

**Univerzitet u Beogradu  
Fakultet Veterinarske medicine**

**Nataša S. Rajić Savić**

**Fenotipske i genotipske karakteristike  
koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz  
vimeni krava**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2013.**

Komisija za odbranu Doktorske disertacije

Mentor : Dr. Vera Katić, redovni profesor za užu naučnu oblast Higijena i tehnologija mleka,  
Fakultet Veterinarske medicine, Beograd

Članovi:

Dr. Zora Mijačević, redovni profesor za užu naučnu oblast Higijena i tehnologija mleka,  
Fakultet Veterinarske medicine, Beograd

Dr. Branko Velebit, naučni saradnik, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

Datum odbrane. 2013.

Najiskreniju zahvalnost za ostvarivanje ovog rada dugujem mentoru Prof. Dr. Veri Katić za svu pomoć koju mi je pružila od početka rada, usmeravajući ga i prateći sve faze rada, dajući mi stručnu pomoć, pomoć u izvođenju praktičnog dela, savete i podršku, kao i nesebičnu pomoć tokom pisanja rada. Obzirom da je bila stalno prisutna na najpozitivniji mogući način, ovaj rad smatram zajedničkim delom.

Prof. Dr. Zori Mijačević se zahvaljujem za sve korisne savete i sugestije.

Zahvaljujem se Dr. Branku Velebitu za stručnu i tehničku pomoć u izvođenju molekularnih metoda i uspešnoj saradnji tokom eksperimentalnog dela rada.

Koleginici Svetlani Čolović se iskreno zahvaljujem za pomoć pri imunološkom ispitivanju enterotoksina stafilokoka.

Najveći deo rada je nastao u dijagnostičkoj laboratoriji PKB Korporacije i zato dugujem bezgraničnu zahvalnost kolegama i tehničarima laboratorije, koji su mi pomogli da, uz redovan posao, uradim najveći deo eksperimentalnog ispitivanja.

Mojoj porodici, suprugu Zoranu i sinu Stanislavu, dugujem iskrenu zahvalnost na razumevanju i strpljenju.

Ovaj rad posvećujem roditeljima.

## **Fenotipske i genotipske karakteristike koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz vimena krava**

### Kratak sadržaj

Mastitis je najčešće obolenje mlečnih krava i uzrok je najvećih gubitaka u primarnoj proizvodnji mleka u svetu, a najčešće su izazvani koagulaza pozitivnim stafilokokama. Rezistencija stafilokoka izolovanih u slučajevima mastitisa prema antimikrobnim sredstvima je u porastu i prati rezistenciju stafilokoka izolovanih u slučajevima oboljenja ljudi, pre svega na penicilin i ampicilin, kao i na preparate iz drugih grupa antimikrobnih lekova. Najznačajniji toksini koji stvaraju koagulaza pozitivne stafilokoke su enterotoksini i imaju veliki značaj za zdravlje ljudi, jer izazivaju alimetarne intoksikacije, a mleko i proizvodi od mleka predstavljaju rizične proizvode u kojima se enterotoksini mogu naći. Novija istraživanja pokazuju da do 93,6% stafilokoka izolovanih u slučajevima mastitisa ima sposobnost da stvara jedan ili više enterotoksina.

Cilj istraživanja je bio da se utvrdi da li postoji razlika u fenotipskim i genotipskim karakteristikama koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka uzetih u slučajevima latentne infekcije, subkliničkih mastitisa i kliničkih mastitisa krava u različitim fazama laktacije i da li postoji veza između osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka na antimikrobne lekove i prisustva gena za stvaranje enterotoksina.

Uzorci mleka za bakteriološko ispitivanje na uzročnike mastitisa su uzeti iz pojedinih četvrti vimena od 9.181 krave u različitim fazama laktacije sa tri farme. Kod svih (830) izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka koji su izolovani iz uzoraka mleka uzetih u različitim fazama laktacije ispitana je osetljivost disk difuzionom metodom po Kirbi Bauer-u na odabrane antimikrobne lekove. Za ispitivanje rezistencije na meticilin oksi testom sa oksicilinom i cefoksitinom ispitano je 373 izolata za koje je disk difuzionim testom utvrđeno da su rezistentni na penicilin G. Za ispitivanje biohemijskih osobina i sposobnosti sinteze enterotoksina odabrano je 50 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava sa subkliničkim mastitisom od kojih je za 35 (78,6%) izolata disk difuzionom metodom utvrđeno da su rezistentni na penicilin G i 15 (21,4%) izolata osetljivo na penicilin G. diskovi antimikrobnih lekova sledećih koncentracija: penicilin G 6 $\mu$ g (Torlak), amoksicilin/klavulanska kiselina (20+10  $\mu$ g) (Oxoid), kloksacilin 25  $\mu$ g (Oxoid), amoksicilin 30  $\mu$ g (Torlak), cefaleksin 30  $\mu$ g (Torlak), ceftiofur 30  $\mu$ g (Oxoid), linkomicin 15  $\mu$ g (Oxoid), gentamicin 30  $\mu$ g (Torlak), i tetraciklin 30  $\mu$ g (Torlak).

Ispitivanje sposobnosti sinteze enterotoksina odabranih izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka je rađeno VIDAS™ Staphylococcal enterotoxin test SET2, 30701 (bioMérieux, Francuska). VIDAS SET2 koristi ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) tehniku za direktnu simultanu detekciju sedam tipova enterotoksina (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED i SEE).

Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokoka je urađena na osnovu makromorfoloških osobina (pigmenta kolonija i hemolize na krvnom agaru) i pomoću biohemijskog komercijalnog niza API Staph bioMérieux. Nakon analize genoma *Staphylococcus aureus* „BLAST“ softverom, za ispitivanje su izabrani sledeći geni: *ftsZ* – koji je „housekeeping“ gen, odnosno gen karakterističan za *Staphylococcus aureus* i koji se uvek ispoljava, zatim gen *sea* – koji kodira sintezu stafilokoknog enterotoksina A, *seb* – koji kodira sintezu stafilokoknog enterotoksina B i gen *sed* – koji kodira sintezu stafilokoknog enterotoksina D.

Koagulaza pozitivne stafilokoke su izolovane iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava na sve tri ispitivane farme: na farmi I utvrđeno je 8,38% latentnih infekcija i subkliničkih mastitisa, na farmi II 17,20% latentnih infekcija i subkliničkih mastitisa, a na farmi III 1,64% latentnih infekcija i subkliničkih mastitisa izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokokama. Ispitivanjem makromorfoloških karakteristika utvrđeno je da 96% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka imaju, zlatnožuti pigment, a samo 4% izolata nije imalo zlatnožuti pigment. Svi izolati su stvarali hemolizine, najčešće beta hemolizin (50% izolata), zatim alfa plus beta hemolizin (36% izolata), beta plus delta hemolizinon (8% izolata), delta hemolizin (4% izolata) i alfa hemolizin 2% izolata. Na osnovu biohemijskih osobina izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka su najčešće identifikovani kao *S. aureus* (88%), zatim *S. chromogenes* (4%), *S. intermedius* (2%), *S. xylosus* (2%), *S. sciuri* (2%) i *S. lentus* (2%). Najveći procenat izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, izolovanih iz uzoraka mleka krava u slučajevima latentne infekcije i subkliničkih mastitisa, rezistentnih na penicilin G je utvrđen na farmi sa umerenom prevalencijom mastitisa (70,4% izolata), zatim na farmi sa visokom prevalencijom mastitisa (60,2% izolata), a najmanji na farmi sa niskom prevalencijom (43,7% izolata). Makrodilucionom metodom je za izolate koagulaza pozitivnih stafilokoka utvrđena minimalna inhibitorna koncentracija penicilina G za izolate koji su disk difuzionom metodom ocenjeni kao rezistentni je bila (MIC 90) 32 µg/ml i (MIC 50) 8 µg/ml (MIC 90), a za izolate koji su disk difuzionom metodom ocenjeni kao osetljivi minimalna inhibitorna koncentracija penicilina G je bila 0,03 µg/ml (MIC 50) i 2 µg/ml (MIC 90). Ispitivanjem fenotipske otpornosti na meticilin, ustanovljena je otpornost kod 3,75% izolata na 1µg oksacilina, a ni jedan izolat nije bio otporan na 30µg cefoksitina. Ni kod jednog od 50 ispitivanih izolata

koagulaza pozitivnih stafilokoka, kod kojih je makrodilucionom metodom utvrđena rezistencija na penicilin G, nije dokazano prisustvo *mecA* gena. Primenom ELISA metode utvrđeno je da 20 % izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, koje su na osnovu fenotipskih i genotipskih osobina, identifikovane kao *S. aureus*, ima sposobnost sinteze klasičnih enterotoksina (A, B, C, D i E). Koagulaza pozitivne stafilokoke osetljive na penicilin G su češće stvarale klasične enterotoksine (53,33% izolata) nego koagulaza pozitivne stafilokoke rezistentne na penicilin G (8,57% izolata).

Prisustvo gena za sintezu enterotoksina dokazano je samo kod jednog od 10 izolata kod kojih je ELISA metodom utvrđena sposobnost sinteze enterotoksina. Dokazan je gen za sintezu enterotoksina B.

Ključne reči: koagulaza pozitivne stafilokoke, infekcija, mastitis, prevalenca, pigment, hemoliza, identifikacija, antimikrobna osetljivost, rezistencija na meticilin, enterotoksini

Naučna oblast: Veterinarska medicina  
Uža naučna oblast: Higijena i tehnologija mleka  
UDK 575.2:599.735.5.

## **Phenotype and genotype characteristics of coagulase-positive staphylococci isolated from cows udder**

### Summary

Mastitis in dairy cows is the persistent, inflammatory reaction of udder tissue. Mastitis cause the greater losses on primary production in milk in world, and most prevalence pathogens are coagulase-positive staphylococci. Resistance of staphylococci into the isolated in bovine udder a cases of mastitis on antimicrobial agents increasing and monitoring resistance of isolated staphylococci in cases in humans infections, especially of penicillin and ampicillin, as well as the preparation of other groups of antibiotics. The main toxins produced coagulase positive staphylococci are enterotoxins and have great significance of human health, causing alimentary intoxication. Milk and milk products are risk factors for enterotoxins existing. Recent research shows that up to 93,6% of staphylococci isolated in cases of mastitis in the ability to produces one or more enterotoxins.

The aim of this study was to determine whether there are differences in phenotypic and genotypic characteristics of coagulase-positive staphylococci isolated from milk samples taken in cases of latent infection, mastitis, subclinical and clinical mastitis at different stages of lactation, and whether there is a link between susceptibility of coagulase-positive staphylococci antimicrobial drugs and the presence of genes for production of enterotoxins.

Milk samples for bacteriological examination of the causes of mastitis are taken from individual quarters of the udder from 9,181 cows at different stages of lactation from three farms. In all (830) isolates of coagulase-positive staphylococci, isolated from milk samples taken at different stages of lactation examined the sensitivity of disk diffusion method by Kirby-Bauer in the selected antimicrobials. To test resistance to methicillin oxy test with oxacillin and cefoxitin were examined 373 isolates for which the disk diffusion assay showed that are resistant to penicillin G. For the investigation of biochemical properties and the ability to synthesize enterotoxin of 50 selected isolates of coagulase-positive staphylococci isolated from milk samples of cows with subclinical mastitis of which is 35 (78.6 %) isolates by disk diffusion method showed that are resistant to penicillin G and 15 (21,4 %) isolates susceptible to penicillin G. Drives the following concentrations of antibiotics: penicillin G 6 $\mu$ g (Torlak), amoxicillin/clavulonic acid (20+10mg) (Oxoid), cloxacillin 25 mg (Oxoid), amoxicillin 30 mg (Torlak), cephalixin 30 mg (Torlak), ceftiofur 30 mg (Oxoid), lincomycine 15 mg (Oxoid), gentamicine 30 mg ( Torlak ) and tetracycline 30 mg (Torlak).

Investigation of enterotoxin synthesis selected isolates of coagulase-positive staphylococci was done VIDAS™ Staphylococcal enterotoxin test SET2, 30701 (bioMérieux, France). VIDAS SET2 using ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) technique for direct simultaneous detection of seven types of enterotoxins (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED and SEE).

Identification of coagulase-positive staphylococci was performed based on macromorphological characteristics (pigment and hemolytic colonies on blood agar) and by a series of biochemical commercial API Staph bioMérieux. After analysis of the genome of *Staphylococcus aureus* "BLAST" software for testing were selected following genes : *ftsZ* - which is the " housekeeping " gene, or a gene characteristic of *Staphylococcus aureus* that is always expressed , then the *sea* gene - which encodes the synthesis of staphylococcal enterotoxin A, *seb* - encoding the synthesis of staphylococcal enterotoxin B gene and *sed* - which encodes the synthesis of staphylococcal enterotoxin D.

Coagulase-positive staphylococci were isolated from milk samples taken from individual udder quarters on all three farms: I first farm were found 8,38% of latent infections and subclinical mastitis on the farm II 17,20 % of latent infections and subclinical mastitis, and farm III 1,64 % latent infection and subclinical mastitis caused by coagulase-positive staphylococci. The study macromorphological characteristics showed that 96% of isolates of coagulase positive staphylococci have golden-yellow pigment and only 4% of the isolates had no golden-yellow pigment. All isolates were hemolysin producer, usually beta hemolysin (50% of isolates), and alpha plus beta hemolysin (36% of the isolates), beta plus delta hemolysin (8% of the isolates ), delta hemolysin (4 % of the isolates) and alpha hemolysin 2 % of the isolates. Based on the biochemical properties of isolates of coagulase-positive staphylococci are commonly identified as *S. aureus* (88%), followed by *S. chromogenes* (4 %), *S. intermedius* (2%), *S. xylosus* (2%), *S. sciuri* (2%) and *S. lentus* ( 2%). The highest percentage of isolates of coagulase- positive staphylococci isolated from milk samples of cows in cases of latent infection and subclinical mastitis resistant to penicillin G was found on a farm with a moderate prevalence of mastitis (70,4 % of isolates), followed by farms with a high prevalence of mastitis (60,2 % of isolates), and at least on a farm with a low prevalence (43,7% of isolates). Macrodilution method for isolates of coagulase-positive staphylococci determined minimum inhibitory concentration of penicillin G for isolates that were evaluated by disk diffusion method was as resistant (MIC<sub>90</sub>) 32 mg / ml (MIC<sub>50</sub>) 8 mg /ml (MIC<sub>90</sub>), and isolates that disk diffusion method rated as susceptible minimum inhibitory concentration of penicillin G was 0,03 mg/ml (MIC<sub>50</sub>) and 2mg/ml (MIC<sub>90</sub>). The study of phenotypic



resistance to methicillin, resistance were found in 3,75% of the isolates to oxacillin 1µg, and no isolate were resistant to 30µg cefoxitin disk. In any of the 50 tested isolates of coagulase-positive staphylococci, in which the macrodilution method determined resistance to penicillin G, it proved the presence of the *mecA* gene. By ELISA method showed that 20% of the isolates of coagulase- positive staphylococci, which are based on phenotypic and genotypic characteristics, identified as *S. aureus* has the ability to synthesis classical enterotoxins (A, B, C, D and E). Coagulase-positive staphylococci sensitive to penicillin G are often created the classical enterotoxins (53,33% of isolates) than coagulase-positive staphylococci resistant to penicillin G (8,57 % of the isolates).

The presence of genes for the synthesis of enterotoxin has been shown in only one of 10 isolates for which was determined by ELISA synthesise enterotoxin. Demonstrated the gene for the synthesis of enterotoxin B.

Keywords: coagulase-positive staphylococci, infections, mastitis, prevalence, pigment, haemolysis, identification, antimicrobial susceptibility, resistance to methicillin, enterotoxins

Scientific area: Veterinary medicine

Special topics: Hygiene and Milk Technology

UDK number: 575.2:599.735.5.

## SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD   | 1  |
| 2. PREGLED LITERATURE   | 4  |
| 2.1. Nalaz i izolovanje koagulaza pozitivnih stafilokoka iz vimena krava  | 4  |
| 2.2. Makromorfološke karakteristike koagulaza pozitivnih stafilokoka  | 10 |
| 2.2.1. Pigment  | 10 |
| 2.2.2. Hemoliza   | 12 |
| 2.3. Identifikacija vrsta koagulaza pozitivnih stafilokoka  | 15 |
| 2.3.1. Identifikacija na osnovu biohemijskih osobina  | 15 |
| 2.3.2. Genotipska identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokoka   | 16 |
| 2.4. Ispitivanje osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka na antimikrobne lekove   | 17 |
| 2.4.1. Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka na penicilin  | 18 |
| 2.4.2. Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka na ostale antibiotike   | 19 |
| 2.4.3. Rezistencija koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz vimena krava na antibiotike  | 23 |
| 2.4.4. Rezistencija na meticilin koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz vimena krava  | 29 |
| 2.5. Enterotoksini koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz vimena krava  | 32 |
| 2.5.1. Sposobnost sinteze enterotoksina koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz mleka krava                                      | 32 |
| 2.5.2. Značaj enterotoksogenih stafilokoka u mleku i potencijalni rizik za zdravlje ljudi   | 35 |
| 3. CILJEVI I ZADACI   | 39 |
| 4. MATERIJAL I METODE   | 40 |
| 4.1. Materijal  | 40 |
| 4.1.1. Uzorci mleka   | 40 |
| 4.1.2.1. Izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka za ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove                                    | 40 |
| 4.1.2.2. Izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka izdvojeni kao karakteristični za ispitivanje fenotipskih i genotipskih karakteristika | 41 |
| 4.1.3. Podloge za izolovanje koagulaza pozitivnih stafilokoka   | 41 |
| 4.1.3.1. Krvni agar sa eskulinom i ferocitratom za izolovanje koagulaza pozitivnih stafilokoka iz uzoraka mleka                         | 41 |

|   |    |
|---|----|
| 4.1.3.2. API Staph bioMérieux kitovi -----  | 41 |
| 4.1.3.3. Podloga za ispitivanje osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka na odabrane antimikrobne lekove disk difuzionom metodom po Kirbi-Baueru ----- | 41 |
| 4.1.3.4. Podloga za ispitivanje osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka na antimikrobne lekove makrodilucionom metodom -----                          | 42 |
| 4.1.3.5. Podloga i reagensi za ispitivanje genotipskih karakteristika <i>mecA</i> gena, 16S rRNK i <i>nuc</i> gena-----                                     | 43 |
| 4.1.3.6. Podloga za dokazivanje enterotoksina pomoću VIDAS TM Staphylococcal enterotoxin test SET2 -----  | 44 |
| 4.2. Metode -----   | 45 |
| 4.2.1. Uzimanje uzoraka mleka iz pojedinih četvrti vimena krava za bakteriološki pregled -  | 45 |
| 4.2.2. Bakteriološko ispitivanje uzoraka mleka krava na uzročnike mastitisa -----   | 45 |
| 4.2.1. Zasejavanje uzoraka mleka na krvni agar -----  | 45 |
| 4.2.2. Određivanje makromorfoloških karakteristika izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka -   |    |
| -----   | 46 |
| 4.2.2.1. Boja kolonija-----   | 46 |
| 4.2.2.2. Ispitivanje hemolize na krvnom agaru -----   | 46 |
| 4.2.3. Bojenje po Gramu -----   | 46 |
| 4.2.4. Ispitivanje prisustva katalaze -----   | 46 |
| 4.2.5. Ispitivanje sposobnosti koagulacije plazme kunića -----  | 47 |
| 4.2.6. Ispitivanje biohemijskih karakteristika odabranih izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka API Staph bioMérieux kitovima -----                       | 47 |
| 4.2.7. Ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove disk difuzionom metodom -----  | 47 |
| 4.2.8. Ispitivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) na penicilin makrodilucionom metodom u bujonu -----  | 48 |
| 4.2.8.1. Priprema CAMHB bujona za zasejavanje-----  | 48 |
| 4.2.8.2. Zasejavanje bujona sa penicilinom G -----  | 49 |
| 4.2.9. Ispitivanje fenotipske rezistencije na meticilin -----   | 49 |
| 4.2.10. Dokazivanje <i>mecA</i> gena i genotipskih karakteristika koagulaza pozitivnih stafilokoka-   |    |
| -----   | 49 |
| 4.2.11. Dokazivanje sposobnosti sinteze enterotoksina -----   | 51 |
| 4.2.11.1. Priprema izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka za ispitivanje sposobnosti sinteze enterotoksina -----  | 51 |
| 4.2.11.2. Ispitivanje gena za sintezu klasičnih enterotoksina kod stafilokoka -----   | 52 |

## 5. REZULTATI ISPITIVANJA

|  |     |
|--|-----|
| 5.1. Rezultati ispitivanja nalaza koagulaza pozitivnih stafilocoka u uzorcima mleka krava uzetim u različitim fazama laktacije -----               | 54  |
| 5.2. Rezultati identifikacije koagulaza pozitivnih stafilocoka na osnovu makromorfoloških karakteristika i biohemijskih osobina -----              | 55  |
| 5.2.1. Rezultati određivanja pigmenta kolonija -----   | 55  |
| 5.2.2. Rezultati ispitivanja hemolize na krvnom agaru -----  | 56  |
| 5.2.3. Rezultati identifikacije odabranih izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka na osnovu komercijalnog testa API Staph bioMérieux -----        | 56  |
| 5.3. Rezultati ispitivanja osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilocoka na odabrane antimikrobne lekove disk difuzionom metodom -----             | 57  |
| 5.4. Rezultati određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) penicilina G za koagulaza pozitivne stafilocoke makrodilucionom metodom ----- | 72  |
| 5.5. Rezultati fenotipske karakterizacije izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka rezistentnih na meticilin i prisustva <i>mec A</i> gena -----   | 73  |
| 5.6. Ispitivanje sposobnosti sinteze enterotoksina odabranih izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka -----  | 77  |
| 6. DISKUSIJA -----   | 81  |
| 7. ZAKLJUČCI -----   | 104 |
| 8. SPISAK LITERATURE -----   | 106 |

## 1. UVOD

Infekcije vimena krava najčešće izazivaju patogene vrste stafilokoka koje imaju sposobnost da koagulišu plazmu kunića. Najčešće mastitise, od koagulaza pozitivnih stafilokoka izaziva, *Staphylococcus aureus*, a poslednjih godina su kao uzročnici mastitisa dokazani i *S. intermedius* i *S. hyicus*. *Staphylococcus aureus* u mleku i proizvodima od mleka stvara enterotoksine koji dovode do intoksikacija ljudi. U većini zemalja u svetu intoksikacija enterotoksinima stafilokoka jedna je od najčešće opisanih intoksikacija nastalih posle konzumiranja hrane. U zemljama Evropske unije mleko i sir, proizveden od sirovog mleka, dokazani su kao izvor enterotoksina u 1-9% (prosečno 4,8%) alimentarnih intoksikacija izazvanih enterotoksinima *S. aureus*. U Republici Srbiji postoji tradicija proizvodnje sireva od sirovog mleka, pa takvi sirevi, ako potiču od mleka krava obolelih od mastitisa izazvanih stafilokokama koje imaju sposobnost stvaranja enterotoksina, mogu da predstavljaju rizik za zdravlje ljudi. Poslednjih godina u humanoj medicini ima sve više izveštaja o pojavi stafilokoka rezistentnih na meticilin (methicillin resistant *Staphylococcus aureus* -MRSA), pa se razmatra uloga multirezistentih sojeva koagulaza pozitivnih stafilokoka, izolovanih iz mleka, u nastanku meticilin rezistentnih stafilokoka. Sojevi stafilokoka rezistentni na meticilin su utvrđeni i u slučajevima mastitisa krava, iako meticilin nije korišćen u terapiji mastitisa. U pogledu virulencije MRSA imaju karakteristike kao i ostale stafilokoke, ali zbog njihove otpornosti na antimikrobne lekove uzrokuju teško izlečive infekcije.

Koagulaza pozitivne stafilokoke (*Staphylococcus aureus* i *S. intermedius* i *S. hyicus*) najčešći uzročnici zaraznog zapalenja vimena, međutim, mogu se izolovati iz mleka i u slučajevima latentne infekcije vimena. Poseduju brojne mehanizme virulencije kojima prodiru u vime i opstaju u tkivu. Prevalencija sojeva stafilokoka, izolovanih u slučajevima mastitisa, rezistentnih prema antimikrobnim lekovima je u porastu i slična je pojavi rezistencije sojeva izolovanih u slučajevima oboljenja ljudi, pre svega rezistencije na penicilin i ampicilin, ali i na lekove iz drugih grupa antibiotika. U intenzivnom uzgoju, gde postoji dobar menadžment proizvodnje mleka i racionalna upotrebe lekova, nivo rezistencije stafilokoka na antimikrobne lekove je niži u poređenju sa izolatima stafilokoka iz mleka krava sa farmi gde takva praksa ne postoji.

Rezistencija stafilokoka na antibiotike je češća kod izolata u zapaštima sa većim brojem intramamarnih infekcija. Neselektivna primena antibiotika i njihovo prisustvo u sredini gde borave životinje je dovela do selekcionisanja rezistentnih sojeva. Stalna unakrsna kontaminacija između stafilokoka koje izazivaju oboljenja ljudi i stafilokoka koje izazivaju mastitise krava podstiče stvaranje novih oblika rezistencije. Osnovni mehanizam rezistencije koagulaza pozitivnih stafilokoka je zasnovan na sintezi i lučenju enzima beta laktamaze koja hidrolizuje labilne beta laktamske lekove (penicilin G i ampicilin) i sprečava njihovo vezivanje za ćelijski zid. Beta laktamski lekovi (kloksacilin, meticilin, oksacilin, amoksicilin plus sublaktam i cefalosporini) otporni na dejstvo beta laktamaze najčešće su otporni na delovanje slobodne beta laktamaze, međutim, rezultati novijih istraživanja pokazuju da se selekcionisanjem sojeva, koji imaju sposobnost hiperprodukcije beta laktamaze, razvija rezistencija i na te lekove. Efikasnost tih antimikrobnih lekova je različita, međutim, oni predstavljaju lek izbora u terapiji mastitisa izazvanih stafilokokama koje imaju sposobnost hiperprodukcije beta laktamaze. Potvrđeni su slučajevi subkliničkog mastitisa krava izazvanih sa meticilin rezistentnim stafilokokama koje su bile genotipski i fenotipski identične sa izolatima poreklom sa opreme i ruku radnika koji su bili u kontaktu sa kravama obolelim od subkliničkog mastitisa. Prisustvo MRSA u mleku ukazuje na mogućnost da se ove stafilokoke mogu naći i u proizvodima od mleka. MRSA ekspimiraju hromozomski *mecA* gen koji kodira sintezu penicilin vezujućeg proteina PBP2 za bakterijsku ćeliju, tako što menjaju redosled aminokiselina i on postaje neprepoznatljiv za beta laktamske lekove. MRSA su rezistentne na sve peniciline, cefalosporine i karbapeneme, a često, i na ostale grupe antimikrobnih lekova. Obzirom da se meticilin nije koristio u terapiji krava, zaključeno je da su MRSA prenete preko mužača na krave. Istraživanja u Republici Srbiji su pokazala da su koagulaza pozitivne stafilokoke najčešće rezistentne na penicilin G, a da u odnosu na lekove otporne na dejstvo penicilinaze pokazuju dobru osetljivost. Pravilna terapija podrazumeva primenu sredstva koje je najefikasnije u odnosu na uzročnik *in vitro*, jer postoji pozitivna korelacija između rezultata antibiograma i efikasnosti terapije. U cilju izbora najboljeg leka za terapiju ispituje se osetljivost mikroorganizma koji je izazvao bolest na dejstvo leka *in vitro*. Najčešće se u praksi u tu svrhu primenjuje Agar difuziona metoda.

Precizniji podaci osetljivosti neke bakterije na antimikrobne lekove se dobijaju primenom mikrodilucione metode kada se utvrđuje minimalna inhibitorna koncentracija određenog antimikrobnog leka (MIK). Visoka usaglašenost rezultata ove dve metode je utvrđena u odnosu na gentamicin, meticilin, hloramfenikol i kanamicin, međutim, u slučaju ispitivanja osetljivosti na penicilin i ampicilin ustanovljena su odstupanja.

Prema ranijim istraživanjima samo mali procenat stafilokoka, izolovanih u slučajevima mastitisa, je imao sposobnost da stvara enterotoksine. Međutim, novija istraživanja pokazuju da do 93,6% izolovanih stafilokoka, uzročnika mastitisa, ima sposobnost da stvara jedan ili više enterotoksina. Kod zdravih krava, u slučajevima latentne infekcije, zastupljenost sojeva koji stvaraju enterotoksine je mala (3,9-6%), međutim, u slučajevima mastitisa učestalost pojave sojeva koji stvaraju enterotoksine je daleko veća (14,6-41,3%). Stafilokoke izolovane u slučajevima mastitisa najčešće stvaraju enterotoksine A, B, C, D i E. Sposobnost stvaranja enterotoksina naročito je izražena kod sojeva kod kojih je utvrđena rezistenciju na antibiotike. Uslovi sredine u pogledu pH, temperature, kiselosti, aktivnosti vode itd. pogoduju sintezi određenog enterotoksina. Ispitivanjem genoma stafilokoka uzročnika mastitisa, utvrđena je povezanost gena koji kodiraju rezistenciju na određene antibiotike, gena za stvaranje koagulaze i gena za stvaranje enterotoksina. Genom stafilokoka sadrži oko tri miliona parova baza. Genetski materijal je organizovan na više nivoa. Faktori virulencije i osnovni metabolički procesi su kodirani bakterijskim hromozomom. Može se javiti i u varijanti pseudogenoma, kao posledica tačkastih mutacija ili umetnutih genetskih elemenata, u kojem se nalaze geni koji imaju ulogu u patogenezi bolesti. U prenošenju nekih osobina unutar vrste, ali i između srodnih vrsta, veliku ulogu imaju profagi. Rezistencija na antimikrobne lekove je određena kasetnim hromozomima u različitim varijantama plazmida ili transpozona. Ostrvca patogenosti su mobilini genetski elementi koji mogu da se prenose unutar bakterijske vrste. Oni su nosioci gena za sintezu enterotoksina, toksičnog šok sindroma, kao i  $\beta$  laktamaze. Diverzitet hromozoma u okviru bakterijskog genoma omogućava da, kada jednom steknu neku osobinu, disperguju je na više genetskih elemenata i tako je zaštite.

## **2. PREGLED LITERATURE**

### **2.1. Nalaz i izolovanje koagulaza pozitivnih stafilokoka iz vimena krava**

#### **Učestalost mastitisa izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokokama**

Mastitis je kao značajno oboljenje definisan pre 60 godina. Ovim oboljenjem je zahvaćeno oko 50% mlečnih krava (Atyabi i sar., 2006). Koagulaza pozitivne stafilokoke mogu izazvati sve forme mastitisa: akutan supurativan oblik, gangrenozni ili hronični oblik (Oliver i sar., 2004).

Prevalencija koagulaza pozitivnih stafilokoka uzročnika kliničkog mastitisa krava je različita. Obolevaju životinje svih starosnih kategorija, ali se najčešće javlja kod životinja starosti 4-7 godina (Ameh i sar., 1999). Kod mladih životinja je češća akutna infekcija sa vidljivo promenjenim mlekom (Younis i sar., 2000). Kao najčešći uzročnik infekcije vimena krava dokazane su koagulaza pozitivne stafilokoke (National Mastitis Council 2004; Malinowski i sar., 2002; Oliver i sar., 2004; Torben i sar., 2006; Peles i sar., 2007; Russi i sar., 2008; Mubarack i sar., 2012; Akineden i sar., 2001). *S. aureus* je ubikvitarni mikroorganizam koji se može naći na koži i sluzokoži životinje i u njenoj okolini. Prisustvo stafilokoka u vimenu ima uticaj na povećanje broja somatskih ćelija u mleku ali i smanjenje količine mleka nakon telenja (Ameh i sar., 1999; Farzana i sar., 2004; Atyabi i sar., 2006; Bennedsgaard i sar., 2006; Ferguson i sar., 2007; Tenhagen i sar., 2009; DaRong i sar., 2010; Klimienė i sar., 2011).

Primena određenih tehnoloških postupaka, koji se sprovode u proizvodnji mleka, ima veći značaj za kontrolu stafilokoknih infekcija u odnosu na druge uzročnike mastitisa. Faktori koji utiču na diverzitet patogenih mikroorganizama i pojavu mastitisa u stadu su mnogobrojni: kapacitet farme, menadžment i obučenosť osoblja. Značajne za nastanak mastitisa su karakteristike vimena, prisustvo oštećenja na papilama, higijena objekta i životinja (National Mastitis Council 2004; Ameh i sar., 1999; Sumathi i sar., 2008; Mubarack i sar., 2012). Na pojavu i širenje infekcije u stadu utiču i telenje u toplom periodu, loša higijena, neadekvatna tehnologija muže, zapati životinja sa visokim brojem somatskih ćelija, prisustvo drugih patogenih mikroorganizama u stadu, ishrana teladi sa mlekom životinja obolelih od mastitisa, kontakt između teladi i između mladih i starijih životinja, neodgovarajuća zdravstvena zaštita životinja. Kod krava, kod kojih



je utvrđena intramamarna infekcije koagulaza pozitivnim stafilokokama pre telenja, česće dolazi do pojave kliničkog mastisa na početku laktacije. Tokom muže, u najvećem broju slučajeva, dolazi do kontakta između mužača i životinje, tako da je moguća razmena izolata sa ljudi na životinje, što može biti uzrok nastanka mastitisa kod mlečnih krava (National Mastitis Council 2004; Adesiyun i sar., 1999).

Prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka u vimenu ne znači nužno i mastitis. U vimenu se može uspostaviti odnos domaćin-patogeni mikroorganizam kada nema znakova infekcije, a uzročnik se izlučuje mlekom. Latentno inficirano vime krava je izvor infekcije za zdrave krave, a infekcija može da se razvije u mastitis. Nalaz 10% i više krava u zapatu sa infekcijom vimena, izazvanom koagulaza pozitivnim stafilokokama, se smatra visokom prevalencijom, 5-6% i manje potvrđenih infekcija vimena krava koagulaza pozitivnim stafilokokama se smatra niskom prevalencijom (Roberson i sar., 1994; Roberson i sar., 1996).

Učestalost infekcije vimena krava je najveća u poslednjem trimestru graviditeta. Iz 35.5% uzoraka kolostruma se mogu izolovati različite vrste stafilokoka, a među njima i koagulaza pozitivne. U situacijama pojave kliničkog mastitisa u stadu neposredno pre i nakon telenja *S. aureus* dominira kao uzročnik u čistoj kulturi, i nešto ređe u mešanoj kulturi sa drugim mikroorganizmima. Mleko krava iz zapata sa visokim brojem četvrti vimena krava inficiranih *S. aureus* predstavljaju rizik po zdravlje ljudi (Peles i sar., 2007).

U Finskoj se od 1980. godine redovno određuje broj somatskih ćelija u zbirnom mleku u cilju ocene kvaliteta mleka i praćenja mastisa na farmi. Na osnovu tih ispitivanja primenjeni su programi za suzbijanje mastitisa. Kao rezultat suzbijanja mastitisa u periodu 1988.-1995. učestalost mastitisa izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokokama je smanjena sa 48% na 38%. Broj krava inficiranih *S. aureus* je smanjen kod prvotelki i drugotelki, a kod starijih krava nije bilo razlike u učestalosti infekcije. U periodu 1995.-2001. godine prevalencija četvrti vimena krava obolelih od mastitisa je smanjena sa 38% na 31%, međutim učestalost infekcija *Staphylococcus aureus* nije smanjena (Pitkala i sar., 2004). Prema Myllys i sar. (1998) stafilokoke su i dalje najznačajniji uzročnici mastitisa, s tim da je prevalencija *S. aureus*-a u opadanju dok je prevalencija koagulaza negativnih stafilokoka u porastu. U SAD utvrđeno da je intramamarna

infekcija kod krava bila zastupljena u 97% stada i 75% četvrti vimena. Najčešći uzročnici infekcije su bili *Staphylococcus aureus*, ali i *Staphylococcus hyicus* i *Staphylococcus chromogenes*. Broj somatskih ćelija se kretao  $12.4 - 17.3 \times 10^6$ /ml mleka (Nickerson, 2009).

Ispitivanjem zbirnog mleka na prisustvo koagulaza pozitivnih stafilocoka se može ustanoviti pojava novih intramamarnih infekcija u stadu (Reyher i sar., 2011). U Mađarskoj je utvrđen nivo kontaminacije zbirnog mleka sa *Staphylococcus aureus*  $6 \times 10^3$  cfu/ml (Peles i sar., 2007). Ispitujući nalaz stafilocoka u zbirnom mleku Sato i sar. (2004) su utvrdili koagulaza pozitivne stafilokoke u 60% uzoraka mleka sa farmi SAD i 55% uzoraka mleka sa farmi u Danskoj. Manja učestalost nalaza *S. aureus* u uzorcima zbirnog mleka je utvrđena u Bangaloru (24%) (Sumathi i sar., 2008) i u Nemačkoj (5.7%) (Tenhagen i sar., 2006).

Prevalencija *S. aureus* u zbirnom mleku se kreće 11,7% u Argentini (Neder i sar., 2012), 10,8%, 37,5% i 41,7% u Brazilu (Fergundes i sar., 2010; Arcuri i sar., 2010); 20,8% u Iranu (Ebrabim i sar., 2012); 22,5% u Latviji (Rafaels i sar., 2006); 37,8% i 75% u Norveškoj (Jorgensen i sar., 2005a); 100% u Trinidadu (Adesiyun i sar., 1998). Prevalencija *S. aureus* je u porastu i u Indiji (Unakal i sar., 2010). Učestalost nalaza *S. aureus* u uzorcima zbirnog mleka (61%) i pojedinačnog mleka (51,4%) iz stada, koje je oslobođeno do kliničkog oblika mastitisa, je mnogo veće nego što govore ranija istraživanja (Adesiyun i sar., 1999). Koagulaza pozitivne stafilokoke se češće nalaze kod starijih krava kao uzročnici intramamarne infekcije, dok se kod mlađih životinja češće javlja zapaljenski proces sa povećanim brojem somatskih ćelija u mleku (Tenhagen i sar., 2006). U Danskoj 49% krava pripada rizičnoj grupi za nastanak infekcije, a prevalencija *Staphylococcus aureus* kod rizičnih grupa krava je iznosila 29% (Benedsgarrd i sar., 2006). U nekim zemljama *S. aureus* ili koagulaza pozitivne stafilokoke se ređe izoluju iz vimena krava (Peles i sar., 2007). Prevalencija *S. aureus* u Iranu je, tokom četvorogodišnjeg perioda ispitivanja, iznosila 2,94; 2,5; 2,12 i 4,84% (Atyabi i sar., 2006).

Prevalencija *S. aureus* izolovanog iz mleka krava u periodu 2002.-2004. godine u evropskim zemljama je različita. U Danskoj je iznosila 44% u periodu 2002. i 2003. godina, dok za 2004. nema podataka. U Engleskoj je ustanovljena prevalencija 10,51%;

8,8% i 6,4%. U Francuskoj je u periodu 2002. godina prevalencija iznosila 6-9,2%; tokom 2003. godine 1,1-7,7%, dok za 2004. godinu nema podataka. U Italiji je tokom 2003. godine zabeležena prevalencija 31%; u Holandiji 25%; 20,69% i 23,51% tokom trogodišnjeg ispitivanja. Za isti period utvrđena je prevalencija *S. aureus* u Španiji 51%; 55% i 56%; u Švedskoj u 2002. godini 33 % a u Švajcarskoj u 2003. godini 78% dok je u 2004. godini bila 83% (Hendriksen i sar., 2008).

Prema rezultatima Apparao i sar. (2009) od svih uzročnika mastitisa u SAD *S. aureus* je zastupljen sa 11%. Kod hronično inficiranih krava *Staphylococcus aureus* je izolovan iz svakog zapata u Izraelu, a u nekim zapatima učestalost nalaza se kretala od 54 do 100% (Younis i sar., 2000).

Prisustvo intramamarne infekcije govori o nekim aspektima menadžmenta. Prvotelke, kod kojih je utvrđena intramamarna infekcija izazvana sa koagulaza pozitivnim stafilokokama, značajan su rezervoar infekcije za neinficirana grla u stadu. Robertson i sar. (1994) su kod 43% ispitanih prvotelki potvrdili infekciju dva meseca nakon telenja. Kod krava kod kojih je utvrđena intramamarna infekcija pre telenja, nakon telenja se povećava broj infekcija. Istraživanje u Argentini je pokazalo je četrnaest dana pre telenja 62,2% ispitivanih četvrti vimena krava bilo inficirano uzročnicima mastitisa, a *S. aureus* je izolovan iz 12,71% ispitivanih četvrti. Nakon telenja *S. aureus* je izolovan iz 21,59% ispitivanih četvrti (Calvinho i sar., 2007). Intramamarne infekcije izazvane *Staphylococcus aureus*, ali i *Staphylococcus hyicus* i *Staphylococcus chromogenes* u SAD su bile dokazane u 97% stada i 75% četvrti vimena u SAD (Nickerson, 2009).

Kod višetelki i hronično inficiranih vimena krava ne mora uvek da postoji korelacija između količine mleka i broja somatskih ćelija (Younis i sar., 2000). Povećan broj somatskih ćelija ukazuje na postojanje infekcije u vimenu, ali i na krave koje imaju predispoziciju za nastajanje mastitisa.

Na osnovu broja somatskih ćelija u zbirnom mleku može se oceniti prevalencija mastitisa u stadu. Prema mišljenju većine autora mleko koje sadrži više od 400.000 somatskih ćelija u mililitru potiče sa farme gde je izražen problem mastitisa u stadu. Međutim, u literaturi su prisutna i mišljenja da je granicu za broja somatskih ćelija za ocenu problema mastitisa u stadu potrebno smanjiti na 300.000 somatskih ćelija u mililitru zbirnog mleka (Pitkala i sar. 2004).

Stafilokoke su najdominantniji uzročnici kliničkih formi mastitisa širom sveta. (Malinowski i sar., 2006; Giannechini i sar., 2002a; Da Rong i sar., 2010; Botrel i sar., 2010; Persson i sar., 2011; Klimienė i sar., 2011). U zapaćtima sa lošom higijenskom i tehnološkom praksom gde se kao uzročnici dominiraju drugi mikroorganizmi, *S. aureus* je ređe izolovan kao uzročnik kliničkog mastitisa (Ameh i sar. 1999).

Prevalencija *Staphylococcus aureus* kod prvotelki i kod starijih krava nije ista. Takođe, u zapaćtima kod kojih ima životinja obolelih od kliničke forme bolesti prevalencija stafilokoknih mastitisa je veća. Ustanovljena je korelacija kliničkog mastitisa u odnosu na *S. aureus* između prvotelki i višetelki (Tenhagen i sar., 2009).

Ustanovljen je i sezonski karakter kliničkog oblika mastitisa, mastitis se češće javlja u kasnu jesen ili ranu zimu (Oliver i sar., 2004). *Staphylococcus aureus* je potvrđen kao uzročnik 50% mastitisa u Danskoj, a spada u najznačajniji uzročnik koji dovodi do povećanja broja somatskih ćelija u mleku (Torben i sar., 2006).

Različiti autori navode da se učestalost *S. aureus*-a kao izazivaća mastitisa kretala 19,97-65% infekcija u stadu. U periodu od 2003 do 2005. godine u Poljskoj je *S. aureus* kao uzročnik mastitisa izolovan iz 8,6% uzoraka mleka. Tokom ranijih perioda ispitivanja, prevalencija *S. aureus* je bila niža (Malinowski i sar., 2006). U zapadnoj Etiopiji *S. aureus* je bio izolovan u čistoj kulturi iz 52,4% uzoraka mleka sa povećanim brojem somatskih ćelija (Tariku i sar., 2011). U Litvaniji koagulaza pozitivne stafilokoke su utvrđene kao uzročnici 11,43 – 41,59% infekcija vimena. Prevalencija *S. aureus* u stadima u Izraelu je iznosila 54-100% (Younis i sar., 2000).

Stafilokoke su najčešći (58,1%) uzročnici subkliničkih formi mastitisa (Klimienė i sar., 2011). *Staphylococcus aureus* je bio najčešće izolovan uzročnik kliničkih i subkliničkih mastitisa u Švedskoj (Persson i sar., 2011), Francuskoj (Botrel i sar., 2010), u zapadnoj Poljskoj (Malinowski i sar., 2006). U Urugvaju je dokazan kao uzročnik 37,5% kliničkih mastitisa i 62,8% subkliničkih mastitisa (Giannechini i sar., 2002); u Kini *S. aureus* je identifikovan u 56,1% uzoraka kliničkog i 30,5% subkliničkog mastitisa (Da Rong i sar., 2010). U Francuskoj je izolovan iz 30,2% uzoraka mleka krava sa subkliničkim i 15,8% uzoraka mleka krava sa kliničkim mastitisom (Botrel i sar., 2010). U Kini je izolovan iz 54,3% inficiranih četvrti (Li i sar., 2009); u Etiopiji iz 42,6% uzoraka mleka krava sa subkliničkim mastitisom (Getahun i sar., 2008), na

Novom Zelandu iz 23,5% uzoraka mleka krava sa mastitisom (Petrovski i sar., 2011); u 39,9% slučajeva mastitisa u Španiji (Garcia i sar. 1980); 27,8% u Pakistanu (Arshad i sar., 2006), i u 38% slučajeva u Etiopiji (Argaw i sar., 2008). U Nigeriji u zapaćtima sa lošom higijenskom i tehnološkom praksom, *S. aureus* je izolovan iz 34,6% uzoraka mleka krava sa oboljenjem vimena, dok je iz mleka zdravih krava izolovan iz 16% uzoraka (Ameh i sar., 1999).

U Indiji, *S. aureus* je dokazan u 70,30% infekcija vimena i to 60,46% kliniċkih i 73,77% subkliniċkih mastitisa (Mubarack i sar., 2012).

Prevalencija *S. aureus* u odnosu na koagulaza pozitivne stafilokoke izolovane iz mleka krava obolelih od mastitisa se kreće 32,3% (Shana i sar., 2009), 44,44%, (Ebrahimii i sar., 2009), 57,5% (Arshad i sar., 2006), 63% (Boerlin i sar., 2003), 82,2% (Lamprell i sar., 2004), 97% (Capurro, 1999) 98% (Younis i sar., 2000), 98,25% (da Costa i sar. 2010). *S. aureus* je više zastupljen u stadima sa visokom prevalencijom intramamarnih infekcija (Robertson i sar., 1996).

Pored *S. aureus* u koagulaza pozitivne stafilokoke koje su od znaċaja za nastanak mastitisa najċešće se potvrđuju *S. hyicus* i *S. intermeduius* (Da Costa i sar., 2010; Gaudra i sar., 2005). Takođe, kao uzročnici mastitisa krava dokazane su i *S. lutrae* i *S.pseudointermeduis* (Da Costa i sar. 2010).

Zastupljenost drugih vrsta koagulaza pozitivnih stafilokoka je različita. Prevalencija je veća u stadima sa niskom zastupljenošću intramamarnih infekcija (Robertson i sar., 1996). Smatra se da ove vrste stafilokoka izazivaju lakša i srednje teška zapaljenja. *S. hyicus* je više zastupljen u stadima sa niskom prevalencijom intramamarnih infekcija (Robertson i sar., 1996). Može se izolovati na kraju laktacije i u slučajevima srednje teških hroniċnih infekcija (Robertson i sar., 1996), ali je potvrđen i kao uzročnik kliniċkog mastitisa. (Ebrahimii i sar., 2009). Zastupljenost *S. hyicus* kao uzročnika kliniċke i subkliniċke forme mastitisa se kreće 0,87% (Da Costa i sar., 2010), 1% (Capurro, 1999) i 22,22% (Ebrahimii i sar., 2009).

*Staphylococcus intermedius* se, takođe, može izolovati iz mleka krava obolelih od mastitisa. Njegova prevalencija iznosi 0,2% (Robertson i sar., 1996), 0.87% (Da Costa i sar., 2010), 2% (Capurro, 1999;), 5,55% (Ebrahimii i sar., 2009), 13,3% (Lamprell i sar., 2004)

## 2.2. Makromorfološke karakteristike koagulaza pozitivnih stafilokoka

### 2.2.1. Pigment

Patogene stafilokoke se razlikuju u odnosu na saprofitske vrste i po boji kolonija. Pigment je bitan faktor identifikacije patogenih vrsta (Mubarack i sar., 2012; Liu i sar. 2005). Karakteristika *S. aureus*, ali i nekih sojeva *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii subsp. 1 i 2*, *S. xylosus*, *S. caseolyticus*, *S. sciuri*, *S. lentus* i *S. caprae* je sposobnost sinteze karotenoidnih pigmenata (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2004). Boja kolonija je jedan od prvih kriterijuma za identifikaciju stafilokoka, ali nije dovoljan, obzirom da je pigmentacija nestabilna karakteristika (Wileland i sar., 1994; Begum i sar, 2007). Boja kolonija patogenih vrsta stafilokoka potiče od triterpenoidnih karotenoida, a zavisi od vrste i koncentracije ovih supstanci. Uočen je veliki broj nijansi: od svetlih do tamno žutih ili zlatno žutih. Indeksiranjem boje kolonija, karakterišu se stafilokoke bez ili sa malo pigmenta, odnosno sa dosta pigmenta (Xiong i sar., 1992). Indeksiranje boje kolonija je deskriptivno, tako da neki autori boju kolonija opisuju kao narandžastu, bledo žutu ili žutu (Isrina i sar., 2004). Neki autori kolonije *S. aureus* koje imaju belu boju označavaju kao nepigmentisane (Adesiyun i sar., 1999). Takođe, subkultivisanjem na bakteriološkim podlogama, stafilokoke mogu da izgube osobinu sinteze pigmenta (Liu i sar., 2008). Značajan mehanizam kojim fagociti eliminišu patogene je otpuštanje reaktivnog kiseonika delovanjem NADPH oksidaze. Karotenoidi bakterija u situacijama oksidativnog stresa imaju zaštitnu funkciju i zato pigmentirani sojevi znatno bolje preživljavaju u neutrofilima u odnosu na sojeve koji ne sintetišu pigment (Liu i sar., 2005; Liu i sar. 2008). Podsticajni faktori za sintezu pigmenta su oštećenje metaboličkih puteva, kao što su: ciklus trikarbonskih kiselina, biosinteza purina i oksidativna fosforilacija, a najznačajniji je oštećenje determinanti virulencije. Pretpostavlja se da postoji tesna veza između metaboličkih procesa i ekspresija gena virulencije. Žuto-narandžasti pigment je dokazan kod većine sojeva izolovanih iz kliničkog materijala, što se objašnjava pojačanim naporima bakterije da preživi i pojača virulenciju (Lan i sar., 2010). Ovaj pigment nastaje preko metaboličkog puta sinteze C30 triterpenoida (Katzif i sar., 2005). Stafilokoke koje imaju belu boju kolonija i nemaju sposobnost sinteze karotenoida su osetljivije na dugolančane nezasićene masne

kiseline i 2-monogliceride koji se generišu u velikoj koncentraciji u gnojnim procesima, a imaju antimikrobno delovanje. Lipidi koji se generišu u patološkim procesima stimulišu stafilokoke da proizvode pigment. Preživljavanje stafilokoka u takvim uslovima je u direktnoj vezi sa koncentracijom ali i sa vrstom karotenoida. Obzirom da masne kiseline oštećuju citoplazmatsku membranu, navodi se na zaključak da se stafilokokni karotenoidi ugrađuju u membranu i tako je stabilizuju, održavaju dvoslojnost i smanjuju njenu propustljivost (Xiong i sar., 1992., Wileland i sar., 1994). U procesu biosinteze karotenoidnih pigmenata javljaju se intermedijerna jedinjenja sa osobinama karotenoida, a imaju žuti pigment. Intenzitet žute boje kolonije stafilokoka zavisi od koncentracije karotenoida u njima, a krajnji produkt sinteze karotenoida je stafiloksantin (Wileland i sar., 1994). Prvi tamno žuti pigmenti u visokoj koncentraciji se mogu pojaviti nakon 12 časova inkubacije, a boja se intenzivira nakon produžene inkubacija na sobnoj temperaturi još 24-48 časova. Narandžasti stafiloksantin je uočljiv tek nakon produžene inkubacije. To ukazuje da su geni za sintezu karotenoidnih pigmenata organizovani na dva klastera. Jedan klaster je odgovoran za sintezu 4,4'-diaponeurosporena, a kada ta supstanca dostigne kritičnu koncentraciju, aktivira se drugi klaster i podstiče se sinteza stafiloksantina (Wileland i sar., 1994; Katzif i sar., 2005). Sinteza stafiloksantina je slična sintezi molekula holesterola kod sisara. Blokiranje sinteze stafiloksantina značajno povećava osetljivost stafilokoka prema lekovima i smanjuje verovatnoću preživljavanja u patološkim procesima (Liu i sar., 2008). Sojevi koji produkuju stafiloksantin imaju tanji ćelijski zid za 20% u poređenju sa homologim roditeljskim parovima, veću rezistencija u odnosu na lizostafin, a zabeležen je porast rezistncije prema antimikrobnim sredstvima koja deluju na sintezu ćelijskog zida. Pored toga, ustanovljen je veći prinos karotenoida (Morikawa i sar., 2001). Sigma faktori na genomu stafilokoka su odgovorni za regulisanje nekih stresnih odgovora, ali i proteina hladnog šoka, i predstavljaju podsticajni faktor za sintezu karotenoida.

Uzročnici infekcije vimena krava su značajno više pigmentisani od sojeva izolovanih iz zbirnog mleka (Adesiyun i sar., 1999). Sojevi koji su potvrđeni kao multirezistentni na antimikrobne lekove imaju sposobnost sinteze zlatnog pigmenta (Wileland i sar., 1994; Begum i sar., 2007; El-Jakee i sar., 2010).

### 2.2.2. Hemoliza

U dijagnostici stafilokoka, hemoliza je vrlo bitan faktor za makromorfološku procenu izraslih kolonija na krvnom agaru u kombinaciji sa pigmentom i sposobnošću koagulacije plazme kunića (Boerlin i sar., 2003; Arshad i sar., 2006; Persson i sar., 2011).

Geni koji kodiraju sinezu hemolizina su označeni sa *hla*, *hlb*, *hld*, *hlg* i *hlg-2* (Fueyo i sar., 2005). Hemolizini su egzoproteini, odnosno hromozomski determinisani citotoksini koji pomažu održavanju i širenju stafilokoka u tkivima. Takođe, deluju na eritrocite različitih životinjskih vrsta (Ebrahimi i sar., 2009; Arshad i sar., 2006; Dinges i sar., 2000).

Hemolizini predstavljaju citotoksine *S. aureus*. Kod sojeva koji sintetišu protein toksičnog šok sindroma često se dešava da, kao posledica mutacije i sprečavanja translacije proteina, ne dolazi do ekspresije *hla* gena odgovornog za sintezu alfa hemolizina. Na ekspresiju gena koji *hla*, *hlb* i *arg* gena utiče veliki broj faktora: temperatura od 42°C, tokom srednje eksponencijalne faze rasta; visok osmolaritet koči ekspresiju, a CO<sub>2</sub> je stimuliše (Dinges i sar., 2000). Alfa hemolizin pokazuje aktivnost prema različitim vrstama ćelija. U maloj koncentraciji se vezuje za specifične receptore, dok u visokoj koncentraciji dolazi do nespecifične adherencije na membrane ćelija. Ugrađuje se u membranu ćelije, formira cilindričan heptamer i dovodi do odliva kalijuma i, kao posledično, do ruptur ćelije. Veličina pora se razlikuje u odnosu na vrstu ćelija. Kod keratocita i limfocita je manja i kroz nju prolaze samo monovalentni joni, dok fibroblasti mogu da se regenerišu u slučajevima male koncentracije alfa toksina. Alfa toksin ima veliku ulogu u nastanku patološkog procesa u tkivima. Izaziva nekrozu i skraćanja glatkih mišića krvnih sudova, čime se zaustavlja krvotok u tkivu (Ebrahimi i sar., 2009; Franco i sar., 2008; Atyab i sar., 2006; Dinges i sar., 2000).

Beta hemolizin je enzim sfingomijelinaza C. Hromozomski je determinisan *hlb* genom. Tačna uloga beta hemolizina u tkivima nije dovoljno poznata. Beta hemolizin sam ili kao kofaktor ima aktivnu ulogu u patogenezi mastitisa izazvanog *S. aureus* (Larsen i sar., 2002). Aktivnost beta hemolizina je ograničena na sfingomijelin i lizofosfatidil holin. Stvara se nakon eksponencijalne faze rasta. Na krvnom agaru izaziva senzibilizaciju eritrocita, a pri temperaturi od 10°C dolazi do popuštanja kohezivnih



snaga između proizvoda hemolize što dovodi do kolapsa dvoslojne membrane (Dinges i sar., 2000).

Nekada se oštećenja dešavaju naknadno, naročito kada je beta hemolizin u kombinaciji sa delta hemolizinom (Sabini i sar., 2001).

Gama hemolizin je dvokomponentni egzotoksin koji stvaraju skoro svi izolati *S. aureus*. Sličan je Panten Valentin leukocidinu, *S. aureus* stvara za vreme kasne logaritamske (postekspencijalne) faze rasta. Ne difunduje kroz agar, i iz tog razloga se ne može uočiti na krvnom agaru (Dinges i sar., 2000). Deluje na neutrofile i makrofage, a može da lizira eritrocite nekih sisara.

Delta hemolizin stvara 97% izolata *S. aureus* tokom kasne logaritamske (postekspencijalne) faze rasta. Može da dovede do lize eritrocita i drugih ćelija sisara ali i subcelularnih struktura. Zabeleženo je dermonekrotično delovanje, kao i letalan efekat kod laboratorijskih životinja kada se koristi u visokim koncentracijama. Deluje kao površinski aktivna materija, ali pokazuje i dejstvo slično pčelinjem otrovu (Dinges i sar., 2000).

Alfa hemoliza je češća karakteristika humanih izolata, ali je potvrđena i kod izolata uzročnika kliničnog i subkliničkog mastitisa krava. Prevalencija izolata koji stvaraju alfa hemolizu je različita: 1,6% (Younis i sar., 2000); 2,32% (Sabini i sar., 2001); 6% (Morandi i sar., 2009); 12% (Franco i sar., 2008); 16,5% (Silva i sar., 2000); 20,58% (Unakal i sar., 2010); 22,4% (Singh i sar., 2011; Akineden i sar., 2001); 28,3% (Boerlin i sar., 2003); 37% (Aarestrup i sar., 1999); 43,4% (Wang fei i sar., 2011); 61% (Garcia i sar., 1980); 69% (Takeshinge i sar., 1983); 74,1% (Matsunaga i sar., 1993), a nekih izolata su detektovani zajedno sa beta hemolizinom. Alfa hemoliza je češće ustanovljena kod *S. xylosus* i *S. haemolyticus* koji su izolovani u slučajevima mastitisa (Morandi i sar., 2009). Beta hemoliza je karakteristika bovinih izolata, i najčešće je potvrđena kod uzročnika mastitisa, tako da može poslužiti za brzu identifikaciju uzročnika na krvnom agaru (Arshad i sar., 2006; Boerlin i sar., 2003). Prevalencija beta hemolizina je potvrđena kod 12,5% (Younis i sar., 2000); 29% (Franco i sar., 2008); 34,11% (Wang fei i sar., 2011); 43,3% (Silva i sar., 2000); 46,51% (Sabini i sar., 2001); 54% (Morandi i sar., 2009); 65,5% (Matsunaga i sar., 1993), 72% (Aarestrup i sar., 1999); 75% (Unakal i sar., 2010); 77,5% (Singh i sar., 2011); 90% (Garcia i sar.,

1980); 95,4% Takeshinge i sar., (1983) i 100% (Piccinini i sar., 2012) izolata stafilokoka. Za *hly* gen, koji kodira sintezu beta hemolizina, preko bakteriofaga, insertuju se i neki faktori virulencije koji stupaju u kontakt sa humanim komplementom (Ikawaty i sar., 2010).

Delta hemoliza je najmanje zastupljena kod uzročnika bovinog mastitisa. Međutim, ispitivanjem velikog broja izolata, ustanovljena je kod 12,1% (Matsunaga i sar., 1993); 17,3% (Silva i sar., 2000); 66,5% (Takeshinge i sar., 1983) i 82,45% izolata (Garcia i sar., 1980).

Često se sreću sojevi koji stvaraju više tipova hemolizina: najčešće alfa i beta kod 23,2% (Younis i sar., 2000); 26,8% (Silva i sar., 2000); 37 % (Franco i sar., 2008); 40% (Morandi i sar., 2009) izolata, kao i različite kombinacije hemolizina: alfa-beta-delta kod 25 izolata (Isrina i sar., 2004) i beta-delta (Garcia i sar., 1980; Arshad i sar., 2006). Ne pokazuju sve patogene stafilokoke sposobnost sinteze hemolizina *in vitro*. Ispitivanjem karakteristika stafilokoka uzročnika mastitisa, ustanovljena je značajna zastupljenost nehemolitičnih sojeva: 4,41% (Unakal i sar., 2010); 7,01% (Garcia i sar., 1980); 13,4% (Silva i sar., 2000); 21 % (Franco i sar., 2008); 22,48% (Wang fei i sar., 2011); 27,18% (Akineden i sar., 2001); 51,16% (Sabini i sar., 2001) i 62,7%. (Younis i sar., 2000). Ispitivanjem genoma patogenih stafilokoka zaključuje se da je zastupljenost *hly*, *hly* i *arg* gena koji kodiraju alfa, beta i delta hemolizu, češća nego fenotipsko ispoljavanje hemolize (Wang fei i sar., 2011). Isto tako, ustanovljeni su izolati koji su pokazivali fenotipsku hemolizu, a da nisu imali korespondentne gene (Wang fei i sar., 2011). Kod bovinih izolata je češće ispoljavanje beta hemolize nego kod humanih izolata (Aarestrup i sar., 1999).

Iz zbirnog mleka i proizvoda od mleka mogu se izolovati izolati koagulaza pozitivne stafilokoke sličnih karakteristika (Morandi i sar., 2009; Adesiyun i sar., 1999). Rezultati ispitivanjem *S. aureus*, izolovanih iz obolelog vimena, da stvaraju hemolizu ukazuje da postoji velika razlika u učestalosti nalaza pojedinih hemolizina u odnosu na poreklo izolata (Piccinini i sar., 2012), ali da genomske razlike ne moraju biti velike (Isrina i sar., 2004).

## **2.3. Identifikacija vrsta koagulaza pozitivnih stafilokoka**

### **2.3.1. Identifikacija na osnovu biohemijskih osobina**

Većina veterinarskih laboratorija koagulaza pozitivne stafilokoke koje su izolovane iz mleka krava obolelih od mastitisa označava kao *S. aureus* (da Costa i sar., 2010).

Kombinacija hemolize i koagulaze je jednostavna i brza metoda za identifikaciju *S. aureus*, ali nije dovoljno osetljiva. S druge strane, razdvajanje *S. aureus* od drugih koagulaza pozitivnih vrsta ima klinički značaj (Boerlin i sar., 2003). Stoga postoji potreba da se utvrdi prevalencija *S. aureus*, ali i zastupljenost drugih koagulaza pozitivnih vrsta.

Ustanovljene su jednostavne kombinacije biohemijskih metoda u cilju razdvajanja najčešćih koagulaza pozitivnih stafilokoka. Kao jedan od metoda diferencijacije je kombinacija prisustva hemolize, razlaganje trehaloze i maltoze i stvaranje acetoina (da Costa i sar., 2010; Rall i sar., 2008; Hanaa i sar., 2011), zatim oksidaza, katalaza, oksidaciono-fermentacioni test koagulaza i fosfataza (Unakal i sar., 2010), kombinacija beta hemolize, prisustva koagulaze i DN-aze i fermentacija manitola (Arshad i sar., 2006), prisustvo koagulaze, katalaze, termonukleaze, rast na Baird Parkeru (da Silva i sar., 2000), rast na P agaru sa akriflavinom, prisustvo beta galaktozidaze i hemolitična svojstva na čokoladnom agaru (Capurro, 1999; Gaundra i sar., 2005), kao i na osnovu rasta na manitol slanom agaru, katalaze i makromorfoloških karakteristika (Asfour i sar., 2011).

U upotrebi su i brzi sistemi za identifikaciju kojima se ispituje sposobnost stafilokoka da razlagažu veliki broj šećera, odnos prema nekim supstancama, kao i sposobnost razlaganja nekih jedinjenja u anaerobnim uslovima. Obzirirajući na veliki broj biohemijskih varijeteta, kao i pojave novih sojeva, ovi sistemi imaju ograničenje i moguće su greške u identifikaciji (Rabello i sar., 2005; Capurro, 2009; Singh i sar., 2011). Ove greške su češće kada se ispituju stafilokoke koje su poreklom od životinja, pošto su sistemi za biohemijsku identifikaciju razvijeni za potrebe identifikacije izolata iz kliničkog materijala obolelih ljudi. Greške u identifikaciji mogu da budu i zbog spore ili nedefinisane promene boje reagensa, naročito u slučaju razlaganja trehaloze i

manože (Langlois i sar., 1983). Češće su greške pri identifikaciji izolata stafilokoka koje nisu *S. aureus* (Yunis i sar., 2000; da Costa i sar., 2010; Langlois i sar., 1983).

Pri identifikaciji stafilokoka izolovanih iz mleka krava obolelih od mastitisa, greške mogu nastati i kao posledica primene određenih dezinficijensa koji se koriste za potapanje papila nakon muže, jer mogu da utiču na pojavu novih biotipova. Ovo se češće dešava kod primene sredstava za potapanje na bazi joda (Langlois i sar., 1983).

Kao uzročnik kliničkog i subkliničkog mastitisa krava najčešće je dokazan *S. aureus*, ali i u slučajevima hroničnih infekcija *S. aureus* je metabolički heterogen i ustanovljen je veći broj biohemijskih varijeteta (Rabello i sar., 2005; Langlois i sar., 1983; Yunis i sar., 2000).

Kao uzročnici mastitisa biohemijskim ispitivanjem su utvrđeni *Staphylococcus epidermidis* (Ebrahimi i sar., 2009; Arshad i sar., 2006; Garcia i sar. 1980; Bergdoll, 1980; Robertson i sar., 1996; Capurro, 1999; Capurro, 2009; Langlois i sar., 1983), *S. xylosus* (Boerlin i sar., 2003; Matsunaga 1990), *S. haemolyticus* (Boerlin i sar., 2003; Langlois i sar., 1983); *S. xylosus*. (Langlois i sar., 1983). Opisan je i nalaz *S. agnetis* kao nov koagulaza varijabilan soj izolovan iz mleka krava sa srednje teškim mastitisom, ali i sa vrha papile, koji je filogenetski najbliži sa *S. hyicus* i *S. chromogenes* (Taponen i sar., 2012).

Prilikom identifikacije koagulaza pozitivnih stafilokoka mogu se utvrditi i sojevi koji pripadaju koagulaza negativnim sojevima (Lamprell i sar., 2004; Ebrahimi i sar., 2009). Poređenjem ispitivanja biohemijskih osobina u cilju identifikacije vrste koagulaze pozitivnih stafilokoka sa genetskom identifikacijom, ustanovljena je visoka korelacija između nalaza *S. aureus*, ali znatno manja pri diferencijaciji drugih koagulaza pozitivnih stafilokoka (Langlois i sar., 1983; Boerlin i sar., 2003; da Costa i sar., 2010).

### **2.3.2. Genotipska identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokoka**

U cilju precizne identifikacije mnogih patogenih bakterija, pa i stafilokoka, primenjuju se metode zasnovane na lančanoj reakciji polimeraze (PCR). Ove metode imaju 100% preciznost (Götz i sar., 2006).

U cilju identifikacije koagulaza pozitivnih stafilokoka koriste se različite PCR tehnike kojima se, najčešće, umnožavaju geni za sintezu 16S ili 23S rRNK u cilju razdvajanja *S. aureus* od drugih koagulaza pozitivnih stafilokoka (Haveri, 2008; Singh i sar., 2011; Akineden, 2001; Boerlin i sar., 2003; da Costa i sar., 2010; Capurro, 2009; Götz i sar., 2006). Reakcijom PCR, u identifikaciji *S. aureus*, se umnožavaju specifični delovi DNK koji su karakteristični za tu vrstu.

Kao savremena verzija u identifikaciji mikroorganizama se primenjuje Real time PCR kojim se za znatno kraće vreme dobijaju rezultati. Multipleks PCR metodom se u isto vreme detektuju geni za veći broj osobina kao što su gen za nukleazu (*nuc*), koagulazu (*coa*), *blaZ*, *mec A*, geni za determinaciju brojnih faktora virulencije (*hla*, *hly*, *lukPV*, *clfA*, *spa*, *tstI*, *fnbA*, *fnbB*, *fib*, *map*, *cap5*, *cap8*, *epb*) kao i geni za sintezu enterotoksina (*sea-sev*) (Capurro, 2009; Srinivasan i sar., 2006; Haennil i sar., 2010; Arcuri i sar., 2010; Singh i sar., 2011; Peles i sar., 2007; Agrudin i sar., 2010; Rall i sar., 2008).

#### **2.4. Ispitivanje osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka na antimikrobne lekove**

Odnos prema antimikrobnim lekovima je značajan podatak na osnovu koga se određuje koji antibiotik će se primeniti u terapiji mastitisa izazvanih sa koagulaza pozitivnim stafilokokama.

Jedan od uzroka neuspeha terapije je neadekvatna primena terapije bez prethodnog laboratorijskog ispitivanja. Kao posledica toga se javljaju ekonomski gubici i rezistencija uzročnika na preparate koji se najčešće koriste (Sumathi i sar., 2008; Arslan i sar., 2009).

U terapiji mastitisa krava se, najčešće, primenjuju beta laktamski preparati. Osnova kontrole ovog oboljenja je antimikrobna terapija, a na efekat izlečenja utiču životinja, patogeni mikroorganizam i menadžment u terapiji oboljenja (Russi i sar., 2008; Gentilini i sar., 2000; Owens i sar., 1997).

Ustanovljena je korelacija između rezultata antibiograma i efikasnosti terapije kod novih infekcija, kao i kod infekcija izazvanih stafilokokama osetljivim na penicilin, dok kod hroničnih infekcija postoje odstupanja (Owens i sar., 1997; Barkema i sar., 2006).

Najveći uspeh u terapiji se postiže primenom antibiotika za intramamarnu upotrebu pred zasušenje i iznosi 67-100% izlečenih životinja (Nickerson, 2009). Kod lečenih krava broj somatskih ćelija u mleku nakon telenja se smanjuje za 50%, a prinos mleka tokom prva dva meseca laktacije se povećava za 10%.

#### **2.4.1. Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka na penicilin**

Penicilin pripada grupi beta laktamskih antibiotika koji se vezuju za proteine smeštene u ćelijskom zidu stafilokoka i imaju funkciju da ojačavaju strukturu. Beta laktamski antibiotici deluju na peptidoglikan i enzime transpeptidazu i karboksipeptidazu koji učestvuju u sintezi ćelijskog zida (penicilin-osetljivi enzimi) i vezuju se za penicilin vezujuće proteine (PBP) koji su smešteni na spoljašnjem delu citoplazmatske membrane. Vezivanjem penicilina dolazi do destabilizacije zida i bakterija postaje osetljiva na promene osmotskog pritiska (Georgopapadakou, 1993).

Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz mleka krava obolelih od mastitisa na beta laktamske antibiotike je veća nego kod onih koji su dokazani kao uzročnici infekcije ljudi. Dobra osetljivost na penicilin se objašnjava racionalnom upotrebom antibiotika u terapiji životinja (Farzana i sar., 2004). Ispitivanjem antimikrobne osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka ili *S. aureus*-a ustanovljen je veliki broj izolata koji su osetljivi na penicilin. Ispitivanjem u evropskim zemljama u periodu od 2002 do 2004. godine osetljivost na penicilin je utvrđena kod: 95,3% i 97% izolata u Francuskoj, 95,0% u Norveškoj, 93,0% Švedskoj, 90%, 75,7% i 88,9% u Holandiji (Hendriksen i sar., 2008) 91%, u Švajcarskoj (Corti i sar., 2003), 96% u Danskoj (Benedsgaard i sar., 2006). Dobru osetljivost *S. aureus* na penicilin su utvrdili i Persson i sar. (2011) kod 96% izolata, Bengtsson i sar. (2009) kod 92,9% izolata, Anderson i sar. (2006) kod 87,12% , Dura i sar. (1999) kod 89,64% izolata, a Yoshimura i sar. (2002) kod 72,6% izolata. U severnim zemljama Evrope Norveškoj, Švedskoj i Danskoj je osetljivost *S. aureus* na penicilin je najveća (80-90% izolata) (Benedsgaard i sar. 2006). Dobra osetljivost na penicilin sojeva *S. aureus*, izolovanih u slučajevima mastitisa krava utvrđena je i u Keniji (kod 89,4% izolata) (Shitandi i sar., 2004).

Precizniji podaci o osetljivosti *S. aureus* na penicilin se dobijaju određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Ispitivanjem osetljivosti na penicilin izolata *S. aureus* dilucionom metodom utvrđena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC<sub>90</sub>) od 0,06µg/ml u Norveškoj, 0,25µg/ml u Danskoj, 0,5µg/ml u Grenlandu i Švajcarskoj i u Engleskoj, Finskoj, Nemačkoj, Irskoj, Švedskoj i SAD. Ispitivanjem prisustva beta laktamaze kod istih izolata ustanovljena je beta laktamaza kod 76,2% izolata iz Irske, 63,6% Islanda, 55,4% Engleske, 50,9% SAD, 43,7% Nemačke, 42,1% Finske, 42% Švajcarske, 15,2% izolata iz Danske, a samo kod 4% izolata poreklom iz Norveške. Izolati koji su bili negativni na prisustvo beta laktamaze su bili najčešći kod izolata iz Norveške 74,3%, iz Danske 70,5%, 42% iz Švedske, 40,8% iz Nemačke, 39,8% iz Švedske, 36,4% iz Islanda, 29,5% iz Finske, 29,3% iz Engleske, 28,3% iz SAD i 4,8% iz Irske (De Oliveira i sar., 2000).

#### **2.4.2. Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka na ostale antibiotike**

U terapiji mastitisa krava se često koriste ampicilin i amoksicilin. Ampicilin je beta laktamski antibiotik koji je osetljiv na delovanje beta laktamaze, dok je amoksicilin nešto rezistentniji, ali je sličan po antibakterijskom spektru. Osetljivost ova dva antibiotika je slična kao kod penicilina (Araki i sar., 1985; Corti i sar., 2003).

Visoka osetljivost na ampicilin je zabeležena kod izolata *S. aureus* koji ne stvaraju beta laktamazu (Araki i sar., 1985; Corti i sar., 2003; Turutoglu i sar., 2006; De Oliveira i sar., 2000; Watts i sar., 1996). Corti i sar. (2003) su utvrdili rezistenciju *S. aureus* na penicilin kod 9% izolata a na ampicilin 7% izolata. Turutoglu i sar. (2006) kod izolata *S. aureus* koji ne stvaraju beta laktamazu utvrdili osetljivost na ampicilin kod 80,0% i amoksicilin kod 83,3% ispitanih izolata.

Dilucionom metodom Araki i sar. (1985) su za *S. aureus* ustanovili MIC<sub>50</sub> od 0,39µg/ml i MIC<sub>90</sub> od 3,13µg/ml za amoksicilin a za ampicilin 0,2 i 1,56µg/ml dok su De Oliveira i sar. (2000) navode da je MIC<sub>90</sub> za amoksicilin ≤0,06µg/ml u Nemačkoj, Finskoj, Islandu, Irskoj, Norveškoj, Švedskoj i SAD a 0,125µg/ml u Engleskoj i Finskoj. Watts i sar. (1997) su ustanovili MIC<sub>50</sub> od 0,13µg/ml i MIC<sub>90</sub> od 0,5µg/ml za ampicilin izolata *S. aureus* koji ne stvaraju beta laktamazu.

Primenom beta laktamskih antibiotika, koji nisu osetljivi na dejstvo beta laktamaze, značajno se povećava efekt izlečenja. Preparati u kombinaciji sa klavulanskom kiselinom ili sublaktamom, koji koče delovanje beta laktamaze i omogućavaju delovanje antibiotika, su efikasni u izlečenju mastitisa.

Koagulaza pozitivne stafilokoke su vrlo osetljive na delovanje kombinacije amoksicilina i klavulanske kiseline. Zabeležena je potpuna osetljivost na amoksicilin/klavulansku kiselinu (Güler i sar., 2005; Gentilini i sar., 2000), a MIC<sub>50</sub> i MIC<sub>90</sub> su iznosile 0,016 i 0,125 µg/ml (Gentilini i sar., 2000). Turutoglu i sar. (2002) navode da je 97,8% izolata *S. aureus* koji nisu stvarali beta laktamazu bilo osetljivo na amoksicilin i klavulansku kiselinu, a da je 96,4% izolata koji su stvarali beta laktamazu bilo osetljivo. Kasnijem istraživanjem Turutoglu i sar. (2007) navode da su svi izolati *S. aureus* koji nisu stvarali beta laktamazu bili osetljivi na amoksicilin/klavulansku kiselinu, a da je 93,2% izolata koji su proizvodili beta laktamazu bilo osetljivo. Kirkan i sar. (2005) su utvrdili osetljivost na amoksicilin/klavulansku kiselinu kod 84% izolata. Kloksacilin je beta laktamski antibiotik koji je otporan na delovanje beta laktamaze i preporučuje se kao terapija kod krava u zasušenju. Yoshimura i sar. (2002) navode da su svi ispitani izolati bili osetljivi na delovanje kloksacilina, a Araki i sar. (1985) navode da MIC<sub>90</sub> za kloksacilin kod sojeva iznosio 0,39µg/ml. Ispitujući osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka na kloksacilin Turutoglu i sar. (2002) i Turutoglu i sar. (2006) su utvrdili osetljivost na kloksacilin kod svih izolata bez obzira da li su izolati stvarali beta laktamazu ili ne.

Cefalosporini su grupa beta laktamskih antibiotika koji su rezistentni na delovanje beta laktamaze i, prema širini antimikrobnog spektra, kategorizovani su u tri generacije. Prvoj generaciji cefalosporina pripadaju cefapirin, cefalonijum, cefperazon, cefuroksim. Ceftiofur je predstavnik treće generacije cefalosporina.

Koagulaza pozitivne stafilokoke koje su izolovane iz mleka krava obolelih od mastitisa su vrlo osetljive na delovanje cefalosporinskih preparata, pa se stoga ti preparati često koriste u terapiji krava obolelih od stafilokoknih mastitisa u laktaciji (Klimiene i sar., 2011; Tenhagen i sar., 2006; Kalmus i sar. 2011).

U brojnim istraživanjima je utvrđeno da su izolati *S. aureus* osetljivi na različite cefalosporine: na cefaleksin (Ebrahimi i sar., 2009), cefkvinom (Gentilini i sar. 2000;



Corti i sar., 2003; Pitkala i sar., 2004; Schröder i sar., 2005), cefalotin (Gentilini i sar., 2000; Schröder i sar., 2005; Giannechini i sar., 2002; Younis i sar., 2000), cefperazon (Corti i sar., 2003), cefacetil (Calvinho i sar., 2002) i cefoksitin (Peles i sar., 2007).

Ispitivanjem osetljivosti na cefperazon Schröder i sar. (2005) su utvrdili da je 88% izolata *S. aureus* bilo osetljivo, a Kirkan i sar. (2005) su kod 85% ispitanih izolata *S. aureus* ustanovili osetljivost na cefkvinom. Unakal i sar. (2010) su, ispitivanjem izolata *Staphylococcus aureus*, ustanovili dobru osetljivost na ceftriakson (80,88%) i cefotaksim (79,41%).

De Oliveira i sar. (2000) navode da je za cefalotin MIC<sub>50</sub> 0,125µg/ml u Engleskoj, a 0,25 µg/ml u Danskoj, Finskoj, Nemačkoj, Irskoj, Islandu, Norveškoj, Švedskoj, Švajcarskoj i SAD, a MIC<sub>90</sub> 0,5 µg/ml u svim navedenim zemljama. Ispitivanjem osetljivosti na ceftiofur je utvrđen MIC<sub>50</sub> 0,5µg/ml u Danskoj, Nemačkoj i Švedskoj, a 1,0µg/ml u Engleskoj, Finskoj, Irskoj, Islandu, Norveškoj, Švajcarskoj i SAD, MIC<sub>90</sub> za ceftiofur je iznosio 1,0 µg/ml u svim navedenim zemljama. Slične rezultate navode i Watts i sar., (1997) koji su ispitivanjem osetljivosti *S. aureus* na cefalotin ustanovili vrednosti kod beta laktamaza pozitivnih izolata 0,25µg/ml za MIC<sub>50</sub> i 0,5µg/ml za MIC<sub>90</sub>, a kod beta laktamaza negativnih izolata 0,25 mg/ml za MIC<sub>50</sub> i MIC<sub>90</sub>. Turutoglu i sar. (2006) su ustanovili osetljivost na cefuroksim kod svih ispitanih izolata *S. aureus* koji ne stvaraju beta laktamazu, a kod 92,1% izolata koji stvaraju beta laktamazu.

Procenat izolata *S. aureus* rezistenih na ceftiofur u Francuskoj se u periodu od 2002. do 2004. godine smanjivao sa 4,2% u 2002. godini na 1,0% u 2003 godini. U Estoniji je ustanovljena rezistencija na ceftiofur kod 0,9% izolata *S. aureus* u 2004. godini (Hendriksen i sar., 2008). Moon i sar. (2007) navode da je osetljivost izolata *S. aureus* koji su oni ispitali na cefalotin bila dobra kako kod sojeva koji imaju sposobnost sinteze enterotoksina tako i kod onih izolata koji tu osobinu nemaju (Moon i sar., 2007a).

Najveći broj rezultata ispitivanja osetljivosti *S. aureus* na tetraciklin pokazuje da je osetljivost *S. aureus* na ovaj antibiotik dobra. Dobru osetljivost na tetracikline su utvrdili Peles i sar. (2007) i Sori i sar. (2011), a Kalmus i sar. (2011) su kod 95,9% izolata *S. aureus* ustanovili osetljivost na tetraciklin. Nešto manju osetljivost na oksitetraciklin su ustanovili Pitkala i sar. (2004) kod 94,9% izolata, Hannil i sar. (2011)

kod 92,8%, Gianneechini i sar. (2002) kod 86% izolata. Dilucionom metodom su utvrđene vrednosti MIC<sub>50</sub> MIC<sub>90</sub> 2 i >64μg/ml. Kirkan i sar. (2005) su ustanovili osetljivost na oksitetraciklin kod 60% i umerenu osetljivost kod 40% ispitanih izolata. Obzirom da se tetraciklini ne koriste često u terapiji mastitisa, pojava sojeva koagulaza pozitivnih stafilokoka koji su rezistentni na tetracikline bi se mogla objasniti njihovom širokom upotrebom u terapiji različitih infekcija krava.

Gentamicin je vrlo efikasan antibiotik prema koagulaza pozitivnim stafilokokama, ali se retko koristi u terapiji mastitisa zbog dugačke karence. Gianneechini i sar. (2002), Corti i sar. (2003), Sori i sar. (2011) i Pitkala i sar. (2004) navode da su svi izolati *S. aureus* koje su ispitali bili osetljivi na gentamicin. Gentilini i sar. (2000) su ustanovili osetljivost kod 96,6% izolata, a Kalmus i sar. (2011) kod 95,2% izolata *S. aureus*.

Makrolidi i linkozamini se vezuju za RNK bakterije i koče sintezu proteina. Kod ovih grupa antibiotika se javlja unakrsna rezistencija, tako da se rezistencija na antibiotik iz jedne klase prenosi na antibiotik iz druge klase. Corti i sar. (2003) i Peles i sar. (2007) navode da su svi izolati koje su ispitali bili osetljivi na linkomicin. Hannil i sar. (2011) su ustanovili osetljivost na linkomicin kod 93,5% izolata. Kalmus i sar. (2011) navode da je osetljivost izolata *S. aureus* na linkomicin iznosila 82,4%, a Turutoglu i sar. (2006) su ustanovili osetljivost na linkomicin kod 77,7% izolata *S. aureus*. Minimalne inhibitorne koncentracije za linkomicin MIC<sub>50</sub> su; 0,5μg/ml u Finskoj, Norveškoj i Švajcarskoj; 1,0μg/ml u Danskoj, Engleskoj i Švedskoj; 2,0μg/ml u Nemačkoj i SAD, 4,0μg/ml u Islandu i 8,0μg/ml u Irskoj, a MIC<sub>90</sub> 1,0μg/ml u Danskoj, 2,0μg/ml u Engleskoj i Švajcarskoj; 4,0μg/ml u Finskoj i Norveškoj (De Oliveira i sar., 2000).

Pored ispitivanja osetljivosti na antibiotike koji se najčešće koriste u terapiji mastitisa izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokokama, dobra osetljivost je utvrđena i na druge antibiotike: ciprofloksacin (Kirkan i sar. 2005.), enrofloxacin (Güler, 2005; Gianneechini i sar., 2002; Turutoglu i sar., 2002; Turutoglu i sar. 2006; Pitkala i sar., 2004), norfloxacilin (Sori i sar., 2011; Russi i sar., 2008; Younis i sar., 2000), trimetoprim/sulfamethoksazol (Peles i sar., 2007; Hendriksen i sar., 2008; Gianneechini i sar., 2002; Pitkala i sar., 2004; Schmidt 2011), sulfonamide (Hendriksen i sar., 2008; Adesyun i sar., 1995), neomicin (Pitkala i sar., 2004; Hendriksen i sar., 2008; Malinowski i sar., 2002; Gianneechini i sar., 2002), eritromicin (Younis i sar.

2000; Peles i sar., 2007; Hendriksen i sar., 2008; Russi i sar., 2008; Malinowski i sar., 2002), spiramicin (Pitkala i sar., 2004), bacitracin (Sori i sar., 2011; Malinowski i sar., 2002), kanamicin (Kirkan i sar., 2005), klindamicin (Giannechini i sar., 2002), florfenikol (Russi i sar., 2008), hloramfenikol (Hendriksen i sar., 2008), ali i kombinacije antibiotika neomicin + bacitracin + tetraciklin (Kirkan i sar., 2005), penicilin + novobiocin (Watts i sar., 1997; Calvinho i sar., 2002), linkomicin+neomicin (De Oliveira i sar., 2000) i kanamicin-cefaleksin (Güler, 2005).

#### **2.4.3. Rezistencija koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz vimena krava na antibiotike**

Rezistencija stafilokoka u odnosu na preparate koji se koriste u terapiji mastitisa je u porastu, a najveća rezistencija je zabeležena u odnosu na penicilin (National mastitis council 2004; Pitkala i sar., 2004; Sobiraj i sar., 1997; El-Jake, 2010; Botrel i sar., 2010; Barboza-Corona i sar., 2009; Roesch i sar., 2006; Franco i sar., 2008; Correa i sar., 2005; Russi i sar., 2008; Myllys i sar., 1998; Malinowski i sar., 2002; Güler i sar., 2005). Česta i neracionalna upotreba antibiotika povećava rizik od pojave sojeva rezistentnih na antibiotike, kao i sojeva koji pokazuju rezistencija na više antibiotika (Apparao i sar., 2009; Correa i sar., 2005). Analizom osnovnih faktora virulencije patogenih stafilokoka nije uočena korelacija sa otpornošću na lekove (Franco i sar., 2008; Moon i sar., 2007a). Rezistencija stafilokoka na antibiotike se povećava ako se one nalaze u mleku jer vezivanjem za mlečnu mast se indukuje formiranje kapsule i biofilma (Ali-Vehmasi sar., 1997).

Rezistencija na antibiotike je češće ustanovljena kod koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih u slučajevima mastitisa krava na farmama sa malim obimom proizvodnje nego na farmama sa velikim obimom proizvodnje, jer je u velikim proizvodnim sistemima bolji monitoring zdravlja životinja (Shitandi i sar., 2004). Nakon prve laktacije se povećava prevalencija sojeva rezistentnih na beta laktamske antibiotike a koji su osetljivi na delovanje penicilinaze (Tenhagen i sar., 2006).

Predviđanje pojave rezistencije na penicilin kod *Staphylococcus aureus* izolovanog iz mleka krava sa mastitisom moguće je kod farmski genetski homogenih sojeva, ali ne i heterogenih (Grinberg i sar., 2005). Geni za rezistenciju na antibiotike su smešteni na

plazmidu ali i na transpozoniima koji predstavljaju mobilne genetske elemente čime se postiže mogućnost prenošenja unutar vrste i širenja rezistentnih sojeva u zapatu. Plazmidi su otkriveni kod najvećeg broja izolata koji su rezistentni na lekove. Većina plazmida stafilokoka je molekulske mase 20 kb do 1.1 kb, ali broj prisutnih plazmida kao i njihova masa ne moraju uvek biti u korelaciji sa rezistencijom na antibiotike (Kirkan i sar., 2005; El-Jakee i sar., 2011; Arslan i sar., 2009; Turutoglu i sar., 2006; Correa i sar., 2005). Pojava stafilokoka, koje su rezistentne na veći broj antibiotika, kod krava u slučajevima subkliničkih mastitisa, predstavlja rizik za zdravlje ljudi zbog moguće razmene gena rezistencije sa humanim izolatima (Ombui i sar., 2000; Arslan i sar., 2009; Turutoglu i sar., 2007; Moon i sar., 2007a). Rezistenciju na penicilin stafilokoke postižu sintezom beta laktamaze koja se, kao ekstracelularni enzim, izlučuje izvan ćelije i razlaže penicilinsku kiselinu kidanjem C-N veze beta laktamskog prstena čime se ona prevodi u neaktivan oblik. Sinteza beta laktamaze je određena *blaZ* genom. Prisustvo *blaZ* gena u genomu stafilokoka ne znači da će se rezistencija na penicilin fenotipski ispoljiti. Potvrđeni su izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka koji su imali *blaZ* gen, ali, su bili osetljivi na penicilin *in vitro* (Russi i sar., 2008; Pitkala i sar., 2004). S druge strane, izolovane su koagulaza pozitivne stafilokoke koje su bili otporne na penicilin a nisu imale *blaZ* gen. Ovakav oblik rezistencije na penicilin ukazuje na to da postoje i neki drugi enzimski mehanizmi koji učestvuju u inaktivaciji (Arshad i sar., 2006; Turutoglu i sar., 2006). Potvrđena je korelacija između sinteze beta laktamaze i rezistencije na penicilin (Russi i sar., 2008; Arshad i sar., 2006; Güler i sar., 2005; Sobiraj i sar., 1997; Turutoglu i sar., 2006; Tenhagen i sar., 2006; Nunes i sar., 2007; Watts i sar., 1997; Apparao i sar., 2009). Kao brza metoda pri određivanju terapije mastitisa može se koristiti ispitivanje prisustva beta laktamaze, i mastitisi izazvani sojevima *S. aureus* koji ne stvaraju beta laktamazu se mogu lečiti penicilinom (Gentilini i sar., 2000; Bengtsson i sar., 2009). Isto tako, kod izolata kod kojih se dilucionom metodom utvrde granične vrednosti osetljivosti na penicilin (0,06 - 0,25 µg/ml), treba ispitati sposobnost sinteze beta laktamaze (Pitkala i sar., 2004). Istraživanja govore o tome da većina sojeva koji sintetiše beta laktamazu je otporno na penicilin, dok većina sojeva koja ne sintetiše beta laktamazu je osetljiva. Potvrđeni su izolati koji su bili pozitivni na beta laktamazu a osetljivi na penicilin, i, sa druge strane,

sojevi koji su bili negativni na sposobnost sinteze beta laktamaze, a rezistentni na penicilin (Turutoglu i sar., 2006).

U brojnim istraživanjima utvrđena je rezistencija na penicilin *S. aureus* izolovanog u slučajevima mastitisa krava: u Argentini 40,3% (Gentilini i sar., 2000) i 55% (Sumathi i sar., 2008), kod 52,1% izolata u Finskoj (Pitkala i sar., 2004), u Koreji 60% (Shin Kim i sar., 2000), u Africi 60%, (Ombui i sar., 2000), u Estoniji 61,4% (Kalmus i sar., 2011), Turskoj 62,1% (Turutoglu i sar., 2006), u Litvaniji 76,7%, (Klimiene i sar., 2011), u Keniji 76,9%. (Shitandi i sar., 2004), u Kini 77,3% (Li i sar., 2009), u Brazilu 77,89% (Correa i sar., 2005), Indiji 86,76% (Unakal i sar., 2010), Turskoj 81% (Kirkan i sar., 2005), u zapadnoj Etiopiji 87,2% (Tariku i sar., 2011), u Mađarskoj 88,9% (Peles i sar., 2007) i Izraelu 96,6 % (Younis i sar., 2000) izolata.

Procenat izolata *S. aureus* rezistentnih na penicilin se u Belgiji i Nemačkoj kreće 51-64% (Klimienė i sar., 2011). U Turskoj u periodu od 1995 do 2004. procenat izolata rezistentnih na antibiotike je sa 43,5% 1995. godini smanjen na 8% 1999. godini, a zatim je porastao na 77% u 2004. godini (Güler i sar., 2005). Visok procenat izolata *S. aureus* rezistentnih na penicilin je zabeležen u svim evropskim zemljama osim u Francuskoj gde je procenat izolata rezistentnih na penicilin bio ispod 10%. U Danskoj je utvrđeno 29,7% i 23,1% izolata rezistentnih na penicilin: u Švajcarskoj 17,3% izolata: Engleskoj 46, 36 i 38%: Italiji 43% izolata: Latviji 49% i Španiji 45, 40,1 i 33% izolata (Hendriksen i sar., 2008). Rezistenciju na penicilin *S. aureus* izolovanog iz vimena krava obolelih od mastitisa su potvrdili Adesyun i sar. (1995) kod 23,6%, Peles i sar. (2007) kod 30,5%, Grinberg i sar. (2005) kod 38%, Rosengren i sar. (2010) kod 39%, Calvinho i sar. (2002) kod 47,6%, Russi i sar. (2008) kod 48,4%, Pitkala i sar. (2004) kod 52,1%, Rabello i sar. (2005) kod 55,1% izolata; Arshad i sar. (2006), kod 56,5%, Shana i sar. (2009) kod 57%, Moon i sar. (2007a) kod 66,7%, Malinowski i sar. (2002), kod 73%, Anderson i sar. (2006) kod 86%, Ebrahimi i sar. (2009) kod 87,5%, Ochoa-Zarzosa i sar. (2008) kod 90,7%, Barboza-Corona i sar. (2009) kod 92% i Younis i sar. (2000) kod 96,6% izolata. Jedan od uzroka neuspeha terapije je neadekvatna primena antibiotika bez prethodnog ispitivanja osetljivosti uzročnika mastitisa na antibiotike. Kao posledica toga dolazi do pojave rezistencije na antibiotike koji se najčešće koriste, ali i do pojave sojeva koji su rezistentni na dva ili više

antimikrobnih preparata (Adesyun i sar., 1995; Farzana i sar., 2004; Sumathi i sar., 2008; Bennedsgaard i sar., 2006; Shitandi i sar., 2004; Pitkala i sar. 2004).

Ispitivanje osetljivosti se, najčešće, vrši disk difuzionom metodom, međutim, znatno precizniji rezultati se dobijaju određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije na određeni antibiotik.

Minimalna inhibitorna koncentracije penicilina (MIC<sub>50</sub>) i (MIC<sub>90</sub>) za izolate *S. aureus* utvrđena u različitim ispitivanjima se kretala od 0,05µg/ml (MIC<sub>50</sub>) i 4 µg/ml (MIC<sub>90</sub>) Russi i sar. (2008); 0,094 (MIC<sub>50</sub>) i 1,5µg/ml (MIC<sub>90</sub>) Gentilini i sar. (2000); 4 µg/ml (MIC<sub>90</sub>) Nunes i sar. (2007); 6,25µg/ml (MIC<sub>90</sub>) Araki i sar. (1985) i MIC<sub>90</sub> >8µg/ml penicilina Giannechini i sar. (2002). Kod izolata *S. aureus* rezistentnih na penicilin utvrđena je najveća MIC<sub>90</sub> (16µg/ml) (Nunes i sar., 2007; De Oliveira i sar., 2000).

Više autora navodi da je rezistencija na ampicilin je slična ili nešto niža u odnosu na penicilin (Güler i sar., 2005; Moon i sar., 2007a; Klimiene i sar., 2011; Kalmus i sar., 2011; Correa i sar., 2005; Turutoglu i sar., 2006; Malinowski i sar., 2002). Ispitivanjem povezanosti osetljivosti na penicilin i ampicilin i sposobnosti sojeva *S. aureus* izolovanih u slučajevima mastitisa da stvaraju enterotoksine Moon i sar. (2007b) su utvrdili manju osetljivost na penicilin i ampicilin kod izolata koji nisu imali sposobnost sinteze enterotoksina. Rezistencija na ampicilin izolata *S. aureus* koji nisu stvarali beta laktamazu je utvrđena u više studija. Turutoglu i sar. (2002) i Turutoglu i sar. (2007) su utvrdili rezistenciju na ampicilin kod 37% i 56,3%, Kalmus i sar. (2011) kod 59,5%, Guler i sar. (2005) kod 63,3%, Turutoglu i sar. (2002) i Turutoglu i sar. (2007) kod 64,3% i 73,7%. Rezistencija na ampicilin je utvrđena i kod izolata *S. aureus* koji su stvarali beta laktamazu. Moon i sar. (2007a) su utvrdili rezistenciju na ampicilin kod 66% izolata, Malinowski i sar. (2002) kod 68,9%, Unakal i sar. (2010) kod 70,59%, Li i sar. (2009) kod 77,3%, Klimiene i sar. (2011) kod 78,4%, Correa i sar. (2005) kod 78,94% ispitanih izolata *S. aureus*. Prema rezultatima Sori i sar. (2011) češće se javlja rezistencija *S. aureus*, izolovanog u slučajevima mastitisa, na penicilin (87,2% izolata) nego na ampicilin (46%). Nasuprot rezultatima iz predhodne studije Schmidt (2011) su ustanovili veći procenat *S. aureus*, izolovanog u slučajevima mastitisa rezistentnih na ampicilin (65,6% izolata) nego na penicilin (47,8% izolata). Giannechini i sar. (2002) su ustanovili rezistenciju na ampicilin kod 46,6% ispitanih izolata, a dilucionom

metodom su odredili minimalnu inhibitornu koncentraciju od 0,58 $\mu$ g/ml (MIC<sub>50</sub>) i 8 $\mu$ g/ml (MIC<sub>90</sub>). De Oliveira i sar. (2000) navode da je MIC<sub>90</sub> za ampicilin 0,5 $\mu$ g/ml u Danskoj i Norveškoj; 1,0 $\mu$ g/ml u Irskoj; 2,0  $\mu$ g/ml u Engleskoj, Finskoj, Nemačkoj i Švedskoj; 4,0 $\mu$ g/ml Švajcarskoj i SAD. Dilucionom metodom Watts i sar. (1997) su ustanovili minimalnu inhibitornu koncentraciju za ampicilin od 1,0 $\mu$ g/ml (MIC<sub>50</sub>) i 4,0 $\mu$ g/ml (MIC<sub>90</sub>).

Amoksicilin se nešto ređe koristi u terapiji mastitisa. U odnosu na beta laktamske antibiotike, osetljive na delovanje beta laktamaze, ima širi spektar delovanja pa se koristi u slučajevima kada nije moguće uraditi bakteriološko ispitivanje mleka krava obolelih od mastitisa.

Prema rezultatima Turutoglu i sar. (2002) i Turutoglu i sar. (2006) češće se rezistencija na amoksicilin (58,6% i 50,0% izolata) javlja kod izolata *S. aureus* koji stvaraju beta laktamazu nego kod izolata koji ne stvaraju beta laktamazu (39% i 45,6% izolata). Rezistenciju na amoksicilin su ustanovili i Malinowski i sar. (2002) kod 42,3%, Correa i sar. (2005) kod 50,52%, Unakal i sar. (2010) kod 63,24%, a Klimiene i sar. (2011) kod 81,3% ispitanih izolata *S. aureus*.

Rezistenciju na amoksicilin i klavulansku kiselinu su utvrdili Klimiene i sar. (2011) kod 38,1% izolata *S. aureus*, a veći procenat (85,7%) izolata rezistentnih na amoksicilin i klavulansku kiselinu su utvrdili Arslan i sar. (2009).

Rezistencija na kloksacilin se sreće u zapatima kod kojih postoji visoka rezistencija na beta laktamske antibiotike koji su osetljivi na delovanje beta laktamaze, ali i u onim zapatima kod kojih je ustanovljeno prisustvo stafilokoka rezistentnih na meticilin. Češće je dokazana rezistencija na kloksacilin kod sojeva *S. aureus* izolovanih u slučajevima kliničkih nego kod sojeva izolovanih u slučajevima subkliničkih mastitisa (Malinowski i sar., 2002). Retko se sreću zapati u kojima je *S. aureus* izolovan u slučajevima mastitisa rezistentan na kloksacilin (Ebrahimi i sar., 2009).

Rezistencija na cefalosporine nije česta kod koagulaza pozitivnih stafilokoka koje su dokazane kao uzročnici matitsa krava. Correa i sar. (2005) su kod izolata, koji su bili rezistentni na antibiotike, ustanovili rezistencija na cefaleksin kod 35,79% izolata, dok su Malinowski i sar. (2002) su ispitivanjem osetljivosti na cefperazon, sojeva *S. aureus* izolovanih iz mleka krava obolelih od kliničkog oblika mastitisa, ustanovili 42,4%,

osetljiva izolata, 24,2% umereno osetljiva i 33,3% rezistentnih izolata, a sojevi izolovani u slučajevima subkliničkih mastitisa su u 42,3% izolata bili osetljivi, 30% umereno osetljivi a 27,7% izolata je bilo rezistentno na cefperazon. Hendriksen i sar. (2008) navode da je rezistencija na cefalosporine ustanovljena tokom 2004. kod 0,9% ispitanih izolata u Španiji i kod 4,2% izolata u Francuskoj.

Rezistencija koagulaza pozitivnih stafilokoka na tetracikline je utvrđena kod 23,2% (Gentilini i sar., 2000), 27,9% (Guler i sar., 2005), 38,8% (Turutoglu i sar., 2006), 47,6% (Turutoglu i sar., 2006), 60,0% (Li i sar., 2009) i 64,22% (Correa i sar., 2005) izolata *S. aureus*. Prema navodima Malinowski i sar. (2002) osetljivost na tetracikline je veća kod sojeva *S. aureus* izolovanih iz mleka krava obolelih od kliničke forme mastitisa nego u slučajevima subkliničkih mastitisa. Veća rezistencija na tetracikline je utvrđena kod izolata *S. aureus* za koje je potvrđeno da stvaraju beta laktamazu (Turutoglu i sar., 2006), i kod izolata koji su imali sposobnost sinteze enterotoksina (Moon i sar., 2007b).

Rezistencija na gentamicin je utvrđena kod 18,95% (Correa i sar., 2005), 39,3% (Turutoglu i sar., 2006), 52,94% (Unakal i sar., 2010) izolata. Veći procenat izolata rezistentnih na gentamicin je utvrđen kod izolata *S. aureus* koji stvaraju beta laktamazu, (Turutoglu i sar., 2006) i kod izolata koji su imali sposobnost sinteze enterotoksina (Moon i sar., 2007b).

Rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije linkomicina za *S. aureus* pokazuju da je MIC u: Švajcarskoj 8,0µg/ml; 16,0µg/ml u Nemačkoj; 32,0µg/ml u SAD; 64µg/ml u Irskoj i  $\geq 64\mu\text{g/ml}$  na Islandu (De Oliveira i sar., 2000). Nije utvrđena značajna razlika u MIC za linkomicin između sojeva *S. aureus* izolovanih u slučajevima kliničkih i subkliničkih mastitis (Malinowski i sar., 2002). Veća MIC linkomicina je utvrđena za izolate *S. aureus* koji su imali sposobnost sinteze enterotoksina (Turutoglu i sar., 2006).

Gentilini i sar. (2000) su ustanovili rezistenciju na trimetoprim/sulfametazin kod 59,2% izolata *S. aureus*.



#### **2.4.4. Rezistencija na meticilin koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz vimena krava**

Rezistencija na meticilin kod sojeva *S. aureus*, izolovanih u slučajevima mastitis krava, dokazana je u malom broju slučajeva (Turutoglu i sar., 2006; Juhász-Kaszanyitzky i sar., 2009; EFSA, 2012; Erskine i sar., 2004; Huber i sar., 2010; Giannechini i sar., 2002).

Rezistencija na meticilin (oksacilin) se javlja nakon upotrebe tog antibiotika u terapiji, a izolati stafilokoka sa tim tipom rezistencije su, najčešće, rezistentni i na druge beta laktamske antibiotike. Rezistencija na meticilin može nastati kao fenotipska usled hiperprodukcije beta laktamaze ili genotipska koja je zasnovana na prisustvu *mecA* gena. U brojnim ispitivanjima sojeva *S. aureus* izolovanih iz mleka krava obolelih od mastitisa nije dokazano prisustvo *mecA* gena (Sobiraj i sar., 1997; Younis i sar., 2000; Calvinho i sar., 2002; Wagner i sar., 2007; Bengtsson i sar., 2009; De Oliveira i sar., 2000; Yoshimura i sar., 2002; Schröder i sar., 2005; Sobiraj i sar., 1997; Nunes i sar., 2007; Russi i sar., 2008; Gentilini i sar., 2000; Turutoglu i sar., 2006; Haveri, 2008; Bervoets, 2008).

Rezistencija *S. aureus* na meticilin je dokazana disk difuzionom metodom u nekoliko istraživanja. U Trinidadu je rezistencija *S. aureus* na meticilin dokazana kod 1,2% (Adesyan i sar. 1995) izolata, u Turskoj kod 17,5% izolata (Turutoglu i sar., 2006), kod 1% izolata u istraživanjima Pitkala i sar., (2004), kod 1,7% izolata u istraživanjima Arslan i sar. (2009) i u istraživanjima Shitandi i sar. (2004) Gentilini i sar. (2000) kod 7,8% izolata.

Brojni istraživači za ispitivanje osetljivosti umesto metcilina preporučuju primenu diska sa 1μg oksacilina. Visoka prevalencija izolata rezistentnih na oksacilin je dokazana u Španiji kod 3,7% izolata (Franco i sar., 2008), u Francuskoj kod 8,3% *S. aureus*. (Hendriksen i sar. 2008), 25% izolata *S. aureus* rezistentnih na oksacilin je utvrđen u istraživanjima Shana i sar. (2009), a 60% izolata *S. aureus* rezistentnih na oksacilin je utvrđen u istraživanjima Kirkan i sar. (2005).

Turutoglu i sar. (2009) su kod 3 od 18 ispitivanih izolata, rezistentnih na oksacilin, dokazali prisustvo *mecA* gena.

Sojevi koji imaju *mecA* gen mogu da ispolje rezistenciju heterogeno ili homogeno. Agar diluciona metoda i oksacilin disk difuziona metoda zavise od različitih uticaja kao što su sastav i fizičko hemijske karakteristike podloge, temperature i vremena inkubacije (Anand i sar., 2009). Stoga heterorezistentan soj koji ima *mecA* gen, zbog niske ekspresije rezistencije, može da ostane neotkriven. Precizniji rezultati u detekciji *mecA* gena difuzionom metodom dobijaju se sa diskom oksacilina od 6 $\mu$ g (Anand i sar., 2009). Osetljivost disk difuzione metode sa oksacilinom od 1 $\mu$ g potvrđena je kod 87,5% MRSA izolata, a sa oksacilinom od 6 $\mu$ g osetljivost je bila veća (96,8%) (Anand i sar., 2009).

CLSI (2006) preporučuje disk difuzionu metodu sa diskom cefoksitina od 30  $\mu$ g pošto je dobar aktivator sistema regulacije *mecA* gena i precizniji u odnosu na oksacilin u otkrivanju rezistencije koja je regulisana *mecA* genom (Swenson i sar., 2005; Febler i sar., 2010; Tavakol i sar., 2012; Anand i sar., 2009). Specifičnost cefoksitin disk testa je 98 i 100% (Swenson i sar., 2005; Anand i sar., 2009). Prema navodima iz literature mali je procenat izolata rezistentnih na cefoksitin, koji nemaju *mecA* gen (Haenni i sar., 2011).

Utvrđena je rezistencija MRSA na veliki broj beta laktamskih antibiotika koji su stabilni u prisustvu beta laktamaze, ali i na druge antibiotike (Tavakol i sar., 2012; Lee, 2003). Visok nivo rezistencije na beta laktamske antibiotike nastaje usled prisustva *mecA* gena koji određuje sintezu penicilin vezujućeg proteina (PBP2a) (Unakal i sar., 2010). *MecA* gen se nalazi na mobilnom genetskom elementu označenom kao staflokokni kasetni hromozomom *mec* (SCC*mec*). Ima više tipova kasetnih hromozoma: V, III, IV, a mogu biti i netipizirani (Febler i sar., 2010; Vandehaeghen i sar., 2007). SCC*mec* tip IV i netipizirani imaju malu vrednost MIC oksacilina 1–4 mg/l, dok SCC*mec* III ili V imaju MIC  $\geq$ 16 mg/l (Febler i sar., 2010). SCC *mec* tip IVa i V su potvrđeni kod krava obolelih od mastitisa (Tavakol i sar., 2012; Lee 2003).

Ispoljavanjem *mecA* gena dolazi do promena u sastavu i strukturi penicilin vezujućeg proteina PBP2a ili PBP2' koji pokazuje vrlo mali afinitet za gotovo sve beta laktamske antibiotike. Ekspresija PBP2a zavisi od uslova sredine kao što su pH i temperatura, prisustva plazmida i od regulatornog regiona (*mecR*). Pored toga, drugi hromozomski gen *femA* (factor essential za methicillin resistance) utiče na sadržaj glicina u

peptidoglikanu, propustljivost ćelijskog zida i osetljivost na beta laktame. Beta laktamski enzimi odgovaraju strukturno, mehanički i evoluciono sa PBP2a ali i dele kontrolne elemente prilikom ekspresije.

Dokazivanje *mecA* gena ili njegovih produkata, penicilin vezujućeg proteina (PBP2a), je konačna potvrda MRSA (Anand i sar., 2009). Dokazivanje *mecA* gena se, najčešće, radi multipleks PCR metodom (Asfour i sar., 2011; Lee 2003).

U Velikoj Britaniji, kod goveda i ljudi, a u Danskoj i Irskoj kod ljudi je ustanovljeni novi tip *S. aureus* koji je rezistentan na meticilin i označen je kao *mecALGA251* a smešten je na novootkrivenom genetskom elementu označenim kao *SCCmec XI*. Ovo je novi oblik meticilinske rezistencije, koji nije vezan za *mecA* gen. *S. aureus* koji ima takve karakteristike je izolovan i iz mleka krava u slučajevima mastitisa (European Union Summary Report on antimicrobial resistance, 2012). MRSA koje vode poreklo od životinja, nisu specifične za određenog domaćina i, mogu se prenositi između životinjskih vrsta, kao i između ljudi i životinja. Tokom mnogih godina MRSA je bio dokazivan samo kod ljudi, a prvi put je MRSA dokazana 1972. godine kod mlečnih krava. Prema podacima iz literature učestalost nalaza MRSA je u porastu i utvrđena je povezanost između nalaza MRSA kod ljudi i životinja. MRSA kod životinja može da kolonizuje kožu i sluzokožu, koji su rezervoar infekcije za druge životinje, međutim, može se na životinje preneti i preko ruku mužača (Vandehaeghen i sar., 2007; Nam i sar., 2011; Haenni i sar., 2011).

Prema rezultatima ispitivanja iz više studija ne postoji korelacije između faktora virulencije i MRSA (Tavakol i sar., 2012; Nam i sar., 2011; Türkyilmaz i sar., 2010; EU Summary Report on antimicrobial resistance, 2012), međutim, El-Jake i sar. (2010) su iz mleka krava obolelih od mastitisa izolovali MRSA koje su imale sposobnost stvaranja enterotoksina.

U više studija su dokazane MRSA rezistentne na više antibiotika (Tavakol i sar., 2012; Saini i sar., 2012; Nam i sar., 2011; Vanderhaeghen i sar., 2010; Türkyilmaz i sar., 2010; Moon i sar., 2007a; Haran i sar., 2012; Turutoglu i sar., 2009; Juhász-Kaszanyitzky i sar., 2009; EU Summary Report on antimicrobial resistance, 2012; Huber i sar., 2010). Saini i sar. (2012) su ustanovili 0,05% MRSA u Kanadi, 4,22% u Koreji (Nam i sar., 2011). U Holandiji je u jednom stadu utvrđena prevalencija MRSA

od 0% do 7,4%, a kod krava je *mecA* gen ustanovljen kod 9,3% *S. aureus* izolovanih kod goveda (Vanderhaeghen i sar., 2010), u Švajcarskoj kod 1,4% (Huber i sar., 2009), 4,53% (Juhász-Kaszanyitzky i sar., 2009). Fenotipski rezistentne MRSA su dokazane kod 17,2% izolata u Turskoj (Türkyilmaz i sar., 2010), 2,5% u Koreji. Prisustvo *mecA* gena je dokazano kod 1,55% izolata *S. aureus* (Moon i sar., 2007b), 25% kod *S. aureus* izolovanih iz vimena krava obolelih od subkliničkog mastitisa (Coelho i sar., 2009) i 2,85% izolata (Broekema i sar., 2009). Rezultati ukazuju na to da je moguće prenošenje infekcije sa MRSA sa životinje na ljude preko kontaminirane hrane (Lee, 2003). U Nemačkoj je 2010. kod 5% izolata *S. aureus* koji su dokazani kao uzročnici mastitisa krava dokazan MRSA (EU Summary Report on antimicrobial resistance, 2012., ECDC, EFSA and EMEA on meticillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in livestock 2009). MRSA su dokazane i u zbirnom mleku sa farmi u Minesoti kod 1,33% uzoraka (Haran i sar., 2012). MRSA ST398, koji se najčešće izoluje kod svinja ali i živine izolovan je iz mleka krava u Holandiji (Tavakol i sar., 2012; Holmes i sar., 2011). Iz 10% uzoraka mleka krava, poreklom sa farmi u Belgiji, izolovane su MRSA ST398 SCC *mec* tip IVa i V istih karakteristike kao humani izolati. U Holandiji su dokazana dva MRSA koja su imala kasetni hromozom V (Huber i sar., 2010). Uočen je porast MRSA ST398, a time i rizik od prenošenja između životinjskih vrsta kao i u slučaju mastitisa krava (Tavakol i sar., 2012; Holmes i sar., 2011; Huber i sar. 2010).

## **2.5. Enterotoksini koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz vimena krava**

### **2.5.1. Sposobnost sinteze enterotoksina koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz mleka krava**

Enterotoksini su često karakteristika patogenih *S. aureus*. Najčešće su udruženi sa drugim značajnim faktorima virulencije, pre svega proteinom toksičnog šok sindroma (Arcuri i sar., 2010; El-Jakee i sar., 2010; Hata i sar., 2006; Srinivasan i sar., 2006; Kuroishi i sar., 2003; Larsen i sar., 2002; Kenny i sar., 1993; Matsunaga i sar., 1993), ali i pigmentom, hemolizinima, koagulazom, fibronektinom, leukocidinom, sposobnošću sinteze biofilma, kapsule, DNA-ze i temonukleaze, eksfolijativnog toksina i drugim (Singh i sar., 2011; Neder i sar., 2011; El-Jakee i sar., 2010; Peles i sar., 2007; Fueyo i sar., 2005; Larsen i sar., 2002; Akineden i sar., 2001; Lee i sar., 1998).

Zabeleženi su i retki slučajevi *S. intermedius* koji je imao sposobnost sinteze enterotoksina (Lamprell i sar., 2004).

Enterotoksini predstavljaju veliku grupu heterogenih egzopeptida. Označeni su slovima abecede: A,B,C1,C2,C3,,D,E,F,G,H,I,J,K,L,M.N.O.P,Q.R.S.T,U,U2,W,V. Antigeno su vrlo slični. Prema sposobnosti da izazovu emezu kod primata podjeljeni su na prave ili klasične enterotoksine (SEA-SEC) i enterotoksinima slične supstance (Argudin i sar., 2010). Prevalencija enterotoksogenih stafilokoka izolovanih iz vimena zdravih muznih krava je mala i iznosi 3,9% – 6,0 %, dok je, kod izolata potvrđenih kao uzročnika zapaljenja vimena, veća i iznosi 14,6 % – 41,3 % (ECHCPD, 2003).

Nije tačno poznata uloga enterotoksina u zapaljenju vimena, ali se pretpostavlja da imaju imunosupresivnu ulogu. U slučajevima mastitisa se češće izoluju enterotoksogeni sojevi, pre svega oni izolati koji imaju sposobnost sinteze enterotoksina C (Kuroishi i sar., 2003; Ebling i sar., 2001; Matsunaga i sar., 1993), ali i drugih enterotoksina (Singh i sar., 2011; Hwang i sar., 2010; ECHCPD, 2003; Akineden i sar., 2001; Kenny i sar., 1993). Hemoliza je često ustanovljena kod enterotoksogenih izolata, bilo kao fenotipska karakteristika ili identifikacijom gena koji kodiraju sintezu hemolizina. Najčešće je potvrđen beta hemolizin (Singh i sar., 2011; Peles i sar., 2007; Larsen i sar., 2002; Ikawaty i sar., 2010; Takeshige, 1983), alfa hemolizin (Singh i sar., 2011; Peles i sar., 2007; Takeshige, 1983), kombinacija alfa i beta hemolizina (Peles i sar., 2007) ali i svi oblici hemolize (Fueyo i sar., 2005). Takođe, ustanovljeni su izolati *S. aureus* koji su imali sposobnost sinteze enterotoksina, ali ne i hemolizina (Akineden i sar., 2001). Jedna od karakteristika enterotoksogenih stafilokoka, koja se češće sreće nego kod izolata koji nemaju tu sposobnost, je i rezistencija na antimikrobne lekove. Kako su u terapiji mastitisa lek izbora beta laktamski antibiotici, najčešća rezistencija enterotoksogenih sojeva je ustanovljena na penicilin (Haennil i sar., 2010; El-Jakee i sar., 2010; Rosengren i sar., 2010; Peles i sar., 2007; Moon i sar., 2007; Jorgensen i sar., 2005; Dura i sar., 1999; Adesyan i sar., 1995), ali i na druge preparate kao što su ampicilin (Adesyan i sar., 1995), kanamicin, eritromicin, tetraciklin, cefoksitin, tobramicin i drugi. (Haennil i sar., 2011; El-Jakee i sar., 2010; Peles i sar., 2007). Sposobnost sinteze enterotoksina je češće utvrđena kod meticilin rezistentnih stafilokoka (Moon i sar., 2007b; Adesyan i sar., 1995).

Veliki broj autora navodi da su izolati *S. aureus*, izolovani u slučajevima mastitisa, imali sposobnost sinteze enterotoksina ili bili nosioci gena koji determinišu sintezu enterotoksina. Prevalencija ovih izolata je različita: 74,9% i 33% u Japanu (Hata i sar., 2006); 53,6% i 96,7% u Trinidadu (Adesyian, 1995; Adesyian 1998); 25,5% u Turskoj (Boynukara i sar., 2008); 13,75% u Kaliforniji (Cenci-Goga i sar., 2003); 37,5% u SAD (Lee i sar., 1998); 93,6% i 28,6% u SAD (Srinivasan i sar., 2006; Kenny i sar., 1993); 54% i 58,7% u Nemačkoj (Stephan i sar., 1999; Zschöck i sar., 2005); 23,6% i 31,8% i 77,3% u Koreji (Moon i sar., 2007b; Hwang i sar., 2010); 13% i 14,3% u Brazilu, (Arcuri i sar., 2010; Fagundes i sar., 2010), 11,9% u Španiji (Fueyo i sar., 2005); 77,3% u Latviji (Joffei sar., 2006); 20,8% u Turskoj (Rahimi i sar., 2012). Geni koji kodiraju sintezu enterotoksina su smešteni na različitim mestima u bakterijskoj ćeliji: hromozomu, profagama, plazmidu ili ostrvcima patogenosti (ECHCPD, 2003; Borkowski i sar., 2005; Fueyo i sar., 2005; Hwang i sar., 2010; Rosengren i sar. 2010; Argudin i sar. 2010; Ikawaty i sar. 2010). *S. aureus* izolovan iz mleka može da ima sposobnost sinteze ili da bude nosilac gena za sintezu jednog klasičnog enterotoksina (Adesyian i sar., 1995; Ikawaty i sar., 2010; Cenci-Goga i sar., 2000; Adesyian i sar., 1998; Stephan i sar., 1999; Fueyo i sar., 2005; Joffe i sar., 2006; El-Jakee i sar. 2010; Neder i sar., 2011; Rahimi i sar., 2012; Fagundes i sar., 2010; Arcuri i sar., 2010; Peles i sar., 2007; Kenny i sar., 1993; Takeshige i sar., 1983; Rall i sar., 2008; Morandi i sar. 2009) ili kombinacije više klasičnih enterotoksina (Adesyian i sar., 1995; Cenci-Goga i sar., 2000; Srinivasan i sar., 2006; Stephan i sar., 1999; Moon i sar., 2007b; Haennil i sar., 2011; Akineden i sar., 2001; El-Jakee i sar., 2010; Neder i sar., 2011; Arcuri i sar., 2010; Rahimi i sar., 2012; Kenny i sar., 1993; Takeshige i sar., 1983; Rall i sar. 2008). Nalaz gena za enterotoksinima slične proteine ili nove enterotoksine je daleko češći nego gena za klasične enterotoksine (Hata i sar., 2006; Srinivasan i sar., 2006; Akineden i sar., 2001; Fueyo i sar., 2005; Jorgensen i sar., 2005; Omoe i sar., 2002; Zschöck i sar. 2005; Hwang i sar., 2010; Arcuri i sar., 2010; Peles i sar., 2007; Rall i sar., 2008; Ikawaty i sar., 2010; Irsina i sar., 2004). Geni koji kodiraju sintezu novih enterotoksina se često potvrđuju kao kombinacija dva gena (Haennil i sar., 2011; Fueyo i sar., 2005; Zschöck i sar., 2005; Rall i sar., 2008; Morandi i sar., 2009), tri gena (Zschöck i sar. 2005; Rall i sar., 2008; Morandi i sar., 2009), četiri gena (Haennil i sar.,

2011; Zschöck i sar., 2005; Rall i sar., 2008), pet gena (Hwang i sar., 2010) ili šest gena (Haennil i sar., 2011). Obzirom da nalaz gena za enterotoksine i njihove međusobne kombinacije mogu da budu specifične za izolate sa određenog područja, praćenje ovih karakteristika može da ima epidemiološki značaj u monitoringu enterotoksogenih sojeva, ali i o njihovoj geografskoj rasprostranjenosti i distribuciji faktora virulencije (Lee i sar., 1998; Moon i sar., 2007a; Arcuri i sar., 2010; Jorgensen i sar., 2005; Rahimi i sar., 2012; Irsina i sar., 2004; Piccini i sar., 2012). Kod *S. intermedius* koji je izolovan iz sirovog mleka krava, dokazana je sposobnost sinteze enterotoksina C, D i A i D (Lamprell i sar., 2004).

### **2.5.2. Značaj enterotoksogenih stafilokoka u mleku i potencijalni rizik za zdravlje ljudi**

Enterotoksini su heterogena grupa proteinskih toksina molekulske mase 22-28kDa (Kenny i sar., 1993). Primarno ih sintetiše *Staphylococcus aureus*, ali su zabeležene intoksikacije gde su uzročnici bili *S. hyicus* koji je pokazao sposobnost sinteze enterotoksina A do E i enterotoksin C koji je sintetisao *S. intermedius*. (ECHCPD, 2003).

Broj ćelija *S. aureus* koje se izluče iz obolelog vimena može iznositi od nekoliko stotina do  $10^5$  cfu/ml, a u slučaju da se temperatura mleka ne snizi za kratko vreme ispod  $10^{\circ}\text{C}$ , broj stafilokoka se može rapidno uvećati (ECHCPD, 2003). Sa druge strane, u namirnici mogu biti prisutni enterotoksini, a broj *S. aureus* može biti ispod kritične vrednosti ako je, iz različitih razloga, došlo do opadanja populacije u namirnici (Council Directive 92/46/EEC). Tokom procesa prerade hrane (kuvanje, čuvanje, transport), ako se stafilokoke sa enterotoksogenim osobinama nađu u hrani u velikom broju (više od  $10^5$ – $10^6$ cfu/g /ml), postoji rizik od intoksikacije (Council Directive 92/46/EEC, Delbes i sar., 2006; Froeder i sar., 2010; Adesyan i sar., 1998; Jorgensen i sar., 2005).

Enterotoksini se mogu dokazati u proizvodima od mleka proizvedenim od sirovog mleka koje je sadržalo enterotoksogene stafilokoke, svežim sirevima (Arcuri i sar., 2010; Joffei sar., 2006; Delbes i sar., 2006; Morandi i sar., 2009), pavlaci kao i drugim proizvodima koji se nalaze u prometu (Joffei sar., 2006). Tokom prerade mleka može

doći do koncentrisanja stafilokoka, tako da je njihov broj u proizvodu značajno veći nego u sirovom mleku (Joffei sar., 2006). U nekim zemljama se konzumira sirovo mleko ili postoji tradicija proizvodnje sireva od nekuvanog mleka. Iz tog razloga je preporučeno da, ako se, u sirevima od nekuvanog mleka ili mekim sirevima bez zrenja, utvrdi broj koagulaza pozitivnih stafilokoka  $>10^5$  cfu/g, takva namirnica mora biti obavezno ispitana na prisustvo enterotoksina (Commission Regulation (EC) No 2073/2005 2005).

Enterotoksini u namirnici se sintetišu pri dosta širokom opsegu pH, temperature, aktivnosti vode, sadržaja soli, redoks potencijala i atmosfere. Enterotoksini stafilokoka su rezistentni na dejstvo proteolitičkih enzima i visokih temperatura. Sirovo mleko je odlična podloga za rast i razmnožavanje stafilokoka, naročito ako se čuva pri temperaturama višim od  $10^{\circ}\text{C}$ . U sirovom mleku čvanom pri različitim temperaturama, a sa inicijalnim brojem ćelija *S. aureus*  $10^6$  cfu/ml enterotoksin je potvrđen nakon 6 h inkubacije pri temperaturi  $35^{\circ}\text{C}$ , 18 h pri  $25^{\circ}\text{C}$  i 36 h pri  $20^{\circ}\text{C}$ . Sa nešto nižim početnim inokulumom *S. aureus* ( $10^4$  cfu/ml mleka), enterotoksin je utvrđen nakon 12h pri  $35^{\circ}\text{C}$ . (ECHCPD 2003.) Kada broj *S. aureus* u namirnici dostigne vrednost  $10^5$ - $10^6$  cfu/g/ml u pogodnim uslovima stvara se količina enterotoksina koja može da se detektuje, ali i da izazove trovanja ljudi.

Pri proceni rizika od intoksikacije nekom namirnicom mora se dokazati prisustvo enterotoksina. Za otkrivanje enterotoksina u hrani primenjuju se imunološke metode i to identifikacioni setovi kojima se otkrivaju enterotoksini A-E. Komercijalni kitovi nisu dostupni za detekciju novih grupa enterotoksina i enterotoksinima sličnih proteina. ELISA test je ustanovljen i za SEH, SEG i SEI. Molekularnim metodama se dokazuje prisustvo gena u ćeliji koji kodiraju jedan ili više enterotoksina, ali to je potvrda latentne sposobnosti stafilokoka, jer prisustvo gena ne znači nužno i prisustvo enterotoksina u namirnici. Enterotoksini *S. aureus* su potvrđeni kao uzročnici niz alimentarnih epidemija u zemljama Evropske unije u periodu 1993-1997. U Francuskoj od svih alimentarnih obolenja 13,6% je bilo izazvano enterotoksinima stafilokoka, a od toga 26% je nastalo nakon konzumiranja mleka; u Portugalu su enterotoksini *S. aureus* dokazani kao uzrok intoksikacija u 9,9% svih epidemija, a od toga 1,7% je nastalo nakon konzumiranja sira; u Finskoj su enterotoksini *S. aureus* dokazani kao uzrok



intoksikacija u 8,2 % epidemija, a od toga 1,1% je nastalo nakon konzumiranja proizvoda od mleka; u Belgiji enterotoksini *S. aureus* su dokazani kao uzrok intoksikacija u 4,9 % epidemija, a od toga 5,4% je nastalo nakon konzumiranja proizvoda od mleka i 2,5% nakon konzumiranja sireva; u Španiji enterotoksini su dokazani kao uzrok intoksikacija u 4,1% epidemija, od toga 1,6% epidemija je nastalo nakon konzumiranja proizvoda od mleka; u Švedskoj enterotoksini *S. aureus* su dokazani kao uzrok intoksikacija u 3,6% epidemija, a od toga 1,15% epidemija je nastalo nakon konzumiranja sira.

U ostalim zemljama Evropske unije prevalencija alimentarnih epidemija je bila niža, ali su one potvrđene u Austriji, Danskoj, Engleskoj i Velsu, Nemačkoj, Italiji, Škotskoj i u Holandiji u 0,2%; 3,2%; 1,0%; 2,8%; 1,8%; 2,3% i 0,9% alimentarnih epidemija. (ECHCPD, 2003). U 2008. godini zabeležena je 291 alimentarna epidemija izazvana sa *S. aureus* što je činilo 5,5% ukupnih epidemija, a najviše je zabeleženo u Francuskoj 211, Španiji 32 i Poljskoj 10 epidemija (EFSA, 2010). Tokom 2009. godine u zemljama Evropske unije bakterijski toksini su bili uzročnici preko 400 alimentarnih epidemija tokom svake godine, s trendom blagog povećanja broja. *S. aureus* je potvrđen u 293 alimentarne epidemije u 2009. godini, a najviše epidemija je bilo u Francuskoj 218 i u Španiji 30. Sirevi, kao inkriminisana namirnica, su bili zastupljeni u 21,6%, dok su mlečni proizvodi bili zastupljeni u 3,4% epidemija (EFSA, 2011). Mleko i proizvodi od mleka čine 1-9% namirnica koje su bile dokazane kao izvor enterotoksina u slučajevima alimentarnih epidemija u Evropi. Toksična doza za SEA iznosi 0,5µg, odnosno emetična doza D<sub>50</sub> iznosi 0,2µg /kg telesne mase kod ljudi, što navodi da ingestija 10-20µg enterotoksina dovodi do pojave simptoma trovanja. Kod osetljivih osoba unos 1µg enterotoksina može izazvati simptome trovanja. U Japanu je potvrđena alimentarna epidemija nastala konzumiranjem čokoladnog mleka koje je sadržalo 0,144µg enterotoksina H (ECHCPD 2003).

Prvi simptomi trovanja se javljaju 30 minuta do 8 časova nakon konzumiranja namirnice koja sadrži enterotoksine, a najčešće se javljaju mučnina, povraćanje, bolovi u truhu i dijareja, a nekada i glavobolja i skok krvnog pritiska. Enterotoksini imaju supraantigena svojstva izazivajući nespecifičnu aktivaciju T limfocita koja dovodi do otpuštanja citokina i izazivanja sistemskog šoka. Vrlo su rezistentni su na visoke

temperature i na proteolitičke enzime. Hospitalizacija obolelih i smrtni ishodi su retki (ECHCPD, 2003). Kao uzročnici intoksikacije su najčešće utvrđeni klasični enterotoksini. SEA je bio uzročnik sam u 56,9% epidemija, ili u kombinaciji sa SED, SEB, SEC i SEB, dok je SED je bio najmanje zastupljen. SEA je bio najčešći uzročnik trovanja u Francuskoj (69,7%), gde je preko velikog broja namirnica, uključujući i mleko i mlečne proizvode, u periodu 1981.-2002. bio uzročnik alimentarnih trovanja. U skladu sa tim, kod izolovanih *S. aureus* je detektovan gen *sea* kao najčešći, a zatim i *sed*, *seg*, *sei* i *seh*. SEA i SED. SEA je takođe bio najčešći enterotoksin u SAD (77,8% od svih epidemija), a zatim SED i SEB. Studija sprovedena u Brazilu je pokazala da su najčešći geni *S. aureus* izolovanog iz proizvoda od mleka koji su bili odgovorni za 16 epidemija, najčešće imali *sea* gen, a zatim *seb*. U periodu 2001-2003. na Tajvanu *sea* je bio najčešće dokazan gen, a zatim *seb* i *sec*. U Koreji oko 90% trovanja hranom je bilo izazvano sa izolatima koji su imali *sea* gen, takođe najčešći je bio i u Japanu 2009. godine, a inkriminisana namirnica je bila obrano mleko u kome je dokazan SEA. SEB, SEC i SED sami ili u kombinaciji, su takođe, bili uključeni u alimentarna trovanja širom sveta. U Francuskoj je 2009. godine zabeležena epidemija nastala posle konzumiranja mekog sira, proizvedenog od sirovog mleka, koji je sadržavao SEE. Za razliku od klasičnih enterotoksina, uloga novih enterotoksina i enterotoksinima sličnih proteina nije tačno utvrđena. U eksperimentima na primatima nije utvrđena emetička aktivnost SEG, SEH i SEI, SER, SES, i SET, a u eksperimentima na kunićima je dokazana emetična aktivnost SE/L i SE/P. Od nove grupe enterotoksina, samo SEH je bio uključen u alimentarnu epidemiju, ali brojna istraživanja pokazuju prisustvo velikog broja gena koji kodiraju nove enterotoksine (Argudin i sar., 2010).

### 3. CILJEVI I ZADACI

Cilj istraživanja je bio da se utvrdi da li postoji razlika u fenotipskim i genotipskim karakteristikama koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka uzetih u slučajevima latentne infekcije, subkliničkih mastitisa i kliničkih mastitisa krava u različitim fazama laktacije i da li postoji veza između osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka na antimikrobne lekove i prisustva gena za stvaranje enterotoksina.

Za ostvarivanje ovog cilja doktorant postavlja za zadatke da:

- 3.1. Izoluje koagulaza pozitivne stafilokoke iz uzoraka mleka krava uzetih u slučajevima latentne infekcije, subkliničkih mastitisa i kliničkih mastitisa krava u različitim fazama laktacije;
- 3.2. Izvrši identifikaciju izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka do vrste na osnovu biohemijskih osobina;
- 3.3. Ispita osetljivost izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka na antimikrobne lekove disk difuzionom metodom;
- 3.4. Utvrdi minimalnu inhibitornu koncentraciju penicilina G za izolate koagulaza pozitivnih stafilokoka koji su na osnovu disk difuzione metode utvrđeni kao osetljivi i kao rezistentni.
- 3.5. Izvrši fenotipsku karakterizaciju izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka rezistentnih na antimikrobne lekove.
- 3.6. Ispita sposobnost izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, rezistentnih na antimikrobne lekove, da stvaraju enterotoksine.
- 3.7. Ispita odabrane izolate koagulaza pozitivnih stafilokoka, koji su disk difuzionim testom ocenjeni kao rezistentni na penicilin G na prisustvo *mecA* gena.

## **4. MATERIJAL I METODE**

### **4.1. Materijal**

#### **4.1.1. Uzorci mleka**

Uzorci mleka za bakteriološko ispitivanje na uzročnike mastitisa su uzeti iz pojedinih četvrti vimena od 9.181 krave u različitim fazama laktacije sa tri farme.

Farma I: uzorci mleka od 1225 krava osam do deset dana nakon telenja, 1581 krave iz avansa; 923 krava u laktaciji i 921 krave pred zasušenje.

Farma II: uzorci mleka od 656 krave osam do deset dana nakon telenja, 347 krava iz avansa, 714 krava u laktaciji i 696 krava pred zasušenje.

Farma III: uzorci mleka od 1050 krava osam do deset dana nakon telenja, 325 krava iz avansa, 39 krava u laktaciji i 699 krava pred zasušenje.

#### **4.1.2.1. Izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka za ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove**

Kod svih (830) izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka koji su izolovani iz uzoraka mleka uzetih u različitim fazama laktacije ispitana je osetljivost disk difuzionom metodom po Kirbi Bauer-u na odabrane antimikrobne lekove. Izbor antibiotika je urađen na osnovu dostupnosti preparata koji se nalaze na tržištu za terapiju mastitisa.

Makrodilucionom metodom je ispitano 146 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka karakterističnih makromorfoloških osobina za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su osetljivi na penicilin G i 145 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka karakterističnih makromorfoloških osobina za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su rezistentni na penicilin G.

Za ispitivanje rezistencije na meticilin oksid testom sa oksicilinom i cefoksitinom ispitano je 373 izolata za koje je disk difuzionim testom utvrđeno da su rezistentni na penicilin G.

#### **4.1.2.2. Izolati koagulaza pozitivnih stafilocoka izdvojeni kao karakteristični za ispitivanje fenotpskih i genotipskih karakteristka**

Za ispitivanje biohemijskih osobina i sposobnosti sinteze enterotoksina odabrano je 50 izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz uzoraka mleka krava sa subkliničkim mastitisom od kojih je za 35 (78,6%) izolata disk difuzionom metodom utvrđeno da su rezistentni na penicilin G i 15 (21,4%) izolata osetljivo na penicilin G.

#### **4.1.3. Podloge za izolovanje koagulaza pozitivnih stafilocoka**

##### **4.1.3.1. Krvni agar sa eskulinom i ferocitratom za izolovanje koagulaza pozitivnih stafilocoka iz uzoraka mleka**

Baza za krvni agar (Becton Dickinson)

|                   |      |
|-------------------|------|
| - Govedi ekstrakt | 10,0 |
| - Pepton No 1     | 10,0 |
| - Natrijum hlorid | 5,0  |
| - Agar No 2       | 12,0 |

Rastvoreno je 37 g praha u 1 litru dejonizovane vode, mešano 10 minuta i zagrevano do rastvaranja. Kada je podloga potpuno rastvorena sterilisana je 15 minuta pri temperaturi od 121°C. Nakon sterilizacije podloga je ohlađena na 47°C i na 100 ml podloge je dodato 0,1% sterilnog rastvora eskulina, 2 ml 0,1% rastvora ferocitrata i 100 ml citratne teleće krvi. Podloge je razlivena u Petri ploče.

##### **4.1.3.2. API Staph bioMérieux kitovi**

Biohemiska identifikacija koagulaza pozitivnih stafilocoka je rađena komercijalnim kitovima API Staph bioMérieux.

##### **4.1.3.3. Podloga za ispitivanje osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilocoka na odabrane antimikrobne lekove disk difuzionom metodom po Kirbi-Baueru**

### **Mueller-Hinton agar** (Becton Dickinson)

- Goveđi ekstrakt 2,0 g
- Kiseli hidrolizat kazeina 17,5 g
- Skrob 1,5 g
- Agar broj 1 17,0 g

Rastvoreno je 38 g praha u jednom litru demineralizovane vode uz intenzivno mešanje 10 minuta. Kada je podloga potpuno rastvorena sterilisana je 15 minuta pri temperaturi od 121°C. Nakon sterilizacije podloga je ohlađena do temperature od 47°C i razlivena u sterilne Petri šolje.

### **Fiziološki rastvor**

- 8,5 g NaCl
- do 1000 ml destilovane vode

Odmereno je 8,5 g NaCl i rastvoreno u destilovanoj vodi. Nakon rastvaranja fiziološki rastvor je razliven po 9 ml u epruvete i sterilisan 15 minuta pri temperaturi od 121°C.

### **4.1.3.4. Podloga za ispitivanje osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka na antimikrobne lekove makrodilucionom metodom**

### **Mueller Hinton II Broth -cation-adjusted (CAMBH)** (Becton Dickinson)

Podloga za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika makrodilucionom metodom

- Goveđi ekstrakt 3,0 g
- Kiseli hidrolizat kazeina 17,5 g
- Skrob 1,5 g
- Destilovana voda do 1000 ml

Podloga sadrži 20–25 mg/l kalcijuma i 10–12,5 mg/l magnezijuma.

U 1 litar destilovane vode rastvoreno je 22 g praha CAMBH i zagrevano uz stalno mešanje dok se prah potpuno ne rastvori.

### **Priprema 1,6% rastvora boje brom krezol purpur**

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Brom krezol purpur | 0,8 g   |
| 0,1 mol/l NaOH     | 14,8 ml |
| Etanol 96%         | 35,2ml  |

U 200 ml CAMBH je dodato 0,2 ml rastvora boje zatim je podloga razlivena u serološke epruvete po 1 ml i sterilisana 10 minuta pri temperaturi od 121°C.

### **Priprema rastvora penicilina G**

Za rastvor penicilina G koncentracije 1:1000 je u aseptičnim uslovima odmereno 20 mg penicilina G i rastvoreno u 20 ml sterilne destilovane vode, a za rastvor koncentracije 1:10.000 odmereno je 202 mg penicilina G i rastvoreno u 20 ml sterilne destilovane vode.

U 100 ml CAMBH bujona dodato je 1,28ml rastvora penicilina G 1:10.000 da bi se postigla finalna koncentracija 128 µg/ml za ispitivanje izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su rezistentni na penicilin G, a 0,8ml rastvora penicilina G 1:1000 da bi se postigla finalna koncentracija 8 µg/ml za ispitivanje izolata osetljivih na penicilin G.

#### **4.1.3.5. Podloga i reagensi za ispitivanje genotipskih karakteristika *mecA* gena, 16S rRNK i *nuc* gena**

- 1. MasterPure Complete DNA and RNA Purification kit (Tissue and Cell Lysis solution, MPC protein Precipitation Reagent, TE buffer)** - kit za izolaciju ukupnih nukleinskih kiselina, proizvođač Epicentre, USA;
- 2. Proteinaza K** – proizvođač Merck, Nemačka;
- 3. Izopropanol** – proizvođač Sigma Aldrich, Nemačka;
- 4. Etanol 75%** – proizvođač Sigma Aldrich, Nemačka;
- 5. Amplitaq Gold PCR Master Mix (2×)** – kit za pripremu reakcione smeše, proizvođač Invitrogen, USA;

**6. SYBR Green MasterMix (2×)** – kit za pripremu *RealTime* PCR reakcione smeše, proizvođač Invitrogen, USA;

**7. Agarozni gel u prahu**– proizvođač Invitrogen, USA;

**8. Etidijum bromid** – proizvođač Sigma Aldrich, Nemačka;

**9. Gel Loading Dye** –boja za vizuelizaciju amplifikovanih sekvenci u elektroforetskom polju, proizvođač Invitrogen, USA

**10. Set prajmera za ispitivanje rezistencije na meticilin – 16S-f, 16S-r, nuc-f, nuc-r, mecA-f, mecA-r (100 μM)** - proizvođač Invitrogen, USA. Spisak prajmera korišćenih za ispitivanje rezistencije na meticilin je dat u tabeli **4.1.3.5.1**.

**Tabela 4.1.3.5.1.** Spisak korišćenih prajmera za određivanje rezistencije na meticilin

| Prajmer          | Target gen  | Dužina<br>amplifikovane<br>sekvence (bp) | Sekvenca  |
|------------------|-------------|--|---|
| 16S-f<br>16S-r   | <i>16S</i>  | 886                                      | 5'- GTGCCAGCAGCCGCGGTAA -3'<br>5'- AGACCCGGGAACGTATTAC -3'      |
| nuc-f<br>nuc-r   | <i>nuc</i>  | 255                                      | 5'- TCAGCAAATGCATCACAAACAG -3'<br>5'- CGTAAATGCACTTGCTTCAGG -3' |
| mecA-f<br>mecA-r | <i>mecA</i> | 527                                      | 5'- GGGATCATAGCGTCATTATTC -3'<br>5'- AACGATTGTGACACGATAGCC -3'  |

#### **4.1.3.6. Podloga za dokazivanje enterotoksina pomoću VIDAS™ Staphylococcal enterotoxin test SET2**

##### **Tripton soja bujon (Becton Dickinson)**

- Pankreasni digest kazeina 17,9 g
- Digest sojinog zrna 4 g
- Natrijum hlorid 8 g
- Kalijum fosfat 2,5 g
- Destilovana voda do 1000ml

U litar destilovane vode je dodato 30,4 gr praha, rastvor je zagrevan dok se podloga nije izbistrila. Podloga je razlivena u epruvete po 10 ml, a zatim sterilisana 15 min pri temperaturi od 121°C.



## **4.2. Metode**

### **4.2.1. Uzimanje uzoraka mleka iz pojedinih četvrti vimena krava za bakteriološki pregled**

Uzorci mleka su uzeti aseptično iz pojedinih četvrti vimena krava u različitim fazama laktacije. Prvi mlaz mleka je upotrebljen za mastitis test, a zatim je vrh papile dezinfikovano vatom natopljenom u 70% etanol. Nakon dezinfekcije papile oko 10 ml mleka je izmuženo u sterilnu epruvetu na kojoj je upisan broj krave i četvrti. Uzorci mleka su dostavljani u laboratoriju odmah nakon uzorkovanja. Bakteriološki pregled uzoraka mleka je započet najkasnije dva časa nakon uzorkovanja. U slučajevima kada se nije moglo odmah izvršiti zasejavanje, mleko je čuvano u frižideru na 4°C. Pre zasejavanja, rashlađeno mleko je termostatirano 15 minuta pri temperaturi od 37°C.

### **4.2.2. Bakteriološko ispitivanje uzoraka mleka krava na uzročnike mastitisa**

#### **4.2.1.1. Zasejavanje uzoraka mleka na krvni agar**

Na jedan kvadrant krvnog agara ezom prečnika 4 mm je preneto približno 0,01 ml dobro promešanog uzorka mleka. Broj krave je upisivan na kvadrant koji je određen za prednju levu četvrt. Nakon zasejavanja, podloge su ostavljene 15 minuta da se mleko upije, a zatim su inkubirane na 37°C tokom 24 časa. Kod uzoraka mleka iz laktacije sa povećanim brojem somatskih ćelija ili u slučaju kliničkog mastitisa, kod kojih nakon 24 časa nije bilo bakteriološkog rasta, inkubacija krvnog agara je produžavana do 48 časova. Nakon završene inkubacije karakteristične svetlo zlatne, zlatne, beličaste ili bele kolonije sa zonom alfa, beta, delta hemolize, kao i višestruke hemolize su presejavane na hranljivi agar koji je potom inkubiran 24 časa pri temperaturi od 37°C. Sa hranljivog agara iz izraslih kolonija pravljen je mikroskopski preparat koji je obojen metodom po Gramu, ispitivano je prisustvo katalaze sa vodonik peroksidom i urađen je koagulaza test sa razblaženom plazmom kunića.

Karakteristične izrasle kolonije koje su na krvnom agaru davale hemolizu, na mikroskopskom preparatu bile Gram pozitivne koke, katalaza pozitivne i koagulisale plazmu kunića su identifikovane kao koagulaza pozitivne stafilokoke.

## **4.2.2. Određivanje makromorfoloških karakteristika izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka**

### **4.2.2.1. Boja kolonija**

Pigment kolonija koagulaza pozitivnih stafilokoka izraslih na krvnom agaru je određivan nakon inkubacije 24 časa pri temperaturi od 37°C. Uočeno je sedam najčešćih pigmentacija: zlatno-siva, zlatna, svetlo zlatna, krem svetlo zlatna, belo-zlatna, krem-bela i beličasta.

### **4.2.2.2. Ispitivanje hemolize na krvnom agaru**

Hemolitična aktivnost izolata je određivana na krvnom agaru nakon inkubacije 18-24 časa pri temperaturi 37°C i hlađenja tokom 15-20 minuta na sobnoj temperaturi, kako bi se postakao toplo-hladni efekat. Potpuno prosvetljenje oko kolonija označavano je kao alfa hemoliza, nepotpuno prosvetljenje kao beta, a vrlo uska zona od oko 1 mm potpunog prosvetljenja oko kolonije kao delta hemoliza. Izolati kod kojih je utvrđeno potpno i nepotpuno prosvetljenje oko kolonija su označavani kao izolati koji daju alfa plus beta hemolizu.

### **4.2.3. Bojenje po Gramu**

U kap fiziloškog rastvora suspendovan je delić ispitivane kolonije i osušen na vazduhu. Nakon toga preparat je fiksiran provlačenjem kroz plamenik. Fiksiran preparat je preliven gencijanom violet i nakon 3 minuta boja je odlivena i preparat preliven Lugolovim rastvorom. Nakon delovanja Lugolovog rastvora jedan minut, preparat je ispran alkoholom. Ispran preparat je preliven rastvorom karbofuksina i nakon 20 sekundi preparat je ispran sa destilovanom vodom, osušen i posmatran pod imerzionim objektivom mikroskopa.

### **4.2.4. Ispitivanje prisustva katalaze**

Jedna kap 3% vodonik peroksida je stavljena na mikroskopsku pločicu i u nju je suspendovan delić ispitivane kolonije. Stvaranje mehurića je očitavano kao katalaza pozitivna reakcija.

#### **4.2.5. Ispitivanje sposobnosti koagulacije plazme kunića**

Po 0,5 ml razblažene sterilne plazme kunića razliveno je u sterilne serološke epruvete. Posebno su razliveno dve epruvete za kontrolu plazme. Delić ispitivane kolonije je suspendovan u razlivenu plazmu. Rezultati ispitivanja su čitani nakon inkubacije 2, 4, 6 i 24 časa pri temperaturi od 37°C. Formiranje čvrstog koagulum, mekšeg ili polutečnog je očitavano kao koagulaza pozitivna reakcija. Ako nije došlo do promene u konzistencije plazme, rezultat je očitavan kao koagulaza negativna reakcija. Kontrola plazme je rađena tako što je jedna epruveta sa razlivenom plazmom ostavljena nezasejana, a druga zasejana sa referentnim sojem stafilokoka (*Staphylococcus aureus* ATTC 11632) koji sigurno koaguliše plazmu kunića. Tokom perioda inkubacije nezasejana plazma je ostala tečna a plazma zasejana sa sigurno pozitivnim sojem stafilokoka je formirala koagulum.

#### **4.2.6. Ispitivanje biohemijskih karakteristika odabranih izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka API Staph bioMérieux kitovima**

Kultura koagulaza pozitivnih stafilokoka sa krvnog agara, stara 18-24 časa je suspendovana u API Staph tečnu podlogu za pripremu inokuluma do zamućenosti 0,5 McFarlanda. Odmah nakon pripreme suspenzija koagulaza pozitivnih stafilokoka je zasejana Pasterovom pipetom u mikrostripove prema preporuci proizvođača. Stripovi su inkubirani pri temperaturi 36°C ± 2°C tokom 18-24 časa. Nakon inkubacije, u ministripove, koje je označio proizvođač, dodati su reagensi prema uputstvu proizvođača i očitani rezultati. Rezultati su upisani u liste koje su imale sedam puta po tri reakcije. Kada su upisani rezultati dobijen je sedmocifrni digitalni kod. Unošenjem koda u softver dobijena je najverovatnija vrsta stafilokoka i procenat verovatnoće. Kao kontrola korišćen je referentni soj *Staphylococcus aureus* ATTC 11632.

#### **4.2.7. Ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove disk difuzionom metodom**

Sterilnom pipetom je odmeren 0,1 ml suspenzije izolata stafilokoka koji se ispituje i nanet na površinu Mueller-Hinton agara. Suspenzija je utrljana po celoj površini podloge sterilnim staklenim štapićem. Zasejana podloga je ostavljena 15 minuta pri sobnoj temperaturi da se naneta suspenzija stafilokoka upije u podlogu, a zatim su na

podlogu postavljani diskovi antimikrobnih lekova sledećih koncentracija: penicilin G 6µg (Torlak), amoksisilin/klavulanska kiselina (20+10 µg ) (Oxoid), kloksacilin 25 µg (Oxoid), amoksisilin 30 µg (Torlak), cefaleksin 30 µg (Torlak), ceftiofur 30 µg (Oxoid), linkomicin 15 µg (Oxoid), gentamicin 30 µg (Torlak), i tetraciklin 30 µg (Torlak).

Podloge sa postavljenim diskovima antimikrobnih lekova su inkubirane 24 časa pri temperaturi od 37°C. Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka na antimikrobne lekove je procenjena na osnovu prečnika zone inhibicije rasta izolata stafilokoka, a prema preporukama proizvođača diskova, i označena kao osetljiv (S), intermedijerno osetljiv (I) i rezistentan (R).

#### **4.2.8. Ispitivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) na penicilin makrodilucionom metodom u bujonu**

##### **4.2.8.1. Priprema CAMHB bujona za zasejavanje**

U stalak je postavljen niz epruveta sa 1ml sterilnog bujona. Prva epruveta je postavljena prazna i u nju je dodato 2 ml rastvora CAMHB bujona sa pripremljenom početnom koncentracijom penicilina G. Iz prve epruvete je prenet 1 ml bujona u sledeću epruvetu sa 1ml sterilnog bujona i homogenizovan, čime je koncentracija penicilina G dvostruko razređena, a zatim je iz tako razređenog bujona 1 ml prenet u sledeću epruvetu. Postupak je ponavljan do poslednje epruvete u nizu, s tim što je poslednji mililitar odbačen. Na ovaj način je dobijen niz bujona sa dvostrukim razređenjima penicilina G. Kod ispitivanja izolata, koji su disk difuzionom metodom ocenjeni kao osetljivi na penicilin G formiran je niz sa početnom koncentracijom 8µg/ml penicilina G, a zatim su pravljena razređenja od 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,06 i 0,03 µg/ml.

Kod ispitivanja izolata koji su disk difuzionom metodom ocenjeni kao rezistentni na penicilin G formiran je niz sa početnom koncentracijom penicilina G od 128µg/ml, a zatim su pravljena razređenja od 64, 32, 16, 8, 4, 2 i 1µg/ml. Minimalna koncentracija penicilina G koja je inhibirala više od 50% ispitivanih izolata je označena kao MIC<sub>50</sub>, a minimalna koncentracija penicilina G koja je inhibirala više od 90% izolata je označena kao MIC<sub>90</sub>.

#### **4.2.8.2. Zasejavanje bujona sa penicilinom G**

Iz fiziološkog rastvora sa koncentracijom stafilokoka  $10^7$  cfu/ml je po 50 $\mu$ l dodato u svaku epruvetu sa penicilinom G, tako da je finalna koncentracija stafilokoka u svakom bujonu bila  $1-5 \cdot 10^5$  cfu/ml.

Zasejan niz epruveta je inkubiran 24 časa pri temperaturi od 37°C. Nakon inkubacije su očitani rezultati tako što je kao minimalna inhibitorna koncentracija penicilina G označena prva koncentracija penicilina G pri kojoj nije ustanovljen rast koagulaza pozitivnih stafilokoka. Kao kontrolni soj korišćen je referentni soj *Staphylococcus aureus* ATTC 11632.

#### **4.2.9. Ispitivanje fenotipske rezistencije na meticilin**

Priprema i zasejavanje izolata stafilokoka je isti kao kod disk difuzione metode po Kirbi-Baueru. Nakon zasejavanja i sušenja podloge, na površinu su naneti diskovi oksacilina 1  $\mu$ g i cefoksitina 30 $\mu$ g proizvođača Becton-Dikinson. Podloge sa nanetim diskovima su inkubirane 24 časa pri temperaturi od 37°C. Nakon inkubacije, osetljivost na oksacilin i cefoksitin je procenjena na osnovu prečnika zone inhibicije oko ispitivanih diskova, i na osnovu preporuke proizvođača diska označavana kao osetljiv (S) ili rezistentan (R).

#### **4.2.10. Dokazivanje *mecA* gena i genotipskih karakteristika koagulaza pozitivnih stafilokoka**

Nakon analize genoma *Staphylococcus aureus* „BLAST“ softverom za ispitivanje su izabrani sledeći geni: 16S - koji je evoluciono visoko konzervisan za rod *Staphylococcus*, *nuc* – koji kodira sintezu ekstracelularnog enzima nukleaze, karakterističnog za *Staphylococcus aureus* i gen *mecA* – koji je odgovoran za sintezu proteina PBP2a. Softverskom analizom konstruisani su parovi prajmera koji se komplementarno vežu ispred i iza odgovarajuće sekvence određenog gena.

Prvog dana ispitivanja izolovane su ukupne nukleinske kiseline iz svih 51 uzoraka (50 primoizolata i uzorak referentnog soja ATCC 43300 *Staphylococcus aureus* MRSA Positive). U svaku od mini tubica koje su sadržavale precipitirane bakterijske ćelije dodato je po 0,3 mL Tissue and Cell rastvora i po 1  $\mu$ L Proteinaze K koncentracije 50

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Uzorci su potom postavljeni u vodeno kupatilo na temperaturu od  $65^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 15 minuta.

Nakon inkubiranja, uzorci su stavljeni na led u trajanju od 5 minuta, a zatim je u svaki uzorak dodato po 0,15 mL MPC Protein Precipitation reagensa. Uzorci su potom mešani na vibratoru za epruvete tokom 10 sekundi. Nakon mešanja, uzorci su centrifugirani tokom 10 min pri 13.000 o/min. Dobijeni supernatant je pipetiran u nove minutube i u svaku je potom dodato po 0,5 mL izopropanola. Potom su nukleinske kiseline precipitirane centrifugiranjem tokom 10 min pri 13.000 o/min. Izopropanol je odliven, a precipitat je dva puta ispran 75% etanolom, a potom je sav rezidualni etanol uklonjen. Dobijeni precipitat nukleinskih kiselina rastvoren je u 35  $\mu\text{L}$  pufera za čuvanje DNK i stavljen u zamrzivač na temperaturu od  $-30^{\circ}\text{C}$ .

Dobijeni izolati DNK ispitani su konvencionalnom multipleks PCR tehnikom. Za sve ispitivane gene pripremljena je posebna smeša čiji je sastav dat u Tabeli 4.2.10.1.

**Tabela 4.2.10.1.** Sastav reakcione smeše za konvencionalni PCR

|   |      |
|---|------|
| Ukupni volumen smeše ( $\mu\text{L}$ )                    | 50   |
| Sastav i koncentracije komponenti:                        |      |
| 2 $\times$ Amplitaq Gold PCR Master Mix ( $\mu\text{L}$ ) | 25,0 |
| 16S-f ( $\mu\text{L}$ )                                   | 0,5  |
| 16S-r ( $\mu\text{L}$ )                                   | 0,5  |
| nuc-f ( $\mu\text{L}$ )                                   | 0,5  |
| nuc-r ( $\mu\text{L}$ )                                   | 0,5  |
| mecA-f ( $\mu\text{L}$ )                                  | 0,5  |
| mecA-r ( $\mu\text{L}$ )                                  | 0,5  |
| Sterilna dd H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ )            | 17,0 |
| DNK ispitivanog uzorka                                    | 5,0  |

Program multipleks PCR reakcije dat je u tabeli 4.2.10.2.

**Tabela 4.2.10.2.** Program za multipleks PCR

|                         |      |       |
|-------------------------|------|-------|
| Inicijalna denaturacija | 95°C | 5 min |
| 30 ciklusa              | 95°C | 30 s  |
|                         | 55°C | 30 s  |
|                         | 72°C | 60 s  |
| Finalna elongacija      | 72°C | 7 min |

Nakon amplifikacije, po 10 µL dobijenog amplifikata pomešano je sa 2 µL boje za elektroforezu i mešavina je pipetirana u bunarčice 2% agaroznog gela obojenog etidijum bromidom. Gel je stavljen u kadu i podvrgnut elektroforezi pri naponu od 120 V, jačini struje od 400 mA tokom 30 minuta. Nakon elektroforeze, gelovi su stavljeni na UV transiluminator radi vizuelizacije traka, nakon čega su snimljeni sistemom za fotografisanje gelova GelDoc (Eppendorf, Nemačka).

#### **4.2.11. Dokazivanje sposobnosti sinteze enterotoksina**

Ispitivanje sposobnosti sinteze enterotoksina odabranih izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka je rađeno VIDAS™ Staphylococcal enterotoxin test SET2, 30701 (bioMérieux, Francuska). VIDAS SET2 koristi ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) tehniku za direktnu simultanu detekciju sedam tipova enterotoksina (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED i SEE), koristeći monoklonska anti-stafilokokni enterotoksin antitela. Ovaj test je kvalitativan i semikvantitativan. Osetljivost testa VIDAS™ SET2 je manje od 0,5 ng/ g za toksine A i B, manje od 1,0 ng/ g za toksine C2 i E, i blizu 1 ng /g za toksin D.

##### **4.2.11.1. Priprema izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka za ispitivanje sposobnosti sinteze enterotoksina**

Nekoliko tipičnih kolonija koagulaza pozitivnih stafilocoka sa krvnog agara je zasejano u Triptozni soja bujon i inkubirano 24 h na temperaturi od 37°C. Uz sprovođenje protokola za tečne uzorke na VIDAS SET2 (bioMérieux, Francuska), pH je korigovan

dodavanjem NaOH (5M ili 1M) do finalne vrednosti 7,5 do 8. Korigovani uzorak je centrifugovan 15 min na 3-5.000 obrtaja, a zatim je 500 µl odpipetirano u Vidas SET2 strip. Tako pripremljen uzorak je postavljen u aparat Mini Vidas. Očitavanje rezultata je direktno poređenjem dobijenih vrednosti sa standardom.

#### 4.2.11.2. Ispitivanje gena za sintezu klasičnih enterotoksina kod stafilokoka

Nakon analize genoma *Staphylococcus aureus* „BLAST“ softverom, za ispitivanje su izabrani sledeći geni: *ftsZ* – koji je „housekeeping“ gen, odnosno gen karakterističan za *Staphylococcus aureus* i koji se uvek ispoljava, zatim gen *sea* – koji kodira sintezu stafilokoknog enterotoksina A, *seb* – koji kodira sintezu stafilokoknog enterotoksina B i gen *sed* – koji kodira sintezu stafilokoknog enterotoksina D.

Softverskom analizom konstruisani su parovi prajmera koji se komplementarno vežu ispred i iza odgovarajuće sekvence određenog gena.

Narednog dana uzorci DNK, prethodno izolovani prvog dana za potrebe ispitivanja prisustva gena za metilinsku rezistenciju amplifikovani su na Real Time PCR uređaju. Za svaki od ispitivanih gena pripremljen je poseban pufer. Sastav smeše za izvođenje Real Time PCR reakcije dat je u tabeli 4.2.11.2.1.

**Tabela 4.2.11.2.1.** Sastav reakcione smeše za *Real Time* PCR

|                                    |      |
|------------------------------------|------|
| Ukupni volumen smeše (µL)          | 25,0 |
| Sastav i koncentracije komponenti: |      |
| 2×Pufer (µL)                       | 12,5 |
| Gen-f (µL)                         | 1,0  |
| Gen-r (µL)                         | 1,0  |
| Sterilna H <sub>2</sub> O (µL)     | 8,5  |
| DNK ispitivanog uzorka             | 1,0  |



Program ispitivanja gena za sintezu enterotoksina Real Time PCR metodom dat je u tabeli 4.2.11.2.2.

**Tabela 4.2.11.2.2.** Program za Real Time PCR

|                         |                   |        |
|-------------------------|-------------------|--------|
| Inicijalna denaturacija | 95°C              | 10 min |
| 40 ciklusa              | 95°C              | 15 s   |
|                         | 60°C (sva 4 gena) | 30 s   |
| Čitanje ploče           |                   |        |

Spisak prajmera koji su korišćeni pri određivanju gena za sintezu enterotoksina Real Time PCR metodom dat je u tabeli 4.2.11.2.3.

**Tabela 4.2.11.2.3.** Spisak korišćenih prajmera za određivanje gena za sintezu enterotoksina

| Prajmer          | Target gen  | Dužina amplifikovane sekvence (bp) | Sekvenca   |
|------------------|-------------|------------------------------------|--|
| ftsZ-f<br>ftsZ-r | <i>ftsZ</i> | 121                                | 5'- ATCCAAATCGGTGAAAAATTAACAC -3'<br>5'- CCATGTCTGCACCTTGGATTG -3'       |
| sea-f<br>sea-r   | <i>sea</i>  | 93                                 | 5'- TCAATTTATGGCTAGACGGTAAACAA-3'<br>5'- GAAGATCCAACCTCCTGAACAGTTACA -3' |
| seb-f<br>seb-r   | <i>seb</i>  | 85                                 | 5'- AACAACTCGCCTTATGAAACGGGAT -3'<br>5'- CTCCTGGTGCAGGCATCATGTCA -3'     |
| sed-f<br>sed-r   | <i>sed</i>  | 150                                | 5'- AAACGTTAAAGCCAATGAAAACA -3'<br>5'- TGATCTCCTGTACTTTTATTTTCTCCTA -3'  |

Nakon Real Time PCR reakcije očitane su Ct vrednosti svakog ispitivanog gena u svakom uzorku i upoređene sa Ct vrednosti referentnog soja ATCC 43300 *Staphylococcus aureus* MRSA Positive. Eksperiment je ponovljen 3 puta da bi se dobili što koherentniji rezultati.

## 5. REZULTATI ISPITIVANJA

### 5.1. Rezultati ispitivanja nalaza koagulaza pozitivnih stafilocoka u uzorcima mleka krava uzetim u različitim fazama laktacije

Prevalencija koagulaza pozitivnih stafilocoka je ispitana kod krava holštajn frizijske rase sličnih genetskih karakteristika i sa proizvodnjom mleka na godišnjem nivou od 8.000-9.000 litara mleka. Za ispitivanje su odabrane tri farme koje primenjuju različite tehnologije proizvodnje mleka. Bakteriološki je pregledano 36.724 uzoraka mleka uzetih od 9.181 krave u različitim fazama laktacije. U periodu laktacije ispitivano je mleko krava sa subkliničkim i kliničkim mastitisom. Rezultati ispitivanja nalaza koagulaza pozitivnih stafilocoka u uzorcima mleka krava prikazani su u tabeli 5.1.1.

**Tabela 5.1.1.** Rezultati ispitivanja prevalencije koagulaza pozitivnih stafilocoka u uzorcima mleka uzetim iz pojedinih četvrti vimena krava u različitim fazama laktacije

| Kategorija  | Farma I    |                |       | Farma II   |                |       | Farma III  |                |       |
|-------------|------------|----------------|-------|------------|----------------|-------|------------|----------------|-------|
|             | Broj krava | Izolovane KPS* |       | Broj krava | Izolovane KPS* |       | Broj krava | Izolovane KPS* |       |
|             |            | Br             | %     |            | Br             | %     |            | Br             | %     |
| Porodilište | 1225       | 22             | 1,79  | 656        | 29             | 4,42  | 1050       | 13             | 1,23  |
| Avans       | 1581       | 31             | 1,96  | 347        | 34             | 9,79  | 325        | 3              | 0,92  |
| Laktacija   | 923        | 81             | 8,77  | 714        | 145            | 20,3  | 39         | 5              | 12,82 |
| Zasušenje   | 921        | 256            | 27,79 | 696        | 207            | 29,74 | 699        | 14             | 2,00  |
| Ukupno      | 4655       | 390            | 8,38  | 2413       | 415            | 17,20 | 2113       | 35             | 1,64  |

\* Koagulaza pozitivne stafilocoke

Bakteriološkim ispitivanjem uzoraka mleka, uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava, ustanovljeno je prisustvo koagulaza pozitivnih stafilocoka na sve tri farme. Prevalencija koagulaza pozitivnih stafilocoka se kretala od 1,64% na farmi III do 8,38% na farmi I i 17,20% na farmi II. Nivo inficiranosti stada mlečnih krava koagulaza pozitivnim stafilocokama manji od 5% označen je kao niska prevalencija, a nivo inficiranosti iznad 10% označen je kao visoka prevalencija. Na osnovu nivoa inficiranosti farma III je označena kao farma sa niskom prevalencijom, a farma II kao farma sa visokom

prevalencijom koagulaza pozitivnih stafilokoka. Na farmi I prosečan nalaz koagulaza pozitivnih stafilokoka se kretao između nalaza na farmi III i farmi II, i zato je ta farma označena kao farma sa umerenom prevalencijom.

## **5.2. Rezultati identifikacije koagulaza pozitivnih stafilokoka na osnovu makromorfoloških karakteristika i biohemijskih osobina**

Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokoka je urađena na osnovu makromorfoloških osobina (pigmenta kolonija i hemolize na krvnom agaru) i pomoću biohemijskog komercijalnog niza API Staph bioMérieux.

### **5.2.1. Rezultati određivanja pigmeta kolonija**

Rezultati nalaza pigmeta kolonija koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava dati su u tabeli 5.2.1.1.

**Tabela 5.2.1.1.** Rezultati ispitivanja pigmeta kolonija koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava

| Pigment kolonija | Broj izolata | %   |
|------------------|--------------|-----|
| Zlatno siv       | 1            | 2   |
| Zlatan           | 29           | 58  |
| Zvetlo zlatan    | 14           | 28  |
| Belo zlatan      | 4            | 8   |
| Krem beo         | 1            | 2   |
| Beličast         | 1            | 2   |
| Ukupno           | 50           | 100 |

Koagulaza pozitivne stafilokoke izolovane iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava su najčešće stvarale zlatni (58% izolata) i svetlozlatni (28%) pigment, a najređe zlatno sivi, krem beo i beličast pigment (po 2% izolata).

### 5.2.2. Rezultati ispitivanja hemolize na krvnom agaru

Jedna od najvažnijih makromorfoloških osobina u identifikaciji koagulaza pozitivnih stafilocoka je stvaranje hemolize na krvnom agaru. Rezultati ispitivanja hemolize na krvnom agaru prikazani su u tabeli 5.2.2.1.

**Tabela 5.2.2.1.** Rezultati ispitivanja odabranih sojeva koagulaza pozitivnih stafilocoka da vrše hemolizu na krvnom agaru

| Hemoliza         | Broj izolata | %   |
|------------------|--------------|-----|
| $\alpha$         | 1            | 2   |
| $\beta$          | 25           | 50  |
| $\Delta$         | 2            | 4   |
| $\alpha + \beta$ | 18           | 36  |
| $\Delta + \beta$ | 4            | 8   |
| Ukupno           | 50           | 100 |

Najveći broj izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka (50%) je na krvnom agaru stvarao beta hemolizu, a zatim alfa i beta hemolizu (36%), a najmanji broj izolata je stvarao alfa hemolizu (2%).

### 5.2.3. Rezultati identifikacije odabranih izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka na osnovu komercijalnog testa API Staph bioMérieux

Na osnovu karakterističnih morfoloških osobina izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka je odabrano 50 izolata koji su ispitani API Staph bioMérieux testom. Rezultati tih ispitivanja prikazani su u tabeli 5.2.3.1.

**Tabela 5.2.3.1.** Rezultati identifikacije vrsta izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka primenom API Staph bioMérieux

| Vrsta stafilokoka     | Broj | %  |
|-----------------------|------|----|
| <i>S. aureus</i>      | 44   | 88 |
| <i>S. chromogenes</i> | 2    | 4  |
| <i>S. lentus</i>      | 1    | 2  |
| <i>S. sciuri</i>      | 1    | 2  |
| <i>S. xylosus</i>     | 1    | 2  |
| <i>S. intermedius</i> | 1    | 2  |

Rezultati prikazani u tabeli 5.2.3.1. pokazuju da su koagulaza pozitivne stafilokoke izolovane iz uzoraka mleka krava uzetih u različitim fazama laktacije najčešće identifikovane kao *S. aureus* (88% izolata), zatim *S. chromogenes* je (4% izolata), a po 2% izolata je identifikovano kao *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. xylosus*, *S. intermedius*.

### **5.3. Rezultati ispitivanja osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka na odabrane antimikrobne lekove disk difuzionom metodom**

Osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka na odabrane antimikrobne lekove je ispitana disk difuzionom metodom po Kirbi Bauer-u. Rezultati tih ispitivanja prikazani su u tabelama 5.3.1.; 5.3.2 i 5.3.3.

**Tabela 5.3.1.** Rezultati ispitivanja osetljivosti na antimikrobne lekove koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava na farmi I

| Antimikrobni lek              | Broj ispitanih izolata | Osetljiv |       | Intermedijerno osetljiv |       | Rezistentan |       |
|-------------------------------|------------------------|----------|-------|-------------------------|-------|-------------|-------|
|                               |                        | Br       | %     | Br                      | %     | Br          | %     |
| Penicilin G                   | 233                    | 50       | 21,46 | 19                      | 8,16  | 164         | 70,40 |
| Amoksisicilin i klavula. kis. | 252                    | 252      | 100   | 0                       | 0     | 0           | 0     |
| Ampicilin                     | 23                     | 23       | 100   | 0                       | 0     | 0           | 0     |
| Kloksacilin                   | 258                    | 258      | 100   | 0                       | 0     | 0           | 0     |
| Cefaleksin                    | 53                     | 48       | 90,56 | 2                       | 3,77  | 3           | 5,67  |
| Ceftiofur                     | 16                     | 16       | 100   | 0                       | 0     | 0           | 0     |
| Gentamicin                    | 107                    | 49       | 45,80 | 41                      | 38,30 | 17          | 15,90 |
| Tetraciklini                  | 33                     | 23       | 69,70 | 9                       | 27,27 | 1           | 3,03  |
| Linkomicin                    | 23                     | 17       | 73,90 | 0                       | 0     | 6           | 26,10 |

Svi izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovani iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava na farmi I su bili osetljivi na amoksisicilin i klavulansku kiselinu, ampicilin, kloksacilin i ceftiofur. Manji procenat izolata je bio osetljiv na cefaleksin (90,56%), linkomicin (73,90%), tetraciklin (69,70%) i gentamicin (45,80%). Najmanji procenat izolata je bio osetljiv na penicilin G (21,46%). Najveći broj izolata (70,40%) je bio rezistentan na penicilin G.

**Tabela 5.3.2.** Rezultati ispitivanja osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava na farmi II

| Antimikrobni lek            | Broj ispitanih izolata | Osetljiv |       | Intermedijerno osetljiv |       | Rezistentan |       |
|-----------------------------|------------------------|----------|-------|-------------------------|-------|-------------|-------|
|                             |                        | Br       | %     | Br                      | %     | Br          | %     |
| Penicilin G                 | 367                    | 118      | 32,15 | 28                      | 7,64  | 221         | 60,22 |
| Amoksicilin i klavula. kis. | 405                    | 376      | 92,84 | 0                       | 0     | 29          | 7,16  |
| Kloksacilin                 | 386                    | 359      | 93,00 | 0                       | 0     | 28          | 6,91  |
| Cefaleksin                  | 73                     | 71       | 97,30 | 0                       | 0     | 2           | 2,7   |
| Ceftiofur                   | 62                     | 62       | 100   | 0                       | 0     | 0           | 0     |
| Gentamicin                  | 129                    | 62       | 48,07 | 41                      | 31,78 | 26          | 20,15 |
| Tetraciklini                | 65                     | 57       | 87,70 | 5                       | 7,70  | 3           | 4,60  |
| Linkomicin                  | 37                     | 25       | 67,60 | 0                       | 0     | 12          | 32,40 |

Svi izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovani iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava na farmi II su bili osetljivi na ceftiofur. Manji procenat izolata je bio osetljiv na cefaleksin (97,30%), kloksacilin (93,00%), amoksicilin i klavulansku kiselinu (92,84), tetraciklin (87,70%), linkomicin (67,60%) i gentamicin (48,07%). Najmanji procenat izolata je bio osetljiv na penicilin G (32,15%). Kao i na farmi I najveći broj izolata (60,22%) je bio rezistentan na penicilin G.

**Tabela 5.3.3.** Rezultati ispitivanja osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava na farmi III

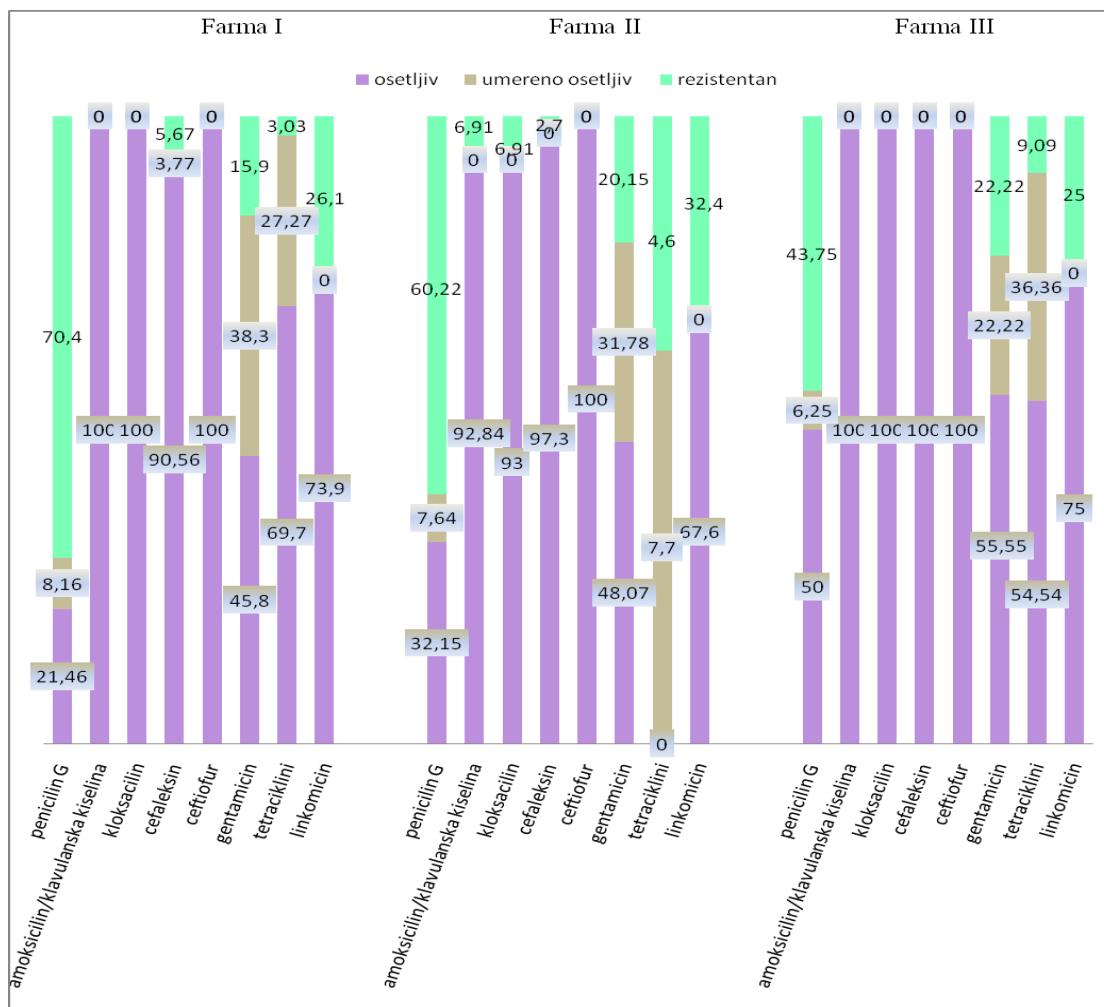
| Antimikrobni lek            | Broj ispitanih izolata | Osetljiv |       | Intermedijerno osetljiv |       | Rezistentan |       |
|-----------------------------|------------------------|----------|-------|-------------------------|-------|-------------|-------|
|                             |                        | Br       | %     | Br                      | %     | Br          | %     |
| Penicilin                   | 32                     | 16       | 50    | 2                       | 6,25  | 14          | 43,75 |
| Amoksicilin i klavula. kis. | 34                     | 34       | 100   | 0                       | 0     | 0           | 0     |
| Kloksacilin                 | 34                     | 34       | 100   | 0                       | 0     | 0           | 0     |
| Cefaleksin                  | 4                      | 4        | 100   | 0                       | 0     | 0           | 0     |
| Ceftiofur                   | 11                     | 11       | 100   | 0                       | 0     | 0           | 0     |
| Gentamicin                  | 18                     | 10       | 55,55 | 4                       | 22,22 | 4           | 22,22 |
| Tetraciklini                | 11                     | 6        | 54,54 | 4                       | 36,36 | 1           | 9,09  |
| Linkomicin                  | 8                      | 6        | 75    | 0                       | 0     | 2           | 25    |

Svi izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovani iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava na farmi III su bili osetljivi na amoksicilin i klavulansku kiselinu, kloksacilin, cefaleksin i ceftiofur. Manji procenat izolata je bio osetljiv na linkomicin (75%), gentamicin (55,55%), tetraciklin (54,54%). Najmanji procenat izolata je bio osetljiv na penicilin G (50%). Najveći broj izolata (43,75%) je bio rezistentan na penicilin G.

Uporedni prikaz osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovani iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava na farmama I, II i III na odabrane antimikrobne lekove prikazan je u grafikonu 5.3.1.



**Grafikon 5.3.1.** Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovani iz uzoraka mleka pojedinih četvrti vimena krava na farmama I, II i III na odabrane antimikrobne lekove



Penicilin je antibiotik koji se dugo upotrebljava u terapiji mastitisa kako u laktaciji tako i u periodu predzasušenje. Stoga smo u daljem radu ispitivali da li postoji razlika u osetljivosti na penicilin G između koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih u različitim fazama laktacije. Rezultati ispitivanja osetljivosti na penicilin G koagulaza pozitivnih stafilokoka, izolovanih iz uzoraka mleka krava u različitim fazama laktacije, prikazani su u tabelama 5.3.4; 5.3.5 i 5.3.6.

**Tabela 5.3.4.** Rezultati ispitivanja osetljivosti na penicilin G koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava u različitim fazama laktacije na farmi I

| Kategorija      | Broj ispitanih izolata | Osetljiv |              | Intermedijerno osetljiv |             | Rezistentan |              |
|-----------------|------------------------|----------|--------------|-------------------------|-------------|-------------|--------------|
|                 |                        | Br       | %            | Br                      | %           | Br          | %            |
| Porodilište     | 33                     | 6        | 18,20        | 2                       | 6           | 25          | 75,80        |
| Avans           | 27                     | 5        | 18,52        | 0                       | 9           | 22          | 81,48        |
| Laktacija       | 76                     | 11       | 14,47        | 9                       | 11,84       | 56          | 73,68        |
| Predzasušenje   | 95                     | 26       | 27,37        | 8                       | 8,42        | 61          | 64,21        |
| Ukupno ispitano | <b>231</b>             | 48       | <b>20,78</b> | 19                      | <b>8,22</b> | 164         | <b>70,10</b> |

Koagulaza pozitivne stafilokoke izolovane iz uzoraka mleka krava u predzasušenju na farmi I su u najvećem procentu bile osetljive na penicilin G (27,37%). Najveći broj izolata rezistentnih na penicilin G je utvrđen među koagulaza pozitivnim stafilokokama izolovanim iz uzoraka mleka krava u avansu (81,48%), a najmanji među koagulaza pozitivnim stafilokokama izolovanim iz uzoraka mleka krava u periodu predzasušenje (64,21%).

**Tabela 5.3.5.** Rezultati ispitivanja osetljivosti na penicilin G koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava u različitim fazama laktacije na farmi II

| Kategorija      | Broj ispitanih izolata | Osetljiv |              | Intermedijerno osetljiv |             | Rezistentan |              |
|-----------------|------------------------|----------|--------------|-------------------------|-------------|-------------|--------------|
|                 |                        | Br       | %            | Br                      | %           | Br          | %            |
| Porodilište     | 18                     | 8        | 44,44        | 0                       | 0           | 10          | 55,56        |
| Avans           | 41                     | 0        | 0            | 3                       | 7,32        | 38          | 92,68        |
| Laktacija       | 132                    | 42       | 31,82        | 15                      | 11,36       | 75          | 56,82        |
| Predzasušenje   | 173                    | 65       | 37,57        | 11                      | 6,36        | 97          | 56,07        |
| Ukupno ispitano | <b>362</b>             | 115      | <b>31,77</b> | 27                      | <b>7,46</b> | 220         | <b>60,77</b> |

Koagulaza pozitivne stafilokoke izolovane iz uzoraka mleka krava iz porodilišta na farmi II su u najvećem procentu bile osetljive na penicilin G (44,44%). Najveći broj izolata rezistentnih na penicilin G je i na ovoj farmi utvrđen među koagulaza pozitivnim stafilokokama izolovanim iz uzoraka mleka krava u avansu (92,68%), a najmanji među koagulaza pozitivnim stafilokokama izolovanim iz uzoraka mleka krava iz porodilišta (55,56%).

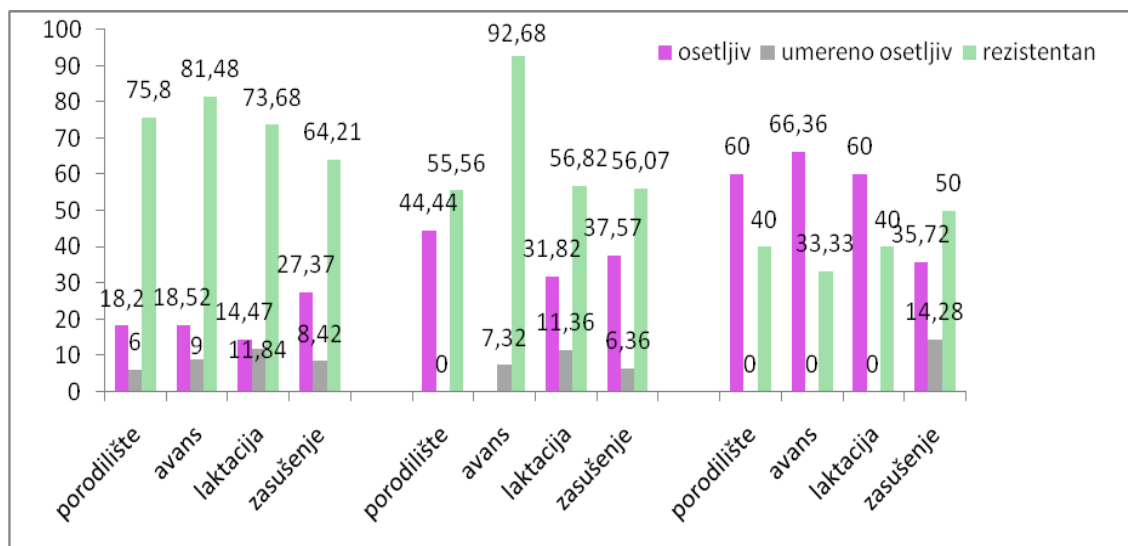
**Tabela 5.3.6.** Rezultati ispitivanja osetljivosti na penicilin G koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava u različitim fazama laktacije na farmi III

| Kategorija      | Broj ispitanih izolata | Osetljiv |           | Intermedijerno osetljiv |             | Rezistentan |              |
|-----------------|------------------------|----------|-----------|-------------------------|-------------|-------------|--------------|
|                 |                        | Br       | %         | Br                      | %           | Br          | %            |
| Porodilište     | 10                     | 6        | 60        | 0                       | 0           | 4           | 40           |
| Avans           | 3                      | 2        | 66,33     | 0                       | 0           | 1           | 33,33        |
| Laktacija       | 5                      | 3        | 60        | 0                       | 0           | 2           | 40           |
| Predzasušenje   | 14                     | 5        | 35,72     | 2                       | 14,28       | 7           | 50           |
| Ukupno ispitano | <b>32</b>              | 16       | <b>50</b> | 2                       | <b>6,25</b> | 14          | <b>43,75</b> |

Koagulaza pozitivne stafilokoke izolovane iz uzoraka mleka krava iz avansa na farmi III su u najvećem procentu bile osetljive na penicilin G (66,33%). Najveći broj izolata rezistentnih na penicilin G je utvrđen među koagulaza pozitivnim stafilokokama izolovanim iz uzoraka mleka krava u periodu predzasušenja (50%), a najmanji među koagulaza pozitivnim stafilokokama izolovanim iz uzoraka mleka krava iz avansa (33,33%).

Uporedna osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka na penicilin na farmama I, II i III je prikazana na grafikonu 5.3.2.

**Grafikon 5.3.2.** Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovani iz uzoraka mleka pojedinih četvrti vimena krava na penicilin na farmama I, II i III



Kombinacija amoksicilina i klavulanske kiseline je vrlo efikasna u terapiji mastitisa izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokoka koje stvaraju beta laktamazu. Svih 252 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka sa farme I i 34 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka sa farme III su bili osetljivi na amoksicilin i klavulansku kiselinu. Rezultati ispitivanja osetljivosti na amoksicilin i klavulansku kiselinu, koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava na farmi II, prikazani su u tabeli 5.3.7.

**Tabela 5.3.7.** Rezultati ispitivanja osetljivosti na amoksicilin i klavulansku kiselinu koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava na farmi II

| Kategorija             | Broj ispitanih izolata | Osetljiv   |              | Rezistentan |             |
|------------------------|------------------------|------------|--------------|-------------|-------------|
|                        |                        | Br         | %            | Br          | %           |
| Porodilište            | 16                     | 16         | 100          | 0           | 0           |
| Avans                  | 33                     | 33         | 100          | 0           | 0           |
| Laktacija              | 142                    | 121        | 85,21        | 21          | 14,79       |
| Predzasušenje          | 214                    | 207        | 96,73        | 7           | 3,27        |
| <b>Ukupno ispitano</b> | <b>405</b>             | <b>377</b> | <b>93,08</b> | <b>28</b>   | <b>6,91</b> |

Svi izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka poreklom iz uzoraka mleka krava iz porodilišta i avansa su bili osetljivi na amoksicilin i klavulansku kiselinu. Rezistencija na amoksicilin i klavulansku kiselinu je dokazana samo kod koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava u laktaciji (14,79%) i u periodu predzasušenja (3,27%).

Najčešće se u terapiji mastitisa izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokokama u fazi zasušenja koristi kloksacilin. Svih 258 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka sa farme I i 34 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka sa farme III su bili osetljivi na kloksacilin. Rezultati ispitivanja osetljivosti na kloksacilin koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava na farmi II su prikazani u tabeli 5.3.8.

**Tabela 5.3.8.** Rezultati ispitivanja osetljivosti na kloksacilin koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava na farmi II

| Kategorija      | Broj ispitanih izolata | Osetljiv   |              | Rezistentan |             |
|-----------------|------------------------|------------|--------------|-------------|-------------|
|                 |                        | Br         | %            | Br          | %           |
| Porodilište     | 22                     | 22         | 100          | 0           | 0           |
| Avans           | 30                     | 30         | 100          | 0           | 0           |
| Laktacija       | 122                    | 100        | 82           | 22          | 18          |
| Predzasušenje   | 209                    | 204        | 97,61        | 5           | 2,39        |
| Ukupno ispitano | <b>383</b>             | <b>356</b> | <b>92,95</b> | 27          | <b>7,05</b> |

Sve koagulaza pozitivne stafilokoke izolovane iz uzoraka mleka uzeti od krava iz porodilišta i avansa su bile osetljive na kloksacilin. Rezistencija na kloksacilin je dokazana samo kod koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava u laktaciji (18%) i u periodu predzasušenja (2,39%).

Osetljivost na cefaleksin je ispitana kod 130 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava u periodu predzasušenja na tri farme. Rezultati tih ispitivanja su prikazani u tabeli 5.3.9.

**Tabela 5.3.9.** Rezultati ispitivanja osetljivosti na cefaleksin koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava pred zasušenje.

| Kategorija | Broj ispitanih izolata | Osetljiv |       | Intermedijerno osetljiv |      | Rezistentan |      |
|------------|------------------------|----------|-------|-------------------------|------|-------------|------|
|            |                        | Br       | %     | Br                      | %    | Br          | %    |
| Farma I    | 53                     | 48       | 90,57 | 2                       | 3,77 | 3           | 5,66 |
| Farma II   | 73                     | 71       | 97,26 | 2                       | 2,74 | 0           | 0    |
| Farma III  | 4                      | 4        | 100   | 0                       | 0    | 0           | 0    |
| Ukupno     | 130                    | 123      | 94,61 | 4                       | 3,08 | 3           | 2,31 |

Visok procenat izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka osetljivih na cefaleksin je dokazan na sve tri ispitivane farme. Rezistentncija na cefaleksin je dokazana samo kod kod 5,66% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka poreklom sa farme I.

Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava uzetih u različitim fazama laktacije ispitana je kod 16 izolata sa farme jedan, 62 izolata sa farme II i 11 izolata sa farme III. Svi ispitivani izolati su bili osetljivi na ceftiofur.

Od aminoglikozidnih preparata za ispitivanje osetljivosti izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka je odabran gentamicin. Rezultati ispitivanja osetljivosti na gentamicin koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih na tri farme iz svih faza laktacije prikazani su u tabelama 5.3.10; 5.3.11 i 5.3.12.

**Tabela 5.3.10.** Rezultati ispitivanja osetljivosti na gentamicin koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih na farmi I

| Kategorija      | Broj ispitanih izolata | Osetljiv |              | Intermedijerno osetljiv |              | Rezistentan |              |
|-----------------|------------------------|----------|--------------|-------------------------|--------------|-------------|--------------|
|                 |                        | Br       | %            | Br                      | %            | Br          | %            |
| Porodilište     | 9                      | 3        | 33,33        | 4                       | 44,44        | 2           | 22,22        |
| Avans           | 15                     | 9        | 60           | 4                       | 26,66        | 2           | 13,33        |
| Laktacija       | 33                     | 9        | 27,27        | 18                      | 54,55        | 6           | 18,18        |
| Predzasušenje   | 48                     | 28       | 58,33        | 13                      | 27,08        | 7           | 14,58        |
| Ukupno ispitano | <b>105</b>             | 48       | <b>45,71</b> | 40                      | <b>38,09</b> | 17          | <b>16,19</b> |

U najvećem procentu su bile osetljive na gentamicin (60%) koagulaza pozitivne stafilokoke izolovane iz uzoraka mleka krava iz avansa, a zatim iz uzoraka mleka krava uzetih u periodu predzasušnja (58,33%). Procenat izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka rezistentnih na penicilin se kretao od 13,33% izolata iz avansa do 22,22% izolata iz porodilišta.

**Tabela 5.3.11.** Rezultati ispitivanja osetljivosti na gentamicin koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih na farmi II

| Kategorija      | Broj ispitanih izolata | Osetljiv |              | Intermedijerno osetljiv |              | Rezistentan |              |
|-----------------|------------------------|----------|--------------|-------------------------|--------------|-------------|--------------|
|                 |                        | Br       | %            | Br                      | %            | Br          | %            |
| Porodilište     | 5                      | 2        | 40           | 1                       | 20           | 2           | 40           |
| Avans           | 10                     | 6        | 60           | 3                       | 30           | 1           | 10           |
| Laktacija       | 2                      | 0        | 0            | 1                       | 50           | 1           | 50           |
| Predzasušenje   | 112                    | 54       | 48,21        | 36                      | 32,14        | 22          | 19,65        |
| Ukupno ispitano | <b>129</b>             | 62       | <b>48,06</b> | 41                      | <b>31,78</b> | 26          | <b>20,16</b> |

U najvećem procentu su bile osjetljive na gentamicin (60%) koagulaza pozitivne stafilocoke izolovane iz uzoraka mleka krava iz avansa, a zatim iz predzasušnja (48,21%). Procenat izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka rezistentnih na penicilin se kretao od 10% izolata iz avansa do 50% izolata iz laktacije.

Rezultati ispitivanja osjetljivosti na gentamicin koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih u različitim fazama laktacije na Farmi III prikazani su u tabeli 5.3.12.

**Tabela 5.3.12.** Rezultati ispitivanja osjetljivosti na gentamicin koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih na farmi III

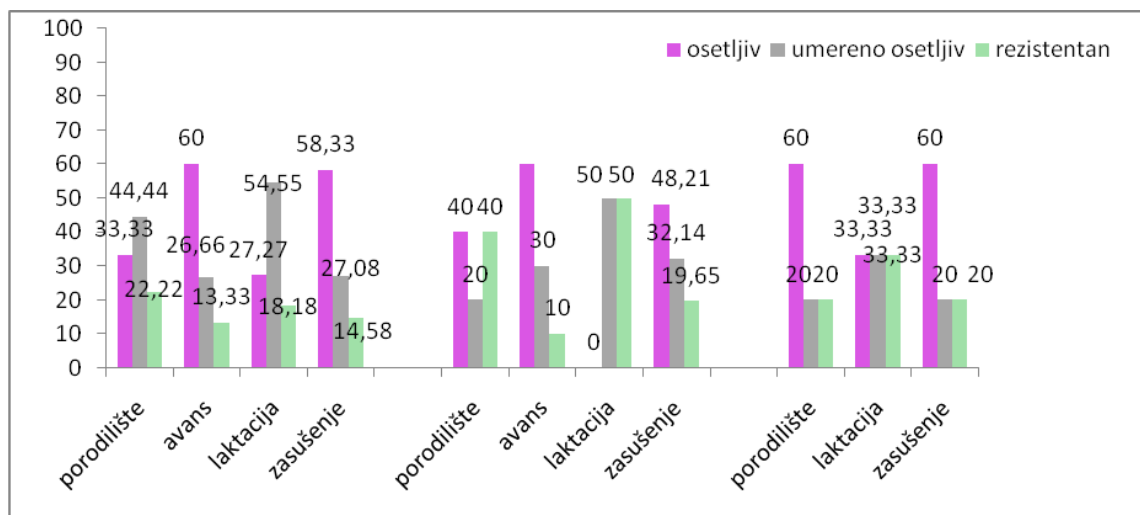
| Kategorija      | Broj ispitanih izolata | Osjetljiv |              | Intermedijerno osjetljiv |              | Rezistentan |              |
|-----------------|------------------------|-----------|--------------|--------------------------|--------------|-------------|--------------|
|                 |                        | Br        | %            | Br                       | %            | Br          | %            |
| Porodilište     | 10                     | 6         | 60           | 2                        | 20           | 2           | 20           |
| Laktacija       | 3                      | 1         | 33,33        | 1                        | 33,33        | 1           | 33,33        |
| Predzasušnje    | 5                      | 3         | 60           | 1                        | 20           | 1           | 20           |
| Ukupno ispitano | <b>18</b>              | 10        | <b>55,56</b> | 4                        | <b>22,22</b> | 4           | <b>22,22</b> |

Najveći procenat koagulaza pozitivnih stafilokoka osjetljivih na gentamicin je dokazan kod izolata iz uzoraka mleka krava iz porodilišta (60%) i predzasušnja (60%). Rezistencija na gentamicin dokazana je disk difuzionom metodom kod 33,33% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka iz laktacije, po 20% izolata iz uzoraka mleka krava iz porodilišta i predzasušnje.

Uporedna osjetljivost izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka na gentamicin na farmama I, II i III prikazana je u grafikonu 5.3.3.



**Grafikon 5.3.3.** Osetljivost izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka na gentamicin na farmama I, II i III



Rezultati ispitivanja osetljivosti na tetracikline koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava u svim fazama laktacije na farmi I su dati u tabeli 5.3.13.

**Tabela 5.3.13.** Rezultati ispitivanja osetljivosti na tetracikline koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih na farmi I

| Kategorija      | Broj ispitanih izolata | Osetljiv |              | Intermedijerno osetljiv |              | Rezistentan |             |
|-----------------|------------------------|----------|--------------|-------------------------|--------------|-------------|-------------|
|                 |                        | Br       | %            | Br                      | %            | Br          | %           |
| Avans           | 11                     | 7        | 63,64        | 4                       | 36,36        | 0           | 0           |
| Predzasušenje   | 20                     | 16       | 80           | 3                       | 15           | 1           | 5           |
| Ukupno ispitano | <b>31</b>              | 23       | <b>74,19</b> | 7                       | <b>22,58</b> | 1           | <b>3,23</b> |

Osetljivost na tetracikline je ispitivana samo kod koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava u avansu i predzasušenje. Veći procenat izolata osetljivih na tetracikline je dokazan kod koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava pred zasušenje (80%), nego kod koagulaza pozitivnih stafilokoka

izolovanih iz uzoraka mleka krava u avansu (63,64%). Disk difuzionom metodom rezistencija na tetracikline je dokazana samo kod koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava pred zasušenje (5%).

Rezultati ispitivanja osetljivosti na tetracikline koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava u svim fazama laktacije na farmi II su dati u tabeli 5.3.14.

**Tabela 5.3.14.** Rezultati ispitivanja osetljivosti na tetracikline koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih na farmi II

| Kategorija      | Broj ispitanih izolata | Osetljiv  |              | Intermedijerno osetljiv |             | Rezistentan |             |
|-----------------|------------------------|-----------|--------------|-------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                 |                        | Br        | %            | Br                      | %           | Br          | %           |
| Porodilište     | 5                      | 5         | 100          | 0                       | 0           | 0           | 0           |
| Avans           | 4                      | 4         | 100          | 0                       | 0           | 0           | 0           |
| Predzasušenje   | 56                     | 48        | 85,71        | 5                       | 8,93        | 3           | 5,36        |
| Ukupno ispitano | <b>65</b>              | <b>57</b> | <b>87,69</b> | <b>5</b>                | <b>7,69</b> | <b>3</b>    | <b>4,62</b> |

Svi izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka poreklom iz uzoraka mleka krava u porodilištu i avansu su bili osetljivi na tetracikline. Manja osetljivost (85,71%) je utvrđena kod izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka poreklom iz mleka krava u prediodu predzasušnja. Disk difuzionom metodom rezistencija na tetracikline je dokazana samo kod koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava predzasušenje (5,36%).

Rezultati ispitivanja osetljivosti na tetracikline koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava u svim fazama laktacije na farmi III su dati u tabeli 5.3.15.

**Tabela 5.3.15.** Rezultati ispitivanja osetljivosti na tetracikline koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih na farmi III

| Kategorija      | Broj ispitanih izolata | Osetljiv |              | Intermedijerno osetljiv |              | Rezistentan |             |
|-----------------|------------------------|----------|--------------|-------------------------|--------------|-------------|-------------|
|                 |                        | Br       | %            | Br                      | %            | Br          | %           |
| Porodilište     | 1                      | 1        | 100          | 0                       | 0            | 0           | 0           |
| Avans           | 3                      | 2        | 66,66        | 1                       | 33,33        | 0           | 0           |
| Predzasušenje   | 7                      | 3        | 42,86        | 3                       | 42,86        | 1           | 14,28       |
| Ukupno ispitano | <b>11</b>              | 6        | <b>54,55</b> | 4                       | <b>36,36</b> | 1           | <b>9,09</b> |

Osetljivost na tetracikline koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava na farmi III se kretala od 42,86% izolata poreklom iz mleka krava u periodu predzasušnja do 100% kod izolata poreklom iz uzorka mleka krave iz porodilišta. Disk difuzionom metodom rezistencija na tetracikline je i na farmi III dokazana samo kod koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava u periodu predzasušnja (14,28%).

Od linkozaminskih preparata za ispitivanje osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka je odabran linkomicin. Rezultati tih ispitivanja prikazani su u tabelama 5.3.16; 5.3.17 i 5.3.18.

**Tabela 5.3.16.** Rezultati ispitivanja osetljivosti na linkomicin koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih na farmi I

| Kategorija      | Broj ispitanih izolata | Osetljiv |              | Rezistentan |              |
|-----------------|------------------------|----------|--------------|-------------|--------------|
|                 |                        | Br       | %            | Br          | %            |
| Avans           | 4                      | 3        | 75           | 1           | 25           |
| Predzasušenje   | 18                     | 13       | 72,22        | 5           | 27,78        |
| Ukupno ispitano | <b>22</b>              | 16       | <b>72,73</b> | 6           | <b>27,27</b> |

Osetljivost na linkomicin koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz uzoraka mleka krava na farmi I je utvrđena kod 72,22% izolata poreklom iz mleka krava u periodu predzasušnja i kod 75% izolata poreklom iz uzorka mleka krava iz avansa. Disk difuzionom metodom rezistencija na linkomicin je utvrđena kod 25% izolata poreklom iz uzoraka mleka krava u avansu i 27,78% izolata poreklom iz uzoraka mleka krava u periodu predzasušnja.

**Tabela 5.3.17.** Rezultati ispitivanja osetljivosti na linkomicin koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih na farmi II

| Kategorija      | Broj ispitanih izolata | Osetljiv |              | Rezistentan |              |
|-----------------|------------------------|----------|--------------|-------------|--------------|
|                 |                        | Br       | %            | Br          | %            |
| Porodilište     | 1                      | 1        | 100          | 0           | 0            |
| Predzasušnje    | 36                     | 24       | 66,66        | 12          | 33,33        |
| Ukupno ispitano | <b>37</b>              | 25       | <b>67,57</b> | 12          | <b>32,43</b> |

Osetljivost na linkomicin koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz uzoraka mleka krava na farmi II je utvrđena kod 66,66% izolata poreklom iz mleka krava u periodu predzasušnja i kod 100% izolata poreklom iz uzorka mleka krave iz porodilišta. Disk difuzionom metodom rezistencija na linkomicin je utvrđena kod 33,33% izolata poreklom iz uzoraka mleka krava u periodu predzasušnja.

**Tabela 5.3.18.** Rezultati ispitivanja osetljivosti na linkomicin koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih na farmi III

| Kategorija      | Broj ispitanih izolata | Osetljiv |           | Rezistentan |           |
|-----------------|------------------------|----------|-----------|-------------|-----------|
|                 |                        | Br       | %         | Br          | %         |
| Avans           | 3                      | 3        | 100       | 0           | 0         |
| Predzasušnje    | 5                      | 3        | 60        | 2           | 40        |
| Ukupno ispitano | <b>8</b>               | 6        | <b>75</b> | 2           | <b>25</b> |

Osetljivost na linkomicin koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz uzoraka mleka krava na farmi III je utvrđena kod 60% izolata poreklom iz mleka krava u periodu predzasušnja i kod 100% izolata poreklom iz uzorka mleka krave iz avansa. Disk difuzionom metodom rezistencija na linkomicin je utvrđena kod 40% izolata poreklom iz uzoraka mleka krava u periodu predzasušnja.

#### **5.4. Rezultati određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) penicilina G za koagulaza pozitivne stafilocoke makrodilucionom metodom**

Izolati iz svih faza laktacije, za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su rezistentni na penicilin G, kao i izolati za koje je utvrđeno da su osetljivi na penicilin G su ispitani makrodilucionom metodom u cilju utvrđivanja minimalne inhibitorne koncentracije. Rezultati tih ispitivanja dati su u tabelama 5.4.1. i 5.4.2.

**Tabela 5.4.1.** Rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) penicilina G za koagulaza pozitivne stafilocoke izolovane iz uzoraka mleka krava za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su rezistentne na penicilin G

| Broj ispitanih izolata | Raspon koncentracija penicilina G | MIC <sub>50</sub> | MIC <sub>90</sub> |
|------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| 100                    | 128- 0,03 µg/ml                   | 1µg/ml            | 16µg/ml           |

Rezultati prikazani u tabeli 5.4.1. pokazuju da je MIC penicilina G za 90 posto ispitanih izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka, za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su rezistentni na penicilin G, bila 16µg/ml, a za 50 posto izolata 1µg/ml.

**Tabela 5.4.2.** Rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) penicilina G za koagulaza pozitivne stafilocoke izolovane iz uzoraka mleka krava za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su osetljivi na penicilin G

| Broj ispitanih izolata | Raspon koncentracija penicilina G | MIC <sub>50</sub> | MIC <sub>90</sub> |
|------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| 146                    | 8- 0,0015 µg/ml                   | 0,003µg/ml        | 2 µg/ml           |

Rezultati prikazani u tabeli 5.4.2. pokazuju da je MIC penicilina G za 90 posto ispitanih izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su osjetljivi na penicilin G, bila 2 µg/ml, a za 50 posto izolata 0,003 µg/ml.

### 5.5. Rezultati fenotipske karakterizacije izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka rezistentnih na meticilin i prisustva *mec A* gena

Posljednjih godina u literaturi se navode podaci o mogućnosti prenošenja putem mleka na ljude stafilokoka rezistentnih na meticilin. Stoga smo u ovom radu postavili u zadatak da ispitamo da li su koagulaza pozitivne stafilokoke, izolovane iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava u različitim fazama laktacije, rezistentne na meticilin. Ispitivanjima su obuhvaćeni izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su rezistentni na penicilin G. U cilju fenotipske karakterizacije izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka su ispitani oksitestom. Rezultati tih ispitivanja su prikazani u tabeli 5.5.1.

**Tabela 5.5.1.** Rezultati ispitivanja rezistencije na oksacilin i cefoksitin koagulaza pozitivnih stafilokoka za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su rezistentni na penicilin G

| Kategorija  | Broj ispitanih izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka | Izolati rezistentni na oksacilin |      | Izolati rezistentni na cefoksitin |   |
|-------------|---|----------------------------------|------|-----------------------------------|---|
|             |   | Broj                             | %    | Broj                              | % |
| Porodilište | 53  | 0                                | 0    | 0                                 | 0 |
| Laktacija   | 184   | 7                                | 3,80 | 0                                 | 0 |
| Avans       | 21  | 0                                | 0    | 0                                 | 0 |
| Zasušenje   | 102   | 7                                | 6,86 | 0                                 | 0 |
| Ukupno      | 360   | 14                               | 3,89 | 0                                 | 0 |

Rezultati prikazani u tabeli 5.5.1. pokazuju da je od 360 ispitanih izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka disk difuzionom metodom utvrđeno da je na oksacilin bilo rezistentno 14 (3,89%) izolata i to 7 (3,80%) izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava u fazi laktacije i 7

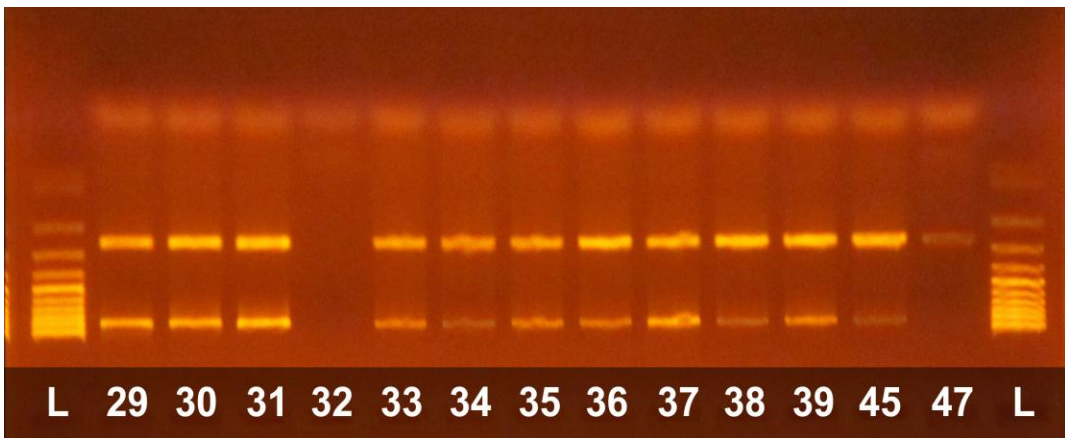
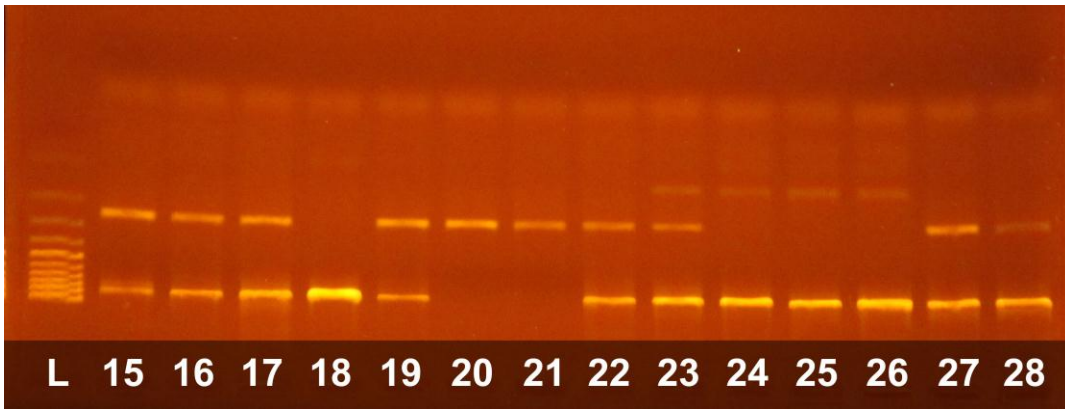
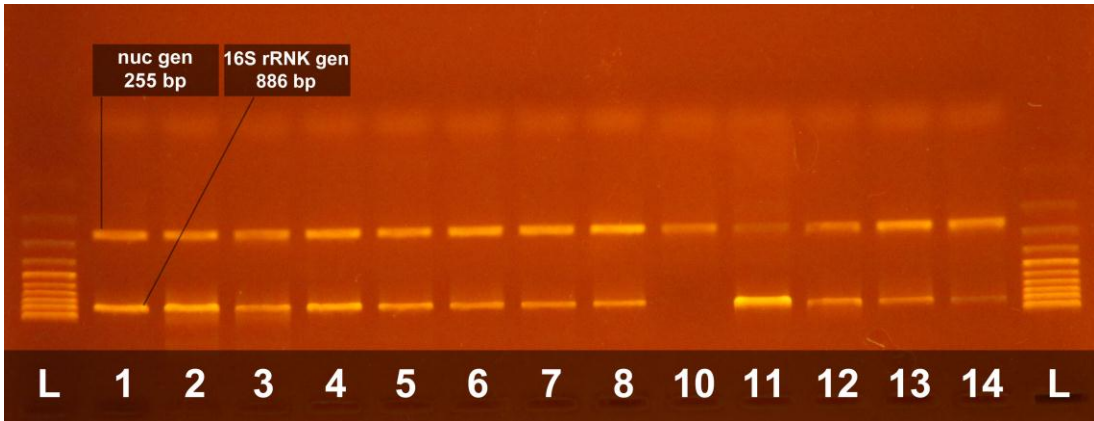
(6,86%) izolata dobijenih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava u fazi zasušenja. Ni jedan izolat koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava nije bio rezistentan na cefoksitin.

Na prisustvo *mecA* gena ukupno je ispitano 50 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka od koji je 35 izolata bilo rezistentno na penicilin G, a 15 izolata je bilo osetljivo na penicilin G. Među izolatima koji su bili rezistentni na penicilin G za 14 izolata je oksitestom utvrđeno da su bili pozitivni prilikom fenotipskog ispitivanja rezistencije na metacilin. Ni kod jednog ispitanog izolata nije utvrđeno prisustvo *mecA* gena. Rezultati tih ispitivanja su prikazani u tabeli 5.5.2.

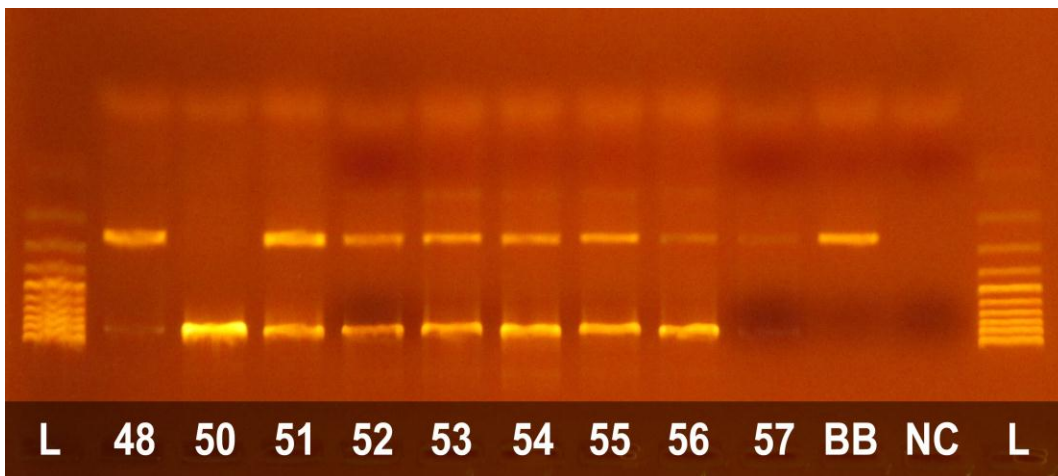
**Tabela 5.5.2.** Rezultati genotipske identifikacije izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava i prisustva *mecA* gena

| Vrsta stafilokoka<br>na osnovu API testa | Broj<br>izolata | 16S rRNK |     | <i>nuc</i> gen |       | <i>mecA</i> gen |   |
|--|-----------------|----------|-----|----------------|-------|-----------------|---|
|  |                 | Broj     | %   | Broj           | %     | Broj            | % |
| <i>S. aureus</i>                         | 44              | 44       | 100 | 39             | 88,64 | 0               | 0 |
| <i>S. chromogenes</i>                    | 2               | 0        | 0   | 2              | 100   | 0               | 0 |
| <i>S. intermedius</i>                    | 1               | 0        | 0   | 1              | 100   | 0               | 0 |
| <i>S. lentus</i>                         | 1               | 0        | 0   | 1              | 100   | 0               | 0 |
| <i>S. sciuri</i>                         | 1               | 0        | 0   | 0              | 0     | 0               | 0 |
| <i>S. xylosus</i>                        | 1               | 0        | 0   | 1              | 100   | 0               | 0 |

Rezultati prikazani u tabeli 5.5.2. pokazuju da je od 44 izolata koji su na osnovu biohemijskih osobina identifikovani kao *S. aureus*, prisustvo *nuc* gena dokazano je kod 88,64% izolata. Izolati koji su na osnovu biohemijskih osobina identifikovani kao *S. chromogenes*, *S. intermedius*, *S. lentus* i *S. xylosus* su posedovali *nuc* gen, *S. sciuri* nije posedovao *nuc* gen. Ni jedan od 50 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka nije posedovao gen rezistencije na metacilin *mecA* gen.







**Slika 5.5.1.** Rezultati elektroforeze PCR proizvoda dobijenih pomoću prajmera specifičnih za 16S rRNK, *nuc* gen i *mecA* gen kod koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava.

Kod izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka označenih na slici sa 10, 20, 21, 32, 47, 57 i BB nije vizuelizovan gen za 16S rRNK. Izostanak pojave 16S rRNK gena može se pripisati fizičkom oštećenju. Izolati *S. aureus* označeni sa 18, 24, 25, 26 i 50 nisu posedovali *nuc* gen. Izolat označen sa 32 je na osnovu API staph identifikovan kao *S. sciuri*. Izolati označeni kao 20 i 21 su na osnovu API staph identifikovani kao *S. chromogenes*. Izolat označen sa 10 je primenom API staph identifikovan kao *S. lentus*. Izolat označen sa 47 je na osnovu API staph identifikovan kao *S. intermedius*, a izolat označen sa 57 je na osnovu API staph identifikovan kao *S. xylosus*.

### **5.6. Ispitivanje sposobnosti sinteze enterotoksina odabranih izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka**

Od ukupno 50 izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka koji su odabrani za dalje ispitivanje, primenom VIDAS™ Staphylococcal enterotoxin SET2 tehnike za direktnu simultanu detekciju sedam tipova enterotoksina (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED i SEE) je utvrđeno da 10 izolata (20%) ima sposobnost stvaranja enterotoksina. Rezultati tih ispitivanja dati su u tabeli 5.6.1.

**Tabela 5.6.1.** Rezultati ispitivanja odabranih izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka da stvaraju enterotoksine

| Odabrani izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka | Broj izolata | Potvrđena sposobnost sinteze enterotoksina |       |
|---|--------------|--|-------|
|   |              | broj                                       | %     |
| Rezistentni na penicilin                          | 35           | 2  | 8,57  |
| Osetljivi na penicilin                            | 15           | 8  | 53,33 |
| Ukupno  | 50           | 10   | 20    |

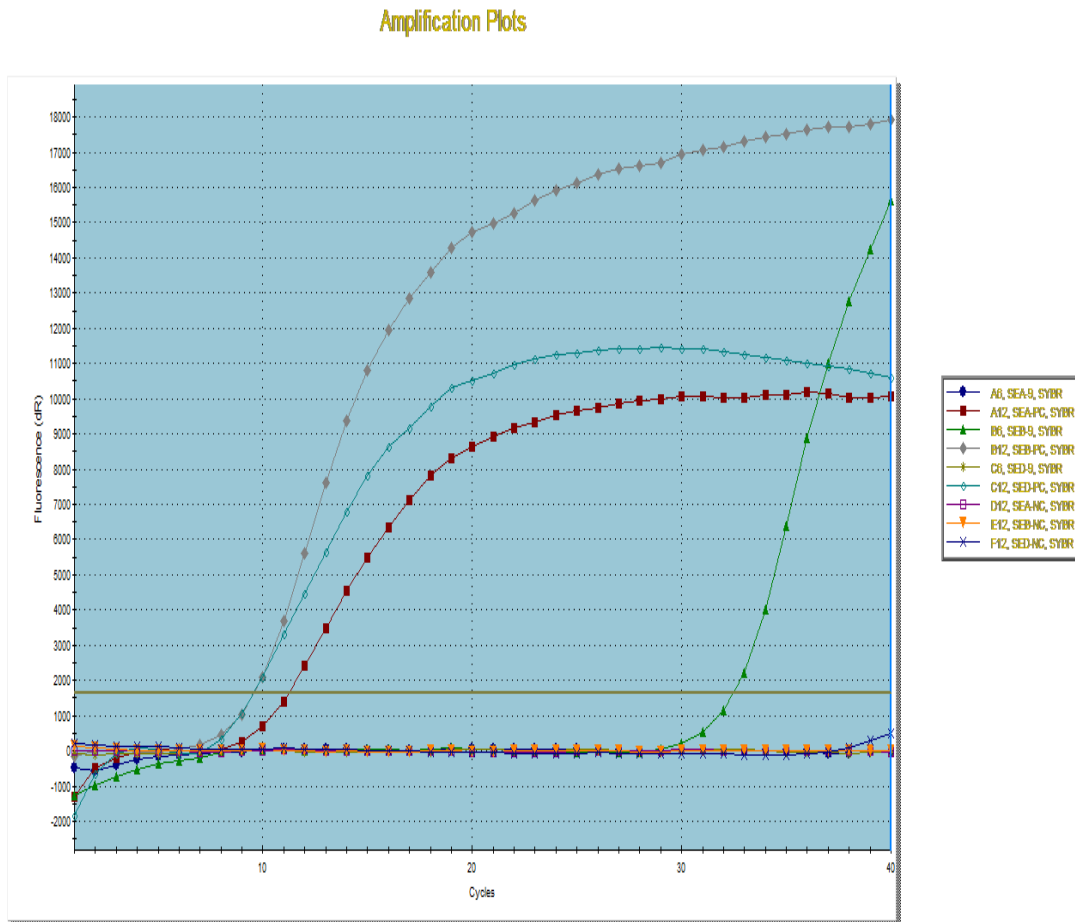
Rezultati ispitivanja sposobnosti koagulaza pozitivnih stafilokoka, izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava stvaranja, da stvaraju jedan od sedam tipova enterotoksina (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED i SEE) su pokazali da je sposobnost sinteze enterotoksina češće dokazana kod izolata (53,33 %) kod kojih je disk difuzionom metodom utvrđena osetljivost na penicilin G. Izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka koji su difuzionim testom ocenjeni kao rezistentni su u 8,57% slučajeva imali sposobnost stvaranja enterotoksina.

Budući da su u slučajevima alimentarnih intoksikacija najčešće dokazivani enterotoksini A, B, i D u daljem radu je kod izolata za koje je VIDAS™ Staphylococcal enterotoxin SET2 tehnikom utvrđena sposobnost stvaranja enterotoksina, metodom Real Time PCR ispitivano je prisustvo gena za sintezu enterotoksina A(*sea*), B(*seb*) i D(*sed*). Rezultati tih ispitivanja su prikazani u tabeli 5.6.2 i grafikonima 5.6.1, 5.6.2 i 5.6.3.

**Tabela 5.6.2.** Rezultati ispitivanja koagulaza pozitivnih stafilokoka na prisustvo gena za sintezu enterotoksina A, B i D

| Vrsta stafilokoka | Broj izolata | <i>sea</i> gen |   | <i>seb</i> gen |    | <i>sed</i> gen |   |
|-------------------|--------------|----------------|---|----------------|----|----------------|---|
|                   |              | Broj           | % | Broj           | %  | Broj           | % |
| <i>S. aureus</i>  | 10           | 0              | 0 | 1              | 10 | 0              | 0 |

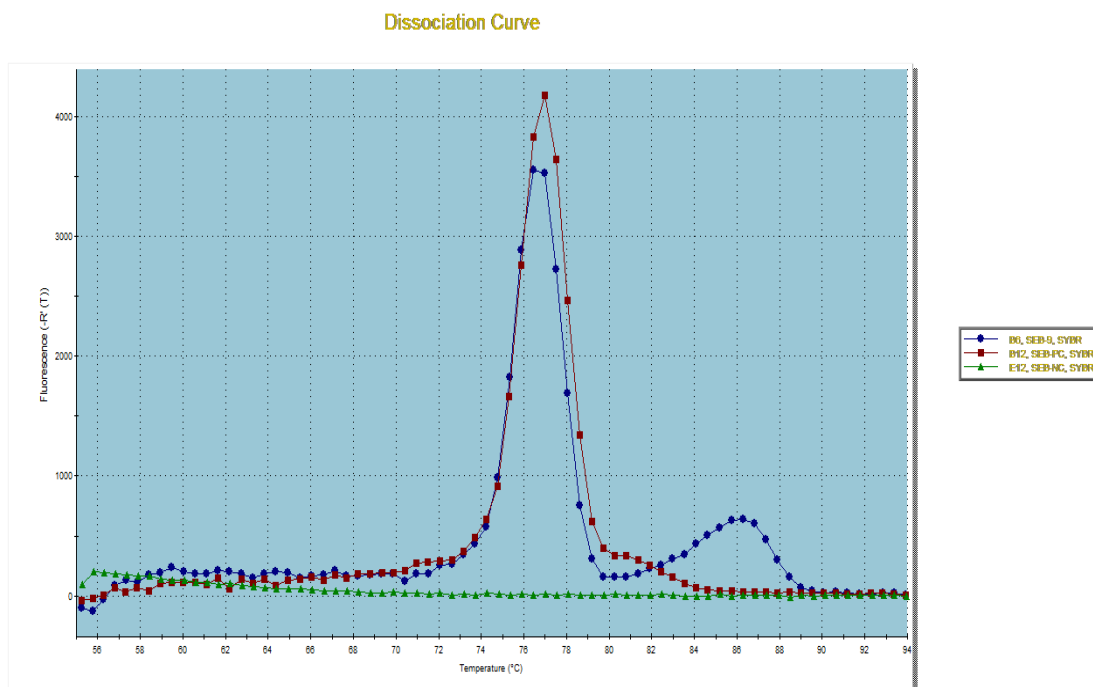
**Grafikon 5.6.1.** Amplifikaciona kriva za izolat broj 9



Iz grafikona 5.6.1. vidi se da su pozitivne kontrole za gene *sea*, *seb* i *sed* dale pozitivan signal pri Ct vrednosti od 10-12, što ukazuje da je amplifikacija uspešna. Pored toga, negativna kontrola nije dala signal, što ukazuje da u ispitivanom sistemu reagenasa nije bilo kontaminacije koja bi odavala sliku lažno pozitivnog signala. Posmatranjem amplifikacionih signala iz DNK izolata broj 9, nedvosmisleno se zaključuje da genom ovog izolata sadrži *seb* gen (Ct vrednost 32,50), a da ne sadrži *sea* odnosno *sed* gen.

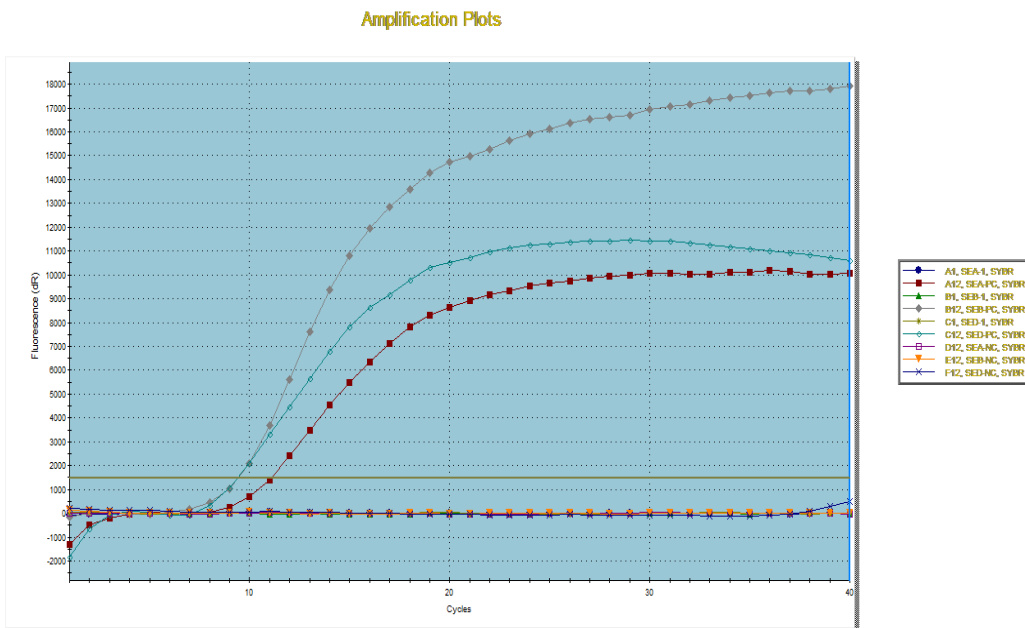
Da bi se dodatno potvrdila verodostojnost nalaza *seb* gena, upoređene su temperature topljenja amplifikovanog fragmenta *seb* gena pozitivne kontrole i izolata broj 9 (Grafikon 5.6.2.).

**Grafikon 5.6.2.** Disocijaciona kriva za izolat broj 9



Rezultati poređenja ukazuju da su oblici i jačine dinamičke krive fluorescencije, izraženi kao prva negativna derivacija, istovetni, pa se ovim konačno potvrdilo da izolat stafilokoka broj 9 u svojoj DNK sadrži gen za sintezu enterotoksina B.

**Grafikon 5.6.3.** Amplifikacione krive za izolote 1, 2, 3, 4, 6, 8, 13, 50, 51.



Posmatranjem grafičkog prikaza amlifikacionih signala za gene *sea*, *seb* i *sed* utvrđeno je da ovi izolati ne sadrže ispitujuće gene. Obzirom da su izolati bovinog porekla, a imajući u vidu nalaze iz literature i rezultate dobijene imunoenzimskom metodom, može se pretpostaviti da ovi izolati stafilokoka sintetišu enterotoksine SEC i/ili SEE.

## 6. DISKUSIJA

Bakteriološkim ispitivanjem mleka ustanovljeno je prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka na sve tri farme mlečnih krava. Prevalencija koagulaza pozitivnih stafilokoka se kretala od 1,64% na farmi III, 8,38% na farmi I do 17,20% na farmi II. Robertson i sar. (1994) su nivo inficiranosti stada mlečnih krava koagulaza pozitivnim stafilokokama manjim od 5% označili kao nisku prevalenciju, dok su inficiranost veću od 10% označili kao visoku prevalenciju. Koristeći preporuku Robertson i sar. (1994) na osnovu procenta krava inficiranih koagulaza pozitivnim stafilokokama u analizi naših rezultata farmu III smo označili kao farmu sa niskom prevalencijom, farmu II kao farmu sa visokom prevalencijom, a farmu I kao farmu sa umerenom prevalencijom koagulaza pozitivnih stafilokoka. Rezultati dobijeni u našim istraživanjima su pokazali da se prevalencija koagulaza pozitivnih stafilokoka na početku laktacije nije značajnije razlikovala na farmi sa niskom prevalencijom (1,23%) i na farmi sa umerenom prevalencijom (1,79%). Međutim, na farmi sa visokom prevalencijom procenat krava inficiranih koagulaza pozitivnim stafilokokama je bio veći (4,42%). Za razliku od rezultata dobijenih u našim istraživanjima Robertson i sar. (1994) su kod krava nakon telenja utvrdili mastitise izazvane koagulaza pozitivnim stafilokokama kod 0%-27% krava, a Calvinho i sar. (2007) kod 12,71% ispitivanih četvrti vimena krava.

Tokom prvih sto dana laktacije, kada su krave, zbog velike proizvodnje mleka pod stresom, slabe odbrambeni mehanizmi i vime postaje podložnije infekciji. Na farmi sa umerenom prevalencijom smo utvrdili blago povećanje nalaza koagulaza pozitivnih stafilokoka kod 1,96% krava, dok na farmi sa visokom prevalencijom dolazi do naglog povećanja infekcije koja je utvrđena kod 9,79% krava. Međutim, na farmi sa niskom prevalencijom dolazi do smanjenja broja krava inficiranih koagulaza pozitivnim stafilokokama na 0,92%. U periodu predzasušnja, sličan nalaz koagulaza pozitivnih stafilokoka je ustanovljen na farmi sa umerenom prevalencijom (27,79%) i na farmi sa visokom prevalencijom (29,74%), dok je nalaz koagulaza pozitivnih stafilokoka u periodu predzasušnja na farmi sa niskom prevalencijom bio 2,0% inficiranih krava.

U periodu laktacije je bakteriološki pregledano mleko krava kod kojih je Kalifornija mastitis test bio pozitivan. Na farmi sa umerenom prevalencijom ispitano je mleko 923 krave, a koagulaza pozitivne stafilokoke su izolovane iz 81 (8,77%) uzoraka mleka

mleka krava, dok je na farmi su visokom prevalencijom ispitani uzorci mleka od 714 krava, a koagulaza pozitivne stafilokoke su izolovane iz uzoraka mleka od 145 (20,31%) krava. Na farmi sa niskom prevalencijom je bakteriološki ispitano mleko 39 krava, a koagulaza pozitivne stafilokoke su izolovane iz uzoraka mleka 5 (12,89%) krava. Rezultate slične našim dobili su Persson i sar. (2011) koji su iz mleka krava sa subkliničkim mastitisom najčešće izolovali koagulaza pozitivne stafilokoke iz 19% uzoraka, a od toga u 31% slučajeva su bile nove infekcije. Veću prevalenciju mastitisa izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokokama su utvrdili Petrovski i sar. (2011) koji su iz 23,5% uzoraka mleka krava sa subkliničkim mastitisom izolovali *S. aureus* i Tariku i sar. (2011) koji su iz 52,4% uzoraka mleka u Etiopiji izolovali *S. aureus*. Koagulaza pozitivne stafilokoke u slučajevima subkliničkih mastitisa su izolovali Getahun i sar. (2008) iz uzoraka mleka 42,6% krava, a Gianneechini i sar. (2008.) su u 62,8% uzoraka mleka krava.

Dufour i sar. (2012) su ispitujući razlike u prevalenciji *S. aureus* na farmama u Kanadi i razlike u tehnologijama koje se primenjuju na tim farmama, ustanovili da su greške tokom muže češće u zaptima sa većom prevalencijom subkliničkih mastitisa, i zaključili da ključnu ulogu u prevenciji subkliničkih mastitisa imaju sprečavanje prenošenja *S. aureus* s krave na kravu tokom muže (međufazna dezinfekcija sisnih čaša), dezinfekcija papila nakon muže i terapija krava u zasušenju. Ovo mišljenje podržavaju Klimiene i sar. (2011) i navode da učestalost nalaza *S. aureus* zavisi od nivoa higijene, načina držanja krave, kvalifikacije osoblja i menadžmenta farme. Pitkala i sar. (2004) napred navedenom mišljenju dodaju da redovna kontrola zdravlja vimena i smanjenje učestalosti mastitisa izazvanih uzročnicima kontagioznih mastitisa značajno doprinose pojavi mastitisa na farmi. Ovom mišljenju priključuju se DaRong i sar. (2010) navodeći da je osnov za uspešnu primenu programa za suzbijanje mastitisa na farmama poznavanje prevalencije uzročnika kontagioznih mastitisa.

Jedna od važnih makromorfoloških karakteristika koagulaza pozitivnih stafilokoka na krvnom agaru koja se koristi u njihovoj detekciji je pigment kolonija. Zlatnožuti pigment se smatra karakteristikom patogenosti stafilokoka. Jedinjenja koja sačinjavaju pigment daju zaštitu bakteriji od odbrambenih faktora domaćina. Liu i sar. (2008) smatraju da je zlatni pigment karakteristika *S. aureus* izolovanih u slučaju zapaljenja

vimena i da izolati koji ne stvaraju pigment brzo bivaju neutralisani od strane neutrofila i postaju osetljiviji na lekove. Imajući u vidu značaj pigmenta za otkrivanje stafilokoka i njegovu ulogu u patološkom procesu u okviru naših ispitivanja smo odredili pigment i izolate svrstali u šest grupa: zlatno sivi, zlatan, svetlo zlatan, belo zlatan, krem beo i beličast. Najveći broj izolata (58%) imao je zlatan pigment, zatim svetlo zlatan (28%), belo zlatan (8%) i po jedan izolat (2%) je imao zlatno sivu boju, krem belu i beličastu. Za razliku od rezultata dobijenih u našim istraživanjima Mubarack i sar. (2012) su u identifikaciji patogenih vrsta stafilokoka, izolovanih u slučajevima mastitisa krava, utvrdili da je od 50 izolata 48 izolata imalo zlatani pigment, 1 izolat je bio slabo pigmentisan, a jedan izolat je bio bez karotenoidnih supstanci. Rezultate slične našim su dobili Xiong i sar. (1992) koji su utvrdili da sojevi *S. aureus* izolovani iz mleka krava obolelih od mastitisa, na krvnom agaru daju devet različitih nijansi pigmenta kolonija, a Begum i sar. (2007) su iz uzoraka mleka krava u slučaju mastitisa izolovali koagulaza pozitivne stafilokoke koje su u 25,71% slučajeva imale zlatno-žuti pigment, 51,43% žuti, a 22,86% beli pigment. Visok procenat izolata *S. aureus* (86,2%), koji su stvarali žuti pigment, izolovani su iz mleka krava obolelih od mastitisa i Takeshige i sar. (1983). Manji procenat izolata, koji stvaraju pigment (7-25%), među koagulaza pozitivnim stafilokokama izolovanim iz zbirnog mleka utvrdili su Adesiyun i sar. (1999).

Hemoliza je značajna karakteristika patogenih stafilokoka i sojevi koji se izoluju kao uzročnici mastitisa najčešće imaju ovu osobinu. Kao fenotipska karakteristika se dokazuju na krvnom agaru, a molekularnim metodama se dokazuju geni koji kodiraju određenu vrstu hemolizina, koji ne moraju uvek da budu ekspimirani. Fenotipska hemoliza pokazuje da je soj aktivan u sintezi egzoproteina koji oštećuju tkivo razlažući ga i prevodeći u hranljivi supstrat koji im omogućava da opstanu u tkivu i da se umnože.

Za stafilokoke koje izazivaju mastitise je karakteristično da najčešće na krvnom agaru daju beta hemolizu, alfa i beta hemolizu ili samo alfa hemolizu. Najveći broj koagulaza pozitivnih stafilokoka, izolovanih u našim ispitivanjima, je na krvnom agaru stvarao beta hemolizu (50%), alfa i beta hemolizu (36%), beta i delta hemolizu (8%), delta hemolizu 4% i alfa hemolizu 2%. Rezultati slični našim su dobijeni u više studija.



Morandi i sar. (2009) su utvrdili da 54% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih u slučajevima mastitisa krava, na krvnom agaru stvara beta hemolizu, a 40% izolata stvara alfa i beta hemolizu. Franco i sar. (2008) su utvrdili da *S. aureus* stvara beta hemolizu u 29% slučajeva, a alfa i beta hemolizu u 37 % slučajeva. Sabini i sar. (2001) su utvrdili da 46,51% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka daje beta hemolizu. Silva. i sar. (2000) su utvrdili da 43,3% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka na krvnom agaru daje beta hemolizu a 26,8% izolata daje alfa i beta hemolizu. Akineden i sar. (2001) su dokazali da od 103 izolata *S. aureus* beta hemolizu na krvnom agaru stvara 50 izolata.

Za razliku od rezultata dobijenih u našim istraživanjima Matsunaga i sar. (1993) su ustanovili da 65,5% izolata *S. aureus* stvara beta hemolizu, a Arshad i sar. (2006) su utvrdili da svi izolati *S. aureus*, izolovani u slučajevima mastitisa krava daju beta hemolizu na krvnom agaru.

Neki autori smatraju da sposobnost stafilokoka da stvaraju hemolizine zavisi od područja sa kojeg potiču izolati (Isrina i sar., 2004). Ovo svoje mišljenje autori potkrepljuju rezultatima da su izolati stafilokoka sa područja Nemačke stvarali beta ili alfa i beta hemolizu, a izolati sa područja Jave nisu stvarali hemolizu na krvnom agaru. Sposobnost stafilokoka da stvaraju beta hemolizin zavisi i od farme do farme. Piccinini i sar. (2012) su utvrdili da su svi izolati *S. aureus* sa jedne farme stvarali beta hemolizu na krvnom agaru, a da je sa druge farme samo jedan izolat stvarao beta hemolizu. Pri ispitivanju genotipske osobine koagulaza pozitivnih stafilokoka da stvaraju beta hemolizin dokazuje se prisustvo *hly* gena. Prema nekim autorima rezultati ispitivanja hemolize na krvnom agaru se upotpunosti ne slažu sa prisustvom gena za sintezu hemolizina. Ispitivanjem odnosa hemolize na krvnom agaru i prisustva *hly* gena, Aarestrup i sar. (1999) su prisustvo *hly* gena dokazali kod 96% izolata, a beta hemolizu na krvnom agaru su potvrdili samo kod 75% izolata.

Za razliku od ovih autora, Ebrahimii i sar. (2009) ustanovili da izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka u slučajevima mastitisa krava ne daju beta hemolizu na krvnom agaru.

Stafilokoke izolovane u slučajevima mastitisa krava ređe daju alfa hemolizu na krvnom agaru u odnosu na beta hemolizu. Rezultati dobijeni u našim ispitivanjima su pokazali

da je samo jedan izolat (2%) stvarao alfa hemolizu, a alfa i beta hemolizu na krvnom agaru je stvaralo 28 (40%) izolata. Rezultati naših ispitivanja su u saglasnosti sa rezultatima Sabini i sar. (2001) koji su ustanovili 2,32% izolata *S. aureus* koji su na krvnom agaru stvarali alfa hemolizu. Za razliku od rezultata dobijenih u našim ispitivanjima više autora je utvrdilo veću učestalost nalaza stafilokoka izolovanih u slučajevima mastitisa krava koje su na krvnom agaru stvarale alfa hemolizu. Morandi i sar. (2009), su alfa hemolizu dokazali kod 6% izolata, alfa i beta hemolizu kod 40% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka. Franco i sar. (2008) su utvrdili 12% izolata stafilokoka koji su na krvnom agaru davali alfa hemolizu. Silva i sar. (2000) su dokazali da 16,5% izolata stvara alfa hemolizu, a 26,8% izolata stvara alfa i beta hemolizu. Boerlin i sar. (2003) su kod 45 od 159 ispitanih izolata *S. aureus* utvrdili alfa hemolizu na krvnom agaru. Ispitujući hemolizu na krvnom agaru kod 103 izolata *S. aureus* Akineden i sar. (2001) su utvrdili alfa hemolizu kod 25 izolata. Najveći procenat izolata *S. aureus* (74,1%) koji stvaraju alfa hemolizu na krvnom agaru su ustanovili Matsunaga i sar. (1993).

Ebrahimi i sar. (2009) su analizom sojeva *S. aureus* izolovanih iz mleka krava u slučajevima subkliničkih mastitisa, utvrdili da tri izolata stvaraju alfa i beta hemolizu, a pet izolata stvara alfa, beta i delta hemolizu na krvnom agaru.

Patogene stafilokoke izolovane u slučajevima mastitisa krava najređe stvaraju delta hemolizin. Rezultati naših ispitivanja pokazuju da je 4,28% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava, stvaralo delta hemolizu na krvnom agaru. Značajno veći procenat izolata stafilokoka (17,3%) koje stvaraju delta hemolizu na krvnom agaru utvrdili su Silva i sar. (2000). Za razliku od rezultata dobijenih u našim istraživanjima Ebrahimi i sar. (2009) nisu utvrdili da izolati stafilokoka stvaraju delta hemolizu, a i Isrina i sar. (2004.) su utvrdili sposobnost stvaranja delta hemolize na krvnom agaru samo kod jednog izolata poreklom iz Nemačke.

U nekoliko istraživanja osobina stafilokoka, izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz vimena krava u slučajevima mastitisa, je utvrđeno da određeni broj izolata stafilokoka ne stvara hemolizu na krvnom agaru. Silva i sar. (2000) su utvrdili da 13,4% izolata stafilokoka nije stvaralo hemolizu na krvnom agaru, Franco i sar. (2008) su utvrdili

21% izolata koji nisu stvarali hemolizu. Akineden i sar. (2001) su utvrdili da od 103 izolata koje su ispitali, 28 nije stvaralo hemolizu na krvnom agaru, a Sabini i sar. (2001) su ustanovili 51,16% izolata koji nisu pokazivali sposobnost hemolize.

Biohemijskom identifikacijom odabranih 50 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka ustanovljeno je da 44 (88%) pripada *S. aureus*, dok 6 (12%) pripada drugim vrstama koagulaza pozitivnih stafilokoka. Rezultati naših istraživanja su u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u više istraživanja. Visoku prevalenciju *S. aureus* u stadu navode i Cappuro i sar. (1999) koji su 97% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka biohemijski identifikovali kao *S. aureus*. Younis i sar. (2000) potvrđuju APIStaph testovima da 98% izolata koje su ispitivali pripada *S. aureus*, a da Costa i sar. (2010) su istim metodom 98,25% izolovanih koagulaza pozitivnih stafilokoka identifikovali kao *S. aureus*. Slične rezultate navode Robertson i sar. (1996) koji su od 487 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, izolovanih iz mleka krava sa subkliničkim mastitisom u stadu sa visokom prevalencijom mastitisa, 82,1% identifikovali kao *S. aureus*, a 17,9% kao druge vrste koagulaza pozitivnih stafilokoka. Analizirajući odnos između *S. aureus* i drugih koagulaza pozitivnih i stafilokoka u zapatima sa niskom prevalencijom mastitisa autori su ustanovili *S. aureus* u 57% slučajeva, a druge vrste koagulaza pozitivnih stafilokoka u 43% slučajeva.

Lamprell i sar. (2004) su, identifikacijom koagulaza pozitivnih stafilokoka koje su izolovali iz sirovog mleka, 82,2% identifikovali kao *S. aureus*.

Od drugih vrsta stafilokoka, na osnovu biohemijskih osobina, dva izolata (4%) su identifikovana kao *S. chromogenes*, a po jedan izolat kao *S. intermedius* (2%), *S. xylosus* (2%), *S. sciuri* (2%) i *S. lentus* (2%). Sve ove stafilokoke se mogu naći u vimenu, na telu krave i u okolini.

Jedan izolat koji je u našim istraživanjima primenom API staph identifikovan kao *S. aureus* nije na osnovu 16S RNK potvrđen kao *S. aureus*. Prema rezultatima istraživanja Langlois i sar. (1983) API-Staph identifikacioni sistemi su u 99,2% slučajeva pouzdani za identifikaciju *S. aureus*, a 41,8% u slučajevima identifikacije ostalih koagulaza pozitivnih stafilokoka.

Velika odstupanja su utvrđena pri identifikaciji *S. epidermidis*, ali je moguća zamena izolata *S. xylosus* sa *S. aureus*. Pored toga, ustanovljena je zamena izolata koagulaza

pozitivnih *S. hyicus* i *S. hyicus subsp. chromogenes* sa *S. epidermidis*. Biohemijskom identifikacijom *S. sciuri* ustanovljena je pouzdanost 85%, a *S. xylosus* 68,8%. Ustanovljene su i zamene *S. xylosus* i *S. hyicus* sa *S. aureus*.

Boerlin i sar. (2003) su, poredeći fenotipsku identifikaciju stafilokoka sa identifikacijom specifične 16S RNK, najveća odstupanja uočili u slučaju *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. saprofiticus*, *S. haemolyticus* i *S. felis*.

Od 44 izolata, koji su u našim istraživanjima API Staph testovima, identifikovani kao *S. aureus*, 43 (90,70%) izolata je PCR metodom potvrđeno kao *S. aureus*. Rezultati naših ispitivanja su u saglasnosti sa rezultatima da Costa i sar. (2010) koji su utvrdili poklapanje rezultata fenotipske i genotipske identifikacije u slučaju *S. aureus*. Međutim, u slučaju drugih vrsta stafilokoka poklapanje rezultata identifikacije je manje.

Ispitivanje osetljivosti na antibiotike koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz vimena krava obolelih od mastitisa je važna karakteristika ali i deo dobre veterinarske prakse. Dugotrajna ili nedekvatna primena antibiotika je ima za posledicu pojavu stafilokoka rezistentnih na antimikrobne lekove, pre svega, na beta laktamske antibiotike jer se oni najčešće primenjuju u terapiji. Brojna istraživanja porast rezistencije stafilokoka na penicilin objašnjavaju prisustvom beta laktamaze. Stoga je veoma važno da se u zapatu utvrdi i pratiti zastupljenost izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka koji stvaraju beta laktamazu.

U našim ispitivanjima su na sve tri farme izolovane koagulaza pozitivne stafilokoke rezistentne na penicilin. Na farmi sa umerenom prevalencijom je ustanovljena rezistencija kod 70,40% ispitanih izolata, na farmi sa visokom prevalencijom rezistentno na penicilin je bilo 60,22%, a na farmi sa niskom prevalencijom je utvrđeno 43,75% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka rezistentnih na penicilin.

Rezultate naših ispitivanja potvrđuju Hendriksen i sar. (2008) navodeći podatke iz EU koji pokazuju da sojevi *S. aureus* izolovani u slučajevima mastitisa krava u visokom procentu pokazuju rezistenciju na penicilin u većini zemalja EU osim u Francuskoj, Norveškoj i Švedskoj.

Antimikrobnu osetljivost smo kod koagulaza pozitivnih stafilokoka pratili tokom laktacije: nakon telenja, tokom prvih sto dana laktacije, tokom laktacije i perioda

predzasušenja. Rezultati naših ispitivanja su pokazali da je zastupljenost izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka rezistentnih na penicilin izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz četvrti vimena krava na farmi sa umerenom prevalencijom 75,80%; 81,48%; 73,68% i 64,21% izolata; na farmi sa visokom prevalencijom 56,56%; 92,68%; 56,82% i 56,07% izolata, a na farmi sa niskom prevalencijom 40%; 33,33%; 40% i 50% izolata. Rezultate dobijene u našim istraživanjima potvrđuju rezultati više autora. Sličan procenat izolata *S. aureus* rezistentnih na penicilin su utvrdili Güler i sar. (2005) kod 63,3% izolata, Kalmus i sar. (2011) kod 61,4% izolata i Malinowski i sar. (2002) kod 66,5% izolata, Klimiene i sar. (2011) kod 76,7% izolata, Li i sar. (2009) kod 77,3% izolata. Turutoglu i sar. (2002) su u zapatu sa prevalencijom *S. aureus* 33,16% ustanovili rezistenciju na penicilin kod 69% izolata, i kod većine rezistentnih izolata (82,2%) dokazali beta laktamazu.

Znatno veći procenat izolata *S. aureus*, rezistentnih na penicilin, su disk difuzionom metodom utvrdili Bengtsson i sar. (2009) kod 92,9% izolata, Unakal i sar. (2010) kod 86,76% izolata, Ebrahimi i sar. (2009) kod 87,5% izolata, i Kirkan i sar. (2005) kod 95% izolata. Arslan i sar. (2009) su ustanovili rezistenciju na penicilin kod 88,3% izolata *S. aureus* izolovanih iz mleka krava obolelih od subkliničkog mastitisa. Autori smatraju da je rezistencija na penicilin zasnovana na prisustvu plazmida i da su izolati *S. aureus* rezistentni na penicilin imali sličan plazmidski profil kao i izolati rezistentni na druge antimikrobne lekove. Istog mišljenja, da su glavni nosioci rezistencije na penicilin geni smešteni na plazmidima, su Correa i sar. (2005).

Rezultati naših ispitivanja osetljivosti na penicilin, koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava sa farmi sa niskom prevalencijom, su u saglasnosti sa nalazima Schmidt (2011) koji je ustanovio rezistenciju kod 47,8% izolata *S. aureus*. Izolati za koje je u našim istraživanjima disk difuzionom metodom utvrđeno da su rezistentni na penicilin su najčešće stvarali zlatno žuti pigment (62% izolata), zatim svetlo zlatni (24,13% izolata), belo zlatni (3,44% izolata), krem beo (3,44% izolata) i beli (3,44% izolata). Da koagulaza pozitivne stafilokoke rezistentne na ampicilin najčešće stvaraju zlatno žuti pigment pokazuju nalazi El-Jakee i sar. (2010) su kod 86 izolata *S. aureus* izolovanih iz mleka krava dokazali zlatno žuti pigment kod 72,1% izolata, beli pigment kod 23,3% izolata i beli pigment kod 4,7% izolata.

U našim ispitivanjima izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka rezistentnih na penicilin G najčešće su primenom API staph identifikovani kao *S. aureus* (82,85%), zatim *S. chromogenes* (6,88%) i po 3,44% *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. intermedius* i *S. xylosus*. Multipleks PCR metodom kod 82,85% izolata je dokazano postojanje 16S rRNK, dok kod ostalih izolata nije. Za razliku od rezultata dobijenih u našim ispitivanjima, Ebrahimi i sar. (2009) su, ispitujući 98 uzoraka mleka krava u slučajevima subkliničkog mastitisa, izolovali koagulaza pozitivne stafilokoke od kojih je 87,5% izolata bilo rezistentno na penicilin. Najčešće su koagulaza pozitivne stafilokoke izolovali u slučajevima subkliničkih mastitisa i identifikovali ih kao *S. aureus* (44,44%), zatim *S. hyicus* (22,22%), *S. epidermidis* (11,11%), *S. intermedius* (5,55%) i *S. capitis* (5,55%) a u slučaju kliničkog mastitisa *S. hyicus* (11,11%).

Jedna od karakteristika koagulaza pozitivnih stafilokoka je da stvaraju hemolizu na krvnom agaru. U cilju utvrđivanja da li postoji veza između tipa hemolize na krvnom agaru i osetljivosti na penicilin G upoređivan je tip hemolize na krvnom agaru i osetljivost na penicilin G. Koagulaza pozitivne stafilokoke izolovane iz uzoraka mleka iz pojedinih četvrti vimema krava, za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su osetljivi na penicilin G, najčešće su stvarale beta hemolizu na krvnom agaru (60% izolata), zatim alfa i beta hemolizu (13,35% izolata), delta i beta hemolizu (20% izolata) i delta hemoliza (6,66% izolata). Izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su rezistentni na penicilin G su najčešće stvarali beta hemolizu (48,27% izolata); alfa i beta hemoliza (41,38%), delta i beta hemolizu (6,9%) i alfa hemolizu (3,44% izolata). Izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka, za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su osetljivi na penicilin G su češće stvarali beta hemolizu nego izolati za koje je utvrđeno da su rezistentni na penicilin, a izolati rezistentni na penicilin G su češće stvarali alfa i beta hemolizu.

Za razliku od rezultata dobijenih u našim ispitivanjima Arshad i sar. (2006) su utvrdili da svi izolati rezistentni na penicilin stvaraju beta hemolizu na krvnom agaru, Begum i sar. (2007) su dokazali da 71,42% izolata rezistentnih na penicilin stvara beta hemolizu na krvnom agaru.

Colelho i sar. (2009) su dvadeset jedan izolat koji su izolovali iz mleka krava obolelih od mastitisa PCR metodom potvrdili kao *S. aureus*. Od devet izolata koji su imali

sposobnost hemolize na krvnom agaru, sedam izolata je stvaralo alfa i beta hemolizu, a dva izolata su samo beta hemolizu. Rezistencija na penicilin i ampicilin je ustanovljena kod 42% izolata *S. aureus*. Franco i sar. (2008) su, ispitujući 117 izolata *S. aureus* izolovanih iz mleka krava obolelih od kliničkog i subkliničkog mastitisa utvrdili da 12% izolata stvara alfa hemolizu, 29% beta hemolizu i 37% izolata alfa i beta hemolizu. Rezistenciju na penicilin su utvrdili kod 80% izolata.

U praksi se pokazalo da postoji odstupanje od procene osetljivosti stafilokoka na penicilin primenom rutinske disk difuzione metode u odnosu na rezultate terapije. Određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije za penicilin se dobijaju precizniji podaci o osetljivosti ispitanih izolata. CLSI (2006) preporučuje ispitivanje osetljivosti stafilokoka dilucionom metodom u odnosu na penicilin u cilju određivanja pravilne terapije jer se može zaključiti o osetljivosti izolata i na ostale penicilinaza osetljive peniciline.

Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije penicilina G odabrano je 146 izolata za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su osetljivi na penicilin G i 145 izolata za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su rezistentni na penicilin G. Minimalna inhibitorna koncentracija penicilina G za izolate koagulaza pozitivnih stafilokoka, za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su osetljivi na penicilina, je bila 0,003 $\mu$ g/ml (MIC<sub>50</sub>) i 2  $\mu$ g/ml (MIC<sub>90</sub>), a za izolate za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su rezistentni na penicilin je bila 8  $\mu$ g/ml (MIC<sub>50</sub>) i 32  $\mu$ g/ml (MIC<sub>90</sub>).

Prema preporuci CLSI (2006) sojevi čija je MIC  $\leq$ 0,12 $\mu$ g/ml penicilina se smatraju osetljivim na penicilin, a za sojeve kod kojih je MIC  $\geq$ 0,25  $\mu$ g/ml se smatra da imaju sposobnost sinteze beta laktamaze i da su rezistentni na delovanje penicilinskih lekova koji su osetljivi na dejstvo beta laktamaze. CLSI (2006) navode da izolati kod kojih se utvrdi vrednost MIC  $\geq$ 0,03  $\mu$ g/ml najverovatnije ne sintetišu beta laktamazu. U slučaju naših ispitivanja samo je kod dva izolata (13,3%) utvrđena MIC  $\leq$ 0,12 $\mu$ g/ml.

Rezultate slične našim dobili su Watts i sar. (1997) koji su kod sojeva *S. aureus*, izolovanih u slučajevima mastitisa krava, koji nisu stvarali beta laktamaza utvrdili MIC<sub>50</sub>  $\leq$ 0,06 $\mu$ g/ml i MIC<sub>90</sub> 0,25 $\mu$ g/ml, a kod sojeva koji su stvarali beta laktamazu MIC<sub>50</sub> 0,5 $\mu$ g/ml a MIC<sub>90</sub> 16 $\mu$ g/ml. Araki i sar. (1984) su za sojeve *S. aureus* izolovane

iz mleka krava obolelih od kliničkog mastitisa utvrdili MIC<sub>50</sub> 0,2µg/ml, MIC<sub>80</sub> 1,56 µg/ml i MIC<sub>90</sub> 6,25µg/ml penicilina.

Manje minimalne inhibitorne koncentracije penicilina G za izolate koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih u slučajevima mastitisa krava za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su rezistentni na penicilin, utvrdili su Russi i sar. (2008) 0,06µg/ml (MIC<sub>50</sub>) i 4µg/ml (MIC<sub>90</sub>) i Gentilini i sar. (2000) 0,094 µg/ml (MIC<sub>50</sub>) i 1,5µg/ml (MIC<sub>90</sub>). Neslaganje između disk difuzione i dilucione metode su ustanovili Gianneechini i sar. (2002) koji su disk difuzionom metodom dokazali 46,1% izolata *S. aureus* rezistentnih na penicilin, a određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije ustanovili MIC<sub>50</sub> 0,5µg/ml i MIC<sub>90</sub> >8µg/ml. Visok procenat izolata *S. aureus* rezistentnih na penicilin autori objašnjavaju prisustvom beta laktamaze kod velikog broja (96%) ispitanih izolata.

Ampicilin je antibiotik koji je osetljiv na delovanje beta laktamaze. Od ukupno 23 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, koji su u našim istraživanjima ispitani sa gazdinstva sa umerenom prevalencijom, svi izolati su bili osetljivi na ampicilin. Ovako visoka osetljivost na ampicilin se može objasniti činjenicom da se u terapiji mastitisa krava ampicilin retko koristi.

Slične rezultate su dobili i drugi autori. Corti i sar. (2003) su utvrdili da je 93% izolata *S. aureus* koje su ispitali bilo osetljivo na ampicilin. Manji procenat osetljivosti na ampicilin (88% izolata) utvrdili su Schroder i sar. (2005). Turutoglu i sar. (2002) su dokazali osetljivost na ampicilin kod 35,7% izolata koji su stvarali beta laktamazu i kod 86,7% izolata koji nisu stvarali beta laktamazu.

Suprotno od naših rezultata više autora je utvrdilo rezistenciju na ampicilin. Klimiene i sar. (2011) su dokazali 78,4% izolata *S. aureus* rezistentnih na ampicilin i 81,3% izolata rezistentnih na penicilin. Schmidt (2011) je utvrdio da je 65,6% izolata stafilokoka rezistentno na ampicilin, a Güler i sar. (2005) su utvrdili 63,3% izolata rezistentnih na ampicilin. Moon i sar. (2007) su utvrdili nešto veći procenat izolata *S. aureus* rezistentnih na penicilin (74%) nego na ampicilin (73%). Sličan nalaz izolata osetljivih na penicilin i ampicilin su dobili u svojim istraživanjima Gianneechini i sar. (2002) koji su utvrdili 53,9% rezistentnih na penicilin i 53,3% izolata rezistentnih na ampicilin i Correa i sar. (2005) koji su utvrdili 78,94% izolata rezistentnih na ampicilin



i 77,89% izolata rezistentnih na penicilin. Visok procenat izolata stafilokoka rezistentnih na ampicilin su utvrdili Malinowski i sar. (2002), pri čemu su utvrdili da je veći procenat stafilokoka izolovanih u slučajevima subkliničkih mastitisa rezistentnih na ampicilin (68,9%) u odnosu na procenat stafilokoka izolovanih u slučajevima kliničkih mastitisa (54,5%).

Koagulaza pozitivne stafilokoke, koje stvaraju beta laktamazu, su osetljive na delovanje penicilinskih lekova koji su otporni na dejstvo beta laktamaze. U praksi se, najčešće, koriste kloksacilin i kombinacije penicilinskih antibiotika sa inhibitorima beta laktamaze.

Rezultati naših ispitivanja su pokazali da koagulaza pozitivne stafilokoke izolovane iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava na farmi sa umerenom i niskom prevalencijom koagulaza pozitivnih stafilokoka, bili osetljivi na amoksicilin/klavulansku kiselinu. Koagulaza pozitivne stafilokoke, izolovane iz uzoraka mleka krava uzetih na farmi sa visokom prevalencijom koagulaza pozitivnih stafilokoka, su u 92,9% slučajeva bile osetljive na kombinaciju amoksicilin/klavulanska kiselina.

Rezultate slične našim dobilo je više autora. Gentilini i sar. (2000) su ustanovili osetljivost na ampicilin/sublaktam kod svih izolata koje su izolovali iz mleka krava obolelih od kliničkog i subkliničkog mastitisa. De Oliviera i sar. (2000) navode da su sojevi *S. aureus* izolovani u slučajevima mastitisa krava u zemljama Evrope vrlo osetljivi na kombinaciju amoksicilin/klavulanska kiselina. Turutoglu i sar. (2006) su ustanovili osetljivost *S. aureus* na amoksicilin/klavulansku kiselinu kod 93,2% izolata, a svi izolati *S. aureus* kod kojih su dokazali da stvaraju beta laktamazu su bili osetljivi na amoksicilin/klavulansku kiselinu.

Manju osetljivost izolata *S. aureus* (84%) na amoksicilin/klavulansku kiselinu su ustanovili Kirkan i sar. (2005). Suprotno od rezultata dobijenih u našim istraživanjima Arslan i sar. (2009) su za 85,7% sojeva *S. aureus*, izolovanih u slučajevima mastitisa krava, dokazali da su rezistentni na amoksicilin/klavulansku kiselinu i utvrdili sličan plazmidni profil kao kod rezistencije na druge antibiotike.

Kloksacilin je penicilinski antibiotik koji je stabilan na dejstvo beta laktamaze i, najčešće, se koristi u terapiji stafilokoknih infekcija na kraju laktacije. U našim

ispitivanjima svi izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka, poreklom sa farmi sa umerenom i sa niskom prevalencijom, bili su osetljivi na kloksacilin. Na farmi sa visokom prevalencijom koagulaza pozitivnih stafilokoka osetljivost na kloksacilin je utvrđena kod 84,7% izolata.

Rezultati slični našim dobijeni su u više ispitivanja. Osetljivost na kloksacilin kod svih ispitanih izolata *S. aureus* su utvrdili su Ebrahimi i sar. (2009) i Yoshimura i sar. (2002), Arslan i sar. (2009) dokazali da je samo 2,5% izolata *S. aureus* bilo rezistentno na kloksacilin. Turutoglu i sar. (2002) navode da postoji značajna razlika u osetljivosti *S. aureus* na kloksacilin u zavisnosti od njihove sposobnosti da stvaraju beta laktamazu. Češće su izolati koagulaza pozitivnih koji ne stvaraju beta laktamazu bili osetljivi na kloksacilin (88,9%) nego izolati koji su imali sposobnost da stvaraju beta laktamazu (76,2%).

Manju osetljivost na kloksacilin *S. aureus* izolovanih u slučajevima subkliničkih mastitisa krava (62,4% izolata) u odnosu na osetljivost *S. aureus* izolovanih u slučajevima kliničkih mastitisa (66,7% izolata) utvrdili su Malinowski i sar. (2002).

Cefalosporini su grupa beta laktamskih antibiotika koji su stabilniji u prisustvu beta laktamaze u odnosu na penicilinske antibiotike. Najveći značaj u terapiji mastitisa izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokokama imaju cefalosporini prve generacije jer su najefikasniji u odnosu na gram pozitivne bakterije.

Ispitivali smo osetljivost na cefaleksin kod koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava u periodu predzasušnja. Rezultati ispitivanja su pokazali da je 90% izolata poreklom sa farmi sa umerenom prevalencijom bilo osetljivo na cefaleksin a 97,3%, izolata poreklom sa farmi sa visokom prevalencijom. Svi izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovani iz uzoraka mleka krava uzetih na farmi sa niskom prevalencijom su bili osetljivi na cefaleksin.

Rezultate slične našim dobilo je više autora. Ebrahimi i sar. (2009) koji su utvrdili da su svi izolati *S. aureus* izolovani u slučajevima subkliničkih mastitisa bili osetljivi na cefaleksin. Za razliku od rezultata dobijenih u našim istraživanjima Correa i sar. (2005) su među izolatima, iz zapatu sa visokom prevalencijom izolata rezistentnih na veći broj antibiotika, utvrdili 35,79% izolata rezistentnih na cefaleksin.

Sličane rezultate u odnosu na cefalosporine prve generacije, kao što su rezultati dobijeni u našim ispitivanjima osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka poreklom sa farmi sa visokom i umerenom prevalencijom koagulaza pozitivnih stafilokoka dobili su Schmidt (2011), koji je utvrdio osetljivost na cefalotin kod 98,91% izolata *S. aureus* i, Kalmus i sar. (2011) koji su ustanovili rezistenciju na isti antibiotik kod 3,8% izolata. Gentilini i sar. (2000) i Giannechini i sar. (2002) i Pitkala i sar. (2004) su utvrdili da su svi ispitivani izolati *S. aureus* bili osetljivi na cefalotin. U zapatu visokom prevalencijom (28,33%) koagulaza pozitivnih stafilokoka Kirkan i sar. (2005) su kod 85% ispitivanih izolata ustanovili osetljivost na cefkvinom Turutoglu i sar. (2006) su ustanovili 90,3% izolata osetljivih na cefuroksim.

Cefalosporini treće generacije se retko koriste u terapiji stafilokoknih mastitisa, obzirom da je njihova efikasnost u odnosu na gram pozitivne mikroorganizme manja nego kod cefalosporina prve generacije. U našem radu ispitivana je osetljivost izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka prema ceftiofuru. Rezultati naših ispitivanja su pokazali da su svi izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka sa sve tri farme bili osetljivi na ceftiofur.

Iz grupe aminoglikozidnih antibiotika se, najčešće, ispituje osetljivost na gentamicin. Gentamicin se retko koristi u terapiji staflokoknih mastitisa krava zbog dugačke karence, a pojava sojeva koji su rezistentni na gentamicin najčešće je posledica upotrebe u terapiji drugih oboljenja u zapatu. U našim ispitivanjem je utvrđena osetljivost kod 45,8% izolata poreklom sa farmi sa umerenom prevalencijom, 48% izolata poreklom sa farmi sa visokom prevalencijom i kod 55,6% izolata poreklom sa farmi sa niskom prevalencijom koagulaza negativnih stafilokoka.

Rezultati slični našim dobijeni su u više istraživanja. Unakal i sar. (2010) su dokazali osetljivost na gentamicin kod 52,94% izolaza *S. aureus*. Na osnovu rezultata iz dve studije Turutoglu i sar. (2002) i Turutoglu i sar. (2006) navode da nema značajne razlike u osetljivosti na gentamicin između izolata *S.aureus* koji stvaraju beta laktamazu i izolata koji ne stvaraju beta laktamaza.

Moon i sar. (2007) su utvrdili rezistenciju na gentamicin kod 29% izolata koji su imali sposobnost stvaranja enterotoksina i 23% izolata koji nisu imali sposobnost stvaranja enterotoksina.

Za razliku od rezultata dobijenih u našim istraživanjima Ebrahimi i sar. (2009), Giannechini i sar. (2002) i Pitkala i sar. (2004) su utvrdili da su svi ispitivani izolati *S. aureus* bili osetljivi na gentamicin. Visok procenat izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka osetljivih na gentamicin utvrdili su Gentilini i sar. (2000) kod 96,6% izolata i Correa i sar. (2005) kod 80,05% izolata.

Ispitivanjem osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka na tetracikline utvrđeno je da je osetljivo na tetraciklin 69,7% izolata poreklom sa farme sa umerenom prevalencijom, 87,7% izolata poreklom sa farme sa visokom prevalencijom i 54,5% izolata poreklom sa farme sa niskom prevalencijom koagulaza pozitivnih stafilokoka.

Rezultati slični našim dobijeni su u više ispitivanja. Malinowski i sar. (2002) su dokazali da je 60,35% sojeva *S. aureus* izolovanih u slučajevima subkličičkih mastitisa 57,9% sojeva *S. aureus* izolovanih u slučajevima kliničkog mastitisa bilo osetljivo na tetraciklin. Güler i sar. (2005) su ustanovili rezistenciju na oksitetraciklin kod 27,9% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka poreklom iz zapata sa 63,3% izolata rezistentnih na penicilin i ampicilin, a Li i sar. (2009) ustanovili rezistenciju na tetraciklin kod 60,0% izolata *S. aureus* poreklom iz zapata sa visokim procentom (77,3%) izolata *S. aureus* rezistentnih na penicilin i ampicilin. Suprotno od napred navedenih rezultata Kirkan i sar. (2005) su utvrdili da je 60% izolata *S. aureus* osetljivo na oksitetraciklin poreklom iz zapata sa visokim procentom izolata rezistentnih na beta laktamske lekove, a Correa i sar. (2005) su ustanovili 64,22% izolata *S. aureus* rezistentnih na tetraciklin pri čemu su sojevi na veći broj antibiotika bili rezistentni i na tetraciklin. Slične rezultate su dobili i Giannechini i sar. (2002) koji su ustanovili 14% izolata *S. aureus* rezistentnih na oksitetraciklin i Turutoglu i sar. (2002) koji su kod izolata poreklom iz zapata sa visokom prevalencijom *S. aureus* utvrdili osetljivost kod 52,4% izolata *S. aureus* koji su stvarali beta laktamaz i 55,6% izolata koji nisu stvarali beta laktamazu.

Moon i sar. (2007) navode da je pojava rezistencije *S. aureus* na tetracikline češća kod izolata koji imaju sposobnost stvaranja enterotoksina (33%) nego kod izolata koji ne stvaraju enterotoksine (19%). Turutoglu i sar. (2006) su utvrdili da su izolati *S. aureus*, koji su stvarali beta laktamazu, bili češće osetljivi na oksitetraciklin (34,2%) nego izolati koji nisu stvarali beta laktamazu (30%).

Za razliku od rezultata dobijenih u našim ispitivanjima Ebrahimi i sar. (2009) su utvrdili da su svi izolati *S. aureus*, koje su ispitali, bili osetljivi na oksitetraciklin.

Makrolidi i linkozamidi deluju na osetljive bakterije tako što koče sintezu RNK zavisnih proteina metilacijom ili mutacijom, pri čemu dolazi do unakrsne rezistencije kod ove dve grupe antibiotika.

Rezultati dobijeni u ovom radu su pokazali da su na linkomicin bili osetljivi svi izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka poreklom sa farme sa visokom prevalencijom, 75% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka poreklom sa farme sa niskom prevalencijom i 73,9% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka poreklom sa farme sa umerenom prevalencijom (tabela 5.3.16., 5.3.17., 5.3.18.).

Rezultate dobijene u našim istraživanjima potvrđuju rezultati iz više studija. Aslantas i sar. (2011) su utvrdili 74,03% izolata *S. aureus* osetljivih na linkomicin, Kalmus i sar. (2011) su utvrdili 82,4% izolata *S. aureus* osetljivih na linkomicin i Turutoglu i sar. (2006) su utvrdili 77,7% izolata *S. aureus* osetljivih na linkomicin. U većem procentu su bili osetljivi na linkomicin izolati *S. aureus* koji su stvarali beta laktamazu (78,9% izolata) nego izolati *S. aureus* koji su nisu stvarali beta laktamazu (70,0% izolata).

Correa i sar. (2005) su utvrdili visok procenat (71,58%) izolata rezistentnih na linkomicin koagulaza pozitivnih stafilokoka koje su bile rezistentne na veći broj antibiotika. Kod 80,0% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, rezistentnih na linkomicin, utvrdili su plazmid za prenos rezistencije, čime objašnjavaju visok nivo rezistencije i pojavu izolata rezistentnih na veći broj antibiotika.

Poslednjih godina u humanoj i veterinarskoj medicini poseban problem predstavljaju koagulaza pozitivne stafilokoke rezistentne na meticilin. Značaj stafilokoka rezistentnih na meticilin je proširen iz oblasti humane i veterinarske medicine na industriju hrane. Pri tome se posebno posvećuje pažnja stafilokokama izolovanim iz uzoraka mleka krava u slučajevima subkliničkih mastitisa. Otkriveno je da *mecA* gen odgovoran za rezistenciju na meticilin, lančano vezuje za sebe druge gene rezistencije (takozvana vezana rezistencija) pa se tako prenošenjem *mecA* gena između stafilokoka posledično prenose i svi ostali naknadno "zakačeni" geni rezistencije. Stafilokoke za razliku od drugih vrsta bakterija imaju jako izraženu sposobnost mutacije genoma u kontaktu sa antibioticima, odnosno stafilokoke lakše od svih drugih vrsta bakterija

mutiraju u prisustvu antibiotika i postaju otporne na njihovo delovanje. Time se objašnjava rezistencija na veliki broj antibiotika kod sojeva MRSA (Mišić, 2012).

Prisustvo *mecA* je ispitivano kod 15 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka koji su disk difuzionom metodom ocenjeni kao osetljivi a primenom API staph i na osnovu 16S rRNK i prisustva *nuc* gena identifikovani kao *S. aureus* i 35 izolata koji su disk difuzionom metodom ocenjeni kao rezistentni a primenom API staph i na osnovu 16S RNK i prisustva *nuc* gena identifikovani kao *S. aureus*. Izolati za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su osetljivi na penicilin G su stvarali pigment (zlatno žuti 46,66% izolata, svetlo zlatni 33,33% izolata i belo-zlatni 20% izolata). Rezultate slične našim dobili su Begum i sar. (2007) koji su utvrdili 17,14% koagulaza pozitivnih stafilokoka osetljivih na penicilin od kojih je 25,71% izolata davalo zlatno-žuti pigment, 51,43% žutni pigment, a 22,86% izolata nije stvaralo pigment.

Na prisustvo fenotipske rezistencije na meticilin u našim istraživanjima ispitano je 373 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka za koje je disk difuzionom metodom utvrđeno da su rezistentni na penicilin. Rezistencija na oksacilin je utvrđena kod 14 (3,75%) izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, a ni kod jednog od 373 izolata nije utvrđena rezistencija na cefoksitin.

U literaturi ima podataka da je kod stafilokoka kod kojih nije utvrđena fenotipska rezistencija dokazano prisustvo *mecA* gena. Stoga je u ovoj disertaciji odabrano 50 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka (15 izolata osetljivih na penicilin i 35 izolata rezistentnih na penicilin) za ispitivanje na prisustvo *mecA* gena. Ni kod jednog od 50 ispitanih izolata nismo dokazali prisustvo *mecA* gen.

Kaya i sar. (2009) su, poredeći disk difuzionu i mikrodilucionu metodu sa oksacilinom u otkrivanju *mecA* gena, potvrdili kod jednog izolata osetljivost ali nije dokazano prisustvo gena za rezistenciju na meticilin. Isto tako, kod izolata kod kojih su dokazali *mecA* gen, ustanovili su osetljivost na oksacilin mikrodilucionom metodom, a kod dva izolata osetljivost disk difuzionom metodom. Autori ovu neusaglašenost objašnjavaju heterogenom rezistencijom na meticilin kod *S. aureus*. Saini i sar. (2012) su sprovedli ispitivanje na 89 mlečnih farmi u cilju otkrivanja izolata *S. aureus* koji su rezistentni na antibiotike. Utvrdili su rezistenciju na penicilin kod 8,8% izolata, a kod 15% izolata utvrdili su rezistenciju na veći broj antibiotika. Iako nisu dokazali rezistenciju na

oksacilin i cefalotin autori su dokazali kod jednog izolata *S. aureus* prisustvo *mecA* gena.

Hendriksen i sar. (2008) navode da je rezistencije na meticilin *S. aureus*, izolovanih u slučajevima mastitisa krava dokazana samo u dve zemlje EU u Španiji kod 3,7% i u Francuskoj 8,3% ispitanih izolata.

Asfour i sar. (2011) su sproveli istraživanje fenotipske i genotipske rezistencije *S. aureus* i drugih koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava u slučajevima mastitisa. U cilju utvrđivanja fenotipske rezistencije ispitivali su osetljivost izolata stafilokoka na penicilin i amoksicilin/klavulansku kiselinu a za utvrđivanje genotipske rezistencije ispitivali su prisustvo *blaZ* gena. Rezistenciju na meticilin su ispitivali pomoću diska oksacilina od 1µg i dokazivanjem *mecA* gena. Za jedan soj *S. aureus*, izolovan u slučaju kliničkog mastitisa krava, utvrdili su da je osetljiv na amoksicilin/klavulansku kiselinu, oksacilin, cefoksitin, a rezistentan na penicilin i dokazali prisustvo *blaZ* gen. Kod ostalih vrsta koagulaza pozitivnih stafilokoka, izolovanih u slučajevima kliničkih mastitisa, kod 6 izolata su utvrdili da su rezistentni na cefoksitin, kod pet na oksacilin, a svi ispitivani izolati su bili rezistentni na penicilin. Kod osam izolata su dokazali *blaZ* gen i *mecA* gen, u po dva izolata su dokazali samo *mecA* gen i samo *blaZ* gen.

Upoređujući efikasnost fenotipskog i genotipskog testa autori su uočili pozitivnu korelaciju kod većine izolata. Poklapanje nije utvrđeno u dve grupe izolata: u prvoj grupi gde nije utvrđen *mecA* gen a ustanovljena rezistencija na oksacilin i na cefoksitin. Razlozi za dobijanje različitih rezultata bi prema autorima mogli da budu: 1. sinteza modifikovanog unutrašnjeg penicilin vezujućeg proteina<sup>2</sup> koji ima mali afinitet za meticilin i 2. hiperprodukcija beta laktamaze.

Lee (2003) navode da su ispitivanjem kod 28 izolata *S. aureus* ustanovili rezistenciju na oksacilin, a da je većina tih izolata posle više subkultivacija postala fenotipski osetljiva na oksacilin. Kod 15 izolata utvrdili su prisustvo *mecA* gena, a 12 izolata je poticalo iz uzoraka mleka krava. Većina sojeva *S. aureus* (9 izolata) je izolovana iz mleka krava sa povećanim brojem somatskih ćelija u mleku.

Prisustvo meticilin rezistentnih koagulaza pozitivnih stafilokoka su dokazali Coelho i sar. (2009) kod šest (25%) od 65 izolata koje su ispitali multipleks PCR metodom.

Moon i sar. (2009) su, ispitujući 835 izolata *S. aureus* koji su izolovali iz mleka krava obolelih od mastitisa, utvrdili 21 (2,5%) izolat rezistentan na oksacilin, a *mecA* gen su dokazali kod 13 izolata. Minimalna inhibitorna koncentracija oksacilina utvrđena u toj studiji je iznosila 16µg/ml. Nam i sar. (2011) su, od 402 soja *S. aureus* izolovana iz uzoraka mleka krava obolelih od mastitisa, kod 17 izolata dokazali prisustvo *mecA* gena. Takođe, autori navode da su karakteristike meticilin rezistentnih *S. aureus* identični sa humanim izolatima koji su dokazani u Koreji i ukazuju na značaj širenja infekcija izazvanih meticilin rezistentnim stafilokokama između ljudi i životinja. Vanderhaeghen i sar. (2010) su analizom uzoraka mleka krava ispitivali prevalenciju meticilin rezistentnih *S. aureus* na belgijskim farmama i dokazali *mecA* gen 11 (9,3%) od 118 sojeva *S. aureus* izolovanih iz uzoraka mleka krava. Türkyilmaz i sar. (2010) su, ispitivanjem prevalencije *S. aureus* rezistentnih na meticilin u Turskoj i dokazali prisustvo *mecA* gena kod 16 od 93 ispitana izolata.

Trideset devet izolata (78%) koja smo ispitali PCR metodom na osnovu 16S rRNK karakterističane za stafilokoke i *nuc* gen je potvrđeno kao *S. aureus*. Pet izolata (10%) je imalo 16S rRNK karakterističnu za stafilokoke ali ne i gen za nukleazu. Padilha i sar. (2000) navode da dokazivanje TN-aze kao jedinstven kriterijuma za identifikaciju *S. aureus* nije pouzdano.

Obzirom da smo kao zadatak postavili da utvrdimo koliki je rizik za zdravlje ljudi nalaz enterotoksogenih koagulaza pozitivnih stafilokoka, izolovanih iz mleka krava sa subkliničkim mastitisom, odabrane izolate koagulaza pozitivnih stafilokoka smo imunoenzimskom metodom na mini VIDAS aparatu ispitali na sposobnost sinteze klasičnih enterotoksina SEA, SEB, SEC, SED i SEE.

Od 50 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka ispitanih na mini VIDAS aparatu, kod 10 (20%) izolata je dokazana sposobnost sinteze klasičnih enterotoksina SEA-SEE.

Rezultate slične našim navode Cenci-Goga i sar. (2003) koji su utvrdili 13,75% *S. aureus* koji stvaraju enterotoksine.

Veći procenat sojeva *S. aureus* koji stvaraju enterotoksine, nego što je dokazano u našim ispitivanjima, utvrđen je u više studija. Jorgensen i sar. (2005) su dokazali sposobnost sinteze klasičnih enterotoksina kod 22,1% izolata *S. aureus*, Moon sar. (2007) kod 23,6%, a Boynukara i sar. (2008) kod 25,5% ispitivanih izolata *S. aureus*,



Kenny i sar. (1993) kod 28,6% *S. aureus*. Više autora je dokazalo veliki procent sojeva *S. aureus*-a izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava ima sposobnost sinteze enterotoksina. Sposobnost sinteze enterotoksina su dokazali Takeshige i sar. (1983) kod 33,3% izolata *S. aureus*, Adesyan i sar. (1998) kod 47,3% izolata *S. aureus* Adesyan i sar. (1995) kod 53,6% izolata *S. aureus*, Stephan i sar. (1999) kod 54% izolata *S. aureus*, a Joffe i sar. (2006) navode znatno višu prevalenciju (77,3% izolata).

Izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka kod kojih smo ELFA metodom potvrdili sposobnost sinteze enterotoksina, analizirali smo PCR metodom na prisustvo gena za sintezu enterotoksina. Ispitivali smo prisustvo gena za sintezu enterotoksina A, B i D jer oni imaju najveći značaj za bezbednost namirnica. Od 10 izolata za koje je mini VIDAS tehnikom dokazano da stvaraju klasične enterotoksine (SEA-SEE) kod jednog izolata je dokazano prisustvo gena za sintezu enterotoksina B. Ni jedan ispitivani izolat nije imao gene za sintezu enterotoksina A i D.

Rezultati dobijeni u našim ispitivanjima su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u istraživanjima drugih autora. Cenci-Goga i sar. (2003) nisu dokazali sposobnost sinteze enterotoksina A i D kod sojeva *S. aureus* izolovanih iz uzoraka mleka krava u slučajevima mastitisa. Stephan i sar. (1999) su dokazali kod dva od 63 enterotokogena soja stafilokoka sposobnost da sintetišu enterotoksine B i D. Moon i sar. (2007) su kod 17 izolata ustanovili sposobnost sinteze enterotoksina B samostalno i kod 27 izolata u kombinaciji ABCD od 164 enterotoksogena izolata. Fueyo i sar. (2005) su kod jednog izolata od ukupno 84 enterotoksogenih *S. aureus*, koje su izolovali iz mleka krava obolelih od subkliničkog mastitisa, dokazali sposobnost stvaranja enterotoksina B imunoenzimski i potvrdili dokazom *seb* gen. U istraživanjima Adesyan i sar. (1995) sposobnost sinteze enterotoksina B je dokazana kod 57,5%, enterotoksin A kod 23,9% i enterotoksin D kod 15,7% sojeva *S. aureus* izolovanih iz mleka krava obolelih od subkliničkog mastitisa.

Za razliku od enterotoksina E koji se retko dokazuje, enterotoksin C se u svoje tri forme C1, C2 i C3 često potvrđuje kod *S. aureus* izolovanih iz vimena krava obolelih od matitisa. U prilog ovom mišljenju su i nalazi Ebling i sar. (2001) koji navode da je *sec* gen najčešće eksprimiran kod *S. aureus* koji izaziva mastitis krava. Kuroishi i sar.

(2003) ukazuju na značaj enterotoksina C u patogenezi zapaljenja vimena. Prisustvo *sec* gena je češće kod *S. aureus* izolovanih u slučajevima mastitisa nego kod sojeva poreklom iz zdravog vimena. Cenci-Goga i sar. (2003) su sposobnost stvaranja enterotoksin C dokazali kod 31,81% izolata *S. aureus*, a kod 13,63% izolata su dokazali sposobnost stvaranja enterotoksina C i D. Adesyan i sar. (1995) su dokazali sposobnost sinteze enterotoksina C kod 50%, a enterotoksina B kod 57,5% ispitanih izolata *S. aureus*. Larsen i sar. (2002) navode da su ispitivanjima *S. aureus* izolovanih iz mleka krava u slučajevima mastitisa u Evropskim zemljama najčešće dokazani geni za sintezu SEC, i SED. U više istraživanja je utvrđeno da sojevi *S. aureus* izolovani u slučajevima mastitisa krava najčešće stvaraju enterotoksin C (Stephan i sar., 1999; Fueyo i sar., 2005; Jorgensen i sar., 2005; Rahimi i sar. 2012). Za razliku od napred navedenih rezultata Boynukara i sar. (2008) navode ni kod jednog izolata *S. aureus* nisu dokazali sposobnost stvaranja enterotoksin C.

Svi izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka kod kojih smo dokazali sposobnost sinteze enterotoksina su biohemijskim ispitivanjem identifikovani kao *S. aureus*, a PCR metodom je potvrđeno prisustvo 16S rRNK karakteristične za stafilokoke i prisustvo *nuc* gena kod svih izolata.

Rezultate dobijene u našim istraživanjima da od koagulaza pozitivnih stafilokoka enterotoksine stvara *S. aureus* potvrđuju rezultati dobijeni u više studija (Moon i sar., 2007; Akineden i sar., 2001; Neder i sar., 2011; Rahimi i sar., 2012; Singh i sar., 2011; Peles i sar. 2007; Kenny i sar., 1993; Takeshige i sar. 1985 i Rall i sar. 2008).

Za razliku od rezultata dobijenih u našim istraživanjima Lamprell i sar. (2004) su kod sojeva *S. intermedius* izolovanih iz sireva, napravljenih od sirovog mleka, dokazali sposobnost sinteze klasičnih enterotoksina, a najčešće enterotoksina C.

Makromorfološkim ispitivanjem na krvnom agaru ustanovljeno je da su svi izolati enterotoksogenih *S. aureus*-a u našim ispitivanjima imali sposobnost sinteze zlatnog pigmenta, a intenzitet boje se kretao od belo-zlatne (30%), svetlo zlatne (50%) i zlatne (10%).

Neder i sar. (2011) su za ispitivanje sposobnosti sinteze enterotoksina *S. aureus* karakterističnih makromorfoloških karakteristika na krvnom agaru koji su izolovali iz zbirnog mleka, a boja kolonija je varirala od sivkasto-bele do zlatno-žute.

Svi izolati enterotoksogenog *S. aureus* su pokazali sposobnost hemolize na krvnom agaru. Fueyo i sar. (2005) su, ispitujući karakteristike enterotoksogenih *S. aureus* koje su izolovali iz mleka krava obolelih od subkliničkog mastitisa, ustanovili boju pigmenta od sivo-bele do žute.

Rezultati naših ispitivanja stvaranja hemolize na krvnom agaru su pokazali da su izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka stvarali beta hemolizu (70% izolata), zatim alfa i beta kod hemolizu (20% izolata) i delta hemolizu (10% izolata). Rezultati slični našim dobijeni su u više ispitivanja. Larsen i sar. (2002) su, ispitujući karakteristike enterotoksogenih *S. aureus* u devet zemalja Evrope, ustanovili da 97% izolata stvara beta hemolizu na krvnom agaru i ima *hly* gen. Akineden i sar. (2001) su, kao najčešći tip hemolize kod *S. aureus*, izolovanog iz mleka krava obolelih od mastitisa, dokazali beta hemolizin a zatim alfa. Takeshige i sar. (1985) su kod 87 izolata *S. aureus* koje su izolovali iz mleka krava obolelih od mastitisa, utvrdili fenotipsku alfa hemolizu kod 69% izolata, beta hemolizu kod 95,4% izolata, a delta hemolizu kod 66,6% izolata. Peles i sar. (2007) su iz zbirnog mleka krava izolovali koagulaza pozitivne stafilokoke koje su na krvnom agaru stvarale alfa i beta hemolizu i imale *seb*, *sed* i *sec* gen, kao i koagulaza pozitivne stafilokoke koje su na krvnom agaru stvarale slabu hemolizu i imale *sea*, *sec* i *seg/sei* gen.

Od deset izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka za koje smo u našim istraživanjima imunoenzimskom metodom dokazali da stvaraju klasične enterotoksine, za osam izolata je disk difuzionom metodom utvrđeno da su osetljivi na penicilin G, a za dva izolata je utvrđeno da su rezistentni na penicilin G. Adesyun i sar. (1995) navode da su kod 53,6% sojeva *S. aureus*, izolovanih iz mleka krava obolelih od mastitisa, dokazali sposobnost sinteze enterotoksina B i C, od kojih je 23,6% bilo rezistentno na penicilin G. Slične rezultate dobili su Moon i sar. (1999) koji su utvrdili da su izolati *S. aureus* kod kojih je dokazana sposobnost stvaranja enterotoksina A bili rezistentni na penicilin G, a znatno manji procenat izolata *S. aureus* koji su stvarali enterotoksin B je bio rezistentan na penicilin G, a izolati *S. aureus* koji su stvarali enterotoksine A, B, C i D su u najvećem procentu bili osetljivi na penicilin G. Jorgensen i sar. (2005) Peles i sar. (2007) i navode da izolati *S. aureus* izolovani iz zbirnog mleka koji su imali gene za sintezu enterotoksina, bili su u malom procentu rezistentni na penicilin G. Haennil i sar.

(2010) su utvrdili da je 14,29% *S. aureus* kod kojih je dokazan *sec* gen bilo rezistentno na penicilin, a 85,71% osetljivo na penicilin. El-Jakee i sar. (2010) su kod izolata *S. aureus*, poreklom od krava obolelih od mastitisa, koji su imali gene za sintezu enterotoksina, utvrdili visoku prevalenciju sojeva rezistentnih na penicilin. Rosengren i sar. (2010) su kod 70% i sojeva *S. aureus* izolovanih iz sireva proizvedenih od sirovog mleka, dokazali jedan ili više gena za sintezu enterotoksina, od kojih je 66% izolata bilo rezistentno na penicilin.

Prevalenca od 20% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka koje su dokazane kao uzročnici subkliničkih mastitisa, a koji imaju sposobnost sinteze enterotoksina, ukazuje na to da njihovo prisustvo u sirovom mleku može biti rizično za zdravlje ljudi, naročito ako se takvo mleko ne čuva pri temperaturama nižim od 8°C, odnosno ako postoje uslovi da se stafilokoke umnože do kritičnog broja. Dobra osetljivost na većinu antibiotika, kao i to da nje dokazana rezistencija na meticilin kod izolovanih koagulaza pozitivnih stafilokoka, ukazuje na to da koagulaza pozitivne stafilokoke uzročnici mastitisa krava u intenzivnom sistemu proizvodnje ne predstavljaju rizik za prenošenja gena rezistencije između životinja i ljudi.

## 7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ispitivanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Koagulaza pozitivne stafilokoke su izolovane iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava na sve tri ispitivane farme: na farmi I u 8,38 % latentnih infekcija i subkliničkih mastitisa, na farmi II u 17,20% latentnih infekcija i subkliničkih mastitisa, a na farmi III u 1,64% latentnih infekcija i subkliničkih mastitisa.
2. Ispitivanjem makromorfoloških karakteristika utvrđeno je da 96% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka imaju, zlatnožuti pigment, a samo 4% izolata nije imalo zlatnožuti pigment. Svi izolati su stvarali hemolizine, najčešće beta hemolizin (50% izolata), zatim alfa plus beta hemolizin (36% izolata), beta plus delta hemolizinon (8% izolata), delta hemolizin (4% izolata) i alfa hemolizin 2% izolata.
3. Na osnovu biohemijskih osobina izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka su najčešće identifikovani kao *S. aureus* (88%), zatim *S. chromogenes* (4%), *S. intermedius* (2%), *S. xylosus* (2%), *S. sciuri* (2%) i *S. lentus* (2%).
4. Najveći procenat izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, izolovanih iz uzoraka mleka krava u slučajevima latentne infekcije i subkliničkih mastitisa, rezistentnih na penicilin G je utvrđen na farmi sa umerenom prevalencijom mastitisa (70,4% izolata), zatim na farmi sa visokom prevalencijom mastitisa (60,2% izolata), a na najmanji na farmi sa niskom prevalencijom (43,7% izolata).
5. Makrodilucionom metodom je za izolate koagulaza pozitivnih stafilokoka utvrđena minimalna inhibitorna koncentracija penicilina G za izolate koji su disk difuzionom metodom ocenjeni kao rezistentni je bila (MIC<sub>90</sub>) 32 µg/ml i (MIC<sub>50</sub>) 8 µg/ml, a za izolate koji su disk difuzionom metodom ocenjeni kao osetljivi minimalna inhibitorna koncentracija penicilina G je bila 0,03 µg/ml (MIC<sub>50</sub>) i 2 µg/ml (MIC<sub>90</sub>).
6. Ispitivanjem fenotipske otpornosti na meticilin, ustanovljena je otpornost kod 3,75% izolata na 1µg oksacilina, a ni jedan izolat nije bio otporan na 30µg cefoksitina. Ni kod jednog od 50 ispitivanih izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, kod kojih je

makrodilucionom metodom utvrđena rezistencija na penicilin G, nije dokazano prisustvo *mecA* gena.

7. Primenom ELFA metode utvrđeno je da 20% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, koje su na osnovu fenotipskih i genotipskih osobina, identifikovane kao *S. aureus*, ima sposobnost sinteze klasičnih enterotoksina (A, B, C, D i E).

8. Koagulaza pozitivne stafilokoke osetljive na penicilin G su češće stvarale klasične enterotoksine (53,33% izolata) nego koagulaza pozitivne stafilokoke rezistentne na penicilin G (8,57% izolata).

9. Od 10 izolata *S. aureus*, kod kojih je ELISA metodom utvrđena sposobnost sinteze klasičnih enterotoksina (A, B, C, D i E), samo kod jednog izolata (izolat broj 9) identifikovan je gen za sintezu enterotoksina B. Ovaj nalaz ukazuje da ostalih 90% izolata *S. aureus* ima sposobnost da sintetiše enterotoksine grupe C i/ili E.

## 8. SPISAK LITERATURE

1. Adesiyun AA. 1995. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitic milk: bacteriophage and antimicrobial agent susceptibility, and enterotoxigenicity. *Zentralbl Veterinarmed B*. May;42(3):129-39.
2. Adesiyun AA, Webb LA, Romain HT. 1998. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. *J Food Prot*. 1998. May;61(5):629-32.
3. Adesiyun AA, L.A. Webb and H. Romain. 1999. Phenotypic characteristic of *Staphylococcus aureus* strain isolated from milk and dairymen on dairy farms in Trinidad. *Israel Journal of veterinary Medicine*. Volume 54 (1)
4. Akineden Ö, C. Annemüller, A. A. Hassan, C. Lämmler, W. Wolter, and M. Zschöck. 2001. Toxin Genes and Other Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Cows with Mastitis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 September; 8(5): 959–964.
5. Ali-Vehmas Teri, Peter Westphalen, Vesa Myllys and Markus Sandholm. 1997. Binding of *Staphylococcus aureus* to milk fat globules increases resistance to penicillin-G. *Journal of Dairy Research* 64 : pp 253-260.
6. Ameh Agbo James, Tobias Edgbe-Nwiyi and Lamido Tanko Zaria. 1999. Prevalence of bovine mastitis in Maiduguri Borno State, Nigeria. *VETERINARSKI ARHIV* 69 (2), 87-95.
7. Anand KB, P Agrawal, S Kumar, K Kapila 2009. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacilin screen agar and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(1): 27-9.
8. Anderson KL, Lyman RL, Bodeis-Jones SM, White DG. 2006. Genetic diversity and antimicrobial susceptibility profiles among mastitis-causing *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples. *Am J Vet Res*. 2006; Jul;67(7):1185-91.
9. Apparao MD, P. L. Ruegg, A. Lago, S. Godden, R. Bey and K. Leslie. 2009. Relationship between in vitro susceptibility test results and treatment outcomes for gram-positive mastitis pathogens following treatment with cephalosporin sodium. *J. Dairy Sci*. 2009;92:2589-2597.
10. Araki Sheiichi, Mamoru Kashiwazaki, Tsuneo Kume. 1985. Antimicrobial activity of amoxicillin and other penicillins against clinical isolates from bovine udder. *Jpn.J.Vet.Sci*. 1985.; 47(2):321-323
11. Arcuri Edna Froeder, Fabiola Fonseca Angelo, Marta Fonseca Martins Guimares, Regine Talon, Maria De Fatima Borges, Sabine Leroy, Gerard Loiseau, Carla Christine Lange, Nelio Jose De Andrade, and Didier Montet. 2010. Toxigenic Status of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Raw Milk and Minas Frescal Cheese in Brazil. *Journal of Food Protection*, Vol. 73, No. 12, Pages 2225–2231.
12. Arestrup, Frank Møller, Larsen, H.D., Eriksen, N.H.R., Elsberg, C.S. and Jensen, N.E. 1999. Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin - A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 107, (4), page 425-430.

13. Argaw K. and T. Tolosa. 2008. Prevalence of sub clinical mastitis in small holder dairy farms in Selale, North Shewa Zone, Central Ethiopia. *The Internet Journal of Veterinary Medicine*. 2008 Volume 5 Number 1.
14. Argudín María Ángeles María Carmen Mendoza and María Rosario Rodicio. 2010. Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins. *Review Toxins*, 2, 1751-1773 ISSN 2072-6651.
15. Arshad M, G. Muhammad, M. Siddiqur, M. Ashraf and H.A. Khan. 2006. Staphylococcal mastitis in bovines and some properties of staphylococcal isolates. *Pakistan Vet. J.*, 26(1): 20-22
16. Arslan Emine, Ayten Celebi, Leyla Acik, Uckun Sait Ucan 2009. Characterisation of coagulase positive Staphylococcus species isolated from bovine mastitis using protein and plasmid patterns. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 33(6): 493-500.
17. Asfour Hanaa A.E. and Somah F. Darwish. 2011. Phenotypic and genotypic detection of both *mec-A* and *bla-Z*- genes mediated  $\beta$ -lactam in staphylococcus strains isolated from bovine mastitis. *Global Veterinaria* 6(1): 39-50.
18. Aslantas Özkan, Fatma Öztürk and Ahmet Ceylan. 2011. Prevalence and Molecular Mechanism of Macrolide and Lincosamide Resistance in Staphylococci Isolated from Subclinical Bovine Mastitis in Turkey. *J. Vet. Med. Sci.* 73(12): 1645–1648
19. Atyabi, N., Vodjgani, M., Ghargozloo, F. and Bahonar, A. 2006. Prevalence of bacterial mastitis in cattle from the farms around Teheran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, University of Shiraz, Vol 7, No.3, Ser.No.16.
20. Barboza-Corona JE, de la Fuente-Salcido N, Alva-Murillo N, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE. 2009. Activity of bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolates associated to bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 2009.; Jul 2;138(1-2):179-83. Epub 2009. Mar 20.
21. Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. 2006. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 2006; Jun;89(6):1877-95.
22. Begum HA, M.S. Uddin, M.J. Islam, K.H.M.N.H. Nazir, M.A. Islam and M.T. Rahman. 2007. Detection of biofilm producing coagulase positive *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis, their pigment production, hemolytic activity and antibiotic sensitivity pattern. *J. Bangladesh Soc. Agric. Sci. Technol.*, 4(1 & 2): 97-100.
23. Bengtsson Björn, Helle Ericsson Unnerstad, Torkel Ekman, Karin Artursson, Maria Nilsson-Öst, Karin Persson Waller. 2009. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Veterinary Microbiology* Volume 136, Issues 1-2, Pg 142-149 .
24. Bennedsgaard Torben W, Stig M Thamsborg, Frank M Aarestrup, Carsten Enevoldsen, Mette Vaarst and Anna B Christoffersen. 2006. Resistance to penicillin of *Staphylococcus aureus* isolates from cows with high somatic cell counts in organic and conventional dairy herds in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica* 48:24 doi:10.1186/1751-0147-48-24.
25. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: second edition 2009. Volume 3: The Firmicutes 392-420 E-book.



26. Bervoets Eva. 2008. The incidence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in milk samples of Canadian dairy cows. Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Canada.
27. Boerlin Patrick, Peter Kuhnert, Daniela Hüsey and Melchior Schaellibaum. 2003. Methods for Identification of *Staphylococcus aureus* Isolates in Cases of Bovine Mastitis. *Journal of Clinical Microbiology*, February 2003, p. 767-771, Vol. 41, No.
28. Botrel Marie-Anne, Marisa Haenni, Eric Morignat, Philippe Sulpice, Jean-Yves Madec, and Didier Calavas. 2010. Distribution and Antimicrobial Resistance of Clinical and Subclinical Mastitis Pathogens in Dairy Cows in Rhône-Alpes, France. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(5): 479-487.
29. Boynukara B, Gulhan T, Alisarli M, Gurturk K, Solmaz H. 2008. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. *Int J Food Microbiol*. 2008 Jul 15;125(2):209-11. Epub 2008 Apr 1.
30. Broekema M. Nicole, Tam T. Van, Timothy A. Monson, Steven A. Marshall, and David M. Warshauer 2009. Comparison of Cefoxitin and Oxacillin Disk Diffusion Methods for Detection of *mecA*-Mediated Resistance in *Staphylococcus aureus* in a Large-Scale Study. *J Clin Microbiol*. 2009 January; 47(1): 217–219.
31. Calvinho LF, Canavesio VR, Iguzquiza IA, Marioni I, Puricelli FG, Neder VE, Tarabla HD, Aubagna MD. 2007. Intramammary infections during the periparturient period in Argentine dairy heifers. *Rev Argent Microbiol*. 39(2):84-9.
32. Calvinho LF, Toselli FG, Weimann WR, Canavesio VR, Neder VE, Iguzquiza IA. 2002. Antimicrobial sensitivity of coagulase-positive staphylococcal strains isolated from bovine mastitis in the central dairy catchment area of Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2002.; Jul-Sep;34(3):171-5.
33. Capurro A, Concha C, Nilsson L, Ostensson K. 1999. Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Acta Vet Scand*. 1999;40(4):315-21.
34. Capurro Aldo 2009. Diagnostic and epidemiological studies of staphylococci in bovine mastitis. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Department of Clinical Sciences, Uppsala and National Veterinary Institute, Department of Bacteriology, Uppsala. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala 2009.
35. Cenci-Goga BT, Karama M, Rossitto PV, Morgante RA, Cullor JS. 2003. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *J Food Prot*. 2003 Sep;66(9):1693-6.
36. CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. January 2006. Vol.26, No.3.
37. Coelho Shana MO, Elina Reinoso, Ingrid A. Pereira, Lidiane C. Soares, Mirta Demo, Cristina Bogni, Miliane MS. Souza. 2009. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Pesq. Vet. Bras. vol. 29 no. 5: 369-374.
38. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance).

39. Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA Journal* (2007) 130; 270-272.
40. Community Summary Report. Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal* 2010.; 8(1):1496.
41. Correa I, Correa MGP, Marin JM. 2005. Antimicrobial susceptibility of strains of coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from mastitic bovine milk. *ARS Vet.*, v.21, p.69-76.
42. Corti S., Sicher D., Regli W., Stephan R. 2003. Current data on antibiotic resistance of the most important bovine mastitis pathogens in Switzerland *Schweiz Arch Tierheilkd.*, 145: 571-575.
43. Da Costa Geraldo Márcio, Luciano Vilela Paiva, Roberta Hilsdorf Piccoli, Demétrio Junqueira Figueiredo, Ulisses de Pádua Pereira, Nivaldo da Silva. 2010. Evaluation of a simplified key for the identification of coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis *Acta Scientiarum : Biological Sciences* ISSN 1679-9283 Volume: 32; Issue: 4; Start page: 403.
44. Da Rong Cheng, Shan Yuan Zhu, Zhao Hua Yin, Wen Wei Ding, Zhi Xia Mu, Zhi Rui Si and Huai Chang Sun 2010. Prevalence of bacterial infection responsible for bovine mastitis. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 4 (11) pp. 1110-1116.
45. Da Silva, N. Cardoso, H.F.T. 2000. The production of hemolysin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Veterinária Notícias* Vol. 6 No. 2 pp. 63-67 .
46. Delbes C, Alomar J, Chougui N, Martin JF, Montel MC. 2006. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows' raw milk. *J Food Prot.* 2006 Sep;69(9):2161-7.
47. De Oliveira AP, J. L. Watts, S. A. Salmon and F. M. Aarestru 2000. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Europe and the United States. *J. Dairy Sci* 83:855–862.
48. Dinges, MM; Orwin, PM and Schlievert, PM 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13: 16-34.
49. Dohoo IR. 2011. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample *Journal of Dairy Science* Volume 94, Issue 1, Pages 250-261
50. Dufour S, Dohoo IR, Barkema HW, Descôteaux L, Devries TJ, Reyher KK, Roy JP, Scholl DT. 2012. Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. *J Dairy Sci.* Mar; 95(3):1283-300.
51. Dura R Stephan , Dura U, Untermann F. 1999. Resistance situation and enterotoxin production capacity of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis milk samples. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 141(6):287-90.
52. Ebrahimi A and Akhavan Taheri M. 2009. Characteristics of staphylococci isolated from clinical and subclinical mastitis cows in Shahrekord, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University, Vol. 10, No. 3, Ser. No. 28, 27 3*

53. El-Jakee J, Ata S. Nagwa, Gad El-Said, W.A., Bakry, M.A., Samy, A.A., Khairy E.A., Elgabry, E.A. 2010. Diversity of *Staphylococcus aureus* Isolated from Human and Bovine Estimated by PCR - Gene Analysis. Journal of American Science 2010;6(11), 487/498
54. El-Jakee JK, Nagwa S. Atta, A.A. Samy, M.A. Bakry, E.A. Elgabry, 2 Mai M. Kandil and W.A. Gad El-Said. 2011. Antimicrobial Resistance in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* from Bovine and Human Sources in Egypt. Global Veterinaria 7 (6): 581-586, 2011
55. Erskine RJ, Walker RD, Bolin CA, Bartlett PC, White DG. 2002. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. J Dairy Sci. May;85(5):1111-8.
56. Erskine Ron, Jim Cullor, Mel Schaellibaum, Bob Yancey and Alfonso Zec 2004. National Mastitis Council Research Committee Report Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. Subcommittee of the NMC Research Committee. NMC Annual Meeting Proceedings (2004), pg. 400-414 *S. aureus*. African Journal of Microbiology Research Vol. 3(12) pp. 925-929
57. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General Directorate C - Scientific Opinions. C2 - Management of scientific committees; scientific co-operation and networks. Opinion of the committee on veterinary measures relating to public health on staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheese (adopted on 26-27 March 2003).
58. European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. European Food Safety Authority<sup>2</sup>, 3 European Centre for Disease Prevention and Control<sup>2,3</sup> EFSA Journal 2012;10(3):2598. Issued on 21 February 2012 Published on 14 March 2012.
59. European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009 European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC EFSA Journal 2011;9(3):2090, Issued on 23 February 2011., Published on 22 March 2011.
60. EFSA. Foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. The EFSA Journal (2008.) 765, 2-87.
61. EFSA. Joint scientific report of ECDC, EFSA and EMEA on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in livestock, companion animals and foods. EFSA-Q-2009-00612 (EFSA Scientific Report (2009) 301, 1-10) and EMEA/CVMP/SAGAM/62464/2009.
62. Fagundes Helena; Luciana Barchesi; Antonio Nader Filho; Luciano Menezes Ferreira; Carlos Augusto Fernandes Oliveira. 2010. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil. Braz. J. Microbiol. vol.41 no.2
63. Farzana Kalsoom, Syed Nisar Hussain Shah and Farzana Jabeen. Antibiotic resistance pattern against various isolates of *Staphylococcus aureus* from raw milk samples. 2004; Journal of Research (Science), Vol.15, No.2, June 2004, pp. 145-151 ISSN 1021-1012.
64. Febler Andrea T, Carmen Billerbeck, Kristina Kadlec and Stefan Schwarz. 2010. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative

- staphylococci from bovine mastitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* Volume 65, Issue 8 Pp. 1576-1582.
65. Ferguson JD, Azzaro G, Gambina M, Licitra G. 2007. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000. to 2006. *J Dairy Sci.* 90(12):5798-813.
  66. Ferreiro L, and E. L. Biberstein. 2008. Comparison between diffusion and dilution methods for testing antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* cultures derived from bovine mastitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2008. Vol. 1 Issue 4, Pages 273 - 278.
  67. Franco G., Julio C.; González V., Libertad; Gómez M., Sandra C.; Carrillo G., Juan M.; Ramírez C., José J. 2008. Virulence factors analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in México *e-Gnosis*, Vol. 6, sin mes, 2008, pp. 1-9ajara, MéxicorcMa.
  68. Fueyo JM, M. C. Mendoza, M. R. Rodicio, J. Muñiz, M. A. Alvarez, and M. C. Martín. 2005. Cytotoxin and Pyrogenic Toxin Superantigen Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* Associated with Subclinical Mastitis in Dairy Cows and Relationships with Macrorestriction Genomic Profiles. *J Clin Microbiol.* 2005 March; 43(3): 1278–1284.
  69. Gandra Ávila Eliezer, Jorge Adolfo Silva, Márcia Raquel Pegoraro de Macedo, Márcia Ribeiro de Araújo, Márcia Magalhães Mata, Wladimir Padilha da Silva. 2005. Differentiation between *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* using phenotypical tests and PCR. *Alim. Nutr., Araraquara* v. 16, n. 2, p. 99-103.
  70. Garcia Maria Luisa, Benito Moreno and Merlin S. Bergdoll. 1980. Characterization of Staphylococci Isolated from Mastitic Cows in Spain. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 39, No. 3, Mar. 1980, p. 548-553.
  71. Giannechini RE, C. Concha and A. Franklin. 2002. Antimicrobial Susceptibility of Udder Pathogens Isolated from Dairy Herds in the West Littoral Region of Uruguay. *Acta vet. scand.* vol. 43 no. 1, 2002.
  72. Gentilini E, G. Denamiel, P. Llorente, S. Godaly, M. Rebuelto, and O. De Gregorio 2000. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. *J Dairy Sci* 83:1224–1227.
  73. Getahun K, Kelay B, Bekana M, Lobago F. 2008. Bovine mastitis and antibiotic resistance patterns in Selalle smallholder dairy farms, central Ethiopia. *Trop Anim Health Prod.*40(4):261-8.
  74. Giannechini R., Concha C., Rivero R., Delucci I., Moreno López J. 2002a. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Vet Scand.*43(4):221-30.
  75. Giannechini RE, Concha C, Franklin A. 2002b. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy herds in the west littoral region of Uruguay. *Acta Vet Scand.* 43(1):31-41.
  76. Georgopapadakou NH. 1993. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to  $\beta$ -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:2045-2053.
  77. George Y. Liu, Anthony Essex, John T. Buchanan, Vivekanand Datta, Hal M. Hoffman, John F. Bastian, Joshua Fierer and Victor Nizet. 2005. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *JEM* vol. 202 No. 2, 209-215.

78. Götz Friederich, Tammy Bannerman and Karl-Heinz Schleifer. 2006. Prokaryotes (2006.) Chapter 1.2.1 The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus* 4:5–75.
79. Grinberg A, Lopez-Villalobos N, Lawrence K, Nulsen M. 2005. Prediction of penicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows with mastitis, based on prior test results. *N Z Vet J.*; 53(5):332-5.
80. Güler L., Ü. Ok, K. Gündüz, Y. Gülcü, H.H. Hadimli. 2005. Antimicrobial Susceptibility and Coagulase Gene Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Clinical Mastitis Cases in Turkey. *Journal of Dairy Science* Volume 88, Issue 9, Pg 3149-3154.
81. Gündüz Kaya Esma, Esra Karakoç, Serap Yaci and Mihriban Yücel 2009. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus*. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 3(12) pp. 925-929 December, 2009
82. Haenni M, Galofaro L, Ponsin C, Bes M, Laurent F, Madec JY. 2011. Staphylococcal bovine mastitis in France: enterotoxins, resistance and the human Geraldine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011. Volume 66, Issue 1 Pp. 216-218.
83. Hansen I, Reinecke A, Heuwieser W. 2009. Prevalence of pathogens in milk samples of dairy cows with clinical mastitis and in heifers at first parturition. *J Dairy Res.* 76(2):179-87.
84. Haran KP, S. M. Godden, D. Boxrud, S. Jawahir, J. B. Bender and S. Sreevatsan 2012. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Isolated from Bulk Tank Milk from Minnesota Dairy Farms. *J. Clin. Microbiol.* March 2012 vol. 50 no. 3 688-695.
85. Hata E, Katsuda K, Kobayashi H, Ogawa T, Endô T, Eguchi M. 2006. Characteristics and epidemiologic genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitic milk in Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci.* 68(2):165-70.
86. Haveri Maarit. 2008. *Staphylococcus aureus* in bovine intramammary infection: molecular, clinical and epidemiological characteristics. Academic Dissertation. Department of Production Animal Medicine Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki, Finland
87. Hendriksen RS, Mevius DJ, Schroeter A, Teale C, Meunier D, Butaye P, Franco A, Utinane A, Amado A, Moreno M, Greko C, Strk K, Berghold C, Myllyniemi AL, Wasyl D, Sunde M, Aarestrup FM. 2008. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. *Acta Vet Scand.* 8;50:28.
88. Holmes MA, Zadoks RN. 2011. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 16(4):373-82.
89. Huber H, Koller S, Giezendanner N, Stephan R, Zweifel C. 2009. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. *Euro Surveill.* 2010;15(16):pii=19542.
90. Hwang Sun Young, Young Kyung Park, Hye Cheong Koo, Yong Ho Park. 2010. *spa* typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea. *J Vet Sci.* 1(2): 125–131.

91. Ikawaty R., E.C. Brouwer, E. Van Duijkeren, D. Mevius, J. Verhoef and A.C. Fluit, 2010. Virulence Factors of Genotyped Bovine Mastitis *Staphylococcus aureus* Isolates in The Netherlands. *International Journal of Dairy Science*, 5: 60-70.
92. Isrina Siti, Oktavia Salasia, Zaini Khusnan, Christoph Lämmler, Michael Zschöck. 2004. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *J. Vet. Sci.* (2004),5(2), 103–109.
93. Joffe Rafaels, Edgars Baranovičs. 2006. Bovine mastitis as the primary conatmination source of milk and milk produsts with *S. aureus* enterotoxins. *Veterinaria Ir Zootechnika T. 36* (58). ISSN 1392-2130.
94. Jorgensen HJ, Mork T, Hogasen HR, Rorvik LM. 2005a. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *J Appl Microbiol.* 99(1):158-66.
95. Jørgensen HJ, T. Mørk, D. A. Caugant, A. Kearns, and L. M. Rørvik. 2005b. Genetic Variation among *Staphylococcus aureus* Strains from Norwegian Bulk Milk. *Appl Environ Microbiol.* December; 71(12): 8352–8361.
96. Juhász-Kaszanyitzky Éva, Szilárd Jánosi, Pál Somogyi, Ádám Dán, Linda vanderGraaf van Bloois, Engeline van Duijkeren, and Jaap A. Wagenaar. 2007. Mrsa transmission between cows and humans. *Emerg infect dis.* april; 13(4): 630-632.
97. Kalmus Piret, Birgit Aasmäe, Age Kärssin, Toomas Orro and Kalle Kask. 2011. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia, *Acta Veterinaria Scandinavica* 2011, 53:4 doi:10.1186/1751-0147-53-4.
98. Katsuhiko Omoe, Machiko Ishikawa, Yu Shimoda, Dong-Liang Hu, Shigeo Ueda, and Kunihiro Shinagawa. 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* Isolates and Determination of the Enterotoxin Productivities of *S. aureus* Isolates Harboring *seg*, *seh*, or *sei* Genes. *J Clin Microbiol.* 40(3): 857–862.
99. Katzif Samuel, Eun-Hee Lee, Anthony B. Law, Yih-Ling Tzeng, and William M. Shafer. 2005. CspA Regulates Pigment Production in *Staphylococcus aureus* through a SigB-Dependent Mechanism. *J Bacteriol.* 187(23): 8181–8184.
100. Kenny Kevin, Raoul F. Reiser, Felix D. Bastida-Corcuera, Neil L. 1993. Norcross. Production of Enterotoxins and Toxic Shock Syndrome Toxin by Bovine Mammary Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal Of Clinical Microbiology*, Mar. 1993, p. 706-707 Vol. 31, No. 3.
101. Kirkan Sukru, Ergun. O.Goksoy, Osman Kaya 2005. Identification and antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and Coagulase Negative *Staphylococci* from Bovine Mastitis in the Aydýn Region of Turkey. *J Vet Anim Sci* 29 791-796 .
102. Klement E, Chaffer M, Leitner G, Shwimmer A, Friedman S, Saran A, Shpigel N. 2005. Assessment of accuracy of disk diffusion tests for the determination of antimicrobial susceptibility of common bovine mastitis pathogens: a novel approach. *Aciii Microb Drug Resist.* 2005.; Winter;11(4):342-50
103. Klimienė Irena, Modestas Ružauskas, Vytautas Špakauskas, Raimundas Mockeliūnas, Asta Pereckienė, Česlova Butrimaitė-Ambrozevičienė. 2011. Prevalence of Gram positive bacteria in cow mastitis and their susceptibility to

- beta-lactam antibiotics. *VETERINARIJA IR ZOOTECHNIKA (Vet Med Zoot)*. T. 56 (78). 65-72.
104. Kuroishi, T., K. Komine, K. Kai, M. Itagaki, J. Kobayashi, M. Ohta, S. Kamata, and K. Kumagai. 2003. Concentrations and specific antibodies to staphylococcal enterotoxin-C and toxic shock syndrome toxin-1 in bovine mammary gland secretions, and inflammatory response to the intramammary inoculation of these toxins. *J. Vet. Med. Sci.* 65:899-906.
  105. Lamprell H, L. Villard, J.-F. Chamba, E. Beuvier, E. Borges, F. Maurin, G. Mazerolles, Y. Noel and A. Kodjo. 2004. Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened Frenchraw milk cheeses and their *in vitro* ability to produce enterotoxins. *Revue Méd. Vét.*, 155, 2, 92-96.
  106. Lan Lefu, Alice Cheng, Paul M. Dunman, Dominique Missiakas and Chuan He1. 2010. Golden Pigment Production and Virulence Gene Expression Are Affected by Metabolisms in *Staphylococcus aureus*. *J. of Bacteriol.* vol. 192 no. 12 3068-3077.
  107. Langlos E. Bruce, Robert J. Harmon and Katherine Akers. 1983. Identification of Staphylococcus Species of Bovine Origin with the API Staph-Ident System. *Journal of clinical microbiology*. Nov. 1983, Vol. 18, No. 5. p. 1212-1219
  108. Larsen HD, Aarestrup FM, Jensen NE. 2002. Geographical variation in the presence of genes encoding super antigenic exotoxins and  $\beta$ - hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Veterinary Microbiology*, Volume 85, Issue 1, Pages 61–67.
  109. Lee John Hwa. 2003. Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans. *Appl Environ Microbiol.* 2003 November; 69(11): 6489–6494.
  110. Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, Fierer J, Nizet V. J. 2005. Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J. Exp. Med.* 202 (2): 209–15.
  111. Liu CI, George Y. Liu, Yongcheng Song, Fenglin Yin, Mary E. Hensler, W.Y.Jeng1, Victor Nizet, A.H.-J.Wang, Eric Oldfield. 2008. A Cholesterol Biosynthesis Inhibitor Blocks Staphylococcus Aureus Virulence. *Science* 319 (2008): 1391-1394.
  112. Lee SU, Quesnell M, Fox LK, Yoon JW, Park YH, Davis WC, Falk D, Deobald CF, Bohach GA. 1998. Characterization of staphylococcal bovine mastitis isolates using the polymerase chain reaction. *J Food Prot.* 61(10):1384-6.
  113. Li Jian-ping, Hai-jian Zhou, Lin Yuan, Ting He and Song-hua Hu. 2009. Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang Province, China. *J Zhejiang Univ Sci B.* October; 10(10): 753–760
  114. Malinowski Edward, Anna Klossowska, Michal Kaczmarowski, Henryka Lasaa and Krystyna Kuzma. 2002. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from affected with mastitis cow. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 46, 289-294
  115. Malinowski E, Lassa H, Kłossowska A, Smulski S, Markiewicz H, Kaczmarowski M. 2006. Etiological agents of dairy cows' mastitis in western part of Poland. *Pol J Vet Sci.*9(3):191-4.

116. Martin J. McGavin. 2006. Bacterial genomes and infectious diseases in Genome comparisons of diverse *Staphylococcus aureus* strains. 2006. edited by Voon L. Chan, Philip M. Sherman, Billy Bourke., Humana Press Inc. pg 191-213.
117. Matsunaga T, Kamata S, Kakiichi N, Uchida K. 1993. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *J Vet Med Sci* 1993 Apr;55(2):297-300.
118. Matsunaga T, Yoshida T, Kamata S, Uchida K. 1990. Identification of staphylococci from bovine mastitis and an examination of their susceptibility to antibiotics and beta-lactamase production. *Nihon Juigaku Zasshi*. Dec;52(6):1219-27.
119. Mišić Dušan. 2012. Prisustvo meticilin-rezistentnih sojeva stafilokoka (MRS) kod životinja i u hrani i mogućnost njihovog prenošenja na ljude. Simpozijum Bezbednost i kvalitet namirnica animalnog porekla Beograd, 2012. Zbornik radova, str. 3-11
120. Moon JS, Lee AR, Jaw SH, Kang HM, Joo YS, Park YH, Kim MN, Koo HC. 2007a. Comparison of antibiogram, staphylococcal enterotoxin productivity, and coagulase genotypes among *Staphylococcus aureus* isolated from animal and vegetable sources in Korea. *J Food Prot*. 70(11):2541-8.
121. Moon JS, A. R. Lee, H. M. Kang, E. S. Lee, Y. S. Joo, Y. H. Park, M. N. Kim, and H. C. Koo. 2007b. Antibiogram and Coagulase Diversity in Staphylococcal Enterotoxin- Producing *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis. *J. Dairy Sci*. 90:1716–1724
122. Moon JS., A.-R. Lee, H.-M. Kang, E.-S. Lee, M.-N. Kim, Y. H. Paik, Y. H. Park, Y.-S. Joo and H. C. Koo. 2007. Phenotypic and Genetic Antibiogram of Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Korea. *J. Dairy Sci*. 2007. 90:1176-1185.
123. Morandi Stefano, Milena Brasca, Cristian Andrighetto, Angiolella Lombardi and Roberta Lodi. 2009. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains from Italian Dairy Products. *International Journal of Microbiology*. Volume 2009. Article ID 501362, 7 pages doi:10.1155/2009/501362.
124. Morikawa Kazuya, Atsushi Maruyama, Yumiko Inose, Masato Higashide, Hideo Hayashi, Toshiko Ohta. 2001. Overexpression of Sigma Factor,  $\zeta^B$ , Urges *Staphylococcus aureus* to Thicken the Cell Wall and to Resist  $\beta$ -Lactams. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Volume 288, Issue 2, Pages 385–389.
125. Moroni P, Pisoni G, Antonini M, Villa R, Boettcher P, Carli S. 2006. Short communication: antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. *J Dairy Sci.*; 89(8):2973-6.
126. Mubarak Muhamed H., A. Doss and M.Vijayasanthi. 2012. Study on prevalence of bovine mastitis on dairy cows in and around Coimbatore district, Tamilnadu, South India. *Indian Journal of Drugs and Diseases*. Vol.1 No.2 (May 2012), 35-39.
127. Myllys V, K. Asplund, E. Brofeldt, V. Hirvela-Koski, T. Honkanen-Buzalski, J. Junttila, L. Kulkas, O. Myllykangas, M. Niskanen, H. Saloniemi, M. Sandholm, and T. Saranpää. 1998. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995-Changes in prevalence and antimicrobial resistance. *Acta Vet. Scand*. 39:119–126.



128. Nam HM, Lee AL, Jung SC, Kim MN, Jang GC, Wee SH, Lim SK. 2011. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. *Foodborne Pathog Dis.* 2011 Feb;8(2):231-8.
129. National mastitis council research committee report bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. 2004. NMC Annual Meeting Proceedings, pg. 400-414.
130. Neder Veronica E., Vilma R. Canavesio, Luis F. Calvino 2011. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk from Argentine dairy farms. *Revista Argentina de Microbiología* 43: 104-106.
131. Nickerson SC. 2009. Control of heifer mastitis: antimicrobial treatment-an overview. *Vet Microbiol.* ; Feb 16;134(1-2):128-35
132. Nunes SF, R. Bexiga, L. M. Cavaco and C. L. Vilela. 2007. *Technical Note: Antimicrobial Susceptibility of Portuguese Isolates of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis in Subclinical Bovine Mastitis.* *J. Dairy Sci.* 90:3242-3246.
133. Ochoa-Zarzosa A, Loeza-Lara PD, Torres-Rodríguez F, Loeza-Angeles H, Mascot-Chiquito N, Sánchez-Baca S, López-Meza JE. 2008. Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie Van Leeuwenhoek.* Aug;94(2):199-206.
134. Oliver SP, B.E. Gillespie, S.J. Headrick, M.J. Lewis and H.H. Dowlen 2004. Heifer mastitis: prevalence, risk factor and control strategies. NMC Annual Meeting Proceedings pg 83-99
135. Ombui J N, A. M. Kimotho. and J. G. Nduhiu. 2000. Antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and meat. *East African Medical Journal* 2000; Vol. 77 No. 9
136. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly in cheeses. *EFSA Journal* 2010.; 8(4)
137. Owens, W. E., C. H. Ray, J. L. Watts and R. J. Yancey. 1997. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility test for bovine mastitis. *J Dairy Sci.* 80: 313-317.
138. Peles F, Wagner M, Varga L, Hein I, Rieck P, Gutser K, Kereszturi P, Kardos G, Turcsanyi I, Beri B, Szabo A. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *Int J Food Microbiol.* 15;118(2):186-93. Epub 2007 Jul 21.
139. Persson Y, Nyman AK, Grönlund-Andersson U. 2011. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet Scand.* 2011 Jun 8;53:36.
140. Petrovski KR, Williamson NB, Lopez-Villalobos N, Parkinson TJ, Tucker IG. 2011. Culture results from milk samples submitted to veterinary diagnostic laboratories from August 2003 to December 2006 in New Zealand. *N Z Vet J.* 2011 Nov;59(6):317-22.
141. Piccinini Renata, Riccardo Tassi, Valentina Daprà, Rachel Pilla, Jackie Fenner, Ben Carter and Muna F. Anjum. 2012. Study of *Staphylococcus aureus* collected at

- slaughter from dairy cows with chronic mastitis. *Journal of Dairy Research*, 79 : pp 249-255.
142. Pitkala A, Haveri M, Pyorala S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. 2004. *J Dairy Sci.* 87(8):2433-41.
  143. Rabello RF, Souza CR, Duarte RS, Lopes RM, Teixeira LM, Castro AC. 2005. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Dairy Sci.* 88(9):3211-9.
  144. Rahimi Ebrahim, Hassan Mommtaz, Amir Shakerian, Hamid Reza Kavyani. 2012. The detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* in raw cow milk using the ELISA method. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 36(3): 319-322.
  145. Rall VLM, F.P. Vieira, R. Rall, R.L. Vieitis, A. Fernandes Jr. 2008. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. Short communication. *Veterinary Microbiology* 132 408–413.
  146. Ramírez C., José J. 2008. Virulence factors analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in México. *e-Gnosis*, Vol. 6, sin mes, 2008, pp. 1-9.
  147. Reyher KK, Dohoo IR. 2011. Diagnosing intramammary infections: evaluation of composite milk samples to detect intramammary infections. *J Dairy Sci.* 94 (7):3387-96.
  148. Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay JM, Besser TE. 1996. Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. *Am J Vet Res.* 57(1):54-8 .
  149. Robertson JR, L.K. Fox, D.D.Hancock, C.C. Gay, T.E. Besser 1994. Coagulase-Positive *Staphylococcus* Intramammary Infection in Primiparous Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* Volume 77, Issue 4, Pages 958-969.
  150. Rosengren A, Fabricius A, Guss B, Sylvén S, Lindqvist R. 2010. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *Int J Food Microbiol.* 15;144(2):263-9.
  151. Roesch M, Perreten V, Doherr MG, Schaeren W, Schallibaum M, Blum JW. 2006. Comparison of antibiotic resistance of udder pathogens in dairy cows kept on organic and on conventional farms. *J Dairy Sci.* Mar;89(3):989-97.
  152. Russi NB, C. Bantar, L.F. Calvinho. 2008. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in Argentine dairy herds. *Revista Argentina de Microbiología* 40: 116-119.
  153. Sabini L, Torres C, Demo M, Sutil S, Lara L. 2001. Effect of *Staphylococcus* toxins isolated from dairy cow milk on Vero cell monolayers. *Rev Latinoam Microbiol.* 43(1):13-8.
  154. Saini V, McClure JT, Léger D, Keefe GP, Scholl DT, Morck DW, Barkema HW. 2012. Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci.* 95(8):4319-32.
  155. Sahebkhari N, Nochi Z, Eslampour MA, Dabiri H, Bolfion M, Taherikalani M, Khoramian B, Zali MR, Emaneini M. 2011. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in Tehran and Mashhad. *Acta Microbiol Immunol Hung.* Jun;58(2):113-21.

156. Saini V, McClure JT, Scholl DT, DeVries TJ, Barkema HW. 2012. Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis staphylococcus aureus isolates on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci* 2012, 95:1921–1929
157. Sato K, Bennedsgaard TW, Bartlett PC, Erskine RJ, Kaneene JB. 2004. Comparison of Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bulk Tank Milk in Organic and Conventional Dairy Herds in the Midwestern United States and Denmark, *Journal of Food Production*, Volume 67, Number 6, 1 June 2004 , pp. 1104-1110.
158. Savić-Rajić Nataša, Katić Vera 2009. Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz mlečne žlezde krava na odabrane antibakterijske lekove. *Veterinarski glasnik*, 2009, vol. 63, br. 5-6, str. 299-310
159. Schmidt T. 2011. In vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains from dairy herds in KwaZulu-Natal. *J S Afr Vet Assoc.* 2011 Jun;82(2):76-9.
160. Shana MO, Coelho, Elina Reinoso, Ingrid A. Pereira, Lidiane C. Soares, Mirta Demo, Cristina Bogni and Miliane M.S. Souza. 2009. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. Bras.* 29(5):369-374
161. Shi D, Hao Y, Zhang A, Wulan B, Fan X. 2010. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in China. *Transbound Emerg Dis.* 1;57(4):221-4. Epub 2010 Jun 15.
162. Shin Kim, Yu-M Oh, Sang-Yun Kim, Young-Ku Woo, Heon-IL Gwon. 2000. Study on antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk and several animals in Kyongbuk northern province and detection of MRSA from the isolates of *Staphylococcus aureus*. *Korean J Vet Seru* 23(2) -153-163
163. Shitandi A, Sternesjo A. 2004a. Prevalence of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in milk from large- and small-scale producers in Kenya. *J Dairy Sci.* 87(12):4145-9.
164. Shitandi Anakalo and Milcah Mwangi. 2004b. Occurrence of Multiple Antimicrobial Resistance among *Staphylococcus aureus* isolates from Kenyan Milk. *The Journal of Food Technology in Africa*, 2004; Vol. 9, No. 1, pp. 23-25.
165. Silva Padilha Wladimir; Maria Teresa Destro 2000. Biochemical characteristic of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. *Braz. J. Microbiol.* vol.31 n.2 São Paulo.
166. Singh RS, Ravinder Kumae, BR Yadao. 2011. Distribution of pathogenic in *Staphylococcus aureus* strains isolated from intra-mammary infections in cattle and buffaloes. *Indian Journal of Biotechnology*, Vol. 10. 410-416.
167. Schroder M, Kaufman RJ. 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 2005; 74:739–789. doi: 10.1146/annurev. biochem. 73.011303.074134.
168. Sobiraj, A., A. Kron, U. Schollmeyer and K. Failing, 1997. Fedral investigations on the distribution and in vitro resistance of udder pathogenic bacteria in the milk of cows with subclinical mastitis. *Tierarztl Prox.*, 25: 108-115.
169. Srinivasan V, Sawant AA, Gillespie BE, Headrick SJ, Ceasaris L, Oliver SP. 2006. Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus*

- aureus isolated from milk of cows with mastitis. *Foodborne Pathog Dis.* Fall;3(3):274-83.
170. Sudhakar P. Awandkar, Narendra V. Khode, Vikas M. Sardar and Mangesh S. Mendhe. 2009. Prevalence and Current Antibiogram Trend of Mastitic Agents in Udgir and its Visinity, Maharashtra State, India. *International Journal of Dairy Science* Vol. 4:3: 117-122
  171. Sumathi B.R, Veeregowda B.M and Amitha R. Gomes. 2008. Prevalence and antibiogram profile of bacterial Isolates from clinical bovine mastitis. *Veterinary World* Vol.1, No.8: 237-238
  172. Swenson Jana M, Fred C. Tenover and the Cefoxitin Disk Study Group 2005. Results of Disk Diffusion Testing with Cefoxitin Correlate with Presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, August 2005, p. 3818-3823, Vol. 43, No. 8.
  173. Takeshige K, Watanabe K, Igarashi H, Shingaki M, Terayama T. 1983. Detection of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and some characteristics with special reference to enterotoxin producibility and coagulase types of isolates. *Nihon Juigaku Zasshi*. 1983 Jun;45(3):355-62.
  174. Taponen S, Supré K, Piessens V, Van Coillie E, De Vlieghe S, Koort JM. 2012. *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. *Int J Syst Evol Microbiol*. 62(Pt 1):61-5. doi: 10.1099/ijss.0.028365-0. Epub 2011 Feb 18.
  175. Tariku Sori, Jemal Hussien and Molalegne Bitew 2011. Prevalence and Susceptibility Assay of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Dairy Farms of Jimma Town, South West Ethiopia. *Journal of Animal and Veterinary Advances* Vol.10, Issue: 6, Pg 745-749
  176. Tavakol Mehri, Richard GM Olde Riekerink, Otlis C Sampimon, Willem JB van Wamel, Alex van Belkum, and Theo JGM Lam. 2012. Bovine-associated MRSA ST398 in The Netherlands. *Acta Vet Scand.*; 54(1): 28.
  177. Tenhagen BA, Koster G, Wallmann J, Heuwieser W. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci*. 89(7):2542-51.
  178. Tenhagen BA, Hansen I, Reinecke A, Heuwieser W. 2009. Prevalence of pathogens in milk samples of dairy cows with clinical mastitis and in heifers at first parturition. *J Dairy Res*. 76(2):179-87.
  179. Turutoglu H., Mudul S., Pehlivanoglu F. 2002. Antibiotic susceptibility and  $\beta$ -actamase prevalence for staphylococci isolated from bovine mastitic milk samples. *Acta Vet (Beograd)* 2002, 52, 337-344.
  180. Turutoglu Hulya, Ercelik Senay and Ozturk Dilek 2006. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. *Bull Vet Inst Pulawy* 50, 41-45
  181. 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* Vol. 33 No. 8 pp. 945-956.

182. Turutoglu Hulya, Senay Ercelik and Dilek Ozturk 2007. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and Coagulase –negative Staphylococci isolated from bovine mastitis. *Bull Vet Inst Pulawy* 50, 41-45
183. Türkyilmaz S, Tekbiyik S, Oryasin E, Bozdogan B. 2010. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Zoonoses Public Health*. 57(3):197-203.
184. Unakal G. and Kaliwal BB. 2010. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Veterinary World*, Vol.3 No.2 , 65-67.
185. Vanderhaeghen W, K. Hermans, F. Haehebrouck, P. Butaye 2007. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in FoodProduction Animals.Belgian Federal Public Service of Public Health, Food Chain Safety and Environment project number RF-6189 MRSA and by the European Project PILGRIM, FP7-Health-2007-2.3.1-4, contract no. 223050.
186. 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. *Vet Microbiol*. 29;144(1-2):166-71
187. Wang fei, Yang hongjun, He hong-bin, Wang shangfa, Gao yundong, Zhong qifeng, Wang Xiaohong, Zeng Yanjun. 2011. Study on the hemolysin phenotype and the genotype ditribution of *Staphylococcus aureus* caused bovine mastitis in Shandong dairy farms.Intern. J Appli Res Vet Med Vol 9, No 4, 416-421 W. E. Owens, C. H. Ray, J. L.
188. Watts J, and R. J. Yancey 1997. Comparison of Success of Antibiotic Therapy During Lactation and Results of Antimicrobial Susceptibility Tests for Bovine Mastitis. *Journal of Dairy Science* vol 80; No. 2; 313-317
189. Watts L. Jeffrey and Sarah A. Salmon. 1997. Activity of Selected Antimicrobial Agents Against Strainsof *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Intramammary Infections that Produce  $\beta$ -Lactamase. 1997.; *Dairy Sci* 80:788–791
190. Watts L. Jeffrey, Kalamazoo. 2008. Antibiotic Therapy of Bovine Mastitis. 6th Italian Mastitis Council Meeting Ragusa, Italy, 7-9 February 2008.
191. Wileland Bernd, Corinna Feil, Eva Gloria-Maercker, Gunther Thumm, Max Lechner, Jean-Michel Bravo, Karl Poralla and Friedrich Gotz. 1994. Genetic and Biochemical Analyses of the Biosynthesis of the Yellow Carotenoid 4,4'-Diaponeurosporeneof *Staphylococcus aureus*. *J of Bacteriology*, pg. 7719-7726 Vol. 176, No. 24.
192. Yoshimura H, Ishimaru M, Kojima A. 2002. Minimum inhibitory concentrations of 20 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Japan. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 49(9):457-60.
193. Younis, G. Leitner, D. E. Heller, Z. Samra, R. Gadba, G. Lubashevsky, M. Chaffer, N. Yadlin, M. Winkler and A. Saran. 2000. Phenotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Israeli Dairy Herds. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, Volume 47 Issue 8, Pages 591 – 597.
194. Xiong Z. and F. A. Karpal. 1992. Carotenoid pigment levels in *Staphylococcus aureus* and sensitivity to oleic acid. *J. Med. Microbiol*. Vol. 37 (1992), 192-194.

195. Zhou P, HJ, Yuan L, He T, Hu SH. 2009. Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang Province, China. *J Zhejiang Univ Sci B.*, Oct;10(10):753-60.
196. Zschöck M, Kloppert B, Wolter W, Hamann HP, Lämmler Ch. 2005. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 1;108(3-4):243-9.

## **Биографија аутора**

Наташа Рајић Савић је рођена у Београду 24.02.1963. Завршила је Факултет Ветеринарске медицине у Београду 1996., смер Хигијена и технологија намирница анималног порекла. Тренутно запослена у "ЕКОЛАБ д.о.о. у реструктурирању" у Падинској Скели на пословима микробиолошког испитивања хране и хране за животиње. У дијагностичкој лабораторији ПКБ Корпорације јје провела шест година на пословима дијагностике маститса крава, што је и њена најужа област интересовања. Аутор је и коаутор већег броја стручних и научних радова из области хигијена млека и дијагностике маститиса. Удата је и има једно дете.

**Прилог 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани-а Наташа Рајић Савић  
број уписа \_\_\_\_\_

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом  
Фенотипске и генотипске карактеристике коагулаза позитивних стафилокока  
изолованих из вимена крва

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 04.10.2013.

\_\_\_\_\_



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора Наташа Рајић Савић

Број уписа \_\_\_\_\_

Студијски програм Докторске академске студије

Наслов рада Фенотипске и генотипске карактеристике коагулаза позитивних стафилокока изолованих из вимена крва

Ментор Проф. Др. Вера Катић

Потписани Наташа Рајић Савић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 04.10.2013.

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Фенотипске и генотипске карактеристике коагулаза позитивних стафилокока изолованих из вимена крава која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 04.10.2013.

---