



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ



ДЕПАРТМАН ЗА ВЕТЕРИНАРСКУ МЕДИЦИНУ

Марија Пајић, др вет.

ПАТОГЕНОСТ И ФИЛОГЕНЕТСКА СРОДНОСТ
СОЈЕВА *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
ИЗОЛОВАНИХ ИЗ МЛЕКА КРАВА
СА ПОРЕМЕЋЕНОМ СЕКРЕЦИЈОМ

докторска дисертација

Нови Сад, 2014.



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
ДЕПАРТМАН ЗА ВЕТЕРИНАРСКУ МЕДИЦИНУ

**ПАТОГЕНОСТ И ФИЛОГЕНЕТСКА СРОДНОСТ
СОЈЕВА *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
ИЗОЛОВАНИХ ИЗ МЛЕКА КРАВА
СА ПОРЕМЕЋЕНОМ СЕКРЕЦИЈОМ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментори:

Др Станко Бобош, редовни професор
Др Бранко Велебит, научни сарадник

Кандидат:

Марија Пајић, др вет.

Нови Сад, 2014. године

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број: РБР	
Идентификациони број: ИБР	
Тип документације: ТД	Монографска документација
Тип записа: ТЗ	Текстуални штампани материјал
Врста рада: ВР	Докторска дисертација
Име и презиме аутора: АУ	Марија Пајић, др вет.
Ментори: МН	Др Станко Бобош, редовни професор Др Бранко Велебит, научни сарадник
Наслов рада: НР	Патогеност и филогенетска сродност сојева <i>Staphylococcus aureus</i> изолованих из млека крава са поремећеном секрецијом
Језик публикације: ЈП	Српски (ћирилица)
Језик извода: ЈИ	Српски / енглески
Земља публикавања: ЗП	Република Србија
Уже географско подручје: УГП	Аутономна Покрајина Војводина
Година: ГО	2014.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МА	Нови Сад, Трг Доситеја Обрадовића 8.
Физички опис рада: ФО	8 поглавља / 142 странице / 25 слика / 25 табела / 2 шеме / 2 графикана / 88 референци / 88 прилога
Научна област: НО	Ветеринарска медицина
Научна дисциплина: НД	Болести животиња и хигијена анималних производа
Предметна одредница, кључне речи: ПО	Млеко, виме краве, поремећај секреције, маститис, <i>Staphylococcus aureus</i> , ентеротоксин, Пантон-Валентин леукоцидин, антимикуробна резистенција, филогенетска сродност
УДК	632.2:59.469(043.3)

<p>Чува се: ЧУ</p>	<p>У библиотеци Пољопривредног факултета, Универзитета у Новом Саду 21000 Нови Сад, Трг Доситеја Обрадовића 8.</p>
<p>Важна напомена: ВН</p>	<p>Нема</p>
<p>Извод: ИЗ</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i> је често присутан у вимену крава где може да узрокује појаву субклиничких и клиничких маститиса. Због способности синтезе термостабилних стафилококних ентеротоксина представља чест узрок тровања храном код људи. Многи аутори бавили су се испитивањем патогености сојева <i>Staphylococcus aureus</i> са аспекта здравља вимена, као и испитивањем патогености сојева пореклом из стадних узорака млека или из производа од млека, али постоји мало података о патогености сојева <i>Staphylococcus aureus</i> изолованих из узорака млека узетих из појединих четврти вимена крава, као и о њиховој филогенетској сродности са изолатима пореклом од људи. Из тог разлога, циљ истраживања у оквиру ове докторске дисертације, био је да се испита патогеност изолата <i>Staphylococcus aureus</i> пореклом из појединачних узорака млека и секрета вимена крава и изолата пореклом из брисева гуше људи, као и да се испита филогенетска сродност ових изолата.</p> <p>На 46 газдинстава у централној Србији, Калифорнија маститис тестом (СМТ) идентификоване су краве са поремећеном секрецијом. Са две велике фарме у Војводини узети су узорци секрета из четврти вимена крава са клиничким маститисом. У Институту за јавно здравље Војводине у Новом Саду узети су брисеви гуше људи. Из наведених узорака, 86 изолата потврђено је као <i>Staphylococcus aureus</i>, коришћењем стандардних микробиолошких метода за изолацију и идентификацију, као и API Staph теста и доказивањем присуства <i>nuc</i> гена методом ланчане реакције полимеразе (PCR). Из четврти вимена крава са субклиничким маститисом изоловано је 62 изолата, из четврти вимена крава са клиничким маститисом изоловано је 13 изолата, а из брисева гуше људи 11 изолата <i>Staphylococcus aureus</i>. За одређивање способности синтезе стафилококних ентеротоксина (SE) коришћен је VIDAS® SET2 тест на принципу ELFA (enzyme-linked fluorescent assay) методе. Присуство гена за синтезу појединих SE, присуство гена за синтезу Пантон-Валентин леукоцидина (PVL) и гена за резистенцију на метицилин доказано је PCR методом. Диск дифузионом методом по Кирби-Бауеру одређена је осетљивост изолата на антимикробне лекове и то на амоксицилин, амоксицилин/клавуланску киселину, ампицилин, бацитрацин, неомицин, новобиоцин, пеницилин Г, тетрациклин, триметоприм и триметоприм/сулфаметоксазол. Анализом нуклеотидних секвенци гена за синтезу стафилококног протеина А утврђена је филогенетска сродност изолата <i>Staphylococcus aureus</i> пореклом из млека крава са субклиничким и клиничким маститисом, као и изолата пореклом из брисева гуше људи.</p> <p>Од 111 узорака млека узетих из четврти са позитивним СМТ, <i>Staphylococcus aureus</i> изолован је из 62 узорка млека, што износи 55,86%. Од укупно 62 изолата <i>Staphylococcus aureus</i> пореклом из четврти вимена крава са поремећеном секрецијом, 5 (8,06%) синтетише стафилококне ентеротоксине и то само SECs, док 6 (54,54%) од 11 изолата <i>Staphylococcus aureus</i> пореклом од људи, синтетише стафилококне ентеротоксине и то и SECs и SEB. Присуство гена за синтезу Пантон-Валентин леукоцидина утврђено је код 5 (8,06%) од 62 изолата <i>Staphylococcus aureus</i> пореклом из четврти вимена крава са поремећеном секрецијом, као и код 7 (63,64%) од 11 изолата <i>Staphylococcus aureus</i> пореклом од људи. Изолати <i>Staphylococcus aureus</i> пореклом из вимена крава резистентни су на мањи број антимикробних лекова од изолата <i>Staphylococcus aureus</i> пореклом од људи на основу испитивања осетљивости на 10 антимикробних лекова. Свих 86 изолата <i>Staphylococcus aureus</i> сензитивни су на</p>	

новобиоцин и триметоприм-сулфаметоксазол, док је 77 изолата (89,54%) резистентно на бацитрацин, 24 (27,91%) на пеницилин Г, а 14 (16,28%) на ампицилин. Присуство гена за метицилинску резистенцију утврђено је код 2 (18,18%) од 11 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од људи и код 1 (1,33%) од 75 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из вимена крава. На основу испитивања филогенетске сродности нуклеотидних секвенци гена за синтезу стафилококног протеина А код 75 изолата пореклом из вимена крава и 11 изолата пореклом од људи, 2 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од људи могу се сматрати прецима свих осталих изолата у смислу броја мутација које су се догодиле у том времену. Подаци о нуклеотидним секвенцама изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од крава депоновани су у GenBank и додељени су им приступни бројеви од KJ023978 до KJ024046.

Резултати истраживања указују на различита патогена својства изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од крава са поремећеном секрецијом, због чега би њихово што раније откривање могло да има значајну улогу у очувању здравља вимена и у добијању квалитетног млека безбедног по здравље људи.

Неопходна су даља истраживања како би се у потпуности разјаснио утицај изолата *Staphylococcus aureus* из вимена крава на безбедност млека и производа од млека, као и на здравље људи.

Датум прихватања теме од стране НН већа: ДП	23. октобар 2013.
Датум одбране: ДО	12. јун 2014.
Чланови комисије: (име и презиме / титула / звање / назив организације / статус) КО	<p>Председник: _____ Др Вера Катић, редовни професор, Факултет ветеринарске медицине, Београд;</p> <p>Ментор: _____ Др Станко Бобош, редовни професор, Пољопривредни факултет, Нови Сад;</p> <p>Ментор: _____ Др Бранко Велебит, научни сарадник, Институт за хигијену и технологију меса, Београд;</p> <p>Члан: _____ Др Мира Михајловић-Укропина, ванредни професор, Медицински факултет Нови Сад;</p> <p>Члан: _____ Др Зоран Рашић, доцент, Ветеринарски специјалистички институт „Јагодина“, Јагодина.</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D. Thesis
Author: AU	Marija Pajić, DVM
Mentor: MN	Stanko Boboš, Ph.D. Full Professor Branko Velebit, Ph.D. Research Associate
Title: TI	Pathogenicity and phylogenetic relatedness of <i>Staphylococcus aureus</i> strains isolated from milk of cows with abnormal secretion
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2014
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Republic of Serbia, Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8.
Physical description: PD	8 chapters /142 pages / 25 tables / 25 figures / 2 schemes / 2 charts / 88 literature quotation / 88 annexes
Scientific field SF	Veterinary medicine
Scientific discipline SD	Animal diseases and hygiene of animal production
Subject, Key words SKW	Milk, cow's udder, abnormal secretion, mastitis, <i>Staphylococcus aureus</i> , enterotoxin, Pantone-Valentine leukocidin, antimicrobial resistance, phylogenetic relatedness
UDC	632.2:59.469(043.3)

Holding data: HD	Library of The Faculty of Agriculture, University of Novi Sad 21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, Republic of Serbia
Note: N	None
<p data-bbox="231 349 352 416"> Abstract: AB </p> <p data-bbox="231 421 1370 891"> <i>Staphylococcus aureus</i> is often present in cow's udder and may cause the occurrence of subclinical and clinical mastitis. Due to the ability to synthesize thermostable staphylococcal enterotoxins, it is a common cause of food poisoning in humans. Many authors have dealt with the examination of the pathogenicity of strains of <i>Staphylococcus aureus</i> in terms of udder health, as well as examining the pathogenicity of strains originating from bulk tank milk samples or dairy products, but there is a scarce amount of data on the pathogenicity of strains of <i>Staphylococcus aureus</i> originating from individual samples from udder quarters, as well as on their phylogenetic relatedness with isolates from humans. Therefore, the goal of the research within this dissertation was to investigate the pathogenicity of <i>Staphylococcus aureus</i> originating from individual samples of milk and udder secretions, as well as isolates from throat swabs of people and to examine the phylogenetic relatedness of these isolates. </p> <p data-bbox="231 896 1370 1733"> On 46 dairy farms in central Serbia, cows with abnormal secretion were identified using California mastitis test (CMT). From two large dairy farms in Vojvodina samples were taken from udder quarters with clinical mastitis. Human throat swabs were collected at the Institute of Public Health of Vojvodina in Novi Sad. From these samples, a total of 86 strains of <i>Staphylococcus aureus</i> were isolated and confirmed by standard microbiological methods for isolation and identification, as well as API Staph test and by detection of <i>nuc</i> gene using the Polymerase Chain Reaction (PCR). 62 isolates of <i>Staphylococcus aureus</i> were isolated from udder quarters suffering subclinical mastitis, 13 isolates were isolated from udder quarters suffering clinical mastitis, and 11 isolates of <i>Staphylococcus aureus</i> were isolated from human throat swabs. VIDAS® SET2 was used for determining the ability of the synthesis of staphylococcal enterotoxins (SE) by the ELFA (enzyme-linked fluorescent assay) method and PCR method for the presence of respective SE genes. PCR method was used for determining the presence of gene for the synthesis of the Pantone Valentine leukocidin (PVL), and the gene responsible for methicillin resistance in strains of <i>Staphylococcus aureus</i>. Susceptibility to antimicrobial drugs was determined by disk diffusion method by Kirby - Bauer to amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, bacitracin, neomycin, novobiocin, penicillin G, tetracycline, trimethoprim and trimethoprim/sulfamethoxazole. Phylogenetic relatedness was determined by analyzing the nucleotide sequences of the genes for the synthesis of staphylococcal protein A between isolates of <i>Staphylococcus aureus</i> originating from cow's udder quarters suffering subclinical and clinical mastitis, as well as isolates of <i>Staphylococcus aureus</i> originating from human throat swabs. </p> <p data-bbox="231 1738 1370 2063"> Out of 111 milk samples from CMT positive udder quarters, <i>Staphylococcus aureus</i> was isolated from 62 samples, which amounts to 55.86%. Out of 62 isolates of <i>Staphylococcus aureus</i> originating from udder quarters with abnormal secretion, 5 (8.06%) synthesized by staphylococcal enterotoxin and only it was SECs, while 6 (54.54%) out of 11 isolates of <i>Staphylococcus aureus</i> originating from humans, synthesize staphylococcal enterotoxin and they were SECs and SEB. The presence of a gene for the synthesis of the Pantone - Valentine leukocidin was determined in 5 (8.06%) out of 62 <i>Staphylococcus aureus</i> strains originating from the udder quarters with abnormal secretion, and in 7 (63.64%) out of 11 strains of <i>Staphylococcus aureus</i> </p>	

origin of humans. Isolates of *Staphylococcus aureus* originating from cow's udder were resistant to fewer antimicrobials than isolates of *Staphylococcus aureus* originating from humans on the basis of susceptibility to 10 antimicrobials. All 86 strains of *Staphylococcus aureus* were sensitive to novobiocin and trimethoprim/sulfamethoxazole, 77 strains (89.54%) were resistant to bacitracin, 24 (27.91%) to penicillin G, and 14 (16.28%) to ampicillin. The presence of the gene for methicillin resistance was found in 2 (18.18%) out of 11 isolates of *Staphylococcus aureus* originating from humans and in 1 (1.33%) out of 75 isolates of *Staphylococcus aureus* originating from the cow's udder. Analyzing the phylogenetic relatedness based on nucleotide sequences of the genes for the synthesis of staphylococcal protein A from 75 isolates from cow's udder, and 11 isolates from humans, 2 isolates of *Staphylococcus aureus* originating from humans can be considered to be the ancestors of all the other isolates in terms of gene mutation ratio give at respective period. Data on the nucleotide sequences of isolates of *Staphylococcus aureus* originating from cows were deposited in GenBank and assigned the accession numbers of KJ023978 to KJ024046.

Results of study on diverse pathogenic properties of *Staphylococcus aureus* originating from cows with abnormal secretion, indicate the importance of their early detection that could have a significant role in maintaining the cow's udder health and in obtaining quality and safe milk.

Further research is necessary in order to fully clarify the impact of *Staphylococcus aureus* from the cow's udder to the safety of milk and dairy products, as well as human health.

Accepted on Scientific Board on: AS	23 October 2013
Defended: DE	12 June 2014
Thesis Defence Board: DB	<p>President: _____ Vera Katić, Ph.D. Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade;</p> <p>Mentor: _____ Stanko Boboš, Ph.D. Full Professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad;</p> <p>Mentor: _____ Branko Velebit, Ph.D. Research Associate, Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade;</p> <p>Member: _____ Mira Mihajlović-Ukropina, Ph.D. Associate Professor, Faculty of Medicine, Novi Sad;</p> <p>Member: _____ Zoran Rašić, Ph.D. Assistant Professor, Institute of Veterinary Medicine "Jagodina", Jagodina.</p>

ЗАХВАЛНОСТ

Желим да се захвалим **менторима и члановима комисије** на указаном поверењу, добронамерности, несебичној помоћи и корисним саветима током израде докторске дисертације:

Мом професору и ментору, **др Станку Бобошу**, редовном професору, који је неуморно и свесрдно пратио мој рад од самог почетка, препознао моје идеје и помагао у њиховом остварењу, хвала на разумевању, стрпљивости, вољи и жељи да ми помогне и упути ме у правом смеру током низа година заједничког рада као и током израде докторске дисертације;

Мом ментору, **др Бранку Велебиту**, научном сараднику, на чијем Одељењу за микробиолошка и имуноензимска испитивања сам стекла многа нова знања и непроцењиво искуство, хвала на отворености и ентузијазму и зато што је много допринео ширини истраживања;

Мојој професорици, **др Вери Катић**, редовном професору, чији савети су усмерили мој рад и која ми је помогла да донесем праве одлуке у многим дилемама током истраживања;

Др Мири Михајловић-Укропини, ванредном професору, која ми је омогућила да проширим своје истраживачке хоризонте у областима хумане медицине које сам дотакла;

Др Зорану Рашићу, вишем научном сараднику, који је био уз мене током читавог рада на дисертацији и својим позитивним ставом, харизмом и приступачношћу, учинио да рад на дисертацији буде позитивно искуство.

Услови за лабораторијска испитивања за потребе ове дисертације обезбеђени су у **Ветеринарском специјалистичком институту „Јагодина“** у Јагодини, **Институту за хигијену и технологију меса** у Београду, **Научном институту за ветеринарство „Нови Сад“** и **Институту за јавно здравље Војводине** у Новом Саду. Посебну захвалност дугујем запосленима у лабораторијама на великој помоћи приликом обраде узорака као и на корисним сугестијама.

За велики део фотографија у дисертацији хвала **Душану Симоновићу, др вет.**, сараднику у Сектору за лабораторијска испитивања Ветеринарског специјалистичког института „Јагодина“.

За коначни изглед дисертације, нарочито за дизајн корица и слику ћелијског зида, хвала **Мр Бојану Новаковићу**, вишем стручном сараднику на Академји уметности у Новом Саду.

Свима са Департмана за ветеринарску медицину Пољопривредног факултета у Новом Саду, који су ми помагали и подржавали ме, искрено се захваљујем.

Породици и пријатељима хвала за подршку коју си ми пружали кроз живот и за веру коју имају у мене.

Мојим најдражима, **Мерими, Константину и Браниславу** хвала за безрезервну љубав, поверење и константну подршку, јер су у великој мери допринели да успешно окончам рад на дисертацији.

На крају, осећам потребу да се захвалим свима које овде нисам поменула, а који су на посредан или непосредан начин допринели развоју и коначној форми моје дисертације.

Марија

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	4
2.1. Патогеност, вируленција и фактори вируленције	4
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.2.1. Историјат	4
2.2.2. Таксономија	5
2.2.3. Особине	5
2.2.3.1. Микроскопски препарат	6
2.2.3.2. Културелне особине	6
2.2.3.3. Биохемијске особине	7
2.2.4. Патогеност сојева <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.2.4.1. Ентеротоксини	9
2.2.4.2. Хемолизини	12
2.2.4.3. Пантон-Валентин леукоцидин	15
2.2.4.4. Резистенција на антимикробне лекове	15
2.2.4.4.1. Антимикробни лекови и њихово деловање	16
2.2.4.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i> резистентан на метицилин	17
2.3. Поремећај секреције	17
2.3.1. Стафилококни маститиси	19
2.4. Пустулозни дерматитис	22
2.5. Примењени тестови и методе	22
2.5.1. Калифорнија маститис тест	22
2.5.2. Крвни агар	22
2.5.3. Метода по Берд-Паркеру	24
2.5.4. API Staph тест	25
2.5.5. ELFA метода	25
2.5.6. Ланчана реакција полимеразе (PCR)	26
2.5.6.1. Историја настанка методе	26
2.5.6.2. Принцип методе	26
2.5.6.3. Развој квантитативне PCR методе	31
2.5.6.4. Real Time PCR	32
2.6. Филогенетска сродност изолата <i>Staphylococcus aureus</i>	40
2.6.1. Деновање података о нуклеотидним секвенцама ДНК	40
3. ЦИЉЕВИ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА	42
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	44
4.1. Формирање група изолата <i>Staphylococcus aureus</i>	44
4.2. Калифорнија маститис тест	44
4.2.1. Поступак рада	45
4.2.2. Бележење резултата	45
4.3. Узимање узорака за бактериолошки преглед	45
4.4. Изолација и идентификација изолата <i>Staphylococcus aureus</i>	47
4.4.1. Засејавање на крвни агар	47
4.4.1.1. Припремање подлоге	47
4.4.1.2. Поступак рада и читавање резултата	48
4.4.2. Микроскопски препарат	48
4.4.2.1. Бојење по Граму	48
4.4.3. Засејавање на агар по Берд-Паркеру	49
4.4.3.1. Припремање подлоге са агаром по Берд-Паркеру	49
4.4.3.2. Поступак рада	50
4.4.3.3. Очитавање резултата	50
4.4.4. Коагулаза тест са плазмом кунџа	51

4.5. Одређивање присуства гена за синтезу нуклеазе	51
4.6. Испитивање биохемијских особина API Staph – bioMérieux	52
4.7. Начин чувања изолата између анализа	53
4.7.1. Коси агар	53
4.7.2. Дубоко замрзавање	53
4.8. Испитивање способности синтезе стафилококних ентеротоксина ELFA методом ..	54
4.8.1. Опрема, реагенси и подлоге	55
4.8.2. Припрема за испитивање и поступак рада	56
4.8.3. Приказивање резултата	56
4.9. Осетљивост на антимикуробне лекове	56
4.9.1. Диск-дифузиона метода по Кирби-Бауеру	56
4.9.2. Slidex MRSA тест „bioMérieux“	57
4.10. Молекуларно-биолошка испитивања	58
4.10.1. Подлоге и реагенси	58
4.10.2. Поступак рада	59
4.11. Секвенцирање и одређивање филогенетске сродности изолата	60
5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА	62
5.1. Идентификација крава са поремећеном секрецијом	62
5.2. Изолација и идентификација изолата <i>Staphylococcus aureus</i>	62
5.2.1. Изолација, идентификација изолата <i>Staphylococcus aureus</i> и преваленца код СМТ позитивних крава	62
5.2.2. Изолација и идентификација изолата <i>Staphylococcus aureus</i> из вимена крава са клиничким маститисом	62
5.2.3. Изолација и идентификација изолата <i>Staphylococcus aureus</i> из брисева гуше људи	63
5.3. Хемолиза	63
5.4. Биохемијска својства изолата <i>Staphylococcus aureus</i> на основу API Staph теста	63
5.5. Присуство гена за синтезу нуклеазе	65
5.6. Синтеза стафилококних ентеротоксина и присуство гена за њихову синтезу	66
5.7. Пантон-Валентин леукоцидин	66
5.8. Осетљивост изолата <i>Staphylococcus aureus</i> на антимикуробне лекове	68
5.8.1 Резистенција изолата <i>Staphylococcus aureus</i> на метицилин	72
5.9. Филогенетска сродност изолата <i>Staphylococcus aureus</i>	73
5.9.1. Филогенетска сродност изолата <i>Staphylococcus aureus</i> из вимена крава....	73
5.9.2. Филогенетска сродност изолата <i>Staphylococcus aureus</i> из вимена крава и из брисева гуше људи	76
6. ДИСКУСИЈА	79
6.1. Налаз <i>Staphylococcus aureus</i> код крава са поремећеном секрецијом	79
6.2. Биохемијска својства изолата <i>Staphylococcus aureus</i> (API Staph тест)	80
6.3. Синтеза стафилококних ентеротоксина и присуство гена за њихову синтезу	80
6.4. Хемолизини	82
6.5. Пантон-Валентин леукоцидин	82
6.6. Резистенција на антимикуробне лекове	83
6.6.1. Резистенција на метицилин	83
6.7. Филогенетска сродност изолата <i>Staphylococcus aureus</i>	84
6.7.1. Филогенетска сродност изолата <i>Staphylococcus aureus</i> из вимена крава....	84
6.7.2. Филогенетска сродност изолата <i>Staphylococcus aureus</i> из вимена крава и из брисева гуше људи	85
7. ЗАКЉУЧАК	87
8. ЛИТЕРАТУРА	89
ПРИЛОЗИ	95
БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ	142

ЛИСТА СЛИКА

Слика 1.	Телијски зид грам-позитивних бактерија	5
Слика 2.	<i>Staphylococcus aureus</i> –микроскопски препарат обојен по Граму	6
Слика 3.	<i>Staphylococcus aureus</i> – златно-жуте колоније на крвном агару	7
Слика 4.	Намирнице путем којих је дошло до епидемија алиментарних обољења изазваних стафилококним токсинима у ЕУ 2011. године и процентуална заступљеност.....	11
Слика 5.	Колоније <i>Staphylococcus aureus</i> на крвном агару са појавом $\alpha\beta$ хемолизе	14
Слика 6.	Приказ thermocycler уређаја	27
Слика 7.	Приказ PCR циклуса	29
Слика 8.	Приказ агароза гел електрофорезе	31
Слика 9.	Приказ амплификационе криве у Real Time PCR	33
Слика 10.	Приказ количине ДНК у односу на циклусе током PCR реакције	34
Слика 11.	Приказ SYBR Green I	35
Слика 12.	TaqMan проба	38
Слика 13.	Molecular Beacons	39
Слика 14.	Хибридизационе пробе.....	40
Слика 15.	Дезинфекција врха папиле	46
Слика 16.	Коси агар без и са израслим колонијама	53
Слика 17.	Криоепрувета са културом за дуготрајно чување у замрзивачу	54
Слика 18.	VIDAS [®] апарат	55
Слика 19.	Агароза гел електрофореза – утврђивање присуства гена за синтезу нуклеазе изолата <i>Staphylococcus aureus</i>	65
Слика 20.	Агароза гел електрофореза – детерминација SECs-позитивних изолата <i>Staphylococcus aureus</i>	66
Слика 21.	Агароза гел електрофореза -детерминација PVL-позитивних изолата <i>Staphylococcus aureus</i> (изолати од броја 58 до 61)	67
Слика 22.	Агароза гел електрофореза -детерминација PVL-позитивних изолата <i>Staphylococcus aureus</i> (изолат број 62)	67
Слика 23.	Агароза гел електрофореза -детерминација <i>tecA</i> гена код изолата <i>Staphylococcus aureus</i> (изолат под бројем 67)	73
Слика 24.	Филограм добијен на основу секвенцирања <i>sra</i> гена изолата <i>Staphylococcus aureus</i> пореклом из вимена крава коришћењем „neighbour-joining“ анализе и 1000 bootstrap-ова	75
Слика 25.	Филограм добијен на основу секвенцирања <i>sra</i> гена изолата <i>Staphylococcus aureus</i> пореклом из вимена крава и из брисева гуше људи коришћењем „neighbour-joining“ анализе и 1000 bootstrap-ова	77

ЛИСТА ТАБЕЛА

Табела 1.	Карактеристике врсте <i>Staphylococcus aureus</i>	8
Табела 2.	Донори и акцептори у Real Time PCR систему	36
Табела 3.	Утврђивање резултата СМТ теста	45
Табела 4.	Састав подлоге крвни агар	47
Табела 5.	Карактеристике крвног агара	48
Табела 6.	Састав основне подлоге	49
Табела 7.	Упутство за читавање резултата на API Staph траци	52
Табела 8.	Основни састав подлоге Милер-Хинтон агар	56
Табела 9.	Стандарди за процену осетљивости изолата <i>Staphylococcus aureus</i> на поједине антимикробне лекове према упутству Европског комитета за испитивање антимикробне осетљивости (EUCAST)	57
Табела 10.	Списак прајмера коришћених у испитивањима	58
Табела 11.	Састав пуфера за Real Time PCR	59
Табела 12.	Број изолата <i>Staphylococcus aureus</i> у I групи, величина и број газдинстава са којих потичу	62
Табела 13.	Број изолата <i>Staphylococcus aureus</i> по групама и њихово порекло	63
Табела 14.	Број изолата <i>Staphylococcus aureus</i> по групама и типу хемолизе	63
Табела 15.	Биохемијска својства заједничка за све изолате <i>Staphylococcus aureus</i> на основу API Staph теста	64
Табела 16.	Заступљеност различитих биохемијских својстава изолата <i>Staphylococcus aureus</i> на основу API Staph теста	64
Табела 17.	Међусобне сличности/разлике изолата <i>Staphylococcus aureus</i> у биохемијским својствима на основу API Staph теста	65
Табела 18.	Налаз гена за синтезу PVL код изолата <i>Staphylococcus aureus</i> пореклом од СМТ позитивних крава, крава са клиничким маститисом и од људи	67
Табела 19.	Осетљивост изолата <i>Staphylococcus aureus</i> на антимикробне лекове на основу диск дифузионе методе	69
Табела 20.	Осетљивост изолата <i>Staphylococcus aureus</i> на антимикробне лекове	70
Табела 21.	Број изолата <i>Staphylococcus aureus</i> по групама и број антимикробних лекова на које су резистентни	71
Табела 22.	Изолати <i>Staphylococcus aureus</i> и број антимикробних лекова на које су резистентни	72
Табела 23.	Резултати „bioMérieux“ Slidex MRSA теста за детекцију MRSA сојева	72
Табела 24.	Налаз гена за синтезу <i>mecA</i> и <i>mecC</i> код СМТ позитивних крава, крава са клиничким маститисом и код људи применом PCR методе	73
Табела 25.	Приступни бројеви изолата <i>Staphylococcus aureus</i> пореклом од крава у GenBank	78

ЛИСТА ШЕМА

Шема 1. Класификација врсте <i>Staphylococcus aureus</i>	5
Шема 2. Шема тока (процеса) стафилококне инфекције вимена	21

ЛИСТА ГРАФИКОНА

Графикон 1. Осетљивост изолата <i>Staphylococcus aureus</i> на антимикуробне лекове на основу диск дифузионе методе	70
Графикон 2. Процент изолата <i>Staphylococcus aureus</i> по групама и број антимикуробних лекова на које су резистентни	71

ЛИСТА ПРИЛОГА

Прилог 1. Листа за унос података за СМТ негативне краве	96
Прилог 2. Листа за унос података за СМТ позитивне краве	97
Прилог 3. Лична карта изолата <i>Staphylococcus aureus</i> (1-86)	98

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

- BA** (blood agar) - крвни агар
- BHI**..... (brain-heart infusion broth) - možдано-срчани бујон
- CFU** (colony forming units) - број јединица које формирају колоније
- CMT** (California mastitis test) - Калифорнија маститис тест
- EFSA** (European Food Safety Authority) - Европска агенција за безбедност хране
- ELFA** (enzyme-linked fluorescent assay) - флуоресцентни имуноензимски тест
- ELISA**(enzyme-linked immunosorbent assay) - имуноензимски тест
- EUCAST** ..(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
- Европски комитет за испитивање антимикробне осетљивости
- MH** (Müller-Hinton agar) - Милер-Хинтон агар
- MRSA** (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)
- *Staphylococcus aureus* резистентан на метицилин
- MSSA** (methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*)
- *Staphylococcus aureus* осетљив на метицилин
- PBP** (penicillin binding protein) - пеницилин-везујући протеин
- PCR** (polymerase chain reaction) - ланчана реакција полимеразе
- RFV** - релативна флуоресцентна вредност
- SCC_{mec}** ... - стафилококна хромозомална касета *mec*
- SE** (staphylococcal enterotoxin) - стафилококни ентеротоксин
- SEI** (staphylococcal enterotoxin-like)
- токсин сличан стафилококним ентеротоксинима

Ова дисертација урађена је у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије бр. 31034 „Одабране биолошке опасности за безбедност/квалитет хране анималног порекла и контролне мере од фарме до потрошача”.

1. УВОД

Субклинички и клинички маститиси које изазива *Staphylococcus aureus* представљају значајан проблем како у свету, тако и на фармама крава у Србији. *Staphylococcus aureus* један је од најчешће изолованих узрочника поремећаја секреције, а налази се код млечних говеда, оваца и коза.

Staphylococcus aureus често се јавља у спољашњој средини, али потребан је дужи период – недеље, месеци, па и до 2 године – пре него што се стафилококе населе у неком запату и изазову масовно клиничко обољење. Узрочник се може доказати најчешће на кожи сисе, нарочито у области мањих повреда на врху сисе и то не само код животиња са оболелим вименом него и код здравих животиња. У запатима крава најчешће се преноси преко опреме за мужу.

Са врха сисе узрочник галактогено продире у виме, везује се за зид сисног канала и цистерне. Као и други узрочници маститиса, стафилококе показују висок индекс адхеренције, што значи да имају добру моћ везивања за епителне ћелије млечне жлезде.

Патогеност сојева *Staphylococcus aureus* изолованих из вимена крава до данас није довољно испитана, као ни филогенетска сродност изолата из вимена крава и изолата узрочника обољења код људи.

Staphylococcus aureus може да расте при рН вредности у распону од 4,5 до 9,0 и концентрацији NaCl до 9%. Отпорност на топлоту зависи од средине која га окружује. *Staphylococcus aureus* суспендован у 0,9% NaCl брзо се инаktivира при 46°C, међутим, када је заштићен протеинима (као што је то случај у млеку или у гноју) може да преживи дуже од 50 минута при 60°C.

Неки сојеви производе додатне екзопротеине који могу бити одговорни за одређене клиничке манифестације. Ту спадају стафилококни ентеротоксини, токсин-1 токсичног шок синдрома, ексфолијативни токсин и Пантон-Валентин леукоцидин.

Ентеротоксини су термостабилни протеини, који након конзумирања изазивају повраћање и пролив. До данас су описана 23 различита стафилококна ентеротоксина, изузев токсина-1 токсичног шок синдрома (раније означен као стафилококни ентеротоксин F), а укључујући стафилококне ентеротоксине (SE - staphylococcal enterotoxin) и токсине сличне стафилококним ентеротоксинима (SEI - staphylococcal enterotoxin-like) од SEA до SEIV.

Стафилококни ентеротоксини због термостабилности могу да остану биолошки активни након кувања и других процеса обраде, а могу да буду присутни у храни и у одсуству живих микроорганизама што се дешава, на пример, приликом кувања млека или смањења рН вредности током производње сира.

Стафилококни ентеротоксини представљају главни узрок тровања храном, а *Staphylococcus aureus* може да изазове и упалу плућа, синдром токсичног шока и инфекцију рана.

Према извештајима Европске агенције за безбедност хране (EFSA - European Food Safety Authority) у Европској унији, стафилококни ентеротоксини одговорни су за висок проценат алиментарних интоксикација код људи, узрокованих бактеријским токсинима, понекад и са смртним исходом.

Пантон-Валентин леукоцидин (PVL) је егзотоксин специфичан за *Staphylococcus aureus*, који припада групи двокомпонентних синергохименотропних токсина. То је леукоцитолитични токсин, који стварањем пора разара мембрану полиморфонуклеарних неутрофила. Сматра се да овај цитотоксин игра значајну улогу у појави некротичних лезија код упорних кожных инфекција као и код тешких некротичних пнеумонија.

PVL се може наћи како у сојевима осетљивим на метицилин (MSSA, methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*) тако и у сојевима *Staphylococcus aureus* резистентним на метицилин (MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Метицилин је полусинтетски бета-лактамски антимикуробни лек из групе пеницилина, коришћен је за лечење инфекција изазваних грам-позитивним бактеријама осетљивим на метицилин, нарочито бактеријама које производе бета-лактамазу и које су резистентне на већину пеницилина. Данас се више не користи у клиничкој пракси. Ипак, термин „*Staphylococcus aureus* резистентан на метицилин“ представља сојеве *Staphylococcus aureus*, који су отпорни на све пеницилине.

О неправилној употреби и евентуалној злоупотреби антимикуробних лекова у лечењу и превенцији маститиса крава на нашим фармама нема довољно података. У свету, па и код нас јавио се проблем повећања резистенције *Staphylococcus aureus* на антимикуробне лекове, што у значајној мери може да угрози производњу млека и производа од млека, здравље крава, а тако и здравље људи.

Проблем поремећаја секреције и његов примарни етиолошки узрочник на нашим фармама није у потпуности испитан, стога је неорходно проучити етиологију поремећаја секреције и патогена својства узрочника.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Патогеност, вируленција и фактори вируленције

Патогеност је способност једног микроорганизма да продре у организам домаћина и да у њему изазове болест. Различите врсте бактерија једног истог рода по степену патогености могу да буду од непатогених до високо патогених. Неке бактерије су патогене само за једног домаћина (на пример, само за човека), а неке могу да буду патогене и за више домаћина.

Вируленција је степен патогености неког микроорганизма односно мера његове способности да изазове болест. Фактори вируленције су:

- Бактеријски токсини (егзотоксини или ендотоксини)
- Хемолизини
- Бактеријска овојница
- Остали токсини

2.2. *Staphylococcus aureus*

2.2.1. Историјат

Назив *Staphylococcus aureus* потиче од грчке речи „стаφυλόκοκκος“ што значи зрно грозђа, бобица у грозду и латинске речи „*aureus*“ што значи златно.

Хирург Сер Александер Огстон (Sir Alexander Ogston) 1880. године у Абердину, у Шкотској, идентификовао је први пут бактерије рода *Staphylococcus* из гнојног апсцеса у коленом зглобу. Огстон није био први који је микроскопом посматрао гној и описао микрококе, оне у ланцима већ су назване стрептококама. Огстон је 1882. године гроздасто груписане микрококе назвао стафилококама „*staphylococci*“ [1-3].

Антон Ј. Розенбах (Anton J. Rosenbach), немачки хирург, изоловао је 1884. године две врсте стафилокока и назвао их по боји колонија: *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus albus* (данас *Staphylococcus epidermidis*), од латинске речи „*albus*“ што значи бело [4].

2.2.2. Таксономија

Данашња таксономија препознаје 3 домена (*Bacteria*, *Archaea* и *Eucarya*) у оквиру којих је подељен читав живи свет. Положај врсте *Staphylococcus aureus* у оквиру домена *Bacteria* приказан је на шеми 1.

Домен: *Bacteria*

Тип XIII: *Firmicutes*

Класа I: *Bacilli*

Ред I: *Bacillales*

Фамилија VIII: *Staphylococcaceae*

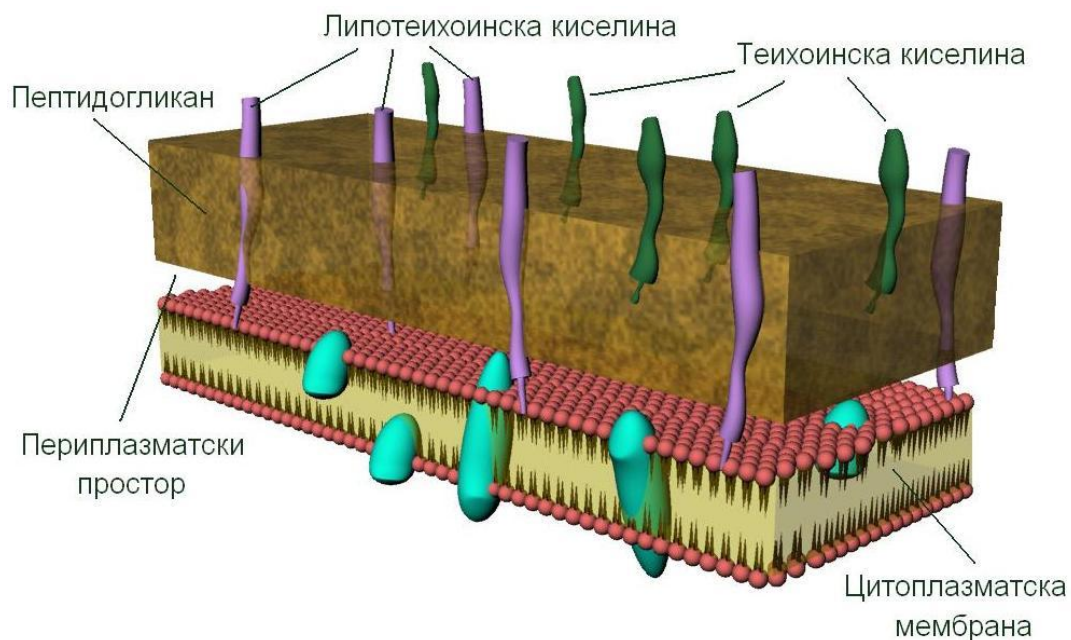
Род I: *Staphylococcus*

Врста: *Staphylococcus aureus*

Шема 1. Класификација врсте *Staphylococcus aureus* [5]

2.2.3. Особине

Staphylococcus aureus је факултативно анаеробна (аеробна респирација или ферментација уз стварање млечне киселине), грам-позитивна, непокретна, лоптаста бактерија. Позната је и као „златни стафилокок“. Умножава се бесполно, бинарном деобом и то у две равни. Две ћерке ћелије које при том настају, не раздвајају се потпуно већ остају спојене, отуда и гроздаст облик. Ћелијски зид грам-позитивних бактерија приказан је на слици 1.

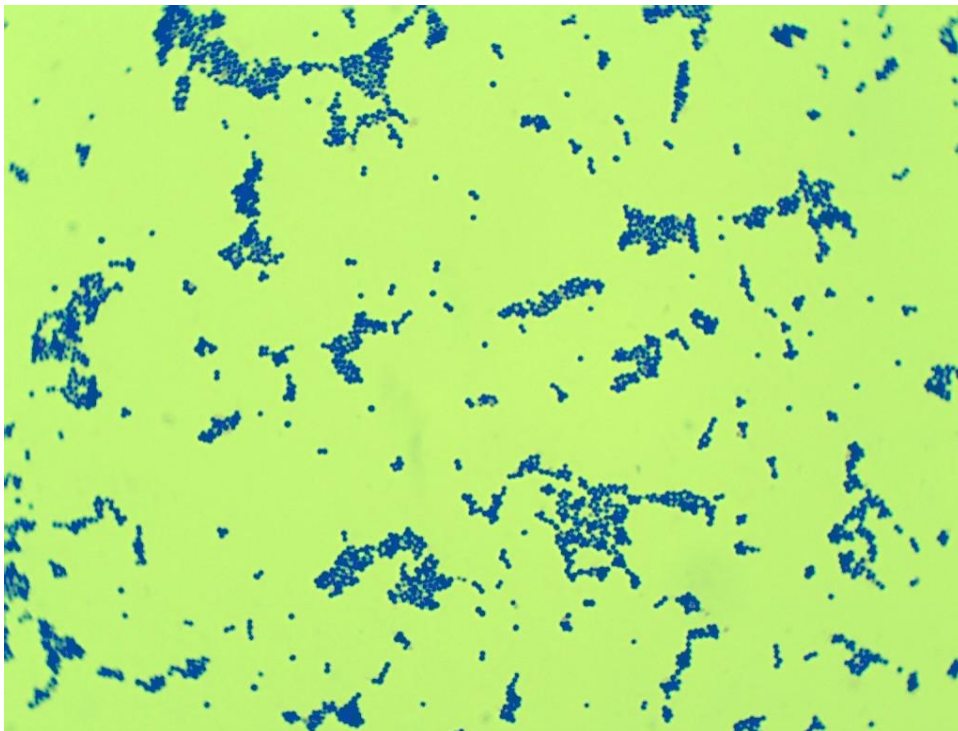


Слика 1. Ћелијски зид грам-позитивних бактерија

Staphylococcus aureus је отпоран на физичке и хемијске факторе и може да толерише рН вредност у распону од 4,5 до 9,0 и концентрацију NaCl до 9%. Његова термостабилност зависи од средине у којој се налази. *Staphylococcus aureus* суспендован у 0,9% NaCl инактивира се брзо при 46°C, међутим, када је заштићен протеинима, као што је то случај у млеку или гноју, може да опстане дуже од 50 минута при 60°C [6].

2.2.3.1. Микроскопски препарат

Бојење по Граму је емпиријска метода за разликовање бактерија тј. поделу на грам-позитивне и грам-негативне, а заснива се на хемијским и физичким особинама њиховог ћелијског зида (Слика 1). Бактерије врсте *Staphylococcus aureus* су грам-позитивне, под микроскопом виде се као коке груписане у виду гроздова плаво-љубичасте боје (Слика 2).



Слика 2. *Staphylococcus aureus* –микроскопски препарат обојен по Граму

2.2.3.2. Културелне особине

Бактерије рода *Staphylococcus* добро расту на свим подлогама. У течним подлогама доводе до дифузног замућења. На чврстим подлогама образују округле, глатке, сјајне колоније од бело-сиве до златно-жуте боје. Расту на подлогама са високим концентрацијама NaCl 7,5 до 10%. На крвном агару најчешће дају β тип хемолизе. Оптимални услови за инкубацију су 32°C и рН 7,4.

На крвном агару расту у виду великих округлих златно-жутих колонија, често уз појаву хемолизе (Слика 3).



Слика 3. *Staphylococcus aureus* –златно-жуте колоније на крвном агару

2.2.3.3. Биохемијске особине

Staphylococcus aureus је каталаза-позитиван (може да ствара ензим каталазу), па може да конвертује водоник пероксид (H_2O_2) у воду и кисеоник, што се понекад користи за разликовање стафилокока од ентерокока и стрептокока.

Коагулаза помоћу плазма-фактора преводи фибриноген у фибрин и на тај начин штити узрочника од имунског одговора домаћина. Коагулаза тест користио се за диференцијацију *Staphylococcus aureus* од осталих стафилокока. Међутим, данас је познато да *Staphylococcus aureus* не мора увек да буде коагулаза позитиван [7,8].

Термоотпорне нуклеазе (термонуклеазе) продукује сваки типични сој *Staphylococcus aureus*. Оне имају способност да разграђују полинуклеотидне ланце. Липазе не делују директно токсично, али преко ослобађања масних киселина активирају метаболизам стафилокока. Хијалуронидаза изазива смањење вискозитета ткива. Стафилокиназе, у стадијуму поодмакле инфекције могу поново да разграде коагулаза-индуковане фибринске баријере [9].

Неке од карактеристика врсте *Staphylococcus aureus* приказане су у табели 1 [10].

Табела 1. Карактеристике врсте *Staphylococcus aureus*

Карактеристика	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>subsp. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>subsp. anaerobius</i>
Величина колоније ±6mm	+	-
Пигментисаност колонија	+	-
Анаеробни раст	+	(+)
Аеробни раст	+	()
Стафилокоагулаза	+	+
<i>Clumping</i> фактор	+	-
Термонуклеаза	+	+
Хемолиза	+	+
Каталаза	+	-
Модификована оксидаза	-	-
Алкална фосфатаза	+	+
Пиролидонил ариламидаза	-	ND
Орнитин декарбоксилаза	-	ND
Уреаза	d	ND
В глюкозидаза	+	-
В глукуронидаза	-	-
В галактозидаза	-	-
Аргинин дихидролаза	+	ND
Продукција ацетоина	+	-
Редуција нитрата	+	-
Хидролиза ескулина	-	-
Резистенција на новобиоцин	-	-
Киселина (аеробно) из:		
Д-трехалозе	+	-
Д-манитола	+	ND
Д-манозе	+	-
Д-туранозе	+	ND
Д-ксилозе	-	-
Д-целобиозе	-	-
Л-арабинозе	-	-
Малтозе	+	+
Схароза	+	+
N-ацетил-глукозамина	+	-
Рафинозе	-	-

Легенда: + = 90% и више сојева позитивно; - = 90% и више сојева негативно; d = од 11 до 89% сојева позитивно; w = слаба реакција; () = реакција је одложена; ND = није одређено.

2.2.4. Патогеност сојева *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus располаже бројним факторима вируленције. Они условљавају патогеност одређеног соја.

Фактори инвазивности бактерија који омогућавају њихово ширење кроз ткива су цитолизини и то хемолизини, који лизирају еритроците и леукоцитини, који лизирају полиморфонуклеарне леукоците и макрофаге.

Егзотоксини значајно доприносе вирулентности сојева *Staphylococcus aureus*. Неки сојеви производе додатне егзопотеине који могу бити одговорни за одређене клиничке манифестације. Ту спадају стафилококни ентеротоксини, токсин-1 токсичног шок синдрома, ексфолијативни токсин и Пантон-Валентин леукоцидин (PVL).

На основу димензија пора које формирају на мембрани и начина остваривања интеракције са рецепторима на еукариотској ћелији, токсини могу да се поделе на оне који формирају велике и оне који формирају мале поре. Токсини који формирају мале поре, од 1 до 1,5 nm, доводе до селективног изласка растворених супстанци масе до 2000 Da. У овој групи се налази алфа токсин и Пантон-Валентин леукоцидин.

Стафилококни протеин А је антифагоцитни фактор, везан за ћелијски зид који се везује за Fc фрагмент имуноглобулина класе G чиме се инхибира специфична опсонизација бактерије.

Staphylococcus aureus је главни узрок тровања храном, због производње термостабилних ентеротоксина, који након конзумирања изазивају повраћање и пролив [11,12]. Може да изазове и упалу плућа, синдром токсичног шока и инфекцију рана [13] и један је од најчешће изолованих патогена изазивача клиничких, субклиничких и хроничних маститиса крва [14-18].

2.2.4.1. Ентеротоксини

Ентеротоксини су термостабилни протеини мале молекулске масе (26900 – 29600 Da), који након конзумирања изазивају повраћање и пролив [11]. До данас су описана 23 различита стафилококна ентеротоксина, изузев токсина-1 токсичног шок синдрома (раније стафилококни ентеротоксин F), а укључујући стафилококне ентеротоксине (SE - staphylococcal enterotoxin) и токсине сличне стафилококним ентеротоксинима (SEI - staphylococcal enterotoxin-like) од SEA до SEIV. Могу се поделити у пет филогенетских група. Сви поседују суперантигену активност, док само неки од њих (SEA до SEI, SER, SES, и SET) могу да изазову повраћање. SE и SEI су класификовани на основу својих аминокиселинских секвенци [19-24].

Стафилококно тровање храном је интоксикација која настапа након конзумирања намирница које садрже довољну количину једног или више претходно формираних ентеротоксина. Симптоми тровања јављају се брзо (од 2 до 8 сати од уноса) и укључују мучнину, интензивно повраћање, абдоминалне грчеве са или без пролива. Болест обично пролази у року од 24 до 48 сати. Понекад може бити толико озбиљна да захтева хоспитализацију, посебно када су у питању деца, старији људи или особе са слабијим имунитетом [25-28].

Дијагноза стафилококног тровања храном најчешће се поставља детекцијом стафилококних ентеротоксина у храни коју је пацијент конзумирао. Присуство ентеротоксина, заједно са великим бројем микроорганизама у повраћеном садржају такође потврђује дијагнозу, иако је овај клинички узорак веома ретко доступан за анализу. Поред присуства ентеротоксина, обично је у 1 g хране присутно више од 10^5 CFU (CFU – colony forming units – број јединица које формирају колоније) микроорганизама врсте *Staphylococcus aureus* који продукују ентеротоксин. Међутим, због стабилности стафилококних ентеротоксина, токсини могу да буду присутни у храни и у одсуству живих микроорганизама, који могу бити уништени током прераде хране (на пример, кувањем или смањењем рН током производње сира).

Према „Извештају EFSA о трендовима и изворима зооноза, зооноских агенаса, о антимикумној резистенцији и епидемијама алиментарних обољења у Европској унији у 2006. години“, ентеротоксини *Staphylococcus aureus* одговорни су за 48,8% алиментарних обољења код људи, узрокованих бактеријским токсинима, са два смртна исхода. 10,7% алиментарних обољења која су изазвана ентеротоксинима *Staphylococcus aureus* повезују се са производима од млека [29].

У 2010. години, 14 држава чланица ЕУ пријавило је 274 епидемије алиментарних обољења изазваних стафилококним ентеротоксинима, од којих је доказано 13,9% са 941 случајем од којих је 20,1% хоспитализовано, а смртних исхода није било [30].

У Техерану, 2010. године, из производа од млека изоловано је 32 изолата *Staphylococcus aureus* и то: 18 из павлаке, 10 из сира и 4 из млека. Мултиплекс PCR методом истраживачи су детектовали гене за синтезу токсина (SEA, SEB). *Staphylococcus aureus* најчешће је контаминирано павлаку (18%), а најређе млеко (4%). Укупно 32% узорака било је контаминирано. Број бактерија изражен у CFU/mL у контаминираним узорцима је варирао [31].

Према „Извештају Европске уније о трендовима и изворима зооноза, зооноских агенаса и епидемија алиментарних обољења у 2011. години“, 15 држава чланица ЕУ

пријавило је 345 епидемија алиментарних обољења изазваних стафилококним токсинима, што представља 6,1% свих пријављених епидемија у ЕУ. То је повећање од 25,9% у поређењу са 2010. годином (274 епидемије), углавном због чињенице да је Француска пријавила 290 епидемија у 2011. години у поређењу са 220 у 2010. години. Највећи број алиментарних интоксикација изазваних стафилококним токсинима у 2011. години пријавила је Француска (84,1%) од тога и један случај са смртним исходом. Поред тога, једна држава која није чланица ЕУ пријавила је два случаја епидемије алиментарних обољења. Потврђено је 35 (10,1%) епидемија алиментарних обољења, које су прилично равномерно дистрибуиране међу десет чланица ЕУ које су их пријавиле. Ово чини 394 случаја, од којих је 27,9% хоспитализовано, без пријављених смртних исхода. Норвешка је пријавила једну епидемија алиментарних обољења изазвану стафилококним ентеротоксинима. Путем производа од млека дошло је до 5,7%, а путем сира до 8,6% алиментарних интоксикација изазваних стафилококним токсинима (Слика 4) [12].



Слика 4. Намирнице путем којих је дошло до епидемија алиментарних обољења изазваних стафилококним токсинима у ЕУ 2011. године и процентуална заступљеност [12]

Staphylococcus aureus присутан је и код товних животиња, као и код музних крава, оваца и коза, нарочито у запатима захваћеним субклиничким маститисом [32].

У истраживању Бобоша и сарадника, у Војводини, 1988. године, од укупно 133 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из вимена крава утврђено је 13 (9,77%) изолата који продукују ентеротоксине [33,34]. Продукција ентеротоксина утврђена је код 4,2% сојева *Staphylococcus aureus* пореклом из стада музних крава Висконсина 2008. године [35], код 22,1% у Норвешкој 2001. године, где су гени за синтезу SE детектовани у 52,5% стадних узорака млека [36]. У Палестини, Адван (Adwan) и сарадници су 2005. године доказали присуство гена за синтезу SE у 29% сојева *Staphylococcus aureus*, тј. 11% од укупног броја узорака млека [37]. Истраживачи из Турске, 2012. године, утврдили су присуство гена за синтезу стафилококних ентеротоксина SEA, SEB, SEC, и SED, у 13,7% сојева *Staphylococcus aureus* изолованих из сировог млека [38].

Пастеризацијом млека (загревањем до температуре 71 до 74°C у трајању од 40 до 45 секунди, или загревањем на 85°C у трајању од 8 до 15 секунди уништавају се вегетативне форме, али не и стафилококни ентеротоксини. У складу са тим, стафилококни ентеротоксини могу се доказати и у пастеризованом млеку као и у производима од млека. Уз одговарајуће хлађење ризик по здравље људи се процењује као веома мали (око 10% сојева је способно за стварање ентеротоксина [9,34].

Асао (Asao) и сарадници су потврдили да су узрок масовног тровања храном у Јапану 2002. године били SEA у производима од млека иако су сви у току производње два пута били подвргнути термичкој обради при 130°C у трајању од 2 до 4 секунде [39].

2.2.4.2. Хемолизини

Хемолиза представља разарање црвених крвних зрнаца. Неке бактерије приликом раста на крвном агару продукују ензиме, хемолизине, који лизирају еритроците и разграђују хемоглобин. Способност бактеријских колонија да изазову хемолизу када се узгајају на крвном агару користи се у класификацији одређених микроорганизама. Дешавања на нивоу молекула код хемолитичне реакције још увек нису прецизно и детаљно објашњена.

Хемолиза је важан фактор у диференцијалној дијагнози специфичних инфективних агенаса, али утврђивање типа хемолизе није довољан критеријум за постављање финалне дијагнозе узрочника.

Тип хемолизе одређене културе бактерија на крвном агару одређује се након 24 сата инкубације при 37°C у присуству 5% CO₂. Као последица инкубације настаје и промена боје крвног агара из оригиналне крв црвене у смеђе-мрку боју.

Хемолитична реакција је класификована на алфа, бета и гама, према изгледу зоне око изолованих колонија, израслих на или у медијуму. Реакција се боље види уколико је инкубација обављена у анаеробним условима.

α хемолиза (*haemoglobinolysis*)

α хемолизин делимично разара мембрану еритроцита. Ова појава се назива α хемолиза, а израсле колоније су α хемолитичне. Визуелно се α хемолиза манифестује формирањем зоне хемолизе око израслих колонија која није потпуно прозачна и има зеленкасту боју. Зеленкасто пребојавање подлоге настаје услед присуства биливердина који је настао као последица разарања хемоглобина. При пажљивом посматрању, помоћу лупе, види се да је зона α хемолизе састављена из 4 различита дела (зоне). Непосредно уз колоније налази се зеленкастосива зона у којој се могу видети густо накупљени еритроцити. Око ње се налази друга, ужа и светлија зона, у којој нема крвне боје, а еритроцити су мање или више деструисани. Око друге зоне налази се трећа, која је нешто светлија и прозачнија од друге. Око треће зоне налази се четврта зона у којој се виде ретко расути еритроцити, и која одваја хемоглинопептичку зону од непромењеног крвног агара. α хемолиза се нарочито добро види око колонија које расту у агару. Ако се α хемолитична култура стави у замрзивач, изглед хемолитичне зоне се неће изменити.

β хемолиза (*haemolysis*)

β хемолизин доводи до потпуне деструкције еритроцита, што резултира ослобађањем хемоглобина у близини бактеријске колоније. Бактерије које продукују овај хемолизин, расту на крвној подлози окружене јасном зоном хемолизе и називају се β хемолитичне, а реакција се означава као β хемолиза. Када се посматра засејана плоча крвног агара у пролазном, рефлектујућем светлу, видеће се прилично широка, прозачна и скоро безбојна зона око колонија. На њу се надовезује много ужа и мање прозачна зона, која поставља јасну границу између зоне хемолизе и непромењеног крвног агара. Ако се крвни агар са β хемолитичним колонијама, после инкубације стави у замрзивач, хемолитична зона се неће променити. Представник групе је *Streptococcus pyogenes*, као и неки сојеви *Staphylococcus aureus*.

$\alpha\beta$ хемолиза

$\alpha\beta$ хемолиза се по својим манифестацијама налази између α и β хемолизе. Од α хемолизе се разликује по томе, што се под лупом не види зона густих еритроцита око колонија. Од β хемолизе се разликује, јер је мутнија. Те разлике се после 24 часа инкубације још не виде голим оком. Виде се само помоћу лупе. Ако се култура са таквим

хемолитичним особинама остави на собној температури или у замрзивачу, често ће се око већ образоване зоне хемоллизе формирати још једна („топло-хладни феномен“). Ти хемолизини показују различиту активност према еритроцитима разних врста животиња. Еритроците неких животињских врста не лизирају уопште, док еритроците других животињских врста лизирају јаче или слабије.

γ хемолиза

Ако микроорганизам не изазива хемолизу, назива се нехемолитичним или се каже да даје γ хемолизу. γ хемолизом се назива заправо недостатак хемоллизе у простору око бактеријске колоније израсле на крвном агару. Запажа се само смеђе-зеленкасто пребојавање крвног агара у односу на његову оригиналну, крв црвену боју. То је нормална реакција подлоге која у свом саставу има крв, а инкубира се на 37°C у присуству 5% CO₂. Представник ове групе је *Enterococcus faecalis* (ранији назив „стрептококе групе D“).



Слика 5. Колоније *Staphylococcus aureus* на крвном агару са појавом αβ хемоллизе

Хемолизини које стварају патогене стафилококе могу да оштете и ћелије целог организма. *Staphylococcus aureus* изолован из узорака узетих од животиња често садржи и α и β хемолизине (Слика 5). Иако β хемолизин преовлађује код стафилокока пореклом од говеда, он је мање токсичан него α хемолизин. Стварање β хемолизина сматра се јасним доказом патогености за виме [9].

2.2.4.3. Пантон-Валентин леукоцидин

Први пут, 1895. године, запажено је да стафилококе производе токсине који уништавају леукоците [40,41]. Године 1901. леукоцидна активност стафилококних филтрата титрирана је посматрањем инхибиције респирације полиморфонуклеарних леукоцита [42]. Разлика између леукоцидне и хемолитичке активности направљена је 1922. године [43]. Коначно, 1932. године Пантон (Panton) и Валентин (Valentine) објављују рад „Стафилококни токсин” у часопису Лансет (Lancet) и тако овај леукоцидин добија име по њима [44].

Пантон-Валентин леукоцидин (PVL) је егзотоксин специфичан за *Staphylococcus aureus*, који припада групи бикомпонентних синергохименотропних токсина [45,46]. То је леукоцитолитични токсин, који оштећује мембрану полиморфонуклеарних неутрофила, стварајући поре у ћелијској мембрани [47]. Кодирају га два суседна и котранскрибована гена који се преносе бактериофагом. Изазива лизу леукоцита и некрозу ткива [48-50]. Сматра се да овај цитотоксин игра значајну улогу у појави некротичних лезија код тешких кожных инфекција као и код тешких некротичних пнеумонија [51,52]. PVL се може наћи како у сојевима осетљивим на метицилин (MSSA - methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*) тако и у сојевима *Staphylococcus aureus* резистентним на метицилин (MRSA - methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*).

У Србији, у току 2008. године у оквиру истраживања спроведеног на националном нивоу, прикупљено је 162 MRSA изолата из 26 општинских болница. Присуство PVL је утврђено у четири (2,5%) изолата. Сви позитивни PVL MRSA изолати воде порекло од млађих пацијената са кожным инфекцијама, који су били у различитим болницама [53].

У Холандији, 2012. године, Тавакол (Tavakol) и сарадници, из узорака млека из 14 различитих млечних стада, идентификовали су MRSA који су отпорни на две или више врста антимикробних лекова, али су PVL негативни. Они закључују да се MRSA преноси међу различитим животињским врстама и да може да се сматра узрочником маститиса крава [54]. Присуство гена за синтезу PVL испитивали су многи аутори у сојевима MRSA пореклом од људи, из хране, из болница и домова, међутим, присуство PVL гена у сојевима *Staphylococcus aureus* изолованим из вимена крава још увек није довољно истражено.

2.2.4.4. Резистенција на антимикробне лекове

Резистенција је способност бактерија да не реагују на неки антимикробни лек или хемиотерапеутик. Може да буде примарна (генетски предодређена) и секундарна (стечена током живота).

Секундарна је од великог значаја, јер може да захвати целу бактеријску врсту и да се шири, не само у оквиру једне, већ и између сродних врста. Ова резистенција је најчашће посредована плазмидима који се процесима коњугације и трансдукције, преносе из једне у другу бактеријску ћелију.

2.2.4.4.1. Антимикробни лекови и њихово деловање

Антибиотици су природни продукти бактерија или гљивица са бактериостатским ефектима, који у већим концентрацијама делују бактерицидно. Полусинтетски и синтетски антимикробни лекови називају се једним именом хемиотерапеутици. Користе се за лечење бактеријских обољења. Према месту и начину деловања, хемиотерапеутици деле се на:

- Хемиотерапеутике који се понашају као метаболички антагонисти, који ремете процесе синтезе важних метаболита као што је фолна киселина, тако што се уграђују у метаболички ланац. По овом механизму делују сулфонамиди и туберкулостатици.
- Хемиотерапеутици који инхибирају синтезу ћелијског зида, и делују најбоље на бактерије у фази активног раста и размножавања. Делују и бактериостатски, јер заустављају и процес размножавања. Најважнији представници су β лактамски антимикробни лекови (пеницилини и цефалоспорини).
- Хемиотерапеутици који инхибирају синтезу протеина. Везују се за рибозоме на нивоу 30S (S - Сведбергова константа) или 50S субјединице и на тај начин ометају синтезу протеина која се одвија у рибозомима. За 30S везују се аминогликозиди који делују бактерицидно и тетрациклини који делују бактериостатски. За 50S се везују макролиди који у мањим концентрацијама делују бактериостатски, а у високим бактерицидно.
- Хемиотерапеутици који инхибирају синтезу нуклеинских киселина, и могу да делују на различите начине, тако што се уграђују у ДНК, ремете транскрипцију или репликацију ДНК. У ову групу спадају рифампицин и налидиксинска киселина.

У погледу осетљивости на антимикробне лекове, сојеви *Staphylococcus aureus* у последњих неколико година показују повећану резистенцију на пеницилин стварањем пеницилиназе као и појаву вишеструке резистенције. Увођењем полусинтетских пеницилина терапија обећава више успеха. Даље, стафилококе су се показале осетљиве на неомицин, олеаномицин, триметаприм, тилозин, еритромицин, линкомицин, гентамицин, канамицин као и на окситетрациклин. Ови препарати могу да се уводе у терапију у индикованим случајевима, у складу са антибиограмом [9].

2.2.4.4.2. *Staphylococcus aureus* резистентан на метицилин

Метицилин је полусинтетски бета-лактамски антимиљробни лек из групе пеницилина, коришћен је за лечење инфекција изазваних грам-позитивним бактеријама осетљивим на метицилин, нарочито бактеријама које производе бета-лактамазу и које су резистентне на већину пеницилина. Данас се више не користи у клиничкој пракси. Ипак, термин „метицилин резистентни *Staphylococcus aureus*“ (MRSA) представља сојеве *Staphylococcus aureus*, који су отпорни на све пеницилине.

Стафилококна отпорност на пеницилин заснива се на продукцији пеницилиназе (облик β -лактамазе), ензима који цепа β -лактамски прстен са молекула пеницилина, чинећи тако антимиљробни лек неефикасним. Пеницилиназа резистентни β -лактамски антимиљробни лекови, као што су метицилин, нафцилин, оксацилин, клоксацилин, диклоксацилин и флуклоксацилин, у стању су да се одупру деловању стафилококне пеницилиназе.

Отпорност на метицилин је посредована преко *tes* оперона, који је део стафилококне хромозомалне касете *tes* (SCC*tes*). За резистенцију одговоран је ген *tesA*, који кодира измењени пеницилин-везујући протеин (PBP2а или PBP2') који се налази у ћелијском зиду бактерије и има низак афинитет везивања за β -лактаме (пеницилини, цефалоспорини, и карбапеними). Ово омогућава резистенцију на све β -лактамске антимиљробне лекове, и онемогућава њихову клиничку употребу током инфекција изазваних сојевима MRSA [55,56].

MRSA представља посебан проблем у болницама и домовима, код пацијената са отвореним ранама и ослабљеним имунским системом [53].

У свету постоје подаци о сојевима MRSA узрочницима маститиса крава и о њиховом преносу између људи и животиња [57,58]. У Србији, сојеви MRSA изоловани су из рила свиња 2010. године [59], а до данас нису изоловани из вимена крава.

2.3. Поремећај секреције

Под појмом поремећаја секреције подразумевају се различита оштећења млечне жлезде која нису само микробиолошког порекла (на пр. механичка оштећења, алиментарни утицаји и стрес) и која по правилу пролазе у виду субклиничке форме маститиса. У складу са Директивом 92/46/ЕЕС сматра се да је по здравље људи безбедно оно млеко у којем је број соматских ћелија у 1 mL узорка стадног млека нижи од 400 000 и није доказано присуство микроорганизама који изазивају обољења [60]. Према најновијим сазнањима број соматских ћелија преко 150 000/mL млека у стадним узорцима млека указује на могућност поремећаја здравственог стања код крава у стаду.

Соматске ћелије млека потичу из крви и ткива млечне жлезде и јављају се у млеку здравог вимена у променљивој количини, од 20 000 – 300 000/mL. Чине их 4 главне ћелијске групе (полиморфонуклеарни леукоцити, лимфоцити, макрофаги и недиференциране ћелије и ћелијски делови) и специфичне ћелије (еозинофили, моноцити, епителоидне ћелије, гигантске ћелије, плазмцити, лимфоцитоици, базофили, мастоцити, еритроцити, ћелије епитела) и имају заштитну улогу.

Код упалних стања четврти вимена број ћелија може да се повећа у мањој или већој мери. Састав ћелија млека зависи од стадијума лактације и броја лактација, постојања упалних процеса и поремећаја метаболизма.

Повећање броја соматских ћелија у млеку може бити изазвано и физиолошким факторима као што су стадијум лактације, број лактација (старост) и раса. У колоструму је број соматских ћелија знатно већи него у млеку. У првим данима након тељења овај број износи више од 10^6 /mL, а након две недеље око 500 000/mL. У средини лактације уочава се најмањи број ћелија. Крајем лактације, број ћелија се поново повећава. Морају се узети у обзир и одступања код броја ћелија у јутарњем односно вечерњем млеку, уколико време дуже није прецизно расподељено [9].

Највећи број соматских ћелија у 1 mL млека уочен је у млеку крава након 5. лактације. Статистички сигурни подаци о односу између броја соматских ћелија и трајања лактације, старости и производних особина животиње, нису добијени. Разлике у броју соматских ћелија код различитих раса истичу способност појединих раса да се прилагоде променљивим условима или утицајима. Ове разлике нису толико велике да би могле да утичу на квалитет млека. Утврђено је да је код животиња на пашњацима у летњој сезони број соматских ћелија већи него код шталског држања [61].

Спречавање поремећаја секреције односно маститиса немикробног порекла пре свега захтева да се контролишу и елиминишу сви фактори који могу да поремете функционисање млечне жлезде. У патолошке утицаје спадају механичка оштећења вимена, алиментарни утицаји, стрес и поремећаји здравственог стања.

Поремећаји секреције могу да изазову пад производње млека (за 5 до 15%), као и производњу биолошки мање вредног млека које се тешко прерађује. То може да има неповољан финансијски утицај (пад цене оваквог млека). Економски су значајни трошкови у погледу неге и терапије оболелих крава, као и повећани ремонт крава у стаду [62,63].

Разјашњење узрока настајања поремећаја секреције има значај и код превенције маститиса говеда. Велики број фактора који утичу на поремећаје секреције представљају истовремено и предиспонирајуће факторе за настанак различитих маститиса инфективне

етиологије на тај начин, да они олакшавају продор узročника у млечну жлезду и слабе имунитет организма. С друге стране, активан цитолошки одговор има одређену заштитну функцију против инфекција вимена. Такође је утврђено да се акутни клинички маститиси чешће јављају у запатима са ниским садржајем ћелија у млеку [9].

2.3.1. Стафилококни маститиси

Стафилококне инфекције у вимену доводе до катарално-гнојног мастититиса и галактофоритиса, који протичу хронично или акутно, са различитим клиничким и патоморфолошким променама, чији је најчешћи узročник *Staphylococcus aureus*, ређе *Staphylococcus epidermidis*. *Staphylococcus aureus* убраја се и у узročнике субклиничких маститиса [64].

Пре 60 година стафилококни маститиси сматрали су се обољењем мањег значаја, а данас стафилококе заједно са стрептококама, осим групе Б, представљају најчешћи узрок маститиса. Њихово присуство доказано је у око 20% бактериолошки позитивних узорака млека. Код субклиничког маститиса проценат њиховог присуства је у порасту, и износи од 20 до 60%. Истовремена појава стафилококног маститиса и стафилококног дерматитиса такође је описана у литератури [65].

Staphylococcus aureus често се јавља у спољашњој средини. Ипак, није тако специфично адаптиран на ткиво вимена као *Streptococcus agalactiae*. Из тог разлога, потребан је дужи временски период, недеље, месеци па и до 2 године, пре него што се стафилококе населе у неком запату и изазову масовно клиничко обољење. Узročник се може доказати најчешће на кожи сисе, нарочито у области мањих повреда на врху сисе, и то не само код животиња са оболелим вименом него и код здравих животиња [6].

Хекман (Hekmann) и сарадници указали су на значај опреме за мужу као извора узročника. Они су методом скенирајуће електронске микроскопије често налазили пукотине и удубљења на површини гумица сисних чаша које се користе приликом муже. *Staphylococcus aureus* је том приликом био далеко најчешће изолован микроорганизам и претежно се радило о сојевима резистентним на антимиљробне лекове [66].

У запатима са стафилококним маститисом, на рукама музача као и на посудама за мужу установљено је присуство истих сојева стафилокока као и у вимену, тако да је потврђено да руке музача могу да представљају извор ширења инфекције у запату крава.

Из врха сисе узročник галактогено продире у виме. Показује афинитет за зид сисног канала и цистерне. Као и други узročници маститиса, стафилококе показују висок индекс адхеренције, што значи да имају добру моћ везивања за ћелије епитела млечне жлезде, што је

највише изражено у логаритамској фази раста узročника. Није познато који су то предиспонирајући фактори који подстичу њихово размножавање у систему млечних канала и њихов даљи продор у паренхим. Недостаци и кварови на техничким уређајима за мужу као и сама хигијена муже играју значајну улогу.

Број соматских ћелија у млеку у тренутку инфекције је без значаја за ток инфекције, као и висина нивоа лактоферина. Упадљиво је да до инфекције лакше долази после 4. месеца лактације него у ранијим месецима. Патогене стафилококе могу да се нађу и у вимену јуница, што је повезано са упалним променама.

Већина токсина које продукују стафилококе одговорни су за различите појаве болести: снажна продукција алфатоксина, која код говеда ипак није у првом плану, преко вазоконстрикција доводи до исхемије и некроза и заједно са бета токсином (који изазива оштећења тромбоцита и еритроцита) доводи до акутног хеморагично некротичног маститиса, који се пре свега јавља код младих крава на почетку лактације, али се у принципу не јавља сувише често. За алфатоксин је доказано да осим тога има и штетно дејство на неутрофилне гранулоците и не налази се у вимену старијих крава због појаве алфатоксин-неутралишућих антитела. Стварање хијалуронидазе од стране узročника треба да омогући његов бољи продор у ткиво, а стварање коагулазе је повезано са локалним поремећајима циркулације.

Неутрофилни гранулоцити се пре свега могу наћи у периваскуларним просторима, а затим доспевају у алвеоле и ситне млеководе након раздвајања епитела. Њихово кретање инхибира леукоцидин који стварају стафилококе, тако да они не могу да доспеју довољно близу њих. Алфатоксин стафилокока може непосредно да уништи леукоците. У каснијим фазама обољења, неутрофилни гранулоцити имају већи значај у одбрани од узročника, када могу да се пронађу фагоцитоване стафилококе. Експериментално, хронични стафилококни маститис може да се претвори у акутну гангренозну упалу, када се огледним животињама апликује антилеукоцитни серум. Фагоцитоза стафилокока зависи од њихове опсонизације, која се услед нормално ниског садржаја комплемента у млеку покреће тек имунолошким процесима. Осим фагоцитозе преко неутрофилних гранулоцита, чије је дејство овде слабије него код других узročника, не постоје никакви ефикасни одбрамени процеси, тако да је по правилу присутна дуготрајна перзистенција узročника са повећаним бројем леукоцита. Локално долази до секундарних поремећаја исхране алвеола, што доводи до њихове атрофије, тако да на почетку обољења губе функцију мањи, а касније већи делови паренхима. На тај начин процес поприма ток сличан жутом галту, где субклинички облик претходи клиничком.

Посебна патогенеза је карактеристична за грануломатозни стафилококни маститис (раније познат као актиномикоза или ботриомикоза). У овим случајевима умножавање узročника је у унутрашњости алвеола, које су окружене неутрофилним гранулоцитима. Делотворна фагоцитоза преко леукоцита се не јавља, и заједно са распадањем алвеоларног епитела долази до пролиферације макрофага и настанка гранулома. Патогенетски, значајну улогу код скупљања узročника у клупко и код слабе фагоцитозе преко леукоцита, има тзв. Clumping-фактор као и узајамно дејство фибриногена и коагулазе на бактеријској површини, што је доказано у експериментима на мишевима.

У зависности од патогених својстава соја стафилокока и његовог умножавања као и од других предиспонирајућих фактора, долази до појаве различите клиничке слике и тока болести. Поред латентне инфекције, може се јавити субклинички маститис, катарално-гнојни галактофоритис, маститис у хроничном и акутном току. Најтежа форма појављивања је акутна форма некротичног маститиса.

Најчешће се јавља хронично катарални галактофоритис и маститис, који често протиче субклинички и може да пређе у акутни облик, нарочито постпартално. Овај облик личи на хроничну инфекцију стрептококама и клинички је скоро непрепознатљив. При томе може да се установи повећани број соматских ћелија и повећана проводљивост млека, а количина и квалитет млека су у опадању. С временом, може доћи до појаве финих пахуљица у првом млеку, након чега долази до смањења четврти вимена и до индурација везивног ткива.



Шема 2. Шема тока (процеса) стафилококне инфекције вимена [9]

У складу са различитом клиничком сликом маститиса, разликују се 4 форме његовог испољавања и то: катарално-гнојни маститис и галактофоритис (акутни до хронични), акутни хеморагични некротични маститис и грануломатозна форма слична ботриомикози.

Инфицирано виме, укључујући и кожу, главни је резервоар узročника у запатима где је присутан *Staphylococcus aureus*. Узročник се често може изоловати са сиса здравих крава.

У том смислу, отклањање узрочника са сиса, коже вимена, руку музача, посуда за мужу и тканина које се користе приликом муже, представља најважнију профилактичку меру, којом се значајно смањује могућност ширења узрочника унутар запата [9].

2.4. Пустулозни дерматитис

Пустулозни дерматитис и фурункулозу коже вимена пре свега изазива *Staphylococcus aureus*. Отоци на кожи, ситне ефлоресценције и апсцеси коже такође се често јављају. Њих погоршава недовољна хигијена. Чишћење и блага дезинфекција доприносе деконтаминацији површине. Локалне антифлогистичке и антибактеријске масти поспешују излечење. Може да се покуша и са вакцинацијом против *Staphylococcus aureus* [9,67,68].

2.5. Примењени тестови и методе

2.5.1. Калифорнија маститис тест

Калифорнија маститис тест (СМТ - California mastitis test) по Шалму [69] за откривање поремећаја секреције и субклиничких маститиса је брз и једноставан тест за индиректно одређивање броја соматских ћелија у млеку крава. Заснива се на дејству алкиларил сулфоната на ДНК полимер из леукоцита, при чему се одваја ДНК, а протеински део прелази у гел. Долази до оштећења ћелијске мембране свих ћелија присутних у узорку млека, што омогућава да ДНК из тих ћелија реагује са СМТ реагенсом и формира гел.

У случајевима када број соматских ћелија у збирном млеку износи од 125 000/mL до 250 000/mL, препоручује се повремена контрола млека са маститис реагенсом у циљу идентификације оболелих грла, корекција рада апарата за мужу и дезинфекција сиса после муже [70].

2.5.2. Крвни агар

Крвни агар (Blood Agar – ВА) је неселективна хранљива подлога. Обезбеђује оптималне услове за раст многих грам-позитивних и грам-негативних врста бактерија. Подржава раст свих бактерија, изузев врло захтевних. Крвни агар је најчешће коришћен медијум у бактериологији. За изолацију *Streptococcus spp.* групе А, може се додати крв кунића. Погодан је за култивацију и откривање хемолитичне активности (стрептококе, стафилококе), па се због те своје карактеристике сврстава и у групу диференцијалних подлога.

Изглед хемолитичне активности око израслих колонија на крвном агару варира у зависности од врсте и количине додате крви, као и од употребљеног базног медијума. Свежа

дефибринисана овчија крв је најподеснија за припрему крвног агара за култивацију стрептокока, стафилокока, пнеумокока и детерминацију њихове хемолитичне активности.

Крв се пре додавања у припремљену и стерилисану базу третира да би се уклонили молекули фибрина који учествује у процесу згрушавања крви. Одсуство фибрина осигурава да не дође до згрушавања крви у припремљеном агару, што би могло да утиче на визуелну детекцију хемолитичне реакције.

Крвни агар припремљен са крвљу коња користи се за култивацију *Haemophilus influenzae*, на којој он расте окружен зоном β хемоллизе и личи на колоније *Streptococcus pyogenes*. Са другим обогаћењима база за крвни агар (Blood Agar Base) је погодна за култивацију захтевних бактерија. Без додатка крви користи се као богат хранљиви медијум.

Хемолиза на крвном агару се користи као прелиминарна или потврдна идентификација многих врста клинички важних бактерија. Хемолиза је важан фактор у диференцијалној дијагнози специфичних инфективних агенаса, али установљавање типа хемоллизе није довољан критеријум за постављање финалне дијагнозе узročника.

Стрептококе продукују хемолизине, али боље у анаеробним условима. Сходно томе, стандардна процедура је прављење тањег слоја крвног агара и убадањем езом у агар, да се обезбеди нижа концентрација кисеоника у којој стрептолизини могу много ефикасније да разарају еритроците.

Ако се Петријева плоча са крвним агаром подигне према извору светлости, видеће се уска зелена зона око израслих колонија. Ово „озелењавање“ је резултат накупљања водоник пероксида насталог услед претварања хемоглобина у метхемоглобин у агару. „Озелењавање“ може да изостане ако бактерија продукује псеудокаталазу.

Хемолитична реакција може да прикаже и синергизам. То је комбинована реакција или међусобно деловање, које има знатно јачи ефекат него свака појединачна хемолитична реакција. Одређене стрептококе групе В (*Streptococcus agalactiae*) су слабо β хемолитичне. Међутим, ако се ове бактерије нађу у непосредној близини са β хемолитичним сојем *Staphylococcus aureus* онда се реакција услед раста ова два микроорганизма интензивира и визуелно детектујемо јако изражену бета хемолитичну реакцију. Ово чини основу САМР теста (назив САМР тест потиче од иницијала аутора који су га први описали: R. Christie, N. E. Atkins, и E. Munch-Peterson).

2.5.3. Метода по Берд-Паркеру

Берд-Паркер агар се користи за изолацију и диференцијацију коагулаза позитивних стафилокока методом по Берд-Паркеру [71].

Као извор азота у медијум се додају казеин пептон и екстракт меса. Екстракт квасца представља извор азота, али и других важних хранљивих материја попут витамина Б комплекса. Медијум садржи литијум и телурит, који инхибишу раст већине микроорганизама контаминената, док глицин и пируват поспешују раст стафилокока. Стафилококе редукују телурит у телурид, што доводи до сиво-црне обојености колонија. Са додатком жуманцета, медијум постаје жут и непрозиран. Око колонија коагулаза позитивних *Staphylococcus aureus* јавља се зона просветљења, а после даље инкубације у овој зони просветљења може да се појави опалесцентан прстен у непосредном додиру са колонијама због реакције лецитиназе и жуманцета (липолитична активност). Претпоставља се да сиво-црне колоније и појава зоне просветљења на овој подлози указују на коагулаза позитивне стафилококе, јер постоји висока корелација између коагулаза теста и липолитичне активности.

Берд-Паркер агар са фибриногеном плазме кунџа може да се користи за детекцију активности коагулазе. Коагулаза позитивне бактерије расту као сиво-црне колоније због редукције телурита и имају опалесцентан прстен у непосредном додиру са колонијама, због конверзије фибриногена у фибрин уз помоћ коагулазе. Коришћењем оваквог медијума губи се потреба за додатним коагулаза тестом.

Европски стандард EN ISO 6888-1:1999+A1:2003 са којим је идентичан и наш стандард SRPS ISO 6888 (Микробиологија хране и хране за животиње — Хоризонтална метода за одређивање броја коагулаза позитивних стафилокока - *Staphylococcus aureus* и друге врсте - описује две хоризонталне методе (Део 1 и Део 2) за одређивање броја коагулаза позитивних стафилокока, међу којима су откривени ентеротоксогени сојеви. Он се углавном односи на *Staphylococcus aureus*, али и на *Staphylococcus intermedius* и одређене сојеве *Staphylococcus hyicus*.

Оба дела ISO 6888 имају еквивалентни статус. Ипак, препоручује се да се поступак описан у ISO 6888-2 користи за храну (као што су сиреви направљени од сировог млека и одређени производи од сировог меса) за коју постоји вероватноћа да је контаминирана:

- стафилококама које формирају атипичне колоније на агару по Берд-Паркеру;
- секундарном флором која може да маскира колоније које се траже.

Потврђивање стафилокока на основу стандарда ISO 6888, заснива се на позитивној реакцији коагулазе, али је познато да неки сојеви *Staphylococcus aureus* дају слабо позитивну реакцију коагулазе. Такви сојеви могу се заменити са другим бактеријама, али се разлика може направити коришћењем додатних испитивања, као што су осетљивост према лизостафину, стварање хемолизина, термостабилне нуклеазе и киселине из манитола.

2.5.4. API Staph

API Staph је стандардизован систем за идентификацију бактерија рода *Staphylococcus* и *Micrococcus*, који користи комбинацију минијатуризованих стандардних биохемијских тестова. Идентификација стафилокока и микрокока може да се уради за 18 до 24 сата. Поузданост је загарантована употребом стандардизованог инокулума са ниском концентрацијом бактерија, чиме се избегавају мешовите културе и субкултуре.

2.5.5. ELFA метода

Имунолошки тестови за детекцију стафилококних ентеротоксина су бројни. Ту спадају RIA (radio immunosorbent assay) и ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), од којих су неки доступни у виду комерцијалних китова. ELFA метода (enzyme-linked fluorescent assay) заснива се на повезивању двоструког имуноензимског теста са финалном флуоресцентном детекцијом. ELFA метода је слична ELISA методи, разлика је у супстрату који се користи, који цепа ензим на флуоресцентни производ. Добијене хемијске промене детектују се коришћењем фотодиоде флуориметра. ELFA метода премењује се у пракси у VIDAS систему, који се широко користи у клиничкој микробиологији: приликом тестирања на хепатитис, AIDS, алергије, анемије, тироидне хормоне. У микробиологији хране су развијени VIDAS комплети за одређивање *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria spp*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli O157* и стафилококних ентеротоксина.

У истраживањима Вернози-Розанд (Vernozy-Rozand) и сарадника упоређене су перформансе три комерцијална имуноесеја: два аутоматизована система за детекцију, VIDAS SET bioMérieux, VIDAS SET2 bioMérieux и ELISA метод - TRANSIA PLATE Staphylococcal Enterotoxins Diffchamb упоређени су за откривање различитих количина пречишћених стафилококних ентеротоксина (A, B, C2, D и E) додатих у храну. VIDAS SET2 је имао већу специфичност (100%) и осетљивост од SET и TRANSIA PLATE Staphylococcal Enterotoxins. Тачније, VIDAS SET2 може да детектује мање од 0,5 ng/g од токсина SEA и SEB, мање од 1ng/g токсина SEC2 и SEE и близу 1 ng/g токсина SED [72].

Обзиром на то да су стафилококне интоксикације, које су последица ингестије ниског нивоа стафилококних ентеротоксина, једна од најчешћих облика обољења изазвана конзумирањем хране постоји потреба за специфичним и осетљивим методама за откривање тих ентеротоксина. VIDAS SET2 је погодан за откривање стафилококних ентеротоксина у узорцима хране.

2.5.6. Ланчана реакција полимеразе (PCR)

2.5.6.1. Историја настанка методе

Методу ланчане реакција полимеразе (PCR - polymerase chain reaction) осмислио је Кери Малис (Kary Mullis) априла 1983. године. Малис је размишљао о новим начинима анализе мутација у ДНК када је схватио да је случајно открио метод за амплификацију било ког дела ДНК. Године 1993. добио је Нобелову награду за своја открића. Његова идеја била је да развије процес којим би се омогућила вештачка мултипликација ДНК поновљеним циклусима и уз помоћ ДНК полимеразе.

У природи, ДНК полимеразе се налази у свим живим организмима. Њена функција је да удвостручи количину ДНК приликом деобе ћелије у митози и/или мејози и то тако што се веже за један ланац ДНК и ствара други комплементарни ланац. У оригиналном процесу овај ензим користио се у условима *in vitro*. Дволанчана ДНК се загревала до 94°C, а онда су се ланци међусобно раздвојили. Међутим, у току овог поступка ДНК полимеразе била је уништена топлотом, тако да се у сваком циклусу морала додавати одређена количина свежег ензима. Првобитни процес није био ефикасан, будући да је захтевао утрошак времена, утрошак велике количине скупог ензима као и континуирану пажњу током поступка.

Касније је оригинални процес значајно побољшан додавањем ДНК полимеразе изоловане из термофилних бактерија које се могу наћи у гејзирима при температурама већим од 110°C. Изолована ДНК полимеразе из ових микроорганизама стабилна је на високим температурама и не разграђује се током загревања смеше приликом које долази до реверзибилне сепарације ланца ДНК молекула. Прва термостабилна ДНК полимеразе добијена је из бактерије *Thermus aquaticus*, па је и добила скраћеницу Таq полимеразе. Недостатак овог ензима је да, понекад, погрешно копира ДНК што доводи до мутација у ДНК секвенци. Узрок погрешног копирања је што Таq полимеразе не поседује 3'→5' егзонуклеазну активност (механизме који проверавају евентуалне грешке у новосинтетисаном ланцу ДНК). Зато се данас користи комбинација Таq полимеразе (велика брзина полимеризације) и *Pwo* или *Pfu* полимеразе (пореклом од *Archaea*) које имају 3'→5' егзонуклеазну активност, али саме веома споро полимеризују нуклеотидне молекуле у ланац.

2.5.6.2. Принцип методе

Метода PCR се у условима *in vitro* користи за ензимску репликацију ДНК, за разлику од других метода код којих се употребљавају живи организми (*E. coli* или квасци). Ова метода користи се за амплификацију кратких, добро дефинисаних делова ДНК ланца. Када се након одређеног броја циклуса накупи довољно амплификата, може се извршити адекватна

идентификација циљане ДНК, тј. утврдити којој врсти циљана ДНК припада. Насупрот живим организмима, PCR методом могу да се копирају фрагменти ДНК величине обично до 10 kb што је много мање од хромозомалне ДНК еукариотских ћелија која садржи 3×10^9 базних парова.

Основне компоненте PCR-а су:

- ДНК темплат (шаблон), који садржи регион ДНК фрагмента који треба да се амплификује;
- Два прајмера, која одређују почетак и крај ДНК секвенце која се амплификује;
- *Taq* полимераза, ДНК полимераза која копира секвенцу која се амплификује;
- Дезоксинуклеотид-трифосфат (dNTP-аденин, тимин, цитозин и гванин), који служе као градивни материјал за синтезу нових копија;
- Пуфер, који обезбеђује повољну хемијску средину за ензимско деловање *Taq* полимеразе.

Метода PCR изводи се у уређају „*thermocycler*“. Овај уређај има способност брзог загревања и хлађења реакционих епруветица на прецизно одређену температуру која је неопходна за сваки корак у реакцији. Да би се спречила евапорација реакционе смеше (уобичајени волумен смеше је од 15 до 100 μ L) на горњу страну тубица поставља се загрејан поклопац или се на површину саме смеше додаје слој уља.



Слика 6. Приказ thermocycler уређаја

Специфичан део ДНК који треба да се амплификује одређен је паром прајмера. Прајмери су кратки и вештачки ланци ДНК, дужине обично од 18 до 25 базних парова који су комплементарни са почетком и крајем ДНК секвенце коју треба амплификовати. Процес њиховог везивања водоничним везама за комплементарни део испитујуће секвенце назива се *annealing*. На месту *annealing*-а, веже се ДНК полимераза која почиње синтезу новог полинуклеотида. Избор дужине прајмера, као и његове температуре топљења (*melting temperature*, T_m) зависи од бројних фактора. Температура топљења прајмера није исто што и температура топљења ДНК у првој фази PCR процеса – то је температура при којој је половина места за везивање прајмера заузета. Температура топљења повећава се са повећањем броја база у прајмеру. Прајмери који су прекратки могу се везивати за више места у дугачком ДНК ланцу, што има за резултат појаву неспецифичних копија.

С друге стране дужина прајмера ограничена је температуром потребном за његово топљење. Превисоке температуре топљења (преко 80°C), могу да узрокују проблеме у виду смањене активности ДНК полимеразе којој активност опада са повишењем температуре. Оптимална дужина прајмера је од 15 до 40 нуклеотида и температура топљења између 55°C и 65°C . Приликом избора прајмера, треба узети у обзир и следеће факторе:

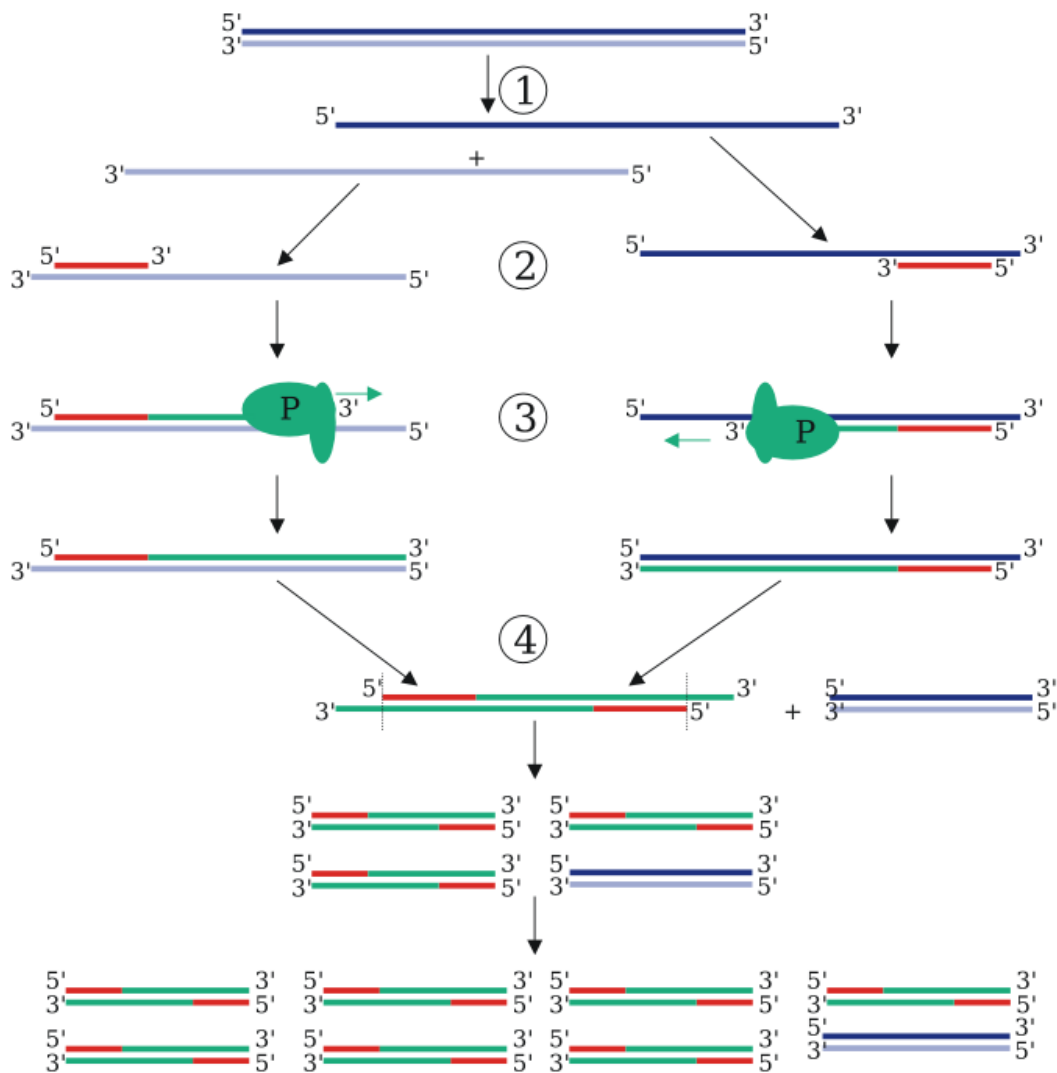
- Процент G-C парова у прајмеру мора бити од 40 до 60%;
- T_m вредности прајмера не смеју да се међусобно разликују за више од 5°C , а T_m вредност добијеног амплификата не сме да се разликује од T_m прајмера за више од 10°C ;
- Температура *annealing*-а мора да буде за 5°C нижа од најниже T_m вредности прајмера;
- Избежавати прајмере у којима спонтано може да настане више од 8 димера и више од 4 укоснице;
- 3' терминус је изразито осетљив - не сме бити комплементаран било ком региону другог прајмера (или истог прајмера) који се користи у реакцији и мора обезбедити тачно подударане са базама у темплату.

Процедура PCR обично се састоји од 25 до 35 циклуса. Сваки циклус састоји се из три корака:

1. Денатурација- Испитујући узорак дволанчане ДНК загрева се у *thermocycler* уређају до температуре од 94 до 96°C . При овој температури долази до реверзибилног прекида водоничних веза између комплементарних ланаца ДНК и ланци се раздвајају. Обично се пре овог корака изврши иницијално загревање до наведених температура да би се осигурало потпуно раздвајање ланаца ДНК, али и прајмера. Овај корак траје 1 до 2 минута.

2. Annealing- Thermocycler нагло обара температуру да би се прајмери везали за раздвојене ланце ДНК. Због високе концентрације прајмера у реакционој смеши спаривање прајмера са комплементарним ланцем испитујуће ДНК одвија се брже него што би се два ланца ДНК поново спојила. У овом кораку температура се спушта за 5°C ниже од T_m вредности прајмера, што значи обично од 45 до 60°C. Овај корак траје 1 до 2 минута.

3. Елонгација- ДНК полимеразе коначно може да почне да копира ДНК ланце. Она почиње да полимеризује dNTP молекуле од места annealing-а и то у 5'→3' правцу. Температура у овом кораку зависи од особина саме ДНК полимеразе, али обично је то 72°C. Дужина трајања овог корака зависи од дужине секвенце која се амплификује, а правило је 1 минут на сваких 1000 базних парова. Након завршетка свих циклуса примењује се финална елонгација која омогућава преосталим једноланчаним молекулама ДНК да буду копирани, што обично траје око 10 минута.



Слика 7. Приказ PCR циклуса

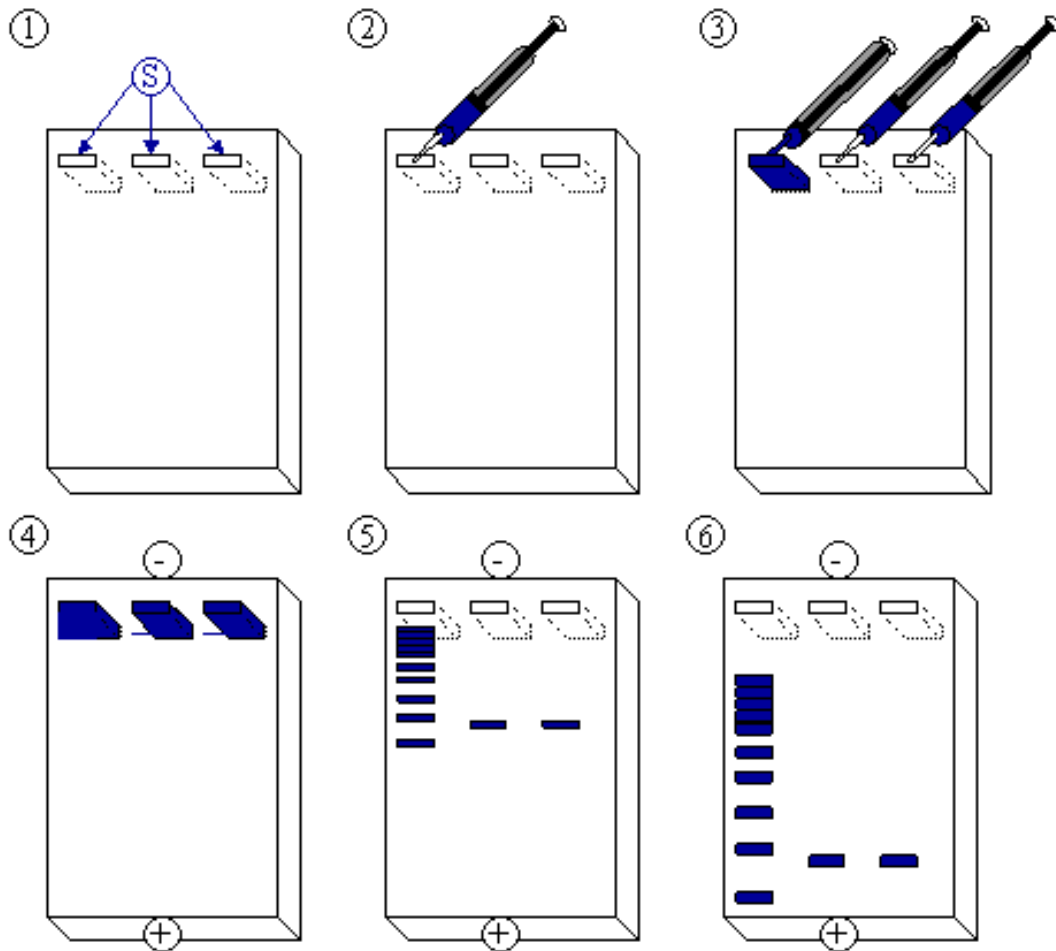
У току процеса ланчане реакције полимеразе, количина новосинтетисаног PCR производа расте експоненцијално, тј. 2, 4, 8, 16, 32, 64... 2^n . На крају 30 циклуса има 2^{30} копија првобитне количине ДНК која се испитује, тако да овакав амплификациони потенцијал пружа могућност да из 10-милионитог дела литра (0,1 μ L) бујона у коме се налази, на пример, 1 до 3 бактерије може да се реконституише њихов целокупан геном.

По завршетку финалне елонгације, PCR производ се оставља на 4°C у случају да се поступак наставља сутрадан (излагање температури од 4°C не оштећује новосинтетисани ДНК фрагмент).

Следећа фаза је визуелизација добијеног производа. Визуелизација се изводи методом агароза-гел електрофорезе и просветљавањем узорака применом UV зрака. Агароза-гел електрофореза користи се у молекуларној биологији за сепарацију ДНК ланаца, на основу њихове различите електрофоретске покретљивости у пољу једносмерне електричне струје кроз гел агарозу, ради процене њихове молекулске величине поређењем са фрагментима познате дужине (ДНК ladder син. ДНК маркер). Метода се заснива на различитој брзини кретања негативно наелектрисаних молекула ДНК (при неутралном рН) ка позитивном полу кроз агарозни матрикс, при чему молекули мање величине (мање базних парова) пролазе брже, а већи молекули крећу се спорије.

Да би се траке ДНК производа виделе, неопходно је да се у агароза гел дода боја етидијум бромид (EtBr). Етидијум бромид је боја која се интеркаларно веже за ДНК (веже се за малу и велику кривину дволанчаног ДНК молекула и разматава га) и под утицајем UV светлости (од 254 до 365 nm) снажно флуоресцира.

Осим EtBr, у сам узорак PCR производа додаје се „loading buffer“. То је пуферска смеша која се састоји од глицерола и индикатора као што је бромфенол-плаво или Orange G. Глицерол има улогу да PCR продукт учини гушћим и исталожи га на дно „базенчића“ у гелу, док наведене боје имају улогу визуелног индикатора напредовања трака у току електрофорезе. Бромфенол-плаво користи се за индикацију PCR производа величине од 300 до 5000 bp, док се Orange G користи за индикацију PCR производа величине од 50 до 125 bp. Сам гел потапа се у одговарајући пуфер (1xТрис-Борна киселина-ЕДТА) и електрофореза може да почне. Трајање електрофорезе зависи од величине гела и резолуције која се жели постићи, али за гел дужине 15 cm обично траје 90 минута при 8 V/cm.



Слика 8. Приказ агароза гел електрофорезе

2.5.6.3. Развој квантитативне PCR методе

Конвенционална PCR метода, од свог увођења 1985. године, преовладала је као метода избора у медицинској дијагностици и општој аналитици. Међутим, с временом је уочено да има одређене недостатке. Наиме, иако је овом техником омогућена синтеза великог броја копија гена, није могуће утврдити почетну количину ДНК материјала који се испитује. Такође, конвенционалном PCR методом могућа је само квалитативна детекција акумулисаног PCR производа и то тек на крају реакције. Парадоксално је што висока осетљивост ове методе представља и ограничење, јер могу да се детектују и мале количине других, контаминирајућих ДНК. Коначни резултат PCR реакције зависи и од квалитета и количине таргет секвенце ДНК у узорку, квалитета *Taq* полимеразе, количине слободних динуклеотид трифосфата, количине $MgCl_2$, квалитета и количине прајмера итд. Појачан научни интерес за ову проблематику довео је до сазнања о кинетици реакције ланчане полимеразе и отворио могућност квантификације ДНК материјала који се испитује у узорку.

Током 1992. године објављени су први научни радови о *Real Time PCR* (познатом и као квантитативни PCR). Основна предност нове технике била је могућност квантификације почетне количине ДНК која се испитује у узорку и избегавање пост-PCR манипулације (употреба етидијум бромида и електрофореза у гелу).

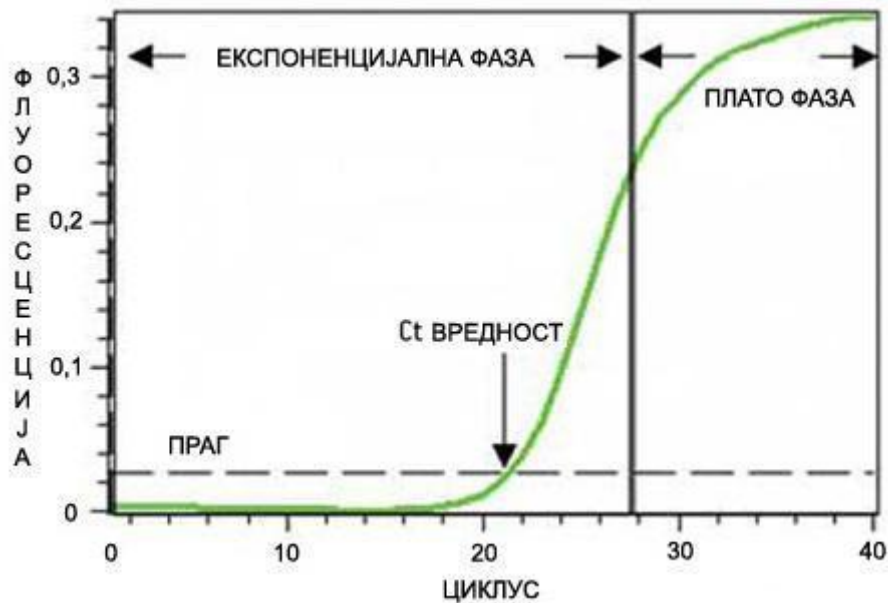
2.5.6.4. Real Time PCR

Еволуција PCR технике довела је до драстичног смањења времена потребног за испитивање, до смањења количине неопходних хемијских реагенаса као и до избегавања коришћења радиоактивних и токсичних супстанци. То је омогућено употребом само једног уређаја, *Real Time PCR thermocycler*. У поређењу са конвенционалном PCR методом, *Real Time PCR* не само да има већу осетљивост, већ су побољшани специфичност, прецизност и интервал квантификације непознатог узорка.

Принцип рада *Real Time PCR* је да се током PCR реакције мери количина акумулираних PCR производа и то тако што се у класичну реакцију мешу додаје флуоресцентна боја која се, по окончању сваког циклуса, интеркаларно веже за новосинтетисани ДНК фрагмент. Компјутерски контролисана CCD камера потом снима интензитет светлости коју UV-побуђена боја емитује из реакционе смеше. Обзиром да се амплификација фрагмената ДНК током PCR реакције одвија експоненцијално, и флуоресценција се повећава експоненцијално. *Real Time PCR* систем упоређује интензитет флуоресценције у односу на сваки циклус и приказује кинетику PCR процеса у облику амплификационе криве. На тај начин није потребно користити финални ДНК производ, јер његова количина у финалној фази PCR реакције није пропорционална количини на почетку реакције.

Амплификациона крива која представља PCR процес само је теоретски експоненцијална. У стварности, она је експоненцијална само у првим циклусима PCR реакције, док је количина расположивих реактаната у реакционој смеси велика. Након неколико циклуса (обично око 15) крива постаје изразито линеарна, док ближе крају PCR реакције поприма плато облик. Могућност да се прати реакција током реалног времена дозвољава да се анализира тренутак када је амплификација у експоненцијалној фази.

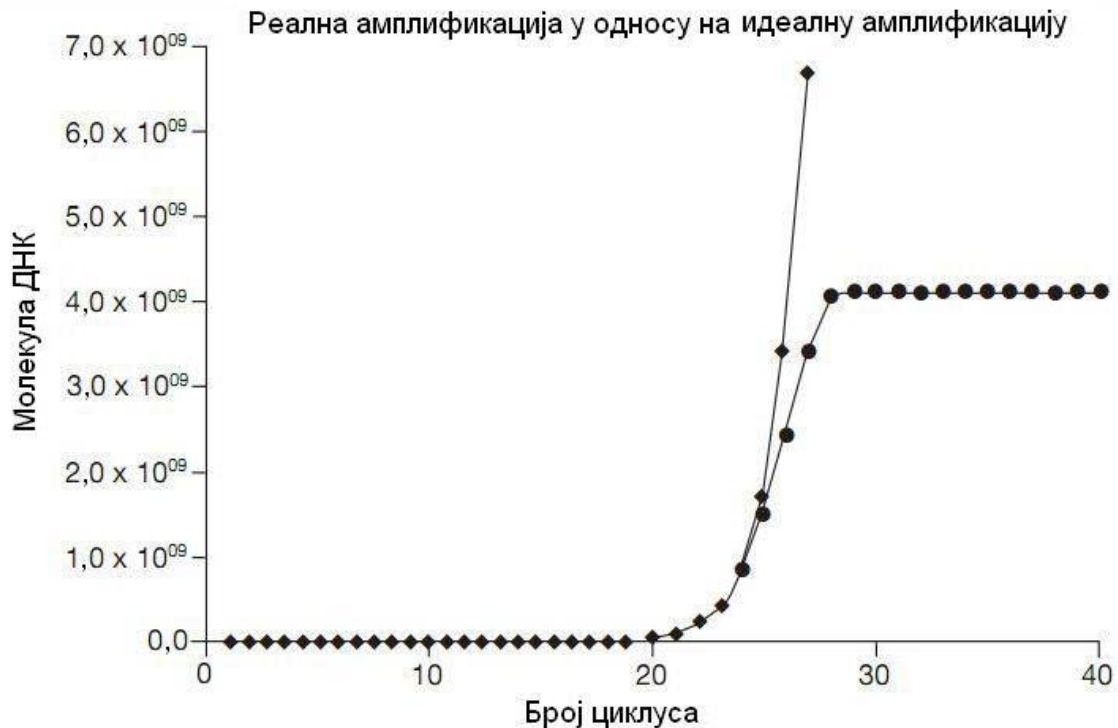
Ток реакције визуелно се представља графиком у коме је за сваки узорак ДНК дефинисан релативни интензитет флуоресценције (Y-оса) при одређеном циклусу PCR реакције (X-оса) што је приказано на слици 9.



Слика 9. Приказ амплификационе криве у Real Time PCR

У првим циклусима Real Time PCR реакције не постоје мерљиве варијације интензитета флуоресценције, али у истом периоду се дефинише први значајан параметар, базна линија амплификационе криве. Повећање флуоресценције изнад базне линије представља почетак фазе акумулације ДНК производа. Други значајан параметар је линија прага. Ова линија је паралелна базној линији, а пресеца амплификациону криву у фази експоненцијалног раста интензитета флуоресценције. У циљу тачне квантификације почетне количине испитујуће ДНК неопходно је да положај линије прага буде што прецизнији. Током Real Time PCR реакције положај линије могуће је подесити аутоматски, полуаутоматски или ручно.

Амплификациона крива сваког узорка који се испитује пресеца линију прага у одређеном циклусу PCR реакције. Тај циклус назива се циклус прага (threshold cycle) и означава као C_t . Пресецање две линије наступа у тренутку експоненцијалног пораста интензитета флуоресценције. Линија прага тако представља почетну количину ДНК која се испитује. Логаритамски приказ количине ДНК производа у односу на циклусе PCR реакције је права линија (Слика 10).



Слика 10. Приказ количине ДНК у односу на циклусе током PCR реакције

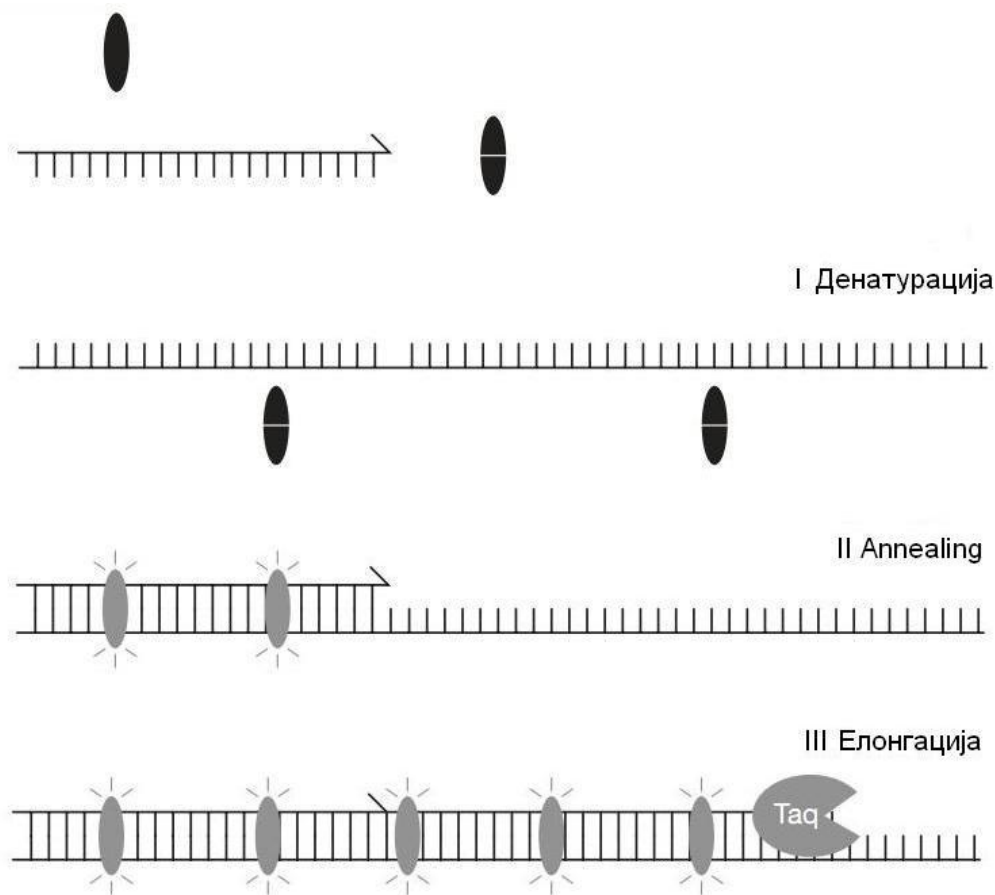
Из напред наведеног произлази да је, уколико се кроз Real Time PCR систем паралелно пропусте узорци са познатом количином ДНК (стандарди) и испитујући узорци, поређењем C_t вредности, могуће утврдити почетну количину ДНК материјала у узорку који се испитује.

Емитовање флуоресценције подразумева да се у реакционој смеши, поред класичних хемијских реагенаса, налазе:

1. интеркаларне боје које имају афинитет за малу и/или велику пукотину ДНК и флуоресцирају уколико се изложе UV зрацима или,
2. хибридизационе пробе, тј. специфичне олигонуклеотидне секвенце које на свом 5' крају имају флуоресцентни молекул под називом „reporter“, а на 3' крају молекула под називом „quencher“.

Најчешће коришћена интеркаларна боја у Real Time PCR систему је SYBR Green I. Ова боја се везује за малу пукотину ДНК ланца и том приликом флуоресцира приближно 2000 пута јаче него када је слободна у реакционој смеши. Сваким циклусом амплификације интензитет флуоресценције везане боје се удвостручује. Међутим, ова боја се неспецифично везује за ДНК ланац тј. уколико је у узорку присутна и најмања количина контаминирајуће

ДНК, иста ће се коамплификовати са испитујућом ДНК. Резултат је да интензитет флуоресценције неће одговарати реалној количини ДНК која се испитује (Слика 11).



Слика 11. Приказ SYBR Green I

Открићем физичког феномена FRET (fluorescence resonance energy transfer) омогућен је даљи развој хемијских реагенаса и побољшана је специфичност Real Time PCR система. За настајање FRET феномена неопходна су два молекула који могу међусобно да реагују и од којих бар један мора да има способност флуоресценције. Флуоресцентна компонента назива се донор, а други молекул назива се акцептор. Уколико се донор побуди светлосном енергијом из спољног извора чија је таласна дужина једнака или приближна његовој таласној дужини ексцитације, он ће емитовати светлосну енергију веће таласне дужине него ексцитаторна (Стоксов закон). Међутим, Real Time PCR систем неће детектовати ову светлост јер ће акцептор, који се налази у непосредној близини донора, апсорбовати емитовану светлосну енергију и „угасити“ (quenching) донора. Акцептор може, али и не мора да реемитује апсорбовану светлост. Оптимална удаљеност између два молекула креће се између 1 и 10 nm. Други неопходан захтев за настајање FRET феномена је да ексцитациона

таласна дужина акцептора мора да буде блиска његовој емитованој таласној дужини. Неки од најчешће коришћених донора и акцептора у Real Time PCR систему наведени су у табели 2.

Табела 2. Донори и акцептори у Real Time PCR систему

Nespecifične boje	Max. ab (nM)	Max. em (nM)
SYBR® Green I	497	525
EvaGreen™	497	525
BOXTO™	515	552
"Reporter" boje	Max. ab (nM)	Max. em (nM)
Pulsar® 650	460	650
Fluorescein™	492	520
6-FAM	494	518
Alexa 488™	495	519
JOE™	520	548
TET™	521	536
Cal Fluor Gold 540™	522	544
Yakima Yellow™	530	549
HEX™	535	556
Cal Fluor Orange 560™	538	559
VIC™	538	554
Quasar® 570	548	566
Cy3™	552	570
TAMRA™	565	580
Cal Fluor Red 590™	569	591
Redmond Red™	579	595
ROX™	580	605
Cal Fluor Red 635™	618	637
LightCycler®640	625	640
Cy5™	643	667
Quasar® 670	647	667
LightCycler®705	685	705
"Quencher" boje	Max. ab (nM)	Max. em (nM)
DABCYL	453	None
BHQ0™	495	None
Eclipse™	522	None
Iowa Black™ FQ	531	None
BHQ1™	534	None
BHQ2™	579	None
Iowa Black™ RQ	656	None
BHQ3™	680	None

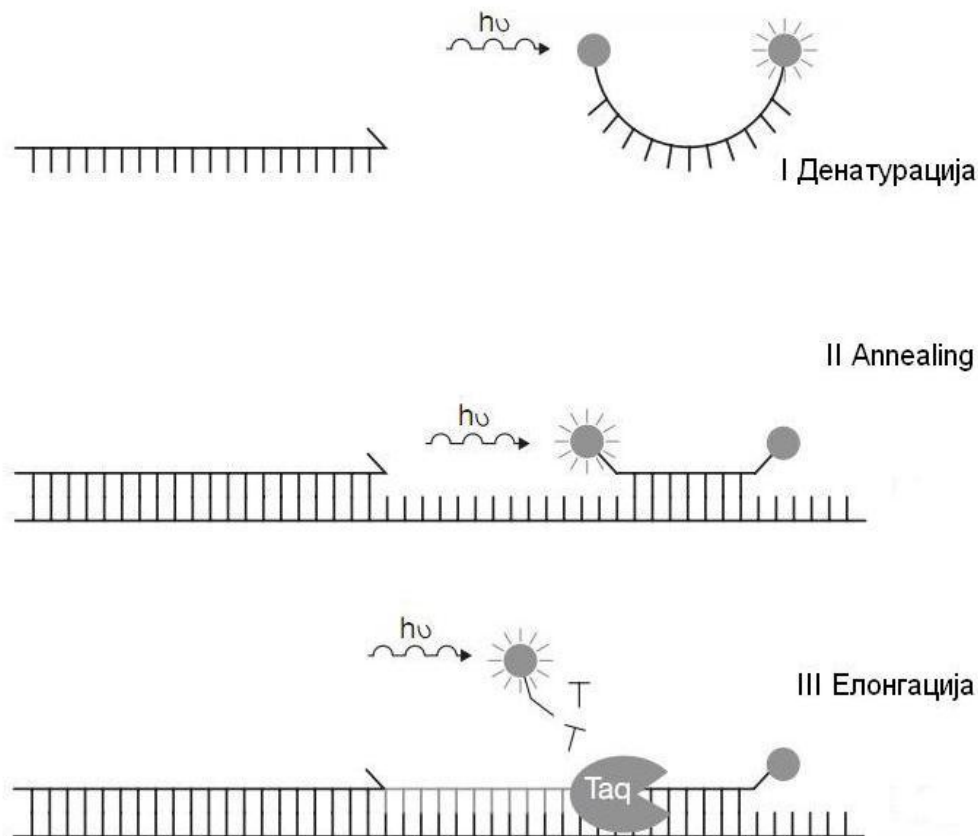
Стратегија развоја подразумевала је испитивање различитих хибридних флуоресцентно обележних проба које би се уградиле у испитујућу секвенцу ДНК омеђену паром прајмера. На тај начин би интензитет флуоресценције растао уколико би се амплификовао сегмент који се испитује, дакле побољшава се специфичност. Применом нове технике у реакционој смеси више не постоји неспецифична флуоресцентна боја.

Користећи овај тип развијања флуоресценције развијена су три типа Real Time PCR тестова:

1. „*Cleaveage based*“ - заснивају се на ензимском цепању (хидролизи) секвенце која на себи носи флуоресцентне хромофоре;
2. „*Displacable probes*“ – заснивају се на избацивању пробе са секвенце која се испитује и поновном искоришћавању услед промене терцијарне структуре;
3. Тестови који користе пробу везану директно за један од прајмера.

Основна предност хибридизационих проба у односу на интеркаларне лежи у чињеници да је за генерисање флуоресцентног сигнала неопходна специфична хибридизација између секвенце са хромофорама и ДНК која се испитује. У овом случају неспецифичне амплификације као што су „*mispriming*“ и стварање димера не генеришу сигнал.

У „*Cleaveage based*“ тестовима најчешће се користи ТаqМаn проба (Слика 12). ТаqМаn је олигонуклеотид који је комплементаран секвенци ДНК која се испитује, која је омеђена паром прајмера. За овај олигонуклеотид на 5' крају ковалентно је везан хромофорни молекул reporter, а на 3' крају хромофорни молекул quencher. Reporter молекул константно емитује фотоне, али се фотонска енергија преноси на quencher молекул без емитовања светлости. У ТаqМаn пробама као reporter хромофора најчешће се користи FAM (6-карбоксифлуоресцеин), а као quencher молекул TAMRA (6-карбокси-тетраметил-родамин). Проба се не распада док се налази у реакционој смеши, већ само у PCR annealing фази.

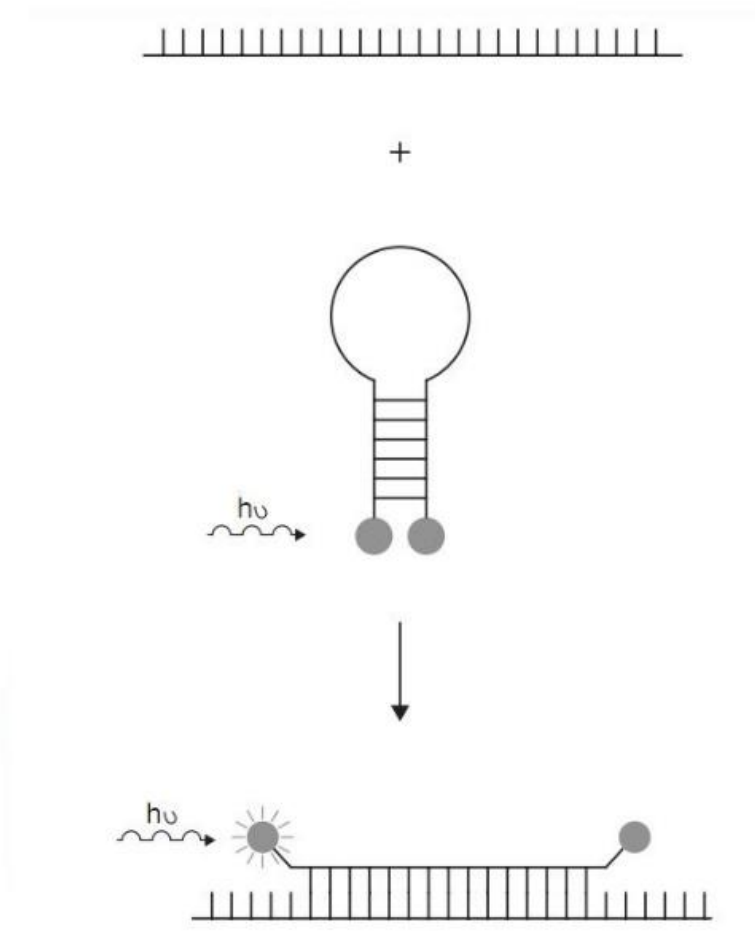


Слика 12. ТаqМан проба

Током фазе екстензије PCR реакције полимераза која, крећући се по једноланчаном ДНК ланцу синтетише комплементаран ланац, наилази на *TaqMan* олигонуклеотид и 5' нуклеазном активношћу хидролизује и избацује reporter са новосинтетисаног ланца. Хромофорни молекул reporter удаљава се од свог quencher и емитује се светлост. Интензитет флуоресценције директно је пропорционалан концентрацији специфичног амплификата. Есенцијално је да се *TaqMan* проба веже за комплементарну секвенцу брже од прајмера тако да флуоресцентни сигнал заиста потиче од сваког новосинтетисаног ампликона. *Taq* полимераза веома брзо по везивању прајмера почиње елонгацију ДНК ланца. Из ових разлога хидролизне пробе се конструишу тако да им је T_m за 9 до 10°C већа од T_m прајмера.

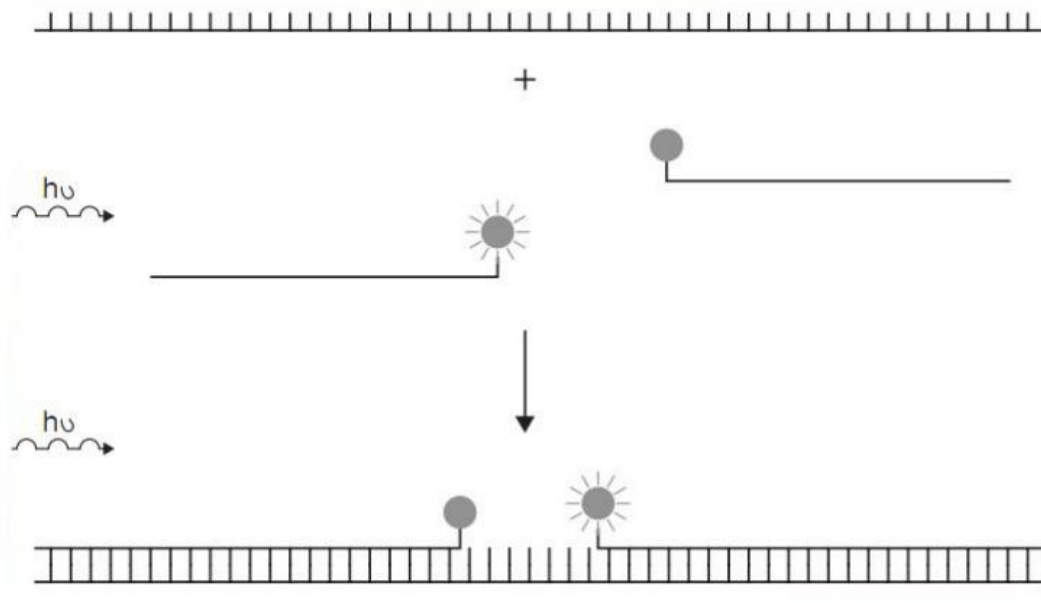
У „*Displacable probes*“ тестовима користе се олигонуклеотиди познати као „*Molecular Beacons*“. Ови олигонуклеотиди слични су ТаqМан пробама у смислу да су такође обележени reporter и quencher хромофорним молекулима и да је њихова T_m већа од прајмера коришћених у тесту. Међутим, за разлику од хидролизних проба, генерисање сигнала код „*Molecular Beacons*“ не зависи од цепања пробе. „*Molecular Beacons*“ поседују на оба краја самокомплементарну секвенцу дужине 4 до 6 база. У воденом раствору крајеви су савијени у енергетски повољну структуру облика укоснице. На тај начин reporter и quencher налазе се у

непосредној близини један другоме и стварају блиску FRET везу. За време PCR annealing фазе, проба се размотава, боје се одвајају и Real Time PCR систем детектује сигнал од reporter (Слика 13).



Слика 13. Molecular Beacons

Коначно, код неких тестова хибридизациона проба садржи два олигонуклеотида који се везују између прајмера и сваки од њих носи по једну флуоресцентну боју. Што је олигонуклеотид 5' крајем ближи секвенци „forward“ прајмера, експримира се све више донора на 3' крају, а други олигонуклеотид експримира све више акцептора на 5' крају. Када се пробе вежу, донор и акцептор се налазе у непосредној близини, удаљени само 1 до 3 базе. Донор (флуоресцеинска боја) апсорбује светлосну енергију из спољног извора и FRET феноменом предаје је акцептору (родаминска боја). Овим путем Real Time PCR систем детектује сигнал акцептора, уместо донора као што је то случај код претходних варијанти хибридизационих проба (Слика 14).



Слика 14. Хибридизационе пробе

2.6. Филогенетска сродност изолата *Staphylococcus aureus*

Филогенеза (грчки $\varphi\upsilon\lambda\omicron\gamma\acute{\epsilon}\nu\epsilon\sigma\eta$, од речи $\varphi\upsilon\lambda\omicron\nu$ што значи колена, родбина, и од речи $\gamma\acute{\epsilon}\nu\epsilon\sigma\iota$, што значи настанак) означава развој врсте тј. биолошку еволуцију.

На основу компаративних испитивања 16S rPHK секвенци, род *Staphylococcus* припада Типу *Firmicutes*, а то су грам-позитивне бактерије са ниским (<50 mol%) садржајем G+C у ДНК). Род *Staphylococcus* је монофилетски и добро је одвојен од других сродних родова са сличношћу 16S rPHK секвенци између родова од 93,4 до 95,3%. Различите врсте су генотипски добро раздвојене и показују 60% или мање сличности ДНК секвенци под оптималним условима хибридизације и мање од 30 % под рестриктивним условима [5].

Јухас-Касањицки (Juhász-Kaszanyitzky) и сарадници наводе податке о преносу сојева *Staphylococcus aureus* резистентних на метицилин између музача и крава на једној фарми у Мађарској, што су закључили на основу *sra* типизације испитиваних изолата [58].

2.6.1. Депоновање података о нуклеотидним секвенцама ДНК

Подаци о нуклеотидним секвенцама ДНК депонују се у јавну базу података нуклеотидних секвенци Genbank која је део међународне базе података нуклеотидних секвенци (у надлежности Националног центра за биотехнолошке информације САД).

Национални центар за биотехнолошке информације (NCBI - National Center for Biotechnology Information) је основан 4. новембра 1988. године, као одељење Народне библиотеке за медицину (NLM - National Library of Medicine) у Националном институту за

здравље (НИН - National Institutes of Health) и ради на унапређењу науке и здравља пружајући приступ биомедицинским и геномским информацијама.

3. ЦИЉЕВИ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА

Као што је приказано у прегледу литературе *Staphylococcus aureus* је присутан у вимену крава и узрочник је тровања храном код људи за чији су настанак одговорни термостабилни стафилококни ентеротоксини. Многи аутори су се бавили испитивањем патогености сојева *Staphylococcus aureus* са аспекта здравља вимена, као и испитивањем патогености сојева пореклом из стадних узорака млека или из производа од млека, али само мало података постоји о патогености сојева *Staphylococcus aureus* пореклом из појединачних узорака млека вимена крава, као и о њиховој филогенетској сродности са изолатима пореклом од људи.

Из тих разлога, циљ истраживања у оквиру ове докторске дисертације је:

- да се испита патогеност изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из појединачних узорака млека и секрета вимена крава, као и изолата пореклом из брисева гуше људи (способност синтезе стафилококних ентеротоксина и присуство одговарајућих гена за њихову синтезу, присуство гена за синтезу Пантон-Валентин леукоцидина, осетљивост изолата на антимикробне лекове, присуство гена *tecA* и *tecC* за резистенцију на метицилин);
- да се испита филогенетска сродност изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из појединачних узорака млека и секрета вимена крава и изолата пореклом из брисева гуше људи.

Сходно циљевима рада, задаци у оквиру ове докторске дисертације су:

- да се идентификују краве са поремећеном секрецијом;
- да се изолује и идентификује *Staphylococcus aureus* из узорака млека и секрета вимена крава и из брисева гуше људи (испитивање хемолизе на крвном агару, биохемијских особина - Аp1 Staph, утврђивање присуства *nuc* гена);

- да се утврди патогеност изолата *Staphylococcus aureus* (способност синтезе стафилококних ентеротоксина и присуство SE гена, присуство гена за синтезу Пантон-Валентин леукоцидина, осетљивост изолата на антимикуробне лекове, присуство гена *mecA* и *mecC* за резистенцију на метицилин);
- да се утврди филогенетска сродност изолата *Staphylococcus aureus* на основу секвенцирања SPA гена.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Формирање група изолата *Staphylococcus aureus*

Испитивања су вршена на 86 изолата *Staphylococcus aureus*, подељених у три групе на основу порекла:

I група: изолати *Staphylococcus aureus* од крава са субклиничким маститисом;

II група: изолати *Staphylococcus aureus* од крава са клиничким маститисом;

III група: изолати *Staphylococcus aureus* пореклом из брисева гуше људи.

I група:

На 46 газдинстава са високо продуктивним кравама за производњу млека у Централној Србији урађен је Калифорнија маститис тест ради идентификације крава са поремећеном секрецијом и узети су узорци млека из СМТ позитивних четврти за бактериолошки преглед у лабораторији Ветеринарског специјалистичког института „Јагодина“ у Јагодини.

II група:

Са 2 велике фарме у Војводини узети су узорци од крава са клиничким маститисом за бактериолошки преглед у лабораторији Научног института за ветеринарство „Нови Сад“, у Новом Саду.

III група:

Изолација и идентификација *Staphylococcus aureus* из брисева гуше људи вршена је у Институту за јавно здравље Војводине, у Новом Саду.

4.2. Калифорнија маститис тест

Млеко свих крава испитивано је Калифорнија маститис тестом по Шалму [69] за откривање поремећаја секреције и субклиничких маститиса.

4.2.1 Поступак рада

Први млаз млека се одбацује, а онда се млеко измузе у тестатор са 4 одвојена одељка, по један за сваку четврт вимена краве. Тестатор се нагне скоро усправно и вишак млека се одлије, а у сваком одељку остане око 2 mL млека. Дода се једнака количина (2 mL) СМТ реагенса. Мешавина би требало нежно да се ротира 20 секунди. Реакција се оцењује на скали од 0 до 3 (од „смеша остаје непромењена“ до „готово-чврстих формација гела“). Утврђивање резултата аглутинације је приказано у табели 3.

Табела 3. Утврђивање резултата СМТ теста

Реакција	Стварање гела	Број соматских ћелија /mL
негативна (-)	нема промена у конзистенцији	<10 000 - 200 000
сумњива (±)	незнатна промена у конзистенцији при померању посуде	150 000 - 500 000
слабо позитивна (+)	појачано згрушавање без стварања гела	400 000 - 1 500 000
позитивна (++)	ствара се гел, при мешању се скупља на средини посуде али се разилази по престанку мешања	800 000 - 5 000 000
јакo позитивна (+++)	ствара се густа желатинозна маса, при мешању се скупља на средини посуде и не разилази се ни по престанку мешања	>5 000 000

4.2.2. Бележење резултата

Пре изласка на терен припреме се две листе. Једна за СМТ негативне краве, друга за СМТ позитивне краве (Прилог 1 и 2), а попуњавају се на основу резултата СМТ теста.

На основу резултата СМТ теста, из СМТ позитивних четврти вимена крава узимају се узорци за бактериолошки преглед, који се означавају у складу са подацима са листе за унос података за СМТ позитивне краве (Прилог 2).

4.3. Узимање узорака за бактериолошки преглед

Након СМТ, приступило се асептичном узорковању млека из СМТ позитивних четврти за бактериолошко испитавање. Да би резултати били валидни неопходно је да се спречи контаминација узорака.

Узорци млека из СМТ позитивних четврти узети су после прања и сушења вимена и измузања првих млазева. Врх папиле дезинфикује се ватом натопљеном 76% алкохолом. Дезинфекција се врши тако што се врх папиле фиксира палцем и кажипрстом десне руке а у

леву руку се палцем и кажипрстом узме вата и врх папиле се брише снажним покретима (Слика 15).



Слика 15. Дезинфекција врха папиле [63]

Дезинфекција папила врши се по редоследу „ка себи”, јер се тако избегава контаминација дезинфиковане папиле руком за време дезинфиковања осталих папила. Најпре се бришу папиле са супротне стране од оне на којој се налази лице које узима узорке и то прво предња, па задња папила. Затим се бришу папиле са стране на којој је лице које узима узорке и то прво предња па задња.

Приликом овог поступка немирне животиње потребно је фиксирати, а пожељно је да се фиксира и реп животиње да не би ногом или репом контаминирала дезинфиковану папилу или саму епрувету.

Узимање узорака се врши тако што се стерилна епрувета са поклопцем узме у леву руку, малим прстом десне руке се скида поклопац и држи се у руци за време узимања узорка. Палцем и кажипрстом десне руке се врши измузање неколико млазева млека у епрувету. Након тога се поклопац враћа на епрувету и она се обележава унапред припремљеном налепницом на којој је број и ознака четврти из које је узорак узет. У циљу спречавања контаминације потребно је водити рачуна да доњи део поклопца епрувете не дође у додир са било којим предметом у штали, као и да не дође до контакта врха папиле и епрувете. Редослед узимања узорака млека је “од себе” односно супротно од редоследа којим се врши дезинфекцију папила.

После завршеног узорковања узорци се транспортују до лабораторије у ручном фрижидеру при 4°C. Узорци треба да стигну до лабораторије у што краћем року, а најдуже за шест сати.

4.4. Изолација и идентификација изолата *Staphylococcus aureus*

Идентификација *Staphylococcus aureus* урађена је на основу изгледа колонија на крвном агару, микроскопских особина, а потврђена је на основу изгледа колонија на агару по Берд-Паркеру (Baird-Parker), коагулаза теста са плазмом кунића, употребом API Staph теста (BioMerieux) и доказивањем присуства гена за синтезу нуклеазе PCR методом.

4.4.1 Засејавање на крвни агар

Узорци млека из СМТ позитивних четврти вимена крава као и секрета из вимена крава са клиничким маститисом су, одмах након узорковања, у хладном ланцу однети у лабораторију. После пола сата стајања на собној температури засејавани су на крвни агар (Табела 4).

Табела 4. Састав подлоге крвни агар

Састојци	Количина
Екстракт говеђег меса	10,0 g/L
Триптон	10,0 g/L
Натријум хлорид	5,0 g/L
Бактериолошки агар	15,0 g/L
Дефибринисана овчија крв	5 – 7 %

4.4.1.1. Припремање подлоге

Суспендује се одређена количина дехидроване подлоге, по упутству произвођача у 1000 mL дестиловане или дејонизоване воде. Загрева се до потпуног растварања. Стерилише се у аутоклаву 15 минута на 121°C. Охлади се на $47 \pm 2^\circ\text{C}$ и у асептичним условима дода се 5 до 7% стерилне дефибринисане овчије крви. Добро се измеша и провери се финална рН вредност (Табела 5). Разлије се по 15 mL у стерилне Петријеве плоче Ø 90 mm, тако да дебљина слоја подлоге у Петријевој плочи износи најмање 4 mm.

Табела 5. Карактеристике крвног агара

Карактеристике медијума	
Циљна група	<i>Streptococcus spp, Staphylococcus spp, Pneumococcus spp.</i>
рН (при 25°C)	7,2 ± 0,2
Стерилизација	121°C / 15 минута
Потребни додаци	5 до 7% дефибринисане овчије крви
Растварање	У 1000 mL дестиловане или дејонизоване воде
Искористљивост медијума	У зависности од врсте употребљеног основног медијума и количине додате крви.

4.4.1.2. Поступак рада и читавање резултата

Засејавање се врши потезом, бактериолошком езом, из претходно добро хомогенизованог узорка млека или секрета вимена крава, или директно узетим брисевима гуше људи. Инкубација је 24 до 48 сати на 37°C у аеробним условима.

Бактериолошко читавање засејане и инкубиране подлоге врши се на основу изгледа колонија. На крвном агару колоније *Staphylococcus aureus* расту у виду великих округлих, белих, сиво-белих и златно-жутих колонија, често уз појаву хемолизе

4.4.2. Микроскопски препарат

4.4.2.1. Бојење по Граму

На чисто предметно стакло нанесе се кап физиолошког раствора. Са крвног агара узме се езом типична колонија за коју се претпоставља да је колонија *Staphylococcus aureus*. Мала количина културе микроорганизама суспендује се у физиолошком раствору на предметном стаклу. Кружним покретима езе суспензија се развуче по површини плоче, водећи при том рачуна да размаз буде што тањи. Размаз се суши топлотом изнад пламеника (превлачењем предметног стакла неколико пута преко пламена).

На препарат, који је претходно охлађен до собне температуре наноси се примарна боја – генцијана љубичасто (*Gentian violet*), која се остави да стоји 2 до 3 минута на предметном стаклу. После истека наведеног времена, одлије се боја и сипа се без испирања Луголов раствор који стоји на препарату 1 до 2 минута. Одбојавање примарне плаве боје врши се 96% етил алкохолом уз лагано померање препарата све док се боја појављује, а затим се препарат испере водом. На испрани препарат сипа се неколико капи секундарне боје карбол фуксина и остави се да стоји на препарату 15 до 30 секунди (ако се користи сафранин као секундарна боја стоји само 10 секунди на препарату). На крају, препарат се добро испере водом и остави да се осуши на собној температури. Тако припремљен препарат посматра се под

микроскопом имерзионим објективом уз употребу кедровог уља. *Staphylococcus aureus* је лоптастог облика, груписан у гроздове, плаво-љубичасте боје (грам-позитиван).

4.4.3. Засејавање на агар по Берд-Паркеру

Са крвног агара узме се езом типична колонија за коју се претпоставља да је колонија *Staphylococcus aureus* и нанесе се на плочу са агаром по Берд-Паркеру. Аеробна инкубација подлога врши се при 37°C, а преглед се врши после 24 и 48 сати.

4.4.3.1. Припремање подлоге са агаром по Берд-Паркеру

За припрему основне подлоге састојци или дехидрирана комплетна основна подлога, растворе се кључањем у води (Табела 6). Ако је потребно, подеси се рН тако да после стерилизације буде $7,2 \pm 0,2$ при 25°C. Пренесе се подлога у количинама од по 100 mL у балоне или боце одговарајуће запремине. Подлога се стерилише током 15 минута при 121°C.

Табела 6. Састав основне подлоге

Састав	Количина
Производ разлагања казеина панкреасним ензимима	10,0 g
Екстракт квасца	1,0 g
Екстракт меса	5,0 g
Натријум-пируват	10,0 g
Л-глицин	12,0 g
Литијум-хлорид	5,0 g
Агар (у зависности од јачине гела)	12 g до 22 g
Вода до коначне запремине од	1000 mL

Раствор калијум-телурита се припрема на следећи начин: Калијум-телурит (K_2TeO_3) се потпуно раствори у води (1,0 g на 100 mL воде) уз минимално загревање. Прах калијум-телурита треба да буде лако растворљив. Ако је у води присутна бела нерастворљива супстанција, калијум-телурит се одбаци. Стерилише се филтрацијом коришћењем мембрана са порама величине 0,22 μm . Овај раствор може да се чува највише један месец при $3 \pm 2^\circ C$. Раствор се одбаци ако се формира бели талог.

Емулзија жуманца се припрема да концентрација буде приближно 20%. Користе се свежа кокошија јаја са неоштећеном љуском. Јаја се очисте четкицом уз коришћење течног

детерцента. Исперу се под текућом водом, а затим се љуске дезинфикују тако што се јаја потопе у 70% етил алкохол током 30 секунди и осуше се на ваздуху или се попрскају алкохолом, а затим стерилишу пламеном. Настављајући поступак у асептичним условима, разбије се свако јаје и одвоји жуманце од беланцета тако што се жуманце више пута пренесе из једне половине љуске у другу. Жуманца се ставе у стерилни балон и дода се стерилна вода у запремини четири пута већој од запремине жуманаца. Добро се промеша. Смеша се греје у воденом купатилу при 47°C током 2 сата и остави се током 18 до 24 сата на температури од $3 \pm 2^\circ\text{C}$ како би се омогућило формирање талога. Асептичним путем се сакупи емулзија изнад талога у нови стерилни балон за коришћење. Емулзија може да се чува при $3 \pm 2^\circ\text{C}$ највише 72 сата.

Комплетна подлога се састоји од 100 mL основне подлоге, 1,0 mL раствора калијум-телурита и 5,0 mL емулзије жуманца. Основна подлога се истопи, а потом се охлади у воденом купатилу на приближно 47°C. Под асептичним условима додају се друга два раствора, с тим што се сваки раствор претходно загреје у воденом купатилу на 47°C уз добро мешање после сваког додавања.

Одговарајућа количина комплетне подлоге стави се у стерилне Петријеве плоче, како би се добио агар дебљине око 4 mm, и остави се да очврсне. Плоче могу да се чувају, пре сушења, до 24 сата при $3 \pm 2^\circ\text{C}$.

Пре употребе, плоче се суше, најбоље са скинутим поклопцима и површином агара окренутом надолу, у сушници подешеној на температуру између 25 и 50°C, све док капљице не нестану са површине подлоге.

4.4.3.2. Поступак рада

Помоћу прибора за наношење пажљиво се нанесе инокулат што је брже могуће преко површине плоче са агаром, ако је могуће без додиривања обода плоче. Плоче се покlope и оставе да се суше око 15 минута на собној температури.

Плоче се окрену и инкубирају се током 24 ± 2 сата, а затим се поново инкубирају током следећа 24 ± 2 сата у инкубатору на 37°C.

4.4.3.3. Очитавање резултата

После инкубације од 24 ± 2 сата, обележе се на дну плоча положаји свих присутних типичних колонија. Типичне колоније су црне или сиве, светлוצаве и конвексне (пречника од 1 mm до 1,5 mm после инкубације од 24 сата, и пречника од 1,5 mm до 2,5 mm, после инкубације од 48 сати) и окружене су зоном просветљења која може да буде делимично

мутна. После инкубације од најмање 24 сата, у овој зони просветљења може да се појави опалесцентан прстен у непосредном додиру са колонијама.

Поново се инкубирају све плоче на 37°C током следећа 24 ± 2 сата, и обележе се све нове типичне колоније. Такође се обележе и све присутне атипичне колоније.

Атипичне колоније имају исту величину као и типичне колоније и могу имати једну од следећих морфологија:

- светлуцаве црне колоније са уским белим рубом или без њега; зона просветљења не постоји или је једва видљива и опалесцентан прстен не постоји или је једва видљив;
- сиве колоније без зоне просветљења.

Атипичне колоније углавном формирају сојеви коагулаза позитивних стафилокока које контаминирају, на пример, производе од млека, рачиће и изнутрице. Њих ређе формирају сојеви коагулаза позитивних стафилокока које контаминирају друге производе.

Друге колоније су све преостале колоније које су евентуално присутне на подлози, а које не показују типичан или атипичан изглед и сматрају се секундарном флором.

4.4.4. Коагулаза тест са плазмом кунића

Помоћу стерилне убудне езе узме се део са површине сваке изабране колоније и пренесе у епрувету или боцу са ВНИ бујоном (brain-heart infusion broth, мождано-срчани бујон). Инкубира се при 35°C или 37°C током 24 ± 2 сата. Асептичним путем дода се 0,1 mL сваке културе у 0,3 mL плазме кунића у стерилним епруветама за хемолизу или боцама и инкубира се при 35°C или 37°C.

Нагињањем епрувете прегледа се да ли се плазма згрушава после 4 до 6 сати инкубације и, ако је тест негативан, поново се прегледа после 24 сата инкубације. Сматра се да је коагулаза тест позитиван ако запремина угрушка заузима више од половине првобитне запремине течности. Као негативна контрола, за сваку серију плазме, дода се 0,1 mL стерилног ВНИ бујона у препоручену количину плазме кунића и инкубира се без инокулације. Да би тест био валидан, контролна плазма не сме да показује знаке згрушавања.

4.5. Одређивање присуства гена за синтезу нуклеазе

Сви изолати *Staphylococcus aureus* потврђени су молекуларно-биолошким испитивањима и то на присуство гена за синтезу нуклеазе (описано у оквиру молекуларно-биолошких испитивања).

4.6. Испитивање биохемијских особина API Staph – bioMérieux

После изолације *Staphylococcus aureus* из узорака млека крава са субклиничким и клиничким маститисом, вршено је испитивање биохемијских особина употребом комерцијалног API Staph теста, како ових изолата, тако и изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од људи.

API Staph трака састоји се од 20 микроепрувета у којима се налази дехидрирана подлога. У ове микроепрувете инокулише се суспензија испитиване бактеријске културе, припремљена у приложеном API Staph медијуму. Током инкубације, метаболизам доводи до промене боје која је или спонтана или видљива после додавања реагенаса. Реакција се читава према табели или употребом софтвера за идентификацију (Табела 7).

Табела 7. Упутство за читавање резултата на API Staph траци

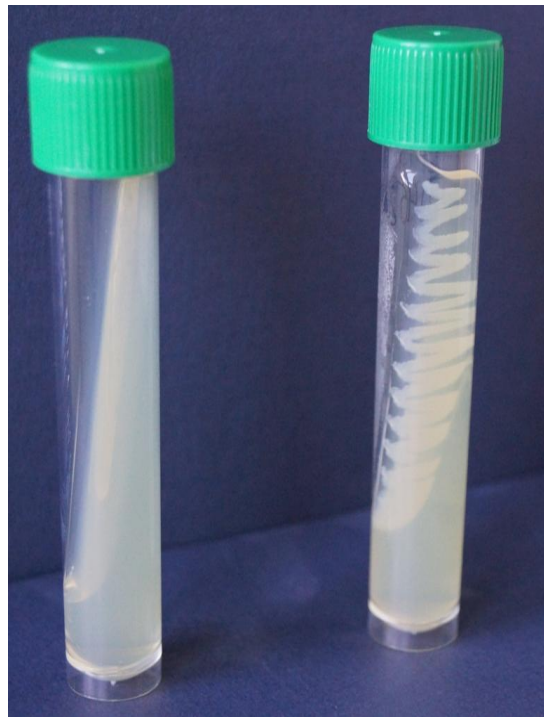
Тест	Резултати	
	негативно	позитивно
URE	жуто	наранцасто
ADH	жуто	наранцасто-црвено
ODC		
ESC	бледо сиво	браон-црно
GLU	црвено или црвено-наранцасто	жуто или жуто-наранцасто
FRU		
MNE		
MAL		
LAC		
TRE		
MAN		
RAF		
RIB		
CEL		
NIT	безбојно	розе-љубичасто
VP	безбојно	розе-црвено
β GAL	безбојно, бледо љубичасто, бледо наранцасто	љубичасто
ArgA	безбојно, бледо наранцасто	наранцасто
PAL	безбојно, бледо љубичасто, бледо наранцасто	љубичасто
PyrA	безбојно, бледо наранцасто	наранцасто
SAC	црвено, црвено-наранцасто	жуто-наранцасто
NAG		
TUR		
ARA		
β GUR	безбојно	жуто

4.7. Начин чувања изолата између анализа

4.7.1 Коси агар

Триптиказа-соја агар је универзална подлога за раст на којој могу да се култивишу и аеробни и анаеробни микроорганизми. У састав подлоге улазе пептон из казеина, пептон из соје, натријум-хлорид и агар. Финални рН подлоге је $7,3 \pm 0,2$ при 25°C . Суспендује се 40 g праха у 1000 mL хладне дестиловане воде и остави се да стоји 15 минута. Лагано се загреје до кључања да би се подлога потпуно растворила. Стерилише се у аутоклаву 15 минута на 121°C . Подлога се охлади на 50 до 55°C . Добро се промеша и разлије се у епрувете, а затим стерилише и остави да се стегне у косом положају.

Езом се култура засејава по површини косог агара и чува се у фрижидеру. Под тим условима култура може да се чува 2 недеље. Затим се поново пресејава и то на крвни агар (37°C , 24 сата) па по потреби опет на коси агар (Слика 16).



Слика 16. Коси агар без и са израслим колонијама

4.7.2. Дубоко замрзавање

За дуготрајно чување изолата користи се триптиказа-соја бујон. Бујон са културом се сипа у криоепрувете и дода се 20 до 30% глицерола. Изолати се тако чувају у замрзивачу при -80°C (Слика 17). Оживљавају се у триптиказа-соја бујону при температури од 37°C у току 24 сата после чега се езом пресејавају на жељене подлоге и користе у даљем раду.



Слика 17. Криоепрувета са културом за дуготрајно чување у замрзивачу

4.8. Испитивање способности синтезе стафилококних ентеротоксина ELFA методом

Испитивање способности синтезе стафилококних ентеротоксина вршено је имуноензимским тестом VIDAS[®] SET2, коришћењем ELFA методе. VIDAS[®] SET2 је имуноензимски тест за скрининг хране на присуство 7 ентеротоксина (SEA, SEB, SECs, SED и SEE). Намењен је за употребу на аутоматизованом VIDAS[®] систему (Слика 18), а заснива се на детекцији антигена стафилококног ентеротоксина.

Апарат инсуфлира одређену количину обогаћеног узорка из посебног стрипа са 10 базенчића кроз пластични наставак обложен анти-стафилококни ентеротоксин антителима. У случају да у узорку има ентеротоксина, антитела импрегнирана у зиду наставка везују се за антигене ентеротоксина. Наставак се потом вишеструко испира да би се избацио вишак реактаната, а затим се инсуфлира раствор са комплексом антитело-алкална фосфатаза који се веже за комплексе антиген-антитело. Након следећег испирања, финално се инсуфлира раствор супстрата (4-метил умбелиферил фосфат) из последњег базенчића. Коњугат ензим катализује хидролизу супстрата у флуоресцентно једињење 4-метил умбелиферон, а интензитет флуоресценције мери се аутоматски на 450 nm. Инструмент затим прерачунава резултате и пореди их са вредношћу интерне референце (прага) и интерпретира резултат као позитиван или негативан.



Слика 18. VIDAS® апарат

4.8.1. Опрема, реагенси и подлоге

Апарати:

- UV лампа;
- Апарат за дејонизацију воде;
- Аутоклав;
- Бунсенов пламеник;
- Хомогенизатор (Stomacher);
- Vortex – апарат за вибрацију кивета;
- Центрифуга 1000-10 000 g;
- VIDAS® апарат;
- pH метар (тачност калибрације $\pm 0,1$ pH јединица при температури од 20 до 25°C).

Реагенси/подлоге:

- Трихлоросирћетна киселина 5,5N;
- Натријум хидроксид 1N и 4N;
- Хлороводонична киселина 5N.

Компоненте кита:

- SET2 SPR® наставци, 30 комада;
- SET2 стрипови, 30 комада;
- SET2 стандард, 6 mL;
- SET2 позитивна контрола, 6 mL;
- SET2 негативна контрола, 6 mL;
- SET2 конц. пуфер за екстракцију, 55 mL;
- MLE карта, 1 комад.

4.8.2. Припрема за испитивање и поступак рада

Дванаесточасовна суспензија испитиваног изолата *Staphylococcus aureus*, инактивише се држањем у термоблоку при температури од 95°C током 15 минута. Када се суспензија охлади, пипетира се по 0,5 mL у одговарајући базенчић у стрипу.

4.8.3. Приказивање резултата

Након завршетка аутоматизованог имуноензимског поступка, инструмент аутоматски анализира резултате. Флуоресценција се мери два пута у стрипу са испитиваним узорком. Прво читање обухвата позадински шум, пре него што SPR наставак буде урођен у супстрат. Друго читање одвија се након инкубације супстрата са ензимом унутар SPR наставка. Измерена вредност RFV (релативна флуоресцентна вредност) добија се одузимање вредности шума од финалног резултата и резултат се штампа. Добијену RFV вредност VIDAS® систем дели са RFV вредношћу стандарда и уколико је количник већи од вредности прага узорак је позитиван и сматра се позитивним на присуство стафилококног ентеротоксина.

4.9. Осетљивост на антимикробне лекове

4.9.1. Диск-дифузиона метода по Кирби-Бауеру

Осетљивост изолат на антимикробне лекове испитана је диск дифузионом методом по Кирби Бауеру (Kirby-Bauer). За рад се користи Милер-Хинтон (МН - Müller-Hinton) агар (Табела 8). Састојци се кувају у дестилованој води до потпуног растварања. Стерилше се у аутоклаву на 121°C током 15 минута. Потребно је подесити рН на $7,3 \pm 0,1$ при 25°C. Разлива се у Петријеве плоче, тако да дебљина подлоге буде 4 mm.

Табела 8. Основни састав подлоге Милер-Хинтон агар

Састојци	Количина (g/L)
Екстракт меса	3,0
Казеин хидролизат	17,5
Скроб	1,5
Агар	16,0
Mg	25
Ca	75

Да би се испитивани микроорганизми равномерно нанели на Милер-Хинтон агар користи се стерилни брис. Урони се у бујонску културу испитиваног микроорганизма, вишак течности се уклони пажљивим притискањем бриса уз унутрашњи зид епрувете. Да би се добио равномеран раст, најпре се култура наноси у једном правцу, а затим се Петријева плоча окрене за 90° и поново се наноси. Окретање плоче се понови 3 пута. Сушење плоче

траје око 5 минута. Дискови са антимикуробним средствима наносе се пинцетом, стерилисаном на пламенику, на тако припремљену подлогу, уз благо притискање сваког диска прилоком спуштања. Инкубација траје 16 до 20 сати при температури од $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

Микроорганизми ће расти на подлози у зависности од тога да ли примењени антимикуробни лек инхибира њихов раст и у којој мери. Ако је микроорганизам сензитиван на одређени антимикуробни лек, око диска неће бити раста. Осетљивост микроорганизама процењује се на основу пречника зоне инхибиције према упутству Европског комитета за испитивање антимикуробне осетљивости (EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) приказаном у табели 9 и означава се као осетљив (S) интермедијерно осетљив (I) или резистентан (R).

За испитивање осетљивости употребљени су комерцијално произведени дискови који су садржавали: амоксицилин 25 μg , амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 μg , ампицилин 10 μg , бацитрацин 0,04 i.j., неомицин 30 μg , новобиоцин 5 μg , пеницилин Г 10 i.j., тетрациклин 30 μg , триметоприм 5 μg и триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 μg .

Табела 9. Стандарди за процену осетљивости изолата *Staphylococcus aureus* на поједине антимикуробне лекове према упутству Европског комитета за испитивање антимикуробне осетљивости (EUCAST)

Антимикуробни лек	R	I	S
Амоксицилин 25 μg	≤ 14	15-20	≥ 21
Амоксицилин/клавуланска киселина (20/10) μg	≤ 19	-	≥ 20
Ampicilin 10 μg	≤ 28	-	≥ 29
Бацитрацин 0,04 i.j.	≤ 8	9-12	≥ 13
Неомицин 30 μg	≤ 12	13-16	≥ 17
Новобиоцин 5 μg	≤ 17	18-21	≥ 22
Пеницилин Г 10 i.j.	≤ 28	-	≥ 29
Тетрациклин 30 μg	≤ 14	15-18	≥ 19
Триметоприм 5 μg	≤ 10	11-15	≥ 16
Триметоприм/сулфаметоксазол (1.25/23.75) μg	≤ 10	11-15	≥ 16

R – резистентан, I - интермедијерно осетљив, S – осетљив

4.9.2. Slidex MRSA тест „bioMérieux“

Slidex MRSA detection је брзи тест за детекцију MRSA сојева произвођача „bioMérieux“. Заснива се на детекцији присуства PBP2' протеина одговорног за резистенцију на метицилин, методом латекс аглутинације.

У састав Slidex MRSA detection теста улазе сензибилисани латекс, латекс за негативну контролу, реагенси за издвајање 1 и 2, као и картице и штапићи за мешање за једнократну употребу. Изводи се по упутству произвођача.

4.10. Молекуларно-биолошка испитивања

4.10.1. Подлоге и реагенси

- Рингеров раствор – осмотски инертан раствор за прављење разређења, произвођач Oxoid, Велика Британија;
- ВНИ (Brain-Heart Infusion) бујон – неселективна подлога за обогаћење, произвођач Oxoid, Велика Британија;
- DNeasy Blood & Tissue Kit – кит за изолацију ДНК, произвођач Qiagen, Немачка;
- Протеиназа К – произвођач Merck, Немачка;
- Изопропанол – произвођач Merck, Немачка;
- Етанол 96% – произвођач Merck, Немачка;
- Amplitaq Gold PCR Master Mix (2x) – кит за припрему реакционе смеше, произвођач Invitrogen, САД;
- Агарозни гел у праху, произвођач Invitrogen, САД;
- Етидијум бромид – произвођач Sigma Aldrich, Немачка;
- 10× TBE Buffer – произвођач Gibco, Life Technologies;
- GeneRuler 100 bp DNA Plus Ladder – боја за визуелизацију амплификованих секвенци у електрофоретском пољу, произвођач Thermo Scientific, Велика Британија;
- SYBR Green MasterMix (2x) – кит за припрему *RealTime* PCR реакционе смеше, произвођач Invitrogen, САД;
- Сет прајмера – *nuc-f*, *nuc-r*, *spr-f*, *spr-r*, *mecA-f*, *mecA1-r*, *mecC-f*, *mecC-r*, *PVL-f*, *PVL-r* (100 μM) - произвођач Invitrogen, САД.

Табела 10. Списак прајмера коришћених у испитивањима

Прајмер	Таргет ген	Дужина амплификоване секвенце (bp)	Секвенца
<i>nuc-f</i> <i>nuc-r</i>	<i>nuc</i>	255	5'- TCAGCAAATGCATCACAACAG -3' 5'- CGTAAATGCACTTGCTTCAGG -3'
<i>spr-f</i> <i>spr-r</i>	<i>spr</i>	180-600	5'- TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC -3' 5'- CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT -3'
<i>mecA-f</i> <i>mecA-r</i>	<i>mecA</i>	162	5'- TCCAGATTACAACCTCACCAGG -3' 5'- CCACTTCATATCTTGTAACG -3'
<i>mecC-f</i> <i>mecC-r</i>	<i>mecC</i>	138	5'- GAAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC -3' 5'- GAAGATCTTTCCGTTTTCAGC -3'
<i>PVL-f</i> <i>PVL-r</i>	<i>PVL</i>	85	5'- GCTGGACAAAACCTTCTTGGAATAT -3' 5'- GATAGGACACCAATAAATTCTGGATTG -3'

4.10.2. Поступак рада

Прво су изоловане укупне нуклеинске киселине из свих 86 узорака. У сваку од Eppendorf минутубица које су садржавале преципитиране бактеријске ћелије из 2 mL дванаесточасовне ВНИ бујонске културе, додато је по 180 μL пуфера ATL и по 20 μL протеиназе К концентрације 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Узорци су потом постављени у водено купатило на температуру од 56°C у трајању од 120 минута.

Након инкубирања и лизирања бактеријских ћелија, у сваки од узорака пипетирано је по 200 μL пуфера AT и по 200 μL 96% етанола. Узорци су потом мешани на вибратору за епрувете током 10 секунди. Након мешања, по 500 μL узорка пипетирано је у Minispin колоне, које су потом центрифугиране током 1 минута при 13 000 о/min. Филтрат је одбачен, а у сваку колону је додато по 500 μL пуфера за пречишћавање AW1. Колоне су поново центрифугиране током 1 минута при 13 000 о/min. Филтрат је одбачен, а у сваку колону је додато по 500 μL пуфера за пречишћавање AW2. Колоне су поново центрифугиране током 3 минута при 13 000 о/min до исушивања мембране колоне. Филтрат је одбачен, а у сваку колону је додато по 200 μL пуфера за елуацију АЕ. Колоне су поново центрифугиране током 1 минута при 13000 о/min и елуат је прикупљен у Eppendorf минутубице од 1,5 μL .

Концентрација и чистоћа сваког појединачног елуата ДНК испитана је на UV спектрофотометру. За даљи рад, елуати ДНК нормализовани су на концентрацију од 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ и чистоћу $\lambda_{260/280} = 1,8-2,0$.

После 24 сата узорци су амплификовани на конвенционалном и Real Time PCR уређају. За сваки од испитиваних гена припремљен је посебан пуфер чији је састав дат у табели 11.

Табела 11. Састав пуфера за Real Time PCR

Састав и концентрације компоненти	
2xПуфер	25,0 μL
Ген- f	1,0 μL
Ген- r	1,0 μL
Стерилна H ₂ O	22,0 μL
ДНК испитиваног узорка	1,0 μL
Укупни волумен пуфера	50,0 μL

За извођење конвенционалне и Real Time PCR реакције припремљен је програм:

- Иницијална денатурација при 95°C у трајању 5 минута;
- 30 циклуса (30 секунди при 95°C, 60 секунди при 59°C, 60 секунди при 72°C);
- Финална елонгација при 72°C у трајању 10 минута.

Очекивана величина PCR производа износи:

- *Nuc* (255 bp); указује на присуство гена за синтезу ензима нуклеазе који је јединствени маркер за идентификацију *Staphylococcus aureus*. Уколико не постоји трака за *nuc* ген, изолат није припадник врсте *Staphylococcus aureus*.
- *Spa* (варијабилно: 180 до 600 bp); указује на присуство гена за синтезу стафилококног протеина А који је јединствени маркер за идентификацију *Staphylococcus aureus*. Уколико не постоји трака за *spa* ген, изолат није припадник врсте *Staphylococcus aureus*, већ друге врсте и неопходна је идентификација биохемијским методама.
- *mecA* (162 bp); указује на присуство гена за синтезу протеина PBP2A (Penicillin binding protein 2A).
- *mecC* (138 bp); указује на присуство гена за синтезу хомологног *mecA*. Овај ген изолован је из MRSA пореклом из људи и говеда.
- PVL (~85 bp); указује на присуство гена за синтезу Пантон-Валентин леукоцидина који би могао бити присутан у неким од изолата.

4.11. Секвенцирање и одређивање филогенетске сродности изолата

Као основа за молекуларну идентификацију изолованих сојева *Staphylococcus aureus* и одређивање њихове филогенетске сродности коришћена је секвенца ДНК величине 200 до 600 базних парова. Овај ген (*spa*) кодира синтезу стафилококног протеина А.

Укупно 86 узорака изоловане ДНК амплификовано је паром прајмера *spa-f* и *spa-g*. Добијени амплификати визуелизовани су на 1,5% агароза гелу, а затим су пречишћени на Qiaquick mini spin (Qiagen, Hilden, Немачка) колонама. Након поновне провере визуелизацијом амплификата као траке од приближно 200 до 600 bp у агароза гелу, узорци су припремљени за секвенцирање.

Секвенцирање је извршено у компанији GATC BIOTECH, Келн, Немачка. За секвенцирање је коришћено 86 узорака од по 20 µL пречишћеног амплификата. Коришћена је техника One Shot Read MP на апарату Roche GS FLX Titanium 454. Резултати секвенцирања представљени су у облику хроматограма и датотека у FASTA формату. За идентификацију изолата, датотеке у FASTA формату учитане су у BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) софтвер и одабран је алгоритам за препознавање високосличних секвенци код микроорганизама. Обрадом података о секвенцираним деловима гена за синтезу стафилококног протеина А добијени су резултати идентификације изолата

Staphylococcus aureus у виду назива врсте и/или подврсте као и о проценту поклапања редоследа база испитиваних сојева.

Да би се испитала филогенетска сродност добијених сојева, њихове секвенце нуклеотида поређане су и поравнате коришћењем софтверског алата ClustalW Omega Multiple Sequence Alignment (The European Bioinformatics Institute). Филогенетска анализа испитана је за сваку секвенцу коришћењем „parsimony“ софтверског пакета (MABL) са 1000 bootstrap-ова и коришћењем „neighbour-joining“ алгоритма. За испитивање могућности међусобног комбиновања секвенци, коришћен је Templeton непараметријски Wilcoxon Signed Rank тест. Хоризонтална линија на стаблу показују количину еволутивне генетске промене сваког изолата током времена. Што је линија дужа, то је генетска промена израженија. Дужина линије испод слике филограма означава скаларну вредност те промене, у овом случају 0,01 или 1% генетске промене. Генетска промена односи се на број супституисаних нуклеотида по свакој секвенци. Вертикалне линије немају никакав значај, само визуелно спајају хоризонталне линије [73-78].

По завршетку идентификације молекуларно-биолошким методама добијене секвенце ДНК испитиваних сојева *Staphylococcus aureus* депоноване су у јавну базу података нуклеотидних секвенци Genbank која је део међународне групе база података нуклеотидних секвенци (у надлежности Националног центра за биотехнолошке информације САД).

5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

5.1. Идентификација крава са поремећеном секрецијом

На 46 газдинстава са високопродуктивним кравама идентификовано је 111 четврти вимена крава са поремећеном секрецијом.

5.2. Изолација и идентификација изолатата *Staphylococcus aureus*

5.2.1. Изолација и идентификација изолатата *Staphylococcus aureus* и преваленца код СМТ позитивних крава

Из узорака млека узетих из 111 СМТ позитивних четврти вимена крава код 62 (55,86%) је изолован *Staphylococcus aureus* и ови изолати чине прву групу. У табели 12 је приказан број изолатата *Staphylococcus aureus* пореклом од СМТ позитивних четврти вимена крава као и број и величина газдинстава са којих потичу.

Табела 12. Број изолатата *Staphylococcus aureus* у I групи, величина и број газдинстава са којих потичу

Величина газдинства (број крава)	Газдинства (број)	Број (редни број) изолатата <i>Staphylococcus aureus</i>
1-5	34	41 (1-41)
6-10	7	8 (42-49)
11-20	3	8 (50-57)
21-100	2	5 (58-62)
УКУПНО	46	62 (1-62)

5.2.2. Изолација и идентификација изолатата *Staphylococcus aureus* из вимена крава са клиничким маститисом

Другу групу изолатата *Staphylococcus aureus* чини 13 изолатата, изолованих из узорака секрета вимена крава са 2 велике фарме (са преко 300 крава) од крава са клиничким маститисом и означени су бројевима од 63 до 75.

5.2.3. Изолација и идентификација изолата *Staphylococcus aureus* из брисева гуше људи

Трећу групу изолата *Staphylococcus aureus* чини 11 изолата, изолованих из брисева гуше људи, и означени су бројевима од 76 до 86.

На овај начин формирано је 3 групе изолата *Staphylococcus aureus* (Табела 13).

Табела 13. Број изолата *Staphylococcus aureus* по групама и њихово порекло

Група	Број и редни број изолата	Порекло
I	62 (1-62)	СМТ позитивне четврти вимена крава
II	13 (63-75)	Четврти вимена крава са клиничким маститисом
III	11 (76-86)	Брисеви гуше људи
УКУПНО	86 (1-86)	

5.3. Хемолиза

Свих 86 изолата *Staphylococcus aureus* на крвном агару показивали су хемолизу. β хемолизу показивало је 10 изолата, α хемолизу 21 изолат, а 55 изолата и α и β хемолизу (Табела 14).

Табела 14. Број изолата *Staphylococcus aureus* по групама и типу хемолизе

Тип хемолизе	Изолати <i>Staphylococcus aureus</i>			УКУПНО (86 изолата)
	I група (укупно 62)	II група (укупно 13)	III група (укупно 11)	
α	17 (27,42%)	2 (15,38%)	2 (18,18%)	21 (24,42%)
β	7 (11,29%)	3 (23,08%)	-	10 (11,63%)
$\alpha\beta$	38 (61,29%)	8 (61,54%)	9 (81,82%)	55 (63,95%)

Групе: I- од крава са субклиничким маститисом, II- од крава са клиничким маститисом, III-од људи

5.4. Биохемијска својства изолата *Staphylococcus aureus* на основу API Staph теста

На основу резултата API Staph теста потврђено је да 86 изолата пореклом из вимена крава и из брисева гуше људи припадају врсти *Staphylococcus aureus*.

Запажено је да на основу биохемијских особина постоје одређене сличности (Табела 15), али и разлике (Табела 16) између 86 изолата *Staphylococcus aureus*, на основу којих могу бити сврстани у 13 група (Табела 17).

Табела 15. Биохемијска својства заједничка за све изолате *Staphylococcus aureus* на основу API Staph теста

Биохемијска својства	Активна материја/састојак	Реакција / ензим
GLU+	Д-глукоза	ферментација - Д-глукоза
FRU+	Д-фруктоза	ферментација – Д-фруктоза
MNE+	Д-маноза	ферментација – Д-маноза
MAL+	Д-малтоза	ферментација – Д-малтоза
LAC+	Д-лактоза (бовиног порекла)	ферментација – Д-лактоза
TRE+	Д-трехалоза	ферментација – Д-трехалоза
MAN+	Д-манитол	ферментација – Д-манитол
NIT+	К-нитрат	редукција нитрата у нитрите
PAL+	β -нафтил-фосфат	алкална фосфатаза
SAC+	Д-сахароза	ферментација - Д-сахароза
NAG+	N-ацетил-глукозамин	ферментација - N-ацетил-глукозамин
RAF-	Д-рафиноза	ферментација - Д-рафиноза
RIB+	Д-рибоза	ферментација – Д-рибоза
CEL-	Д-целобиоза	ферментација - Д-целобиоза
ESC-	ескулин фери цитрат	хидролиза ескулина
ARA-	Л-арабиноза	ферментација - Л-арабиноза
β GUR-	4-нитрофенил- β -Д-глукуронид	β глукуронидаза

Табела 16. Заступљеност различитих биохемијских својстава изолата *Staphylococcus aureus* на основу API Staph теста

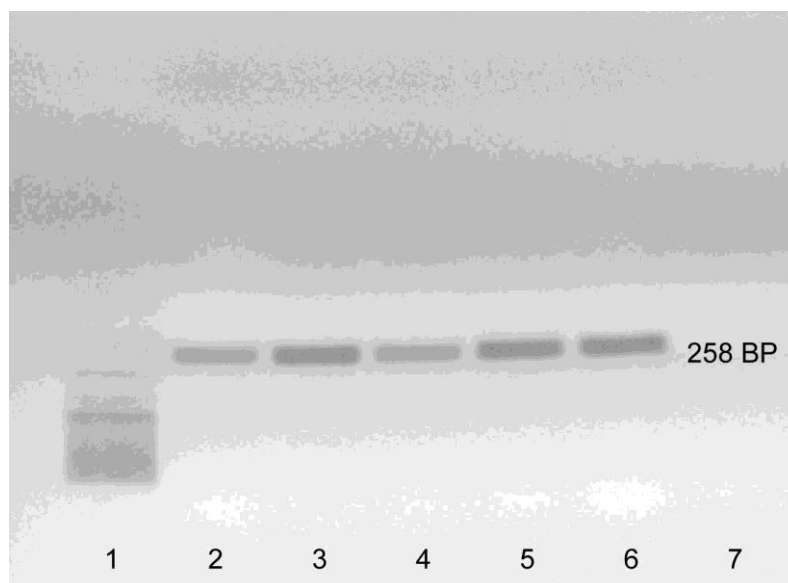
Биохемијска својства	%	Активна материја/састојак	Реакција / ензим
ODC-	98,84	Л-орнитин	орнитин декарбоксилаза
TUR+	97,67	Д-тураноза	ферментација - Д-тураноза
VP+	96,51	Na-пируват	продукција ацетоина (Voges-Proskauer)
β GAL-	88,37	2-нафтил- β -Д-галактопираносид	β галактозидаза
ADH+	81,40	Л-аргинин	аргинин дихидролаза
ArgA-	80,23	Л-аргинин β -нафтиламид	аргинин ариламидаза
URE-	61,63	уреа	уреаза
PyrA+	60,46	пироглутаминска киселина – β -нафтиламид	пиролидонил ариламидаза

Tabela 17. Међусобне сличности/разлике изолата *Staphylococcus aureus* у биохемијским својствима на основу API Staph теста

Изолати <i>Staphylococcus aureus</i> под бројевима	ODC	TUR	VP	β GAL	ADH	ArgA	URE	PyrA
3, 6, 7, 13, 14, 15, 52, 53, 64, 67, 68, 69, 71, 74, 84, 85, 86	-	+	+	-	+	-	+	+
2, 4, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 27, 28, 29, 30, 31, 36, 37, 38, 41, 42, 43, 48, 49, 55, 79	-	+	+	-	+	-	-	-
58, 59, 60, 70, 72, 76, 82	-	+	+	-	+	-	+	-
61, 62, 73, 78, 80	-	+	+	-	+	+	+	+
21, 24, 25, 32, 33, 44, 45, 54	-	+	+	-	-	-	-	+
26, 34, 35, 46, 47, 50, 51, 56	-	+	+	-	-	+	-	+
1, 5, 8, 9, 22, 23, 39, 40, 57, 63	-	+	+	+	+	-	-	+
65	-	+	-	-	+	-	+	+
75	-	+	-	-	+	+	+	-
77	-	+	-	-	+	+	-	+
83	-	-	+	-	+	+	+	+
66	-	-	+	-	+	-	-	+
81	+	+	+	-	+	+	+	-

5.5. Присуство гена за синтезу нуклеазе

PCR методом потврђено је присуство гена за синтезу нуклеазе код свих 86 изолата, чиме је потврђено да анализирани изолати припадају врсти *Staphylococcus aureus* (Слика 19).

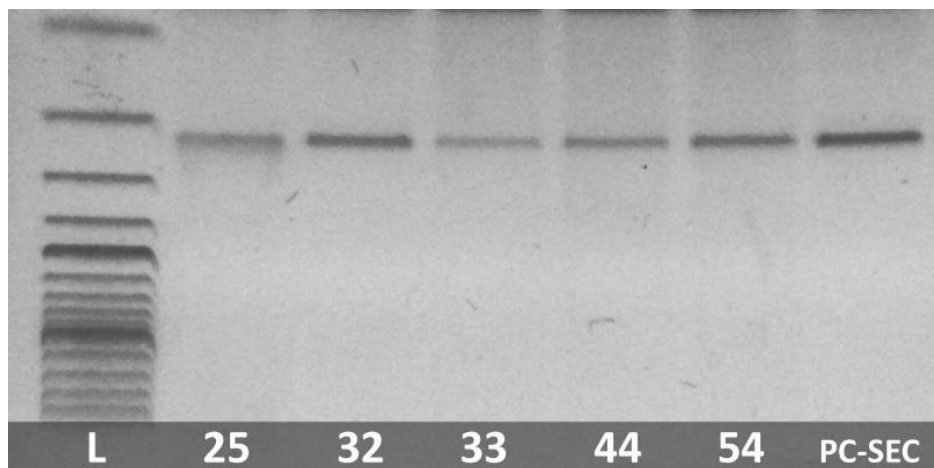


Слика 19. Агароза гел електрофореза – утврђивање присуства гена за синтезу нуклеазе изолата *Staphylococcus aureus*

5.6. Синтеза стафилококних ентеротоксина и присуство гена за њихову синтезу

Применом VIDAS® SET2 имуноензимског теста на присуство 7 ентеротоксина (SEA, SEB, SECs, SED и SEE) утврђена је способност синтезе стафилококних ентеротоксина код 5 од 75 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из узорака млека и секрета из вимена крава и то код изолата под бројевима 25, 32, 33, 44 и 54, као и код 6 од 11 (54,54%) изолата пореклом од људи и то код изолата под бројевима 77, 78, 80, 81, 83 и 84.

PCR методом потврђено је присуство гена за синтезу стафилококних ентеротоксина и утврђено је да је код свих изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из вимена крава присутан само ген за синтезу SECs. (Слика 20), док су изолати пореклом од људи имали и ген за синтезу SEB и ген за синтезу SECs.



Слика 20. Агароза гел електрофореза – детерминација SECs-позитивних изолата *Staphylococcus aureus*

5.7. Пантон-Валентин леукоцидин

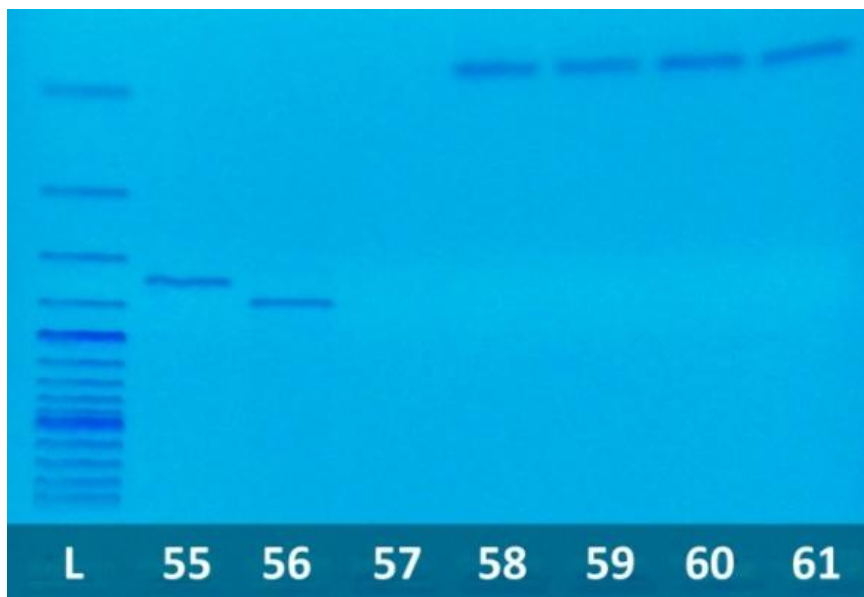
PCR методом утврђено је присуство гена за синтезу PVL код 5 од 75 (6,67%) изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из узорака млека и секрета четврти вимена крава и код 7 од 11 (63,64%) изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од људи. Сви изолати *Staphylococcus aureus*, позитивни на присуство гена за синтезу PVL, пореклом од крава, припадају I групи (Табела 13), што чини 5 (8,06%) од 62 изолата пореклом (Табела 18).

Пет PVL-позитивних изолата *Staphylococcus aureus* бовиног порекла, под бројевима 58, 59, 60, 61 и 62 (Слике 21 и 22), потичу са две од 46 фарми од СМТ позитивних четврти крава које су увезене.

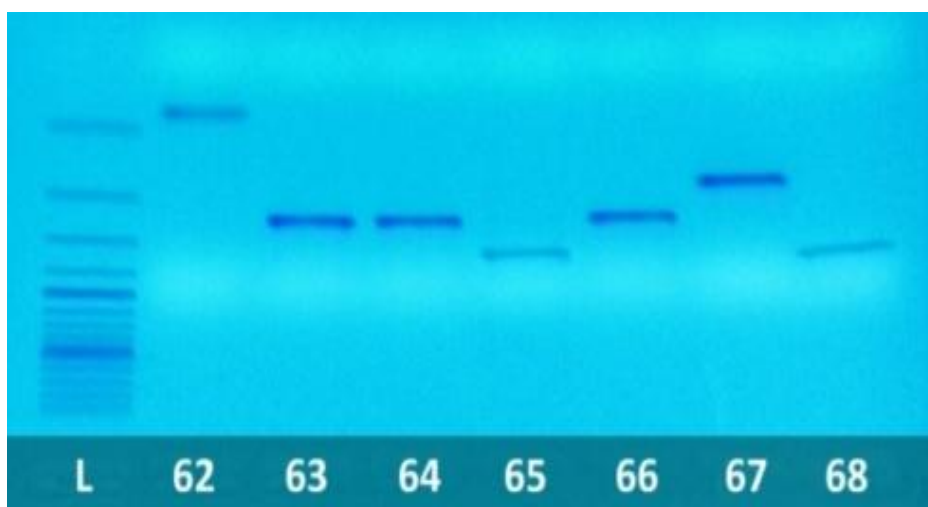
Табела 18. Налаз гена за синтезу PVL код изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од СМТ позитивних крава, крава са клиничким маститисом и од људи

Присуство гена за синтезу		Изолати <i>Staphylococcus aureus</i>			
		I група (укупно 62)	II група (укупно 13)	I и II група (укупно 75)	III (укупно 11)
PVL	+	5 (8,06%)	/	5 (6,67%)	7 (63,64%)
	-	57 (91,94%)	13 (100%)	70 (93,33%)	4 (36,36)

Групе: I- од крава са субклиничким маститисом, II- од крава са клиничким маститисом, III-од људи



Слика 21. Агароза гел електрофореза -детерминација PVL-позитивних изолата *Staphylococcus aureus* (изолати од броја 58 до 61)



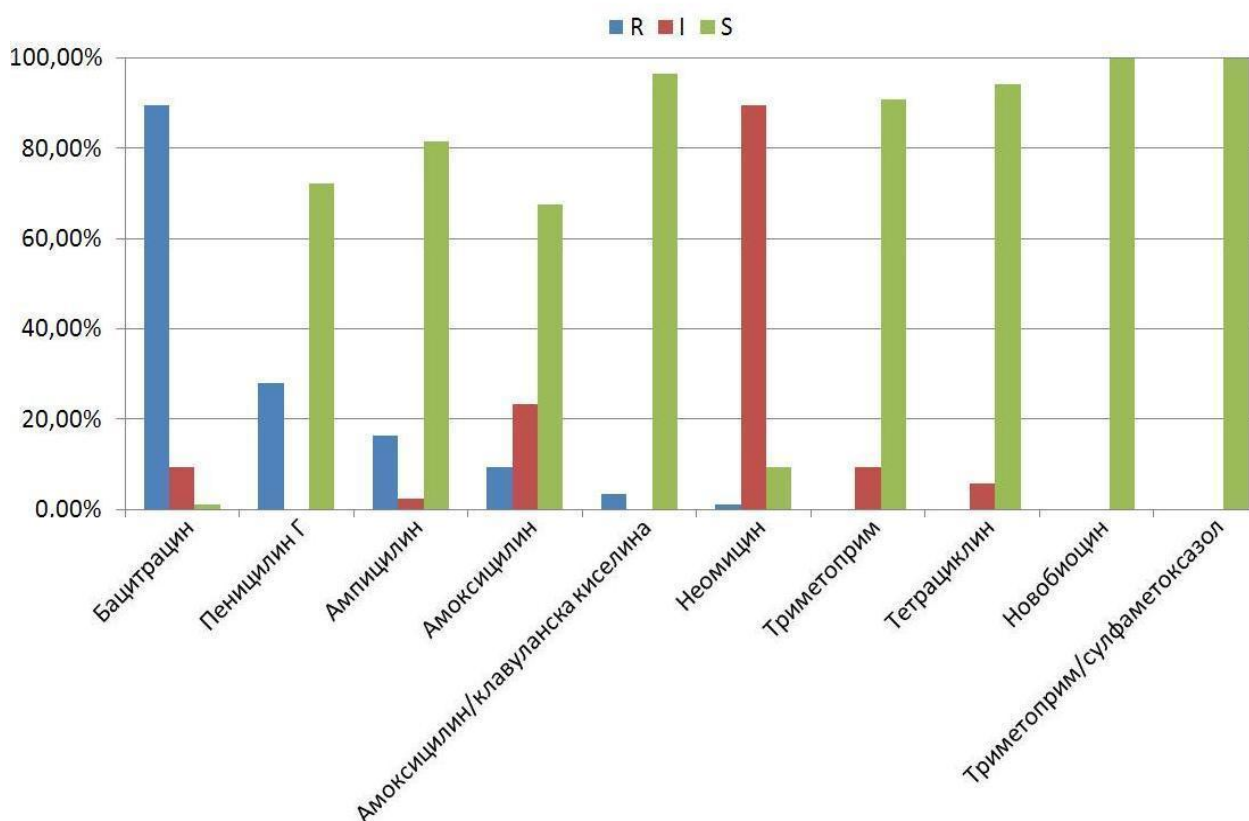
Слика 22. Агароза гел електрофореза -детерминација PVL-позитивних изолата *Staphylococcus aureus* (изолат број 62)

5.8. Осетљивост изолата *Staphylococcus aureus* на антими­кробне лекове

Осетљивост изолата *Staphylococcus aureus* на антими­кробна средства је испитана диск дифузионом методом по Кирби Бауеру према упутству Европског комитета за испитивање антими­кробне осетљивости (EUCAST) на амоксицилин 25 µg, амоксицилин/клавуланску киселину 20/10 µg, ампицилин 10 µg, бацитрацин 0,04 i.j., неомицин 30 µg, новобиоцин 5 µg, пеницилин Г 10 i.j., тетрациклин 30 µg, триметоприм 5 µg и триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg. На основу пречника зоне инхибиције изолати *Staphylococcus aureus* су означавани као осетљив (S) интермедијерно осетљив (I) или резистентан (R) (Табела 19 и Графикон 1).

Табела 19. Осетљивост изолата *Staphylococcus aureus* на антимикуробне лекове на основу диск дифузионе методе

Антимикуробни лек Бројеви изолата <i>Staphylococcus aureus</i>	Бацитрацин 0,04 i.j.	Пеницилин Г 10 i.j.	Ампицилин 10 µg	Амоксицилин 25 µg	Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	Неомицин 30 µg	Тетрациклин 30 µg	Триметоприм 5 µg
78	R	R	R	R	R	I	S	S
85	R	R	R	R	S	R	I	S
81	R	R	R	I	R	I	I	S
83	R	R	R	R	S	S	I	S
66,71,77	R	R	R	R	S	I	S	S
79	R	R	R	I	R	S	S	S
84	R	R	R	I	S	I	I	S
80	R	R	R	I	S	S	I	S
26,63	R	R	R	I	S	I	S	S
86	R	R	R	I	S	S	S	S
82	S	R	R	R	S	S	S	S
50,51	R	R	I	I	S	I	S	S
34,35,46,47,56,75,76	R	R	S	I	S	I	S	S
72	R	R	S	I	S	S	S	S
73	R	S	S	R	S	I	S	S
69,70,74	R	S	S	I	S	I	S	S
21,24,25,32,33,44,45,54	R	S	S	S	S	I	S	I
1,2,4,5,8,9,10,11,12,16, 17,18,19,20,22,23,27,28, 29,30,31,36,37,38,39,40, 41,42,43,48,49,55,57,58, 59, 60, 61, 62, 67, 68	R	S	S	S	S	I	S	S
64, 65	R	S	S	S	S	S	S	S
3,6,7,13,14,15,52,53	I	S	S	S	S	I	S	S



Графикон 1. Осетљивост изолата *Staphylococcus aureus* на антимикробне лекове на основу диск дифузионе методе

Највећи број (89,54%) изолата *Staphylococcus aureus* је резистентан на бацитрацин 0,04 i.j., а сви су сензитивни на новобиоцин 5 μg и триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 μg (Табела 20 и Графикон 1).

Табела 20. Осетљивост изолата *Staphylococcus aureus* на антимикробне лекове

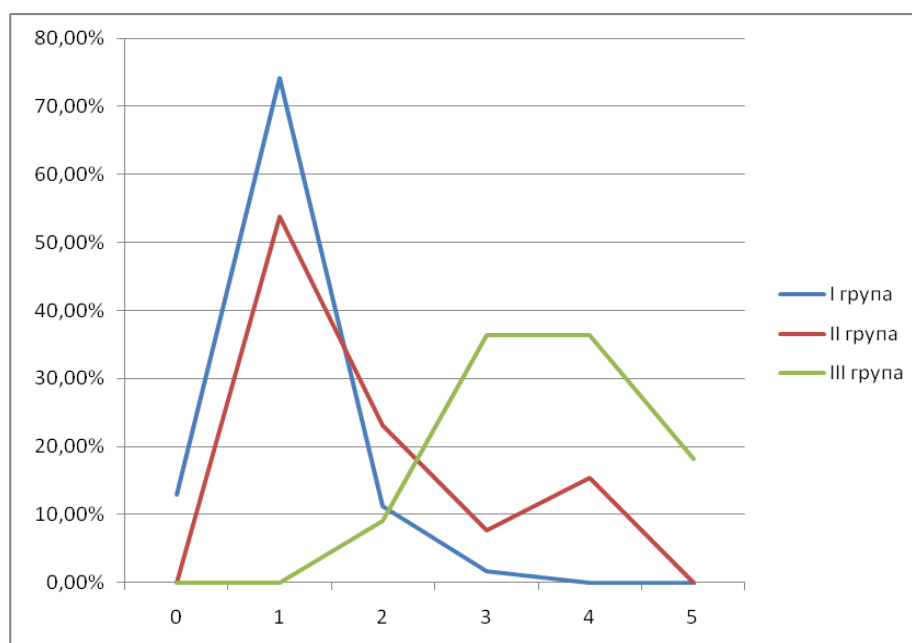
Антимикробни лекови	Број (%) изолата <i>Staphylococcus aureus</i>			
	Резистентно	Интермедијерно	Сензитивно	Укупно
Бацитрацин 0,04 i.j.	77 (89,54)	8 (9,30)	1 (1,16)	86 (100)
Пеницилин Г 10 i.j.	24 (27,91)	-	62 (72,09)	86 (100)
Ампицилин 10 μg	14 (16,28)	2 (2,33)	70 (81,39)	86 (100)
Амоксицилин 25 μg	8 (9,30)	20 (23,26)	58 (67,44)	86 (100)
Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 μg	3 (3,49)	-	83 (96,51)	86 (100)
Неомицин 30 μg	1 (1,16)	77 (89,54)	8 (9,30)	86 (100)
Триметоприм 5 μg	-	8 (9,30)	78 (90,70)	86 (100)
Тетрациклин 30 μg	-	5 (5,81)	81 (94,19)	86 (100)
Новобиоцин 5 μg	-	-	86 (100)	86 (100)
Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 μg	-	-	86 (100)	86 (100)

Изолати *Staphylococcus aureus* пореклом из вимена крава резистентни су на мањи број антимикробних лекова од изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од људи. Од 11 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од људи, 2 (18,18%) је истовремено резистентно на по 5 од укупно 10 антимикробних лекова, по 4 (36,36%) на 4 и 3 антимикробна лека и 1 изолат на 2 (9,09%) антимикробна лека, док ниједан изолат *Staphylococcus aureus* пореклом од крава није био резистентан истовремено на 5 антимикробних лекова, већ је највећи број резистентан истовремено на само по један антимикробни лек и то 46 (74,19%) од 62 изолата пореклом од крава са субклиничким маститисом и 7 (53,85%) од 13 изолата пореклом од крава са клиничким маститисом (Табела 21 и Графикон 2).

Табела 21. Број изолата *Staphylococcus aureus* по групама и број антимикробних лекова на које су резистентни

Укупан број антимикробних лекова на које су резистентни	Изолати <i>Staphylococcus aureus</i>			УКУПНО (86 изолата)
	I група (укупно 62)	II група (укупно 13)	III група (укупно 11)	
0	8 (12,90%)	-	-	8 (9,30%)
1	46 (74,19%)	7 (53,85%)	-	53 (61,63%)
2	7 (11,29%)	3 (23,08%)	1 (9,09%)	11 (12,79%)
3	1 (1,61%)	1 (7,69%)	4 (36,36%)	6 (6,98%)
4	-	2 (15,38%)	4 (36,36%)	6 (6,98%)
5	-	-	2 (18,18%)	2 (2,33%)

Групе: I- од крава са субклиничким маститисом, II- од крава са клиничким маститисом, III-од људи



Групе: I- од крава са субклиничким маститисом, II- од крава са клиничким маститисом, III-од људи

Графикон 2. Процент изолата *Staphylococcus aureus* по групама и број антимикробних лекова на које су резистентни

У табели 22 приказани су изолати *Staphylococcus aureus* и укупан број антимикробних лекова на које су резистентни.

Табела 22. Изолати *Staphylococcus aureus* и број антимикробних лекова на које су резистентни

Изолати <i>Staphylococcus aureus</i> под бројевима	Укупан број антимикробних лекова на које су резистентни
78, 85	5
66, 71, 77, 79, 81, 83	4
26, 63, 80, 82, 84, 86	3
34, 35, 46, 47, 50, 51, 56, 72, 73, 75, 76	2
1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 48, 49, 54, 55, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 67, 68, 69, 70, 74	1
3, 6, 7, 13, 14, 15, 52, 53	0

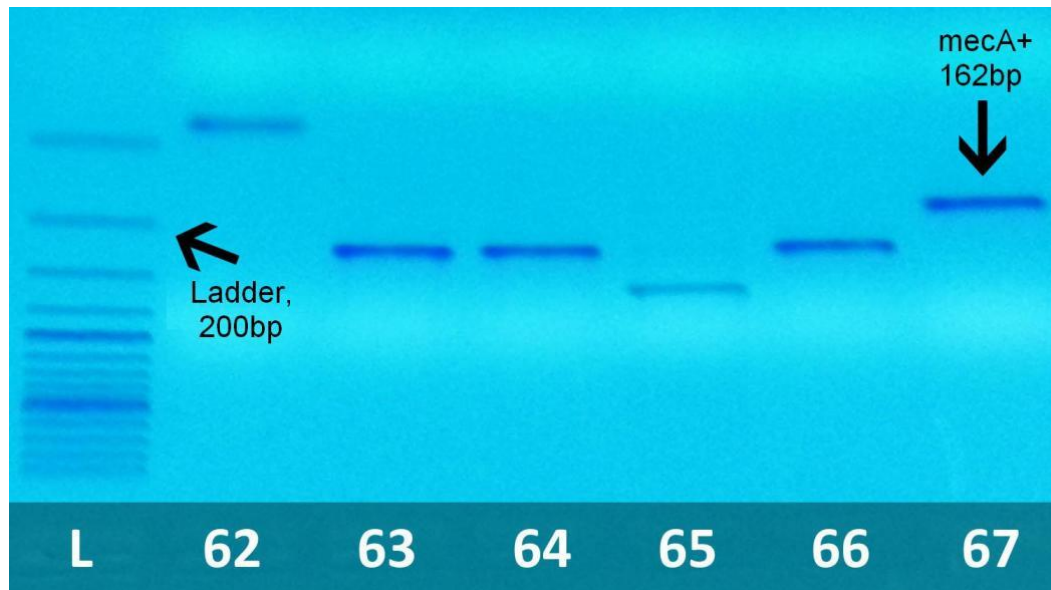
5.8.1. Резистенција изолата *Staphylococcus aureus* на метицилин

Применом „bioMérieux“ Slidex MRSA теста од укупно 86 изолата *Staphylococcus aureus* утврђено је да су три изолата резистентна на метицилин: изолат број 67, пореклом од крава, и два изолата пореклом од људи под бројевима 82 и 83 (Табела 23).

Табела 23. Резултати „bioMérieux“ Slidex MRSA теста за детекцију MRSA сојева

Изолат под бројем	R1 (+ контрола)	R2 (-контрола)	Резултат
67	+	-	MRSA (PBP2' +)
82	+	-	MRSA (PBP2' +)
83	+	-	MRSA (PBP2' +)

PCR методом утврђено је присуство гена *mecA* код 1 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од крава и то код изолата II групе (Слика 23), што представља 1 (7,69%) од 13 изолата. Од 11 хуманих изолата *Staphylococcus aureus*, ген *mecA* утврђен је код 2 (18,18%) изолата (Табела 23). Код изолата *Staphylococcus aureus* из I групе, није доказано присуство гена *mecA*. Присуство гена *mecC* није утврђено ни у једној од 3 групе испитиваних изолата (Табела 24).



Слика 23. Агароза гел електрофореза -детерминација *mecA* гена код изолатата *Staphylococcus aureus* (изолат под бројем 67)

Табела 24. Налаз гена за синтезу *mecA* и *mecC* код СМТ позитивних крава, крава са клиничким маститисом и код људи применом PCR методе

Присуство гена за синтезу		Изолати <i>Staphylococcus aureus</i>		
		I група (укупно 62)	II група (укупно 13)	III група (укупно 11)
<i>mecA</i>	+	/	1 (7.7%)	2 (18.8%)
	-	62 (100%)	12 (92.3%)	9 (81.2%)
<i>mecC</i>	+	/	/	/
	-	62 (100%)	13 (100%)	11 (100%)

Групе: I- од крава са субклиничким маститисом, II- од крава са клиничким маститисом, III-од људи

5.9. Филогенетска сродност изолатата *Staphylococcus aureus*

Филограми добијени на основу секвенцирања *sra* гена изолатата *Staphylococcus aureus* пореклом из вимена крава и из брисева гуше људи приказани су на сликама 24 и 25.

Подаци о нуклеотидним секвенцама изолатата *Staphylococcus aureus* пореклом од крава депоновани су у GenBank и додељени су им приступни бројеви од KJ023978 до KJ024046. Списак приступних бројева приказан је у табели 25.

Приступни бројеви у GenBank представљају јединствену идентификациону ознаку депонованих података о нуклеотидним секвенцама уз помоћ које могу да се препознају у научној јавности и могу да се преузму са on-line сервера GenBank.

5.9.1. Филогенетска сродност изолатата *Staphylococcus aureus* из вимена крава

Анализа нуклеотидних секвенци гена за синтезу стафилококног протеина А код 75 изолатата *Staphylococcus aureus* пореклом из четврти вимена крава са субклиничким и

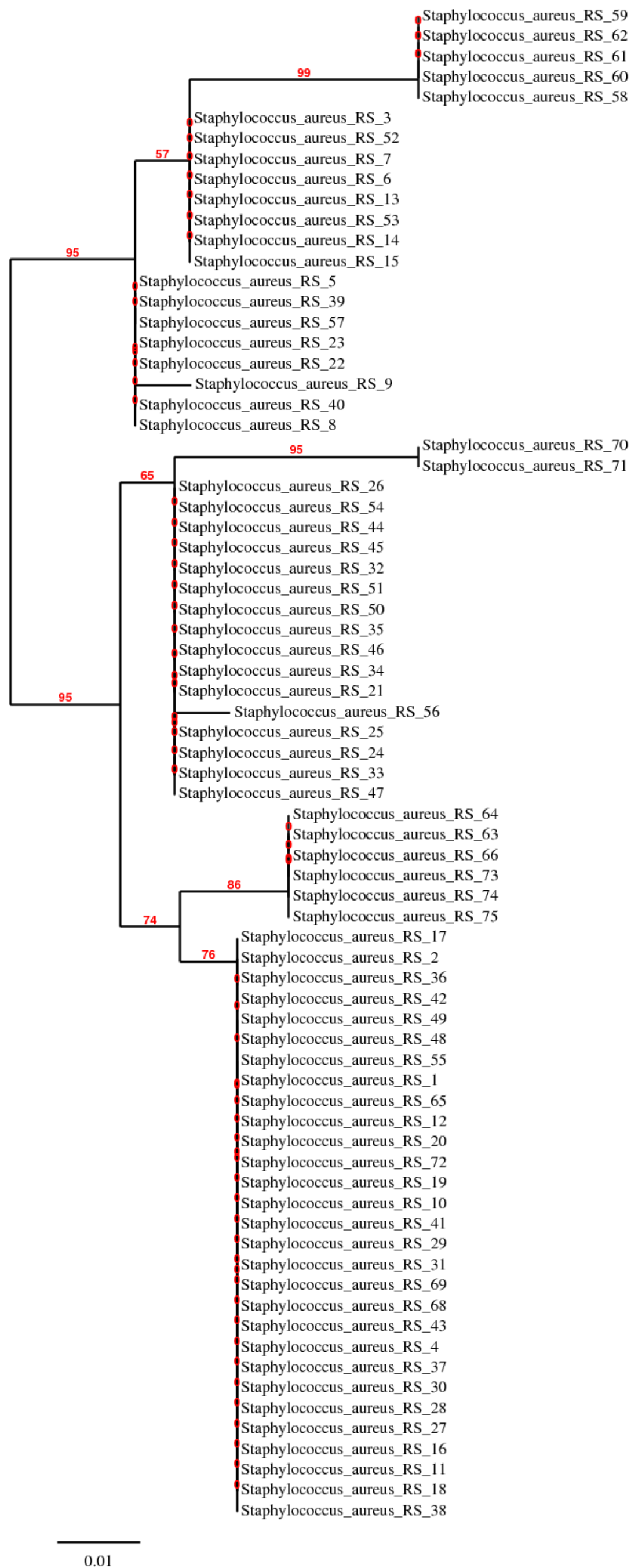
клиничким маститисом показала је да су сојеви филогенетски груписани у 2 групе, односно у 7 кластера (Слика 24).

Прва група обухвата 3 кластера:

- Кластер 1 чине изолати 58, 59, 60, 61 и 62.
- Кластер 2 чине изолати 3, 6, 7, 13, 14, 15, 52 и 53.
- Кластер 3 чине изолати 5, 8, 9, 22, 23, 39, 40 и 57.

Друга група обухвата 4 кластера:

- Кластер 4 чине изолати 70 и 71.
- Кластер 5 чине изолати 21, 24, 25, 26, 32, 33, 34, 35, 44, 45, 46, 47, 50, 51, 54 и 56.
- Кластер 6 чине изолати 63, 64, 66, 73, 74 и 75.
- Кластер 7 чине изолати 1, 2, 4, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 27, 28, 29, 30, 31, 36, 37, 38, 41, 42, 43, 48, 49, 55, 65, 68, 69 и 72.



0.01

Слика 24. Филограм добијен на основу секвенцирања *spa* гена изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из вимена крава коришћењем „neighbour-joining“ анализе и 1000 bootstrap-ова

5.9.2. Филогенетска сродност изолата *Staphylococcus aureus* из вимена крава и из брисева гуше људи

Анализа нуклеотидних секвенци гена за синтезу стафилококног протеина А код 75 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из четврти вимена крава са субклиничким и клиничким маститисом и 11 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из брисева гуше људи показала је да су сојеви филогенетски груписани у 6 кластера (Слика 25):

- Кластер 1 чине изолати 76 и 79
- Кластер 2 чине изолати 3, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 22, 23, 39, 40, 52, 53 и 57.
- Кластер 3 чине изолати 58, 59, 60, 61 и 62.
- Кластер 4 чине изолати 67, 70, 71, 77, 81, 83, 86 и сој MRSA изолован из рила свиња у Србији 2010. године [59].
- Кластер 5 чине изолати 63, 64, 66, 73, 74, 75 и 82.
- Кластер 6 чине изолати 1, 2, 4, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 54, 55, 56, 65, 68, 69, 72, 78, 80, 84 и 85.



Слика 25. Филограм добијен на основу секвенцирања *spa* гена изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из вимена крава и из брисева гуше људи коришћењем „neighbour-joining“ анализе и 1000 bootstrap-ова

Табела 25. Приступни бројеви изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од крва у GenBank

	Изолати <i>Staphylococcus aureus</i> пореклом од крва	Приступни број
1.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_1	KJ023978
2.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_2	KJ023989
3.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_3	KJ024000
4.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_4	KJ024011
5.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_5	KJ024021
6.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_6	KJ024030
7.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_7	KJ024040
8.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_8	KJ024045
9.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_9	KJ024046
10.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_10	KJ023979
11.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_11	KJ023980
12.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_12	KJ023981
13.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_13	KJ023982
14.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_14	KJ023983
15.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_15	KJ023984
16.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_16	KJ023985
17.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_17	KJ023986
18.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_18	KJ023987
19.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_19	KJ023988
20.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_20	KJ023990
21.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_21	KJ023991
22.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_22	KJ023992
23.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_23	KJ023993
24.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_24	KJ023994
25.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_25	KJ023995
26.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_26	KJ023996
27.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_27	KJ023997
28.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_28	KJ023998
29.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_29	KJ023999
30.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_30	KJ024001
31.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_31	KJ024002
32.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_32	KJ024003
33.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_33	KJ024004
34.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_34	KJ024005
35.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_35	KJ024006
36.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_36	KJ024007
37.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_37	KJ024008
38.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_38	KJ024009
39.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_39	KJ024010
40.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_40	KJ024012
41.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_41	KJ024013
42.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_42	KJ024014
43.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_43	KJ024015
44.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_45	KJ024016
45.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_46	KJ024017
46.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_47	KJ024018
47.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_48	KJ024019
48.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_49	KJ024020
49.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_50	KJ024022
50.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_51	KJ024023
51.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_53	KJ024024
52.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_54	KJ024025
53.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_55	KJ024026
54.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_57	KJ024027
55.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_58	KJ024028
56.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_59	KJ024029
57.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_60	KJ024031
58.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_61	KJ024032
59.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_62	KJ024033
60.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_63	KJ024034
61.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_64	KJ024035
62.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_65	KJ024036
63.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_66	KJ024037
64.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_68	KJ024038
65.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_69	KJ024039
66.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_70	KJ024041
67.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_72	KJ024042
68.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_73	KJ024043
69.	Staphylococcus_aureus_isolate_RS_75	KJ024044

6. ДИСКУСИЈА

6.1. Налаз *Staphylococcus aureus* код крава са поремећеном секрецијом

На 46 газдинстава у централној Србији све краве су испитане Калифорнија маститис тестом. *Staphylococcus aureus* изолован је из 62 од 111 (55,86%) узорака млека из СМТ позитивних четврти крава код којих није било клинички видљивих симптома маститиса (Табела 12). То је нешто више од ранијих налаза у нашој земљи и у свету. Бобош је у Војводини 1988. године забележио 52%, а 2009. године Радиновић и сарадници 43% [33,63,79]. У истраживању Виера-да-Моте (Vieira-da-Motta) и сарадника, *Staphylococcus aureus* је изолован из 35% узорака млека СМТ позитивних крава [80], а у истраживању Јаношија (János) и Балтаија (Baltay) из 32,5% [81]. Фокс (Fox) и Геј (Gay) [82] су установили да је од 7 до 40% свих крава (не само СМТ позитивних) инфицирано сојевима *Staphylococcus aureus*, чему одговарају и налази у оквиру ове дисертације. Још 1980. године Бишоп (Bishop) износи податак да је за 33% случајева клиничких маститиса на фармама одговоран *Staphylococcus aureus* [83].

Разјашњење узрока настајања поремећаја секреције (повећање броја соматских ћелија) има значај и код превенције маститиса крава. Велики број фактора који утичу на поремећај секреције представљају истовремено и предиспонирајуће факторе за настанак различитих маститиса инфективне етиологије, јер олакшавају продор узрочника у млечну жлезду и слабе имунитет организма. С друге стране, активан цитолошки одговор има одређену заштитну улогу од инфекција вимена [9].

Чак и у случајевима када број соматских ћелија у збирним узорцима млека износи од 125 000 до 250 000/mL, препоручује се повремена контрола млека са маститис реагенсом у циљу идентификације оболелих грла, корекција рада апарата за мужу и дезинфекција сиса после муже [70].

Спречавање поремећаја секреције и маститиса неинфективне етиологије пре свега захтева да се контролишу и елиминишу сви фактори који могу да поремете активност млечне

жлезде. Изузев микробиолошких агенаса маситисе могу изазвати механичка оштећења вимена, алиментарни утицаји, поремећаји метаболизма и стрес.

На великом броју фарми присутне су инфекције вимена крава праћене субклиничким и клиничким маститисом чији је узрочник *Staphylococcus aureus*, што доводи до промене хемијског састава млека и доводи у питање хигијенску исправност млека. Поремећај секреције изазива пад производње млека, као и производњу биолошки мање вредног млека које није подесно за прераду [62,63].

Инфицирано виме укључујући и кожу вимена је главни резервоар узрочника *Staphylococcus aureus* у запатима крава. Често се узрочник може изоловати и са сиса здравих крава. У том смислу, отклањање узрочника са коже вимена, руку музача, посуда за мужу и убруса који се користе приликом муже, представља најважнију профилактичку меру којом се значајно редукује могућност ширења узрочника унутар запата. Јухас-Касањицки и сарадници наводе податке о преносу сојева *Staphylococcus aureus* резистентних на метицилин између музача и крава на фарми [58]. Многи аутори код нас и у свету указују на значај биосигурности и профилактичких мера у сузбијању маститиса [84-86].

Идентификација крава са поремећајем секреције и крава инфицираних сојевима *Staphylococcus aureus* као и примена профилактичких мера на фармама је од великог значаја за очување здравља вимена и добијања квалитетног млека безбедног по здравље људи.

6.2. Биохемијска својства изолата *Staphylococcus aureus* (API Staph тест)

На основу биохемијских особина постоје одређене сличности и то у 17 тестираних биохемијских карактеристика (Табела 15), али и одређене разлике и то у 8 тестираних биохемијских карактеристика (Табела 16) између 86 изолата *Staphylococcus aureus* који су испитивани у истраживањима у оквиру ове дисертације, на основу којих ови изолати могу бити сврстани у 13 група (Табела 17).

Уобичајено је да се изолати исте бактеријаске врсте разликују у појединим биохемијским карактеристикама [5,10].

6.3. Синтеза стафилококних ентеротоксина и присуство гена за њихову синтезу

Продукција ентеротоксина утврђена је имуноензимским тестом VIDAS[®] Set2, симултаном детекцијом антигена 7 стафилококних ентеротоксина. PCR методом је потврђено присуство гена за синтезу појединих стафилококних ентеротоксина. Од 75 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од крава, продукција ентеротоксина је утврђена код 5

изолата (6,67%) и сви (25, 32, 33,44 и 54) су продуковали само ентеротоксине групе SEC (Слика 20),

Од 11 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од људи, продукција ентеротоксина утврђена код 6 изолата (54,54%), и то 3 изолата продуковала су SEB и 3 изолата SECs.

У Војводини, је 1988. године продукција стафилококних ентеротоксина утврђена имунодифузионом техником по Вадсворту (Wadsworth) код 13 (9,77%) од укупно 133 изолата *Staphylococcus aureus* из вимена крава, од тога је 4 (28,57%) продуковало SEA, 1 (7,14%) SEB и 9 (64,29%) SECs [33,34]. SECs су још увек, 25 година после истраживања Бобоша, најчешће нађени SE код изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из вимена крава [33]. У оквиру ове дисертације, налаз од 6,67% сојева из вимена крава, који продукују SE није много нижи од налаза из 1988. године. Међутим, тај налаз је у поређењу са 54,54% изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од људи значајно мањи. Даље, 6,67% изолата *Staphylococcus aureus* из вимена крава, који продукују SE много је мање од налаза других аутора. У истраживању Адвана и сарадника 2005. године, у Северној Палестини, PCR методом је утврђено присуство гена за синтезу ентеротоксина (sea-see) код 29% изолата *Staphylococcus aureus* [37]. Истраживачи из Турске, 2012. године у Самсун провинцији путем мултиплекс PCR методе утврдили су присуство гена за синтезу ентеротоксина SEA, SEB, SEC, и SED, код 13,7% изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из узорака сировог млека [38].

Према „Извештају EFSA о трендовима и изворима зооноза, зоонотских агенаса, о антимикумној резистенцији и епидемијама алиментарних обољења у Европској унији у 2006. години“, ентеротоксини *Staphylococcus aureus* су одговорни за 48,8% епидемија алиментарних обољења код људи, узрокованих бактеријским токсинима, и пријављених од стране земаља чланица ЕУ, са два смртна исхода. 10,7% алиментарних обољења која су изазване стафилококним ентеротоксинима доводе се у везу са производима од млека [29].

Према „Извештају Европске уније о трендовима и изворима зооноза, зоонотских агенаса и епидемија алиментарних обољења у 2011. години“, 15 држава чланица ЕУ пријавило је 345 епидемија алиментарних обољења изазваних стафилококним токсинима, што представља 6,1 % свих пријављених епидемија у ЕУ [12].

Присуство гена за синтезу SE утврђено је код 5 од 75 (6,67%) изолата *Staphylococcus aureus* из вимена крава и свих пет изолата имају исте биохемијске особине (Табела 17) и исту осетљивост на антимикуробне лекове (Табела 19).

Иако је налаз у оквиру ове дисертације од 6,67% изолата *Staphylococcus aureus* из вимена крава, који продукују SE, мањи од налаза других аутора, овај налаз ипак указује на постојање одређеног ризика, не само за безбедност сировог млека већ и производа од млека,

поготово због термостабилности SE, иако експресија гена за синтезу SE зависи од више фактора.

6.4. Хемолизини

Свих 86 изолата *Staphylococcus aureus* на крвном агару показивали су хемолизу. β хемолизу показивало је 10 (11,63%) изолата, α хемолизу 21 (24,42%) изолат, а 55 (63,95%) изолата и α и β хемолизу (Табела 14). У истраживањима Бобоша, 1991. године, α хемолизу показивало је 27,6% изолата *Staphylococcus aureus* из вимена крава, β хемолизу ниједан, а 72,94% изолата и α и β хемолизу [34].

6.5. Пантон-Валентин леукоцидин

Присуство гена за синтезу PVL доказано је код 5 од 75 (6,67%) изолата *Staphylococcus aureus* из вимена крава (Слике 21 и 22) и код 7 од 11 (63,64%) изолата пореклом од људи (Табела 18). PVL позитивни изолати *Staphylococcus aureus* потичу од СМТ позитивних крава са само два газдинстава, и то су краве које су увезене.

У истраживању спроведеном у Западном Алжиру присуство гена за синтезу PVL утврђено је код 1 од 11 (9%) изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из вимена крава са маститисом [87].

Присуство гена за синтезу PVL често се повезује са резистенцијом на метицилин [53]. У Енглеској је 2005. године, од свих изолата *Staphylococcus aureus* послатих у лабораторију *Staphylococcus Reference Unit for epidemiological purposes*, 1,6% (8 од 515) било PVL позитивно [50].

У току 2008. године у Србији је у оквиру националног мониторинга прикупљено 162 MRSA изолата из 26 болница. Од тога је 4 (2,5%) било PVL позитивно. Сви PVL позитивни MRSA изолати водили су порекло из различитих болница од млађих пацијената са инфекцијом коже [53].

У истраживањима у оквиру ове дисертације сви PVL позитивни изолати *Staphylococcus aureus* били су *mecA* и *mecC* негативни.

Присуство гена за синтезу PVL утврђено је код 5 од 75 (6,67%) изолата *Staphylococcus aureus* из вимена крава и ови изолати потичу са само 2 фарме и то од крава које су увезене. Из тог разлога, податак за преваленцу гена за синтезу PVL од 8,06% код изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из вимена крава са субклиничким маститисом, добијен у истраживањима у оквиру ове дисертације, мора да се интерпретира у светлу свих доступних података.

6.6. Резистенција на антими­кробне лекове

Резистенција појединих сојева микроорганизама на антими­кробне лекове представља велики проблем приликом избора лека у терапији обољења изазваних резистентним микро­организмима. Секундарна резистенција најчешће је посредована плазмидима који се процесима коњу­гације и трансдукције, преносе из једне у другу бактеријску ћелију и тако се резистенција шири, а антими­кробни лек губи ефикасност у терапији обољења изазваног резистентним микро­организмима.

Истраживања у оквиру ове дисертације указују на то да је највећи број изолата *Staphylococcus aureus* био резистентан на бацитрацин (89,54%) и на пеницилин Г (27,91%), док су на новобиоцин и триметоприм/сулфаметоксазол сви изолати били сензитивни (Табеле 19 и 20 и Графикон 1).

Највећа резистенција на антими­кробне лекове установљена је код изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од људи, од којих је 2 (18,18%) изолата било резистентно на укупно 5 антими­кробних лекова, по 4 (36,36%) изолата на 3 и 4 антими­кробна лека и 1 (9,09%) изолат на 2 антими­кробна лека. Највише, 53 (70,67%) изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од крава било је резистентно само на 1 антими­кробни лек, 10 (13,33%) на 2, по 2 (2,67%) на 3 и 4 антими­кробна лека, док 8 (10,67%) изолата није било резистентно ни на један антими­кробни лек (Табела 21 и Графикон 2). На графикону 2 види се да изолати *Staphylococcus aureus* пореклом из вимена крава показују знатно мању резистенцију на антими­кробне лекове од изолата пореклом из брисева гуше људи.

Како се у млекарској индустрији врше свакодневне провере на присуство резидуа антими­кробних лекова у млеку, тако је и примена антими­кробних лекова на фармама музних крава под сталним надзором ветеринарске службе, чиме може да се објасни и мања резистенција на антими­кробне лекове изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од крава у односу на изолате пореклом од људи.

6.6.1. Резистенција на метицилин

Присуство гена *mecA* утврђено је код 1 од 75 (1,33%) изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из вимена крава и код 2 од 11 (18,18%) изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од људи. Обзиром на то да у Србији, према нашим сазнањима, до сада, није потврђено присуство MRSA код говеда, налаз изолата MRSA из узорка млека из вимена крава у оквиру ове дисертације представља први забележен случај. Потребна су даља испитивања овог изолата у циљу његове коначне класификације.

У Мађарској, 2007. године, Јухас-Касањицки и сарадници изоловали су 27 MRSA код крава са субклиничким маститисом и доказали пренос MRSA сојева између музача и крава на тој фарми [58].

Присуство *mecC* гена није утврђено код испитаних изолата *Staphylococcus aureus*.

Сви *mecA* позитивни изолати *Staphylococcus aureus* били су PVL негативни.

Сојеви MRSA немају већу патогеност од MSSA сојева, али ако дође до инфекције са сојевима MRSA, избор антимикробних лекова за терапију је значајно сужен или уопште не постоји могућност терапије [88].

6.7. Филогенетска сродност изолата *Staphylococcus aureus*

Филогенетска сродност изолата *Staphylococcus aureus* одређена је на основу анализе нуклеотидних секвенци гена за синтезу стафилококног протеина А у смислу броја мутација које су се догодиле у том времену.

6.7.1. Филогенетска сродност изолата *Staphylococcus aureus* из вимена крава

Анализа нуклеотидних секвенци гена за синтезу стафилококног протеина А код 75 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из млека крава са субклиничким и клиничким маститисом показала је да су сојеви филогенетски груписани у 2 групе, односно у 7 кластера (Слика 24).

Биохемијске особине (Табела 17) изолата *Staphylococcus aureus*, њихова осетљивост на антимикробне лекове (Табела 19) као и друге фенотипске особине ни на који начин не зависе од гена за синтезу стафилококног протеина А. Међутим, сродност изолата *Staphylococcus aureus* одређена анализом нуклеотидних секвенци гена за синтезу стафилококног протеина А, у одређеној мери поклапа се и са неким другим фенотипским особинама.

Сви изолати сврстани у кластере од 1 до 4 показивали су алфа/бета хемолизу.

Прва група обухвата 3 кластера:

- Кластер 1 (58, 59, 60, 61 и 62) обухвата само PVL позитивне изолате који потичу са само 2 фарме и међусобно се разликују само у две биохемијске особине (ArgA и PrgA) од 25 тестираних особина, а осетљивост на 10 антимикробних лекова им је иста.
- Изолати сврстани у кластер 2 (3, 6, 7, 13, 14, 15, 52 и 53) показивали су исте биохемијске особине и исту осетљивост на антимикробне лекове.

- Кластер 3 (5, 8, 9, 22, 23, 39, 40 и 57) чине изолати који су показивали исте биохемијске особине и сами чине посебну групу на основу осетљивости на антимикуробне лекове.

Друга група обухвата 4 кластера:

- У кластеру 4 налазе се изолати 70 и 71 пореклом од крава са клиничким маститисом, који су са изузетком једне (PugA) показивали исте биохемијске особине.
- Изолати који се налазе у кластеру 5 (21, 24, 25, 26, 32, 33, 34, 35, 44, 45, 46, 47, 50, 51, 54 и 56) потичу од крава са субклиничким маститисом и показивали су исте биохемијске особине са изузетком једне (ArgA). На основу осетљивости на антимикуробне лекове могу да се сврстају у 4 различите групе, при чему се три групе међусобно разликују само по осетљивост на један антимикуробни лек (ампицилин). Четврта група изолата, где су и сви SE позитивни изолати, разликује се од осталих на основу осетљивости на још 3 антимикуробна лека (пеницилин Г, амоксицилин и триметоприм).
- Кластер 6 (63, 64, 66, 73, 74 и 75) чине изолати који потичу од крава са клиничким маститисом, код којих није запажено веће поклапање испитиваних фенотипских особина.
- У кластеру 7 (1, 2, 4, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 27, 28, 29, 30, 31, 36, 37, 38, 41, 42, 43, 48, 49, 55, 65, 68, 69 и 72) има 29 изолата, од којих је 24 (83%) изолата показивало исте биохемијске особине и исту осетљивост на антимикуробне лекове. Исту осетљивост на антимикуробне лекове показивала су још два изолата, укупно 26 (90%).

6.7.2. Филогенетска сродност изолата *Staphylococcus aureus* из вимена крава и из брисева гуше људи

Анализа нуклеотидних секвенци гена за синтезу стафилококног протеина А код 75 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из млека крава са субклиничким и клиничким маститисом и 11 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из брисева гуше људи показала је да су сојеви филогенетски груписани у 6 кластера (Слика 25).

Биохемијске особине (Табела 17) изолата *Staphylococcus aureus*, њихова осетљивост на антимикуробне лекове (Табела 19) као и друге фенотипске особине ни на који начин не зависе од гена за синтезу стафилококног протеина А. Међутим, сродност изолата *Staphylococcus aureus* одређена анализом нуклеотидних секвенци гена за синтезу стафилококног протеина А, у одређеној мери поклапа се и са неким другим фенотипским особинама.

Сви изолати сврстани у кластере од 1 до 3 показивали су алфа/бета хемолизу

- Кластер 1 (76 и 79) чине два изолат *Staphylococcus aureus* пореклом из брисева гуше људи, који могу да се сматрају прецима свих осталих изолат у смислу броја мутација које су се догодиле у том времену. Код оба изолат утврђено је присуство гена за синтезу PVL. Међусобно се разликују у једној биохемијској особини (URE) и у осетљивости на три антимикуробна лека.
- На основу биохемијских особина и осетљивости на антимикуробне лекове, у кластеру 2 (3, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 22, 23, 39, 40, 52, 53 и 57) налазе се изолати пореклом из вимена крава са субклиничким маститисом. На основу осетљивости на антимикуробне лекове и биохемијских особина могу се сврстати у две групе које се међусобно разликују у осетљивости на један антимикуробни лек (бацитрацин) и у две биохемијске особине (β GAL и URE).
- Кластер 3 (58, 59, 60, 61 и 62) чине искључиво изолати *Staphylococcus aureus* пореклом из вимена крава, који су сви PVL позитивни и имају исту осетљивост на антимикуробне лекове. Потичу са само 2 фарме и међусобно се разликују само у две биохемијске особине (ArgA и PrgA), а осетљивост на антимикуробне лекове им је иста.
- У кластеру 4 (67, 70, 71, 77, 81, 83, 86 и сој MRSA из рила свиња) налазе се *tecA* позитивни изолат *Staphylococcus aureus* пореклом из вимена крава, један од два *tecA* позитивна изолат *Staphylococcus aureus* пореклом из брисева гуше људи и сој MRSA изолован из рила свиња у Србији 2010. године [59].
- Кластер 5 (63, 64, 66, 73, 74, 75 и 82) обухвата изолате код којих није запажено веће поклапање испитиваних фенотипских особина.
- Кластер 6 (1, 2, 4, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 54, 55, 56, 65, 68, 69, 72, 78, 80, 84 и 85) обухвата 49 изолат *Staphylococcus aureus*, међу којима су и свих пет изолат пореклом из вимена крава код којих је доказано присуство гена за синтезу SE. У кластеру 6 налазе се 3 групе изолат од по 24 (49%), 8 (16%) и 5 (10%) изолат са истим биохемијским особинама и истом осетљивошћу на антимикуробне лекове и сви ови изолати потичу из вимена крава са субклиничким маститисом. Ове групе се међусобно разликују у три биохемијске особине (ArgA, ADH и URE) и у осетљивости на 2 антимикуробна лека. Особине осталих 12 (25%) изолат се у мањој или већој мери поклапају са особинама већ поменутих изолат.

7. ЗАКЉУЧАК

На основу резултата добијених у оквиру ове докторске дисертације, која је обухватала испитивање патогености и филогенетске сродности изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из млека и секрета вимена крава са 48 фарми на територији Војводине и централне Србије, као и изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од људи доказано је следеће:

- Из 111 узорака млека, узетих из СМТ позитивних четврти вимена крава, *Staphylococcus aureus* изолован је из 62 узорка, што износи 55,86%.
- Од 62 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из четврти вимена крава са поремећеном секрецијом код 5 (8,06%) изолата доказано је присуство гена за синтезу ентеротоксина SECs, а код 6 (54,54%) од 11 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од људи, доказано је присуство гена за синтезу ентеротоксина SECs и SEB. Ни код једног од 13 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од крава са клиничким маститисом није доказано присуство гена за синтезу стафилококних ентеротоксина.
- Присуство гена за синтезу Пантон-Валентин леукоцидина доказано је код 5 (8,06%) од 62 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из четврти вимена крава са поремећеном секрецијом и код 7 (63,64%) од 11 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од људи, а код ниједног од 13 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од крава са клиничким маститисом није доказано присуство гена за синтезу Пантон-Валентин леукоцидина.
- Свих 86 изолата *Staphylococcus aureus* су осетљиви на новобиоцин и триметоприм-сулфаметоксазол, док је 77 изолата (89,54%) резистентно на бацитрацин, 24 (27,91%) на пеницилин Г, 14 (16,28%) на ампицилин.
- Изолати *Staphylococcus aureus* пореклом из вимена крава резистентни су на мањи број антимикуробних лекова од изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од људи. Два (18,18%) од 11 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од људи истовремено је резистентно на по 5 од 10 антимикуробних лекова, по 4 (36,36%) изолата на 4 и 3

антимикробна лека и 1 изолат на 2 (9,09%) антимикробна лека. Ниједан изолат *Staphylococcus aureus* пореклом од крава није био резистен истовремено на 5 антимикробних лекова, већ је највећи број изолата пореклом од крава резистентан истовремено на само један од 10 антимикробних лекова и то 46 (74,19%) од 62 изолата пореклом од крава са субклиничким маститисом и 7 (53,85%) од 13 изолата пореклом од крава са клиничким маститисом.

- Присуство гена за резистенцију на метицилин доказано је код 2 (18,18%) од 11 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од људи и код 1 (1,33%) од 75 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом из вимена крава.
- На основу испитивања филогенетске сродности нуклеотидних секвенци гена за синтезу стафилококног протеина А, код 75 изолата пореклом из вимена крава и 11 изолата пореклом од људи - у смислу броја мутација које су се догодиле у том времену, 2 изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од људи могу да се сматрају прецима свих осталих изолата.

Резултати истраживања указују на различита патогена својства изолата *Staphylococcus aureus* пореклом од крава са поремећеном секрецијом, због чега би њихово што раније откривање могло да има значајну улогу у очувању здравља вимена и у добијању квалитетног млека безбедног по здравље људи.

Неопходна су даља истраживања како би се у потпуности разјаснио утицај изолата *Staphylococcus aureus* из вимена крава на безбедност млека и производа од млека, као и на здравље људи.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Ogston, A. Über Abscesse. Arch Klin Chir. 1880; 25:588-600.
2. Ogston A. Report upon microorganisms in surgical diseases. Brit Med J. 1881; 1:369-375.
3. Ogston A. Micrococcus poisoning. J Anat Physiol. 1883; 17:24-58.
4. Rosenbach AJ. Mikro-Organismen bei den Wund-Infections-Krankheiten des Menschen. Wiesbaden, J.F. Bergmann, 1884. p. 18.
5. Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB, editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. Volume 3: The Firmicutes; Springer Science+Business Media, LLC; 2009.
6. EFSA, BIOHAZ. Aspects of dairy cow housing and husbandry systems. The EFSA Journal 2009; 1189:1-27.
7. Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev. 1994; 7:117-140.
8. Matthews KR, Roberson J, Gillespie BE, Luther DA, Oliver SP. Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. J Food Prot. 1997; 60(6):686-688.
9. Boboš S, Vidić B. Patomorfologija mlečne žlezde preživara [monograph]. Novi Sad: Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Naučni Institut za veterinarstvo „Novi Sad“; 2005.
10. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria, 3rd ed. Volume 4: Bacteria: *Firmicutes, Cyanobacteria*. Springer Science+Business Media, LLC; 2006.
11. ICMSF. *Staphylococcus aureus*. In: Roberts TA, Baird-Parker AC, Tompkin RB, editors. Microorganisms in foods 5. Characteristics of microbial pathogens. Blackie Academic and Professional, London; 1996. p. 299-333.
12. EFSA, ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. The EFSA Journal 2013; 11(4).
13. Van den Broek PJ. *Staphylococcus aureus*, a successful pathogen. Ned. Tijdschr. Geneesk. 2003; 147:1045-1048.
14. Watts JL. Etiological agents of bovine mastitis. Vet Microbiol. 1988;16(1):41-66.
15. Esmat M, Bader A. Some studies on mastitis-metritis-agalctia syndrome in cows. Vet Med J Giza. 1996; 44(2):303-309.

16. Boboš S, Stojanović L, Vidić B, Bugarski D. *Staphylococcus aureus* isolated from cows udder with subclinical mastitis and their biochemical and toxicological features. In: Proceedings of the II Middle-European Congress for Buiatrics; High Tatras 2000; Slovak Republic; 2000. p. 219-222.
17. Fourichon C, Seegers H, Beaudeau F, Bareille N. Economic losses consecutive to health disorders in dairy farms in Pays de la Loire (France), In Proceedings of the 52nd Meeting of the European Association of Animal Production. 2001 Aug 26-29, Budapest, Hungary; 2001. p. 26-29.
18. El-Seedy FR, El-Shabrawy M, Hakim AS, Dorgham SM, Nagwa S, Bakry MA, et al. Recent techniques used for isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* from mastitis cows. J Am Sci. 2010; 6(12):701-708.
19. Schlievert PM, Case LC. Molecular analysis of staphylococcal superantigens. Methods Mol Biol 2007; 391:113-126.
20. Larkin EA, Carman RJ, Krakauer T, Stiles BG. *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. Curr Med Chem. 2009; 16(30):4003 - 4019.
21. Gaebler Vasconcelos N, de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha M. Staphylococcal enterotoxins: molecular aspects and detection methods. J Public Health Epidemiol. 2010; 2(3):29-42.
22. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res. 2003; 2(1):63-76.
23. Ono HK, Omoe K, Imanishi K, Iwakabe Y, Hu DL, Kato H, et al. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. Infect Immun. 2008; 76(11):4999 - 5005.
24. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. Science. 1990; 248(4956):705-711.
25. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev. 2000; 13(1):16-34.
26. Argudín ÁM, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins 2010; 2(7):1751-1773.
27. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal Enterotoxins. Int. J. Food Microbiol. 2000; 61:1-10.
28. Murray RJ. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. Intern Med J. 2005; 35(S2):S106-S119.
29. EFSA, ECDC. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and food-borne outbreaks in the European Union in 2006. The EFSA Journal 2007; 130.
30. EFSA, ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. The EFSA Journal 2012; 10(3).
31. Imani Fooladi AA, Tavakoli HR, Naderi A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in domestic dairy products. Iran J Microbiol. 2010; 2(3):137-142.
32. Stewart GC. *Staphylococcus aureus*. In: Fratamico PM, Bhunia AK, Smith JL, editors. Foodborne pathogens: Microbiology and molecular biology; Caister Academic Press, Norfolk; 2005. p. 273-284.

33. Boboš S, Vidić B, Lalić M, Stojanović L. *Staphylococcus aureus* izolovan iz vimena krava sa mastitisom, njegova biohemijska i toksična svojstva. In Proceedings of Simpozij o bakterijama roda *Staphylococcus*; 1988 Apr 27-29; Plitvice, SFRJ; 1988. p. 26.
34. Boboš S. Influence of different programs of mastitis prevention to milk production and to udder health (Uticaj različitih programa suzbijanja mastitisa na proizvodnju mleka i zdravstveno stanje vimena krava) [dissertation] Belgrade: Univ. Belgrade, Faculty of Veterinary medicine; 1991.
35. Oliveira L, Carolina Rodrigues A, Hulland C, Ruegg P. Genetic diversity and expression of enterotoxin of *Staphylococcus aureus* associated with bovine mastitis. In Proceedings of the NMC 47th Annual Meeting; 2008 Jan 20-23; New Orleans, Louisiana; 2008. p. 192-193.
36. Jorgensen HJ, Mork T, Hogasen HR, Rorvik LM. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *J Appl Microbiol.* 2005; 99(1):158-166.
37. Adwan G, Abu-Shanab B, Adwan K. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk in the North of Palestine. *Turk J Biol* 2005; 29(4):229 - 232.
38. Gücükoğlu A, Kevenk TO, Uyanik T, Cadirci O, Terzi G, Alişarlı M. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk and dairy products by multiplex PCR. *J Food Sci.* 2012; 77(11):620-623.
39. Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K et al. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol Infect.* 2003; 130:33-40.
40. Van der Velde H. Etude sur le mécanisme de la virulence du Staphylocoque. *La Cellule*, 1894; 10:401-460.
41. Denys J, Van der Velde H. Sur la production d'une antileucocidin chez les vaccine contre le Staphylocoque pyogène. *La Cellule.* 1895; 11:359-372.
42. Neisser M, Wechsberg F. Über das Staphylotoxin. *Z. Hyg. Infektkrankh.* 1901; 36:299-349.
43. Julianelle LA. Studies of hemolytic Staphylococci. *J. Infect. Dis.* 1922; 31:256-284.
44. Panton P, Valentine F. Staphylococcal toxin. *Lancet* 1932; 219(5662):506-508.
45. Supersac G, Prevost G, Piemont Y. Sequencing of leucocidin R from *Staphylococcus aureus* P83 suggests that staphylococcal leucocidins and gamma-hemolysin are members of a single, two-component family of toxins. *Infect Immun.* 1993; 61:580-587.
46. Gravet A, Colin DA, Keller D, Girardot R, Monteil H, Prevost G, et al. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Lett.* 1998; 436:202-208.
47. Kaneko J, Kamio Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004; 68(5):981-1003.
48. Szmigielski S, Prévost G, Monteil H, Colin DA, Jeljaszewicz J. Leukocidal toxins of staphylococci. *Zentralbl Bakteriolog.* 1999; 289(2):185-201.
49. Melles DC, van Leeuwen WB, Boelens HA, Peeters JK, Verbrugh HA, van Belkum A. Panton-Valentine leukocidin genes in *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infect. Dis.* 2006; 12(7):1174-1175.
50. Holmes A, Ganner M, Mguane S. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes in England and Wales: frequency, characterization and association with clinical disease. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:2384-2390.

51. Cribier B, Prevost G, Couppie P. *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections. An epidemiological and experimental study. *Dermatol.* 1992; 185:175-180.
52. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton - Valentine leukocidin - producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 1999; 29(5):1128-32.
53. Cirkovic I, Sorum M, Radenkovic D, Svabic Vlahovic M, Larsen AR. National surveillance reveals the first findings of Panton Valentine leukocidin positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Serbia. *J Med Microbiol.* 2012; 62(Pt 2):342-344.
54. Tavakol M, Riekerink RGMO, Sampimon OC, van Wamel WJB, van Belkum A, Lam TJGM. Bovine-associated MRSA ST398 in The Netherlands. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2012; 54:28
55. Appelbaum P. Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 2007; 45:S165–S170.
56. Berger-Bachi B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol.* 2002; 178:165–171.
57. EFSA, BIOHAZ. Assessment of the public health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *The EFSA Journal* 2009; 993.
58. Juhász-Kaszanyitzky É, Jánosi Sz, Somogyi P, Dán Á, van der Graaf van Bloois L, van Duijkeren E, et al. MRSA Transmission between cows and humans. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(4):630–632.
59. Velebit B, Fetsch A, Mirilovic M, Teodorovic V, Jovanovic M. MRSA: MRSA in pigs in Serbia (Letter). *Veterinary Record* 2010; 167(5):183-184.
60. Council Directive 92/46/EEC of 16th June 1992 Official Journal L 268, 14/09/1992; p. 0001 – 0031.
61. Kehrli ME, Shuster DE. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 1994; 77:619–627.
62. Bojanić M, Mirecki S, Stanković V, Živković B. Promjene fizičko hemijskih parametara kvaliteta mlijeka i broja somatskih ćelija kod infekcija mliječne žlijezde krava različite etiologije. In: *Proceedings of the Simpozijum mlekarске industrije Srbije i Crne Gore: Savremeni trendovi u mlekarstvu; 2003 May 7-11; Zlatibor: Serbia; 2003.* p. 61-66.
63. Radinović M. Ispitivanje uticaja patogenog prvog i drugog reda na broj somatskih ćelija i kvalitet mleka u krava. [master thesis] Novi Sad: Univ. Novi Sad, Faculty of Agriculture; 2008.
64. Boboš S, Plavšić M. Tehnologija držanja visoko produktivnih krava kao preduslov za dobijanje zdravstveno bezbednog i kvalitetnog mleka. *Vet Glasnik* 2005; 59(1-2):189-200.
65. Nicholls TJ, Rubira RJ. Staphylococcal dermatitis and mastitis. *Austral Vet J.* 1981; 57(1):54-55.
66. Heckmann RA. Quality control and evaluation of milking machine liners (inflatons) and milk tubes using scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. *Microscopy and Analysis* 1997; 17: 35-37.
67. Boboš S, Vidić B, Božić M, Ilišković V. Zasadpljenost starih i novih infekcija vimena krava u zapatima sa kliničkim mastitisom. *Vet Glasnik* 1994; 48(3-4):219-223.

68. Boboš S, Stojanović L, Vidić B, Bugarški D. Infekcije vimena krava – novija saznanja o sprečavanju i suzbijanju. *Vet Glasnik* 1996; 50(5-6):323-328.
69. Schalm OW. *Bovine Mastitis*. Lea & Febiger; USA; 1971.
70. Tolle A, Heeschen W, Hamann J. *Kieler milchwirtschaftliche Forschungsberichte, Milchwissenschaft Berlin*; 1977; 32.
71. Baird Parker AC. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci. *J Appl Bacteriol.* 1962; 25(I):12-19.
72. Vernozy-Rozand C, Mazuy-Cruchaudet C, Bavai C, Richard Y. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. *Letters in Applied Microbiology* 2004; 39(6):490-494.
73. Dereeper A, Audic S, Claverie JM, Blanc G. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evol Biol.* 2010 Jan 12;10:8.
74. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jul 1;36(Web Server issue):W465-9. Epub 2008 Apr 19.
75. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004, Mar 19; 32(5):1792-1797.
76. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol.* 2000, Apr; 17(4):540-552.
77. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 2003, Oct; 52(5):696-704.
78. Anisimova M, Gascuel O. Approximate likelihood ratio test for branches: A fast, accurate and powerful alternative. *Syst Biol.* 2006, Aug; 55(4):539-552.
79. Radinović M, Pajić M, Boboš S. Findings of *Staphylococcus aureus* in the udder of cows with secretion disorder. In: *Proceedings of the 8th Veterinary Congress of Serbia; 2009 Sept 15-19; Belgrade, Serbia.* 2009. p. 64-65.
80. Vieira-da-Motta O, Folly MM, Sakyama CCH. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. *Braz J Microbiol*, 2001; 32(1):27-31.
81. Jánosi Sz, Baltay Zs. Correlations among the somatic cell count of individual bulk milk, result of the California Mastitis Test and bacteriological status of the udder in dairy cows. *Acta Vet Hung.* 2004; 52(2):173-183.
82. Fox LK, Gay JM. Contagious mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1993; 9(3):475-87.
83. Bishop JR, Boddine AB, Jansen JJ. Sensitivity to antibiotics and seasonal occurrence of pathogens. *J Dairy Sci.* 1980; 63:1134-1137.
84. Katić V, Boboš S, Jurca J. Značaj preventivnih mera u suzbijanju mastitisa. *Vet. Glasnik*, 1990; (3-4).
85. Boboš S, Ilić M, Vidić B, Božić M. Primena određenih mera za suzbijanje stafilokoknog mastitisa na jednoj farmi krava u našim proizvodnim uslovima. *Vet Glasnik* 1991; 45(11-12):803-807.
86. Boboš S, Rašić Z, Radinović M, Mašić Z, Pajić M, Galfi A, et al. Biosigurnost i mastitisi u intenzivnoj proizvodnji mleka krava. *Vet Glasnik* 2012; 66(5-6):417-425.

87. Benhamed N, Kihal M. Biodiversity of molecular profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in West Algeria. J Bacteriol Res. 2013; 5(4):41-45.
88. Mišič D. Rezistencija na antibiotike kod bakterija izolovanih od životinja u Republici Srbiji. In Proceedings of the 23. Savetovanje veterinara Srbije. 2012 Sept 13-16; Zlatibor, Serbia 2012. p. 67-82.

П Р И Л О З И

Прилог 1. Листа за унос података за СМТ негативне краве

СМТ негативне краве		Број листе:	
Подаци о газдинству	Бр. газдинства	Адреса	Власник
Број објекта и други релевантни подаци			
		Датум тестирања:	
Ред. бр.	Број краве*	Напомена	
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			
9.			
10.			
11.			
12.			
13.			
14.			
15.			
16.			
17.			
18.			
19.			
20.			
21.			
22.			
23.			
24.			
25.			
26.			
27.			
28.			
29.			
30.			
31.			
32.			
33.			
34.			
35.			


* под бројем краве се подразумевају четири велике цифре са ушне маркице


Прилог 2. Листа за унос података за СМТ позитивне краве

СМТ позитивне краве						Број листе:	
Подаци о газдинству	Бр. газдинства	Адреса				Власник	
Број објекта и други релевантни подаци							
Датум тестирања:							
Ред. бр.	Број краве*	Ознака четврти и СМТ резултат				Напомена	
		ПЛ	ЗЛ	ПД	ЗД		
1.							
2.							
3.							
4.							
5.							
6.							
7.							
8.							
9.							
10.							
11.							
12.							
13.							
14.							
15.							
16.							
17.							
18.							
19.							
20.							
21.							
22.							
23.							
24.							
25.							
26.							
27.							
28.							
29.							
30.							
31.							
32.							
33.							
34.							
35.							

* под бројем краве се подразумевају четири велике цифре са ушне маркице

Прилог 3. Лична карта изолата *Staphylococcus aureus* (1-86)


Број изолата:		1	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>tesA</i>	-	
	<i>tesC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	Напомена: GenBank accession number: KJ023978
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		2	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>tesA</i>	-	
	<i>tesC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	Напомена: GenBank accession number: KJ023989
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		3	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024000</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	I	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		4	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024011</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		5	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024021</p>
2.Амоксицилин /клавуланска кис. 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		6	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024030</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	I	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		7		
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>		
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве			
Хемолиза	αβ			
Присуство гена:				
	<i>nuc</i>	+		
	SE	-		
	PVL	-		
	<i>mecA</i>	-		
	<i>mecC</i>	-		
Осетљивост на антимикробне лекове:				
1.Амоксицилин 25 µg	S	Напомена: GenBank accession number: KJ024040	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S		
3.Ампицилин 10 µg	S		
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	I		
5.Неомицин 30 µg	I		
6.Новобиоцин 5 µg	S		
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S		
8.Тетрациклин 30 µg	S		
9.Триметоприм 5 µg	S		
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S		

Број изолата:		8		
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>		
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве			
Хемолиза	αβ			
Присуство гена:				
	<i>nuc</i>	+		
	SE	-		
	PVL	-		
	<i>mecA</i>	-		
	<i>mecC</i>	-		
Осетљивост на антимикробне лекове:				
1.Амоксицилин 25 µg	S	Напомена: GenBank accession number: KJ024045	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S		
3.Ампицилин 10 µg	S		
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R		
5.Неомицин 30 µg	I		
6.Новобиоцин 5 µg	S		
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S		
8.Тетрациклин 30 µg	S		
9.Триметоприм 5 µg	S		
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S		


Број изолата:		9	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024046</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		10	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023979</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		11	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023980</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		12	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	β		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023981</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		13	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023982</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	I	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		14	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023983</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	I	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		15	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023984</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	I	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		16	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	β		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023985</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		17	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023986</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		18	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	β		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023987</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		19	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	β		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023988</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		20	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	β		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023990</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		21	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023991</p>
1.Амоксицилин 25 µg	S	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	I	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		22	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023992</p>
1.Амоксицилин 25 µg	S	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		23	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикуробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023993</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		24	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикуробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023994</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	I	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		25	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	SECs	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023995</p>
1.Амоксицилин 25 µg	S	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	I	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		26	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023996</p>
1.Амоксицилин 25 µg	I	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	R	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		27		
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>		
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве			
Хемолиза	αβ			
Присуство гена:				
	<i>nuc</i>	+		
	SE	-		
	PVL	-		
	<i>mecA</i>	-		
	<i>mecC</i>	-		
Осетљивост на антимикробне лекове:				<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023997</p>
1.Амоксицилин 25 µg	S		
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S		
3.Ампицилин 10 µg	S		
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R		
5.Неомицин 30 µg	I		
6.Новобиоцин 5 µg	S		
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S		
8.Тетрациклин 30 µg	S		
9.Триметоприм 5 µg	S		
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S		


Број изолата:		28		
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>		
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве			
Хемолиза	β			
Присуство гена:				
	<i>nuc</i>	+		
	SE	-		
	PVL	-		
	<i>mecA</i>	-		
	<i>mecC</i>	-		
Осетљивост на антимикробне лекове:				<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023998</p>
1.Амоксицилин 25 µg	S		
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S		
3.Ампицилин 10 µg	S		
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R		
5.Неомицин 30 µg	I		
6.Новобиоцин 5 µg	S		
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S		
8.Тетрациклин 30 µg	S		
9.Триметоприм 5 µg	S		
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S		


Број изолата:		29	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антими­кробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ023999</p>
1.Амоксицилин 25 µg	S	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		30	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	β		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антими­кробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024001</p>
1.Амоксицилин 25 µg	S	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		31	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024002</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		32	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	SECs	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024003</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	I	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		33	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	SECs	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024004</p>
1.Амоксицилин 25 µg	S	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	I	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		34	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024005</p>
1.Амоксицилин 25 µg	I	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		35	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	I	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024006</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		36	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024007</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		37	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикуробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024008</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		38	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикуробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024009</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		39	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антими­кробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024010</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		40	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антими­кробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024012</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		41	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикуробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	Напомена: GenBank accession number: KJ024013
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		42	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикуробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	Напомена: GenBank accession number: KJ024014
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		43	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024015</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		44	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	SECs	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>-</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	I	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		45	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикуробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024016</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	I	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		46	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикуробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	I	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024017</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		47	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	I	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024018</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		48	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024019</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		49	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024020</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		50	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	I	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024022</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	I	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		51	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024023</p>
1.Амоксицилин 25 µg	I	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	I	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		52	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>-</p>
1.Амоксицилин 25 µg	S	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	I	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		53	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024024</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	I	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		54	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	SECs	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024025</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	I	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		55	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антими­кробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024026</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		56	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антими­кробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	I	<p>Напомена:</p> <p>-</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		57	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024027</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		58	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	+	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024028</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		59	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024029</p>
	SE	-	
	PVL	+	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		60	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024031</p>
	SE	-	
	PVL	+	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		61	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	+	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024032</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		62	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из млека СМТ позитивне четврти вимена краве		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	+	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024033</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		63	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	из секрета вимена краве са клиничким маститисом		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024034</p>
1.Амоксицилин 25 µg	I	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	R	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		64	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	из секрета вимена краве са клиничким маститисом		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024035</p>
1.Амоксицилин 25 µg	S	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	S	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		65	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из секрета вимена краве са клиничким маститисом		
Хемолиза	β		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	S	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024036</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	S	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		66	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из секрета вимена краве са клиничким маститисом		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	R	<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024037</p>
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	R	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		67	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	из секрета вимена краве са клиничким маститисом		
Хемолиза	β		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>tesA</i>	+	
	<i>tesC</i>	-	
Осетљивост на антимикуробне лекове:			Напомена: -
1.Амоксицилин 25 µg	S	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		68	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	из секрета вимена краве са клиничким маститисом		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>tesA</i>	-	
	<i>tesC</i>	-	
Осетљивост на антимикуробне лекове:			Напомена: GenBank accession number: KJ024038
1.Амоксицилин 25 µg	S	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		69	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	из секрета вимена краве са клиничким маститисом		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>tesA</i>	-	
	<i>tesC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024039</p>
1.Амоксицилин 25 µg	I	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		70	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	из секрета вимена краве са клиничким маститисом		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>tesA</i>	-	
	<i>tesC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024041</p>
1.Амоксицилин 25 µg	I	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		71	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	из секрета вимена краве са клиничким маститисом		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	R	Напомена: -
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	R	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		72	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	из секрета вимена краве са клиничким маститисом		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	I	Напомена: GenBank accession number: KJ024042
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	S	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		73	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	из секрета вимена краве са клиничким маститисом		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>tesA</i>	-	
	<i>tesC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>GenBank accession number:</p> <p>KJ024043</p>
1.Амоксицилин 25 µg	R	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		74	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	из секрета вимена краве са клиничким маститисом		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>tesA</i>	-	
	<i>tesC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>-</p>
1.Амоксицилин 25 µg	I	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	S	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		75	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	из секрета вимена краве са клиничким маститисом		
Хемолиза	β		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>tesA</i>	-	
	<i>tesC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	I	Напомена: GenBank accession number: KJ024044
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		76	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	брис гуше људи		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	+	
	<i>tesA</i>	-	
	<i>tesC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	I	Напомена: -
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	S	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		77		
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>		
Порекло	брис гуше људи			
Хемолиза	α			
Присуство гена:				
	<i>nuc</i>	+		
	SE	SEB		
	PVL	-		
	<i>mecA</i>	-		
	<i>mecC</i>	-		
Осетљивост на антимикробне лекове:				
1.Амоксицилин 25 µg	R	Напомена: -	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S		
3.Ампицилин 10 µg	R		
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R		
5.Неомицин 30 µg	I		
6.Новобиоцин 5 µg	S		
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R		
8.Тетрациклин 30 µg	S		
9.Триметоприм 5 µg	S		
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S		

Број изолата:		78		
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>		
Порекло	брис гуше људи			
Хемолиза	αβ			
Присуство гена:				
	<i>nuc</i>	+		
	SE	SECs		
	PVL	-		
	<i>mecA</i>	-		
	<i>mecC</i>	-		
Осетљивост на антимикробне лекове:				
1.Амоксицилин 25 µg	R	Напомена: -	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	R		
3.Ампицилин 10 µg	R		
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R		
5.Неомицин 30 µg	I		
6.Новобиоцин 5 µg	S		
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R		
8.Тетрациклин 30 µg	S		
9.Триметоприм 5 µg	S		
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S		

Број изолата:		79	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	брис гуше људи		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	+	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>-</p>
1.Амоксицилин 25 µg	I	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	R	
3.Ампицилин 10 µg	R	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	S	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		80	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	брис гуше људи		
Хемолиза	α		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	SECs	
	PVL	+	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>-</p>
1.Амоксицилин 25 µg	I	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	R	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	S	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	I	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	


Број изолата:		81	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	брис гуше људи		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	SEB	
	PVL	+	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	I	Напомена: -
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	R	
3.Ампицилин 10 µg	R	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	I	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		82	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	брис гуше људи		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	+	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	R	Напомена: -
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	R	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	S	
5.Неомицин 30 µg	S	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		83	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	брис гуше људи		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	SEB	
	PVL	-	
	<i>mecA</i>	+	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>-</p>
1.Амоксицилин 25 µg	R	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	R	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	S	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	I	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		84	
Врста:		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Порекло	брис гуше људи		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	SECs	
	PVL	+	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антимикробне лекове:			<p>Напомена:</p> <p>-</p>
1.Амоксицилин 25 µg	I	
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	R	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	I	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	I	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		85	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	брис гуше људи		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	+	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антими­кробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	R	Напомена: -
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	R	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	R	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	I	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

Број изолата:		86	
Врста: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Порекло	брис гуше људи		
Хемолиза	αβ		
Присуство гена:			
	<i>nuc</i>	+	
	SE	-	
	PVL	+	
	<i>mecA</i>	-	
	<i>mecC</i>	-	
Осетљивост на антими­кробне лекове:			
1.Амоксицилин 25 µg	I	Напомена: -
2.	..Амоксицилин/клавуланска киселина 20/10 µg	S	
3.Ампицилин 10 µg	R	
4.Бацитрацин 0,04 i.j.	R	
5.Неомицин 30 µg	S	
6.Новобиоцин 5 µg	S	
7.Пеницилин Г 10 i.j.	R	
8.Тетрациклин 30 µg	S	
9.Триметоприм 5 µg	S	
10.	...Триметоприм/сулфаметоксазол 1,25/23,75 µg	S	

БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ

Марија Пајић (девојачко презиме Нешић) рођена је 12. априла 1978. године у Сенти. Детињство је провела у Молу где је завршила Основну школу „Новак Радонић“ са одличним успехом.

Природно-математички смер Гимназије „Јован Јовановић Змај“ у Новом Саду завршила је са одличним успехом. Одбранила је матурски рад под насловом „Утицај Терс-Ви-ООН на виталност ћелија Ерлиховог асцитног карцинома“ са оценом 5.

Студије ветеринарске медицине завршила у Новом Саду, на Пољопривредном факултету, 24. октобра 2006. године са просечном оценом 9,00.

Мастер студије на Департману ветеринарске медицине Пољопривредног факултета у Новом Саду завршила је 14. фебруара 2008. године из области Болести животиња и хигијена анималних производа са просечном оценом 10,00 и одбранила master рад под насловом „Упоредни резултати броја соматских ћелија у млеку крава добијени микроскопским бројањем и фосоматик апаратом“, са оценом 10.

Запослена је на Пољопривредном факултету у Новом Саду од 15. јула 2007. године. Изабрана је 4. јула 2007. и реизабрана 2008. године у звање сарадника у настави, а у звање асистента изабрана је 29. јуна 2009. године за ужу научну област Болести животиња и хигијена анималних производа. Студенти су њен рад оценили одличном оценом.

До сада је аутор и коаутор више од четрдесет научних радова и саопштења из области ветеринарске медицине. Своје радове је излагала на међународним и националним скуповима.

Активна је у научно истраживачком раду. Била је учесник на Међународном пројекту PSOM5/SB/1/90 „Integrated improvement of the Serbian dairy chain“ (2007) и на Пројекту технолошког развоја број 20117 „Патологија и дијагностика актуелних болести животиња које угрожавају јавно здравље и животну средину“ (01.04.2008 - 31.03.2011). Учесник је на Пројекту технолошког развоја 31034 „Одабране биолошке опасности за безбедност/квалитет хране анималног порекла и контролне мере од фарме до потрошача“ (2011 - 2014. године) и на пројекту Покрајинског секретаријата за науку и технолошки развој „Контрола здравља животиња у ланцу производње здравствено безбедне хране“ (2011 - 2014. године).

Говори мађарски, енглески и немачки језик.

Удата је и има двоје деце.