

ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI *STAPHYLOCOCCUS* VRSTA NA NEKE ANTIBAKTERIJSKE LEKOVE PRIMENOM DISK DIFUZIJE I MIKRODILUCIJE METODE U BUJONU*
INVESTIGATION OF SUSCEPTIBILITY OF STAPHYLOCOCCUS SPECIES TO SOME ANTIBACTERIAL DRUGS BY DISK DIFFUSION AND BROTH MICRODILUTION

Jelena Ašanin, Ksenija Aksentijević, M. Žutić, Vera Katić, D. Krnjaić, N. Milić, Ružica Ašanin, D. Mišić**

Cilj ovog rada je bila identifikacija izolovanih vrsta stafilokoka i ispitivanje njihove osetljivosti na neke antibakterijske lekove. Kao materijal u ovom ispitivanju korišćeni su izolati stafilokoka poreklom iz uzoraka mleka. Ukupno je ispitano 25 sojeva izolovanih stafilokoka od kojih su 24 poticala iz uzoraka mleka krava sa mastitisom, a jedan soj je izolovan iz uzorka mleka krave nakon lečenja mastitisa. U primarnoj identifikaciji su korišćeni katalaza i oksidaza testovi, kao i test prisustva slobodne koagulaze. Nakon izvođenja preliminarnih testova, vršena je identifikacija izolovanih sojeva, primenom komercijalnih sistema ID32 STAPH (bioMérieux, Francuska) i BBL Crystal Gram-Positive ID Kit (Becton Dickinson, SAD) prema uputstvima proizvođača.

Osetljivost izolovanih sojeva stafilokoka ispitivana je na: oksacilin, penicilin, cefoksitin, gentamicin, eritromicin, hloramfenikol, tetraciklin, ciprofloksacin, sulfametoksazol/trimetoprim i vankomicin primenom disk difuzije metode i mikrodilucije metode u bujonu prema preporukama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2003), a tumačenje rezultata je vršeno prema preporukama CLSI iz 2008. i 2010. godine. Korišćeni su antibiogram diskovi proizvođača Becton Dickinson (SAD), a za mikrodiluciju metodu u bujonu korišćene su čiste supstance antibakterijskih

* Rad primljen za štampu 30. 12. 2011. godine

** Dr med. Jelena Ašanin, istraživač saradnik, Inovacioni Centar Tehnološko-Metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu; mr sc. med. vet. Ksenija Aksentijević, asistent, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; dr sc. med. vet. Milenko Žutić, naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; dr sc. med. vet. Vera Katić, profesor, dr sc. med. vet. Dejan Krnjaić, vanr. profesor, dr sc. med. vet. Nenad Milić, profesor, dr sc. med. vet. Ružica Ašanin, profesor, dr sc. med. vet. Dušan Mišić, docent, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

lekova različitih proizvođača: eritromicin, hloramfenikol, cefoksitin, gentamicin, oksacilin, tetraciklin (Sigma Aldrich, SAD), sulfametoksazol (Fluka, SAD), penicilin (Calbiochem, Nemačka), vankomicin (Abbott laboratories, SAD), ciprofloksacin i trimetoprim (Zdravlje A.D., Srbija). Svih 25 sojeva je bilo katalaza pozitivno i oksidaza negativno. Od 25 sojeva, 19 je bilo koagulaza-pozitivno, a 6 koagulaza-negativno. Primenom disk difuzione metode od 19 sojeva *S. aureus* kod 17 je utvrđena rezistencija na penicilin (89,5%), a kod 2 soja na gentamicin (10,5%). Od 3 soja *S. xylosus*, kod jednog je primenom disk difuzione metode utvrđena rezistencija na tetraciklin (33,3%) i na oksacilin (33,3%), dok je kod drugog soja utvrđena rezistencija na penicilin (33,3%). Treći soj *S. xylosus* je bio osetljiv na sve ispitivane antibiotike. Kod dva soja *S. simulans* i jednog soja *S. haemolyticus* nije utvrđena rezistencija ni na jedan od ispitivanih antibiotika primenom disk difuzione metode. Primenom mikrodilucione metode u bujonu kod 13 sojeva *S. aureus* je utvrđena rezistencija na penicilin (68,4%) sa vrednostima minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) od 0,5 do 4 µg/ml, kod 2 soja na gentamicin (10,5%) sa vrednostima MIC od 32 µg/ml, a intermedijarna osetljivost na hloramfenikol utvrđena je kod 9 sojeva *S. aureus* (47,4%) sa vrednostima MIC od 16 µg/ml i na vankomicin kod jednog soja *S. aureus* (5,3%) čija je vrednost MIC iznosila 4 µg/ml.

Ključne reči: mastitis, staphylococcus, antibakterijski lekovi, rezistencija

Uvod / Introduction

Još 1878. godine Koh (Robert Koch) je zapazio kokoidne oblike u gnoju pacijenta, a zatim i prepoznao da su pojedine bolesti, poput dubokih apscesa kože, povezane sa prisustvom koka koje formiraju grozdove. Nakon dve godine (1880) Koh je uspeo da ih kultiviše u tečnoj hranljivoj podlozi, a zatim ih je Ogston 1882. godine nazvao stafilokokama (*Staphylococcus*). Nešto kasnije, 1884. godine, Rozenbah (Friedrich Julius Rosenbach) je uspeo da na hranljivoj podlozi izoluje čistu kulturu stafilokoka iz materijala uzetog iz rane kod čoveka. Iako su dugo poznate čovečanstvu, *Staphylococcus* vrste još uvek predstavljaju mikroorganizme koji su u centru pažnje naučne i stručne javnosti. Nalaze se kod ljudi i svih vrsta životinja, pa se mogu naći i u namirnicama različitog porekla. Veoma lako se prilagođavaju spoljašnjim uslovima sredine i sposobne su da izazovu širok spektar infekcija, počev od benignih infekcija kože do vrlo ozbiljnih stanja koja ugrožavaju život, kao što su septikemije i nekrotizirajuća pneumonija.

Staphylococcus aureus kod krava izaziva mastitis i impetigo vimena, kod ovaca i koza dovodi do mastitisa i dermatitisa, a kod jagnjadi do pijemije nakon ujeda krpelja, kao i benignog folikulitisa (Quinn i sar., 2002).

Osim izučavanja sposobnosti *S. aureus* i ostalih vrsta stafilokoka da izazovu brojne infekcije, velika pažnja je usmerena na njihovu rastuću rezistenciju na različite antibiotike, a posebno na β -laktame. Kako je koja grupa antibiotika uvedena u kliničku praksu, tako su stafilokoke vrlo brzo sticale rezistenciju na njih, verovatno brže od svih ostalih vrsta bakterija. Ovaj podatak izaziva paniku, jer su stafilokoke svuda prisutne, pa tako i sposobne da izazovu infekcije koje bi, zbog njihove rezistencije, bilo vrlo teško lečiti. Dok penicilin, kao prvi predstavnik β -laktamskih antibiotika, nije uveden u kliničku praksu, smrtnost od infekcija izazvanih vrstom *S. aureus* je iznosila do 80%. Danas se smatra da skoro ne postoje sojevi *S. aureus* koji su osetljivi na penicilin. Najznačajniji tip rezistencije na antibiotike koju vrste iz ovog roda mogu imati je rezistencija na meticilin, koja predstavlja rezistenciju na sve β -laktamske antibiotike. Rezistencija na vankomicin *Staphylococcus* vrsta predstavlja još veću opasnost od rezistencije na meticilin, jer su, pored nekih novih antibiotika, glikopeptidni antibiotici poslednja odbrana protiv stafilokoknih infekcija. Iako je vankomicin odavno uveden u kliničku praksu, stafilokoke su rezistenciju na njega stekle dugo posle njegovog uvođenja u kliničku praksu i taj tip rezistencije nije toliko zastupljen, koliko rezistencija na meticilin.

Ranije je vladalo mišljenje da su različite vrste stafilokoka strogo adaptirane na određene domaćine i da je prenos stafilokoka sa jedne vrste domaćina na drugu vrstu domaćina nemoguć. Međutim, dokazano je da, iako postoje neki sojevi pojedinih vrsta koji su specifično adaptirani na određenog domaćina, većina vrsta stafilokoka se može preneti sa jedne vrste domaćina na drugu. Da bi situacija bila još gora, takvi sojevi su vrlo često multirezistentni i meticilin-rezistentni, pa je tako zabeležen i dokazan prenos MRSA (meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus*) sojeva između ljudi i pasa, ljudi i konja, ljudi i svinja itd (Van Loo i sar., 2007).

Vrste iz velike grupe poznate kao koagulaza-negativne stafilokoke (CoNS) se normalno nalaze na koži i mukoznim membranama i imaju ulogu komensala ili saprofita. Smatralo se da u kliničkim materijalima predstavljaju kontaminante, pa čak i onda kada su ti materijali poticali iz primarno sterilnih regija tela. Međutim, ukoliko dođe do oštećenja kože, zbog traume, injekcionih procedura ili prisustva stranih tela, CoNS prodiru u dublje strukture organizma, nakon čega mogu izazvati infekcije opasne po život. U namirnicama i hrani za životinje njihovo prisustvo nije ni utvrđivano. Prvi slučaj izolacije CoNS poreklom od krave sa mastitisom je zabeležen 1916. godine. U istraživanjima CoNS su dugo vremena bile zapostavljane, ali je danas velika pažnja usmerena na njih iz više razloga. Prvi razlog je to što veliki broj sojeva CoNS pokazuje rezistenciju na meticilin. Do 80% izolovanih sojeva CoNS iz bolničke sredine je rezistentno na meticilin. Drugi razlog je to što CoNS izazivaju veliki broj infekcija kod bolesnika u bolnicama, koje se vrlo teško leče zbog njihove rezistencije na antibiotike. Treći razlog, ali nikako najmanje važan, je što CoNS predstavljaju rezervoar gena rezistencije za različite sojeve meticilin-osetljivih stafilokoka, uključujući i meticilin-osetljive sojeve *S. aureus* (MSSA). Kod krava CoNS izazivaju supkliničke i kliničke

mastitise, koji dovode do ekonomskih gubitaka zbog smanjene proizvodnje mleka. (Busscher i sar., 2006; Vengust i sar., 2006). Takođe, koagulaza-negativne stafilocoke su rezistentnije na antibiotike od *S. aureus* i brže razvijaju multirezistenciju. U većini studija izolati CoNS su *in vitro* testirani na penicilin, koji se koristi u lečenju mastitisa izazvanih penicilin-osetljivim CoNS, ali je veliki broj izolata CoNS bio rezistentan na penicilin (Taponen i Pyörälä, 2009). Utvrđeno je da u namirnicama CoNS mogu lučiti enterotoksine, zbog čega predstavljaju opasnost po zdravlje ljudi. Produkcija različitih stafilokoknih enterotoksina i toksina 1 toksičnog šok sindroma, bila je česta kod CoNS izolata isto kao kod izolata *S. aureus*, bilo da su poticali iz uzoraka kod slučajeva supkliničkog, hroničnog ili akutnog mastitisa (Kuroishi i sar., 2003).

Dominantne CoNS vrste u prostirci i okolini u kojoj se nalaze krave su *S. xylosus*, *S. sciuri* i *S. saprophyticus*. Iste vrste su često izolovane sa kože krava, nozdrva, kože bradavice i ostalih mesta. Mnoge druge vrste, uključujući *S. chromogenes*, *S. warneri* i *S. epidermidis* su takođe izolovane sa kože krava. Osim *S. chromogenes*, CoNS vrste često izolovane sa kože bradavice, vrha bradavice i sisnog kanala se razlikuju od vrsta CoNS izolovanih iz mleka. *Staphylococcus xylosus*, *S. sciuri* i *S. haemolyticus* su vrste koje dominiraju u uzorcima sa kože i apeksa bradavice, dok su *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. simulans* i grupa neidentifikovanih stafilokoka često izolovane iz uzoraka mleka

Iz mleka krava sa kliničkim i supkliničkim mastitisom povremeno se može izolovati *S. haemolyticus* (Quinn i sar., 2002; Koneman i sar., 2006). Takođe *S. simulans* je vrsta koja je često izolovana tokom laktacije. U nekim studijama izolati koji su poticali iz uzoraka kliničkih i supkliničkih mastitisa, najčešće su identifikovani kao *S. simulans* (Taponen i sar., 2006; Taponen i Pyörälä, 2009).

Svi navedeni podaci ukazuju na to da je značaj ovih vrsta bakterija, kako u humanoj, tako i u veterinarskoj medicini veliki, ali novijih podataka o njihovom prisustvu i rezistenciji u Republici Srbiji nema.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Kao materijal su korišćeni izolati stafilokoka poreklom iz uzoraka mleka krava sa klinički manifestnim mastitisom. Od 25 sojeva stafilokoka izolovanih iz uzoraka poreklom od životinja, 24 su poticala iz uzoraka mleka krava sa mastitisom, a jedan soj je izolovan iz uzorka mleka krave nakon lečenja mastitisa.

Od svih izolata stafilokoka iz ispitivanih uzoraka pripremani su preparati koji su bojeni po Gramu. Sve gram-pozitivne koke u grozdovima su potvrđene daljem ispitivanju. U primarnoj identifikaciji su korišćeni katalaza i oksidaza testovi, kao i test slobodne koagulaze.

Nakon izvođenja preliminarnih testova, vršena je identifikacija izolovanih sojeva, primenom komercijalnih sistema ID32 STAPH (bioMérieux, Francuska) i BBL Crystal Gram-Positive ID Kit (Becton Dickinson, SAD) prema uputstvima proizvođača. Osetljivost izolovanih sojeva stafilokoka je ispitivana na sledeće

antibakterijske lekove: oksacilin, penicilin, cefoksitin, gentamicin, eritromicin, hloramfenikol, tetraciklin, ciprofloksacin, trimetoprim/sulfametoksazol i vankomicin primenom disk difuzione metode i mikrodilucione metode u bujonu prema preporukama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2003), a tumačenje rezultata je vršeno prema preporukama CLSI iz 2008. i 2010. godine. Korišćeni su antibiogram diskovi proizvođača Becton Dickinson (SAD), a čiste supstance antibakterijskih lekova korišćene za mikrodilucionu metodu u bujonu su bili sledećih proizvođača: eritromicin, hloramfenikol, cefoksitin, gentamicin, oksacilin, tetraciklin (Sigma Aldrich, SAD), sulfametoksazol (Fluka, SAD), penicilin (Calbiochem, Nemačka), vankomicin (Abbott laboratories, SAD), ciprofloksacin i trimetoprim (Zdravlje A.D., Srbija). Osetljivost na antibiotike izolovanih sojeva stafilokoka metodom disk difuzije je ispitivana na Mueller Hinton agaru (bioMérieux, Francuska).

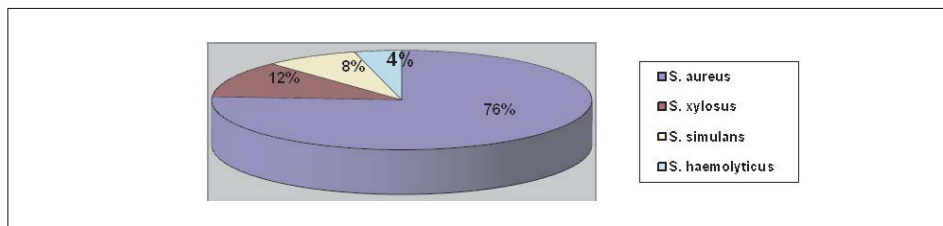
Rezultati su očitavani merenjem prečnika zona inhibicije, na osnovu kojih su utvrđivane interpretativne kategorije (S, I, R). Za kontrolu kvaliteta izvođenja ove metode, kao i kvaliteta antibiogram diskova korišćen je referentni soj *S. aureus* ATCC 25923. Osetljivost na antibiotike izolovanih sojeva stafilokoka mikrodilucionom metodom ispitivana je u Cation Adjusted Mueller Hinton 2 bujonu (Becton Dickinson, SAD). Rastvori antibiotika u čistim supstancama su pripremani prema preporukama CLSI. Za ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva stafilokoka na oksacilin, u podlogu je dodavan NaCl (Zorka Šabac, Srbija) u koncentraciji od 2%. Metoda je izvođena u mikrotitracionim pločama sa „U“ dnom (Spektar d.o.o. Čačak, Srbija) u koje je unošena podloga, a zatim i antibiotici u određenim koncentracijama. Raspon koncentracija antibakterijskih lekova se kretao: za penicilin od 0,12 do 256 µg/ml; za cefoksitin od 0,12 do 256 µg/ml; za gentamicin od 0,06 do 126 µg/ml; za eritromicin od 0,12 do 256 µg/ml; za hloramfenikol od 0,25 do 512 µg/ml; za tetraciklin od 0,06 do 128 µg/ml; za ciprofloksacin od 0,0015 do 32 µg/ml; za oksacilin 0,06 do 128 µg/ml; za trimetoprim/ sulfametoksazol od 0,004/0,075 do 8/152 µg/ml i za vankomicin od 0,12 do 256 µg/ml. Ispitivani sojevi su inokulisani u bazenčiće u finalnoj koncentraciji od 5×10^5 CFU/ml. Inkubacija je obavljena na temperaturi od 37°C tokom 16-18 h, osim za oksacilin i vankomicin, kada je vreme trajanja inkubacije iznosilo 24 h. Za kontrolu kvaliteta izvođenja mikrodilucione metode, kao i kvaliteta upotrebljenih antibakterijskih lekova je korišćen referentni soj *S. aureus* ATCC 29213.

Rezultati / Results

Izolovano je 25 sojeva iz uzoraka mleka krava sa mastitisom. Svi sojevi su bili katalaza pozitivni i oksidaza negativni. Izolovane stafilokoke su identifikovane do vrste primenom sistema ID32 STAPH i BBL Crystal GP.

Od 25 sojeva poreklom iz uzoraka mleka krava sa mastitisom, 19 je identifikovano kao *Staphylococcus aureus* (76%) primenom oba sistema, 3 kao *Staphylococcus xylosus* (12%) primenom BBL Crystal GP sistema, dok je ID32

STAPH jedan soj identifikovao kao *S. equorum* (u daljem tekstu prikazan kao *S. xylosus*), 2 kao *Staphylococcus simulans* (8%) i 1 kao *Staphylococcus haemolyticus* (4%), sva 3 soja su identifikovana primenom oba sistema identično.



Grafikon 1. Prikaz zastupljenosti pojedinih vrsta stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka krava sa mastitisom /

Graph 1. Representation of the different *Staphylococcus* strains isolated from milk samples from cows with mastitis

Primenom disk difuzione metode, od 19 sojeva *S. aureus* kod 17 je utvrđena rezistencija na penicilin (89,5%), a kod 2 soja na gentamicin (10,5%). Od 3 soja *S. xylosus*, kod jednog je primenom disk difuzione metode utvrđena rezistencija na tetraciklin (33,3%) i na oksacilin (33,3%), dok je kod drugog soja utvrđena rezistencija na penicilin (33,3%). Treći soj *S. xylosus* je bio osetljiv na svih 10 ispitivanih antibiotika. Kod 2 soja *S. simulans* i jednog soja *S. haemolyticus* nije utvrđena rezistencija ni na jedan od ispitivanih antibiotika primenom disk difuzione metode. Primenom mikrodilucione metode u bujonu kod 13 sojeva *S. aureus* je utvrđena rezistencija na penicilin (68,4% sa vrednostima MIC od 0,5 do 4 µg/mL), a kod 2 soja na gentamicin (10,5%, vrednost MIC od 32 µg/mL.), dok je na 2 antibiotika ustanovljena intermedijarna osetljivost i to na hloramfenikol kod 9 sojeva (47,4%, vrednost MIC od 16 µg/mL) i na vankomicin kod 1 soja *S. aureus* (5,3% vrednost MIC od 4 µg/mL).

Rasponi vrednosti MIC za ispitivane antibiotike prikazani su u tabeli 1. Od 3 soja *S. xylosus*, primenom mikrodilucione metode u bujonu, utvrđena je rezistencija kod jednog soja na tetraciklin (33,3%) i na oksacilin (33%), a kod drugog na penicilin (33,3%). Treći soj je primenom mikrodilucione metode u bujonu bio osetljiv na svih 10 ispitivanih antibakterijskih lekova. Kod jednog od 2 soja *S. simulans* primenom mikrodilucione metode u bujonu je utvrđena intermedijarna osetljivost na hloramfenikol, dok je drugi bio osetljiv na svih 10 antibakterijskih lekova. Primenom mikrodilucione metode u bujonu kod soja *S. haemolyticus* nije utvrđena rezistencija ni na jedan od ispitivanih antibakterijskih lekova.

Na grafikonu koji sledi (grafikon 2) su prikazane razlike u rezultatima ispitivanja osetljivosti na antibiotike dobijene primenom disk difuzione metode i mikrodilucione metode u bujonu za 25 sojeva poreklom iz uzoraka mleka krava sa mastitisom. Razlika se može videti kod hloramfenikola, na koji je 40% sojeva bilo intermedijarno osetljivo primenom mikrodilucione metode u bujonu, dok su pri-

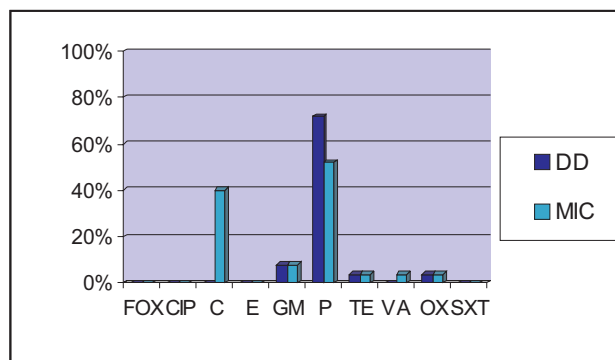
menom disk difuzione metode svi sojevi bili osetljivi na hloramfenikol. Takođe je 4% sojeva bilo intermedijarno osetljivo na vankomicin primenom mikrodilucione metode u bujonu, dok su svi sojevi bili osetljivi na vankomicin primenom disk difuzione metode. Može se videti i razlika u rezultatima ispitivanja osetljivosti na penicilin, jer je primenom mikrodilucione metode u bujonu na penicilin bilo rezistentno 52% sojeva, a primenom disk difuzione metode 72%. Rezultati osetljivosti ispitivanih sojeva stafilokoka na gentamicin (8%) i tetraciklin (4%) bili su identični primenom obe metode.

Tabela 1. Rasponi u kojima su se kretale MIC vrednosti ($\mu\text{g/mL}$) ispitivanih antibakterijskih lekova prema vrstama izolovanih stafilokoka iz uzoraka mleka krava sa mastitisom / Table 1. Range of MIC values ($\mu\text{g/mL}$) of examined antibacterial drugs according to species of *Staphylococcus* isolates from milk samples from cows with mastitis

Izolovane vrste / Isolated species	FOX	CIP	C	E	GM	P	TE	VA	OX	SXT*
<i>S. aureus</i>	1-4	0,03 - 0,12	8-16	0,25 - 0,5	$\leq 0,06$ -32	$\leq 0,12$ -4	0,12 -2	0,5-4	0,12 - 0,5	0,06 - 0,5
<i>S. xylosus</i>	1-2	0,12	4-8	0,25	$\leq 0,06$	$\leq 0,12$	1->128	0,5-1	0,25 -1	0,12-0,5
<i>S. simulans</i>	2-4	0,03	8-16	0,25 - 0,5	$\leq 0,06$	$\leq 0,12$	0,5 - 1	1-2	0,25	0,5-1
<i>S. haemolyticus</i>	1	0,06	8	0,25	$\leq 0,06$	$\leq 0,12$	0,5	1	0,25	0,5

* Vrednosti za trimetoprim/sulfametoksazol (SXT) su prikazane prema vrednostima trimetoprima; njihov odnos je 1:19 (T/S) /

* Values for trimetoprim/sulfametoxazol(SXT) are shown according to values for trimetoprim; their ratio is 1:19 (T/S)



Grafikon 2. Prikaz rezistencije i razlike u rezultatima između mikrodilucione metode u bujonu i disk difuzione metode za sojeve poreklom iz uzoraka mleka krava sa mastitisom *sojevi su primenom mikrodilucione metode u bujonu bili intermedijarno osetljivi / Graph 2. Resistance and difference in results between broth microdilution method and disk diffusion method for strains originating from milk samples from cows with mastitis *using the broth microdilution method strains were intermediately sensitive

Diskusija / Discussion

U ovom ispitivanju su korišćene 2 metode za ispitivanje osetljivosti bakterija na antibiotike. Od 19 sojeva *S. aureus*, izolovanih iz uzoraka mleka krava sa mastitisom disk difuzionom metodom je utvrđena rezistencija na penicilin kod 17 sojeva, dok je mikrodilucionom metodom u bujonu rezistencija utvrđena kod 13 sojeva. Po preporukama CLSI, poželjnije je ispitivanje osetljivosti sojeva stafilocoka na penicilin, umesto na ampicilin, jer se tako lakše detektuju sojevi koji produkuju β -laktamaze. Na osnovu osetljivosti na penicilin, može se predvideti i osetljivost na većinu drugih penicilina. Pošto se smatra da je prevalencija penicilin-osetljivih sojeva *S. aureus* niska, preporuka je da se za sojeve koji imaju vrednosti $MIC \leq 0.12 \mu\text{g/ml}$ ili zonu inhibicije $\geq 29\text{mm}$, koristi test za indukciju β -laktamaza (nitrocefinski test), pre nego što se soj prijavi kao osetljiv na penicilin (CLSI, 2010). Rezistencija na penicilin kod sojeva *S. aureus* izolovanih iz uzoraka mleka krava sa mastitisom varira i kreće se od 5% u Norveškoj do 87% u Brazilu (Aarestrup, 2006). U istraživanju čeških autora (Schlegelova i sar., 2008), 52,5% sojeva CoNS poreklom iz uzoraka sirovog mleka, sirovog mesa i mesnih prerađevina, kao i briseva opreme u mlekarama je bilo rezistentno na penicilin primenom disk difuzione metode.

Rezistencija na gentamicin je u ovom ispitivanju utvrđena kod 2 soja *S. aureus*, primenom obe metode. Prema podacima iz literature (Aarestrup, 2006), najveći procenat sojeva *S. aureus* rezistentnih na gentamicin je izolovan u Švajcarskoj 2003. godine. Osetljivost stafilocoka na vankomicin se prema novim preporukama (CLSI, 2010) ne ispituje primenom disk difuzione metode, jer se ovom metodom ne mogu razlikovati sojevi *S. aureus* koji su osetljivi i intermedijarno osetljivi na vankomicin. Disk difuziona metoda sa vankomicinom je u ovom ispitivanju rađena prema preporukama CLSI iz 2008. godine. Ispitivanjem osetljivosti stafilocoka na vankomicin (30 μg) primenom disk difuzione metode mogu se detektovati izolati *S. aureus* koji imaju *vanA* gen (VRSA izolati). Kod takvih izolata se neće videti nikakva zona inhibicije oko diska vankomicina (CLSI, 2010). Rezistencija na gentamicin je utvrđena kod 2 soja *S. aureus*, primenom obe metode.

Izolovan je jedan soj *S. aureus* koji je bio intermedijarno osetljiv na vankomicin primenom mikrodilucione metode u bujonu, dok se vankomicin prema novim preporukama (CLSI, 2010) ne testira disk difuzionom metodom, jer se ovom metodom ne mogu razlikovati sojevi *S. aureus*, koji su osetljivi i intermedijarno osetljivi na vankomicin. Disk difuziona metoda sa vankomicinom je u ovom ispitivanju rađena prema preporukama CLSI iz 2008. godine. Rezistencija na tetraciklin kod CoNS poreklom iz uzoraka od krava sa mastitisom se kretala od 4% u Danskoj do 9% u Finskoj i SAD (Aarestrup, 2006). U istraživanju čeških autora (Schlegelova i sar., 2008), rezistencija na tetracikline iznosila je 32,5%.

Kod CoNS, osim kod *S. epidermidis*, vrlo često se javljaju problemi zbog neslaganja rezultata disk difuzione i mikrodilucione metode sa oksacilinom. Interpretativna kategorija za oksacilin ima uske granice kada su u pitanju CoNS,

osim za *S. epidermidis*, jer sojevi čije vrednosti MIC za oksacilin iznose od 0,5 do 2 µl/mL ne moraju imati *mecA* gen (CLSI, 2010). Za sojeve čije vrednosti MIC za oksacilin iznose od 0,5 do 2 µl/mL, preporuka je da se sojevi testiraju na prisustvo PBP2a ili na prisustvo *mecA* gena. Po preporukama CLSI za 2010. godinu, više se ne proverava rezistencija na oksacilin primenom disk difuzione metode, već samo primenom mikrodilucione metode u bujonu. Disk difuziona metoda sa oksacilinom je u ovom ispitivanju rađena prema preporukama CLSI iz 2008. godine.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu dobijenih rezultata identifikovano je 19 sojeva *S. aureus*, 3 soja *S. xylosus*, 2 soja *S. simulans* i jedan soj *S. haemolyticus*. Od 19 sojeva *S. aureus* kod 17 sojeva utvrđena je rezistencija na penicilin primenom disk difuzione metode, a primenom mikrodilucione metode u bujonu rezistencija je utvrđena kod 13 sojeva *S. aureus*. Kod CoNS, osim kod *S. epidermidis* vrlo često se javljaju problemi zbog neslaganja rezultata disk difuzione i mikrodilucione metode sa oksacilinom te je potrebno primeniti najmanje 2 različite metode sa cefoksitinom i oksacilinom za utvrđivanje rezistencije na meticilin. U ovom ispitivanju, osim na penicilin, nije utvrđen visok procenat rezistencije kod ispitivanih sojeva na ostale korišćene antibakterijske lekove.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGMENTS:

Ovaj rad je podržan sredstvima Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije, Projekat Ev.br 31079. *This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia, Project No 31079.*

Literatura / References

1. Aaerstrup FM. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin, ASM Press, 2006.
2. Busscher JF, Van Duijkeren E, Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM. The prevalence of methicillin-resistant staphylococci in healthy horses in the Netherlands. *Vet Microbiol* 2006; 113: 131-6.
3. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 629-41.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Sixth Edition. M7-A6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne PA, 2003.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne PA, 2008.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne PA, 2010.
7. Koneman EW, Winn WC, Allen SD, Procop GW, Janda WM, Schreckenberger PC, Woods GL. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, sixth edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

8. Kuroishi T, Komine K, Kai K, Itagaki M, Kobayashi J, Ohta M, Kamata S, Kumagai K. Concentration and specific antibody to staphylococcal enterotoxin-C and toxic shock syndrome toxin-1 in bovine mammary gland secretion, and inflammatory response to the intramammary inoculation of these toxins. *J Vet Med Sci* 2003; 65: 899-906.
9. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, Blackwell Science Ltd 2002;44-8.
10. Schlegelova J, Vlkova H, Babak V, Holasova M, Jaglic Z, Stosova T, Sauer P. Resistance to erythromycin of *Staphylococcus* spp. Isolates from food chain. *Veterinarni Medicina* 2008; 53(6): 307-14.
11. Taponen S, Simojoki H, Haveri M, Larsen HD, Pyörälä S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet Microbiol* 2006; 115: 199-207.
12. Taponen S, Pyörälä S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis – Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet Microbiol* 2009; 134: 29-36.
13. van Loo I, Huijsdens X, Tiemersma E, de Neeling A, van de Sande-Bruinsma N, Beaujean D, Voss A, Kluytmans J. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1834-9.
14. Vengust M, Anderson MEC, Rousseau J, Weese JS. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. *Lett Appl Microbiol* 2006; 43: 602-6.

ENGLISH

INVESTIGATION OF SUSCEPTIBILITY OF STAPHYLOCOCCUS SPECIES TO SOME ANTIBACTERIAL DRUGS BY DISK DIFFUSION AND BROTH MICRODILUTION

Jelena Ašanin, Ksenija Aksentijević, M. Žutić, Vera Katić, D. Krnjajić, N. Milić, Ružica Ašanin, D Mišić

The objective of this work was to identify isolated *Staphylococcus* species and to investigate their sensitivity to some antibacterial drugs. The material used for these investigations were *Staphylococcus* isolates originating from milk samples. A total of 25 strains of *Staphylococcus* isolates were examined, including 24 from milk samples from cows with mastitis, and one strain was isolated from a milk sample from a cow following treatment for mastitis. For primary identification, catalase and oxidase tests were used, as well as the free coagulase test. Following the preliminary tests, the isolated strains were identified using commercial systems ID32 STAPH (bioMérieux, France) and the BBL Crystal Gram-Positive ID Kit (Becton Dickinson, USA) according to the enclosed instructions.

The *Staphylococcus* isolates were examined for sensitivity to the following: oxacillin, penicillin, cefoxitin, gentamicin, erythromycin, chloramphenicol, tetracycline, ciprofloxacin, sulfametoxazol/trimetoprim, and vacomycin using the disk diffusion method and the broth microdilution method as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI(2003), and the results were interpreted according to CLSI recommendations from 2008 and 2010. Antibiogram disks manufactured by Becton Dickinson (USA) were used, and the broth microdilution method was applied using pure antibiotic

substances from different manufacturers: erythromycin, chloramphenicol, cefoxitin, gentamicin, oxacillin, tetracycline (Sigma Aldrich, USA), sulfametoxazol (Fluka, USA), penicillin (Calbiochem, Germany), vancomycin (Abbott laboratories, USA), ciprofloxacin and trimetoprim (Zdravlje A.D., Serbia). All 25 strains were catalase positive and oxidase negative. Of the 25 strains, 19 were coagulase positive and 6 were coagulase negative. With the implementation of the disk diffusion method on 19 strains of *S. aureus*, 17 were established to be resistant to penicillin (89.5%), and 2 strains to gentamicin (10.5%). The investigation of 3 strains of *S. xylosus* using the disk diffusion method showed that one strain was resistant to tetracycline (33.3%) and to oxacillin (33.3%), while another strain was found to be resistant to penicillin (33.3%). The third strain of *S. xylosus* was sensitive to all the examined antibiotics. Two strains of *S. simulans* and one strain of *S. haemolyticus* were not found to be resistant to any of the examined antibiotics using the disk diffusion method. The implementation of the broth microdilution method yielded in 13 strains of *S. aureus* resistance to penicillin (68.4%) with MIC values from 0.5 to 4 µg/ml, in 2 strains to gentamicin (10.5%) with MIC values of 32 µg/ml, and intermediary sensitivity to chloramphenicol was established in 9 strains of *S. aureus* (47.4%) with MIC values of 16 µg/ml and to vancomycin in 1 strain of *S. aureus* (5.3%) with MIC values of 4 µg/ml.

Key words: mastitis, *Staphylococcus*, antibacterial drugs, resistance

РУССКИЙ

ИСПЫТАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *STAPHYLOCOCCUS* ВИДОВ НА НЕКОТОРЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВА

Елена Ашанин, Ксения Аксентиевич, М. Жутич, Вера Катич, Д. Крняич, Н. Милич, Ружица Ашанин, Д. Мишич

Цель этой работы была идентификация изолированных видов стафилококков и испытание их чувствительности на определённое число антибактериальных лекарств. Как материал в этом испытании использованы изоляты стафилококков происхождением из образчиков молока. Совокупно испытано 25 штаммов изолированных стафилококков из которых 24 происходили из образчиков молока коров с маститом, а один штамм изолирован из образчика молока коровы после лечения мастита. В первичной идентификации использованы каталаза и оксидаза тесты, словно и тест присутствия свободной коагулазы. После исполнения прелиминарных тестов, совершена идентификация изолированных штаммов, применением коммерческих систем ID32 STAPH (bioMerieux, Франция) и BBL crystal Gram-Positive ID Kit (Becton Dickinson, США) согласно инструкциям производителя.

Чувствительность изолированных штаммов стафилококков испытана на: оксацилин, пенициллин, цефокситин, гентамицин, эритромицин, хлорамфеникол, тетрациклин, ципрофлоксацин, сульфаметоксазол/триметроприм и ванкомицин применением диск диффузионного метода и микродилуционного метода в бульоне согласно рекомендациям Института для клинических и лабораторных стандартов Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2003), а толкование результатов совершено рекомендациям CISI из 2003 и 2010 года. Пользованы антибиотикограмма диски производителя Becton Dickinson (США), а для микродилуционного метода в бульоне использованы чистые субстанции антибиотиков различных произво-

дителей: эритромицин, хлорамфеникол, цефокситин, гентамицин, оксацилин, тетрациклин (*Sigma Aldrich*, США), сульфаметоксазол (*Fluka*, США), пенициллин (*Calbiochem*, Германия), ванкомицин (*Abbott Laboratories*, США), ципрофлоксацин и триметроприм (Здравље А.Д. Србија). Всех 25 штаммов было каталаза положительно и оксидаза отрицательно. От 2 штаммов 19 было коагулаза-положительно и оксидаза отрицательно. От 25 штаммов. 19 было коагулаза-положительно, а 6 коагулаза-отрицательно. Применением диск диффузионного метода от 10 штаммов *S. aureus* у 17 утверждена резистенция на пенициллин (89,5%), а у 2 штамма на гентамицин (10,5%). От 3 штамма *S. hylosus*, у одного штамма применением диск диффузионного метода утверждена резистенция на тетрациклин (33,3%) и на оксацилин 33,3%, пока у второго штамма утверждена резистенция на пенициллин (33,3%). Третий штамм *S. xylosus*, у одного штамма применением диск диффузионного метода утверждена резистенция на тетрациклин (33,3%) и на оксацилин (33,3), пока у второго штамма утверждена резистенция на пенициллин (33,3%). Третий штамм *S. xylosus* был чувствительным на все испытанные антибиотики. У два штамма *S. simulans* и одного штамма *S. haemolyticus* на утверждена резистенция ни на один из испытанных антибиотиков применением диск диффузионного метода. Применением микродилуционного метода в бульоне у 13 штаммов *S. aureus* утверждена резистенция на пенициллин (66,4%) с стоимостями MIC от 0,5 до 4 мг/м, а у 2 штамма на гентамицин (10,5%) с стоимостями MIC от 16 мг/мл и на ванкомицин у одного штамма *S. aureus* (5,3%) чья стоимость MIC составляла (в сумме) 4 мг/мл.

Ключевые слова: мастит, *Staphylococcus*, antibakterialnye lekarstva, резистенция