

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Slobodan B. Vujinović

**ISPITIVANJE VIRULENTNOSTI I PREVALENCIJE
GENOTIPOVA KOAGULAZA POZITIVNIH
STAFILOKOKA UZROČNIKA MASTITISA KRAVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Slobodan B. Vujinović

**INVESTIGATION OF VIRULENCE AND PREVALENCE
GENOTYPES OF COAGULASE-POSITIVE
STAPHYLOCOCCI THAT CAUSE COW MASTITIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023.

MENTOR:

Dr Vera Katić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Dejan Krnjaić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr Milan Maletić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr **Dušan Milivojević**, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Zahvaljujem se svojoj mentorki, **prof. dr Veri Katić**, na nesebičnoj pomoći tokom svih faza istraživačkog rada i pisanja doktorske disertacije. Njeni stručni saveti, posvećenost, neizmerna podrška i strpljenje zaslužni su za završetak ove disertacije.

Kolegi i prijatelju **dr Dušanu Milivojeviću**, posebno sam zahvalan na pomoći oko genotipizacije tokom izvođenja eksperimentalnog dela rada. Zahvalan sam mu i na stručnim savetima, podršci i ohrabrenju koje mi je pružao od početka izrade ove disertacije.

Veliku zahvalnost za pomoć u prikupljanju uzoraka kao i analizi dobijenih rezultata u okviru doktorske disertacije dugujem kolegini **dr Jasni Prodanov-Radulović**, višem naučnom saradniku, Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad".

Prijatelju i kolegi **Ivanu Vičiću** posebno se zahvaljujem na stručnoj pomoći prilikom statističke obrade podataka, tehničke obrade teksta i pisanja rezultata.

Takođe, zahvalan sam članovima komisije, **prof. dr Dejanu Krnjiću** i **prof. dr Milanu Maletiću**, na vremenu, trudu i stručnom pregledu teksta disertacije. Njihovi komentari, saveti i sugestije bile su ključne tokom finalne izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se kolegama i prijateljima iz Veterinarskog specijalističkog instituta „Šabac“ na pruženoj pomoći i podršci tokom izrade ovog rada.

Na kraju, najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, **supruzi Sandri**, **ćerkama Juliji i Mioni** i **sinu Luki**, za neizmernu ljubav i podršku. Hvala vam na razumevanju i strpljenju tokom izrade ovog rada. Vama posvećujem ovu doktorsku disertaciju.

ISPITIVANJE VIRULENTNOSTI I PREVALENCIJE GENOTIPOVA KOAGULAZA POZITIVNIH STAFILOKOKA UZROČNIKA MASTITISA KRAVA

Sažetak:

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) izaziva hronične mastitise, koji se teško eliminišu iz stada mlečnih krava. Pretpostavlja se da je razvoj mastitisa povezan sa karakteristikama izolata *S. aureus* i ekspresijom kombinacije gena faktora virulencije. Da bi se problemi mastitisa mlečnih krava, koji su često perzistentni, sveli na najmanju moguću meru, potrebno je dobro poznavanje virulencije *S. aureus*, kako bi se na osnovu tih saznanja mogle da primene najefikasnije mere kontrole. Cilj ove disertacije je bio da se izvrši suptipizacija *S. aureus* izolovanih iz uzoraka mleka uzetih u slučajevima mastitisa krava. Za realizaciju postavljenog cilja definisani su zadaci da se: utvrdi prevalencija mastitisa krava izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokokama u Mačvanskom i Kolubarskom okrugu (Republika Srbija); izvrši fenotipska i genotipska karakterizacija izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka; ispita osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka na antimikrobna sredstva i ispita prisustvo gena virulencije kod *S. aureus* izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava u slučajevima mastitisa.

Tokom 20 meseci, primenom Kalifornija mastitis testa, ispitano je 4484 mlečnih krava, sa 288 farmi na području Mačvanskog i Kolubarskog okruga. Pozitivan mastitis test je utvrđen kod 1673 mlečne krave (37,3%). *Staphylococcus aureus* je izolovan na krvnom agaru. Na osnovu makromorfoloških, mikromorfoloških i biohemijskih osobina izolati poreklom iz uzoraka mleka krava pozitivnim na Kalifornija mastitis testu su identifikovani kao *S. aureus*. Kod svih izolata, koji su na osnovu fenotipskih osobina identifikovani kao *S. aureus* je primenom PCR metode dokazano prisustva *nuc* gena i *23S RNK* gena, specifičnih za *S. aureus*. Svi izolati *S. aureus* su primenom disk difuzione metode po Kirbi Baueru ispitani na osetljivost na antimikrobna sredstva i prisustvo gena koji kodiraju glavne faktore virulencije (*coa*, *clfA*, *cna*, *efb*, *fnbA*, *cap5*, *cap8*, *icaA*, *icaD*, *bab*, *mecA*, *pvl*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *ser*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sep*, *tsst-1*) primenom PCR.

S. aureus, kao uzročnik mastitisa dokazan je kod 242 mlečne krave, pa je ukupna prevalencija mastitisa izazvanih ovim uzročnikom bila 5,4% (95% interval poverenja, CI=4,7–6,1%). Povećan rizik od intramamarne infekcije *S. aureus* utvrđen je na malim porodičnim farmama (odnos verovatnoće, OR=4,2, 95% CI=2,6–6,6, P < 0,001) i farmama srednje veličine (OR=3,5, 95% CI=2,2–5,7, P < 0,001). Disk difuzionom metodom utvrđeno je da je najveći procenat izolata bio rezistentan na penicilin (74,7%), zatim na ampicilin (56,5%), kloksacilin (48,1 %), neomicin (42,8 %), gentamicin (27,0%), tetraciklin (14,7%), kombinaciju amoksicilina sa klavulanskom kiselinom (14%), linkomicin (12,6%), ceftriakson (10,9%), cefaleksin (8,8%) , a najmanji procenat izolata bio je rezistentan na sulfametoksazol- trimetoprim (4,9%). PCR analizom intergenskih spajsera ribozoma (RS-PCR) utvrđena su 33 različita genotipa, od kojih 10 genotipova imaju varijante. Otkriveno je ukupno 15 novih genotipova (GTCL, GTCM, GTCN, GTCO, GTCP, GTCR, GTCS, GTCT, GTCU, GTCV, GTCY, GTCX, GTCZ, GTCQ i GTDA) i 5 novih varijanti genotipova (GTD¹,

GTAF^{II}, GTAS^I, GTCL^I, GTCY^I). Dva dominantna *S. aureus* genotipa bila su GTD (25,3%) i GTR^{VI} (24,2%). Gen *spa* je otkriven kod svih izolata *S. aureus*, a ni kod jednog izolata nije otkriven *bap*, *ser* ili *tsst-1* gene. Geni koji kodiraju MSCRAMM dokazani su u visokom procentu. Kod novootkrivenih genotipova i varijanti dokazan je u manjoj frekvenciji gen *clfA* (64,8%), dok su geni koji kodiraju enterotoksine *sea* (20,4%), *seb* (14,8%) i *sec* (14,8%) dokazani u većoj frekvenciji u odnosu na poznate genotipove ($P < 0,001$). Samo kod novootkrivenih genotipova i varijanti potvrđeno je prisustvo *sej* i *sep* gena. Dokazano je 7,7% MRSA izolata kao uzročnika mastitisa kod krava, što predstavlja potencijalnu pretnju za prenos ovih sojeva na ljude. Genotipizacijom i ispitivanjem pojedinih faktora virulencije koagulaza pozitivnih stafilokoka uzročnika mastitisa kod krava, može se predvideti kontagioznost i patogenost izolata. Date informacije mogu da pomognu pri donošenju odluka koje mere treba primeniti za prevenciju širenja, terapiju i iskorenjivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka iz stada.

Ključne reči: mastitis, *Staphylococcus aureus*, RS-PCR, faktori virulencije, antimikrobna rezistencija

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Higijena mleka, mikrobiologija

UDK:

INVESTIGATION OF VIRULENCE AND PREVALENCE GENOTYPES OF COAGULASE-POSITIVE STAPHYLOCOCCI THAT CAUSE COW MASTITIS

Abstract:

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) causes chronic mastitis, which is challenging to eliminate from the herd of dairy cows. It is assumed that the development of mastitis is related to the characteristics of the *S. aureus* isolate and the expression of a combination of virulence factor genes. In order to minimize the problems of mastitis in dairy cows, which are often persistent, it is necessary to have a good knowledge of the virulence of *S. aureus* so that the most effective control measures can be applied based on this knowledge. This dissertation aimed to perform subtyping of *S. aureus* isolated from milk samples taken in cases of mastitis in cows. For the realization of the intent goal, the following tasks were defined: to determine the prevalence of cow mastitis caused by coagulase-positive staphylococci in Mačvanski and Kolubara districts (Republic of Serbia); to carry out the phenotypic and genotypic characterization of isolates of coagulase-positive staphylococci; to examine the sensitivity of coagulase-positive staphylococci to antimicrobial agents and to investigate the presence of virulence genes in *S. aureus* isolated from milk samples taken from individual quarters of udder cows in cases of mastitis. During 20 months, using the California mastitis test, 4,484 dairy cows were examined from 288 farms in the Mačva and Kolubara districts. A positive mastitis test was found in 1673 dairy cows (37.3%). *Staphylococcus aureus* was isolated on blood agar. Based on macromorphological, micromorphological, and biochemical characteristics, isolates originating from milk samples of cows positive for the California mastitis test were identified as *S. aureus*. In all isolates identified as *S. aureus* based on phenotypic characteristics, the presence of the *nuc* gene and 23S RNA gene, specific for *S. aureus*, was proven using the PCR method. All *S. aureus* isolates were tested for susceptibility to antimicrobial agents and the presence of genes encoding the main virulence factors (*coa*, *clfA*, *cna*, *efb*, *fnbA*, *cap5*, *cap8*, *icaA*, *icaD*, *bap*, *mecA*, *pvl*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *ser*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sep*, *tsst-1*) using PCR.

S. aureus, as the causative agent of mastitis, was confirmed in 242 dairy cows, so the overall prevalence of mastitis caused by this causative agent was 5.4% (95% confidence interval, CI=4.7–6.1%). An increased risk of *S. aureus* intramammary infection was found on small family farms (odds ratio, OR=4.2, 95% CI=2.6–6.6, $P < 0.001$) and medium-sized farms (OR=3.5, 95% CI=2.2–5.7, $P < 0.001$). By the disk diffusion method, it was determined that the highest percentage of isolates was resistant to penicillin (74.7%), followed by ampicillin (56.5%), cloxacillin (48.1%), neomycin (42.8%), gentamicin (27.0%), tetracycline (14.7%), the combination of amoxicillin with clavulanic acid (14%), lincomycin (12.6%), ceftriaxone (10.9%), cephalixin (8.8%), and the lowest percentage isolate was resistant to sulfamethoxazole-trimethoprim (4.9%). Ribosomal spacer PCR analysis (RS-PCR) revealed 33 different genotypes, of which ten genotypes have variants. A total of 15 new genotypes (GTCL, GTCM, GTCN, GTCO, GTCP, GTCR, GTCS, GTCT, GTCU, GTCV, GTCY, GTCX, GTCZ, GTCQ, and GTDA) and five new genotype variants (GTD^I, GTAF^{II}, GTAS^I, GTCL^I, and GTCY^I) were discovered. The two dominant genotypes of *S. aureus* were GTD (25.3%) and GTR^{VI} (24.2%). The *spa* gene was detected in all *S.*

aureus isolates, while no *bap*, *ser*, or *tsst-1* genes were detected in any of the isolates. Genes encoding MSCRAMM were detected in a high percentage. In newly discovered genotypes and variants, the *clfA* gene was detected in a lower frequency (64.8%), and the genes encoding enterotoxins *sea* (20.4%), *seb* (14.8%), and *sec* (14.8%) in the higher frequency compared to other known genotypes ($P < 0.001$). The presence of *sej* and *sep* genes was confirmed only in newly discovered genotypes and variants. 7.7% of MRSA isolates caused mastitis in cows, representing a potential threat to transmitting these strains to humans. By genotyping and testing certain virulence factors of coagulase-positive staphylococci as the causative agent of mastitis in cows, the contagiousness and pathogenicity of the isolate could be predicted. The provided information can help with the measures to be applied to prevent the spread, treat, and eradicate coagulase-positive staphylococci from the herd.

Keywords: mastitis, *Staphylococcus aureus*, RS-PCR, virulence factors, antimicrobial resistance

Scientific field: Veterinary medicine

Scientific subfield: Milk hygiene, Microbiology

UDK number:

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	6
2. 1. Mastitis krava.....	6
2.2. Karakteristike stafilokoknog mastitisa	7
2.3 Rod <i>Staphylococcus</i>	9
2.3.1 Taksonomija i osnovne karakteristike stafilokoka	9
2.3.2. Morfologija, biohemijske i kulturelne osobine stafilokoka.....	10
2.3.3 Genom.....	11
2.3.4 Faktori virulencije.....	11
2.3.5 Rezistencija na antimikrobna sredstva	16
2.4. Dijagnoza stafilokoknog mastitisa.....	17
2.5. Kontrola stafilokoknih mastitisa na farmama.....	20
3. CILJ I ZADACI.....	22
4. MATERIJAL I METODE	23
4.1. Materijal.....	23
4.1.1. Uzorci mleka.....	23
4.1.2. Referentni sojevi	23
4.1.3. Podloge za izolovanje i potvrdu koagulaza pozitivnih stafilokoka	23
4.1.4. Reagensi za bojenje po Gramu	25
4.1.5. Podloga za ispitivanje osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka na antimikrobne lekove disk difuzionom metodom po Kirbi- Baueru	26
4.1.6. Reagensi za ekstrakciju DNK	26
4.1.7. Reagensi za PCR amplifikaciju	26
4.1.8. Reagensi za vizuelizaciju PCR produkta	29

4.1.9. Reagensi za genotipizaciju	29
4.1.10. Oprema	29
4.2. Metode.....	30
4.2.1. Kalifornija mastitis test (California Mastitis Test, CMT).....	30
4.2.2. Bakteriološke metode izolacije i identifikacije stafilocoka	30
4.2.3. Ispitivanje osetljivosti stafilocoka na antimikrobna sredstva disk difuzionom metodom.....	31
4.2.4. Ekstrakcija DNK stafilocoka.....	32
4.2.5. PCR reakcije.....	32
4.2.6. Vizuelizacija PCR produkta	33
4.2.7. RS-PCR genotipizacija.....	33
4.2.8. Statistička analiza.....	34
5. REZULTATI.....	35
5.1. Rezultati mastitis testa (CMT) i nalaza koagulaza pozitivnih stafilocoka u uzorcima mleka krava .	35
5.2. Rezultati izolacije, fenotipske i genotipske identifikacije koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih u slučajevima mastitisa krava	38
5.2.1. Fenotipska identifikacija koagulaza pozitivnih stafilocoka	38
5.2.2. Genotipska identifikacija koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih u slučajevima mastitisa krava.....	40
5.3. Rezultati ispitivanja osetljivost izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka na antimikrobna sredstva	40
5.4. Rezultati RS-PCR genotipizacije S. aureus.....	42
5.5. Rezultati ispitivanja prisustva gena koji kodiraju faktore virulencije	44
6. DISKUSIJA	51
7. ZAKLJUČCI.....	64
8. LITERATURA	66

1. UVOD

Mastitis je zapaljenje mlečne žlezde i predstavlja najčešću bolest mlečnih krava sa štetnim efektom po zdravlje životinja i profitabilnost farme. Uprkos sveobuhvatnim i različitim pristupima ispitivanja, prevencije i lečenja mastitisa kod krava, on je ostao glavni problem kod proizvodnje mleka. Mastitis krava potencijalno ugrožava javno zdravlje jer se mlekom koje potiče iz vimena krava obolelih od mastitisa mogu preneti toksini i uzročnici zoonotskih bolesti. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) je najvažniji i najrasprostranjeniji uzročnik infektivnih mastitisa u svetu i u Republici Srbiji koji pripada rodu *Staphylococcus*, familiji *Staphylococcaceae*. Pored njega iz mleka su izolovane i druge koagulaza pozitivne stafilokoke, kao što su *S. intermedius* i *S. hyicus*.

Mastitis krava izazvan stafilokokama može postati veoma ozbiljan problem ako je izazvan sojevima otpornim prema više antimikrobnih sredstava. Pojavom multirezistentnih sojeva (multidrug resistance, MDR), posebno meticilin rezistentnih *S. aureus* (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), zabrinutost za zdravlje ljudi i životinja postala je sve veća. Neracionalna upotreba antibiotika, uključujući lečenje mastitisa bez prethodno ispitane osetljivosti bakterija na antibiotike, primena supertapijskih doza i nedovoljno dugo trajanje terapije, može dovesti do povećanja zastupljenosti odnosno dominacije rezistentnih u odnosu na oseljive sojeva.

S. aureus izaziva hronične mastitise, koji se teško eliminišu iz stada mlečnih krava. Razvoj mastitisa je povezan sa karakteristikama izolata *S. aureus* i ekspresijom kombinacije gena faktora virulencije. Da bi se problemi mastitisa mlečnih krava, koji su često perzistentni, sveli na najmanju moguću meru, potrebno je dobro poznavanje virulencije *S. aureus*, kako bi se na osnovu tih saznanja mogle da primene najefikasnije mere kontrole.

Koagulaza pozitivne stafilokoke se mogu izolovati i uzgajati na hranljivim podlogama. Za identifikaciju do vrste koriste se specifične podloge i pojedine biohemijske analize. Koagulaza pozitivne stafilokoke do nivoa vrste mogu se dokazati i detektovanjem specifičnih delova genoma korišćenjem molekularnih metoda kao što je lančana reakcija polimeraze (Polymerase Chain Reaction, PCR). Međutim, identifikacija do vrste uzročnika nije dovoljna da bi se razumela priroda mastitisa u zapatu. Više istraživanja genetičkih osobina ovog uzročnika pokazalo je da su različiti genotipovi *S. aureus* povezani s različitim faktorima virulencije. Na osnovu određenih genotipova može se pretpostaviti da li će uzročnik biti manje ili više kontagiozan ili će izazivati teže ili lakše patološke promene u vimenu.

Razumevanje epizootičkih, epidemioloških i evolucionih osobina stafilokoka oslanja se na fenotipske i genotipske metode tipizacije.

Fenotipske metode tipizacije su, generalno, jednostavne, lake za izvođenje, jeftinije, ali imaju nižu tačnost (Typeability; nižu mogućnost tipizacije), reproduktivnost i diskriminatornu moć nego genotipske metode. Fenotipske metode zasnovane su na određivanju antibiogramskog profila, serotipova, biotipova, fagotipova i metode multilokusne enzimske elektroforeze.

Genotipske metode tipizacije se sve više koriste zbog njihove tačnosti i velike diskriminatorne moći. Za genotipizacije stafilokoka najčešće se koriste metode: metoda slučajnog umnožavanja polimorfne DNK (Random amplification of polymorphic DNA, RAPD), polimorfizam dužine amplifikovanih fragmenata (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP), polimorfizam dužine restrikcionog fragmenta (Restriction fragment length polymorphism-PCR, RFLP), elelektroforeza u pulsnom polju (Pulse Field Gel Elektrophoresis, PFGE), multilokusno sekvenciranje (Multi Locus Sequence Typing, MLST), *spa* tipizacija proteina A *S. aureus*, tipizacija intergenskih spajsera 16S–23S rRNK ribozoma (Ribosomal spacer PCR, RS-PCR) i sekvenciranje celog genoma (Whole genome sequencing, WGS).

Genom *S. aureus* sastoji se od jednog kružnog hromozoma veličine oko $2,8 \times 10^6$ baznih parova (bp). Pored hromozoma, genom stafilokoka čine i ekstrahromozomski genetski elementi, koji se često nazivaju i mobilni genetski elementi (Mobile genetic element- MGE), koji obuhvataju plazmide, insercione sekvence, transpozone, profage i druge varijabilne elemente. Hromozom sadrži sve gene vitalne za život i razmnožavanje. Ekstrahromozomski genetski elementi sadrže gene koji kodiraju proteine neophodne za adaptaciju bakterija u različitim staništima.

Stafilokoke dobiju genetske informacije od drugih bakterija ili okruženje na tri načina: (1) usvajanjem slobodnog DNK iz okoline (transformacija) (veoma retko), (2) preko bakteriofaga (transdukcija), i (3) direktnim kontaktom između bakterijskih ćelije (konjugacija).

Geni odgovorni direktno za adaptaciju na domaćina odnosno stanište u kome se nalaze, faktore virulencije, proizvodnju toksina, rezistencije na antimikrobne supstance, kod stafilokoka nalaze se na MGE. Međutim, većina gena kodiranih od strane MGE ostaje pod kontrolom globalnih regulatora koji se nalaze u hromozomu.

Po definiciji, svaki faktor koji sadrži ili proizvodi bakterija, a koji joj omogućava preživljavanje u domaćinu, smatra se faktorom virulencije. Faktori virulencije stafilokoka mogu biti podeljeni na faktore virulencije povezane sa ćelijskim zidom, egzoenzime i egzotoksine.

Protein A je prvi identifikovani površinski protein *S. aureus*-a. Svojim C- terminalnim krajem kovalentno je vezan za peptidoglikan ćelijskog zida. N- terminalni kraj proteina A (koji se nalazi na površini bakterije) sastoji se od četiri ili pet domena koji vezuju Fc region IgG. Bakterije preko proteina A vežu IgG u pogrešnoj orijentaciji, tako da neutrofili ne mogu da prepoznaju Fc region. Ovo bi moglo objasniti antifagocitni efekat proteina A i njegovu ulogu u patogenezi infekcija.

Komponente ćelijskog zida peptidoglikan i lipoteihoinjska kiselina funkcionišu kao faktori virulencije stimulišući proizvodnju citokina.

Identifikovano je 11 različitih serotipova kapsularnih polisaharida kod *S. aureus*. Većina kliničkih izolata *S. aureus* sadrži tanak mikrokapsularni sloj koji se sastoji od kapsularnih polisaharida tipa 5 ili tipa 8. Kapsula sprečava vezivanje antitela za stafilokoke. Stafilokoke koje imaju kapsulu vezuju se i za epitelne i endotelne ćelije i monocite domaćina i indukuju izlučivanje citokina.

Adhezini se smatraju najvažnijim faktorima virulencije tokom ranih faza infekcije stafilokokama. Porodica adhezina obuhvata površinke bakterijske proteine koji posreduju u adherenciji bakterija za komponente ekstracelularnog matriksa domaćina (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules - MSCRAMM), a koji su usidreni u ćelijski zid bakterije svojim C-terminalnim krajem, dok se N-terminalnim krajem vezuju za molekule ekstracelularnog matriksa domaćina. Stafilokoke se najčešće adheriraju za fibronektin, laminin, vitronektin i kolagen epitelnih i endotelnih ćelija domaćina.

Clumping factor A i B (Clumping factor A, ClfA; Clumping factor B, ClfB) su fibrinogen vezujući proteini koji učestvuju u adherenciji stafilokoka za ćelije domaćina. Stafilokoke pomoću ClfA mogu da se adheriraju za ćelije mlečne žlezde nezavisno od fibrinogena, preko anksin A2 receptora. ClfA inhibira fagocitozu cepanjem C3b komponente komplemента pri interakciji sa regulatornim faktorom I komplemента.

Sposobnost formiranja biofilma važan je faktor virulencije stafilokoka koji im omogućava perzistenciju unutar mlečne žlezde. Stafilokoke u biofilmu otpornije su na ispiranje mlekom iz mlečne žlezde, zaštićene su od fagocitoze i tolerantnije su na antibiotike. Smanjena osetljivost na antibiotike nastaje usled smanjene difuzije leka kroz matriks biofilma, kao i smanjene metaboličke aktivnosti i razmnožavanja bakterija unutar biofilma. Sve navedeno posledično dovodi do upornih mastitisa kod krava.

Biofilm ima složenu strukturu koja se sastoji od više bakterijskih slojeva ugrađenih u ekstraćelijski matriks. Formiranje biofilma počinje adherencijom bakterija na tkivo mlečne žlezde u kojoj najčešće učestvuju MSCRAMM. Nakon adhezije bakterije se umnožavaju i počinju da luče polisaharidne intercelularne adhezine (polysaccharide intercellular adhesin, PIA), glavne komponente biofilma koje su kodirane *ica* operonom. Rast ekstracelularnog matriksa biofilma i umnožavanje bakterija dovodi do stvaranja mikrokolonija. U ovoj fazi rasta biofilma, ekstracelularni matriks ima ključnu ulogu u jačanju međusobnih veza između bakterija, kao i sa površinom gde se nalazi biofilm. Bakterije u biofilmu međusobno komuniciraju pomoću Quorum Sensing mehanizma, čime obezbeđuje razmenu i distribuciju materija i metabolita, kao i uklanjanje štetnih materija. Biofilm tokom vremena raste i usložnjava se njegova struktura. Poslednji korak u sazrevanju biofilma predstavlja odvajanje stafilokoka iz biofilma i širenje uzročnika koji mogu stvoriti formacije biofilma na drugim mestima.

Koagulaza je ekstracelularni enzim koja koaguliše plazmu prevođenjem fibrinogena plazme u fibrin. Delovanjem koagulaze stafilokoke se oblože fibrinskim omotačem koji ih verovatno štiti od fagocitoze.

Uloga lipaze je u razgrađivanju hranljivih materija iz okoline. Lipaze imaju ulogu i u razgrađivanju ćelijskih membrana domaćina. Kao odgovor na infekciju, tkivo domaćina može proizvesti razne masne kiseline i lipidne molekule koji negativno deluju kao sufraktanti na ćelijsku membranu bakterija posebno kada se formira apsces. Ove baktericidne masne kiseline mogu biti esterifikovane enzimima *Staphylococcus* sojeva koji proizvode lipazu (fatty acid – metabolizing enzyme, FAME).

Hijaluronidaze su porodica enzima koji razgrađuju hijaluronsku kiselinu. Degradacijom tkiva doprinose invazivnosti i širenju stafilokoka s primarnog mesta infekcije.

Proteaze proteolitički uništavaju tkivo domaćina i doprinose invazivnosti stafilokoka. Proteaze blokiraju dejstvo antitela cepanjem i inaktivacijom IgG. Takođe imaju ulogu u zaštiti od antimikrobnih peptida, kao što su neutrofilni defenzini. Proteaze učestvuju i u obezbeđivanju hranljivih materija iz okoline.

Enterotoksini i toksin toksičnog šoka su moćni nespecifični stimulatori T-limfocita (superantigeni), koji izazivaju nekontrolisanu aktivaciju imunološkog odgovora. Oni se vezuju za spoljašnju površinu glavnog histokompatibilnog kompleksa (Major Histocompatibility Complex, MHC) klase II, a ne za T ćelijski receptor (T-cell receptor, TCR) za koji se antigeni specifično vezuju. Zaobilazi se uobičajen način prezentacije antigena i aktivira se 30% T-limfocita, dok konvencionalni antigeni vezani za TCR aktiviraju 0,1 % T-limfocita. Posledica stimulacije T-limfocita je oslobađanje velike količine citokina koji mogu da izazovu tešku upalu mlečne žlezde. Pretpostavlja se da enterotoksini, imaju ulogu u razvoju mastitisa stvaranjem atraktivnog okruženja za kolonizaciju bakterija.

Hemolizini stafilokoka su uključeni u patogenezu mastitisa. Oni oštećuju membrane ćelija domaćina. Hemolizini mogu oštetiti eritrocite, leukocite, trombocite, epitelne i endotelne ćelije.

Leukocidini su dvokomponentni toksini koji uništavaju leukocitne ćelije domaćina formiranjem pora na ćelijskoj membrani i posledičnom lizom što omogućava da stafilokoke izbegnu imunološki sistem domaćina i obezbeđuje bržu kolonizaciju bakterijama.

Postoji sedam različitih tipova leukocidina, a Panton-Valentine leukocidin (PVL) je toksin s najjačim dejstvom na imune ćelije. PVL ima važnu ulogu u izazivanju nekroze tkiva i povezan je sa ozbiljnijim bolestima. Leukocidin M je najsnažniji citotoksin za goveđe neutrofile, dok je Leukocidin E citotoksičan za goveđe neutrofile i makrofage. Geni koji kodiraju oba ova leukocidina često su detektovani kod izolata stafilokoka koji izazivaju mastitise krava, što ukazuje da imaju važnu ulogu u razvoju mastitisa.

Da bi se suprotstavile dejstvu antibiotika stafilokoke koriste različite mehanizme rezistencije. Najvažniji mehanizmi su: produkcija enzima koji razaraju antibiotike, promena u strukturi mesta za koje se vezuje antibiotik, promena metaboličkih puteva u bakterijama, promena permeabilnosti membrane prema leku, razvoj alternativnog enzima kod bakterija, kao i aktivno izbacivanje antibiotika iz citoplazme efflux pumpom. Otpornost na antimikrobna sredstva je pojava koja se javlja tokom vremena, obično zbog čestih mutacija genoma i/ili akvizicijom gena između različitih sojeva i vrsta bakterija (horizontalni transfer gena).

Genotipozacija *spa* metodom se zasniva se na PCR amplifikaciji i sekvenciranju kratkih ponavljajućih sekvenci polimorfnog X regiona gena koji kodira protein A (*spa*), prisutnog u svim sojevima *S. aureus*. Delecije i duplikacije ponavljajućih jedinica zajedno sa tačkastim mutacijama dovode do diverziteta u polimorfnom X regionu *spa* gena. Varijacije u sekvencama koriste se za numeraciju ponavljajućih sekvenci. Podaci dobijeni sekvenciranjem se mogu analizirati pomaću

bioinformatičkog softvera Ridom Bioinformatics (<http://spaserver.ridom.de/>). Pomoću istog softvera mogu se porediti globalno svi *spa* tipovi. Genotipozacija *spa* metodom korišćena je u mnogim epizootiološkim studijama za identifikaciju genetskih linija *S. aureus*-a kod mastitisa goveda.

Whole Genome Sequencing pruža mogućnost otkrivanja strukture genoma i celog genetskog sadržaja mikroorganizama sve do rezolucije od jednog baznog para. S tehnološkim napretkom, WGS je postao pristupačniji alat za genotipizaciju sa visokom propusnosti i najvećom diskriminatornom moći. Primena ove metode doprinela je boljem poznavanju strukture populacije *S. aureus*, poznavanju porekla sojeva otpornih na antibiotike, genetske osnove virulencije, kao i nastanaka i širenje loza iz lokalnih i globalnih populacija goveda.

PCR intergenskih spajsera ribozoma se zasniva na amplifikaciji 16S–23S rRNK međugenskog odvojenog regiona (spajser regiona) i elektroforetskoj analizi dobijenih PCR produkata. Region 16S–23S rRNK pokazuje velike varijacije u sekvenci i dužini na nivou vrste, što je iskorišćeno za suptipizaciju stafilokoka. Ova metoda genotipizacije veoma rezolutivna i robusna, a i zbog jednostavnosti izvođenja ima i visoku propustnost. Za epidemiološka poređenja između genotipova izolovanih kod goveda i ljudi, potrebno je uporedo sa RS-PCR izvršiti i *spa* genotipizaciju, jer se *spa* metoda široko koristi za genotipizaciju sojeva izolovanih kod ljudi i dostupno je mnogo podataka u bazi.

U terapiji mastitisa najčešće se koriste antimikrobna sredstva (antibiotici i hemioterapeutici), a rezultati izlečenja su veoma varijabilni (od 4% do 92%), što zavisi od niza faktora, uključujući faktore domaćina - krave, genotipa stafilokoka i režima terapije. Koagulaza pozitivne stafilokoke su najpoznatije bakterije koje razvijaju rezistencije na antimikrobna sredstva, što sužava izbor leka za terapiju.

S. aureus izaziva hronične mastitise, koji se teško eliminišu iz stada muznih krava. Pretpostavlja se da je razvoj mastitisa povezan sa karakteristikama izolata *S. aureus* i ekspresijom kombinacije različitih gena faktora virulencije. Da bi se problemi mastitisa mlečnih krava, koji su često perzistentni, sveli na najmanju moguću meru, potrebno je dobro poznavanje virulencije *S. aureus*, kako bi se na osnovu tih saznanja mogle da primene najefikasnije mere kontrole.

Genotipizacija *S. aureus* važna je za epizootiološka istraživanja, za utvrđivanje izvora infekcije, puteve prenošenja kao i proučavanje faktora virulencije sojeva koji daju različite forme mastitisa. Do danas u Republici Srbiji nije ispitivana distribucija genotipova koagulaza pozitivnih stafilokoka i njihova povezanost sa faktorima virulencije. Stoga je cilj ove disertacije da se izvrši suptipizacija *S. aureus* izolovanih iz uzoraka mleka uzetih u slučajevima mastitisa krava. Za realizaciju postavljenog cilja definisani su sledeći zadaci: da se utvrdi prevalencija mastitisa krava izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokokama u Mačvanskom i Kolubarskom okrugu; izvrši fenotipska i genotipska karakterizacija izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, ispita osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka na antimikrobna sredstva i ispita prisustvo gena virulencije kod *S. aureus* izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava u slučajevima mastitisa.

2. PREGLED LITERATURE

2. 1. Mastitis krava

Mastitis je zapaljenje mlečne žlezde i predstavlja najčešću bolest muznih krava sa štetnim efektom po zdravlje životinja i profitabilnost farme (Ruegg, 2017). Uprkos sveobuhvatnim i različitim pristupima ispitivanja, prevencije i lečenja mastitisa kod krava, on je ostao glavni problem industrije mleka. Mastitis krava predstavlja jedan od najaktuelnijih problema u proizvodnji mleka, koji nanosi velike ekonomske gubitke (Rose i sar., 2003). Direktni ekonomski gubici kod mastitisa obuhvataju: troškove lekova, troškove veterinarskih usluga, odbačeno mleko lečenih životinja, u nekim teškim slučajevima i uginuće životinja. Indirektni gubici obuhvataju: smanjenje proizvodnje mleka, smanjenje kvaliteta mleka, prevremeno izlučivanje hronično obolelih životinja i poremećaj plodnosti (Petrovski i sar., 2006; Bar i sar., 2008; Halasa i sar., 2009; Dahl i sar., 2018). U studiji Rose i sar., (2003) utvrđeno je da se proizvodnja mleka ne poboljšava ni nakon potpunog oporavka od supkliničkih mastitisa, tako da je ekonomski gubitak i nakon oporavka krava i dalje značajan. Pored toga, mastitis narušava kvalitet mleka koje je nepodobnije za tehnološku obradu (Stojanović i Katić, 2011).

Mastitis krava potencijalno ugrožava javno zdravlje jer se mlekom koje potiče iz vimena krava obolelih od mastitisa mogu preneti toksini i uzročnici zoonotskih bolesti (Zouharova i Rysanek, 2008). Mleko koje potiče od krava lečenih od mastitisa u slučajevima nepravilne terapije i procene upotrebljivosti mleka za ishranu ljudi, može da sadrži ostatke antibiotika (Singh i sar., 2014). Konzumacija mleka i proizvoda od mleka koji sadrže rezidue antibiotika kod ljudi može izazvati alergijske reakcije, poremećaj crevne flore i razvoj rezistentnih bakterija (Althaus i sar., 2003). Takođe, rezidue antibiotika iz mleka smanjuju aktivnost bakterija mlečne kiseline uključenih u procesima fermentacije (Singh i sar., 2014).

Zapaljenje mlečne žlezde nastaje kao posledica reakcije tkiva na povrede, strane materije ili mikroorganizme. U nastajanju mastitisa učestvuju tri grupe faktora: krava sa odbrambenim sistemom i predispozicijom za nastajanje mastitisa, mikroorganizmi sa mehanizmima patogenog delovanja i uslovi sredine koji omogućavaju održivost mikroorganizama u spoljašnjoj sredini i brojne mogućnosti za prenošenje uzročnika mastitisa. Svi navedeni faktori podjednako utiču na nastajanje i trajanje mastitisa (Stojanović i Katić, 2011).

Klinički gledano mastitisi se mogu pojaviti u klinički vidljivoj formi sa raširenošću 1 - 3% i supkliničkoj formi sa raširenošću preko 30% (Stojanović i sar., 2001). Dijagnostika kliničkih mastitisa ne predstavlja problem, budući da u takvim slučajevima dolazi do otoka, temperiranosti, bola i induracije u pogođenoj četvrti mlečne žlezde, kao i promena u mleku (promena boje i konzistencije, prisustvo krpica, tragova gnoja i krvi) (Gruet i sar., 2001). Dijagnoza kliničkog mastitisa se postavlja, adspekcijom, palpacijom i pregledom prvih mlazeva mleka. U slučajevima supkliničkih mastitisa, ne zapažaju se vidljive promene na mlečnoj žlezdi i mleku (Ruegg, 2017). Međutim, smanjuje se prinos mleka i povećava broj somatskih ćelija u mleku (Somatic cell count - SCC). Otkrivanje supkliničkih mastitisa zasniva se na utvrđivanju povećanog broja SCC i medijatora zapaljenja u mleku, a najpoznatiji su sledeći testovi i metode

ispitivanja: Kalifornija mastitis test, Whiteside test, automatsko brojanje somatskih ćelija, elektroprovodljivost mleka, sadržaj NaCl, koncentracija C reaktivnog proteina i dr. (Khan i Khan, 2006). Mleko iz zdravih četvrti vimena uglavnom sadrži ispod 200.000 SCC / mL. Broj SCC iznad 300.000 već predstavlja indikaciju za upalu vimena. Postoji mnoštvo dokaza da kravlje mleko prirodno sadrži od 100.000 - 150.000 SCC / mL i da broj SCC iznad tog nivoa ukazuje na sekretorne poremećaje (Hillerton, 1999).

Mastitis krava nastaje kada uzročnik (infektivne, fizičke ili hemijske prirode) dospe u mlečnu žlezdu i otpočne svoje patogeno delovanje. Kako četvrti vimena međusobno ne komuniciraju, uzročnici mastitisa mogu da dospeju u mlečnu žlezdu:

1. putem krvotoka iz nekog žarišta u organizmu (hematogeno, limfogeno);
2. kroz sisni otvor i sisni kanal (galaktogeno);
3. preko povreda na koži sisa i vimena (infekcija rane) (Magaš, 2012).

Mastitise uzrokuje širok spektar mikroorganizama (najčešće bakterije 95 - 98%) koji se epizootiološki dele u dve grupe: uzročnici kontagioznih mastitisa i uzročnici mastitisa iz okruženja. Uzročnici kontagioznih mastitisa žive i razmnožavaju se u mlečnoj žlezdi, šire se sa četvrti na četvrt; i sa životinje na životinju uglavnom tokom nehigijenskog i nepravilnog postupka muže. Kontagiozne mastitise izazivaju: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) i ređe *Mycoplasma bovis* i *Corynebacterium bovis* (Kibebew, 2017).

Uzročnici mastitisa iz okruženja nalaze se na telu životinja i u okolini u kojoj životinje borave. Oportunističke su prirode i izazivaju mastitis kada je imunološki sistem domaćina oslabljen ili kada nisu dobri higijenski uslovi u okolini. Ovoj grupi uzročnika pripadaju: *Streptococcus uberis* (*S. uberis*), *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella* spp., *Enterococcus* spp, *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Candida albicans*, *Prothoteca* spp. (Rakesh Ranjan i sar., 2006; Verbeke i sar., 2014; Kibebew, 2017).

2.2. Karakteristike stafilokoknog mastitisa

S. aureus je najrasprostranjeniji mikroorganizam koji izaziva zapaljenje mlečne žlezde (Khan i Khan, 2006). Pored *S. aureus* i druge koagulaza pozitivne stafilokoke izazivaju mastitise kod krava, kao što su *Staphylococcus intermedius* (*S. intermedius*) i *Staphylococcus hyicus* (*S. hyicus*) (Rediet i sar., 2013; Rajić Savić i sar., 2014; Adkins i sar., 2017). Prevalencija mastitisa izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokokama različita je u različitim državama i kreće se u rasponu od 1,3% do 39% (Ferguson i sar., 2007; Cervinkova i sar., 2013; Cobirka i sar., 2020). Glavni rezervoar koagulaza pozitivnih stafilokoka je zaražena četvrt vimena, a prenos uzročnika na druge četvrti i druge životinje najverovatnije se događa tokom muže (preko ruku mužača, sisnih guma od muzilica, krpa za brisanje vimena) (Fox i Gay, 1993). Traumatizovana mesta na vimenu, zglobovima, pregibima kože krava, smatraju se sekundarnim izvorima koagulaza pozitivnih

stafilokoka. Da bi izazvale mastitis stafilokoke moraju ući i opstati u mlečnoj žlezdi, odnosno moraju pobediti sve nespecifične i specifične faktore odbrane domaćina. Jedina mehanička barijera između spoljašnje sredine i unutrašnjosti vimena je sisni kanal, koji ujedno predstavlja i vrata infekcije. Vrh sise mlečne žlezde služi kao prva linija odbrane protiv infekcije. Sfinkter sisnog kanala, izgrađen od glatkih mišića, služi kao zatvarač sisnog kanala (Murphy i sar, 1988). Takođe služi i za sprečavanje isticanja mleka iz mlečne žlezde i ulazak infektivnih agenasa u nju. Unutrašnjost sisnog kanala obložena je keratinom nastalom iz višeslojnog skvamoznog epitela. Keratin u sisnom kanalu je građen od masnih kiselina i vlaknastih proteina. Masne kiseline deluju bakteriostatski. Vlaknasti proteini elektrostatički vežu uzročnike mastitisa i menjaju ćelijski zid bakterija, čineći ih osetljivim na osmotski pritisak. Nesposobnost održavanja osmotskog pritiska uzorkuje lizu i smrt invazivnih patogenih mikroorganizama. Keratinska struktura na taj način omogućava hvatanje invazivnih bakterija i sprečava njihovu migraciju u cisternu mlečne žlezde (Habbit i sar, 1969).

Tokom muže bakterije, koje su prisutne u blizini otvora sisnog kanala, koriste priliku da uđu u sisni kanal, prouzrokujući oštećenja keratinskog sloja ili sluzokože sinusa (Capuco i sar, 1992). Kanal sise može ostati delimično otvoren 1-2 sata nakon muže i tokom ovog perioda patogeni mikroorganizmi mogu ući u kanal sise (Jones i Bailey, 2006). Nakon prodora u mlečnu žlezdu stafilokoke moraju da izdrže ispiranje mlekom sve dok se ne vežu za epitelne ćelije mlečne žlezde ili za molekule ekstracelularnog matriksa (Frost i sar., 1977). *S. aureus* prijanja na epitelne ćelije vimena bolje od većine drugih bakterijskih vrsta (Frost i sar., 1977). Oštećenje epitela otkriva osnovne subepitelne komponente, što omogućava stafilokoknim površinskim proteinima vezivanje za ekstracelularni matriks (Patti i sar., 1994). Egzotoksini, koje luči *S. aureus*, takođe mogu biti uključeni u oštećenje epitela (Mamo i sar., 1988). Stafilokoke dospеле u mlečnu žlezdu kolonizuju tkivo i tu se umnožavaju. Svojim metabolitima i faktorima virulencije izazivaju oštećenje tkiva i inflamatornu reakciju, nakon čega zahvaćeno tkivo počinje da luči medijatore zapaljenja. Ti medijatori privlače leukocite koji migriraju na mesto inflamacije, pokušavajući da se izbore sa uzročnicima. U odbrambene mehanizme mlečne žlezde uključene su i komponente mleka sa baktericidnom aktivnošću, kao što su lizozim, laktoferin i peroksidaza. Humoralni i celularni sistem odbrane igraju važnu ulogu u borbi protiv patogenih mikroorganizama u mlečnoj žlezdi (Rainard i Riollet, 2003). Uspešna infekcija zavisi od osobina uzročnika, njegove virulencije koja mu omogućava preživljavanje i patogeno delovanje.

U početku infekcije stafilokoke oštećuju tkiva cisterni papila i cisterni vimena, što na kraju dovodi do formiranja ožiljnog tkiva. Stafilokoke zatim invadiraju mlečne canaliće i alveole uspostavljajući duboke džepne infekcije u lobulusima. Ovo je praćeno formiranjem apscesa koji sprečava širenje bakterija, ali omogućava i izbegavanje imunološkog sistema domaćina. Takođe, apscesi sprečavaju i prodor antibiotika do bakterija, što predstavlja glavni razlog lošeg odgovora na lečenje (Pettersson-Volfe i sar., 2010). Uništene ćelije duktusa i alveola zamenjuje fibrinozno tkivo, što dovodi do okluzije kanala i smanjene proizvodnje mleka. Kanali se kasnije mogu otvoriti, što obično rezultira oslobađanjem stafilokoka i njihovim širenjem u druge oblasti mlečne žlezde sa ponovnim formiranjem apscesa u tkivu (Pettersson-Volfe i sar., 2010).

Većina stafilokoknih mastitisa su supklinički, hroničnog toka sa povišenim brojem somatskih ćelija i povremenim epizodama kliničke forme (Rainard i sar., 2018). Osobine stafilokoka da mogu da formiraju manje aktivne metaboličke varijante u mlečnoj žlezdi, takozvane male kolonije, doprinose inaparentnim formama mastitisa i povremenim izlučivanjem uzročnika, što još više otežava dijagnozu i terapiju stafilokoknih mastitisa (Proctor i sar., 1998; Sinha i Herrmann, 2005).

2.3 Rod *Staphylococcus*

2.3.1 Taksonomija i osnovne karakteristike stafilokoka

Formalan taksonomski opis roda *Staphylococcus* uradio je Rosenbach (1884), kada je podelio ovaj rod na *S. aureus* i *S. albus*, iako je sferične bakterije Aleksandar Ogston u gnoju apscesa otkrio ranije (Ogston 1880). Zopf (1885) je stafilokoke koje imaju grozdaste strukture pod mikroskopom i mikrokoke koje formiraju tetrade svrstao u rod *Micrococcus*. Fluge je 1886. godine odvojio rod *Staphylococcus* od *Micrococcus*. On je razlikovao ova dva roda na osnovu dejstva na želatin i odnosa prema domaćinu.

Sredinom 1960-tih godina stafilokoke i mikrokoke su razdvojene na osnovu zastupljenosti nukleobaza u DNK (Silvestri i Hill, 1965). Vrste u okviru roda *Staphylococcus* u DNK su imale guanina i citozina u rasponu od 33-40 mol%, dok su *Micrococcus* vrste imale visok sadržaj guanina i citozina oko 70 mol% (Götz i sar., 2006).

Na osnovu posedovanja enzima koagulaze stafilokoke su podeljene u dve grupe: 1) koagulaza pozitivne vrste (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. pseudintermedius* i *S. schleiferi* subspecies *coagulans*) i 2) koagulaza negativne vrste (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. chromogenes*, *S. felis*) (Milić i sar., 2017). Danas rod *Staphylococcus* sadrži 48 vrsta (Milić i sar., 2017).

Stafilokoke su oportunističke bakterije koje kolonizuju različita mesta na telu kod brojnih životinjskih vrsta i ljudi (Cuny i sar., 2010). Najčešće su prisutne na koži i sluzokožama, koji predstavljaju najznačajniji rezervoar i izvor infekcije. Kod životinja i ljudi stafilokoke prouzrokuju mastitise, septikemična oboljenja, apscese, gnojna oboljenja kože, potkožnog tkiva i sluznica (Zecconi 2010, Milić i sar., 2017, Cheung i sar., 2021). *S. aureus* je često izolovan iz različite hrane životinjskog porekla. Takva hrana može biti kontaminirana sa jednim ili više prethodno formiranih stafilokoknih enterotoksina (SE) i može dovesti do trovanja ljudi (Normanno i sar., 2007).

Iz roda *Staphylococcus*, vrsta *S. aureus* se smatra najčešćim uzročnikom mastitisa. Iz mleka su izolovane i druge koagulaza pozitivne stafilokoke kao što su *Staphylococcus intermedius* (*S. intermedius*) (Belayneh i sar., 2013) ili *Staphylococcus hyicus* (*S. hyicus*) (Roberson i sar., 1996). *S. intermedius* izaziva dermatitis kod pasa, dok *S. hyicus* kod svinja izaziva eksudativni epidermitis i artritis (Milić i sar., 2017).

2.3.2. Morfologija, biohemijske i kulturelne osobine stafilokoka

Stafilokoke su Gram-pozitivne loptaste (koke) bakterije prečnika oko 1 μm . Razmnožavaju se prostom deobom u više ravni, tako da se na mikroskopskim preparatima vide u grupicama nalik grozdovima. Po Gramu se boje plavo (pozitivno), a izuzetno retko neke bakterije u starijim kulturama, mogu da budu Gram-varijabilne boje. One su nepokretne bakterije koje stvaraju najčešće žuto-zlatne kolonije. Aureus (lat. aurei) u prevodu znači zlatan. Boja kolonija koagulaza pozitivnih stafilokoka potiče od sposobnosti sinteze karotenoidnih pigmenata i zavisi od vrste i koncentracije tih pigmenata. Uočava se veliki broj nijansi kolonija, od svetlo do tamno žutih, pa i kolonije koje su bele i koje se označavaju kao nepigmentisane (Adesiyun i sar, 1999).

Koagulaza pozitivne stafilokoke su katalaza pozitivne, fakultativno anaerobni mikroorganizmi koji bolje rastu u aerobnim uslovima. Na čvrstim hranljivim podlogama za 24h izrastu kolonije veličine 2 do 4 mm, koje su okrugle, konveksne i glatke. Optimalna temperatura za razmnožavanje ovih bakterija je 30-37°C, mada mogu i da se razmnožava na temperaturama između 10 °C i 42 °C. Optimalna pH za razmnožavanje je 7,0 - 7,5 mada *S. aureus* toleriše i pH između 4,2 i 9,3. *S. aureus* je otporan na NaCl (15–20%), soli žuči (40%), visoke koncentracije šećera i relativno je otporan na sušenje i toplotu. *S. aureus* relativno brzo koaguliše plazmu kunića dok *S. hyicus* izaziva odloženu koagulaciju (Adkins i sar., 2017). Većina sojeva hidrolizuje hemoglobin, fibrin, belance jajeta, kazein i želatin. Takođe, proizvode alfa, beta i delta hemolizine, koji se međusobno razlikuju po sposobnosti lize eritrocita ovna. Ostale bitne biohemijske osobine za identifikaciju koagulaza pozitivnih stafilokoka date su u tabeli 2.3.2.1. (Götz i sar, 2006).

Tabela 2.3.2.1. Biohemijske osobine koagulaza pozitivnih stafilokoka (Götz i sar, 2006)

	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. hyicus</i>
Koagulaza	+	+	±
Clumping faktor	+	±	-
Termonukleaza	+	+	+
Hemoliza	+	±	-
Katalaza	+	+	+
Oksidaza	-	-	-
β- galaktozidaza	-	+	-
Fermentacija šećera i stvaranje kiselina			
D-manitol	+	±	-
Maltoza	+	()	-

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

2.3.3 Genom

Genom *S. aureus* sastoji se od jednog kružnog hromozoma veličine oko $2,8 \times 10^6$ baznih parova (bp). Pored hromozoma, genom stafilokoka čine i ekstrahromozomski genetski elementi, koji se često nazivaju i mobilni genetski elementi (Mobile genetic element-MGE), koji obuhvataju plazmide, insercione sekvence, transpozone, profage i druge varijabilne elemente. Hromozom sadrži sve gene vitalne za život i razmnožavanje (Malachowa i DeLeo, 2010). Ekstrahromozomski genetski elementi sadrže gene koji kodiraju proteine neophodne za adaptaciju bakterija u različitim staništima (Malachowa i DeLeo, 2010).

Stafilokoke dobiju genetske informacije od drugih bakterija ili okruženje na tri načina: (1) usvajanjem slobodnog DNK iz okoline (transformacija) (veoma retko), (2) preko bakteriofaga (transdukcija), i (3) direktnim kontaktom između bakterijskih ćelije (konjugacija) (Malachowa i DeLeo, 2010).

Geni odgovorni direktno za adaptaciju na domaćina, faktore virulencije, proizvodnju toksina, rezistencije na antimikrobne supstance, kod stafilokoka nalaze se na MGE (Malachowa i DeLeo, 2010). Međutim, većina gena kodiranih od strane MGE ostaje pod kontrolom globalnih regulatora koji se nalaze u hromozomu (Malachowa i DeLeo, 2010).

2.3.4 Faktori virulencije

Po definiciji, svaki faktor koji sadrži ili proizvodi bakterija, a koji joj omogućava preživljavanje u domaćinu, smatra se faktorom virulencije (Projan i Novick, 1997).

Faktori virulencije stafilokoka mogu biti podeljeni na faktore virulencije povezane sa ćelijskim zidom, egzoenzime i egzotoksine.

2.3.4.1 Faktori virulencije povezani sa ćelijskim zidom

Protein A. Protein A je prvi identifikovani površinski protein *S. aureus*-a (Sjödahl, 1977). Svojim C- terminalnim krajem kovalentno je vezan za peptidoglikan ćelijskog zida (Götz i sar, 2006). N-terminalni kraj proteina A (koji se nalazi na površini bakterije) sastoji se od četiri ili pet domena koji vezuju Fc region IgG (Uhlen i sar., 1984). Bakterije preko proteina A vežu IgG u pogrešnoj orijentaciji, tako da neutrofili ne mogu da prepoznaju Fc region. Ovo bi moglo objasniti antifagocitni efekat proteina A i njegovu ulogu u patogenezi infekcija (Foster, 2005).

Peptidoglikan i lipoteihoiniska kiselina. Komponente ćelijskog zida peptidoglikan i lipoteihoiniska kiselina funkcionišu kao faktori virulencije stimulišući proizvodnju citokina (Projan i Novick 1997).

Kapsularni polisaharidi. Identifikovano je 11 različitih serotipova kapsularnih polisaharida kod *S. aureus* (Salimena i sar., 2016). Većina kliničkih izolata *S. aureus* sadrži tanak mikrokapsularni sloj koji se sastoji od kapsularnih polisaharida tipa 5 ili tipa 8 (Hochkeppel i sar., 1987). Kapsula sprečava vezivanje antitela za stafilokoke (Nilsson i sar., 1997). Stafilokoke koje imaju kapsulu vezuju se i za epitelne i endotelne ćelije i monocite domaćina i indukuju izlučivanje citokina (Soell i sar., 1995).

Adhezini. Adhezini se smatraju najvažnijim faktorima virulencije tokom ranih faza infekcije stafilokokama. Porodica mikrobnih površinskih adhezina ima ulogu u prepoznavanju i vezivanju za komponente ekstracelularnog matriksa domaćina (MSCRAMM) (Foster i Höök, 1998; Clarke i Foster, 2006) i predstavlja proteine usidrene svojim C- terminalnim krajem u ćelijski zid bakterije, dok se N- terminalnim krajem vezuju za ekstracelularni matriks tkiva domaćina (Foster i sar., 2014). Stafilokoke se najčešće adheriraju za fibronektin, laminin, vitronektin i kolagen epitelnih i endotelnih ćelija domaćina (Mamo i sar., 1988; Gillaspay i sar., 1998).

Adhezija i invazija ćelija mlečne žlezde uglavnom započinje vezivanjem fibronektin- vezujućeg proteina A (fibronectin binding protein-A, FnBPA) (Lammers i sar., 1999). Fibronektin deluje kao most koji povezuje FnBPA sa $\alpha 5\beta 1$ integrinom prisutnim na površini ćelija mlečne žlezde (Sinha i sar., 1999, Fowler i sar., 2000). Interakcija FnBPA-integrin indukuje promene citosolnog proteinskog kompleksa što dovodi do preuređivanja citoskeleta i posledično ulaska bakterije u ćeliju (Agerer i sar., 2005). FnBPA može da se veže i za fibrinogen i elastin (Roche i sar., 2004).

Klamping factor A i B su fibrinogen vezujući proteini koji učestvuju u adheziji stafilokoka za ćelije domaćina (Foster i sar., 2014). Stafilokoke pomoću ClfA mogu da se adheriraju za ćelije mlečne žlezde nezavisno od fibrinogena, preko anksin A2 receptora (Ashraf i sar., 2017). ClfA inhibira fagocitozu cepanjem C3b komponente komplemента pri interakciji sa regulatornim faktorom I komplemента (Hair i sar., 2010).

Kolagen vezujući protein (collagen adhesin, CNA) ima važnu ulogu u adheziji bakterija za tkivo mlečne žlezde (Monistero i sar., 2018). S obzirom da je kolagen veoma rasprostranjen u tkivu vimena, ekspresija gena *cna* važna je za adheziju *S. aureus* za epitelne ćelije mlečne žlezde krava.

Ekstracelularni fibrinogen vezujući protein (Extracellular Fibrinogen-binding protein, EFB) vezuje se za C3 faktor komplemента i blokira taloženje C3 faktora na površinu stafilokoka usled čega je sprečena aktivacija komplemента (Lee i sar., 2004). Tokom infekcije EFB sa fibrinogenom stvara zaštitni štiti sa antifagocitnom ulogom (Ko i sar., 2016).

Biofilm. Sposobnost formiranja biofilma važan je faktor virulencije stafilokoka koji im omogućava perzistenciju unutar mlečne žlezde. Stafilokoke u biofilmu otpornije su na ispiranje mlekom iz mlečne žlezde, zaštićene su od fagocitoze i tolerantnije su na antibiotike (Cucarella i sar., 2004). Smanjena osetljivost na antibiotike nastaje usled smanjene difuzije leka kroz matriks biofilma, smanjene metaboličke aktivnosti i razmnožavanja bakterija unutar biofilma (Aguilar i Iturralde., 2001). Sve navedeno posledično dovodi do upornih mastitisa kod krava (Fox i sar., 2005, Melchior i sar., 2006, Grunert i sar., 2018).

Biofilm ima složenu strukturu koja se sastoji od više bakterijskih slojeva ugrađenih u ekstraćelijski matriks. Formiranje biofilma počinje adherencijom bakterija na tkivo mlečne žlezde u kojoj najčešće učestvuju MSCRAMM (Speziale i sar., 2014). Nakon adhezije bakterije se umnožavaju i počinju da luče PIA, glavne komponente biofilma koje su kodirane *ica* operonom (Cramton i sar., 1999, Arciola i sar., 2015). Rast ekstracelularnog matriksa biofilma i umnožavanje bakterija dovodi do stvaranja mikrokolonija. U ovoj fazi rasta biofilma, ekstracelularni matriks ima ključnu ulogu u jačanju veza između bakterija, kao i sa površinom gde se nalazi biofilm (Chmielewski i Frank, 2003). Bakterije u biofilmu međusobno komuniciraju pomoću Quorum Sensing mehanizma (Novick i Geisinger., 2008). Komunikacija među mikrokolonijama obezbeđuje razmenu i distribuciju materija i metabolita, kao i uklanjanje štetnih materija (Costerton i Levandovski, 1995; Jamal i sar., 2018). Biofilm tokom vremena raste i usložnjava se njegova struktura. Poslednji korak u sazrevanju biofilma predstavlja odvajanje stafilokoka iz biofilma i širenje uzročnika (McLandsborough i sar., 2006) koji mogu promovisati stvaranje biofilma na drugim mestima.

Stafilokoke mogu da formiraju biofilm nezavisno od *ica* lokusa. Protein povezan sa biofilmom (biofilm associated protein, Bap) i protein povezan sa akumulacijom (accumulation-associated protein, Aap) može zameniti PIA tokom razvoja biofilma kod stafilokoka (Cucarella i sar., 2004, O'Gara., 2007), što ukazuje da stafilokoke mogu imati nekoliko mehanizama stvaranja biofilma bez prisustva pojedinih gena koji kodiraju stvaranje komponenti biofilma.

2.3.4.2 Egzoenzimi

Koagulaza. Koagulaza je ekstracelularni enzim koja koaguliše plazmu prevođenjem fibrinogena plazme u fibrin (Milić i sar, 2017). Delovanjem koagulaze stafilokoke se oblože fibrinskim omotačem koji ih verovatno štiti od fagocitoze (Pal i sar, 2020).

Lipaze. Uloga lipaze je u razgrađivanju hranljivih materija iz okoline (Projan i Novick, 1997). Lipaze imaju ulogu i u razgrađivanju ćelijskih membrana domaćina (Doery i sar, 1965). Kao odgovor na infekciju, tkivo domaćina može proizvesti razne masne kiseline i lipidne molekule koji deluju kao sufraktanti ometajući ćelijsku membranu bakterija posebno kada se formira apsces (Shryock i sar, 1992). Ove baktericidne masne kiseline mogu biti esterifikovane enzimima *Staphylococcus* sojeva koji proizvode lipazu (fatty acid – metabolizing enzyme, FAME) (Tam i Torres, 2019).

Hijaluronidaza razgrađuju hijaluronsku kiselinu i posledično degradacijom tkiva doprinosi invazivnosti i širenju stafilokoka s primarnog mesta infekcije (Farrell i sar, 1995).

Proteaze. Proteaze proteolitički uništavaju tkivo domaćina i doprinose invazivnosti stafilokoka (Götz i sar, 2006). Proteaze blokiraju dejstvo antitela cepanjem i inaktivacijom IgG. Takođe imaju ulogu u zaštiti od antimikrobnih peptida, kao što su neutrofilni defenzini. Proteaze učestvuju i u obezbeđivanju hranljivih materija iz okoline (McGavin i sar., 1997).

2.3.4.3 Egzotoksini

Enterotoksini i toksin toksičnog šoka. Enterotoksini i toksin toksičnog šoka su moćni nespecifični stimulatori T-limfocita (superantigeni), koji izazivaju nekontrolisanu aktivaciju imunološkog odgovora (Dinges i sar., 2000, Fisher i sar., 2018). Oni se vezuju za spoljašnju površinu glavnog histokompatibilnog kompleksa (Major Histocompatibility Complex, MHC) klase II, a ne za TCR za koji se antigeni specifično vezuju. Zaobilazi se uobičajen način prezentacije antigena i aktivira se 30% T-limfocita, dok konvencionalni (ili je bolji izraz uobičajeni) antigeni vezani za TCR aktiviraju 0,1 % T-limfocita (Fleischer i Schrezenmeier, 1988). Posledica stimulacije T-limfocita je oslobađanje velike količine citokina koji mogu da izazovu tešku upalu mlečne žlezde (Tollersrud i sar., 2006, Wang i sar., 2018, Fang i sar., 2019). Pretpostavlja se da enterotoksini, imaju ulogu u razvoju mastitisa stvaranjem adekvatnog okruženja za olakšanu kolonizaciju bakterija (Piccinini i sar., 2010).

Mlečna žlezda krava zaražena enterotoksogenim stafilokokama postaje izvor enterotoksina u mleku što može dovesti do intoksikacija kod ljudi (Zschöck i sar., 2005). Enterotoksini su stabilni na visokoj temperaturi i zadržavaju svoju biološku aktivnost u mleku i proizvodima od mleka i posle pasterizacije (Hennekinne i sar., 2012). Ukupno je do sada opisano više od 27 serotipova (Lefebvre i sar., 2022). U nedavnom istraživanju primenom sekvenciranja celog genoma (Whole genome sequencing, WGS), utvrđeno je da jedan soj koagulaza pozitivnih stafilokoka može da sadrži između 1 i 11 gena koji kodiraju stafilokokne enterotoksine (Lefebvre i sar., 2022).

Eksfolijativni toksini. Neki sojevi sekretuju eksfolijativne toksine koji dovode do opsežnih oštećenja *stratum granulosum* epidermisa i proteolitičkog cepanja dezmostoleina 1 (Dsg-1) i time do olakšane kolonizacije kože sisara stafilokokama da kolonizuju kožu sisara (Imanishi i sar., 2019).

Hemolizini. Hemolizini stafilokoka su uključeni u patogenezu mastitisa. Oni oštećuju membrane ćelija domaćina (Vann i sar., 1988). Hemolizini mogu oštetiti eritrocite, leukocite, trombocite, epitelne i endotelne ćelije. α -hemolizin (Alpha-hemolysin, Hla) je citotoksin koji *S. aureus* najčešće proizvodi (Pérez i sar., 2020). Hla se za ciljanu ćeliju vezuje preko proteina ADAM 10 i formira transmembranske pore. Ovo dovodi do povećane permeabilnosti ćelijske membrane usled čega nastaju ireverzibilne osmotske promene u citoplazmi, što dovodi do smrti ćelija (Oliveira i sar., 2018). Razlike u citolitičkom kapacitetu prema različitim tipovima ćelija posredstvom Hla zavise od distribucije ADAM 10 receptora u različitim tipovima ćelija (Berube i sar., 2013). Fagocitovane bakterije koje proizvode Hla mogu da liziraju ćelije koje su ih inkorporisale, i nakon osobađanja mogu da invadiraju i druge ćelije domaćina (Vann i sar., 1988).

β -hemolizin (beta-hemolysin, Hlb) je sfingomijelinaza koja povećava permeabilnost ćelije domaćina sa progresivnim gubitkom negativnog električnog naboja na površini ćelije, omogućavajući lakše prijanjanje bakterija (Cifrian i sar., 1996). Hlb ne može uništiti samostalno većinu tipova ćelija, ali omogućava olakšanu lizu već oštećenih ćelija delovanjem drugih toksina

poput Hla i leukocidini (Wang i sar., 2011). Interakcija između Hla i Hlb može sinergistički da poveća prijanjanje stafilokoka na ćelije mlečne žlezde, oštećenje ćelija i izloženost supcelularnog matriksa (Cifrian i sar., 1996).

δ-hemolizin (delta-hemolysin, Hld) je mali peptid koji se prenosi kroz plazma membranu domaćina formirajući prelaznu strukturu koja remeti dvosloj i indukuje efluks jona (Verdon i sar., 2009). Pri visokim koncentracijama deluje kao deterdžent koji rastvara membrane ćelija domaćina (Vandenesch i sar., 2012).

Leukocidini. Leukocidini su dvokomponentni toksini koji uništavaju leukocitne ćelije domaćina formiranjem pora na ćelijskoj membrani i posledičnom lizom (Alonzo i Torres, 2014). Samim tim stafilokoke izbegavaju imunološki sistem domaćina i obezbeđuju bržu kolonizaciju bakterijama. Formiranje pora leukocidinima počinje prepoznavanjem i vezivanjem subjedinice S leukocidina za specifični proteinski receptor na površini ciljnih ćelija domaćina. Subjedinica S tada prepoznaje i privlači F subjedinicu, što dovodi do dimerizacije, oligomerizacije i formiranja oktamerne strukture sastavljene od naizmenične S i F subjedinice. Poslednji korak u formiranju pore su strukturne promene u bazi S i F subjedinica, što dovodi do umetanja i formiranja pore kroz lipidni dvosloj ćelija domaćina (Alonzo i Torres, 2014).

Postoji sedam različitih tipova leukocidina, a Panton-Valentine leukocidin je toksin s najjačim dejstvom na imune ćelije (Abril i sar., 2020). PVL ima važnu ulogu u izazivanju nekroze tkiva (Alonzo i Torres, 2014) i povezan je sa ozbiljnijim bolestima (Shariati i sar., 2016). PVL može da izazove infekcije opasne po život i kod zdravih ljudi (Oliveira i sar., 2018) i često je povezan sa MRSA sojevima (community-acquired MRSA, CA-MRSA) (Vandenesch i sar., 2003).

Leukocidin M ispoljava najsnažnije citotoksično dejstvo prema neutrofilnim granulocitima goveda (Vrieling i sar., 2015), dok je Leukocidin E citotoksičan za goveđe neutrofile i makrofage (Loeffler i sar., 1986). Geni koji kodiraju oba ova leukocidina često se mogu ustanoviti kod izolata stafilokoka koji izazivaju mastitise krava, što ukazuje da imaju važnu ulogu u razvoju mastitisa (Fournier i sar., 2008; Graber i sar., 2009, Ben Said i sar., 2016).

2.3.4.4 Kontrola ekspresije faktora virulencije koagulaza pozitivnih stafilokoka

Faktori virulencije nisu strukturno i funkcionalno ključni za razmnožavanje bakterija, nego se sintetišu samo u neophodnim situacijama. Kada bi se faktori virulencije neprestano produkovali, to bi bilo neekonomično za bakteriju. Proces ekspresije površinskih proteina i egzoenzima koagulaza pozitivnih stafilokoka je koordinisan proces koji zavisi od faze rasta bakterija i stimulacije životne sredine (Horsburgh, 2008). Koordinaciju vrše regulatorni elementi koji čine *sar* (staphylococcal accessory regulator, *sar*) lokus i dvokomponentni regulatorni sistemi *agr* (accessory gene regulator, *agr*) i *sae* (staphylococcal accessory element, *sae*) (Fournier, 2008).

Kultivisanje *S. aureus* u idealnim uslovima dovodi do sinteze površinskih proteina, rasta i razmnožavanja bakterija u eksponencijalnoj fazi. Proizvodnju mnogih površinskih proteina u

ovoj fazi reguliše *sar*. Takođe, *sar* može da modulira *agr* lokus. *agr* je quorum-sensing sistem koji isključuje sintezu površinskih proteina, a pojačava transkripciju nekoliko faktora virulencije, kada se gustina bakterijskih ćelija poveća u posteksponencijalnoj fazi rasta. U regulaciji manje značajnih faktora virulencije učestvuju sigma factor σ and *rot* (Fournier, 2008).

2.3.5 Rezistencija na antimikrobna sredstva

Mastitis krava izazvan stafilokokama može postati veoma ozbiljan problem ako je izazvan sojevima otpornim na mnoge antimikrobne lekove (Watts i Salmon, 1997). Pojavom multirezistentnih sojeva, posebno MRSA sojeva, zabrinutost za zdravlje ljudi i životinja postala je sve veća (Li i sar., 2015). Neracionalna upotreba antibiotika (bez predhodno ispitane osetljivosti bakterija na antibiotike, primena supterapijskih doza, nedovoljno dugo trajanje terapije) u lečenju mastitisa može dovesti do favorizovanja rasta i brojnosti rezistentnih u odnosu na osetljive sojeve.

Postoje četiri osnovna mehanizma delovanja antibiotika na bakterije (Jezdimirović, 2010; Milić i sar., 2017):

1. Antibiotici koji inhibiraju sintezu ćelijskog zida bakterija,
2. Antibiotici koji inhibiraju sintezu proteina bakterija,
3. Antibiotici koji inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina bakterija,
4. Antibiotici koji dovode do promene permeabilnosti odnosno oštećenja membrane bakterijske ćelije.

U terapiji mastitisa najčešće se koriste: penicilini (penicilin, ampicilin, kloksacilin, amoksisilin s klavulonskom kiselinom), cefalosporini (cefaleksin, ceftriakson), aminoglikozidi (gentamicin, neomicin), tetraciklini (tetraciklin), linkozamini (linkomicin), i sulfonamidi (sulfametoksazol sa trimetoprimom).

Da bi se suprotstavile dejstvu antibiotika stafilokoke koriste različite mehanizme rezistencije. Najvažniji mehanizmi su: produkcija enzima koji razaraju antibiotike, promena u strukturi mesta za koje se vezuje antibiotik, promena metaboličkih puteva u bakterijama, promena permeabilnosti membrane prema leku, razvoj alternativnog enzima kod bakterija, kao i aktivno izbacivanje antibiotika iz citoplazme efflux pumpom (Jezdimirović, 2010; Milić i sar., 2017). Otpornost na antimikrobna sredstva je pojava koja se javlja tokom vremena usled genetskih promena stečenih mutacijom i/ili akvizicijom gena između različitih sojeva i vrsta bakterija horizontalnim transferom gena (Biswas i sar., 2008).

2.4. Dijagnoza stafilokoknog mastitisa

Sumnja na stafilokokni mastitis, kao i na mastitise druge etiologije, u zavisnosti od kliničke forme, postavlja se na osnovu kliničkog pregeleda, pregleda prvih mlazeva mleka i Kalifornija mastitis testa. Sumnja na mastitis može se postaviti i na osnovu povišenog broja SCC u uzorcima zbirnog mleka. Definitivna etiološka dijagnoza se postavlja na osnovu detekcije bakterija u aseptično uzetom uzorku iz mlečne žlezde.

Koagulaza pozitivne stafilokoke se mogu relativno lako izolovati i uzgajati *in vitro* na velikom broju različitih hranljivih podloga. Za identifikaciju do vrste koriste se specifične podloge i pojedine biohemijske analize (Milić i sar., 2017). Koagulaza pozitivne stafilokoke do nivoa vrste mogu se dokazati i detektovanjem specifičnih delova genoma korišćenjem molekularnih metoda kao što je PCR.

Razumevanje epizootioloških, epidemioloških i evolucionih osobina stafilokoka oslanjaju se na metode tipizacije (Ruppitsch, 2016; Chadi i sar., 2022). Metode tipizacije mogu biti fenotipske i genotipske.

U prošlosti više su se koristile fenotipske metode za identifikaciju i tipizaciju bakterija (Ruppitsch, 2016). Ove metode su, generalno, jednostavne, laka za izvođenje, jeftinije, ali imaju nižu tačnost (Typeability; nižu mogućnost tipizacije), reproduktivnost i diskriminatornu moć nego genotipske metode (Zadoks i Schukken, 2006). Fenotipske metode zasnovane su na određivanju antibiogramskog profila, serotipova, biotipova, fagotipova i metodi multilokusne enzimska elektroforeze (Multilocus Enzyme Electrophoresis, MLEE) (Chadi i sar., 2022).

Genotipske metode tipizacije se sve više koriste zbog njihove tačnosti i velike diskriminatorne moći. Za genotipizacije stafilokoka najčešće se koriste metode: RAPD, AFLP, RFLP, PFGE, MLST, *spa* tipizacija, RS-PCR i WGS.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) – metoda nasumičnog umnožavanja DNK. RAPD metoda zasniva se na nasumičnom umnožavanju više delova genomske DNK bakterija pomoću kratkih sekvenci prajmera. U slučaju da postoji razlika između sekvenci DNK, prajmeri će se vezivati na različitim mestima, zbog čega će se nakon elektroforeze uočiti različiti RAPD profili, što predstavlja kriterijum za utvrđivanje razlika, odnosno sličnosti između genoma ispitivanih uzročnika (Welsh i McClelland, 1990). Diskriminatorna moć ove metode zavisi od broja prajmera uključenih u genotipizaciju. Metoda je mnogo uspešnija u razlikovanju različitih genotipova kada se koristi više prajmera (Reinoso i sar., 2004). Iako je ova metoda brza i laka za primenu ima ograničenu reproduktivnost i tumačenje rezultata je komplikovano (Chadi i sar., 2022).

Amplified Fragment Length Polymorphism – metoda utvrđivanja polimorfizma dužine amplificiranih fragmenata (AFLP). Ova metoda se zasniva na digestiji genomske DNK pomoću restriktionog enzima, nakon čega se dobijaju više fragmenata genomske DNK. Ovi fragmenti DNK, koji se nazivaju adapteri, amplifikuju se pomoću specifičnih prajmera, a proizvodi amplifikacije se analiziraju na gel elektroforezi (Lakhundi i Zhang, 2018). Ova metoda je

korišćena za istraživanje klonske veze između različitih sojeva *S. aureus* iz različitog izvora uključujući i one koji su poreklom od goveda (Boerema i sar., 2006; Salasia i sar., 2011). AFLP je jeftin za izvođenje, veoma ponovljiv, i brz za izvođenje, ali ima nižu diskriminatornu moć u poređenju sa drugim metodama molekularne tipizacije kao što su PCR-RFLP, PFGE i MLST.

Dodavanje drugog restriktionog enzima u prvom delu metode može poboljšati diskriminatornu moć ove metode, ali metoda tada postaje skuplja i komplikovanija za izvođenje i tumačenje rezultata (Chadi i sar., 2022).

Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) – metoda utvrđivanja polimorfizma dužine amplificiranih fragmenata uz primenu restriktionih enzima.

Kod metode RFLP nakon PCR amplifikacije željenog dela genoma, PCR produkti se razlažu pomoću jednog ili više restriktionih enzima, nakon čega se fragmenti DNK analiziraju na gel elektroforezi. U istraživanjima stafilokoka poreklom od goveda najviše se koristi PCR-RFLP za gen koji kodira koagulazu (*coa*) i gen koji kodira protein A (*spa*) (Zecconi i sar., 2006; Morandi i sar., 2010). Ova metoda se jednostavno izvodi, brza je i ima veliku reproduktivnost (Chadi i sar., 2022).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) – metoda elektroforeze u pulsnom polju. Ova metoda se zasniva na digestiji samo nekoliko mesta u hromozomu bakterije, pri čemu se stvaraju veliki fragmenti DNK (Chadi i sar., 2022). Dati fragmenti se zatim razdvajaju elektroforezom u pulsnom polju sa periodičnim promenama orijentacije električnog polja kroz gel (He i sar., 2014). Ova metoda se koristi u epizootiološkim istraživanjima stafilokoka, kao i u genotipizaciji MRSA sojeva (Jørgensen i sar., 2005; Said i sar., 2010; Kroning i sar., 2018). PFGE se smatra kao najdiskriminatorniji metod, i stoga je postala široko primenjena metoda za uporednu tipizaciju (Zadoks i sar., 2002; Ikawaty i sar., 2009; Hata i sar., 2010; Said i sar., 2010; Cremonesi i sar., 2015). Ovo je jedan od razloga zašto se PFGE često smatra zlatnim standardom u tipizaciji *S. aureus*. Međutim, PFGE ima i nedostatke, kao što su: dugi interval do dobijanja rezultata, komplikovani protokoli, nepodesnost za proučavanje velikog broja uzoraka, skupi reagenasi i upotreba specijalizovane opreme (Zadoks i Schukken, 2006). Pored toga, teško je standardizovati i porediti različite PFGE rezultate laboratorija (Ikawaty i sar., 2009), što ga čini nepodesnim za međunarodna poređenja (Lakhundi i Zhang, 2018, Chadi i sar., 2022).

Multilocus sequence typing (MLST) – metoda tipizacije sekvenci većeg broja gena. Ova metoda tipizacije zasniva se na sekvenciranju i ustanovljavanju razlika u sekvencama sedam relativno konzerviranih gena (housekeeping). Ovi geni kodiraju esencijalne enzime: karbamat kinaza (*arcC*), šikimat dehidrogenaza (*aroE*), glicerol kinaza (*glpF*), gvanilat kinaza (*gmk*), fosfat acetiltransferaza (*pta*), triosefosfat izomeraza (*tpi*) i acetil koenzim A acetiltransferaza (*ikiL*) (Enright i sar., 2000; Boss i sar., 2016). Dobijene sekvence svakog ispitanog gena ubacuju se u MLST bazu podataka (<https://pubmlst.org/>). Za svaki prepoznati alel, baza dodeljuje alelni broj i na osnovu kombinacije svih sedam alelnih brojeva baza dodeljuje tip sekvence (ST). Dalje se ST svrstavaju u klonske komplekse (CC). Klonski kompleksi su definisani kao grupe ST-a u kojima svaki ST ima najmanje pet od sedam identičnih alela sa najmanje još jednim ST u grupi (Enright i sar., 2002). Pomoću softverskog programa BURST formiraju se CC i omogućava se praćenje evolucije ST u CC (Zhang i sar., 2016a). MLST je korišćen za mnoge epizootiološke studije

(Vanderhaeghen i sar., 2010; Cremonesi i sar., 2015; Wang i sar., 2015; Ben Said i sar., 2016; Boss i sar., 2016) i pokazao je se kao odličan metod za dugoročne evolucione i globalne studije (Holmes i Zadoks, 2011). Pored dobre reproducibilnosti i mogućnosti tipiziranja, međulaboratorijske uporedivosti, nedostatak ove metode ogleda se u dugotrajnoj, laboratorijski zahtevnoj i veoma skupoj metodi (Boss i sar., 2016). Takođe, MLST ima manju diskriminatornu moć u poređenju sa *spa* i PFGE (Boss i sar., 2016; Chadi i sar., 2022).

***spa* typing – metoda tipizacije gena proteina A.** Ova metoda zasniva se na PCR amplifikaciji i sekvenciranju kratkih ponavljajućih sekvenci polimorfnog X regiona gena za protein A (*spa*), prisutnog u svim sojevima *S. aureus* (Ji, 2020). Delecije i duplikacije ponavljajućih jedinica zajedno sa tačkastim mutacijama dovode do diverziteta u polimorfnom X regionu *spa* gena. Varijacije u sekvencama koriste se za numeraciju ponavljajućih sekvenci. Podaci dobijeni sekvenciranjem se mogu analizirati pomaću bioinformatičkog softvera Ridom Bioinformatics (<http://spaserver.ridom.de/>). Pomoću istog softvera mogu se porediti globalno svi *spa* tipovi. Genotipizacija *spa* metodom korišćena je u mnogim epizootiološkim studijama za identifikaciju genetskih linija *S. aureus*-a kod mastitisa goveda (Said i sar., 2010; Holmes i Zadoks, 2011; Veh i sar., 2015; Boss i sar., 2016; Ben Said i sar., 2016). Glavne prednosti ove metode tipizacije su njena odlična međulaboratorijska ponovljivost, brzina i standardna nomenklatura, kao i dobra diskriminatorna moć (Chadi i sar., 2022). Ova metoda je i mnogo jednostavnija i brža za izvođenje i jeftinija od PFGE i MLST. Pored toga ova metoda pruža čvrste dokaze za filogenetske odnose između linija stafilokoka, pošto su *spa* tipovi obično povezani sa specifičnim MLST tipovima (Boss i sar., 2016; Bonsaglia i sar., 2018).

Whole Genome Sequencing (WGS) – metoda sekvenciranja celog genoma. Ova metoda pruža mogućnost otkrivanja strukture genoma i celog genetskog sadržaja mikroorganizama sve do rezolucije od jednog baznog para (Chadi i sar., 2022). Sa tehnološkim napretkom, WGS je postao pristupačniji alat za genotipizaciju sa visokom propusnosti i najvećom diskriminatornom moći (Kosecka-Strojek i sar., 2016). Kod goveda je sve češća upotreba u studijama koje proučavaju mastitise (Ronco i sar., 2018; Antok i sar., 2020; Fisher i Paterson, 2020; Fursova i sar., 2020; Hoekstra i sar., 2020; Naushad i sar., 2020; Torres i sar., 2020). Ispitivanja ovom metodom dovela su do boljeg poznavanja strukture populacije *S. aureus*, poznavanja porekla sojeva otpornih na antibiotike, genetske osnove virulencije, kao i nastanka i širenje loza iz lokalnih i globalnih populacija goveda (Fursova i sar., 2020; Naushad i sar., 2020). Međutim, trenutno ova metoda je komplikovana i dugotrajna za izvođenje. Potrebna su velika početna ulaganja u hardversku opremu i softver, a i visoki su troškovi analize (Chadi i sar., 2022). Takođe, tumačenje rezultata je komplikovano i zahteva iskustvo i definisane kriterijume za procenu genetskih odnosa između sojeva (Kosecka-Strojek i sar., 2016; Chadi i sar., 2022).

Ribosomal spacer PCR (RS-PCR) - PCR amplifikacija intergenskih spajsera 16S–23S rRNK ribozoma. Metoda se zasniva na amplifikaciji 16S–23S rRNK međugenskog odvojenog regiona i elektroforetskoj analizi dobijenih PCR produkata (Fournier i sar., 2008). Region 16S–23S rRNK pokazuje velike varijacije u sekvenci i dužini na nivou vrste (Jensen i sar., 1993), što je iskorišćeno za suptipizaciju stafilokoka (Fournier i sar., 2008). Ova metoda je korišćena za proučavanje sojeva *S. aureus* izolovanih kod mastitisa krava (Fournier i sar., 2008; Graber i sar.,

2013, Cremonesi i sar., 2015; Graber, 2016; Ben Said i sar., 2016; Boss i sar., 2016; Monistero i sar., 2018) i pokazala se kao veoma rezolutivna i robusna metoda (Graber, 2016). Za najbolju rezoluciju i procenu podataka, produkte RS-PCR-a potrebno je analizirati na minijaturnim sistemima elektroforeze ili na kapilarnim elektroforezama (Graber, 2016). Tumačenje dobijenih rezultata je jednostavno i standardizovano preko bioinformatičkog softvera (<https://mahal.vitech.dev/#/>). U poređenju sa *spa* tipizacijom i MLST-om, RS-PCR ne zahteva sekvenciranje DNK, što znatno pojednostavljuje i pojeftinjuje analizu i omogućava visoku propusnost (Ben Said i sar., 2016; Boss i sar., 2016; Graber, 2016). Diskriminatorna moć RS-PCR-a za sojeve *S. aureus* izolovane kod goveda je visoka i slična *spa* tipizaciji, a veća od MLST i PFGE (Cremonesi i sar., 2015; Boss i sar., 2016; Graber, 2016). Za epidemiološka poređenja između genotipova izolovanih kod goveda i ljudi, potrebno je uporedo sa RS-PCR izvršiti i *spa* genotipizaciju, jer se *spa* metoda široko koristi za genotipizaciju sojeva izolovanih kod ljudi i dostupno je mnogo podataka u bazi (Graber, 2016).

2.5. Kontrola stafilokoknih mastitisa na farmama

U terapiji mastitisa najčešće se koriste antimikrobna sredstva (antibiotici i hemioterapeutici), a rezultati izlečenja su veoma varijabilni (od 4% do 92%), što zavisi od niza faktora, uključujući faktore vezane za obolelu jedinku, infektivnog agensa i režima terapije (Barkema i sar., 2006; Khan i Khan, 2006). Koagulaza pozitivne stafilokoke su među najpoznatijim bakterijama koje brzo razvijaju rezistenciju na antimikrobna sredstva, što sužava izbor leka za terapiju (Chambers i DeLeo, 2009). U nekim slučajevima, iako antibiogram ispitujućeg izolata pokaže da su stafilokoke senzitivne na razne antibiotike, često tretman ne bude uspešan. Neuspeh terapije, pre svega, nastaje zbog faktora virulencije stafilokoka koje im omogućavaju izbegavanje kontakta sa terapijskim sredstvom. Mastitisi izazvani genotipovima stafilokoka prilagođenih kravama teže se leče, verovatno zbog njihove sposobnosti da prežive u tkivu mlečne žlezde (Budd i sar., 2015). Predloženi su alternativni tretmani lečenja, kao što su bakteriocini, eterična ulja i drugi biljni i homeopatski lekovi, ali do danas, nedostaju naučni dokazi koji podržavaju preporuke za njihovu upotrebu (Rainard i sar., 2018; Cheng i Han., 2020).

Vakcina i vakcinacija protiv stafilokoknog mastitisa, proučavana je dugi niz godina. Da bi bila efikasna, idealna vakcina protiv mastitisa uzrokovanim *S. aureus*-om treba da spreči infekciju ili da olakša uklanjanje bakterija iz mlečne žlezde vrlo brzo nakon ulaska u nju, čime se eliminiše mogućnost dugotrajne intramamarnе infekcije koja može poslužiti i kao rezervoar za infekciju stada (Rainard i sar., 2018). Do danas vakcina koja ispunjava ove kriterijume nije razvijena (Schukken i sar., 2014; Freick i sar., 2016; Rainard i sar., 2018; Cheng i Han., 2020).

Zbog niskog procenta izlečenja stafilokoknih mastitisa antimikrobnim sredstvima (Sol i sar., 2000; Gruet i sar., 2001; Barkema i sar., 2006) i ograničene efikasnosti vakcinacije za sprečavanje novih infekcije (Peton i Le Loir, 2014; Landin i sar., 2015), implementacija sanitarnih programa je trenutno najrazumniji pristup kontrole mastitisa u zaraženom stadu. Sanitarni program se prave na osnovi plana od 10 tačaka (<https://www.nmconline.org/wp->

<content/uploads/2016/08/RECOMMENDED-MASTITIS-CONTROL-PROGRAM-International.pdf>)

koji predstavljaju temelj sanitarnih programa posebno kod visokokontagioznih mastitisa (Sartori i sar., 2017). Neke sanitarne mere su obavezne za sprovođenje dok su neke samo preporučene. Najvažnija obavezna mera je pridržavanje strogog reda muže na osnovu trenutnog statusa mastitisa krava u stadu. Uvek se prvo muzu krave koje nemaju mastis, pa krave nepoznatog statusa (krave nakon teljenja, posle antimikrobne terapije, novonabavljene krave) i na kraju krave sa mastitisom. Druge obavezne sanitarne mere su: pravilno čišćenje opreme za mužu (posle svake muže po uputstvu proizvođača), čišćenje, pranje i sušenje vimena i sisa pre muže jednokratnim ubrusima i dezinfekcija sisa nakon muže (Sartori i sar., 2017). Preporučene sanitarne mere obuhvataju: izmuzanje prvih mlazeva u posudu s tamnim dnom, nošenje čistih rukavica tokom procesa muže, antibiotska terapija krava sa kliničkim mastitisom i krava u zasušenju, kao i vođenje kompletne evidencije odnosno čuvanje relevantnih zapisa.

Pa studiji Sartori i saradnika (2017), farme zaražene sa visokokontagioznim genotipom *S. aureus*, uspešno su sanirane za 9 meseci odgovarajućim sanitarnim merama. Te mere su obuhvatale striktan red i higijenu muže, odgovarajuću antibiotsku terapiju krava sa mastitisom (produženu na 5 dana i tretiranjem svih četvrti vimena bez obzira da li su zaražene) i izlučivanje hronično zaraženih krava koje su otporne na terapiju (Sartori i sar., 2017).

3. CILJ I ZADACI

S. aureus izaziva hronične mastitise, koji se teško eliminišu iz stada muznih krava. Pretpostavlja se da je razvoj mastitisa povezan sa karakteristikama izolata *S. aureus* i ekspresijom kombinacije različitih gena faktora virulencije. Da bi se problemi mastitisa mlečnih krava, koji su često perzistentni, sveli na najmanju moguću meru, potrebno je dobro poznavanje faktora virulencije *S. aureus*, kako bi se na osnovu tih saznanja mogle da primene najefikasnije i nejefektivnije mere kontrole. Do danas u Republici Srbiji nije ispitivana distribucija genotipova koagulaza pozitivnih stafilokoka i njihova povezanost sa faktorima virulencije. Stoga je cilj ove disertacije da se izvrši suptipizacija sojeva *S. aureus* izolovanih iz uzoraka mleka uzetih u slučajevima mastitisa krava. Za realizaciju postavljenog cilja definisani su sledeći zadaci:

1. Utvrđivanje prevalencije mastitisa krava izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokokama u Mačvanskom i Kolubarskom okrugu.
2. Ispitivanje fenotipske i genotipske karakterizacije izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka.
3. Ispitivanje osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka na antimikrobna sredstva.
4. Ispitivanje prisustva gena virulencije kod *S. aureus* izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava u slučajevima mastitisa.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Materijal

4.1.1. Uzorci mleka

Uzorci mleka za bakteriološku izolaciju uzročnika mastitisa uzeti su iz pojedinih četvrti vimena krava s povećanim brojem somatskih ćelija. Uzorci su prikupljeni u periodu od juna 2019. do marta 2021. godine na epizootiološkom području Mačvanskog i Kolubarskog okruga. Ukupno je pregledano 288 farmi mlečnih krava. Veličina stada na farmama varirala je od 3 do 145 krava, od kojih su od 3 do 112 krava bile u laktaciji.

Pre uzimanja uzoraka mleka, klinički je pregledano vime i sise svake krave, vizuelno su pregledani prvi mlazevi mleka, a Kalifornija mastitis test je korišćen kao skrining test za otkrivanje mleka sa povećanim brojem somatskih ćelija. Pre uzimanja oko 6 mL uzoraka mleka u sterilne i unapred obeležene epruvete (broj krave i četvrt vimena), vime svake krave je oprano, osušeno, a vrh sisa je dezinfikovano 70%-nim etanolom. Uzorci mleka su čuvani u frižideru i transportovani u laboratoriju u roku od 12 h.

4.1.2. Referentni sojevi

U ispitivanjima kao referentni sojevi korišćeni su: *S. aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 25923, *S. aureus* ATCC 6538 koji produkuje biofilm i *S. aureus* ATCC 43300 koji je meticilin rezistentan.

4.1.3. Podloge za izolovanje i potvrdu koagulaza pozitivnih stafilokoka

4.1.3.1. Krvni agar

Za izolaciju i ispitivanje sposobnosti stafilokoka da stvaraju hemolizine korišćen je krvni agar, koji je pripreman od hranljivog agara uz dodatak 5-7% sterilne defibrinisane ovčije krvi. Sastav hranljivog agara (Torlak, Srbija) za pripremu krvnog agara sadrži (g/L):

Pepton	15,0 g
Mesni ekstrakt	3,0 g
Natrijum-hlorid	5,0 g

Kalijum-hidrogenfosfat	0,3 g
Agar	18,0 g

Podloga je pripremana tako što je odmereno 41,3 g praha hranljivog agara i dodato 1000 mL destilovane vode i ostavljeno da odstoji 15 minuta na sobnoj temperaturi. Podloga je zatim pažljivo uz mešanje zagrejana do ključanja, da se potpuno rastvori, a zatim sterilisana u autoklavu 15 minuta na 121 °C. Zatim je podloga ohladjena na 50 °C i u aseptičnim uslovima dodato je 5- 7% sterilne defibrinisane krvi, dobro je pomešana i razlivena u Petri ploče.

4.1.3.2. Hranljivi agar

Za umnožavanje kulture stafilokoka korišćen je hranljivi agar. Dehidrovani medijum (Torlak, Srbija) za pripremu hranljivog agara sadrži (g/L):

Pepton	15,0 g
Mesni ekstrakt	3,0 g
Natrijum-hlorid	5,0 g
Kalijum-hidrogenfosfat	0,3 g
Agar	18,0 g

Podloga je pripremana od 41,3 g praha hranljivog agara i 1000 mL destilovane vode i ostavljena da odstoji 15 minuta na sobnoj temperaturi. Podloga je zatim pažljivo uz mešanje zagrevaana do ključanja, da potpunog rastvoranja. Zatim je ohladjena na 50 °C i razlivena u Petri ploče.

4.1.3.3. Manitol slani agar

Za ispitivanje sposobnosti stafilokoka da fermentišu manitol korišćen je manitol slani agar. Dehidrovani medijum (Oxoid, Velika Britanija) za pripremu manitol slanog agara sadrži (g/L):

„Lab- Lemco” prah	1,0 g
Pepton	10,0 g
Manitol	10,0 g
Natrijum- hlorid	75,0 g
Fenol crveno	0,025 g
Agar	15,0 g

Podloga je pripremana od 111 g praha podloge i 1000 mL destilovane vode i ostavljena da odstoji 15 minuta na sobnoj temperaturi. Podloga je zatim pažljivo uz mešanje zagrevana do

ključanja, da se potpuno rastvori, a zatim sterilisana u autoklavi 15 minuta na 121 °C. Podloga je ohladjena na 50 °C, promešana i razlivena u Petri ploče.

4.1.3.4. Vodonik- peroksid za ispitivanje enzima katalaze

Za katalaza test korišćen je 3% vodonik-peroksid (Julifarm, Srbija).

4.1.3.5. Plazma kunića za koagulaza test

Za koagulaza test korišćena je, spremna za upotrebu, plazma kunića (Torlak, Srbija).

4.1.3.6. Fiziološki rastvor

Fiziološki rastvor pripreman je od 8,5 g natrijum-hlorida koji je rastvoren u 1000 mL dejonizovane vode. Nakon rastvaranja fiziološki rastvor razliven je u epruvete od 9 mL i sterilisan na temperaturi od 121 °C tokom 15 minuta.

4.1.3.7. Orto-nitrofenil beta-D-galaktopiranozid (ONPG) test za dokazivanje beta galaktozidaze

Za dokazivanje enzima beta-D-galaktozidaze korišćeni su ONPG diskovi (Himedia, Indija) u sterilni epruvetama sa sterilnim fiziološkim rastvorom.

4.1.3.8. Maltoza test

Za dokazivanje fermentacije šećera maltoze korišćeni su maltoza diskovi (Himedia, Indija) u sterilnim epruvetama sa rastvorom ljubičastog bujona (Becton, Dickinson i Company, SAD). Sastav dehidrovanog medijum za pripremu ljubičastog bujona (g/L):

Pankreasni digest želatina	10,0 g
Natrijum-hlorid	5,0 g
Bromkrezol ljubičasto	0,02 g

Bujon je pripreman od 15,0 g praha ljubičastog bujona i 1000 mL destilovane vode. Rastvor je zagrevan uz mešanje dok se prah nije rastvorio, zatim je sterilisana u autoklavu 15 minuta na 118°C. Podloga je zatim ohladjena na 50 °C i u aseptičnim uslovima razlivena po 5 mL u sterilne epruvete.

4.1.4. Reagensi za bojenje po Gramu

Za bojenje po Gramu korišćeni su reagensi: gencijana ljubičasto (Himedia, Indija), Lugolov rastvor (Himedia, Indija), 96% etil-alkohol (Zorka Pharma- Hemija, Srbija), Karbol fuksin (Himedia, Indija).

4.1.5. Podloga za ispitivanje osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka na antimikrobne lekove disk difuzionom metodom po Kirbi- Baueru

Za ispitivanje osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka na antimikrobne lekove disk difuzionom metodom po Kirbi-Baueru korišćen je Mueller-Hinton agar. Sastav dehidrovanog medijuma (Oxoid, Velika Britanija) za pripremu Mueller-Hinton agara (g/L) je bio sledeći:

dehidrovana infuzija iz govedine	300,0 g
kazein hidrolizat	17,5 g
skrob	1,5 g
agar	17,0 g

Podloga je pripremana od 38,0 g praha podloge i 1000 mL destilovane vode. Podloga je zatim pažljivo uz mešanje zagrevana do ključanja, da se potpuno rastvori, a zatim sterilisana u autoklavu 15 minuta na 121 °C. Podloga ohladjena na 50 °C, je promešana i razlivena u Petri ploče.

4.1.6. Reagensi za ekstrakciju DNK

Za ekstrakciju DNK iz izolata stafilokoka korišćen je:

- Tris-etilen diamin tetra sirćetna kiselina (TE) pufer (pH 8) (Invitrogen, Litvanija). Rastvor spreman za upotrebu i koji sadrži 10 mM Tris i 1 mM etilen diamin tetra sirćetne kiseline (EDTA).
- Fosfatni slani pufer (phosphate buffered saline, PBS) u tabletama (Fisher BioReagents, Belgija). Rastvor je pripreman od jedne tablete i 200 mL dejonizovane vode. Tako pripremljen rastvor sadrži 0,01 M fosfatnog pufera, 0,0027 M kalijum-hlorida i 0,137 M natrijum-hlorida. pH rastvora je 7,4 na 25 °C. Rastvor je čuvan na temperaturi od 4 °C.

4.1.7. Reagensi za PCR amplifikaciju

Za PCR amplifikaciju korišćen je:

- Kit za pripremu reakcione smeše, DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (ThermoScientific, Litvanija),
- Kit za pripremu reakcione smeše za amplifikaciju 16S-23S rRNK, HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen, Nemačka),
- Prajmeri (Invitrogen, Velika Britanija), oligonukleotidi specifičnih sekvenci za različite gene. Specifične sekvence prajmera i uslovi umnožavanja dati su tabeli 4.1.7.

Tabela 4.1.7. Spisak prajmera korišćenih za amplifikaciju gena stafilokoka

Gen	Prajmeri	Sekvence prajmera	Dužina amplifikata	Reference
<i>nuc</i>	nuc F nuc R	TGCTATGATTGTGGTAGCCATC TCTCTAGCAAGTCCCTTTTCCA	420 ¹⁾	Baron i sar., 2004
<i>coa</i>	coa1 coa4	ATA CTC AAC CGA CGA CAC CG GAT TTT GGA TGA AGC GGA TT	1517 ²⁾	Aarestrup i sar., 1995
<i>coa</i>	coa2 coa3	ACC ACA AGG TAC TGA ATC AAC G TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC	976 ³⁾	Aarestrup i sar., 1995
<i>23S RNK</i>	23sRNA F 23sRNK R	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	1250 ⁴⁾	Straub i sar., 1999
<i>spa</i>	spa F spa R	TGTAAAACGACGGCCAGTGTCTAAAAGCTAAAC GATGC CAGGAAACAGCTATGACCCACCAAATACAGTT GTACC	> 270 ⁵⁾	Dalla Pozza i sar., 1999
<i>spa</i>	spa-1113F spa-1514R	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	200- 600 ⁶⁾	Stegger i sar., 2012
<i>clfA</i>	clfA F clfA R	GGCTTCAGTGCTTGTAGG TTTTCAGGGTCAATA TAAGC	1042 ⁷⁾	Stephan i sar., 2001
<i>cna</i>	cna F cna R	AAA GCG TTG CCT AGT GGA GA AGT GCC TTC CCA AAC CTT TT	192 ⁸⁾	Smith i sar., 2010
<i>fnbA</i>	fnbA F fnbA R	CACAACCAGCAAATATAG CTGTGTGGTAATCAATGTC	1362 ⁹⁾	Peacock i sar., 2002
<i>efb</i>	efb F efb R	ACGGTCCAAGAGAAAAGAAACC TTGTCCAGACTACTGCATCTGC	657 ¹⁰⁾	Smeltzer i sar., 1997
<i>icaA</i>	icaA F icaA R	GATTATGTAATGTGCTTGGA ACTACTGCTGCGTTAATAAT	770 ¹¹⁾	Peacock i sar., 2002
<i>icaD</i>	icaD F icaD R	AAA CGT AAG AGA GGT GG GGC AAT ATG ATC AAG ATA C	381 ¹²⁾	Vasudevan i sar., 2003
<i>bap</i>	bap F bap R	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	971 ¹³⁾	Cucarella i sar., 2004
<i>pvl</i>	pvl F pvl R	TTCATTTAGACGCAGCAGGA TTGAATAGCCGTCCTTACG	465 ¹⁴⁾	Zeccon i sar., 2006
<i>pvl</i>	pvl 1 pvl 2	GCTGGACAAAATTCTTGAATAT GATAGGACACCAATAAATTCTGGATTG	85 ⁶⁾	Stegger i sar., 2012
<i>mecA</i>	mecA P4 mecA P7	TCCAGATTACAATTCCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAACG	162 ⁶⁾	Stegger i sar., 2012
<i>mecA</i>	GMECAR-1 GMECAR-2	ACTGCTATCCACCCTCAAAC CTGGTGAAGTTGTAATCTGG	163 ⁷⁾	Mehrotra i sar., 2000
<i>mecC</i>	mecC F mecC R	GAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC GAAGATCTTTCCGTTTTTCAGC	138 ⁶⁾	Stegger i sar., 2012
<i>cap5</i>	cap5 F cap5 R	ATGAGGATAGCGATTGAAA CGCTTCTTAATCACTTTTGC	518 ¹⁵⁾	Ote i sar., 2011
<i>cap8</i>	cap8 F cap8 R	ATCGAAGAACATATCCAAGG TTCATCACCAATACCTTTTA	834 ¹⁶⁾	Ote i sar., 2011
<i>sea</i>	sea F sea R	GGT TAT CAA TGT GCG GGT GG CGG CAC TTT TTT CTC TTC GG	102 ¹⁷⁾	Roussel i sar., 2015
<i>sea</i>	sea 1	AAA GTC CCG ATC AAT TTA TGG CTA	216 ¹⁾	Salasia i sar.,

	sea 2	GTA ATT AAC CGA AGG TTC TGT AGA		2004
<i>seb</i>	seb F seb R	GTA TGG TGG TGT AAC TGA GC CCA AAT AGT GAC GAG TTA GG	164 ¹⁷⁾	Roussel i sar., 2015
<i>seb</i>	seb 1 seb 2	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC	478 ¹⁾	Salasia i sar., 2004
<i>sec</i>	sec F sec R	AGA TGA AGT AGT TGA TGT GTA TGG CAC ACT TTT AGA ATC AAC CG	451 ¹⁷⁾	Roussel i sar., 2015
<i>sec</i>	sec 1 sec 2	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	257 ¹⁾	Salasia i sar., 2004
<i>sed</i>	sed F sed R	CCA ATA ATA GGA GAA AAT AAA AG ATT GGT ATT TTT TTT CGT TC	278 ¹⁷⁾	Roussel i sar., 2015
<i>sed</i>	sed 1 sed 2	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG	317 ¹⁾	Salasia i sar., 2004
<i>see</i>	see F see R	TGT ATG TAT GGA GGT GTA AC GCC AAA GCT GTC TGA G	213 ¹⁷⁾	Roussel i sar., 2015
<i>see</i>	see 1 see 2	TAG ATA AGG TTA AAA CAA GC TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	170 ¹⁾	Salasia i sar., 2004
<i>ser</i>	ser F ser R	AGA TGT GTT TGG AAT ACC CTA T CTA TCA GCT GTG GAG TGC AT	123 ¹⁷⁾	Roussel i sar., 2015
<i>seg</i>	seg F seg R	GTT AGA GGA GGT TTT ATG TTC CTT CAA CAG GTG GAG A	198 ¹⁸⁾	Roussel i sar., 2015
<i>she</i>	seh F seh R	CAA CTG CTG ATT TAG CTC AG CCC AAA CAT TAG CAC CA	173 ¹⁸⁾	Roussel i sar., 2015
<i>sei</i>	sei F sei R	GGC CAC TTT ATC AGG ACA AAC TTA CAG GCA GTC CA	328 ¹⁸⁾	Roussel i sar., 2015
<i>sej</i>	sej F sej R	GTT CTG GTG GTA AAC CA GCG GAA CAA CAG TTC TGA	131 ¹⁸⁾	Roussel i sar., 2015
<i>sep</i>	sep F sep R	TCA AAA GAC ACC GCC AA ATT GTC CTT GAG CAC CA	398 ¹⁸⁾	Roussel i sar., 2015
<i>tsst</i>	tsst F tsst R	CAACATACTAGCGAAGGA GATATGTGGATCCGTCATTCA	277 ¹⁹⁾	Cosandey i sar., 2016
<i>tsst</i>	tsst 1 tsst 2	ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT	350 ¹⁾	Akineden i sar., 2001
<i>16S-23S rRNK</i>	L1 G1	CAA GGC ATC CAC CGT GAA GTC GTA ACA AGG	varijabilno ²⁰⁾	Jensen i sar., 1993

¹⁾95°C 5min.,30x(95°C 30sek.,55°C 30sek.,72°C 1min.),72°C 10 min.,4°C∞ ²⁾95°C 3min.,35x(95°C 60sek.,55°C 60sek.,72°C 90sek.),72°C 10 min.,4°C∞ ³⁾95°C 3min.,35x(95°C 30sek.,55°C 45sek.,72°C 75sek.),72°C 10min.,4°C∞ ⁴⁾95°C 3min.,50x(94°C 30sek.64°C 45sek,72°C 90sek.),72°C 7min.,4°C∞ ⁵⁾95°C 5min.,30x(95°C 30sek.,55°C 30sek.,72°C 1min),72°C 10min., 4°C∞ ⁶⁾94°C 5min.,30x(94°C 30sek.,59°C 30sek.,72°C 1min),72°C 10min.,4°C∞ ⁷⁾95°C 3min.,35x(94°C 1min.,57°C 1 min.,72°C 1min), 72°C 10min., 4°C∞ ⁸⁾ 95°C 2min., 40x (94°C 30 sek., 52°C 30 sek., 72°C 1 min), 72°C 10 min., 4°C∞ ⁹⁾ 95°C 2min., 35x (94°C 60 sek., 50°C 60 sek., 72°C 2 min), 72°C 10 min., 4°C∞ ¹⁰⁾ 95°C 2min., 32x (94°C 45sek., 55°C 30 sek., 72°C 1 min), 72°C 10 min., 4°C∞ ¹¹⁾ 94°C 5min., 30x (94°C 60 sek., 50°C 60 sek., 72°C 1 min), 72°C 10 min., 4°C∞ ¹²⁾ 92°C 5min., 30x (92°C 60 sek., 49°C 50 sek., 72°C 1 min), 72°C 7 min., 4°C∞ ¹³⁾ 95°C 3min., 40x (95°C 30 sek., 52°C 30 sek., 72°C 1 min), 72°C 7 min., 4°C∞ ¹⁴⁾ 95°C 3min., 30x (94°C 40 sek., 59°C 45sek., 72°C 1 min), 72°C 8 min., 4°C ∞ ¹⁵⁾ 94°C 5min., 35x (94°C 30 sek., 50°C 30 sek., 72°C 1 min), 72°C 7 min., 4°C ∞ ¹⁶⁾ 94°C 5min., 30x (94°C 30 sek., 46°C 30 sek., 72°C 1 min), 72°C 7 min., 4°C ∞ ¹⁷⁾ 94°C 5min., 30x (94°C 30 sek., 59°C 30 sek., 72°C 1 min), 72°C 10 min., 4°C ∞ ¹⁸⁾ 94°C 5min., 30x (94°C 30 sek., 59°C 30 sek., 72°C 1 min), 72°C 10 min., 4°C ∞ ¹⁹⁾ 95°C 2min., 35x (95°C 30 sek., 59°C 30 sek., 72°C 1 min), 72°C 7 min., 4°C ∞ ²⁰⁾ 95 °C 15 min.,27x(94 °C 1min., 2min dizanje temperature, 55 °C 7min., 2min spužtanje temperature,72°C 1min),72°C 10min., 4°C∞

4.1.8. Reagensi za vizuelizaciju PCR produkta

Za vizuelizaciju PCR produkata korišćeni su:

- Tris-borna kiselina-EDTA puffer (TBE), koncentrovan UltraPure 10x TBE pufer (1,0 M Tris, 0,9 M borna kiselina, 0,01 M EDTA, pH 8,4 ± 0,1) (Invitrogen, Velika Britanija). Radni rastvor je pripremljen od 90 mL dejonizovane vode i 10 mL TBE pufera.
- Agarozna, Ultra Pure Agarose (Invitrogen, SAD),
- marker molekulske mase DNK, GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Litvanija) i HyperLadder 50bp (Bioline, Velika Britanija),
- boja za DNK produkte, MaestroSafe Nucleic Acid Loading Dye (MaestroGen, Tajvan).

4.1.9. Reagensi za genotipizaciju

Kod genotipizacije korišćen je Agilent DNA7500 Kit (Agilent, SAD).

4.1.10. Oprema

U toku istraživanja korišćena je standardna laboratorijska oprema. Za molekularna istraživanja korišćeni su:

- PCR aparat, ProFlex PCR System (Applied Biosystems, SAD)
- centrifuga, Centrifuge 5425 (Eppendorf, Nemačka)
- mini centrifuga, MY SPIN 6 (Thermo Scientific, SAD)
- vorteks, LP Vortex Mixer (Thermo Scientific, SAD)
- setovi automatskih pipeta, Finnpipe F2 1- 10 µL, 10- 100 µL, 100- 1000 µL (Thermo Scientific, SAD)
- aparat za elektroforezu sa transluminatorom, Mupid- exu (Advance, Japan)
- držač za čipove (Agilent, SAD),
- vorteks za čipove (IKA, Velika Britanija),
- bioanalizator, Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, SAD).

4.2. Metode

4.2.1. Kalifornija mastitis test (California Mastitis Test, CMT)

Kalifornija mastitis test rađen je po proceduri opisanoj u knjizi Clinical Veterinary Microbiology (Quinn i sar., 1999). Pre testiranja mleka pomoću CMT zaprljane sise su čišćenje i oprane po potrebi. Nakon toga prvi mlazevi mleka izmuzani su u posudu s crnim dnom, radi odbacivanja prvog mlaza mleka i kontrole na prisustvo kliničkog mastitisa. Oko 2 mL mleka iz svake sise izmuzano je u pojedinačni odeljak posude za CMT. Jednaka količina CMT reagensa je dodavana u mleko. Blagim kružnim pomeranjem posude mešan je reagens sa mlekom i nakon 15 sekundi je očitavan rezultat. Rezultati su interpretirani na osnovu konzistencije mešavine kao:

- negativno (mešavina ostaje tečna, homogena bez uočljivog zgrušavanja),
- sumnjivo (neznatna promena u konzistenciji),
- slabo pozitivno (postepeno zgrušavanje mleka),
- pozitivno (odmah zgrušavanje mleka),
- izrazito pozitivno (stvaranje želatinozne mase).

4.2.2. Bakteriološke metode izolacije i identifikacije stafilokoka

4.2.2.1. Zasejavanje na krvni agar

Uzorci mleka pre zasejavanja držani su na sobnoj temperaturi pola sata ili u termostatu 15 minuta na temperaturi 37°C. Uzorci su kratko mešani na mešalici i zasejani velikom omčom eze prečnika 4 mm (0,01 mL) na krvni agar. Oko 15 minuta podloge su ostavljene na sobnoj temperaturi da se mleko upije, a zatim su inkubirane u aerobnim uslovima 24 h na 37°C. Na krvnom agaru na kojem nije bilo porasta nakon 24 h inkubacije, podloge su inkubirane još 24 h. Kolonije karakterističnog izgleda za stafilokoke (bele, žućkaste, žute, konveksne, za zonom hemolize) zasejavane su na hranljivi agar.

4.2.2.2. Zasejavanje na hranljivi agar

Par kolonija sumnjivih na stafilokoke presevajane su na hranljivi agar tehnikom „tri eze”. Podloga je inkubirana 24h na 37 °C. Kolonije izrasle na hranljivom agaru korišćene su za testove identifikacije i ispitivanje osetljivosti stafilokoka na antimikrobna sredstva.

4.2.2.3. Bojenje po Gramu

Na mikroskopsku pločicu stavljena je jedna kap fiziološkog rastvora i u njoj je suspendovan delić ispitujuće kolonije. Pločica je ostavljena da se osuši na sobnoj temperaturi, a onda je preparat fiksiran na plameniku. Preparat je preliven gencijana ljubičastom bojom, koja je bila u kontaktu sa preparatom 3 minuta. Nakon toga, boja je odlivena, a preparat je preliven Lugolovim rastvorom. Lugolov rastvor je delovao 1 minut, nakon čega je odliven, a preparat je ispran 96% etil-alkoholom. Preparat je zatim preliven karbofuksinom koji je delovao na preparat 20 sekundi. Nakon toga, preparat je ispran destilovanom vodom, osušen na vazduhu i posmatran

pod imerzionim objektivom mikroskopa. Stafilokoke na mikroskopskom preparatu vide se kao plave sferične tvorevine grupisane u nepravilne ili grozdaste skupine.

4.2.2.4. Ispitivanje prisustva enzima katalaze

Na mikroskopsku pločicu stavljena je jedna kap 3% vodonik-peroksida i u nju je suspendovan delić ispitujuće kolonije. Stvaranje mehurića pri kontaktu 3% vodonik-peroksida i kolonije označavalo je pozitivnu reakciju na enzim katalazu.

4.2.2.5. Zasejavanje na manitol slani agar

Par kolonija sa hranljivog agara presejane su na manitol slani agar. Inkubacija je vršena u aerobnim uslovima na 37°C tokom 24 h. Na ovoj podlozi *S. aureus* ima izgled žutih kolonija sa žutom zonom, dok ostale vrste iz roda *Staphylococcus* imaju izgled malih ružičastih kolonija bez promene boje podloge.

4.2.2.6. Ispitivanje sposobnosti koagulacije plazme kunića

U sterilne epruvete razliveno je 0,5 mL plazme kunića koja je već bila spremna za upotrebu. Delić ispitujuće kolonije suspendovan je u epruvetu sa razlivenom plazmom. Istovremeno kao pozitivna kontrola suspendovana je kolonija *S. aureus* ATCC 6538, i kao negativna kontrola korišćena je plazma u kojoj ništa nije suspendovano. Inkubacija je vršena na 37 °C, a rezultati su očitavani posle 4 h i 24h.

4.2.2.7. Ispitivanje prisustva enzima beta glukuronidaze

Jedna tableta ONPG stavljena je u sterilnu epruvetu. Dodato je 100 µL sterilnog fiziološkog rastvora i delić kolonije koja se ispituje. Inkubacija je vršena na 37 °C, a rezultati su očitavani posle 6 h i posle 24h. Rastvor žute boje označavao je pozitivnu reakciju, dok izostanak promene boje označavao je negativnu reakciju.

4.2.2.8. Ispitivanje fermentacije maltoze

U epruvete u kojima se nalazi ljubačasti bujon, aseptično je dodat jedan disk manoze i delić kolonije koja se ispituje. Inkubacija je vršena na 37 °C, a rezultati su očitavani posle 24 h i 48 h. Promena boje rastvora od purpurne do žute boje označavala je pozitivnu reakciju, dok izostanak promene boje označavao je negativnu reakciju.

4.2.3. Ispitivanje osetljivosti stafilokoka na antimikrobna sredstva disk difuzionom metodom

U sterilnu epruvetu naliven je 1 mL sterilnog fiziološkog rastvora u koji je suspendovano nekoliko kolonija stafilokoka sa hranljivog agara. Napravljena suspenzija je blago izmeša na vorteksu i upoređena sa 0,5 McFarland-ovim rastvorom (bioMerieux, Francuska) koji predstavlja standard za koncentraciju bakterija u suspenziji. Ukoliko suspenzija odgovara standardu, dobijen je željeni broj bakterija u primarnoj suspenziji koji iznosi $1- 3 \times 10^8$ bakterija u 1 mL. Iz dobijene primarne suspenzije preneto je 100 µL u 9,9 mL sterilnog fiziološkog rastvora. Suspenzija je izmešana na vorteksu i ona je predstavljala krajnu suspenziju za ispitivanje. Petri ploča sa Muller-Hinton agarom je prelivena sa svom količinom krajne

suspenzije stafilokoka. Petri ploča su ostavljene oko 2 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je višak suspenzije odliven, a ploča je stavljena u termostat na 37°C tokom 1 - 2 h da se prosuši. Postavljanje diskova antimikrobnih lekova na površinu inokulisane podloge vršeno je sterilnim pincetama. Na površinu inokulisane podloge sterilnim pincetama postavljani su diskovi antibiotika (Bioanalyse, Turska) u koncentracijama: penicilin G 10 µg (P), ampicilin 10 µg (AM), amoksisilin/ klavulanska kiselina 20 µg + 10 µg (AMC), cefaleksin 30 µg (CL), ceftriakson 30 µg (CRO), kloksacilin 1 µg (CX), gentamicin 10 µg (CN), tetraciklin 30 µg (TE) i trimetoprim/ sulfametoksazolom 1,25 µg + 23,75 µg (STX). Izolati koji su pokazali rezistenciju na penicilin, ispitani su dodatno disk difuzionom metodom na osetljivost prema oksacilinu 1 µg (OX) i cefoksitinu 30 µg (FOX) u cilju otkrivanja potencijalnih MRSA sojeva. Podloge su inkubirane na temperaturi 37 °C u trajanju od 24h. Osetljivost stafilokoka na pojedine antimikrobne lekove procenjivana je na osnovu merenja prečnika zone inhibicije. Rezultati su interpretirani prema standardu (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- EUCAST, 2021) i upustu proizvođača (Bioanalyse, Turska) kao osetljiv (S), intermedijarno osetljiv (I) i rezistentan (R) izolat na pojedine antimikrobne lekove.

4.2.4. Ekstrakcija DNK stafilokoka

4.2.4.1. Ekstrakcija za gene identifikacije i gene faktora virulencije

DNK ekstrakcija rađena je metodom ključanja prema protokolu Evropske Referentne laboratorije za antimikrobnu rezistenciju (EU Reference Laboratories, EURL) (Cavaco i sar., 2016). U kiveticu od 1,5 mL u koju je predhodno dodat 1 mL PBS- a, resuspendovana je puna omča od 10 µL kolonija stafilokoka sa hranljivog agara. Kivetica je centrifugovana 5 minuta na 20 000 x g. Nakon završenog centrifugovanja pažljivo je odvojen supernatant. U tu istu kiveticu dodato je 100 µL TE pufera. Užarenom ubodnom ezom napravljena je rupa na poklopcu kivetice. Kivetica je postavljena u stiroporski držač i zajedno sa njim je postavljena u posudu sa ključanom vodom. Kivetica sa uzorkom je bila u ključanoj vodi tačno 10 minuta. Nakon toga kivetica je stavljena na led gde je držana tačno 1 minut. Nakon toga sadržaj kivetice prebačen je u kiveticu u kojoj se nalazilo 900 µL TE pufera. Sadržaj kivetice je vorteksovan i kratko spinovan (5 sekundi), nakon čega je ceo sadržaj sa ekstrahovanom ukupnom količinom DNK koagulaza pozitivnih stafilokoka podeljen u više posebnih kivetica koje su predhodno obeležene brojem uzorka. Ekstrakti DNK su čuvani u zamrzivaču na temperaturi od -80 °C.

4.2.4.2. Ekstrakcija za genotipizaciju

DNK ekstrakcija za RS-PCR genotipizaciju rađenja je po protokolu Grabera (Grabera, 2016). U kiveticu zapremine 1,5 mL sa zavrtnjem u kojij se nalazi 100 µL TE, resuspendovana je jedna kolonija stafilokoka. Kivetica je zavrtnuta i inkubirana 10 minuta u termobloku na temperaturi 95 °C. Odmah nakon inkubacije kivetica je stavljena na led i držana tačno 1 minut. Uzorci su razblaženi 1:100 u DNAaza slobodnoj vodi i čuvani do ispitivanja na temperaturi od -80 °C.

4.2.5. PCR reakcije

Za identifikaciju stafilokoka do nivoa vrste dokazivalo se prisustvo gena za termostabilnu nukleazu (*nuc*) i prisustvo specifičnog 23S rRNK gena.

Za dokazivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka ispitivano je prisustvo gena koji kodira sintezu koagulaze (*coa*). Za dokazivanje *coa* korišćena je nested PCR tehnika. Prvi PCR protokol je izvršen sa eksternim parom prajmera (*coa1* i *coa4*), a veličina amplifikata bila je 1517 bp. Ovaj amplifikat predstavljao je DNK uzorak za ispitivanje za drugi PCR protokol sa internim parom prajmera (*coa2* i *coa3*). Veličina amplifikata kod drugog PCR protokola bila je 987 bp.

Nakon identifikacije koagulaza pozitivnih stafilokoka, identifikovani su geni koji kodiraju faktore virulencije. Sekvence prajmera, dužine amplifikata i uslovi PCR reakcije dati su u tabeli 4.2.5.1. Za dokazivanje *spa*, *pvl*, *mecA*, *sea-see* i *tsst* korišćeni su po dva nezavisna protokola.

Sve PCR reakcije su vršene u reakcionoj smeši od 25 µL, koja se sastojala 12,5 µL Dream Taq Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Lithuania), 1 µL (10µM) prajmera F (Invitrogen, Velika Britanija), 1 µL (10µM) prajmera R (Invitrogen, Velika Britanija), 8,5 µL nukleaza slobodne vode i 2 µL ekstrahovanog DNK.

4.2.6. Vizuelizacija PCR produkta

4.2.6.1. Priprema agar gela

U sterilnu staklenu bocu dodato je 90 mL dejonizovane vode, 10 mL 10x TBE pufera i 2 g agara. Smeša je zatim pažljivo uz mešanje zagrevana do ključanja, da se agar potpuno rastvori, nakon čega je hlađen u vodenom kupatilu na temperaturi od 50 °C. Dovoljno ohlađen agar razliven je u kalup sa postavljenim češljem koji pravi bunarčice u agaru. Kada se agar potpuno stegao češalj je izvadjen iz agara i agar je postavljen u kadu za elektroforezu.

4.2.6.2. Priprema pufera za elektroforezu

U sterilnu staklenu bocu dodato je 450 mL dejonizovane vode i 50 mL 10x TBE pufera. Sadržaj boce je blago promešan i naliven u kadu za elektroforezu tako da prekrije površinu agar gela.

4.2.6.3. Postavljanje ispitujućeg materijala u agar gel, elektroforeza i vizuelizacija.

U stripovanim kiveticama zapremine 100 µL pomešano je 3 µL boje Maestrosafe i 8 µL PCR amplifikata i sve je pipetom preneto u bunarčić agar gela. Isti postupak je sproveden i za markere molekulske mase DNK (ledere), pozitivne i negativne kontrole.

Elektroforeza za različite ispitujuće gene trajala je od 1 - 2 h, a voltaža elektroforeze kretala se u rasponu 50-100V. Vizuelizacija je vršena UV transluminatorom koji je sastavni deo elektroforeze više puta tokom trajanja procesa razdvajanja amplifikata na elektroforezi.

4.2.7. RS-PCR genotipizacija

Svi izolati su genotipizovani pomoću RS-PCR metode i minijaturnog sistema za elektroforezu (Agilent Technologies, SAD) prema metodi Fournie i saradnika (Fournier i sar., 2008) i Grabera (Grabner, 2016). Metoda se zasniva na amplifikaciji međugenski odvojenog regiona 16S–23S

rRNK. Reakciona smeša je bila ukupne zapremine 25 μL i sadržala 1,5 μL vode 12,5 μL Taq Master Mix (Qiagen, Nemačka), 2 μL (10 μM) svakog prajmera (G1 i L1 prajmera) i 7 μL ekstrakta DNK. Temperaturni PCR profil bio je: 95 $^{\circ}\text{C}$ tokom 15 minuta, nakon čega je usledilo 27 ciklusa koji su obuhvatali 94 $^{\circ}\text{C}$ tokom 1 min, nakon čega je usledilo snižavanje temperature tokom 2 minuta do 55 $^{\circ}\text{C}$ koje je trajalo 7 minuta. Nakon toga povećanje temperature trajanja 2 minuta do 72 $^{\circ}\text{C}$ koje je trajalo 2 min. Poslednji korak PCR ciklusa bio je na temperature 72 $^{\circ}\text{C}$ tokom 10 minuta nakon čega je usledilo hlađenje na 4 $^{\circ}\text{C}$.

Nakon završenog temperaturnog ciklusa PCR proizvodi čuvani su na temperaturi -20 $^{\circ}\text{C}$ i u roku od 3 dana su analizirani na minijaturnom sistemu za elektroforezu (Agilent 2100 bioanalyzer) uz upotrebu odgovarajućeg čipa (Agilent DNA 7500) po uputstvu proizvođača. Ovaj sistem razdvaja delove DNK po veličini, što kao rezultat prikazuje bendove (elektroferogrami). Genotipovi su definisani na osnovu izračunavanja Mahalanobis udaljenosti (Mahalanobis distance) veličine bendova datog izolata i poređenjem sa već poznatim genotipovima korišćenjem Mahal programa.

Genotipovi su imenovani prema Fournier i saradnici (Fournier i sar., 2008) od GTA do GTZ, a kasnije i od GTAA do GTAZ i nadalje. Elektroferogramski obrasci koji se razlikuju u samo jednom bendu od identifikovanog genotipa smatrani su genotipskom varijantom. Varijante su označavane rimskim brojevima u superskriptu (npr GTF^I, GTF^{II}). Elektroferogramski obrasci koji se razlikuju u više od jednog benda se smatraju novim genotipom (Syring i sar., 2012; Cosandey i sar., 2016). Novi genotipovi su imenovani ljubaznošću profesora Hansa Grabera (Agroscope, Research Division, Food Microbial Systems, Bern, Švajcarska)

4.2.8. Statistička analiza

Prevalencija CMT pozitivnih jedinki je određena kao proporcija pozitivnih mlečnih krava u odnosu na sve ispitane krave. Isti pristup je primenjen pri utvrđivanju *S. aureus* intramamarne infekcije na nivou četvrti, grla i farme. Farma je označena kao pozitivna, ukoliko je samo jedna krava bila *S. aureus* pozitivna. Primenom binarne logističke regresije ispitana je povezanost *S. aureus* infekcije sa veličinom farme, regionom i sezonom. Homer-Lemeshow test je korišćen za proveru prihvatljivosti statističkih modela. Kako nije uočena asocijativnost pojave infekcije sa sezonom i regionom, veličina farme je prikazana kao finalni logistički model. Jačina asocijativnosti je izražena kroz odnos verovatnoće. Hi kvadratni test je upotrebljen za procenu učestalosti faktora virulencije između klastera i ispitanih grupa genotipova. Statistička obrada rezultata izvršena je upotrebom SPSS 21 softverskog paketa (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5. REZULTATI

Rezultati ispitivanja virulentnosti i prevalencije koagulaza pozitivnih stafilokoka u slučajevima mastitisa krava prikazani su u četiri potpoglavlja (5.1, 5.2, 5.3 i 5.4).

5.1. Rezultati mastitis testa (CMT) i nalaza koagulaza pozitivnih stafilokoka u uzorcima mleka krava

Od ukupno pregledanih 4484 krava sa Mačvanskog i Kolubarskog okruga koje su se nalazile na 288 farmi, kod 1673 krave (37,3 %) ustanovljen je pozitivan nalaz na CMT testu (tabela 5.1.1).

Tabela 5.1.1. Rezultati CMT u Mačvanskom i Kolubarskom okrugu

Okrug	Broj CMT negativnih krava (%)	Broj CMT pozitivnih krava (%)	Ukupno (100%)
Mačvanski	1656 (63,1)	969 (36,9)	2625
Kolubarski	1155 (62,1)	704 (37,9)	1859
Ukupno	2811 (62,7)	1673 (37,3)	4484

Najveći procenat pozitivnih uzoraka mleka na CMT ustanovljen je tokom leta (40,6%), nešto manji tokom jeseni (38,7%) i proleća (32,6%), a najmanji u zimskom periodu (30%). Frekvencija CMT pozitivnih rezultata tokom godišnjih doba prikazana je u tabeli 5.1.2.

Tabela 5.1.2. Rezultati CMT u zavisnosti od godišnjeg doba

Sezona	Broj CMT negativnih krava (%)	Broj CMT pozitivnih krava (%)	Ukupno (100%)
Zima	471 (70)	202 (30)	673
Proleće	403 (67,3)	195 (32,6)	598
Leto	1051 (59,4)	717 (40,6)	1768
Jesen	886 (61,3)	559 (38,7)	1445
Ukupno	2811 (62,7)	1673 (37,3)	4484

Procenat pozitivnih krava na CMT, u zavisnosti od veličine farme, bio je sličan na malim i srednjim farmama (38,7% i 38,9%) dok je nešto niži bio na velikim farmama (33,4%). Rezultati ispitivanja uticaja broja krava na farmi na rezultate CMT testa prikazani su u tabeli 5.1.3.

Tabela 5.1.3. Rezultati CMT u zavisnosti od veličine farmi

Veličina farme	Broj CMT negativnih krava (%)	Broj CMT pozitivnih krava (%)	Ukupno (100%)
<20 krava	1100 (61,3)	693 (38,7)	1793
20-50 krava	903 (61,1)	575 (38,9)	1478
>50 krava	808 (66,6)	405 (33,4)	1213
Ukupno	2811 (62,7)	1673 (37,3)	4484

Od ukupno ispitanih 4484 mlečnih krava, kod 242 jedinice (5,4%) dokazano je prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka kao uzročnika mastitisa (Tabela 5.1.4). Mastitisi izazvani koagulaza pozitivnim stafilokokama su nešto češće dokazani na farmama Kolubarskog okruga (6,1%) nego na farmama Mačvanskog okruga (4,9%), ali bez statističke značajnosti.

Tabela 5.1.4. Prevalencija mastitisa krava izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokokama prema okrugu

Okrug	Broj negativnih krava (%)	Broj pozitivnih krava (%)	Ukupno (100%)
Mačvanski	2496 (95,1)	129 (4,9)	2625
Kolubarski	1746 (93,9)	113 (6,1)	1859
Ukupno	4242 (94,6)	242 (5,4)	4484

Posmatrajući uzorak mleka kao jedinicu ispitivanja, koagulaza pozitivne stafilokoke su izolovane iz 285 uzoraka mleka sa 128 farmi, tako da je prevalencija koagulaza pozitivnih stafilokoka na nivou četvrti vimena bila 1,6%, dok je na nivou farmi iznosila 44,4%.

Najveća prevalencija koagulaza pozitivnih stafilokoka ustanovljena je tokom zime (6,8%), nešto manje tokom proleća (6%) i leta (5,6%), a najmanje u jesen (4,2%) (Tabela 5.1.5).

Tabela 5.1.5. Prevalencija koagulaza pozitivnih stafilokoka tokom sezona

Sezona	Broj negativnih krava (%)	Broj pozitivnih krava (%)	Ukupno (100%)
Zima	627(93,2)	46 (6,8)	673
Proleće	562 (94)	36 (6)	598
Leto	1669 (94,4)	99 (5,6)	1768
Jesen	1384 (95,8)	61 (4,2)	1445
Ukupno	4242 (94,6)	242 (5,4)	4484

Primenom Hi-kvadratnog testa uočena je znatno veća prevalencija *S. aureus* supkliničkih mastitisa kod farmi sa manje od 20 krava ($P<0,001$) i farmi sa 20 do 50 krava ($P<0,001$) u odnosu na farme sa više od 50 krava. Prevalencija koagulaza pozitivnih stafilokoka u odnosu na veličinu farme prikazana je u tabeli 5.1.6.

Tabela 5.1.6. Prevalencija koagulaza pozitivnih stafilokoka u odnosu na veličinu farme

Veličina farme	Broj negativnih krava (%)	Broj pozitivnih krava (%)	Ukupno (100%)
<20 krava	1664 (92,8)	129 (7,2)	1793
20-50 krava	1387 (93,8)	91 (6,2)	1478
>50 krava	1191 (98,2)	22 (1,8)	1213
Ukupno	4242 (94,6)	242 (5,4)	4484

Upotrebom modela binarne logističke regresije, utvrđena je povezanost veličine farme sa pojavom *S. aureus* intramamarnе infekcije (tabela 5.1.7). Uzimajući u obzir veliku farmu sa više od 50 krava kao referentnu kategoriju, uočen je četverostruki rizik od pojave *S. aureus* intramamarnе infekcije kod krava koje potiču sa malih porodičnih farmi, sa manje od 20 grla ($P<0,0001$). Skoro četverostruka verovatnoća od pojave *S. aureus* mastitisa je utvrđena kod mlečnih krava poreklom sa srednjih farmi (20-50 grla) u odnosu na krave sa velikih farmi (preko 50 grla) ($P<0,0001$).

Tabela 5.1.7. Povezanost veličine farme i pojave mastitisa izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokokama

Veličina farme	Ukupan broj krava	B	S.E.	Wald	OR	95% IP		p
						Donji	Gornji	
Konstanta	-	-3.992	0.215	344.150	-	-	-	<0.0001
>50 krava	1213	0.000	0.000	-	1.000	-	-	-
<20 krava	1793	1.434	0.234	37.648	4.197	2.654	6.636	<0.0001
20-50 krava	1478	1.267	0.241	27.696	3.552	2.215	5.695	<0.0001

*OR - "odds ratio", odnos verovatnoće; IP - interval poverenja

5.2. Rezultati izolacije, fenotipske i genotipske identifikacije koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih u slučajevima mastitisa krava

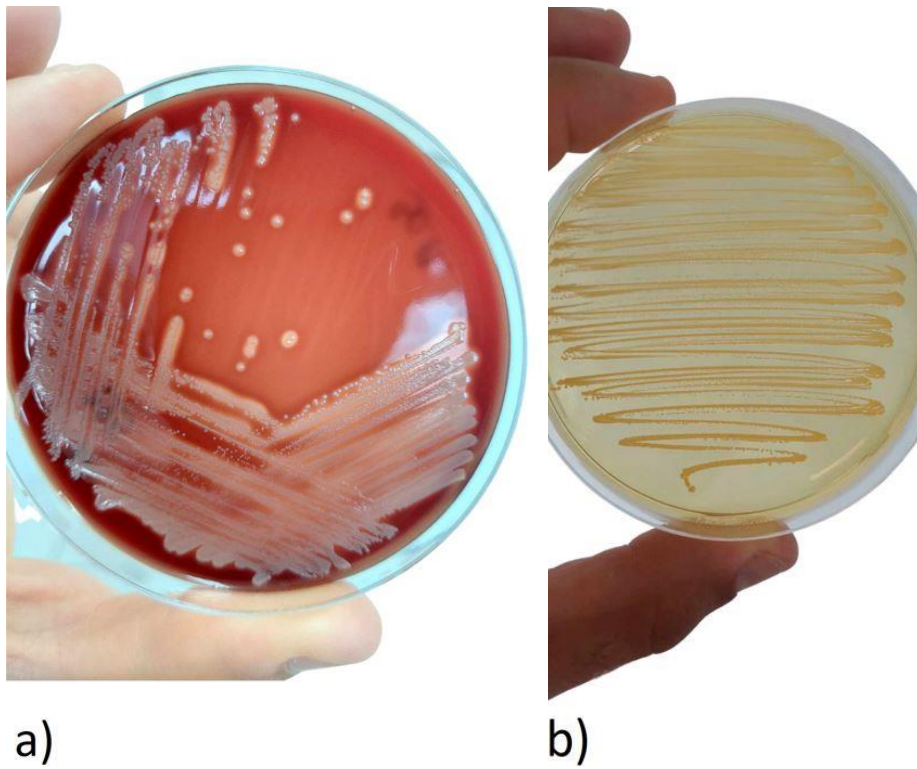
5.2.1. Fenotipska identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokoka

Izolati stafilokoka imali su karakterističan izgled kolonija nakon inkubacije tokom 24 h na krvnom agaru. Kolonije su bile okrugle, glatke, ispupčene, bele, svetlo žute do žute, sa zonom potpune hemolize (slika 5.2.1.1.a).

Na mikroskopskom preparatu izolati su imali karakterističan izgled Gram pozitivnih sferičnih oblika (koke) grupisane u nepravilne ili grozdaste tvorevine.

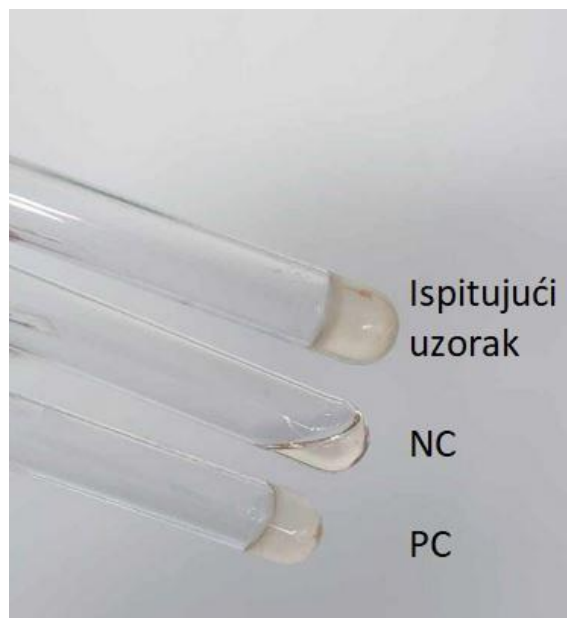
Izolati su bili pozitivni i na katalaza testu.

Izolati stafilokoka imali su karakterističan rast na manitol slanom agaru: kolonije su bile žute, glatke, ispupčene (slika 5.2.1.1.b).



Slika 5.2.1.1 Izgled kolonija stafilokoka na: a) krvnom agaru, b) manitol slanom agaru

Koagulaza pozitivne stafilokoke koagulisale su plazmu kunića u testu u epruveti (slika 5.2.1.2).



Slika 5.2.1.2. Koagulaza test u epruveti

Svi izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka reagovali su negativno na ONPG testu, a pozitivno na testu fermentacije maltoze.

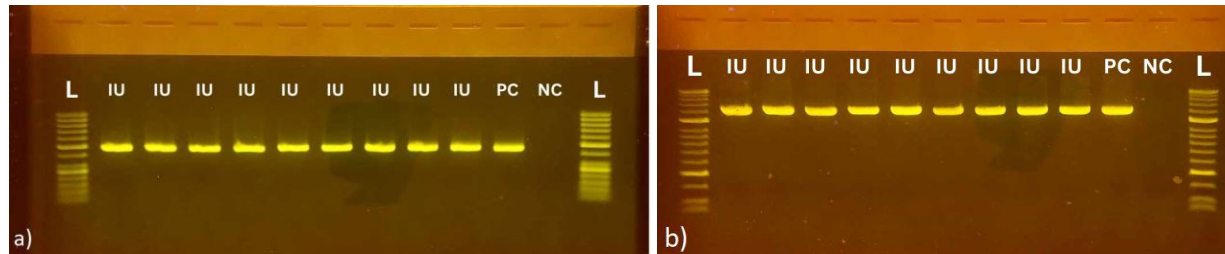
Na osnovu fenotipske identifikacije svih 285 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka je identifikovano kao *S. aureus* (tabela 5.2.1.1).

Tabela 5.2.1.1. Rezultati fenotipske identifikacije koagulaza pozitivnih stafilokoka

	Broj izolata	%
Manitol	285	100
ONPG	0	0
Maltoza	285	100

5.2.2. Genotipska identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih u slučajevima mastitisa krava

Kod svih 285 izolata dokazano je prisustvo *nuc* gena i *23S RNK*, specifičnih za *S. aureus* (slika 5.2.2.1.). Takođe, kod svih izolata dokazano je prisustvo *coa* gena.



Slika 5.2.2.1. Prikaz elektroforeza za: a) *nuc* gen; b) 23S RNK; L- ladder marker, IU- ispitujući uzorak, PC- pozitivna kontrola, *S. aureus* ATCC 6538, NC- negativna kontrola, voda

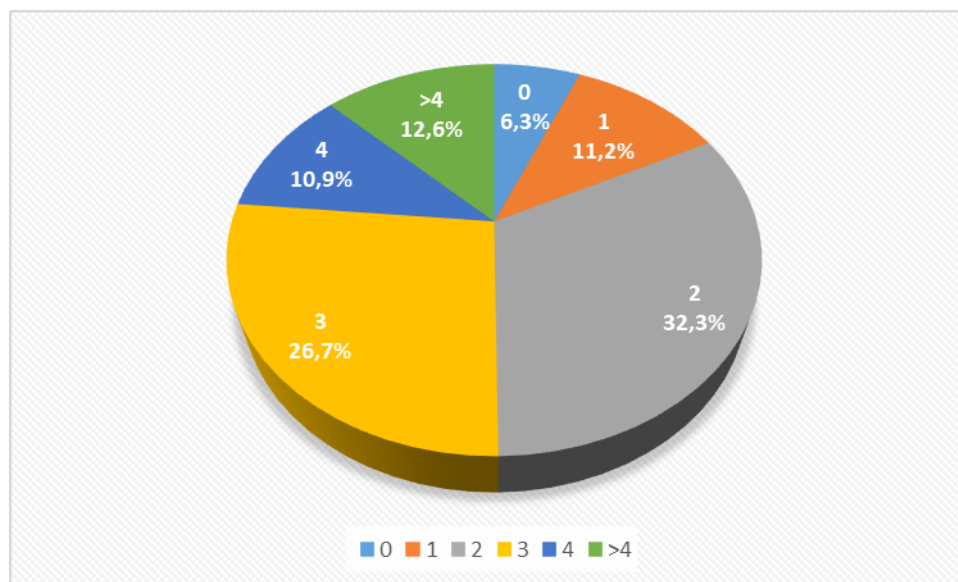
5.3. Rezultati ispitivanja osetljivost izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka na antimikrobna sredstva

Rezultati osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka na odabrana antimikrobna sredstva, disk difuzionom metodom po Kirbi Bauer-u prikazana je u tabeli 5.3.1. Uzimajući u obzir sve ispitane izolate, najveći procenat rezistencije je uočen na penicilin (74,7%), ampicilin (56,5%), kloksacilin (48,1%) i neomicin (42,8%).

Tabela 5.3.1. Osetljivost izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka na odabrana antimikrobna sredstva

Antimikrobno sredstvo	Broj ispitanih izolata	Osetljiv		Intermedijerno osetljiv		Rezistentan	
		Broj	%	Broj	%	Broj	%
Penicilin	285	72	25,3	0	0	213	74,7
Ampicilin	285	124	43,5	0	0	161	56,5
Amoksisilin- klavulanska kis.	285	245	86,0	0	0	40	14,0
Kloksacilin	285	148	51,9	0	0	137	48,1
Cefaleksin	285	254	89,1	0	0	31	10,9
Ceftriakson	285	260	91,2	0	0	25	8,8
Gentamicin	285	208	73,0	0	0	77	27,0
Neomicin	285	163	57,2	0	0	122	42,8
Tetraciklin	285	228	80,0	15	5,3	42	14,7
Linkomicin	285	249	87,4	0	0	36	12,6
Sulfametoksazol- trimethoprim	285	271	95,1	0	0	14	4,9
Cefoksitin	285	263	92,3	0	0	22	7,7
Oksacilin	285	263	92,3	0	0	22	7,7

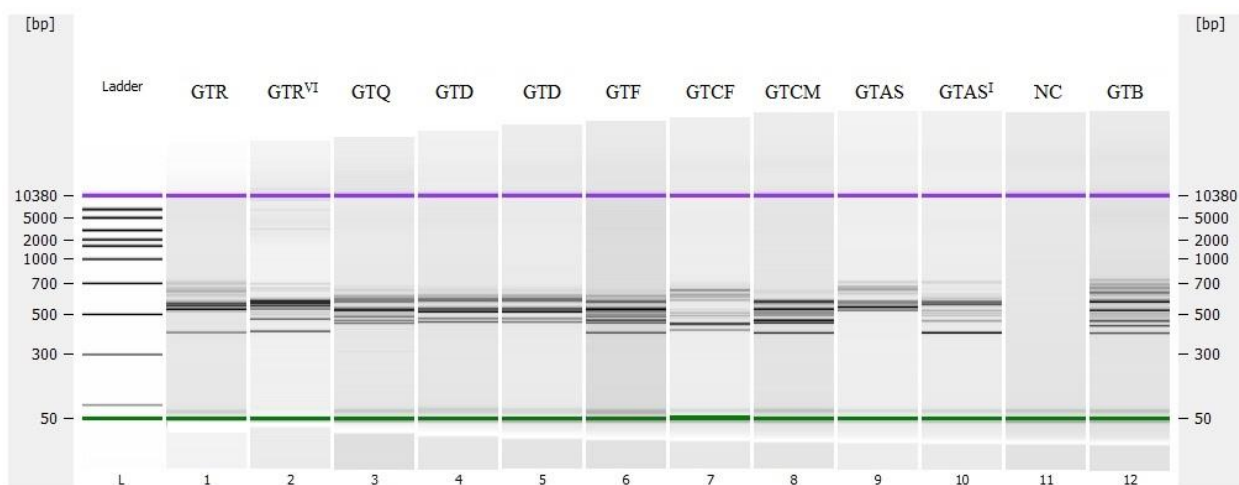
Ispitivanjem osetljivosti izolata disk difuzionom metodom prema 13 antimikrobnih sredstava koji se najčešće koriste u terapiji mastitisa ustanovili smo da je većina rezistentna na 2 ili više antimikrobnih sredstava. Rezultati rezistencije izolata prema broju antimikrobnih sredstava prikazani su na grafikonu 5.3.1.



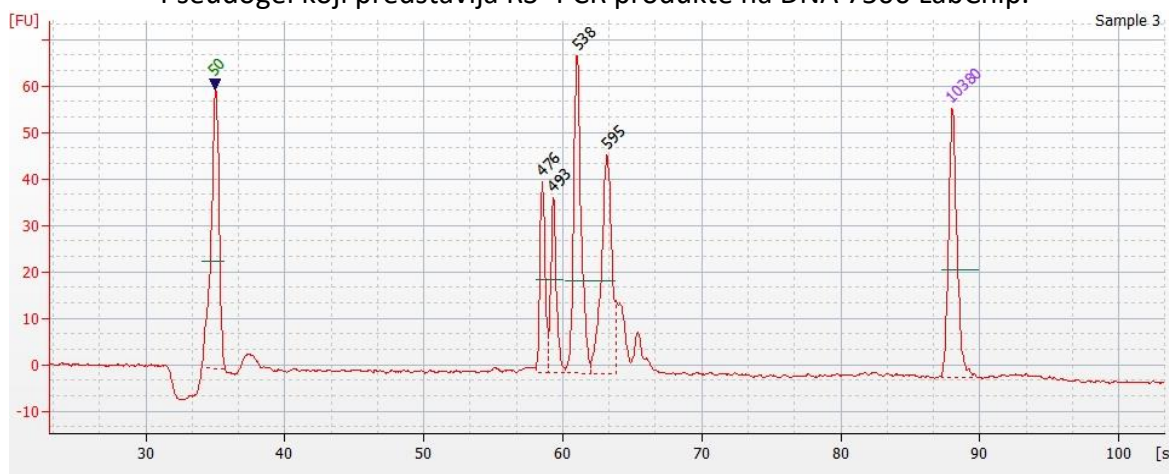
Grafikon 5.3.1. Prikaz rezistencije izolata prema broju antimikrobnih sredstava

5.4. Rezultati RS-PCR genotipizacije *S. aureus*

RS-PCR analizom utvrđena su 33 različita genotipa, od kojih 10 genotipova imaju varijante. Otkriveno je ukupno 15 novih genotipova (GTCL, GTCM, GTCN, GTCO, GTCP, GTCR, GTCS, GTCT, GTCU, GTCV, GTCY, GTCX, GTCZ, GTCQ i GTDA) i 5 novih varijanti genotipova (GTD^I, GTAF^{II}, GTAS^I, GTCL^I, GTCY^I) (tabela 5.4.1.). Genotipovi i njihove varijante klasifikovani su u klaster (CL). Genotipovi i varijante genotipova koji se javljaju u malom procentu svrstani su u klaster ostalih genotipova (CLOG), te su definisani glavni klasteri CLD (28,1%) i CLR (28,4%), kao i CLOG (43,5%). Genotipovi koji pripadaju CLD klasteru nisu detektovani kod krava na velikim farmama, u manjem procentu unutar CLR klastera (6,1%) i nešto većem procentu unutar CLOG klastera (17,1%). S druge strane, novi genotipovi i genotipske varijante jedino su identifikovani kod mlečnih krava poreklom sa malih i srednjih farmi.



Slika 5.4.1. RS-PCR genotipovi. Elektroforeza različitih RS-PCR proizvoda na DNA 7500 LabChip. Pseudogel koji predstavlja RS-PCR produkte na DNA 7500 LabChip.



Slika 5.4.2. Elektroforetski profil GTD. Brojevi na vrhovima pikova prikazuju veličinu RS-PCR produkata u bp.

Table 5.4.1. Genotipski klasteri, genotipovi i genotipske varijante izolata *S. aureus*

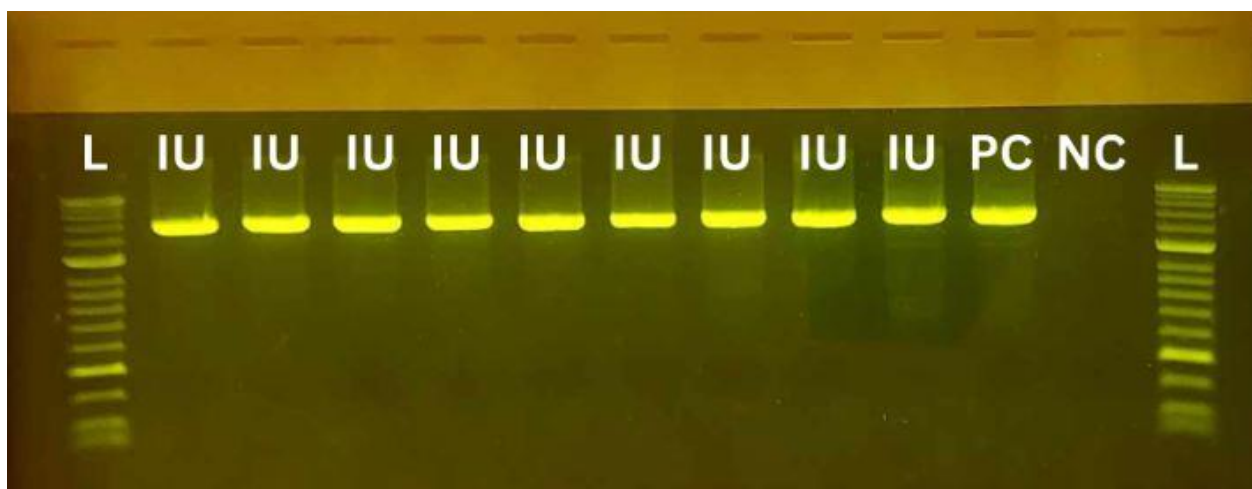
Genotipski klaster (CL)	Genotip i/ili genotipska varijanta	Novi genotip i/ili genotipska varijanta	Veličina farme			Ukupno (%)	
			<20 krava (%)	20-50 krava (%)	>50 krava (%)		
CLD	GTD		45 (29.4)	35 (33)	-	80 (28.1)	
			45 (29.4)	27 (25.5)	-	72 (25.3)	
		GTD ^I	-	8 (7.5)	-	8 (2.8)	
CLR	GTR		36 (23.5)	40 (37.7)	5 (19.2)	81 (28.4)	
			2 (1.3)	1 (0.9)	5 (19.2)	8 (2.8)	
		GTR ^I	-	1 (0.9)	-	1 (0.4)	
		GTR ^{VI}	33 (21.6)	36 (34)	-	69 (24.2)	
		GTR ^{VII}	1 (0.7)	-	-	1 (0.4)	
		GTR ^X	-	2 (1.9)	-	2 (0.7)	
CLOG			72 (47.1)	31 (29.2)	21 (80.8)	124 (43.5)	
		GTF	6 (3.9)	3 (2.8)	6 (23.1)	15 (5.3)	
		GTF ^I	2 (1.3)	3 (2.8)	-	5 (1.8)	
		GTQ	7 (4.6)	3 (2.8)	6 (23.1)	16 (5.6)	
		GTBI	6 (3.9)	3 (2.8)	-	9 (3.2)	
		GTCF		2 (1.3)	3 (2.8)	4 (15.4)	9 (3.2)
			GTCM	5 (3.3)	4 (3.8)	-	9 (3.2)
			GTCY	5 (3.3)	3 (2.8)	-	8 (2.8)
			GTCY ^I	1 (0.7)	-	-	1 (0.4)
		GTC	-	-	2 (7.7)	2 (0.7)	
		GTM	1 (0.7)	-	-	1 (0.4)	
		GTP	1 (0.7)	-	-	1 (0.4)	
		GTS	-	-	2 (7.7)	2 (0.7)	
		GTS ^I	-	1 (0.9)	-	1 (0.4)	
		GTS ^{III}	-	1 (0.9)	-	1 (0.4)	
			GTA ^{FII}	1 (0.7)	-	-	1 (0.4)
		GTAO ^I	2 (1.3)	-	1 (3.8)	3 (1.1)	
		GTAS	6 (3.9)	-	-	6 (2.1)	
			GTAS ^I	4 (2.6)	-	-	4 (1.4)
		GTAX	2 (1.3)	-	1 (3.8)	3 (1.1)	
		GTBS ^{II}	1 (0.7)	-	-	1 (0.4)	
		GTCB	1 (0.7)	-	-	1 (0.4)	
		GTCD	1 (0.7)	-	-	1 (0.4)	
		GTCH	1 (0.7)	-	-	1 (0.4)	
			GTCL	-	1 (0.9)	-	1 (0.4)
			GTCL ^I	1 (0.7)	-	-	1 (0.4)
			GTCN	2 (1.3)	1 (0.9)	-	3 (1.1)
	GTCO	1 (0.7)	-	-	1 (0.4)		
	GTCP	1 (0.7)	-	-	1 (0.4)		

	GTCQ		2 (1.3)	-	-	2 (0.7)
	GTCR		1 (0.7)	-	-	1 (0.4)
	GTC S		1 (0.7)	-	-	1 (0.4)
	GTCT		1 (0.7)	-	-	1 (0.4)
	GTCU		2 (1.3)	-	-	2 (0.7)
	GTCV		2 (1.3)	2 (1.9)	-	4 (1.4)
	GTCX		1 (0.7)	2 (1.9)	-	3 (1.1)
	GTCZ		1 (0.7)	-	-	1 (0.4)
	GTDA		1 (0.7)			1 (0.4)
Total	231 (81)	54 (19)	153 (53.7)	106 (37.2)	26 (9.1)	285 (100)

Primenom RS-PCR genotipizacije utvrđena su dva dominantna genotipa *S. aureus*- a: GTD (25,3%) i GTR^{VI} (24,2%). Učestalost ostalih genotipova bila je manja od 6%.

5.5. Rezultati ispitivanja prisustva gena koji kodiraju faktore virulencije

Relativna učestalost 25 gena koji kodiraju faktore virulencije *S. aureus*-a, prikazana je u tabeli 5.5.1. Geni koji kodiraju MSCRAMM dokazani su u visokom procentu. Gen *fnbA* dokazan je kod 278 izolata (97,5%), *clfA* kod 252 (88,4%), *cna* kod 243 (85,3%), *efb* kod 126 (44,2%). Gen *spa* koji kodira sintezu proteina A, koji je bitan za izbegavanje opsonizacije, dokazan je kod svih izolata. Geni koji kodiraju kapsularne polisaharide *cap5* i *cap8* dokazani su kod 38,25%, odnosno kod 61,8% izolata. Geni koji imaju važnu ulogu u formiranju biofilma *icaA* i *icaD* dokazani su u visokom procentu. Gen *icaA* dokazan je kod 94,0%, a gen *icaD* kod 93,0% izolata. S druge strane gen *bap*, koji kodira biofilm akcesorni protein (Bap), nije dokazan ni kod jednog izolata.



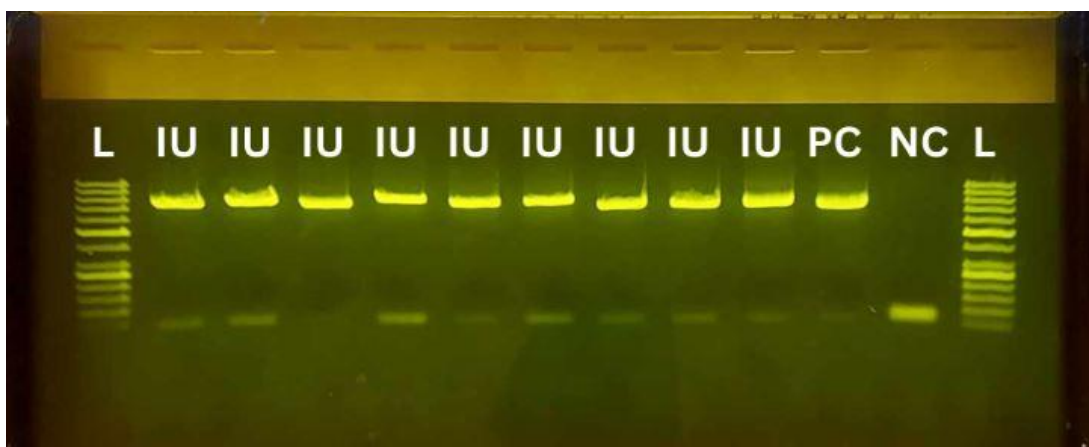
Slika 5.5.1. Prikaza elektroforeze za *fnbA* gen; L- ladder marker, IU- ispitujući uzorak, PC- pozitivna kontrola, *S. aureus* ATCC 6538, NC- negativna kontrola, voda

Od 11 istraživanih gena koji kodiraju enterotoksine, *sed* je detektovan kod 163 (57,2%), *sei* kod 136 (47,7%) i *seg* kod 29 (10,2%) izolata. Ostali geni za sintezu enterotoksina detektovani su u manjem procentu. Prisustvo gena *ser* i *tsst* nije dokazano ni kod jednog izolata u ovoj studiji. Gen za Panton- Valentin leukocidin, *pvl* dokazan je kod 29 (10,2%) izolata. Prisustvo *mecA* gena (slika 5.5.4), koji kodira rezistenciju na meticilin, dokazano je kod 22 (7,7%) izolata. Uzimajući u obzir *pvl*-pozitivne *S. aureus* izolate, 10 (34,5%) je bilo nosilac i *mecA* gena.

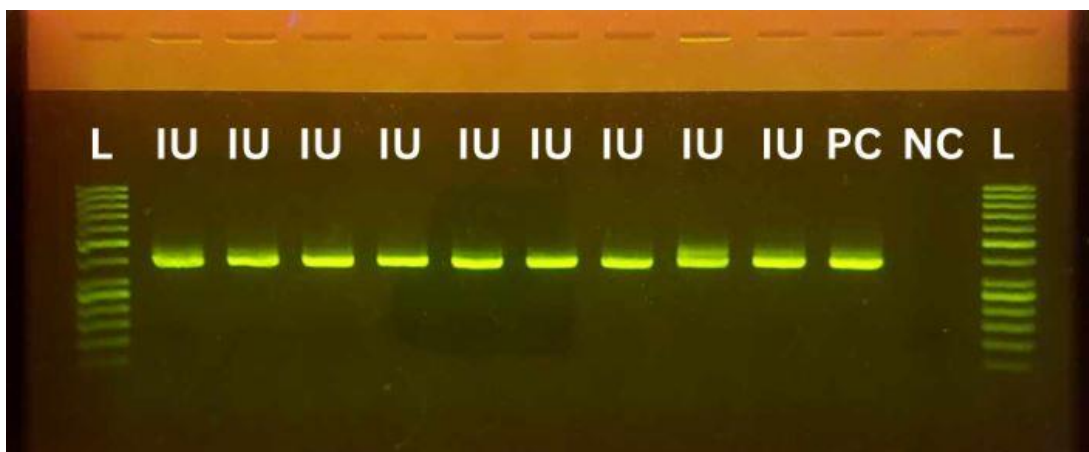
Pošto je ispitan veliki broj gena kod svih 285 izolata *S.aureus*, rezultati kombinacije gena koji kodiraju faktore virulencije su podjeljeni i predstavljeni u dve grupe po srodnim genima. U prvoj grupi se nalaze geni koji kodiraju površinske faktore virulencije i koji učestvuju u adherenciji i koji ometaju opsonizaciju. Relativna učestalost ove grupe gena je prikazana u tabeli 5.5.2 kod već opisanih genotipova i u tabeli 5.5.3 kod novih genotipova.

Tabela 5.5.1. Relativna učestalost gena koji kodiraju faktore virulencije kod *S. aureus* izolata

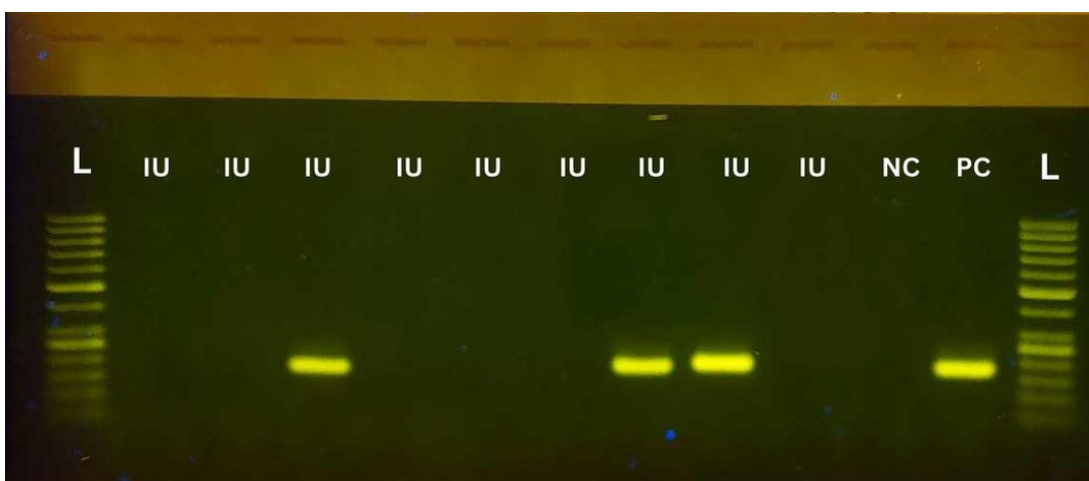
	Veličina farme			Ukupno	Relativna frekvencija
	<20 krava (%)	20-50 krava (%)	>50 krava (%)		
<i>clfA</i>	135 (88.2)	93 (87.7)	24 (92.3)	252	88.4
<i>can</i>	128 (83.6)	97 (91.5)	18 (69.2)	243	85.3
<i>efb</i>	65 (42.5)	60 (56.6)	17 (65.4)	142	49.8
<i>fnbA</i>	150 (98.0)	102 (96.2)	26 (100)	278	97.5
<i>spa</i>	153 (100)	106 (100)	26 (100)	285	100.0
<i>cap5</i>	76 (49.7)	21 (19.8)	10 (38.5)	107	37.5
<i>cap8</i>	78 (51.0)	85 (80.2)	15 (57.7)	178	62.5
<i>icaA</i>	147 (96.1)	101 (95.3)	22 (84.6)	270	94.7
<i>icaD</i>	145 (94.8)	98 (92.4)	22 (84.6)	265	93.0
<i>bap</i>	-	-	-	-	-
<i>mecA</i>	13 (8.5)	4 (3.8)	5 (19.2)	22	7.7
<i>pvl</i>	23 (15.0)	5 (4.7)	1 (3.8)	29	10.2
<i>sea</i>	9 (5.9)	11 (10.4)	2 (7.7)	22	7.7
<i>seb</i>	7 (4.6)	8 (7.5)	1 (3.8)	16	5.6
<i>sec</i>	14 (9.1)	2 (1.9)	6 (23.1)	22	7.7
<i>sed</i>	69 (45.1)	83 (78.3)	12 (46.2)	164	57.5
<i>see</i>	1 (0.6)	-	-	1	0.4
<i>ser</i>	-	-	-	-	-
<i>seg</i>	22 (14.4)	7 (6.6)	2 (7.7)	31	10.9
<i>she</i>	3 (2.0)	2 (1.9)	-	5	1.8
<i>Sei</i>	74 (48.4)	50 (47.2)	16 (61.5)	140	49.1
<i>Sej</i>	3 (2.0)	1 (0.9)	-	4	1.4
<i>Sep</i>	4 (2.6)	2 (1.9)	-	6	2.1
<i>tsst-1</i>	-	-	-	-	-
Ukupno (%)	153 (100)	106 (100)	26 (100)	285	100



Slika 5.5.2. Prikaz elektroforeze za *icaA* gen; L- ladder marker, IU- ispitujući uzorak, PC- pozitivna kontrola, *S. aureus* ATCC 6538, NC- negativna kontrola, voda



Slika 5.5.3. Prikaz elektroforeze za *icaD* gen; L- ladder marker, IU- ispitujući uzorak, PC- pozitivna kontrola, *S. aureus* ATCC 6538, NC- negativna kontrola, voda



Slika 5.5.4. Prikaz elektroforeze za *mecA* gen; L- ladder marker, IU- ispitujući uzorak, PC- pozitivna kontrola, *S. aureus* ATCC 43300, NC- negativna kontrola, voda

Table 5.5.2. Distribucija gena koji kodiraju površinske faktore virulencije kod prethodno opisanih genotipova i genotipskih varijanti *S. aureus*

	<i>clfA</i>	<i>cna</i>	<i>efb</i>	<i>fnbA</i>	<i>spa</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>bap</i>
GTD (72)	72	72	-	72	72	-	72	72	72	-
GTF (15)	15	15	15	15	15	5	10	15	15	-
GTF ^I (5)	-	-	5	5	5	5	-	5	5	-
GTR (8)	8	-	8	8	8	8	-	8	8	-
GTR ^I (1)	-	1	-	-	1	1	-	-	-	-
GTR ^{VI} (69)	69	69	69	69	69	38	31	69	69	-
GTR ^{VII} (1)	1	1	1	1	1	1	-	1	1	-
GTR ^X (2)	2	2	2	2	2	2	-	2	2	-
GTQ (16)	16	16	16	16	16	-	16	16	16	-
GTB ^I (9)	9	-	-	9	9	5	4	9	9	-
GTCF (9)	9	9	-	9	9	4	5	-	-	-
GTC (2)	2	-	-	2	2	-	2	2	2	-
GTM (1)	1	-	1	1	1	1	-	1	1	-
GTP (1)	1	1	-	1	1	-	1	1	1	-
GTS (2)	-	2	-	2	2	2	-	2	2	-
GTSI (1)	-	1	-	-	1	1	-	1	1	-
GTS ^{III} (1)	-	1	-	1	1	1	-	1	1	-
GTAO ^I (3)	3	-	-	3	3	3	-	3	3	-
GTAS (6)	6	6	-	6	6	6	-	6	6	-
GTAX (3)	-	3	-	-	3	-	3	3	-	-
GTBSII (1)	1	-	-	1	1	1	-	1	1	-
GTCB (1)	1	1	-	1	1	-	1	-	1	-
GTCD (1)	1	-	-	1	1	-	1	-	-	-
GTCH (1)	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-
CLD (72)	72	72	-	72	72	0	72	72	72	-
CLR (81)	80	73	80	80	81	50	31	80	80	-
CLOG (78)	65	55	38	74	78	35	43	66	64	-
Total (231)	217	200	118	226	231	85	146	218	216	-
%	93.9	86.6	51.1	97.8	100	36.8	63.2	94.4	93.5	-

Table 5.5.3. Distribucija gena površinskih faktora virulencije kod novootkrivenih genotipova i genotipskih varijanti *S. aureus*

	<i>clfA</i>	<i>can</i>	<i>efb</i>	<i>fnbA</i>	<i>spa</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>bap</i>
GTD ^I (8)	8	8	8	8	8		8	8	8	-
GTCM (9)	9	9	-	9	9	3	6	9	9	-
GTCY (8)	-	8	8	8	8	2	6	8	8	-
GTCY ^I (1)	-	-	1	1	1	1	-	1	1	-
GTA ^{FII} (1)	1		1	1	1	1	-	1	1	-
GTAS ^I (4)	4	4	-	4	4	4	-	4	4	-
GTCL (1)	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
GTCL ^I (1)	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
GTCN (3)	3	-	3	3	3	2	1	3	3	-
GTCO (1)	-	1	-	1	1	-	1	1	1	-
GTCP (1)	-	1	-	1	1	1	-	1	1	-
GTCQ (2)	2		-	2	2	1	1	2	2	-
GTCR (1)	1	1	-	1	1	-	1	1	1	-
GTCS (1)	1	-	1	1	1	-	1	1	1	-
GTCT (1)	1	-	1	1	1	1	-	1	1	-
GTCU (2)	-	2	-	2	2	2	-	2	2	-
GTCV (4)	4	4	-	4	4	2	2	4	4	-
GTCX (3)	-	3	-	3	3	-	3	3	-	-
GTCZ (1)	-	1	1	1	1	-	1	1	1	-
GTDA (1)	1	1	-	1	1	-	1	1	1	-
CLD (8)	8	8	8	8	8	-	8	8	8	-
CLR (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CLOG (45)	27	35	16	44	46	22	24	44	41	-
Total (54)	35	43	24	52	54	22	32	52	49	-
%	64.8	79.6	44.4	96.3	100	40.7	59.3	96.3	90.7	-

Gen *clfA* koji kodira faktor virulencije koji učestvuje u adherenciji detektovan je u manjoj meri (64,8%) kod *S. aureus* izolata koji pripadaju novim genotipovima i varijantama genotipa u odnosu na već dobro poznate genotipove i njihove varijante ($p < 0,001$).

U drugoj grupi se nalaze geni koji kodiraju enterotoksine, toksin toksičnog šoka, Panton Valentin leukocidin i *mecA* gen kod već poznatih genotipova (tabela 5.5.4.) i kod novootkrivenih genotipova (tabela 5.5.5.).

Table 5.5.4. Distribucija *mecA*, *pvl*, *tsst* i gena za enterotoksine kod prethodno opisanih genotipova i genotipskih varijanti *S. aureus*

	<i>mecA</i>	<i>pvl</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>ser</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>sej</i>	<i>sep</i>	<i>tsst</i>
GTD (72)	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	72	-	-	-
GTF (15)	-	10	-	-	-	5	-	-	-	-	15	-	-	-
GTF ^I (5)	-	-	-	5	-	5	-	-	5	-	5	-	-	-
GTR (8)	2	1	1	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-
GTR ^I (1)	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
GTR ^{VI} (69)	-	-	6	-	-	69	-	-	16	2	-	-	-	-
GTR ^{VII} (1)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTR ^X (2)	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
GTQ (16)	-	6	-	-	-	6	-	-	-	-	16	-	-	-
GTB ^I (9)	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-
GTCF (9)	6	1	3	3	6	3	-	-	-	-	-	-	-	-
GTC (2)	-	-	-	-	2	-	-	-	2	-	2	-	-	-
GTM (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-
GTP (1)	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1	-	-	-	-
GTS (2)	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
GTS ^I (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-
GTS ^{III} (1)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
GTAO ^I (3)	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
GTAS (6)	6	6	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTAX (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTBS ^{II} (1)	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTCB (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTC ^D (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTCH (1)	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-
CLD (72)	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	72	-	-	-
CLR (81)	3	1	7	-	-	80	-	-	16	2	-	-	-	-
CLOG (78)	15	23	4	8	14	29	1	-	11	1	44	-	-	-
Total (231)	18	24	11	8	14	129	1	-	27	3	116	-	-	-
%	7.8	10.4	4.8	3.5	6.1	55.8	0.4	-	11.7	1.3	50.2	-	-	-

Tabela 5.5.5. Distribucija *mecA*, *pvl*, *tsst* i gena za enterotoksine kod novootkrivenih genotipova i genotipskih varijanti *S. aureus*

	<i>mecA</i>	<i>pvl</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>ser</i>	<i>seg</i>	<i>she</i>	<i>sei</i>	<i>sej</i>	<i>sep</i>	<i>tsst</i>
GTD ^I (8)	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	8	-	-	-
GTCM (9)	-	1	-	-	-	9	-	-	-	-	8	-	-	-
GTCY (8)	-	-	6	6	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
GTCY ^I (1)	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTAF ^{II} (1)	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1	-	1	-
GTAS ^I (4)	4	4	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTCL (1)	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTCL ^I (1)	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTCN (3)	-	-	-	-	3	3	-	-	3	-	3	3	-	-
GTCO (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
GTCP (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-
GTCQ (2)	-	-	1	-	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-
GTCR (1)	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-
GTCs (1)	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-
GTCT (1)	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
GTCU (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTCV (4)	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	4	-
GTCX (3)	-	-	2	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
GTCZ (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTDA (1)	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-
CLD (8)	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	8	-	-	-
CLR (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CLOG (45)	4	5	11	8	8	27	-	-	4	2	16	4	6	-
Total (54)	4	5	11	8	8	35	-	-	4	2	24	4	6	-
%	7.4	9.3	20.4	14.8	14.8	64.8	-	-	7.4	3.7	44.4	7.4	11.1	-

Izolati iz CLOG klastera novih genotipova i varijanti bili su jedini koji su nosili *sej* i *sep* gene. To je statistički značajno u odnosu na prethodno opisane genotipove i njihove varijante ($p < 0,001$). Kod CLOG klastera novih genotipova i varijanti ustanovljeno je sledeća frekvenciji *sea* (20,4%), *seb* (14,8%) i *sec* (14,8%) gena.

6. DISKUSIJA

Prevalencija uzorčnika mastitisa značajno se razlikuje među zemljama (Tenhagen i sar., 2006; Cervinkova i sar., 2013; Oliveira i sar., 2015; Cvetnić i sar., 2016; Zhang i sar., 2016b). Čak i u istoj državi u različitim regijama, prevalencija uzročnika mastitisa može da se razlikuje u zavisnosti od klime, higijene i menadžmenta na farmi (Zeryehun i sar., 2013; Verbeke i sar., 2014; Zhang i sar., 2016b).

Stafilokokni mastitis predstavlja problem mlečnog govedarstva već više od 60 godina (Ruegg, 2017). Kao posledica kontagioznosti i sposobnosti da izaziva dugotrajne hronične infekcije, koagulaza pozitivne stafilokoke su među nekoliko glavnih patogenih bakterija povezanih sa mastitisima (Petzer i sar., 2009; Abera i sar., 2010; Wang i sar., 2015; Acosta i sar., 2016; Levison i sar., 2016; Taponen i sar., 2017, Morales-Ubaldo i sar., 2023). Od koagulaza pozitivnih stafilokoka, *S. aureus* je najčešće izolovani uzročnik mastitisa (Tenhagen i sar., 2006; Botrel i sar., 2010; Petersson-Wolfe, 2010; Maćešić i sar., 2012).

U našem istraživanju dokazali smo prevalenciju mastitisa izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokokama od 5,4%. Slični rezultati su dobijeni u istraživanjima provedenim u Nemačkoj (5,7%) (Tenhagen i sar., 2006), dok je ispitivanjima izvedenim u Hrvatskoj utvrđena prevalencija od 4,5% (Cvetnić i sar., 2016). Manji procenat učestalosti mastitisa uzrokovanih *S. aureus* utvrđen je u SAD, 2,9% u konvencionalnoj proizvodnji i 5,4% u organskoj proizvodnji mleka (Pol i Ruegg, 2007). Veća prevalencija mastitisa izazvanih *S. aureus* utvrđena je u Norveškoj (8,2%) (Østerås i sar., 2006), na dve farme u Srbiji (8,2%) (Zutić i sar., 2012), u Argentini (10,8%) (Dieser i sar., 2014), Indiji (14,0%) (Pati i Mukherjee, 2022), Etiopiji (16,2%) (Mekuria i sar., 2013), Danskoj (34%) (Kirkeby i sar., 2019) i Egiptu (53,6%) (Hussein i sar., 2022). Varijacije u prevalenciji mastitisa uzrokovanih *S. aureus* u pomenutim studijama mogu nastati zbog različitih proizvodnih sistema, veličine stada, nivoa biosigurnosti, higijenskih praksi, dizajna studije i pristupa prikupljanju uzoraka (Wang i sar., 2022).

Prevalencija koagulaza pozitivnih stafilokoka tokom godišnjih doba se nije znatno razlikovala, s tim da je nešto veća prevalencija bila tokom zime i proleća. Na farmama gde su izolovane koagulaza pozitivne stafilokoke, higijena muže i higijena objekta bile su dobre. Takođe, dobri su bili i mikroklimatski uslovi u objektu. Međutim, prevalencija pozitivnih rezultata na CMT testu je bila veća tokom leta i jeseni što se može objasniti povećanom prevalencijom uzročnika mastitisa iz okoline (*S. uberis* i bakterija iz familije *Enterobacteriaceae*). Povišena temperatura u štalama tokom letnjih i jesenjih meseci, dovodi do slabljenja imuniteta krava što predstavlja faktor rizika za pojavu mastitisa (Zhang i sar., 2016b). Pored visoke temperature, povećana vlažnost u štalama i prisustvo muva, povoljno utiču na razvoj i širenje uzročnika mastitisa iz okruženja (Costa i sar., 1998; Zhang i sar., 2016b).

Bakteriološkim i molekularnim ispitivanjima uzročnika mastitisa iz mleka krava s pozitivnim Kalifornija mastitis testom u našem istraživanju ustanovljeno je prisustvo 285 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka. Svi izolati su identifikovani kao *S. aureus*, što se slaže sa rezultatima

dobijenim u drugim studijama izvedenim u Srbiji (Vakanjac i sar., 2010; Žutić i sar., 2012; Rajić Savić i sar., 2014). Prevalencija mastitisa izazvanih *S. aureus*-a kretala se od 1% do 55,6% na različitim farmama. Statistički je dokazana značajno veća prevalencija *S. aureus*-a na farmama sa manje od 20 krava i farmama sa 20 do 50 krava u odnosu na farme sa više od 50 krava (tabela 5.1.7). Takođe, dokazan je i 4 puta povećan rizik od infekcije *S. aureus*-om na malim i srednjim farmama u odnosu na velike farme. Generalno na svim farmama gde su izolovane koagulaza pozitivne stafilokoke, higijena na farmama i higijena muže bila je dobra. Poštovao se redosled muže. Jedina razlika na malim, a u nekim slučajevima i na srednjim farmama je to da se ne vodi dobro evidencija terapije mastitisa, da se i hronično obolele krave sa rekurentnim mastitisima ostavljaju u proizvodnji. Takođe, na malim farmama retko se izmuzaju prvi mlazevi mleka u posudu sa tamnim dnom i kontroliše mleko pomoću CMT. Farmeri na ovim farmama nisu stimulisani da kontrolišu somatske ćelije u mleku, jer se pri formiranju cene mleka ne uzima u obzir broj somatskih ćelija.

Rezistencija stafilokoka na antimikrobna sredstva predstavlja sve veći globalni problem. Izolovanje uzročnika i ispitivanje njegove osetljivosti na antimikrobna sredstva pre početka terapije predstavlja osnovu za uspešno lečenje mastitisa krava.

U našem istraživanju ispitali smo osetljivost izolata *S. aureus*, poreklom iz mlečne žlezde krava, na 13 antimikrobnih sredstava. Najveći procenat izolata *S. aureus* bio je rezistentan na penicilin 213 odnosno (74,7%) izolata, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u drugim studijama izvedenim u Srbiji, gde je ustanovljena rezistencija od 62,4%, odnosno 89,4% (Rajić Savić i sar., 2014; Zdravković, 2016). Rezultati slični našim dobijeni su u studijama drugih autora.

Visoki procenat izolata rezistentnih na penicilin utvrđen u više studija kretao se u rasponu od 63,8% do 100 % (Moroni i sar., 2006; Intorre i sar., 2013; Mekuria i sar., 2013; Wang i sar., 2016; Kenar i sar., 2017; Liu i sar., 2017; Ma i sar., 2018; Ren i sar., 2020; Zhang i sar., 2020; Abdeen i sar., 2021; Greeshma i sar., 2022; Naranjo-Lucena i Slowey, 2022; Zhang i sar., 2022). Znatno niži procenat (5% do 20%) *S. aureus*, izolovanih u slučajevima mastitisa rezistentnih na penicilin utvrđen je u Norveškoj, Švedskoj, Francuskoj, Švajcarskoj, SAD i Brazilu (Hendriksen i sar., 2008; Haran i sar., 2012; Monistero i sar., 2020; Naranjo-Lucena i Slowey, 2022). β -laktamski antibiotici iako su se više koristili u prošlosti i danas se često koriste u veterinarskoj kliničkoj praksi. Deluju tako što inhibiraju sintezu ćelijskog zida bakterije. Vezuju se za penicilin vezujuće proteine u ćelijskom zidu bakterije, onemogućavaju sintezu peptidoglikana i dovode do smrti bakterija. Enzim koji proizvode neki sojevi stafilokoka, β -laktamaza, hidrolizuje β -laktamski prsten antibiotika i tako ga inaktivira. Produkcija β -laktamaza najviše doprinosi rezistenciji stafilokoka na β -laktamske antibiotike (Olsen i sar., 2006).

Ampicilin, kao i penicilin, pripada grupi β -laktamskih antibiotika osetljivih na β -laktamazu. U našem istraživanju 161 izolat (56,5%) bio je rezistentan na ampicilin. Veliki procenat rezistencije na ampicilin može se objasniti čestom upotrebom ovog antibiotika u kliničkoj terapiji i prisustvom stafilokoka koje proizvode β -laktamazu (Monistero i sar., 2020). Rezultati slični našim dobijeni su u ispitivanjima u Maleziji 43,6% (Saeed i sar., 2022), Kazahstanu 45,3% (Rychshanova i sar., 2022), Indiji 50% (Greeshma i sar., 2022) i Turskoj 61,5% (Kenar i sar.,

2017). Nešto veći procenat rezistencije (78,4%) utvrđen je u Litvaniji (Naranjo-Lucena i Slowey, 2022), Italiji 98,5% (Moroni i sar., 2006) i Kini 79,6% i 94,3% (Wang i sar., 2016; Liu i sar., 2017). Nizak procenat rezistencije utvrđen je u studijama u SAD 1 % (Haran i sar., 2012), Belgiji 12,7% i Norveškoj 5% (Naranjo-Lucena i Slowey, 2022). U više studija uporedno je ispitivana rezistenciju na penicilin i ampicilin. U tim studijama procenat rezistencije bio je sličan na oba antibiotika (Haran i sar., 2012; Wang i sar., 2016; Kenar i sar., 2017; Liu i sar., 2017; Greeshma i sar., 2022; Rychshanova i sar., 2022; Saeed i sar., 2022).

Kloksacilin je β - laktamski antibiotik otporan na β - laktamazu. U našem istraživanju 137 izolata (48,1%) bilo je rezistentno na kloksacilin. Za razliku od rezultata dobijenih u našim istraživanjima, studija Rajić-Savić (2014) je utvrdila da su svi izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka, poreklom sa farmi gde je prevalencija stafilokoka bila niska ili srednja, osetljivi na kloksacilin, a izolati poreklom sa farmi gde je učestalost mastitisa izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokokom bila visoka, 6,9% izolata je bilo rezistentno na kloksacilin. Nizak procenat izolata *S.aureus* rezistentnih na kloksacilin (2,9%) utvrđen je u studiji u Portugalu (Naranjo-Lucena i Slowey, 2022). Viši procenat izolata *S.aureus* rezistentnih na kloksacilin utvrđen je u studijama u Indiji 15,3% (Kumari i sar., 2020), Etiopiji 17,6% (Tassew i sar., 2017) i Poljskoj 20% (Burmańczuk i sar., 2016). U studiji u SAD utvrđen je procenat rezistencije na kloksacilin od 29%, što je ujedno bio i najveći procenat rezistencije u odnosu na druge ispitivane antibiotike (Haran i sar., 2012). Relativno visok procenat rezistencije na kloksacilin u našoj studiji verovatno je posledica veće upotrebe ovog antibiotika u terapiji mastitisa na našem epizootiološkom području i primene u zasušenju preparata sa kloksacilinom. Na većini farmi u zasušenju su primenjivani preparati sa ampicilinom i kloksacilinom.

Ukupno 40 izolata (14%) u našem istraživanju bilo je rezistentno na kombinaciju amoksicilina sa klavulanskom kiselinom. Sličan procenat izolata rezistentnih na kombinaciju amoksicilina i klavulanska kiseline (13,3%) u Srbiji utvrdio je Zdravković (2016). U ostalim istraživanjima utvrđeni su različiti procenti rezistencije na amoksicilin sa klavulanskom kiselinom. U Belgiji je utvrđena prevalencija 2,1% rezistentnih izolata (Naranjo-Lucena i Slowey, 2022), u Slovačkoj 5,26% (Idriss i sar., 2014), u Engleskoj i Velsu 7,1% (Naranjo-Lucena i Slowey, 2022), u Hrvatskoj 8,6% (Naranjo-Lucena i Slowey, 2022), u Italiji 12,3% (Intorre i sar., 2013), u Kini 19,6% (Zhang i sar., 2020), u Indiji 21% (Greeshma i sar., 2022), u Pakistanu 30,2% (Abdeen i sar., 2021) i u Etiopiji 35,7% (Mekuria i sar., 2013). Generalno za terapiju *S.aureus*-a koji proizvode β - laktamazu preporučuje se upotreba amoksicilina sa klavulanskom kiselinom (Monistero i sar., 2020).

U terapiji stafilokoknog mastitisa koriste se i cefalosporini i to najčešće prve klase. U našem istraživanju samo 31 izolat (10,9%) je bio rezistentan na cefaleksin, što je slično sa rezultatima dobijenim u drugom istraživanju u Srbiji, gde je dokazana rezistencija na cefaleksin kod 8% izolata (Zdravković, 2016). U studiji u Indiji je dokazana rezistencija na cefaleksin od 20,7% (Singh i sar., 2018) i u Kini od 35,7% (Zhang i sar., 2020). U istraživanjima u svetu više se koristi ispitivanje osetljivost na cefalotin (prva grupa cefalosporina). U istraživanjima u SAD dokazana je rezistencija na cefalotin 1% (Haran i sar., 2012), u Italiji prosečno 8% za period od 2005. do

2011. godine, s tim da je procenat rezistencije u tom periodu rastao od 2,4% do 16,4% (Intorre i sar., 2013).

Cefalosporini treće generacije retko se koriste u terapiji stafilokoknih mastitisa. Na našem epizootiološkom području se koriste kada su uzročnici rezistentni na druga antimikrobna sredstva. Najčešće se koristi ceftriakson aplikovan intravenski. Postoje studije koje dokazuju da je jedna doza ceftriaksona aplikovana intravenski dovoljna za izlečenje stafilokoknog mastitisa kod krava (Buragohain i Sar, 2018). U našem istraživanju samo 25 izolata (8,8%) je bilo rezistentno na ceftriakson. Manji procenat izolata *S. aureus*, rezistentnih na ceftriakson (4,2%), utvrđen je u Nepal (Tiwari i sar., 2022), a veći procenat izolata *S. aureus*, rezistentnih na ceftriakson utvrđen je u Nigeriji kod 19,3% izolata (Ahmad i sar., 2022) i u Indiji kod 30,8% izolata (Chandrasekaran i sar., 2014). Rezistencija na ceftiofur (treća generacija cefalosporina) *S. aureus* izolovanog u slučajevima mastitisa krava dokazana je u Kanadi kod 0,3% izolata (Saini i sar., 2012), u SAD kod 1% (Haran i sar., 2012), u Slovačkoj 5,26% (Idriss i sar., 2014), dok je u Ukrajini dokazana rezistencija kod 41,5% izolata (Elias i sar., 2020).

Aminoglikozidni antibiotici kao što su gentamicin i neomicin koriste se u terapiji mastitisa u kombinaciji sa drugim antibioticima (penicilinom, streptomycinom, polimiksinom B, linkomicinom). U našem istraživanju kod 122 izolata (42,8%) dokazana je rezistencija na neomicin, a kod 77 izolata (27,0%) na gentamicin. Zdravković (2016) je utvrdio rezistenciju na neomicin kod 5,3 % izolata *S. aureus*. Manji procenat izolata *S. aureus* rezistentnih na neomicin utvrđen je u Francuskoj od 2% (Naranjo-Lucena i Slowey, 2022), u Litvaniji od 5,3% (Hendriksen i sar., 2008), i u Slovačkoj od 21,5% (Naranjo-Lucena i Slowey, 2022). Manji procenat izolata rezistentnih na gentamicin utvrđen je u Nemačkoj od 10,7% (Naranjo-Lucena i Slowey, 2022), Ukrajini od 16,9% (Elias i sar., 2020) i u Srbiji od 22,2% (Rajić-Savić, 2014). Veći procenat izolata *S. aureus* na gentamicin od 43,5% utvrđen je u Egiptu (Ma i sar., 2018) i od 53,8% u Kini (Zhang i sar., 2022). Ispitujući efikasnost antimikrobnih sredstava u lečenju mastitisa krava izazvanih *S. aureus*, Vakanjac i saradnici (2013) su utvrdili da lek koji sadrži kombinaciju neomicina sa polimiksinom B nije efikasan u lečenju mastitisa, a da je lek koji sadrži neomicin, penicilin i streptomycin efikasniji u lečenju te vrste mastitisa. Relativno veći procenat rezistencije na neomicin i gentamicin utvrđen u našem istraživanju je verovatno posledica veće upotrebe ovih antibiotika u terapiji mastitisa i drugih oboljenja kod krava na našem epizootiološkom području.

U našem istraživanju 42 izolata (14,7%) bilo je rezistentno na tetraciklin, što je slično sa rezultatima dobijenim u Slovačkoj gde je dokazana rezistencija kod 10,8% izolata (Naranjo-Lucena i Slowey, 2022) i studiji u SAD gde je dokazano 16% rezistentnih izolata *S. aureus* (Haran i sar., 2012). Veći procenat izolata *S. aureus* rezistentnih na tetraciklin od 21,4% utvrđen je u Ukrajini (Elias i sar., 2020), u Italiji od 25,1% (Intorre i sar., 2013), u Kini od 33,9% (Zhang i sar., 2020), u Turskoj od 34,9% (Kenar i sar., 2017), u Pakistanu od 53,5% (Abdeen i sar., 2021) i u Etiopiji od 73,8% (Mekuria i sar., 2013). Visok procenat rezistencije na tetraciklin u Etiopiji je posledica velike upotrebe ovog antibiotika u lečenju krava, kao i upotrebe u promociji rasta životinja (Mekuria i sar., 2013).

U našem istraživanju 36 izolata (12,6%) bilo je rezistentno na linkomicin. U druga dva istraživanja izvedena u Srbiji utvrđena je rezistencija kod 4,4% izolata (Zdravković, 2016) i kod 25 % izolata koji potiču sa farme sa niskom prevalencijom stafilokoknih mastitisa (Rajić-Savić, 2014). Sličan našem istraživanju utvrđen je procenat izolata *S.aureus* rezistentnih na linkomicin u Kini (10,8%, Ren i sar., 2020) i Slovačkoj (13,6%, Idriss i sar., 2014). Za razliku od rezultata dobijenih u našem istraživanju veći procenat izolata rezistentnih na linkomicin utvrđen je u Hrvatskoj (31,4%, Naranjo-Lucena i Slowey, 2022) i u Italiji (86,5%, Intorre i sar., 2013).

Sojevi *S. aureus* izolovani u našim ispitivanjima mastitisa krava bili su najosetljiviji na sulfametoksazol-trimetoprim, samo 14 izolata (4,9%) bilo je rezistentno na ovaj lek. Čak 10 MRSA izolata iz našeg istraživanja bilo je osetljivo na sulfametoksazol-trimetoprim. Sličan procenat izolata osetljivih na sulfametoksazol-trimetoprim (0 do 3,4%) utvrđen je istraživanjima sprovedenim u Belgiji, Finskoj, Francuskoj, Italiji, Irskoj, Norveškoj, Portugalu i Švedskoj (Naranjo-Lucena i Slowey, 2022). Za razliku od rezultata dobijenih u našim istraživanjima veći procenat izolata *S. aureus* rezistentnih na sulfametoksazol-trimetoprim je utvrđen Hrvatskoj (45,7%, Naranjo-Lucena i Slowey, 2022) i u Turskoj (62,7%, Kenar i sar., 2017). U Kini je utvrđeno da je 100% izolata *S. aureus* rezistentno na sulfametoksazol (Wang i sar., 2016, Zhang i sar., 2020). Manji procenat izolata rezistentnih na sulfametoksazol utvrđen je u Danskoj (28,6%), međutim, svi izolati su bili osetljivi na kombinaciju sulfametoksazol-trimetoprim (Naranjo-Lucena i Slowey, 2022). Ovi rezultati navode na zaključak da je sulfametoksazol delotvorniji u terapiji kada se primenjuje zajedno sa trimetoprimom.

Oksacilin i cefoksitin se ne koriste na našem epizootiološkom području za terapiju mastitisa. Ispitivanje osetljivosti na ova dva antibiotika rađeno je u svrhu ispitivanje prisustva MRSA sojeva, a za potvrdu MRSA sojeva smo koristili dokazivanje *mecA* i *mecC* gena. Ukupno 22 izolata (7,7%) su bila rezistentna na oksacilin i cefoksitin. Svi ovi izolati su bili multirezistentni, od kojih je 10 bilo rezistentno na svih 12 ispitujućih antimikrobnih sredstava. Kao što je već navedeno 10 MRSA izolata je bilo je osetljivo na sulfametoksazol- trimetoprim. Ukupno 8 MRSA izolata je bilo osetljivo na gentamicin i 3 na tetraciklin.

Iako je oko polovine izolata u našoj studiji rezistentno na 3 ili više antimikrobnih sredstava, ipak postoji širok spektar antimikrobnih sredstava koja se mogu koristiti u terapiji stafilokoknog mastitisa. Pošto je utvrđen visok procenat rezistencije na penicilin, ampicilin i kloksacilin, ove antibiotike ne treba koristiti pri nasumičnom izboru antibiotika za lečenje stafilokoknog mastitisa, odnosno pre provere osetljivosti izolata na njih. U ovoj studiji većina izolata stafilokoka se odlikovala senzitivnošću na sulfametoksazol-trimetoprim, što ukazuje da ova kombinacija predstavlja prvi izbor antimikrobnog leka u terapiji mastitisa. Pored odabira najboljeg leka za terapiju mastitisa, ispitivanje osetljivosti uzročnika na antimikrobna sredstva bitno je i za praćenje širenja rezistentnih sojeva. Često nepravilna i dugotrajna primena antimikrobnih sredstava na nekom području vremenom dovodi do razvoja rezistencije na taj antibiotik.

U Srbiji postoji malo podataka o prisustvu i osobinama genotipova *S. aureus* kao uzročnika mastitisa kod krava. Ovaj rad omogućava poređenje genotipova prisutnih u svetu i u Srbiji. Takođe omogućava bolje razumevanje patogeneze, rezervoara i puteva prenošenja uzročnika.

U našoj studiji pronađeno je više RS-PCR genotipova, međutim, najzastupljeniji su bili genotipovi GTD (28,1%), GTR (24,2%), GTQ (5,6%) i GTF (5,3%). U 12 evropskih država najzastupljeniji su bili genotipovi GTB, GTC, GTF i GTR (Cosandey i sar., 2016). U Švajcarskoj i Italiji najzastupljeniji su genotipovi koji pripadaju genotipu CLB (Cosandey i sar., 2016). Genotip GTB je najkontagiozniji i na farmama gde je prisutan izaziva visoku prevalenciju mastitisa u stadu (Fournier i sar., 2008; Graber i sar., 2009; Cosandey i sar., 2016). U našoj studiji nije detektovan ni jedan izolat koji pripada genotipu GTB.

S. aureus GTD nije opisan kao značajan uzročnik mastitisa, jedino je detektovan u malom procentu u Švajcarskoj (Fournier i sar., 2008; Cosandey i sar., 2016). U našoj studiji GTD i njegova novootkrivena varijanta GTD^I su jedni od najzastupljenijih genotipova. Od kliničkog je značaja da su navedeni genotipovi otkriveni na malim porodičnim farmama sa manje od 20 krava i srednjim farmama od 20 do 50 krava. Naši podaci ukazuju da je genotip GTD prisutan na teritoriji Srbije i da predstavlja značajnog uzročnika mastitisa kod goveda. Podaci o rasprostranjenosti i osobinama genotipa GTD do sada nisu opisani u stručnim radovima.

Genotipovi koji pripadaju CLR generalno su prisutni i u Evropi (Austrija, Belgija, Francuska, Nemačka, Slovenija, Severna Makedonija, Norveška, Švedska, Švajcarska) (Cosandey i sar., 2016) i na ostalim kontinentima (Argentina, Kolumbija, SAD - država Nju Jork, Južna Afrika, Tunis) (Monistero i sar., 2018). Klaster R je najdivergentniji genetski klaster (Cosandey i sar., 2016), u kojem je do sada opisano 13 varijanti (Monistero i sar., 2018). U našoj studiji otkriven je GTR i njegove 4 varijante GTR^I, GTR^{VI}, GTR^{VII} i GTR^X. Posebno važna za našu studiju je varijanta GTR^{VI} čija je ukupna prevalencija unutar malih i srednjih farmi iznosila 21,6% i 34%, respektivno. Ova visoka prevalencija mastitisa izazvana GTR^{VI} je u skladu sa nalazom Cremonesi i saradnika (2015). U njihovom istraživanju prevalencija mastitisa u stadu gde je uzročnik *S. aureus* genotip GTR^{VI} bila je na nivou 43%. Drugi istraživači koji su detektovali GTR^{VI} nisu opisivali prevalenciju u stadu, jer im to nije bio cilj studije (Ben Said i sar., 2016; Monistero i sar., 2018).

Genotipovi CLF detektovani su u Austriji, Belgiji, Francuskoj, Nemačkoj, Irskoj, Italiji, Švedskoj, Švajcarskoj (Cosandey i sar., 2016) i Tunisu (Ben Said i sar., 2016). U našoj studiji 20 izolata pripadalo je genotipovima CLF. Na farmama gde su detektovani prevalencija mastitisa je bila niska. Genotipovi GTR i GTF su detektovani u našoj studiji ali i u mnogim delovima sveta, što sugerše da su se ovi genotipovi prisutni globalno (Cosandey i sar., 2016).

Genotip GTQ nije opisan u naučnoj literaturi, dok je u našoj studiji detektovan kod 16 izolata. Na farmama gde je detektovan ovaj genotip prevalencija mastitisa je bila niska.

Genotip GTC koji je prisutan u većini Evropskih država (Cosandey i sar., 2016) i Nju Jorku (Monistero i sar., 2018). U našem istraživanju dati genotip detektovan je u malom procentu. Zanimljivo je da su data dva GTC izolata poticali sa iste velike farme, na kojoj krave vode poreklo iz jedne Evropske države.

Genotip GTS, i varijante GTS^I i GTS^{III} otkriveni su u našoj studiji. Ranije ovaj genotip GTS izolovan je iz mleka krava sa mastitisom u Nemačkoj (Cosandey i sar., 2016), Italiji (Monistero i sar., 2018; Gazzola i sar., 2020), Brazilu (Monistero i sar., 2018), Tunisu (Ben Said i sar., 2011) i Švajcarskoj (Leuenberger i sar., 2019). Leuenberger i saradnici (2019) navode da je genotip GTS često prisutan kod ljudi i svinja, a može se izolovati i iz mleka krava.

Pojedini genotipovi mogu da pređu sa čoveka na krave kao što je potvrđeno za GTS (Boss i sar., 2016). Leuenberger i saradnici (2019) dokazali da je moguć direktan prenos *S. aureus* genotipa GTS između svinja, čoveka i krava. Ovaj genotip često nosi *mecA* gen (Cremonesi i sar., 2015; Gazzola i sar., 2020; Monistero i sar., 2018, Thiran i sar., 2018). U našoj studiji u CLS, *mecA* gen je detektovan kod GTS i GTS^{III}, dok kod GTS^I nije. Sa epidemiološkog gledišta genotipovi koji nose *mecA* gen predstavljaju ozbiljnu pretnju za ljude i životinje (Leuenberger i sar., 2019). U našoj studiji *mecA* geni dokazani su pored GTS i GTS^{III} i kod GTR, GTR^{VII}, GTAS, GTAS^I i GTCF. Za sojeve *S. aureus* izolovane u slučajevima mastitisa krava kod kojih je dokazano prisustvo *mecA* gena potrebna su dodatna ispitivanja kojima bi se utvrdilo poreklo genotipova.

Genotip GTAS je dokazan u Nemačkoj (Cosandey i sar., 2016), a u našim ispitivanjima je pored genotipa GTAS dokazano i prisustvo novootkrivene varijante GTAS^I. Ovi genotipovi su bili rezistentni na sve antibiotike koji se koriste za suzbijanje mastitisa kod krava. Navedeni genotipovi su poticali sa malih porodičnih farmi i ujedno su bili i MRSA sojevi. U našem ispitivanju otkrivena je viša prevalencija mastitisa u zaptima gde je utvrđeno prisustvo genotipa GTAS u odnosu na farme sa prisutnim drugim genotipovima *S. aureus* sa *mecA* genom. Kod ostalih genotipova (GTS i GTS^{III}, GTR, GTR^{VII} i GTCF) prevalencija mastitisa u stadu je bila sasvim niska, uzimajući u obzir veličinu farme.

Genotipovi koji su dokazani u malom procentu u našim ispitivanjima, dokazani su i u drugim državama. Genotipovi GTM i GTP dokazani su u Švajcarskoj (Fournier i sar., 2008). Genotip GTAO^{II} dokazan je u Kolumbiji (Monistero i sar., 2018) i u Italiji (Gazzola i sar., 2020). Genotip GTAX je dokazan u Austriji (Cosandey i sar., 2016). Genotip GTBI dokazan je u Italiji (Gazzola i sar., 2020). Genotip GTBS je dokazan u Švajcarskoj (Leuenberger i sar., 2019), a GTBS^{II} u Italiji (Thiran i sar., 2018). Genotip GTCB detektovan je samo u Tunisu (Ben Said i sar., 2016, Monistero i sar., 2018). GTCD i GTCH nisu nigde opisani.

U našoj studiji je otkriveno je ukupno 15 novih genotipova (GTCL, GTCM, GTCN, GTCO, GTCP, GTCQ, GTCR, GTCs, GTCT, GTCU, GTCY, GTCX, GTCZ, GTDA) i 5 varijanti (GTD^I, GTAF^{II}, GTAS^I, GTCL^I, GTCY^I). Novi genotipovi su otkriveni većinom na malim i na 8 srednjih farmi. Veliki broj novih genotipova i varijanti otkrivenih u našoj studiji mogu da znače da su kod mastitisa krava u Mačvanskom i Kolubarskom okrugu prisutni genotipovi koji su lokalno evoluirali. Tu hipotezu je svakako potrebno dodatno ispitati. Velika većina malih farmi sa kojih su uzimani uzorci za ispitivanje su male porodične farme sa sopstvenom proizvodnjom priplodnih krava. Retko se krave i priplodne junice kupuju i uvoze sa udaljenih lokacija. Takođe, u nekim slučajevima se u istoj štali drže i druge životinjske vrste. Lečenju supkliničkih i kliničkih mastitisa često se pristupa bez predhodnog ispitivanja sekreta vimena, utvrđivanja uzročnika mastitisa i antibiograma.

Često samo lečenje mastitisa ne sprovodi se sa adekvatnim antibiotikom niti u dovoljno dugom vremenskom periodu. Svi navedeni faktori mogu da utiču na evoluciju lokalnih *S. aureus* sojeva.

Farme krava mogu da se posmatraju kao zasebne epizootiološke jedinice (Burmańczuk i sar., 2016; Rainard i sar., 2018), i u principu, sprečavanje širenje uzročnika između stada ne bi trebalo da predstavlja veliki problem. Do širenja uzročnika uglavnom dolazi uvođenjem zaražene životinje u stado. Mastitis izazvan stafilokokama uspešno se kontroliše izlučivanjem iz stada hronično obolelih životinja, a samim tim i sprečavanjem pojave novih infekcija. Po mnogim autorima prevalencija mastitisa, izazvanih *S. aureus*, u direktnoj je korelaciji sa nivoom higijene muže i kreće se od 2% do preko 50% (Pavlak i sar., 2008; Cvetnić i sar., 2016; Wang i sar., 2022). Međutim, Voelk i saradnici (2014) izneli su mišljenje da virulentnost soja može igrati glavnu ulogu u širenju uzročnika u stadu. Takođe, Sommerhauser i saradnici (2003), proučavajući razlike u efikasnosti mera kontrole i suzbijanja mastitisa, zaključili su da kontrola mastitisa može više da zavisi od soja odnosno genotipa bakterija nego od menadžmenta na samoj farmi (Sommerhauser i sar., 2003). Oni navode da je na četiri od sedam proučavanih farmi prevalencija mastitisa izazvanih *S. aureus*-a iznosila 24-27%, sa dominantnim PFGE pulsotipom, dok je prevalencija mastitisa na tri preostale farme bila niža i iznosila je 4-12%, sa drugim PFGE pulsotipovima (Sommerhauser i sar., 2003). Maisano i saradnici (2023) zaključili su da nesumnjivo određeni genotip *S. aureus*-a utiče na prevalenciju mastitisa na farmi, dok faktori životne sredine u objektu i menadžment muže nemaju nikakav ili imaju minimalan uticaj na prevalenciju stafilokoknog mastitisa.

U našem ispitivanju farme sa kojih su izolovane koagulaza pozitivne stafilokoke imale su dobru higijenu na farmi i higijenu muže. Na farmama sa lošijom higijenom, kao uzročnici mastitisa, najčešće su izolovani *E. coli* i *Streptococcus uberis*. Na farmama gde su izolovane koagulaza pozitivne stafilokoke nije utvrđeno prisustvo *S. agalactiae* kao uzročnika mastitisa, koji se može posmatrati kao indikatorski mikroorganizam loše higijene i menadžmenta muže. U Norveškoj i Finskoj implementacijom strategije kontrole zaraznih mastitisa na farmama smanjili su prevalenciju *S. agalactiae*, dok je prevalencija *S. aureus* ostala visoka (Østeras i sar., 2006; Koivula i sar., 2007). Sve navedeno dovodi nas do zaključka da u nastajanju i širenju stafilokoknog mastitisa u našem istraživanju najviše su doprinele osobine uzročnika, odnosno određeni genotip.

Određeni *S. aureus* genotipovi kontagiozniji su i brže se prenose kroz stado, dok su drugi manje kontagiozni i obično se ne šire dalje od jedne krave (Leuenberger i sar., 2019). Ispitivanjem i poznavanjem osobina genotipova može se pratiti njihovo širenje u stadu, otkrivanje rezervoara i puteva prenošenja, kao i potencijal prenošenja na ljude. U našoj studiji na svakoj pojedinačnoj farmi izolovan je po jedan *S. aureus* genotip. I u drugim studijama je dokazano da u stadu obično perzistira ograničeni broj genotipova sa određenim osobinama kontagioznosti i patogenosti (Boss i sar., 2016; Fournier i sar., 2008; Graber, 2016). Može se zaključiti da na našoj teritoriji trenutno ne postoji GTB, ali probleme sa visokom prevalencijom mastitisa u stadima prave genotipovi GTD, GTD^I i GTR^{VI}.

Ako izuzmemo pojavu MRSA sojeva, i pošto smo u našem istraživanju ustanovili da genotipovi *S. aureus*-a većinom nisu multirezistentni, dolazimo do zaključka da su za patogenezu mastitisa, uspešno izbegavanje mehanizama imunološke odbrane domaćina, perzistentnost infekcije i neuspešno lečenje antimikrobnim sredstvima odgovorni prevashodno faktori virulencije uzročnika. Razlike u kontagioznosti genotipa kao i ishodu zapaljenja mlečne žlezde mogu biti povezane sa odsustvom ili prisustvom faktora virulencije *S. aureus*- a kao i pojavi njihovih različitih kombinacija (Magro i sar., 2017).

U našoj studiji ispitano je prisustvo 23 gena koja kodiraju značajne faktore virulencije, a njihova relativna učestalost prikazana je u tabeli 5.4.3.1.

Adhezini se smatraju najvažnijim faktorima virulencije tokom ranih faza infekcije *S. aureus*. U ovoj studiji u visokom procentu su detektovani geni koji kodiraju MSCRAMM. Adhezija i invazija ćelija mlečne žlezde uglavnom je započeta vezivanjem fibronektin-vezujućeg proteina (FnBPA) za fibronektin ćelija domaćina (Lammers i sar., 1999). Naši rezultati pokazuju visoku prevalenciju *fnbA* gena (97,54%) (tabela 5.11), što je u skladu sa rezultatima drugih studija gde je otkrivena prevalencija 88,3% (Ote i sar., 2011), 96,64% (Zhang i sar., 2022), 94,3% (Wang i sar., 2016), 93,5% (Acosta i sar., 2018) i 84,2% (Zuniga i sar., 2015). Studija Ren i saradnika (2020) otkrila je prevalencu *fnbA* kod 32,3% izolata. Visoka prevalencija *fnbA* gena ukazuje na važnost ovog adhezina u patogenezi mastitisa.

Izolati *S. aureus* iz mleka krava u slučajevima supkliničkih mastitisa stvaraju i druge MSCRAMM, a jedan od njih je i klamping faktor A (ClfA), koji predstavlja fibrinogen- vezujući protein. Ovaj protein ima nekoliko definisanih uloga u kolonizaciji i patogenezi (Foster i sar., 2014). U našoj studiji dokazana je visoka prevalencija *clfA* gena (88,42%) (tabela 5.4.3.1.). Slični rezultati dobijeni su u drugim ispitivanjima gde je prevalencija *clfA* gena bila 96,9% (Ote i sar., 2011), 87% (Naushad i sar., 2020), 100% (Ben Said i sar., 2016), 97,99% (Zhang i sar., 2022), 100% (Ren i sar., 2020). Manja prevalencija *clfA* gena utvrđena je u ispitivanjima izvedenim u državi Nju Jork (53%) i Južnoj Africi (63,7%) (Monistero i sar., 2018) i Holandiji (21%) (Ikawaty i sar., 2010). Izolati koji pripadaju novim genotipovima i njihovim varijantama su imali značajno nižu frekvenciju *clfA* gena, tako da su neophodna dalja istraživanja kako bi se utvrdio adhezivni potencijal specifičnih genotipova *S. aureusa*.

Kolagen vezujući protein (CNA) ima važnu ulogu u adheziji bakterija za tkivo mlečne žlezde. S obzirom da je kolagen veoma rasprostranjen u tkivu vimena, ekspresija gena *cna* važna je za adheziju *S. aureus* za epitelne ćelije mlečne žlezde krava. U našim ispitivanjima utvrđena je prevalencija *cna* gena kod 85,26% izolata (tabela 5.4.3.1). Postoje značajne varijacije u prevalenciji *cna* gena uočene među izolatima *S. aureus* poreklom iz mleka krava sa mastitisima. Prisustvo *cna* gena je dokazano kod svih ispitanih izolata u Tunisu, Brazilu, Nemačkoj, Italiji, Južnoj Africi i Kini (Ben Said i sar., 2016; Monistero i sar., 2018; Ren i sar., 2020). Niža prevalencija *cna* gena u odnosu na naše rezultate dokazana je u studijama u Italiji od 32,14% (Zecconi i sar., 2006), u Belgiji od 31,9% (Ote i sar., 2011), u Argentini od 20% (Pereyra i sar., 2016) i u Holandiji od 18% (Ikawaty i sar., 2010).

Gen *efb* kodira ekstracelularni protein koji vezuje fibrinogen (EFB). EFB blokira opsonizaciju tako što se vezuje za C3 faktor komplementa i blokira taloženje na površini bakterijske ćelije (Lee i sar., 2004). Takođe u interakciji sa fibrinogenom formira štit oko bakterije koji ima antifagocitnu ulogu (Ko i sar., 2016). U našoj studiji *efb* gen dokazan je u 44,21% (tabela 5.4.3.1). Slična prevalencija *efb* gena od 42,8% i 68,4% utvrđena je u Rusiji i u Brazilu (Zuniga i sar., 2015; Fursova i sar., 2020). U studijama u Italiji i Holandiji prisustvo *efb* gena dokazano je kod svih izolata (Zecconi i sar., 2006; Ikawaty i sar., 2010), a visoke prevalencije od 90% i 95% dokazane u studijama u Argentini i Kanadi (Pereyra i sar., 2016; Naushad i sar., 2020).

Protein A je prvi identifikovan površinski protein *S. aureus* koji je vezan za ćelijski zid (Sjödahl., 1977). Protein A u infekciji ima antifagocitnu ulogu (Foster, 2005). On sa četiri ili pet domena vezuje Fc fragmente imunoglobulina G (IgG) (Uhlen i sar., 1984). Posledica ove interakcije je obložena bakterijska ćelija sa IgG u pogrešnoj orijentaciji, tako da neutrofili ne mogu da prepoznaju Fc fragmente IgG i izvrše fagocitozu (Foster, 2005). Gen *spa*, koji kodira sintezu protein A, u našoj studiji otkriven je kod svih izolata (tabela 5.4.3.1.). Naši rezultati o prisustvu *spa* gena u skladu su sa rezultatima Zecconi i saradnika (2006), gde je takođe *spa* gen otkriven kod svih izolata, a razlikuju se od rezultata Ote i saradnika (2011) gde je *spa* otkriven kod 85,6% izolata.

Biofilm pomaže bakterijama da prežive u neprijateljskom okruženju unutar mlečne žlezde (Costerton i sar., 1999). Sposobnost formiranja biofilma važan je faktor virulencije koji omogućava perzistenciju bakterija i povećava toleranciju na antibiotike, što posledično dovodi do upornih mastitisa kod krava (Fox i sar., 2005; Melchior i sar., 2006; Grunert i sar., 2018). Formiranje biofilma počinje adhezijom bakterija za ekstracelularni matriks u kojoj najčešće učestvuju ClfA, ClfB, FnbA i FnbB (Speziale i sar., 2014), što je još jedna uloga površinskih faktora virulencije. Nakon adhezije bakterije se umnožavaju i počinju da luče polisaharidne intercelularne adhezine (PIA), glavne komponente biofilma koje su kodirane *ica* operonom (Cramton i sar., 1999; Arciola i sar., 2015). Kod 94,04% izolata u našoj studiji otkriven je *icaA* gen, a kod 92,98% izolata *icaD* gen (tabela 5.4.3.1). U studiji u Belgiji *icaA* gen je dokazan kod 86,9% izolata poreklom iz mleka krava sa mastitisom (Ote i sar., 2011). U studiji u Izraelu i Rusiji dokazani su i *icaA* i *icaD* geni kod svih izolata (Bar-Gal i sar., 2015; Fursova i sar., 2020). U studiji u Kanadi *icaA* gen dokazan je kod svih izolata, a *icaD* kod 99% (Naushad i sar., 2020). U studiji u Argentini *icaA* je dokazan kod 95% izolata, a *icaD* kod svih izolata (Pereyra i sar., 2016). Ranija studija iz Srbije dokazala je prisustvo *icaA* gena kod 25% izolata i *icaD* gena kod 65,9% izolata (Suvajdžić i sar., 2017). U studiji Dhanawade i saradnika (2010), dokazano je prisustvo *icaA* i *icaD* gena kod 35,29% izolata.

U ovoj studiji ni u jednom izolatu nije otkriven *bap* gen (tabela 5.4.3.1.). U studiji Cucarella i saradnika (2004) *bap* je opisan kao faktor virulencije. *Bap*-pozitivni sojevi mogu izgubiti sposobnost formiranja biofilma u mleku, verovatno zbog stabilizacije *bap* gena u prisustvu kalcijuma (Snel i sar., 2015). Pri nižim koncentracijama kalcijuma, *bap* se cepa u fragmente koji formiraju amiloidna vlakna dajući osnovu za formiranje biofilma (Taglialegna i sar., 2016). Ovo ukazuje da *bap* ima ulogu u formiranju biofilma i perzistenciji *S. aureus* u vimenu krava tokom perioda zasušenja, kada je koncentracija kalcijuma u vimenu mala. Pereyra i saradnici (2016)

takođe nisu dokazali ni jedan izolat sa *bap* genom. Gen *bap* dokazan je u studijama Cucarella i saradnika (2004) sa prevalencijom od 25,6%, Zuniga i saradnika (2015) sa prevalencijom od 15,8% i Naushadi i saradnika (2020) sa prevalencijom 1,7%. Pošto ni u jednom izolatu nije otkriven *bap* gen, a *icaA* i *icaD* geni su otkriveni u visokom procentu, zaključujemo da na stvaranje biofilma od strane *S. aureus* u ovoj studiji utiču samo *ica* geni.

Većina kliničkih izolata *S. aureus* sadrži tanak mikrokapsularni sloj koji se sastoji od kapsularnih polisaharida tipa 5 ili tipa 8 (Hochkeppel i sar., 1987). Kapsula kod *S. aureus* ima antifagocitnu ulogu jer smanjuje opsonizaciju (Nilsson i sar., 1997). Kod svih izolata u našoj studiji detektovani su geni za kapsularne polisaharide (tabela 5.4.3.1). Gen *cap5* dokazan je kod 38,25% izolata, *cap8* kod 61,75%. U studiji Ikawaty i saradnika (2010) *cap5* je dokazan u 96,05 %, a *cap8* u 3,95 % izolata. Slične rezultate objavljeni su i u studiji Acosta i saradnika (2018) gde je *cap5* dokazan u 81,3%, a *cap8* u 6,5% izolata. U studiji Bar-Gal i saradnika (2015) *cap5* je dokazan kod 54%, a *cap8* kod 44% izolata, dok je u studiji Zhang i saradnika (2022) *cap5* dokazan kod 35,57%, a *cap8* u 57,38% izolata.

Stafilokokni enterotoksini (SE), zajedno sa toksinom toksičnog šoka (TSST) deluju kao superantigeni, stimulišući T-limfocite koji oslobađaju velike količine citokina koji mogu izazvati tešku upalu mlečne žlezde (Tollersrud i sar., 2006; Wang i sar., 2018; Fang i sar., 2019). Pretpostavlja se da enterotoksini stvaraju pogodno okruženje za kolonizaciju bakterija (Piccinini i sar., 2010). Mlečna žlezda krava zaražena sa enterotoksogenim stafilokokama postaje izvor enterotoksina u mleku što može dovesti do intoksikacija kod ljudi (Zschöck i sar., 2005). Enterotoksini su stabilni na visokoj temperaturi i zadržavaju svoju biološku aktivnost u mleku i proizvodima od mleka i posle pasterizacije (Hennekinne i sar., 2012). Ukupno je do sada opisano više od 27 serotipova SE (Lefebvre i sar., 2022). Geni koji kodiraju različite SE nalaze se i šire različitim mobilnim genetičkim elementima (Hennekinne i sar., 2012). U nedavnom istraživanju primenom sekvencioniranja celog genoma (WGS), utvrđeno je da sojevi koagulaza pozitivnih stafilokoka mogu da sadrže između 1 i 11 gena koji kodiraju SE (Lefebvre i sar., 2022).

Samo kod 6,7% izolata u našoj studiji nije dokazano prisustvo SE. Najčešće dokazani geni za SE su *sed* i *sei* (57,19% za *sed* i 47,72% za *sei*) (tabela 5.4.3.1). Visoka prevalencija *sed* gena od 62% dokazana je i u studiji Zecconi i saradnika (2006). U studiji u Argentini, državi Nju Jork i Italiji kod kliničkih izolata *sed* je dokazan u prevalenciji od 37,5%, 70,6% i 82,3 % (Monisteno i sar., 2018). Visoke prevalencije *sei* gena dokazane su i u studijama Zecconi i saradnika 100% (2006), Ikawaty i saradnika 80% (2010), Bar-Gal i saradnika 41% (2015), Ote i saradnika 36,2% (2011), Naushad i saradnika 36% (2020), kao i Zschock i saradnika 36% (2005). Visoke prevalencije *seg* gena dokazane su u studijama Ikawaty i saradnika 78% (2010), Naushad i saradnika 41% (2020), Ote i saradnika 38% (2011) i Bar-Gal i saradnika 35% (2015). Gen *sea* je dokazan u rasponu od 47,1% do 90,9%, u izolatima iz kliničkih mastitisa u sedam od osam država (sem Tunisa) gde je sprovedena studija (Monisteno i sar., 2018). Slične rezultate dobijenim u našoj studiji za *sea* gen dobili su Ote i saradnici 5,2% (2011), Acosta i saradnici 6,67% (2018) i Ben Said i saradnici 9,3% (2016). Izolati CLOG klastera novootkrivenih genotipova su jedini bili nosioci *sej* i *sep* gena, kao i u većem procentu *sea*, *seb* i *sec* gena. Sve ovo ukazuje na različiti obrazac prisustva određenih gena kod specifičnih genotipova, i posledično različite forme kolonizacije i moguće transmisije.

Panton-Valentin leukocidin (PVL) igra važnu ulogu u izazivanju nekroze tkiva i u uništavanju leukocitnih ćelija domaćina (Alonzo i Torres, 2014). U ovoj studiji ukupno kod 29 izolata (10,18%) detektovan je *pvl* gen (tabela 5.4.3.1.). Od ukupnog broja *pvl* pozitivnih izolata 10 (34,5 %) izolata su bili MRSA sojevi. Slične rezultate našoj studiji (prevalencija od 14,8%) dobili su Liu i saradnici (2017). Zecconi i saradnici (2006) su utvrdili još veću (56%) prevalenciju *pvl* gena. U izolatima koji potiču iz mleka sa kliničkim mastitisom u Brazilu, Argentini i Kolumbiji dokazana je visoka prevalencija *pvl* (100%; 81,2%; 67,7%) pojedinačno (Monisteno i sar., 2018). U istoj studiji u uzoracima koji potiču iz Italije i Nemačke nije detektovan ni jedan *pvl* gen.

S. aureus je dobro poznata bakterija koja razvija rezistenciju prema antibioticima (Chambers i DeLeo, 2009). Pojavom multirezistentnih sojeva, *S. aureus*, posebno MRSA sojeva, zabrinutost za zdravlje ljudi i životinja postala je sve veća (Li i sar., 2015). Za rezistenciju na meticilin odgovoran je *mecA* gen koji se nalazi na mobilnom genetskom elementu poznatom kao stafilokokni kasetni hromozom (SCC, *SCCmec* kada sadrži *mecA* gen) (Holmes i Zadoks, 2015). Gen *mecA* lančano vezuje za sebe i druge gene rezistencije, pa se prenošenjem *mecA* gena između stafilokoka posledično prenose i drugi geni rezistencije (Oliveira i sar., 2000; Ito i sar., 2001; Milheiriço i sar., 2007; Malachowa i DeLeo, 2010; Hiramatsu i sar., 2014). Detekcija *mecA* gena smatra se najpouzdanijom metodom za detekciju MRSA sojeva (Maes i sar., 2002). U našoj studiji, 22 soja (7,72%) bila su pozitivna na *mecA* gen (tabela 5.4.3.1). U više studija širom sveta je otkrivena različita prevalencija MRSA sojeva koji potiču iz mleka krava sa mastitisom. Savić i saradnici (2014) nisu dokazali prisustvo *mecA* gen ni kod jednog izolata u Srbiji, dok su Pajić i saradnici (2016) dokazali *mecA* gen kod 1,3% izolata. Niska prevalencija *mecA* gena u izolatima *S. aureus* uzročnika mastitisa utvrđena je u Švajcarskoj 0,35% (Overesch i sar., 2013), Finskoj 1,5% (Gindonis i sar., 2013), Hrvatskoj 4,2% (Cvetnić i sar., 2021), Brazilu 4,3% (Zuniga i sar., 2015), Mađarskoj 7,5%, (Juhász-Kaszanyitzky i sar., 2007), Indiji 7,9% (Mahanti i sar., 2020), Belgiji 9,3% (Vanderhaeghen i sar., 2010) i u Italiji 9,2% (Luini i sar., 2015). Veća prevalencija *mecA* gena je utvrđena u Turskoj 18,5% (Pehlivanoglu i Yardimci, 2012), Indiji 16,6% (Hamid i sar., 2017) i Kini 15,9% (Wang i sar., 2015) i 14,7% (Yang i sar., 2020).

MRSA sojevi koji su povezani sa životinjama klasifikuju se kao livestock-related MRSA (LA-MRSA) (Crombé i sar., 2013). LA-MRSA se mogu preneti direktnim kontaktom na druge životinje, kao i na ljude koji su profesionalno vezani za krave ili indirektno preko mleka i proizvoda od mleka (Moon i sar., 2007; Spohr i sar., 2011; Paterson i sar., 2012; Lozano i sar., 2016; Tenhagen i sar., 2018). Negativan uticaj LA-MRSA sojeva na proizvodnju mleka i zdravlje krava veoma je važan, posebno kada se uzme u obzir da je lečenje ovih mastitisa komplikovanije. Još važniji je uticaj na javno zdravlje, jer krave mogu predstavljati zoonotski rezervoar za prenos ovih sojeva na ljude (Graveland i sar., 2011; Holmes i Zadoks, 2011; Bardiau i sar., 2013; Cuny i sar., 2013; Schmidt i sar., 2015; Aires-de-Sousa, 2017).

Prenošenje MRSA sojeva sa ljudi na životinje opisano je u više studija (Juhász-Kaszanyitzky i sar., 2007; Boss i sar., 2016). Za utvrđivanje bilo kog smera prenosa LA-MRSA uzročnika, potrebno je izvršiti epidemiološko istraživanje i identifikovati izvor infekcije. Nakon toga treba pristupiti sistemskom rešavanju sprečavanja širenja uzročnika (Paterson i sar., 2012). Poboljšanje biosigurnosnih mera, organizacije i upravljanja farmom, kao i redovna zdravstvena zaštita krava

i ljudi su važni za sprečavanje širenja sojeva LA-MRSA (Paterson i sar., 2012; Effendi i Harijani, 2017).

Povezanost genotipova sa faktorima virulencije prikazano je u tabelama 5.4.4.- 5.4.7. U našim istraživanjima je utvrđeno da su genotipovi u većini slučajeva povezani sa kombinacijama gena koji kodiraju faktore virulencije, što je u skladu i sa rezultatima drugih studija (Fournier i sar., 2008; Graber i sar., 2009; Cosandey i sar., 2016). Svi izolati u okviru genotipova ili genotipskih varijanti imali su iste obrasce gena koji kodiraju MSCRAMM i gene biofilma (tabele 5.4.4 i 5.4.5). Povezanost genotipova i ovih faktora virulencije objašnjava se činjenicom da se geni za MSCRAMM i biofilm nalaze na hromozomu bakterija i značajni su za komesalni način života ovog uzročnika (Cramton i sar., 1999; Cheung i sar., 2021). Geni koji kodiraju rezistenciju na meticilin, PVL i enterotoksine su kod većine izolata u okviru genotipa ili genotipskih varijanti imale iste obrasce, mada je kod pojedinih izolata bilo odstupanja (tabele 5.4.6. i 5.4.7). Ovo se može objasniti činjenicom da su geni za rezistenciju na meticilin, PVL i enterotoksine nalaze na mobilnim genetskim elementima – MGE (Le Loir i sar., 2003; Malachowa i DeLeo, 2010). Gen *sea* prenosi porodica umerenih bakteriofaga čiji se genom inkorporira i replikuje u *S. aureus*-u (Balaban i Rasooli, 2000; Le Loir i sar., 2003). Manja zastupljenost *sea* gena kod genotipova kod kojih se očekuje prisustvo ovog gena, može nastati zbog neravnomerne geografske distribucije bakteriofaga koji prenosi ovaj gen. Imajući u vidu da pojedini sojevi istih genotipova imaju isto poreklo, a različite faktore virulencije može se pretpostaviti da prenos MGE na potomke nije bio potpun kod svih sojeva. Ekstrahromozomski DNK elementi igraju ključnu ulogu u plastičnosti genoma, omogućavajući bakterijama da se lako prilagode novom okruženju (Tam i Torres, 2019). Takođe, i selektivni pritisak iz okoline favorizuje opstanak i preživljavanje otpornijih sojeva (Biswas i sar., 2008).

Poznavanjem osobina određenih genotipova (kontagioznost, prisustvo određenih faktora virulencije, osetljivost na antimikrobna sredstva, MRSA sojevi) treba da pomogne pri donošenju odluka koje mere treba primeniti za prevenciju širenja, terapiju i iskorenjivanje *S. aureus*-a iz stada. Posebnu pažnju potrebno je obratiti i na izbegavanje ponovnog unošenja uzročnika u stado slobodno od koagulaza pozitivnih stafilokoka. Ako nije moguće imati stado zatvorenog tipa, pre kupovine krava bilo bi poželjno odraditi analizu mleka na uzročnike mastitisa. Takođe, novokupljene krave i junice trebalo bi staviti u karantin i još par puta ispitati mleko na uzročnike mastitisa, zbog mogućnosti postojanja latentnih infekcija.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Na osnovu fenotipskih karakteristika identifikovano je 285 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, a kod svih izolata dokazano je prisustvo gena specifičnih za *S. aureus*, *nuc* gena koji kodira termostabilnu nukleazu i *23S rRNK* gena, kao i *coa* gena koji kodira enzim koagulazu.
2. Ispitivanjem osetljivosti izolata *S. aureus* disk difuzionom metodom prema 13 antimikrobnih sredstava utvrđen je najviši procenat izolata rezistentnih na penicilin 74,7%, a zatim na ampicilin 56,5%, kloksacilin 48,1%, neomicin 42,8%, gentamicin 27,0%, tetraciklin 14,7%, kombinaciju amoksicilina sa klavulanskom kiselinom 14%, linkomicin 12,6%, ceftriakson 10,9%, cefaleksin 8,8%, kao i kombinaciju sulfametoksazola i trimetoprima 4,9%.
3. Osetljivost *S. aureus* prema svim ispitivanim antimikrobnim sredstvima utvrđena je kod 6,3% izolata, dok je rezistencija prema jednom, dva, odnosno tri i više antimikrobnih sredstava bila prisutna kod 11,2%, 32,3% i 50,2% izolata.
4. Prisustvo *mecA* gena koji kodira rezistenciju na meticilin, dokazano je kod 7,7% izolata *S. aureus*, što predstavlja rizik od prenošenja MRSA sojeva na ljude.
5. PCR analizom intergenskog spajsera između 16S i 23S rRNK gena operona gena koji kodiraju rRNA ribozoma (RS-PCR genotipizacija) utvrđena su 33 različita genotipa *S. aureus*, od kojih su 10 genotipova imali različite varijante. Otkriveno je ukupno 15 novih genotipova (GTCL, GTCM, GTCN, GTCO, GTCP, GTCR, GTCS, GTCT, GTCU, GTCV, GTCY, GTCX, GTCZ, GTCQ i GTDA) i 5 novih varijanti genotipova (GTD^I, GTAF^{II}, GTAS^I, GTCL^I, GTCY^I).
6. Primenom RS-PCR genotipizacije utvrđena su dva dominantna srednje kontagiozna *S. aureus* genotipa: GTD (25,3%) i GTR^{VI} (24,2%). Pojedinačno učestalost svih ostalih genotipova koji su svrstani u CLOG klaster bila je manja od 6%.
7. Geni koji kodiraju mikrobne površinske adhezine sa ulogom u prepoznavanju i vezivanju za komponente ekstracelularnog matriksa domaćina (MSCRAMM) dokazani su u visokom procentu. Gen *fnbA* (kodira fibronektin vezujući proteina A) dokazan je kod 97,5% izolata, *clfA* gen (kodira klamping faktor A) kod 88,4% izolata, a *cna* gen (kolagen vezujući protein) kod 85,3 % izolata.
8. Gen *clfA* koji kodira faktor virulencije koji učestvuje u adherenciji detektovan je u manjoj meri (64,8%) kod izolata *S. aureus* koji pripadaju novim genotipovima i varijantama genotipa ($p < 0,001$).

9. Gen *spa* koji kodira sintezu proteina A dokazan je kod svih izolata.
10. Geni *cap5* i *cap8*, koji regulišu eksprimiranje kapsularnih polisaharida, dokazani su kod 38,25% izolata odnosno kod 61,8% izolata, a *efb* gen koji kodira ekstracelularni fibrinogen vezujući protein kod 44,2% izolata.
11. Geni koji imaju važnu ulogu u formiranju biofilma *icaA* i *icaD* dokazani su u visokom procentu. Gen *icaA* dokazan je kod 94,7% izolata, a gen *icaD* kod 93% izolata. Ni kod jednog izolata nije dokazan *bap* gen koji kodira biofilm akcesorni protein.
12. Samo kod 6,7% izolata nije dokazano prisustvo gena koji kodiraju stafilokokne enterotoksine. Najčešće dokazani geni koji kodiraju stafilokokne enterotoksine su bili *sed* i *sei* kod 57,2% izolata odnosno 47,7% izolata. Izolati iz CLOG klastera novih genotipova i varijanti bili su jedini koji su posedovali *sej* i *sep* gene, kao i u većem procentu *sea*, *seb* i *sec* gene ($P < 0,001$).
13. Gen *tsst-1* koji kodira toksin 1 toksičnog šok sindroma nije ustanovljen ni kod jednog izolata *S. aureus*.
14. Gen *pvl* koji kodira Panton-Valentin leukocidin dokazan je kod 10,2% izolata.
15. Genotipizacijom i ispitivanjem prisustva pojedinih faktora virulencije koagulaza pozitivnih stafilokoka uzročnika mastitisa kod krava može se predvideti stepen patogenosti i kontagioznosti izolata. Ustanovljene informacije mogu da pomognu pri donošenju odluka koje mere treba primeniti za prevenciju širenja, terapiju i iskorenjivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka iz stada.

8. LITERATURA

1. Aarestrup, F.M., Dangler, C.A. and Sordillo, L.M., 1995. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 59(2), pp.124-128.
2. Abril, A. G., Villa T. G., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., Sánchez-Pérez, A., Calo-Mata, P. and Carrera, M., 2020. *Staphylococcus aureus* exotoxins and their detection in the dairy industry and mastitis. *Toxins*, 12(9), p.537.
3. Abdeen, E.E., Mousa, W.S., Abdel-Tawab, A.A., El-Faramawy, R. and Abo-Shama, U.H., 2021. Phenotypic, genotypic and antibiogram among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Pakistan Veterinary Journal*, 41(2), pp.289-293.
4. Abera, M., Demie, B., Aragaw, K., Regassa, F. and Regassa, A., 2010. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitic milk and their drug resistance patterns in Adama town, Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 2(3), pp.29-34.
5. Acosta, A.C., Oliveira, P.R.F., Albuquerque, L., Silva, I.F., Medeiros, E.S., Costa, M.M., Pinheiro Junior, J.W. and Mota, R.A., 2018. Frequency of *Staphylococcus aureus* virulence genes in milk of cows and goats with mastitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38, pp.2029-2036.
6. Adesiyun, A. A., L. A. Webb, and H. T. Romain, 1999. Phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk and dairymen on dairy farms in Trinidad. *Israel J. Vet. Med.* 54:11–17
7. Adkins, P.R.F., Middleton, J.R., Calcutt, M.J., Stewart, G.C. and Fox, L.K., 2017. Species identification and strain typing of *Staphylococcus agnetis* and *Staphylococcus hyicus* isolates from bovine milk by use of a novel multiplex PCR assay and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(6), pp.1778-1788.
8. Agerer, F., Lux, S., Michel, A., Rohde, M., Ohlsen, K. and Hauck, C.R., 2005. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. *Journal of cell science*, 118(10), pp.2189-2200.
9. Aguilar B, Iturralde M. 2001. Binding of a surface protein of *Staphylococcus aureus* to cultured ovine mammary gland epithelial cells. *Veterinary Microbiology* 82, 165–175.
10. Ahmad, K.H., Abubakar, M.B., Umar, B.N., Salawudeen, M.T., Olorunshola, I.D. and Usman, M.D., 2022. Haemolytic and antibiogram activities of *Staphylococcus aureus* isolated from cattle with mastitis in Sokoto, Northern Nigeria. *Journal of Sustainable Veterinary & Allied Sciences*, 3(1), pp.39-42.

11. Aires-de-Sousa, M., 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clinical Microbiology and Infection*, 23(6), pp.373-380.
12. Althaus, R.L., Torres, A., Montero, A., Balasch, S. and Molina, M.P., 2003. Detection limits of antimicrobials in ewe milk by Delvotest photometric measurements. *Journal of Dairy Science*, 86(2), pp.457-463.
13. Akineden, O., Annemuller, C., Hassan, A.A., Lammler, C., Wolter, W. and Zschock, M., 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(5), pp.959-964.
14. Alonzo III, F. and Torres, V.J., 2014. The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(2), pp.199-230.
15. Antók, F.I., Mayrhofer, R., Marbach, H., Masengesho, J.C., Keinprecht, H., Nyirimbuga, V., Fischer, O., Lepuschitz, S., Ruppitsch, W., Ehling-Schulz, M. and Feßler, A.T., 2019. Characterization of antibiotic and biocide resistance genes and virulence factors of *Staphylococcus* species associated with bovine mastitis in Rwanda. *Antibiotics*, 9(1), pp.1-17.
16. Arciola, C.R., Campoccia, D., Ravaioli, S. and Montanaro, L., 2015. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, p.1-10.
17. Ashraf, S., Cheng, J. and Zhao, X., 2017. Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* interacts with AnnexinA2 on mammary epithelial cells. *Scientific Reports*, 7(1), pp.1-9.
18. Balaban, N. and Rasooly, A., 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International journal of food microbiology*, 61(1), pp.1-10.
19. Bar, D., Tauer, L.W., Bennett, G., Gonzalez, R.N., Hertl, J.A., Schukken, Y.H., Schulte, H.F., Welcome, F.L. and Gröhn, Y.T., 2008. The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming. *Journal of dairy science*, 91(6), pp.2205-2214.
20. Bardiau, M., Yamazaki, K., Duprez, J.N., Taminiau, B., Mainil, J.G. and Ote, I., 2013. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. *Letters in Applied Microbiology*, 57(3), pp.181-186.
21. Bar-Gal, G.K., Blum, S.E., Hadas, L., Ehricht, R., Monecke, S. and Leitner, G., 2015. Host-specificity of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections in dairy animals assessed by genotyping and virulence genes. *Veterinary microbiology*, 176(1-2), pp.143-154.
22. Barkema, H.W., Schukken, Y.H. and Zadoks, R.N., 2006. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of dairy science*, 89(6), pp.1877-1895.

23. Baron, F., Cochet, M.F., Pellerin, J.L., Zakour, N.B., Lebon, A., Navarro, A., Proudly, I., Le Loir, Y. and Gautier, M., 2004. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. *Journal of food protection*, 67(10), pp.2302-2305.
24. Belayneh, R., Belihu, K. and Wubete, A., 2013. Dairy cows mastitis survey in Adama town, Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 5(10), pp.281-207.
25. Ben Said, M., Abbassi, M.S., Bianchini, V., Sghaier, S., Cremonesi, P., Romanò, A., Gualdi, V., Hassen, A., Luini, M.V., 2016. Genetic characterization and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Tunisia. *Lett. Appl. Microbiol.* 63 (6), 473–481.
26. Berube, B.J. and Bubeck Wardenburg, J., 2013. *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins*, 5(6), pp.1140-1166.
27. Biswas, S., Raoult, D. and Rolain, J.M., 2008. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. *International journal of antimicrobial agents*, 32(3), pp.207-220.
28. Boerema, J.A., Clemens, R. and Brightwell, G., 2006. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 107(2), pp.192-201.
29. Bonsaglia, E.C.R., Silva, N.C.C., Rossi, B.F., Camargo, C.H., Dantas, S.T.A., Langoni, H., Guimarães, F.F., Lima, F.S., Fitzgerald, J.R., Júnior, A.F. and Rall, V.L.M., 2018. Molecular epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) isolated from milk of cows with subclinical mastitis. *Microbial pathogenesis*, 124, pp.130-135.
30. Boss, R., Cosandey, A., Luini, M., Artursson, K., Bardiau, M., Breitenwieser, F., Hehenberger, E., Lam, T., Mansfeld, M., Michel, A. and Mösslacher, G., 2016. Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. *Journal of dairy science*, 99(1), pp.515-528.
31. Botrel, M.A., Haenni, M., Morignat, E., Sulpice, P., Madec, J.Y. and Calavas, D., 2010. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France. *Foodborne pathogens and disease*, 7(5), pp.479-487.
32. Budd, K.E., McCoy, F., Monecke, S., Cormican, P., Mitchell, J. and Keane, O.M., 2015. Extensive genomic diversity among bovine-adapted *Staphylococcus aureus*: evidence for a genomic rearrangement within CC97. *PLoS One*, 10(8), p.e0134592.
33. Buragohain, R. and Sar, T.K., 2018. The Advancements in Mastitis Therapy. *Public Health*, 10(9), pp.4060-4085.

34. Burmańczuk, A., Kowalski, C., Roliński, Z., Zań, R. and Krasucka, D., 2016. Activity of β -lactam antibiotics against certain microorganisms which cause mastitis in cows. *Journal of Veterinary Research*, 60(3), pp.267-271.
35. Capuco, A. V., S. A. Bright, J. W. Pankey, D. L. Wood, R. H. Miller and J. Bitman, 1992. Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *J. Dairy Sci.*, 75: 2126.
36. Cavaco, L., Mordhorst, H. and Hendriksen, R., 2016. Laboratory protocol: PCR for plasmid-mediated colistin resistance genes. *Lynby, Denmark: National Food Institute*.
37. Cervinkova, D., Vlkova, H., Borodacova, I., Makovcova, J., Babak, V., Lorencova, A., Vrtkova, I., Marosevic, D. and Jaglic, Z., 2013. Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. *Vet Med*, 58(11), pp.567-575.
38. Chadi, Z.D., Dib, L., Zeroual, F. and Benakhla, A., 2022. Usefulness of molecular typing methods for epidemiological and evolutionary studies of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(8), p.103338.
39. Chambers, H.F. and DeLeo, F.R., 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), pp.629-641.
40. Chandrasekaran, D., Venkatesan, P., Tirumurugaan, K.G., Nambi, A.P., Thirunavukkarasu, P.S., Kumanan, K., Vairamuthu, S. and Ramesh, S., 2014. Pattern of antibiotic resistant mastitis in dairy cows. *Veterinary World*, 7(6), pp.389-394.
41. Cheng, W.N. and Han, S.G., 2020. Bovine mastitis: Risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments—A review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 33(11), p.1699.
42. Cheung, G.Y., Bae, J.S. and Otto, M., 2021. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), pp.547-569.
43. Chmielewski, R.A.N. & Frank, J.F. 2003. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2: 22–32.
44. Cifrian, E., Guidry, A.J., Bramley, A.J., Norcross, N.L., Bastida-Corcuera, F.D. and Marquardt, W.W., 1996. Effect of staphylococcal β toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Veterinary microbiology*, 48(3-4), pp.187-198.
45. Clarke, S.R. and Foster, S.J., 2006. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Advances in microbial physiology*, 51, pp.187-224.
46. Cobirka, M., Tancin, V. and Slama, P., 2020. Epidemiology and classification of mastitis. *Animals*, 10(12), p.2212.

47. Cosandey, A., Boss, R., Luini, M., Artursson, K., Bardiau, M., Breitenwieser, F., Hehenberger, E., Lam, T., Mansfeld, M., Michel, A. and Mösslacher, G., 2016. Staphylococcus aureus genotype B and other genotypes isolated from cow milk in European countries. *Journal of dairy science*, 99(1), pp.529-540.
48. Costa, E.O., Ribeiro, A.R., Watanabe, E.T. and Melville, P.A., 1998. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 45(1-10), pp.65-71.
49. Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *science*, 284(5418), pp.1318-1322.
50. Costerton, J.W. & Lewandowski, Z. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 711–745.
51. Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.F., Nichols, W.W. and Götz, F., 1999. The intercellular adhesion (ica) locus is present in Staphylococcus aureus and is required for biofilm formation. *Infection and immunity*, 67(10), pp.5427-5433.
52. Cremonesi, P., Pozzi, F., Raschetti, M., Bignoli, G., Capra, E., Graber, H.U., Vezzoli, F., Piccinini, R., Bertasi, B., Biffani, S. and Castiglioni, B., 2015. Genomic characteristics of Staphylococcus aureus strains associated with high within-herd prevalence of intramammary infections in dairy cows. *Journal of dairy science*, 98(10), pp.6828-6838.
53. Crombé, F., Argudín, M.A., Vanderhaeghen, W., Hermans, K., Haesebrouck, F. and Butaye, P., 2013. Transmission dynamics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pigs. *Frontiers in Microbiology*, 4, p.57.
54. Cucarella, C., Tormo, M.A., Ubeda, C., Trotonda, M.P., Monzón, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, Í. and Penadés, J.R., 2004. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine Staphylococcus aureus. *Infection and immunity*, 72(4), pp.2177-2185.
55. Cuny, C., Köck, R. and Witte, W., 2013. Livestock associated MRSA (LA-MRSA) and its relevance for humans in Germany. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), pp.331-337.
56. Cuny, C., Friedrich, A., Kozytska, S., Layer, F., Nübel, U., Ohlsen, K., Strommenger, B., Walther, B., Wieler, L. and Witte, W., 2010. Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in different animal species. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(2-3), pp.109-117.
57. Cvetnić, L., Samardžija, M., Duvnjak, S., Habrun, B., Cvetnić, M., Jaki Tkalec, V., Đuričić, D. and Beničić, M., 2021. Multi Locus Sequence Typing and spa typing of Staphylococcus aureus isolated from the milk of cows with subclinical mastitis in Croatia. *Microorganisms*, 9(4), p.725.

58. Cvetnić, L., Samardžija, M., Habrun, B., Kompes, G. and Benić, M., 2016. Microbiological monitoring of mastitis pathogens in the control of udder health in dairy cows. *Slovenian Veterinary Research*, 53(3), pp.131-40.
59. Dahl, M.O., De Vries, A., Maunsell, F.P., Galvao, K.N., Risco, C.A. and Hernandez, J.A., 2018. Epidemiologic and economic analyses of pregnancy loss attributable to mastitis in primiparous Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 101(11), pp.10142-10150.
60. DALLA POZZA, M.C., RICCI, A. and VICENZONI, G., 1999. Protein A gene polymorphism analysis in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis. *Journal of dairy research*, 66(3), pp.449-453.
61. Dhanawade, N.B., Kalorey, D.R., Srinivasan, R., Barbuddhe, S.B. and Kurkure, N.V., 2010. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Veterinary research communications*, 34, pp.81-89.
62. Dieser, S.A., Vissio, C., Lasagno, M.C., Bogni, C.I., Larriestra, A.J. and Odierno, L.M., 2014. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in Argentinean dairy herds. *Pak Vet J*, 34(1), pp.124-126.
63. Dinges, M.M., Orwin, P.M. and Schlievert, P.M., 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*, 13(1), pp.16-34.
64. Doery, H.M., Magnusson, B.J., Gulasekharan, J. and PEARSON, J.E., 1965. The properties of phospholipase enzymes in staphylococcal toxins. *Microbiology*, 40(2), pp.283-296.
65. Effendi, M.H. and Harijani, N., 2017. Cases of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from raw milk in East Java, Indonesia. *Glob. Vet*, 19(1), pp.500-503.
66. Elias, L., Balasubramanyam, A.S., Ayshpur, O.Y., Mushtuk, I.U., Sheremet, N.O., Gumeniuk, V.V., Musser, J.M. and Rogovskyy, A.S., 2020. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Escherichia coli* isolated from mastitic dairy cattle in Ukraine. *Antibiotics*, 9(8), p.469.
67. Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J. and Spratt, B.G., 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 38(3), pp.1008-1015.
68. Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H. and Spratt, B.G., 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), pp.7687-7692.
69. Fang, R., Cui, J., Cui, T., Guo, H., Ono, H.K., Park, C.H., Okamura, M., Nakane, A. and Hu, D.L., 2019. Staphylococcal enterotoxin C is an important virulence factor for mastitis. *Toxins*, 11(3), p.141.

70. Farrell, A.M., Taylor, D. and Holland, K.T., 1995. Cloning, nucleotide sequence determination and expression of the *Staphylococcus aureus* hyaluronate lyase gene. *FEMS microbiology letters*, 130(1), pp.81-85.
71. Ferguson, J.D., Azzaro, G., Gambina, M. and Licitra, G., 2007. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. *Journal of dairy science*, 90(12), pp.5798-5813.
72. Fisher, E.L., Otto, M. and Cheung, G.Y., 2018. Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. *Frontiers in microbiology*, 9, p.436.
73. Fisher, E.A. and Paterson, G.K., 2020. Prevalence and characterisation of methicillin-resistant staphylococci from bovine bulk tank milk in England and Wales. *Journal of global antimicrobial resistance*, 22, pp.139-144.
74. Fleischer, B. and Schrezenmeier, H.U.B.E.R.T., 1988. T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells. *The Journal of experimental medicine*, 167(5), pp.1697-1707.
75. Flügge, C. 1886. Die Mikroorganismen. F. C. W. Vogel. Leipzig, Germany.
76. Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K. and Höök, M., 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews microbiology*, 12(1), pp.49-62.
77. Foster, T.J. and Höök, M., 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*, 6(12), pp.484-488.
78. Foster, T.J., 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nature reviews microbiology*, 3(12), pp.948-958.
79. Fournier, C., Kuhnert, P., Frey, J., Miserez, R., Kirchhofer, M., Kaufmann, T., Steiner, A. and Graber, H.U., 2008. Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Research in veterinary science*, 85(3), pp.439-448.
80. Fournier, B., 2008. Global regulators of *Staphylococcus aureus* virulence genes. *Staphylococcus molecular genetics*, pp.131-183.
81. Fowler, T., Wann, E.R., Joh, D., Johansson, S., Foster, T.J. and Höök, M., 2000. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell β 1 integrins. *European journal of cell biology*, 79(10), pp.672-679.
82. Fox, L.K. and Gay, J.M., 1993. Contagious mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 9(3), pp.475-487.

83. Fox, L.K., Zadoks, R.N. and Gaskins, C.T., 2005. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Veterinary Microbiology*, 107(3-4), pp.295-299.
84. Freick, M., Frank, Y., Steinert, K., Hamedy, A., Passarge, O. and Sobiraj, A., 2016. Mastitis vaccination using a commercial polyvalent vaccine or a herd-specific *Staphylococcus aureus* vaccine. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere/Nutztiere*, 44(04), pp.219-229.
85. Frost, A.J., Wanasinghe, D.D. and Woolcock, J.B., 1977. Some factors affecting selective adherence of microorganisms in the bovine mammary gland. *Infection and immunity*, 15(1), pp.245-253.
86. Fursova, K., Sorokin, A., Sokolov, S., Dzhelyadin, T., Shulcheva, I., Shchannikova, M., Nikanova, D., Artem'eva, O., Zinovieva, N. and Brovko, F., 2020. Virulence factors and phylogeny of *Staphylococcus aureus* associated with bovine mastitis in Russia based on genome sequences. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, p.135.
87. Gazzola, A., Maisano, A.M., Bianchini, V., Vezzoli, F., Romanò, A., Graber, H.U., Cremonesi, P., Zanardi, G., Cappa, V. and Luini, M., 2020. Characterization of *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy cattle in Lombardy (northern Italy). *Journal of dairy science*, 103(3), pp.2685-2692.
88. Gillaspay, A.F., Lee, C.Y., Sau, S., Cheung, A.L. and Smeltzer, M.S., 1998. Factors affecting the collagen binding capacity of *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*, 66(7), pp.3170-3178.
89. Gindonis, V., Taponen, S., Myllyniemi, A.L., Pyörälä, S., Nykäsenoja, S., Salmenlinna, S., Lindholm, L. and Rantala, M., 2013. Occurrence and characterization of methicillin-resistant staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1), pp.1-8.
90. Götz, F., Bannerman, T. and Schleifer, K.H., 2006. The genera staphylococcus and macrococcus. *The prokaryotes*, pp.5-75.
91. Graber, H.U., Naskova, J., Studer, E., Kaufmann, T., Kirchhofer, M., Brechbühl, M., Schaeren, W., Steiner, A. and Fournier, C., 2009. Mastitis-related subtypes of bovine *Staphylococcus aureus* are characterized by different clinical properties. *Journal of dairy science*, 92(4), pp.1442-1451.
92. Graber, H.U., Pfister, S., Burgener, P., Boss, R., Meylan, M. and Hummerjohann, J., 2013. Bovine *Staphylococcus aureus*: diagnostic properties of specific media. *Research in veterinary science*, 95(1), pp.38-44.
93. Graber, H.U., 2016. Genotyping of *Staphylococcus Aureus* by ribosomal spacer PCR (RS-PCR). *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (117), p.e54623.

94. Graveland, H., Wagenaar, J.A., Bergs, K., Heesterbeek, H. and Heederik, D., 2011. Persistence of livestock associated MRSA CC398 in humans is dependent on intensity of animal contact. *PloS one*, 6(2), p.e16830.
95. Greeshma AJ., Ramani Pushpa RN., Lakshmi Kavitha K. end Srinivasa Rao T., 2022. Antimicrobial Resistance Pattern of Staphylococcus aureus and Streptococcus uberis Causing Mastitis. *Acta Scientific Veterinary Sciences* 4.11: 107-116.
96. Gruet, P., P. Maincent, X. Berthelot, and V. Kaltsatos. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: Review and perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50:245–259.
97. Grunert, T., Stessl, B., Wolf, F., Sordelli, D.O., Buzzola, F.R. and Ehling-Schulz, M., 2018. Distinct phenotypic traits of Staphylococcus aureus are associated with persistent, contagious bovine intramammary infections. *Scientific Reports*, 8(1), p.15968.
98. Habbit, K. G., C. B. Cole, and B. Reiter, 1969. Antimicrobial proteins isolated from the teat canal of the cow. *J. Gen. Microbiol.*, 56: 365.
99. Hair, P.S., Echague, C.G., Sholl, A.M., Watkins, J.A., Geoghegan, J.A., Foster, T.J. and Cunnion, K.M., 2010. Clumping factor A interaction with complement factor I increases C3b cleavage on the bacterial surface of Staphylococcus aureus and decreases complement-mediated phagocytosis. *Infection and immunity*, 78(4), pp.1717-1727.
100. Halasa, T., Nielen, M., De Roos, A.P.W., Van Hoorne, R., de Jong, G., Lam, T.J.G.M., Van Werven, T. and Hogeveen, H., 2009. Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model. *Journal of Dairy Science*, 92(2), pp.599-606.
101. Hamid, S., Bhat, M.A., Mir, I.A., Taku, A., Badroo, G.A., Nazki, S. and Malik, A., 2017. Phenotypic and genotypic characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from bovine mastitis. *Veterinary world*, 10(3), p.363.
102. Haran, K.P., Godden, S.M., Boxrud, D., Jawahir, S., Bender, J.B. and Sreevatsan, S., 2012. Prevalence and characterization of Staphylococcus aureus, including methicillin-resistant Staphylococcus aureus, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), pp.688-695.
103. Hata, E., Katsuda, K., Kobayashi, H., Uchida, I., Tanaka, K., Eguchi, M., 2010. Genetic variation among Staphylococcus aureus strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2130–2139.
104. He, Y., Xie, Y. and Reed, S., 2014. Pulsed-field gel electrophoresis typing of Staphylococcus aureus isolates. Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Protocols, pp.103-111.

105. Hendriksen, R.S., Mevius, D.J., Schroeter, A., Teale, C., Meunier, D., Butaye, P., Franco, A., Utinane, A., Amado, A., Moreno, M. and Greko, C., 2008. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002–2004. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50, pp.1-10.
106. Hennekinne, J.A., De Buyser, M.L. and Dragacci, S., 2012. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS microbiology reviews*, 36(4), pp.815-836.
107. Hillerton, J.E., 1999. Balancing mastitis and quality. In *Proc. British Mastitis Conference, Stoneleigh, UK* (pp. 31-36).
108. Hiramatsu, K., Katayama, Y., Matsuo, M., Sasaki, T., Morimoto, Y., Sekiguchi, A. and Baba, T., 2014. Multi-drug-resistant Staphylococcus aureus and future chemotherapy. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20(10), pp.593-601.
109. Hochkeppel, H.K., Braun, D.G., Vischer, W., Imm, A., Sutter, S., Staebli, U., Guggenheim, R., Kaplan, E.L., Boutonnier, A. and Fournier, J.M., 1987. Serotyping and electron microscopy studies of Staphylococcus aureus clinical isolates with monoclonal antibodies to capsular polysaccharide types 5 and 8. *Journal of clinical microbiology*, 25(3), pp.526-530.
110. Hoekstra, J., Zomer, A.L., Rutten, V.P.M.G., Benedictus, L., Stegeman, A., Spaninks, M., Bennedsgaard, T.W., Biggs, A., De Vlieghe, S., Mateo, D.H., Huber-Schlenstedt, R., Katholm, J., Kovács, P., Krömker, V., Lequeux, G., Moroni, P., Pinho, L., Smulski, S., Supré, K., Swinkels, J.M., Holmes, M.A., Lam, T.J.G.M., Koop, G., 2020. Genomic analysis of European bovine Staphylococcus aureus from clinical versus subclinical mastitis. *Sci. Rep.* 10, 18172.
111. Holmes, M.A., Zadoks, R.N., 2011. Methicillin resistant Staphylococcus aureus in human and bovine mastitis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 16, 373–382.
112. Horsburgh, M. J. 2008. The response of Staphylococcus aureus to environmental stimuli. Staphylococcus molecular genetics. Lindsay, J. A. (ed), *Caister Academic Press*, Norfolk, pp.185-206.
113. Hussein, O.H., Abdel Hameed, K.G. and El-Malt, L.M., 2022. Prevalence and public health hazards of subclinical mastitis in dairy cows. *SVU-International Journal of Veterinary Sciences*, 5(3), pp.52-64.
114. Idriss, S.E., Foltys, V., Tančin, V., Kirchnerová, K., Tančinová, D. and Zaujec, K., 2014. Mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Nitra, Slovakia. *Slovak Journal of Animal Science*, 47(1), pp.33-38.
115. Ikawaty, R., Brouwer, E.C., Duijkeren, E.V., Mevius, D., Verhoef, J. and Fluit, A.C., 2010. Virulence factors of genotyped bovine mastitis Staphylococcus aureus isolates in The Netherlands. *International Journal of Dairy Science*, 5(2), pp.60-70.

116. Ikawaty, R., Brouwer, E.C., Jansen, M.D., van Duijkeren, E., Mevius, D.J., Verhoef, J., Fluit, A.C., 2009. Characterization of Dutch *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis using a multiple locus variable number tandem repeat analysis. *Vet. Microbiol.* 136, 277–284.
117. Imanishi, I., Nicolas, A., Caetano, A.C.B., Castro, T.L.D.P., Tartaglia, N.R., Mariutti, R., Guédon, E., Even, S., Berkova, N., Arni, R.K. and Seyffert, N., 2019. Exfoliative toxin E, a new *Staphylococcus aureus* virulence factor with host-specific activity. *Scientific Reports*, 9(1), p.16336.
118. Intorre, L., Vanni, M., Meucci, V., Tognetti, R., Cerri, D., Turchi, B., Cammi, G., Arrigoni, N. and Garbarino, C., 2013. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Italy from 2005 to 20011. *LARGE ANIMALS REVIEW*, 6, pp.287-291.
119. Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C. and Hiramatsu, K., 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(5), pp.1323-1336.
120. Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M. and Kamil, M.A., 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the chinese medical association*, 81(1), pp.7-11.
121. Jensen, M.A., Webster, J.A. and Straus, N., 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and environmental microbiology*, 59(4), pp.945-952.
122. Jezdimirović, M., Veterinarska farmakologija, 2010. Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Beograd
123. Ji, Y., 2020. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocols: Cutting- Edge Technologies and Advancements; *Methods in Molecular Biology* 2069.
124. Jones, G.M. and Bailey, T.L., 2006. Understanding the basics of mastitis. Virginia Cooperative Extension, Publication No. 404-233. Virginia State University, pp.1-7.
125. Jørgensen, H.J., Mørk, T., Caugant, D.A., Kearns, A., Rørvik, L.M., 2005. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8352–8361.
126. Juhász-Kaszanyitzky, É., Jánosi, S., Somogyi, P., Dán, Á., vanderGraaf van Bloois, L., Van Duijkeren, E. and Wagenaar, J.A., 2007. MRSA transmission between cows and humans. *Emerging infectious diseases*, 13(4), p.630.
127. Kenar, B., Bagcigil, A.F., Kuyucuoglu, Y., KAHRAMAN, B.B. and Konak, S., 2017. Antimicrobial susceptibility profiles and coagulase gene polymorphism of

Staphylococcus aureus isolated from bovine subclinical mastitis. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23(4).

128. Khan, M.Z. and Khan, A., 2006. Basic facts of mastitis in dairy animals: A review. *Pakistan veterinary journal*, 26(4), p.204.
129. Kibebew, K., 2017. Bovine mastitis: A review of causes and epidemiological point of view. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 7(2), pp.1-14.
130. Kirkeby, C., Zervens, L., Toft, N., Schwarz, D., Farre, M., Hechinger, S. and Halasa, T., 2019. Transmission dynamics of Staphylococcus aureus within two Danish dairy cattle herds. *Journal of dairy science*, 102(2), pp.1428-1442.
131. Ko, Y.P., Kang, M., Ganesh, V.K., Ravirajan, D., Li, B. and Höök, M., 2016. Coagulase and Efb of Staphylococcus aureus have a common fibrinogen binding motif. *MBio*, 7(1), pp.10-1128.
132. Koivula, M., Pitkälä, A., Pyörälä, S. and Mäntysaari, E.A., 2007. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. *Acta Agriculturae Scand Section A*, 57(2), pp.89-96.
133. Kosecka-Strojek, M., Ilczyszyn, W.M., Buda, A., Polakowska, K., Murzyn, K., Panz, T., Bialecka, A., Kasproicz, A., Jakubczak, A., Krol, J. and Wieliczko, A., 2016. Multiple-locus variable-number tandem repeat fingerprinting as a method for rapid and cost-effective typing of animal-associated Staphylococcus aureus strains from lineages other than sequence type 398. *Journal of medical microbiology*, 65(12), pp.1494-1504.
134. Kroning, I.S., Iglesias, M.A., Mendonca, K.S., Lopes, G.V. and Silva, W.P., 2018. Presence of classical enterotoxin genes, agr typing, antimicrobial resistance, and genetic diversity of Staphylococcus aureus from milk of cows with mastitis in southern Brazil. *Journal of food protection*, 81(5), pp.738-742.
135. Kumari, S., Kumar, S., Prasad, A., Sahay, S., Kumar, R., Minj, N. and Ahmad, T., 2020. A study on antibiotic sensitivity test of methicillin resistant and non methicillin resistant Staphylococcus aureus from mastitic milk. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8, pp.77-79.
136. Lakhundi, S., Zhang, K., 2018. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, e00020–e118
137. Lammers, A., Nuijten, P.J. and Smith, H.E., 1999. The fibronectin binding proteins of Staphylococcus aureus are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS microbiology letters*, 180(1), pp.103-109.
138. Landin, H., M. J. Mork, M. Larsson, and K. P. Waller. 2015. Vaccination against Staphylococcus aureus mastitis in two Swedish dairy herds. *Acta Vet. Scand.* 57:81.

139. Le Loir, Y., F. Baron, and M. Gautier. 2003. Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2:63–76.
140. Lee, L.Y., Liang, X., Höök, M. and Brown, E.L., 2004. Identification and characterization of the C3 binding domain of the Staphylococcus aureus extracellular fibrinogen-binding protein (Efb). *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), pp.50710-50716.
141. Lefebvre, D., Blanco-Valle, K., Hennekinne, J.A., Simon, S., Fenaille, F., Becher, F. and Nia, Y., 2022. Multiplex detection of 24 Staphylococcal Enterotoxins in culture supernatant using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Toxins*, 14(4), p.249.
142. Leuenberger, A., Sartori, C., Boss, R., Resch, G., Oechslin, F., Steiner, A., Moreillon, P. and Graber, H.U., 2019. Genotypes of Staphylococcus aureus: On-farm epidemiology and the consequences for prevention of intramammary infections. *Journal of dairy science*, 102(4), pp.3295-3309.
143. Levison, L.J., Miller-Cushon, E.K., Tucker, A.L., Bergeron, R., Leslie, K.E., Barkema, H.W. and DeVries, T.J., 2016. Incidence rate of pathogen-specific clinical mastitis on conventional and organic Canadian dairy farms. *Journal of dairy science*, 99(2), pp.1341-1350.
144. Li, D., Wu, C., Wang, Y., Fan, R., Schwarz, S. and Zhang, S., 2015. Identification of multiresistance gene cfr in methicillin-resistant Staphylococcus aureus from pigs: plasmid location and integration into a staphylococcal cassette chromosome mec complex. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(6), pp.3641-3644.
145. Liu, H., Li, S., Meng, L., Dong, L., Zhao, S., Lan, X., Wang, J. and Zheng, N., 2017. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of Staphylococcus aureus isolated from dairy herds in northern China. *Journal of Dairy Science*, 100(11), pp.8796-8803.
146. Loeffler, D.A., Schat, K.A., Norcross, N.L., 1986. Use of 51Cr release to measure the cytotoxic effects of staphylococcal leukocidin and toxin neutralization on bovine leukocytes. *J. Clin. Microbiol.* 23, 416–420.
147. Lozano, C., Gharsa, H., Ben Slama, K., Zarazaga, M. and Torres, C., 2016. Staphylococcus aureus in animals and food: methicillin resistance, prevalence and population structure. A review in the African continent. *Microorganisms*, 4(1), p.12.
148. Luini, M., Cremonesi, P., Magro, G., Bianchini, V., Minozzi, G., Castiglioni, B. and Piccinini, R., 2015. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) is associated with low within-herd prevalence of intra-mammary infections in dairy cows: Genotyping of isolates. *Veterinary microbiology*, 178(3-4), pp.270-274.

149. MA, E.S., KOTB, E.E. and IBRAHEM, S., 2018. MOLECULAR CHARACTERIZATION OF TOXIGENIC AND ANTIBIOTIC RESISTANT OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS OF RECURRENT BOVINE MASTITIS. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 64(158), pp.1-8.
150. Maćešić, N., Karadjole, T., Bačić, G., Benić, M., Karadjole, M., Vince, S., Lipar, M. and Cergolj, M., 2012. Aetiology and prevalence of bovine intramammary infection at drying off. *Veterinarski arhiv*, 82(2), pp.125-131.
151. Maes, N., Magdalena, J., Rottiers, S., De Gheldre, Y. and Struelens, M.J., 2002. Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci and determine methicillin resistance from blood cultures. *Journal of clinical microbiology*, 40(4), pp.1514-1517.
152. Magaš, V.B., 2012. Priprema, ispitivanje imunogenosti i ocena efikasnosti vakcine u profilaksi nastanka mastitisa kod krava. Univerzitet u Beogradu.
153. Magro, G., Biffani, S., Minozzi, G., Ehricht, R., Monecke, S., Luini, M. and Piccinini, R., 2017. Virulence genes of *S. aureus* from dairy cow mastitis and contagiousness risk. *Toxins*, 9(6), p.195.
154. Mahanti, A., Joardar, S.N., Bandyopadhyay, S., Banerjee, J., Ghosh, S., Batabyal, K., Sar, T.K., Dutta, T.K. and Samanta, I., 2020. Characterization of methicillin-resistant and enterotoxins producing *Staphylococcus aureus* in bovine milk in India. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2, p.100017.
155. Maisano, A.M., Luini, M., Gazzola, A., Sala, L., Vezzoli, F., Bertocchi, L., Lorenzi, V., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Bergagna, S. and Romano, A., 2023. *Staphylococcus aureus* adlb gene is associated with high prevalence of intramammary infection in dairy herds of northern Italy: A cross-sectional study. *Journal of Dairy Science*, 106(5), pp.3421-3435.
156. Malachowa, N. and DeLeo, F.R., 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and molecular life sciences*, 67, pp.3057-3071.
157. Mamo, W., G. Fröman, and T. Wadström. 1988. Interaction of subepithelial connective tissue components with *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 18:163-176.
158. McGavin, M.J., Zahradka, C., Rice, K. and Scott, J.E., 1997. Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease. *Infection and immunity*, 65(7), pp.2621-2628.
159. McLandsborough, L., Rodriguez, A., Pérez-Conesa, D. and Weiss, J., 2006. Biofilms: at the interface between biophysics and microbiology. *Food biophysics*, 1, pp.94-114.

160. Mehrotra, M., Wang, G. and Johnson, W.M., 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of clinical microbiology*, 38(3), pp.1032-1035.
161. Mekuria, A., Asrat, D., Woldeamanuel, Y. and Tefera, G., 2013. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from milk samples of dairy cows and nasal swabs of farm workers in selected dairy farms around Addis Ababa, Ethiopia. *Afr J Microbiol Res*, 7(27), pp.3501-3510.
162. Melchior, M.B., Fink-Gremmels, J. and Gaastra, W., 2006. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 53(7), pp.326-332.
163. Milheiriço, C., Oliveira, D.C. and de Lencastre, H., 2007. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(9), pp.3374-3377.
164. Milić, N., Krnjaić, D., Mišić, D., Nišavić, J. and Radojčić, M., 2017. Mikrobiologija sa imunologijom, osnovni udžbenik. Naučna, Beograd.
165. Monistero, V., Graber, H.U., Pollera, C., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Bottini, E., Ceballos-Marquez, A., Lasso-Rojas, L., Kroemker, V., Wente, N. and Petzer, I.M., 2018. *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in eight countries: genotypes, detection of genes encoding different toxins and other virulence genes. *Toxins*, 10(6), p.247.
166. Monistero, V., Barberio, A., Biscarini, F., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Graber, H.U., Bottini, E., Ceballos-Marquez, A., Kroemker, V., Petzer, I.M. and Pollera, C., 2020. Different distribution of antimicrobial resistance genes and virulence profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical mastitis in six countries. *Journal of dairy science*, 103(4), pp.3431-3446.
167. Moon, J.S., Lee, A.R., Kang, H.M., Lee, E.S., Kim, M.N., Paik, Y.H., Park, Y.H., Joo, Y.S. and Koo, H.C., 2007. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *Journal of dairy science*, 90(3), pp.1176-1185.
168. Morales-Ubaldo, A.L., Rivero-Perez, N., Valladares-Carranza, B., Velázquez-Ordoñez, V., Delgadillo-Ruiz, L. and Zaragoza-Bastida, A., 2023. Bovine mastitis, a worldwide impact disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. *Veterinary and Animal Science*, p.100306.
169. Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Brusetti, L., Andrighetto, C. and Lombardi, A., 2010. Biochemical profiles, restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and multilocus variable number tandem repeat

- analysis (MLVA) for typing *Staphylococcus aureus* isolated from dairy products. *Research in veterinary science*, 88(3), pp.427-435.
170. Moroni, P., Pisoni, G., Antonini, M., Villa, R., Boettcher, P. and Carli, S., 2006. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. *Journal of dairy science*, 89(8), pp.2973-2976.
 171. Murphy, S. C., K. Cranker, G. F. Senyk, D. M. Barbano, A. I. Saeman and D. M. Galton, 1988. Influence of bovine mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. *J. Dairy Sci.*, 71: 65-69.
 172. Naranjo-Lucena, A. and Slowey, R., 2022. Invited review: Antimicrobial resistance in bovine mastitis pathogens: A review of genetic determinants and prevalence of resistance in European countries. *Journal of Dairy Science*, 106 (1), pp.1-23
 173. Naushad, S., Nobrega, D.B., Naqvi, S.A., Barkema, H.W., De Buck, J., 2020. Genomic Analysis of Bovine *Staphylococcus aureus* isolates from Milk to Elucidate Diversity and Determine the Distributions of Antimicrobial and Virulence Genes and Their Association with Mastitis. *Msystems* 5(4), pp.10-1128.
 174. Nilsson, I.M., Lee, J.C., Bremell, T., Ryden, C. and Tarkowski, A., 1997. The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. *Infection and immunity*, 65(10), pp.4216-4221.
 175. Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Corrente, M., Parisi, A., Santagada, G., Firinu, A., Crisetti, E. and Celano, G.V., 2007. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International journal of food microbiology*, 115(3), pp.290-296.
 176. Novick, R.P. and Geisinger, E., 2008. Quorum sensing in staphylococci. *Annual review of genetics*, 42, pp.541-564.
 177. O'Gara, J.P., 2007. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters*, 270(2), pp.179-188.
 178. Ogston, A., 1882. Micrococcus poisoning. *Journal of anatomy and physiology*, 16 (Pt 4), p.526.
 179. Oliveira, D., Borges, A. and Simões, M., 2018. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins*, 10(6), p.252.
 180. Oliveira, D.C., Wu, S.W. and de Lencastre, H., 2000. Genetic organization of the downstream region of the *mecA* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying different polymorphisms of this region. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7), pp.1906-1910.

181. Oliveira, C.S.F., Hogeveen, H., Botelho, A.M., Maia, P.V., Coelho, S.G. and Haddad, J.P.A., 2015. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. *Preventive veterinary medicine*, 121(3-4), pp.297-305.
182. Olsen, J.E., Christensen, H. and Aarestrup, F.M., 2006. Diversity and evolution of bla_Z from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), pp.450-460.
183. Østerås, O., Sølverød, L. and Reksen, O., 2006. Milk culture results in a large Norwegian survey—effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. *Journal of dairy science*, 89(3), pp.1010-1023.
184. Ote, I., Taminiau, B., Duprez, J.N., Dizier, I. and Mainil, J.G., 2011. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Veterinary microbiology*, 153(3-4), pp.285-292.
185. Overesch, G., Stephan, R. and Perreten, V., 2013. Antimicrobial susceptibility of gram-positive udder pathogens from bovine mastitis milk in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 155(6), pp.339-50.
186. Pajić, M., Boboš, S., Velebit, B., Rašić, Z., Katić, V., Radinović, M., Nikolić, A., Simonović, D. and Babić, M., 2016. Prevalence and molecular characterization of enterotoxin-producing strains of *Staphylococcus aureus* isolated from Serbian dairy cows. *Acta Veterinaria-Beograd*, 66(4), pp.466-477.
187. Pal, M., Kerorsa, G.B., Marami, L.M. and Kandi, V., 2020. Epidemiology, pathogenicity, animal infections, antibiotic resistance, public health significance, and economic impact of *staphylococcus aureus*: a comprehensive review. *American Journal of Public Health Research*, 8(1), pp.14-21.
188. Paterson, G.K., Larsen, J., Harrison, E.M., Larsen, A.R., Morgan, F.J., Peacock, S.J., Parkhill, J., Zadoks, R.N. and Holmes, M.A., 2012. First detection of livestock-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in bulk tank milk in the United Kingdom, January to July 2012. *Eurosurveillance*, 17(50), p.20337.
189. Pati, B.K. and Mukherjee, R., 2022. Prevalence of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis origin and antibiotic sensitivity pattern from Northern tropical region of India. *The Pharma Innovation Journal*, SP-11(11): 738-741
190. Patti, J. M., B. L. Allen, M. McGavin, and M. Höök. 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:585.
191. Pavlak, M., Benić, M., Cvitković, D. and Tadić, M., 2008. Epidemiological data of intramammary infection in cattle—a quantitative analysis of published data and comparison with data in Croatia. In Proceedings of the XVI Congress of the Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants, Zadar, Croatia, 26 April 2008 (pp. 97-112). University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine.

192. Peacock, S.J., Moore, C.E., Justice, A., Kantzanou, M., Story, L., Mackie, K., O'Neill, G. and Day, N.P., 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*, 70(9), pp.4987-4996.
193. Pehlivanoglu, F. and Yardimci, H., 2012. Detection of methicillin and vancomycin resistance in *Staphylococcus* strains isolated from bovine milk samples with mastitis. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(5), pp.849-855.
194. Pereyra, E.A., Picech, F., Renna, M.S., Baravalle, C., Andreotti, C.S., Russi, R., Calvinho, L.F., Diez, C. and Dallard, B.E., 2016. Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Microbiology*, 183, pp.69-77.
195. Pérez, V.K.C., da Costa, G.M., Guimarães, A.S., Heinemann, M.B., Lage, A.P. and Dorneles, E.M.S., 2020. Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of global antimicrobial resistance*, 22, pp.792-802.
196. Petersson-Wolfe, C.S., Mullarky, I.K. and Jones, G.M., 2010. *Staphylococcus aureus* mastitis: cause, detection, and control. *Virginia Cooperative Extension*
197. Peton, V., and Y. Le Loir. 2014. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect. Genet. Evol.* 21:602–615.
198. Petrovski, K.R., Trajcev, M. and Buneski, G., 2006. A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 77(2), pp.52-60.
199. Petzer, I.M., Karzis, J., Watermeyer, J.C., Van der Schans, T.J. and Van Reenen, R., 2009. Trends in udder health and emerging mastitogenic pathogens in South African dairy herds. *Journal of the South African Veterinary Association*, 80(1), pp.17-22.
200. Piccinini, R., Borromeo, V. and Zecconi, A., 2010. Relationship between *S. aureus* gene pattern and dairy herd mastitis prevalence. *Veterinary Microbiology*, 145(1-2), pp.100-105.
201. Pol, M. and Ruegg, P.L., 2007. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. *Journal of dairy science*, 90(1), pp.262-273.
202. Proctor, R.A., Kahl, B., von Eiff, C., Vaudaux, P.E., Lew, D.P. and Peters, G., 1998. *Staphylococcal* small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clinical infectious diseases*, 27 (Supplement_1), pp.S68-S74.

203. Projan, S. J. and R. P. Novick. 1997. The molecular basis of pathogenesis. In: The staphylococci in human disease. Crossley, K. B. and G. L. Archer (Eds.). *Churchill Livingstone*, N. Y., pp. 55-81.
204. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. and Carter, G.R., 1999. *Clinical Veterinary Microbiology* Wolf publishing. *London, England*, 327.
205. Rainard, P. and C. Riollot. 2003. Mobilization of neutrophils and defense of the bovinemammary gland. *Reprod. Nutr. Dev.* 43:439-57. Review.
206. Rainard, P., Foucras, G., Fitzgerald, J.R., Watts, J.L., Koop, G. and Middleton, J.R., 2018. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transboundary and emerging diseases*, 65, pp.149-165
207. Savić, N.R., Katić, V. and Velebit, B., 2014. Characteristics of coagulase positive staphylococci isolated from milk in cases of subclinical mastitis. *Acta veterinaria*, 64(1), pp.115-123.
208. Rajić Savić, N.S., 2014. Fenotipske i genotipske karakteristike koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz vimena krava. *Univerzitet u Beogradu*.
209. Rakesh Ranjan, R.R., Swarup D, S.D., Patra, R.C. and Nandi D, N.D., 2006. Bovine protothecal mastitis: a review. *CABI Reviews*, (2006), pp.7-pp.
210. Rediet, B., Kelay, B. and Alehegne, W., 2013. Dairy cows mastitis survey in Adama town, Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 5(10), pp.281-287.
211. Reinoso, E., Bettera, S., Frigerio, C., DiRenzo, M., Calzolari, A. and Bogni, C., 2004. RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts. *Microbiological research*, 159(3), pp.245-255.
212. Ren, Q., Liao, G., Wu, Z., Lv, J. and Chen, W., 2020. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China. *Journal of dairy science*, 103(4), pp.3368-3380.
213. Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gay, J.M. and Besser, T.E., 1996. Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. *American Journal of Veterinary Research*, 57(1), pp.54-58.
214. Roche, F.M., Downer, R., Keane, F., Speziale, P., Park, P.W. and Foster, T.J., 2004. The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), pp.38433-38440.

215. Ronco, T., Klaas, I.C., Stegger, M., Svennesen, L., Astrup, L.B., Farre, M., Pedersen, K., 2018. Genomic investigation of *Staphylococcus aureus* isolates from bulk tank milk and dairy cows with clinical mastitis. *Vet. Microbiol.* 215, 35–42.
216. Rose, S.G.S., Swinkels, J.M., Kremer, W.D., Kruitwagen, C.L. and Zadoks, R.N., 2003. Effect of penethamate hydriodide treatment on bacteriological cure, somatic cell count and milk production of cows and quarters with chronic subclinical *Streptococcus uberis* or *Streptococcus dysgalactiae* infection. *Journal of Dairy Research*, 70(4), pp.387-394.
217. Rosenbach, A.J.F., 1884. *Mikro-organismen bei den Wund-infections-krankheiten des Menschen*. JF Bergmann.
218. Roussel, S., Felix, B., Vingadassalon, N., Grout, J., Hennekinne, J.A., Guillier, L., Brisabois, A. and Auvray, F., 2015. *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France: comparison of different molecular typing methods, including MLVA. *Frontiers in microbiology*, 6, p.882.
219. Ruegg, P.L., 2017. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of dairy science*, 100(12), pp.10381-10397.
220. Ruppitsch, W., 2016. Molecular typing of bacteria for epidemiological surveillance and outbreak investigation/Molekulare Typisierung von Bakterien für die epidemiologische Überwachung und Ausbruchsabklärung. *Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment*, 67(4), pp.199-224.
221. Rychshanova, R., Mendybayeva, A., Miciński, B., Mamiyev, N., Shevchenko, P., Bermukhametov, Z., Orzechowski, B. and Miciński, J., 2022. Antibiotic resistance and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cows at the stage of subclinical mastitis in northern Kazakhstan. *Archives Animal Breeding*, 65(4), pp.439-448.
222. Saeed, S.I., Mat Yazid, K.A., Hashimy, H.A., Dzulkifli, S.K., Nordin, F., Nik Him, N.A., Omar, M.F.F.B., Aklilu, E., Mohamad, M., Zalati, C.W.S. and Kamaruzzaman, N.F., 2022. Prevalence, antimicrobial resistance, and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in East Coast Malaysia. *Animals*, 12(13), p.1680.
223. Said, K.B., Ismail, J., Campbell, J., Mulvey, M.R., Bourgault, A.M., Messier, S., Zhao, X., 2010. Regional profiling for determination of genotype diversity of mastitis-specific *Staphylococcus aureus* lineage in Canada by use of clumping factor A, pulsed-field gel electrophoresis, and spa typing. *J. Clin. Microbiol.* 48, 375–386.
224. Saini, V., McClure, J.T., Léger, D., Keefe, G.P., Scholl, D.T., Morck, D.W. and Barkema, H.W., 2012. Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. *Journal of dairy science*, 95(8), pp.4319-4332.

225. Salasia, S.I.O., Khusnan, Z., Lammler, C. and Zschock, M., 2004. Comparative studies on pheno-and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *Journal of Veterinary Science*, 5(2), pp.103-109.
226. Salasia, S.I., Tato, S., Sugiyono, N., Ariyanti, D., Prabawati, F., 2011. Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovines, humans, and food in Indonesia. *J. Vet. Sci.* 12, 353–361.
227. Salimena, A.P., Lange, C.C., Camussone, C., Signorini, M., Calvino, L.F., Brito, M.A., Borges, C.A., Guimarães, A.S., Ribeiro, J.B., Mendonça, L.C. and Piccoli, R.H., 2016. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. *Veterinary research communications*, 40, pp.97-106.
228. Sartori, C., Boss, R., Bodmer, M., Leuenberger, A., Ivanovic, I. and Graber, H.U., 2018. Sanitation of *Staphylococcus aureus* genotype B-positive dairy herds: a field study. *Journal of dairy science*, 101(8), pp.6897-6914.
229. Schmidt, T., Kock, M.M. and Ehlers, M.M., 2015. Diversity and antimicrobial susceptibility profiling of staphylococci isolated from bovine mastitis cases and close human contacts. *Journal of dairy science*, 98(9), pp.6256-6269.
230. Schukken, Y.H., Bronzo, V., Locatelli, C., Pollera, C., Rota, N., Casula, A., Testa, F., Scaccabarozzi, L., March, R., Zalduendo, D. and Guix, R., 2014. Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. *Journal of dairy science*, 97(8), pp.5250-5264.
231. Shariati, L., Validi, M., Hasheminia, A.M., Ghasemikhah, R., Kianpour, F., Karimi, A., Nafisi, M.R. and Tabatabaiefar, M.A., 2016. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes: Their frequency, antimicrobial patterns, and association with infectious disease in Shahrekord city, Southwest Iran. *Jundishapur journal of microbiology*, 9(1).
232. Shryock, T.R., Dye, E.S. and Kapral, F.A., 1992. The accumulation of bactericidal lipids in staphylococcal abscesses. *Journal of medical microbiology*, 36(5), pp.332-336.
233. Silvestri, L. G., and L. R. Hill. 1965. Agreement between deoxyribonucleic acid base composition and taxonomic classification of Gram-positive cocci. *J. Bacteriol.* 90:136–140.
234. Singh, K., Chandra, M., Kaur, G., Narang, D. and Gupta, D.K., 2018. Prevalence and antibiotic resistance pattern among the mastitis causing microorganisms. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 8(04), p.54.
235. Singh, S., Shukla, S., Tandia, N., Kumar, N. and Paliwal, R., 2014. ANTIBIOTIC RESIDUES: A GLOBAL CHALLENGE. *Pharma Science Monitor*, 5(3), pp.184-197.

236. Sinha, B. and Herrmann, M., 2005. Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *Thrombosis and haemostasis*, 94(08), pp.266-277.
237. Sinha, B., François, P.P., Nüße, O., Foti, M., Hartford, O.M., Vaudaux, P., Foster, T.J., Lew, D.P., Herrmann, M. and Krause, K.H., 1999. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5\beta 1$. *Cellular microbiology*, 1(2), pp.101-117.
238. Sjö Dahl, J., 1977. Repetitive Sequences in Protein A from *Staphylococcus aureus*: Arrangement of Five Regions within the Protein, Four being Highly Homologous and Fc-Binding. *European journal of biochemistry*, 73(2), pp.343-351.
239. Smeltzer, M.S., Gillaspay, A.F., Pratt Jr, F.L., Thames, M.D. and landolo, J.J., 1997. Prevalence and chromosomal map location of *Staphylococcus aureus* adhesin genes. *Gene*, 196(1-2), pp.249-259.
240. Smith, K., Gould, K.A., Ramage, G., Gemmell, C.G., Hinds, J. and Lang, S., 2010. Influence of tigecycline on expression of virulence factors in biofilm-associated cells of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(1), pp.380-387.
241. Snel, G.G., Monecke, S., Ehricht, R. and Piccinini, R., 2015. Molecular characteristics of bap-positive *Staphylococcus aureus* strains from dairy cow mastitis. *Journal of Dairy Research*, 82(3), pp.312-316.
242. Soell, M., Diab, M., Haan-Archipoff, G., Beretz, A., Herbelin, C., Poutrel, B. and Klein, J.P., 1995. Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. *Infection and immunity*, 63(4), pp.1380-1386.
243. Sol, J., Sampimon, O.C., Barkema, H.W. and Schukken, Y.H., 2000. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Journal of dairy science*, 83(2), pp.278-284.
244. Sommerhäuser, J., Kloppert, B., Wolter, W., Zschöck, M., Sobiraj, A. and Failing, K., 2003. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Veterinary microbiology*, 96(1), pp.91-102.
245. Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T.J. and Geoghegan, J.A., 2014. Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, p.171.
246. Spohr, M., Rau, J., Friedrich, A., Klittich, G., Fetsch, A., Guerra, B., Hammerl, J.A. and Tenhagen, B.A., 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in southwest Germany. *Zoonoses and Public Health*, 58(4), pp.252-261.

247. Stegger, Á., Andersen, P.S., Kearns, A., Pichon, B., Holmes, M.A., Edwards, G., Laurent, F., Teale, C., Skov, R. and Larsen, A.R., 2012. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(4), pp.395-400.
248. Stephan, R., Annemüller, C., Hassan, A.A. and Lämmler, C., 2001. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Veterinary microbiology*, 78(4), pp.373-382.
249. Stojanović, L., Petrović, M., Katić Vera (2001): Značaj mastitisa u proizvodnji mleka. *Simpozijum "Mastitis i kvalitet mleka"*, Vrnjačka Banja.
250. Stojanović L., Katić V. 2011. Higijena mleka. 3. dopunjeno izdanje, Beograd: Veterinarska komora Srbije, 177-198.
251. Straub, J.A., Hertel, C. and Hammes, W.P., 1999. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *Journal of food protection*, 62(10), pp.1150-1156.
252. Suvajdžić, B., Teodorović, V., Vasilev, D., Karabasil, N., Dimitrijević, M., Đorđević, J. and Katić, V., 2017. Detection of *icaA* and *icaD* genes of *Staphylococcus aureus* isolated in cases of bovine mastitis in the Republic of Serbia. *Acta Veterinaria-Beograd*, 67(2), pp.168-177.
253. Syring, C., Boss, R., Reist, M., Bodmer, M., Hummerjohann, J., Gehrig, P. and Graber, H.U., 2012. Bovine mastitis: The diagnostic properties of a PCR-based assay to monitor the *Staphylococcus aureus* genotype B status of a herd, using bulk tank milk. *Journal of dairy science*, 95(7), pp.3674-3682.
254. Taglialegna, A., Navarro, S., Ventura, S., Garnett, J.A., Matthews, S., Penades, J.R., Lasa, I. and Valle, J., 2016. Staphylococcal Bap proteins build amyloid scaffold biofilm matrices in response to environmental signals. *PLoS pathogens*, 12(6), p.e1005711.
255. Tam, K. and Torres, V.J., 2019. *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. *Microbiology spectrum*, 7(2), pp.7-2.
256. Taponen, S., Liski, E., Heikkilä, A.M. and Pyörälä, S., 2017. Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*. *Journal of dairy science*, 100(1), pp.493-503.
257. Tassew, A., Aki, A. and Legesse, K., 2017. Isolation, identification and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* and occurrence of methicillin

resistant *S. aureus* isolated from mastitic lactating cows in and around assosa town, Benishangul Gumuz region, Ethiopia. *J. Dairy Vet. Anim. Res*, 6, p.180.

258. Tenhagen, B.A., Alt, K., Pfefferkorn, B., Wiehle, L., Käsbohrer, A. and Fetsch, A., 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in conventional and organic dairy herds in Germany. *Journal of dairy science*, 101(4), pp.3380-3386.
259. Tenhagen, B.A., Köster, G., Wallmann, J. and Heuwieser, W., 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *Journal of dairy science*, 89(7), pp.2542-2551.
260. Thiran, E., Di Ciccio, P.A., Graber, H.U., Zanardi, E., Ianieri, A. and Hummerjohann, J., 2018. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* dairy isolates representing different genotypes. *Journal of Dairy Science*, 101(2), pp.1000-1012.
261. Tiwari, B.B., Subedi, D., Bhandari, S., Shrestha, P., Pathak, C.R., Chandran, D., Pandey, G., Mohankumar, P. and Dhama, K., 2022. Prevalence and Risk Factors of Staphylococcal Subclinical Mastitis in Dairy Animals of Chitwan, Nepal. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 16(2).
262. Tollersrud, T., Kampen, A.H. and Kenny, K., 2006. *Staphylococcus aureus* enterotoxin D is secreted in milk and stimulates specific antibody responses in cows in the course of experimental intramammary infection. *Infection and immunity*, 74(6), pp.3507-3512.
263. Torres, G., Vargas, K., Cuesta-Astroz, Y., Reyes-Vélez, J., Olivera-Angel, M., 2020. Phenotypic characterization and whole genome analysis of a strong biofilmforming *Staphylococcus aureus* strain associated with subclinical bovine mastitis in Colombia. *Front. Vet. Sci.* 4 (7), 530.
264. Uhlen, M., Guss, B., Nilsson, B., Gatenbeck, S., Philipson, L. and Lindberg, M., 1984. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *Journal of Biological Chemistry*, 259(3), pp.1695-1702.
265. Vakanjac, S., Pavlović, M. & Pavlović, V. 2010. Testing the efficiency of different treatments of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in cows during the dry period. *Acta Veterinaria*, 60, 227-239.
266. Vakanjac, S., Pavlović, V., Magaš, V., Pavlović, M., Đurić, M., Maletić, M., Nedić, S. and Sočo, I., 2013. Investigations of efficacy of intramammary applied antimicrobials and glucocorticosteroides in the treatment of subclinical and clinical mastitis in cows. *Veterinarski glasnik*, 67(1-2), pp.15-27.
267. Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M.C., Lina, G., Nimmo, G.R., Heffernan, H., Liassine, N., Bes, M., Greenland, T., Reverdy, M.E. and Etienne, J., 2003. Community-

- acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerging infectious diseases*, 9(8), p.978.
268. Vandenesch, F., Lina, G. and Henry, T., 2012. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors?. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, p.12.
269. Vanderhaeghen, W., Cerpentier, T., Adriaensen, C., Vicca, J., Hermans, K., Butaye, P., 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Vet. Microbiol.* 144, 166–171.
270. Vann, J.M. and Proctor, R.A., 1988. Cytotoxic effects of ingested *Staphylococcus aureus* on bovine endothelial cells: role of *S. aureus* α -hemolysin. *Microbial pathogenesis*, 4(6), pp.443-453.
271. Vasudevan, P., Nair, M.K.M., Annamalai, T. and Venkitanarayanan, K.S., 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary microbiology*, 92(1-2), pp.179-185.
272. Veh, K.A., Klein, R.C., Ster, C., Keefe, G., Lacasse, P., Scholl, D., Roy, J.P., Haine, D., Dufour, S., Talbot, B.G. and Ribon, A.O.B., 2015. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. *Journal of dairy science*, 98(1), pp.155-168.
273. Verbeke J, Piepers S, Supré K, De Vlieghe S. 2014. Pathogen specific incidence rate of clinical mastitis in Flemish dairy herds, severity, and association with herd hygiene. *Journal of Dairy Science*, 97, 6926–6934.
274. Verdon, J., Girardin, N., Lacombe, C., Berjeaud, J.M. and Hécharde, Y., 2009. δ -hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides*, 30(4), pp.817-823.
275. Voelk, V., Graber, H.U., van den Borne, B.H.P., Sartori, C., Steiner, A., Bodmer, M. and Haerdi-Landerer, M.C., 2014. A longitudinal study investigating the prevalence of *Staphylococcus aureus* genotype B in seasonally communal dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 7(97), pp.4184-4192.
276. Vrieling, M., Koymans, K.J., Heesterbeek, D.A.C., Aerts, P.C., Rutten, V.P.M.G., De Haas, C.J.C., Van Kessel, K.P.M., Koets, A.P., Nijland, R. and van Strijp, J.A.G., 2015. Bovine *Staphylococcus aureus* secretes the leukocidin LukMF' to kill migrating neutrophils through CCR1. *MBio*, 6(3), pp.10-1128.
277. Wang, D., Zhang, L., Zhou, X., He, Y., Yong, C., Shen, M., Szenci, O. and Han, B., 2016. Antimicrobial susceptibility, virulence genes, and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from bovine mastitis in Ningxia, China. *Journal of Dairy Science*, 99(12), pp.9560-9569.

278. Wang, W., Lin, X., Jiang, T., Peng, Z., Xu, J., Yi, L., Li, F., Fanning, S. and Baloch, Z., 2018. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* cultured from raw milk taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China. *Frontiers in microbiology*, 9, p.1123.
279. Wang, D., Wang, Z., Yan, Z., Wu, J., Ali, T., Li, J., Lv, Y. and Han, B., 2015. Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: Antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. *Infection, Genetics and Evolution*, 31, pp.9-16.
280. Wang, F., Hongjun, Y., Hong-Bin, H., Changfa, W., Yundong, G., Qifeng, Z., Xiaohong, W. and Yanjun, Z., 2011. Study on the hemolysin phenotype and the genotype distribution of *staphylococcus aureus* caused bovine mastitis in shandong dairy farms. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.*, 9, 416–421.
281. Wang, K., Cha, J., Liu, K., Deng, J., Yang, B., Xu, H., Wang, J., Zhang, L., Gu, X., Huang, C. and Qu, W., 2022. The prevalence of bovine mastitis-associated *Staphylococcus aureus* in China and its antimicrobial resistance rate: A meta-analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. p.1006676.
282. Watts, J.L. and Salmon, S.A., 1997. Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce β -lactamase. *Journal of dairy science*, 80(4), pp.788-791.
283. Welsh, J. and McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*, 18(24), pp.7213-7218.
284. Yang, F., Zhang, S., Shang, X., Li, H., Zhang, H., Cui, D., Wang, X., Wang, L., Yan, Z. and Sun, Y., 2020. Detection and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis cases in China. *Journal of Dairy Science*, 103(1), pp.840-845.
285. Zadoks, R.N., Schukken, Y.H., 2006. Use molecular epidemiology in veterinary practice. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 22, 229–261.
286. Zadoks, R.N., Van Leeuwen, W.B., Kreft, D., Fox, L.K., Barkema, H.W., Schukken, Y.H. and Van Belkum, A., 2002. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *Journal of clinical microbiology*, 40(11), pp.3894-3902.
287. Zdravković, N., 2016. Ispitivanje antibakterijskog dejstva karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola prema sojevima *Staphylococcus aureus* izolovanih u slučajevima mastitisa krava. Univerzitet u Beogradu.
288. Zecconi, A., 2010. *Staphylococcus aureus* mastitis: what we need to know to control them. *Isr J Vet Med*, 65(3), pp.93-99.

289. Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Daprà, V. and Piccinini, R., 2006. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial pathogenesis*, 40(4), pp.177-183.
290. Zeryehun, T., Aya, T. and Bayecha, R., 2013. Study on prevalence, bacterial pathogens and associated risk factors of bovine mastitis in small holder dairy farms in and around Addis Ababa, Ethiopia. *J Anim Plant Sci*, 23(1), pp.50-55
291. Zhang, L., Li, Y., Bao, H., Wei, R., Zhou, Y., Zhang, H., Wang, R., 2016a. Population structure and antimicrobial profile of *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis in China. *Microb. Pathog.* 97, 103–109.
292. Zhang, Z., Li, X.P., Yang, F., Luo, J.Y., Wang, X.R., Liu, L.H. and Li, H.S., 2016b. Influences of season, parity, lactation, udder area, milk yield, and clinical symptoms on intramammary infection in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(8), pp.6484-6493.
293. Zhang, Z., Chen, Y., Li, X., Wang, X. and Li, H., 2022. Detection of antibiotic resistance, virulence gene, and drug resistance gene of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine Mastitis. *Microbiology Spectrum*, 10(4), pp.e00471-22.
294. Zhang, D.X., Li, Y., Yang, X.Q., Su, H.Y., Wang, Q., Zhang, Z.H., Liu, Y.C., Tian, C.L., Cui, C.C. and Liu, M.C., 2020. *In vitro* antibiotic susceptibility, virulence genes distribution and biofilm production of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in the Liaoning Province of China. *Infection and Drug Resistance*, pp.1365-1375.
295. Zopf, W., 1885. *Die spaltpilze*. Eduard Trewendt.
296. Zouharova, M. and Rysanek, D., 2008. Multiplex PCR and RPLA identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains from bulk tank milk. *Zoonoses and Public health*, 55(6), pp.313-319.
297. Zschöck, M., Kloppert, B., Wolter, W., Hamann, H.P. and Lämmler, C.H., 2005. Pattern of enterotoxin genes seg, seh, sei and sej positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Veterinary microbiology*, 108(3-4), pp.243-249.
298. Zuniga, E., Melville, P.A., Saidenberg, A.B., Laes, M.A., Gonsales, F.F., Salaberry, S.R., Gregori, F., Brandão, P.E., dos Santos, F.G., Lincopan, N.E. and Benites, N.R., 2015. Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. *Microbial Pathogenesis*, 89, pp.1-6.
299. Zutic, M., Cirkovic, I., Pavlovic, L., Zutic, J., Asanin, J., Radanovic, O. and Pavlovic, N., 2012. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk samples from Serbian cows with subclinical mastitis. *Afr. J. Microbiol. Res*, 6(29), pp.5887-5889.

Biografija

Slobodan Vujinović je rođen 28.01.1989. godine u Šapcu. Osnovnu školu je završio u Zminjaku, a srednju poljoprivrednu školu, smer veterinarski tehničar u Šapcu. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2008/2009. godine, a diplomirao je 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,49. Iste godine je upisao doktorske akademske studije i položio sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 9,73.

Pripravnički staž obavio je u Veterinarskom specijalističkom institutu "Šabac" u Šapcu. Od 1. marta 2016. zaposlen je u Veterinarskom specijalističkom institutu "Sabac", prvobitno kao stručni saradnik u laboratoriji za mikrobiologiju, serologiju i parazitologiju, a od 2017. zaposlen je u Sektoru za zdravstvenu zaštitu životinja. Jedan je od osnivača Laboratorije za molekularna ispitivanja u institutu, a rukovodilac je od 2020. godine.

U periodu od 2016 do 2019. završio je specijalističke akademske studije i užu specijalizaciju iz oblasti Epizootiologije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Od početka pandemije Kovid 19 u Srbiji 2020. do sredine 2022. godine aktivno je učestvovao u dijagnostikovanju virusa SARS-CoV2.

Autor je i koautor većeg broja naučnih i stručnih radova. Oženjen je, otac troje dece.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Слободан Б. Вујиновић

број уписа 14/4

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање вирулентности и преваленције генотипова коагулаза позитивних стафилокока узрочника маститиса крива

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора	Слободан Б. Вујиновић
Број уписа	14/4
Студијски програм	Докторске академске студије
Наслов рада	Испитивање вирулентности и преваленције генотипова коагулаза позитивних стафилокока узрочника маститиса крвава
Ментор	др Вера Катић, редовни професор
Потписани	Слободан Б. Вујиновић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Испитивање вирулентности и преваленције генотипова коагулаза позитивних стафилокока узрочника маститиса крива

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.