

**NALAZ KOAGULAZA NEGATIVNIH STAFILOKOKA U
ZAPATU SA POVEĆANIM BROJEM SOMATSKIH ČELIJA
U MLEKU I NJIHOVA OSETLJIVOST NA
ANTIMIKROBNA SREDSTVA***

***FINDING OF COAGULASE NEGATIVE STAPHYLOCOCCI IN
THE HERD WITH AN INCREASED NUMBER OF SOMATIC CELLS
IN MILK AND THEIR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY***

Vera Katić, Nataša Rajić Savić**

Koagulaza negativne stafilokoke se smatraju oportunistički patogenim mikroorganizmima. Suzbijanje mastitisa izazvanih koagulaza negativnim stafilokokama je teško, zbog toga što epidemiologija bolesti nije jasna, a grupu koagulaza negativnih stafilokoka čini više od oko 40 različitih vrsta stafilokoka.

Stoga je cilj ovog rada bio da se ustanovi prevalenca koagulaza negativnih stafilokoka u mleku krava sa subkliničkim mastitisom, kao i da se ispita njihova osetljivost na odabrana antimikrobna sredstva. Mastitis testom je pregledano 112 muznih krava na farmi, gde je utvrđeno povećanje broja somatskih ćelija u zbirnom mleku sa farme. Iz 52 četvrti vimena krava, gde je mastitis testom utvrđeno povećanje broja somatskih ćelija uzeti su uzorci mleka za bakteriološki pregled. Za izolovanje uzročnika mastitisa korišćen je krvni agar. Identifikacija uzročnika mastitisa je urađena na osnovu izgleda kolonija na krvnom agaru i fizioloških osobina. Osetljivost koagulaza negativnih stafilokoka na uzročnike mastitisa je ispitana metodom po Kirbi Baueru. Za ispitivanje osetljivosti upotrebljeni su komercijalno proizvedeni diskovi koji su sadržavali: penicilin (10 IU), amoksicilin/klavulanska kiselina (20+10 µg), kloksacilin 25 µg, amoksicilin 30 µg, cefaleksin 30 µg, ceftiofur 30 µg, linkomicin 15 µg, gentamicin 30 µg i tetraciklin 30 µg. Osetljivost mikroorganizama je procenjena na osnovu prečnika zone inhibicije prema preporuci proizvođača i označavana kao osetljiv (S) umereno osetljiv (I) ili rezistentan (R).

* Rad primljen za štampu 06. 08. 2012. godine

** Dr sci. med. vet. Vera Katić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet Veterinarske medicine Beograd, Srbija; Nataša Rajić Savić, PKB Korporacija, Dijagnostička laboratorija, Padinska Skela, Srbija

Koagulaza negativne stafilokoke su izolovane iz 61,53% uzoraka mleka krava sa subkliničkim mastitisom, što ih čini najčešćim uzročnikom subkliničkih mastitisa. Najveći broj koagulaza negativnih stafilokoka je bio rezistentan na penicilin G (58,33% izolata). Svi izolati koagulaza negativnih stafilokoka su bili osetljivi na amoksisicilin/klavulansku kiselinu, 83,33% izolata je bilo osetljivo na ceftiofur, 70,83% izolata je bilo osetljivo na cefaleksin i 41,66% izolata je bilo osetljivo na ceftriakson.

Ključne reči: koagulaza negativne stafilokoke, mastitisi, antimikrobna sredstva, mleko, somatske ćelije

Uvod / Introduction

Mastitis je jedno od najčešćih oboljenja koje izaziva najveće ekonomske štete u proizvodnji mleka. Jedna od mera u suzbijanju mastitisa je stalno praćenje broja somatskih ćelija u zbirnom mleku, budući da je broj somatskih ćelija u mleku sa farme u korelaciji sa subkliničkim mastitsima u stadu (Pitkälä i sar., 2004.) Na porast broja somatskih ćelija najviše utiču uzročnici kontagioznog mastitisa *Streptococcus agalactiae* i *Staphylococcus aureus*. Međutim, poslednjih godina više autora navodi da i mikroorganizmi iz okoline mogu da izazovu mastitise u kliničkoj i subkliničkoj formi (Pitkälä i sar., 2004; Turutoglu i sar., 2006; Pol i Ruegg, 2007; Moniri i sar., 2007; Bal i sar., 2010). Tokom poslednjih godina, kao uzročnici subkliničkog, ali i kliničkih mastitisa, sve češće se dokazuju koagulaza negativne stafilokoke (Rajala-Schultz i sar., 2004; Sampimon i sar., 2007; Goorani-nejad i sar., 2007; Moniri i sar. 2007).

Koagulaza negativne stafilokoke naseljavaju kožu i sluzokožu životinja. Izolovane su sa vrha papile, izvodnog mlečnog kanala, ali i sa ležišta životinja, posuda za napajanje, opreme za mužu i ruku radnika. Kao faktori rizika za pojavu intramamarnih infekcija u stadu izazvanih koagulaza negativnim stafilokokama se navode lokacija stada, godišnje doba i faza graviditeta. Češće se javljaju kod mladih životinja pre telenja nego posle telenja, a kod starijih životinja daleko ređe javljaju najčešće četiri meseca posle telenja (Fox, 2009).

Budući da izazivaju lakše i srednje teške zapaljenjske procese u vimenu, koagulaza negativne stafilokoke dovode do porasta broja somatskih ćelija u mleku i smanjenja količine i kvaliteta mleka. U slučaju perzistentne intramamarne infekcije u vimenu, prosečna vrednost somatskih ćelije sa kreće oko 600.000/ml (Pyörälä i Taponen, 2009). Epidemiologija koagulaza negativnih stafilokoka nije u potpunosti poznata. Koagulaza negativne stafilokoke mogu da dovedu do lokalnih i sistemskih znakova zapaljenja vimena. Koncentracija medijatora zapaljenjske reakcije u mleku je 10-100 puta manja u slučaju zapaljenjske reakcije izazvane koagulaza negativnim stafilokokama u odnosu na mastitise izazvane koliformnim bakterijama (Pyörälä i Taponen, 2009). *U patogenezi mastitisa koagulaza negativne stafilokoke u odnosu na S. aureus* imaju sličnu sposob-

nost adherencije za epitelne ćelije mlečne žlezde, ali je invazivni kapacitet manji, izazivaju leukocitozu, imaju slične citotoksične mehanizme, kao i sposobnost sinteze hemolizina, enterotoksina, eksfolijativnog toksina i stvaranja biofilmova (Pyörälä i Taponen, 2009).

Više autora (Pitkälä i sar., 2004; Turutoglu i sar. 2006; Pol i Rueg, 2007; Moniri i sar. 2007; Bal i sar., 2010; Pyörälä i Taponen, 2009) navodi porast prevalence koagulaza negativnih stafilocoka kao uzročnika mastitisa i smanjenje njihove osetljivosti na antimikrobna sredstva, Koagulaza negativne stafilocoke u okolini predstavljaju značajan rezervoar gena rezistencije na antimikrobna sredstva, što je prema Rajala-Šulc i sar. (2004) posledica mutacije i rekombinacije gena, zbog česte upotrebe antibiotika u terapiji različitih oboljenja životinja. Važnu ulogu u prenošenju gena rezistencije imaju plazmidi, ali i mobilini genetski elementi (Turutoglu i sar. 2006).

Antimikrobna otpornost je najčešće utvrđena u odnosu na penicilin G, jer se on najviše upotrebljava za lečenje stafilokoknih mastitisa (Bal i sar., 2010; Turutoglu i sar., 2006; Gooraninejad i sar., 2007; Moniri i sar., 2007; Taponen i sar., 2006). Takođe, često se izoluju i multirezistentni sojevi koagulaza negativnih stafilocoka otporni na tri ili više ispitivanih preprata.

Primenom antimikrobnih sredstava u lečenju mastitisa izazvanih koagulaza negativnim stafilokokama postiže se visok procenat izlečenja (85,9%). Takođe i samoizlečenje je češće u odnosu na samoizlečenje mastitisa izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokokama (45,5%) (Pyörälä i Taponen, 2009). Da bi terapija subkliničkih mastitisa bila uspešna, kao i da bi se smanjila mogućnost nastajanja i širenja izolata koji su otporni na antimikrobna sredstva, neophodno je da se za svaki izolat uzročnika mastitisa uradi antibiogram i primeni najadekvatnije antimikrobno sredstvo.

Cilj ovog rada je bio da se ustanovi prevalenca koagulaza negativnih stafilocoka u mleku krava sa subkliničkim mastitisom, kao i da se ispita osetljivost izolovanih koagulaza negativnih stafilocoka na odabrana antimikrobna sredstva.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Mastitis testom je pregledano 112 muznih krava na farmi gde je utvrđeno povećanje broja somatskih ćelija u zbirnom mleku sa farme. Iz pojedinih četvrti vimena krava, gde je mastitis testom utvrđeno povećanje broja somatskih ćelija, uzeti su uzorci mleka za bakteriološki pregled. Uzorci mleka su, odmah nakon uzorkovanja, doneti u laboratoriju i zasejavani na krvni agar sa eskulinom i feri citratom i na endo agar (Torlak, Beograd). Zasejane podloge su inkubirane 24 časa pri temperaturi od 37°C, a podloge na kojima nije bilo rasta inkubirane su do 48 časova. Identifikacija uzročnika mastitisa urađena je na osnovu izgleda kolonija na krvnom agaru, mikroskopskih osobina, koagulaza testa sa plazmom kunića i API Staph (BioMerieux). Na osnovu rezultata koagulaza testa stafilocoke

su razdvojene na koagulaza pozitivne i koagulaza negativne. *Streptococcus agalactiae* je identifikovan na osnovu CAMP testa, a gram negativni mikroorganizmi su identifikovani na osnovu biohemijskog niza (rast na dvostrukom šećeru, indol, metil crveno, voges-proskauer, citrat). Osetljivost izolata koagulaza negativnih stafilocoka na antimikrobna sredstva je ispitana disk difuzionom metodom po Kirbi Baueru. Za ispitivanje osetljivosti upotrebljeni su komercijalno proizvedeni diskovi koji su sadržavali: penicilin G (10 IU), amoksicilin/klavulanska kiselina (20+10 µg), kloksacilin 25 µg, amoksicilin 30 µg, cefaleksin 30 µg, ceftiofur 30 µg, linkomicin 15 µg, gentamicin 30 µg i tetraciklin 30 µg. Osetljivost mikroorganizama je procenjena na osnovu prečnika zone inhibicije prema preporuci proizvođača i označavana kao osetljiv (S) intermedijerno osetljiv (I) ili rezistentan (R).

Rezultati rada i diskusija / Results and Discussion

Rezultati mastitis testa, urađenog na farmi gde je broj somatskih ćelija u mleku sa farme bio povećan pokazuju da je od 112 pregledanih krava pozitivna mastitis test reakcija utvrđena u mleku iz 52 (11,60%) četvrti od 42 krave. Bakteriološkim ispitivanjem 52 uzorka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava, u kojima je mastitis testom utvrđeno povećanje broja somatskih ćelija, najčešće su kao uzročnici mastitisa izolovani gram-pozitivni mikroorganizmi iz 37 (71,15%) uzoraka mleka, dok su gram-negativni mikroorganizmi izolovani iz samo dva (3,84%) uzorka mleka, a 13 (25%) ispitivanih četvrti je bilo bakteriološki negativno.

Ukupno je izolovano 39 uzročnika mastitisa, i to: 24 (61,53%) koagulaza negativnih stafilocoka, 8 (20,51%) koagulaza pozitivnih stafilocoka, 5 (12,82%) *S. agalactiae*, 1 (2,56%) *Klebsiella spp.* i 1 (2,56%) *E. coli* (Tabela 1).

Koagulaza negativne stafilocoke su u ovom ispitivanju najčešće dokazane kao izazivač subkliničkog mastitisa krava, što potvrđuje nalaze Rajala-Schultz i sar. (2004), Sampimon i sar. (2007), Tututoglu i sar. (2006), Moniri i sar., (2007), Fox (2009) i Pyorala i Taponen (2009) da se poslednjih godina koagulaza negativne stafilocoke sve češće dokazuju kao uzročnici subkliničkih mastitisa. Suzbijanje mastitisa izazvanih koagulaza negativnim stafilocokama je teško, zbog toga što epidemiologija bolesti nije jasna, a grupu koagulaza negativnih stafilocoka čini više od 40 različitih vrsta stafilocoka. Više autora (Pitkälä i sar., 2004; Turutoglu i sar. 2006; Pol i Ruegg, 2007; Moniri i sar. 2007; Bal i sar., 2010; Pyörälä i Taponen, 2009) navodi porast prevalencije koagulaza negativnih stafilocoka, kao uzročnika mastitisa, i smanjenje njihove osetljivosti na antimikrobna sredstva. U ovom radu ispitivana je osetljivost koagulaza negativnih stafilocoka na penicilinske i cefalosporinske lekove i lekove koji ne pripadaju grupi beta-laktamskih jedinjenja. Rezultati ispitivanja osetljivosti koagulaza negativnih stafilocoka na penicilinske preparate prikazani su u Tabeli 2.

Table 1. Rezultati bakteriološkog ispitivanja uzoraka mleka uzetih iz četvrti vimena krava sa povećanim brojem somatskih ćelija
 Table 1. Results of bacteriological examination of milk samples taken from udder quarters with elevated somatic cells

Broj pregledanih uzoraka mleka / Number of tested milk samples	Bakteriološki negativni uzorci / Bacteriologically negative samples		Bakteriološki pozitivni uzorci / Bacteriologically positive samples		Izolovani uzročnici mastitisa iz uzoraka mleka / Mastitis pathogens isolated from milk samples							
	Broj / N	%	Broj / N	%	KNS/CNS*		KPS/CPS**		E. coli			
					n	%	n	%	n	%	n	%
52	13	25	37	75	24	61,53	8	20,51	5	12,82	1	2,56

*KNS/CNS – koagulaza negativne stafilokoke / *Coagulasa negative staphylococci* ;

**KPS/CPS – koagulaza pozitivne stafilokoke / *Coagulasa positive staphylococci*

Tabela 2. Osetljivost izolata koagulaza negativnih stafilokoka uzročnika subkliničkog mastitisa na penicilinske preparate
 Table 2. Susceptibility of coagulase negative staphylococci to penicilline antimicrobials

Atimikrobno sredstvo / Antimicrobials	Osetljiv / Sensitive		Intermedijerno osetljiv / Moderately sensitive		Rezistentan / Resistant	
	Broj / Number	%	Broj / Number	%	Broj / Number	%
Kloksacilin/ <i>Cloxacillin</i>	17	70,83	4	16,66	3	12,5
Amoksicilin / klav. kiselina / <i>Amoxicillin / clav. acid</i>	24	100	–	–	–	–
Penicilin G / <i>Penicillin</i>	8	33,33	2	8,33	14	58,33

Visoka otpornost izolata koagulaza negativnih stafilocoka na penicilin G, utvrđena u ovom ispitivanju, potvrđuje rezultate koje su u istraživanjima dobili Bal i sar. (2010), Tututoglu i sar. (2006), Gooraninejad i sar. (2007); Moniri i sar. (2007); Taponen i sar. (2006). Većina autora smatra da je najmanja osetljivost koagulaza negativnih stafilocoka na penicilin G zbog njegove široke upotrebe u terapiji mastitisa krava. U više studija utvrđena je slaba osetljivost koagulaza negativnih stafilocoka na penicilin G, od 12,5% u ispitivanjima Bengtsson i sar. (2009), 30,19% u ispitivanjima Gooraninejad i sar. (2007), Sampimon i sar. (2007) i 37,4% u ispitivanjima Rajala-Schultz i sar. (2004). Ova grupa autora smatra da otpornost koagulaza negativnih stafilocoka, izolovanih u slučajevima subkliničkih i kliničkih mastitisa, zavisi od starosti životinje i da je manja (26%) u slučaju prvotelki, u odnosu na krave sa većim brojem laktacija (39%). Manja osetljivost koagulaza negativnih stafilocoka na beta-laktamske preparate se dovodi u vezu sa njihovom sposobnošću da stvaraju beta-laktamazu. Satu i Taponen (2009) su utvrdili da manji broj (13%) sojeva *S. aureus*, izolovanih u slučajevima kliničkih mastitisa stvara beta-laktamazu, a da veći broj (26%) izolata koagulaza negativnih stafilocoka stvara beta-laktamazu. Svi izolati koagulaza negativnih stafilocoka u ovom ispitivanju su bili osetljivi na antimikrobno sredstvo koje sadrži amoksicilin i klavulansku kiselinu, što autori objašnjavaju inhibitornim delovanjem klavulonske kiseline na beta laktamazu. Visoku osetljivost na ovaj preparat utvrdili su i Tututoglu i sar. (2006). Veliki broj izolata koagulaza negativnih stafilocoka u ovom ispitivanju je bio osetljiv na kloksacilin (70,83%). Nešto veći procenat osetljivih koagulaza negativnih stafilocoka (77,93%) na kloksacilin su utvrdili Tututoglu i sar. (2006). Iako je osetljivost koagulaza pozitivnih stafilocoka na kloksacilin između 70 i 80% Satu i Taponen (2009) preporučuju da se subklinički mastitisi izazvani koagulaza negativnim stafilocokama koje stvaraju beta laktamazu leče kloksacilinom.

Rezultati ispitivanja osetljivosti koagulaza negativnih stafilocoka na cefalosporinske preparate prikazani su u Tabeli 3.

Tabela 3. Osetljivost izolata koagulaza negativnih stafilocoka uzročnika subkliničkog mastitisa na cefalosporinske preparate

Table 3. Susceptibility of coagulase negative staphylococci isolates, which are the cause of subclinic mastitis, to cephalosporin antimicrobials

Antimikrobno sredstvo / <i>Antimicrobials</i>	Osetljiv / <i>Sensitive</i>		Intermedijerno osetljiv / <i>Moderately sensitive</i>		Rezistentan / <i>Resistant</i>	
	Broj / <i>N</i>	%	Broj / <i>N</i>	%	Broj / <i>N</i>	%
Cefaleksin / <i>Cefalexin</i>	17	70,83	3	12,5	4	16,66
Ceftriakson / <i>Ceftriaxone III</i>	10	41,66	2	8,33	12	50
Ceftiofur / <i>Ceftiofur</i>	20	83,33	2	8,33	2	8,33

Rezultati prikazani u Tabeli 3 pokazuju da su koagulaza negativne stafilocoke bile najosetljivije na ceftiofur (83,33%) a zatim na cefaleksin (70,83%). Najmanja osetljivost koagulaza negativnih stafilocoka je utvrđena na ceftriakson

(41,66%). Otpornost na ceftiofur je utvrđena kod 8,33% ispitanih izolata koagulaza negativnih stafilocoka, što potvrđuje nalaze Sawant i sar. (2009). Ispitujući osetljivost koagulaza negativnih stafilocoka na cefoksitim Turutoglu i sar. (2006) su utvrdili rezistenciju kod 8,1% izolata.

U cilju utvrđivanja da li preparati koji nisu beta-laktamski mogu da budu lek izbora u slučaju kliničkih i subkliničkih mastitisa izazvanih koagulaza negativnim stafilocokama ispitivana je njihova osetljivost na preparate koji nisu beta-laktamski. Rezultati tih ispitivanja prikazani su u Tabeli 4.

Tabela 4. Osetljivost izolata koagulaza negativnih stafilocoka uzročnika subkliničkog mastitisa na ne beta laktamske preparate

Table 4. Susceptibility of coagulase negative staphylococci to non beta lactam antimicrobials

Antimikrobno sredstvo / <i>Antimicrobials</i>	Osetljiv / <i>Sensitive</i>		Intermedijerno osetljiv / <i>Moderately sensitive</i>		Rezistentan / <i>Resistant</i>	
	Broj / <i>Number</i>	%	Broj / <i>Number</i>	%	Broj / <i>Number</i>	%
Ttraciklin / <i>Tetracycline</i>	21	87,5	-	-	2	12,5
Gentamicin / <i>Gentamicin</i>	23	95,8	-	-	1	4,2
Linkomicin / <i>Lincomycin</i>	19	79,15	1	4,20	4	16,65

Najveći broj izolata koagulaza negativnih stafilocoka je bio osetljiv na tetracikline (87,5%), a samo 12,5% izolata je bilo rezistentno. Manju osetljivost koagulaza negativnih stafilocoka na tetracikline su utvrdili Gooraninejad i sar. (2007), Tututoglu i sar. (2006) i Rajala-Schultz i sar. (2004). Brinda (2009) nije ustanovila nijedan osetljiv izolat, a Taponen i sar. (2006) navode da se nivo otpornosti na tetracikline kreće 9-16% ispitanih izolata koagulaza negativnih stafilocoka .

U ovom ispitivanju je utvrđeno da je najveći broj izolata koagulaza negativnih stafilocoka 95,8% osetljivo na gentamicin, što potvrđuje rezultate Nam i sar. (2010). U jednom slučaju (4,2%) utvrđena je otpornost koagulaza negativnih stafilocoka na gentamicin. Pojavu sojeva koagulaza negativnih stafilocoka rezistentnih na gentamicin Tututoglu i sar. (2006) objašnjavaju razvojem mehanizma otpornosti na aminoglikozide kao posledicu široke primene preparata ove grupe u terapiji različitih oboljenja životinja, pri čemu dolazi do modifikacije enzimskih sistema oportunističkih stafilocoka. Gooraninejad i sar. (2007) i Moniri i sar. (2007) navode da nisu izolovali koagulaza negativne stafilocoke otporne na gentamicin.

Na linkomicin je bilo osetljivo 79,15% izolata koagulaza negativnih stafilocoka, 4,20% izolata je bilo umereno osetljivo, a 16,65% izolata je bilo rezistentno na linkomicin. Nešto veću osetljivost koagulaza negativnih stafilocoka na linkomicin (84,6%) utvrdili su Tututoglu i sar. (2006). Taponen i sar. (2006) navode da se koagulaza negativne stafilocoke ne razlikuju bitno u kliničkom smislu i otpornosti na antimikrobna sredstva od *S. aureus*, i da se otpornost koagulaza negativnih stafilocoka na aminoglikozide i makrolide kreće 6-14%.

Zaključak / Conclusion

Koagulaza negativne stafilokoke su izolovane iz 61,53% uzoraka mleka krava sa subkliničkim mastitsom, što ih čini najčešćim uzročnikom subkliničkih mastitsa. Najmanji broj izolata koagulaza negativnih stafilokoka je bio osetljiv na penicilin G, svega 33,33%. Svi izolati koagulaza negativnih stafilokoka su bili osetljivi na amoksisilin/klavulansku kiselinu, a dobra osetljivost je utvrđena na ceftiofur, gentamicin i tetraciklin.

Literatura / References

1. Bal EB, Bayar S, Bal MA. Antimicrobial susceptibilities of Coagulase-Negative Staphylococci (CNS) and Streptococci from bovine subclinical mastitis cases, *J Microbiol.* 2010; 8(3): 267-74.
2. Bengtsson B, Unnerstad HE, Ekman T, Artursson K, Nilsson-Ost M, Waller KP. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Vet Microbiol.* 2009; Apr 14;136(1-2):142-9.
3. Corti S, Sicher D, Regli W, Stephan R. Current data on antibiotic resistance of the most important bovine mastitis pathogens in Switzerland, *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2003; 5(12): 571-5.
4. Gooraninejad S, Ghorbanpoor M, Salati AP. Antibiotic susceptibility of staphylococci isolated from bovine subclinical mastitis. *Pak J Biol Sci* 2007; 10(16): 2781-3.
5. Fox LK. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. *Vet. Microbiol* 2009; 82-8.
6. Lüthje P, Schwarz S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *J Antimicrob Chemother* 2006; May; 57(5): 966-9.
7. Mihaela Brinda. Antibiotic susceptibility of pathogens isolated from mastitic milk in cattle. *Lucrari stinfnice medicina veterinaria vol. XLII (1), Timsoara, 2009; 263-7.*
8. Moniri R, Dastehgoli K, Akramian A. Increasing resistant coagulase negative staphylococci in bovine clinical mastitis. *Pak J Biol Sci* 2007; 10(15): 2465-9.
9. Nam HM, Lim SK, Kim JM, Kang HM, Moon JS, Jang GC, Kim JM, Wee SH, Joo YS, Jung SC. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *J Microbiol Biotechnol* 2010; 20(10): 1446-9.
10. NMC Annual Meeting Proceedings Research committee report Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs, 2004; 400-14.
11. Pitkälä AM, Haveri S, Pyörälä V, Myllys T, Honkanen-Buzalski. 2004, Bovine Mastitis in Finland-Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. *J Dairy Sci* 2001; 87: 2433-41.
12. Pol M, Ruegg PL. Relationship Between Antimicrobial Drug Usage and Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Mastitis Pathogens. *J Dairy Sci* 2007; 90: 262-73.
13. Pyörälä S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Ve Microbiol* 2009; 16: 134(1-2): 3-8.

14. Rajala-Schultz PJ, Torres AH, DeGraves FJ, Gebreyes WA, Patchanee P. Antimicrobial resistance and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci over the dry period. *Vet Microbiol* 2009; 134 55-64.
15. Rajala-Schultz PJ, Smith KL, Hogan JS, Love BC. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet Microbiol* 2004; 102(1-2): 33-42.
16. Sampimon OC, Vernooij JC, Mevius DJ, Sol J. Sensitivity to various antibiotics of coagulase-negative staphylococci isolated from samples of milk from Dutch dairy cattle. *Tijdschr Diergeneeskd* 2007; 132(6): 200-4.
17. Satu Pyörala, Suvi Taponen. Coagulase-negative staphylococci-Emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol* 2009; 134: 3-8.
18. Satu Pyörala, Suvi Taponen. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis- Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet Microbiol* 2009; 134: 29-36.
19. Sawant AA, Gillespie BE, Oliver SP. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. *Vet Microbiol* 2009; 134(1-2): 73-81.
20. Taponen S, Simojoki H, Haveri M, Larsen HD, Pyörälä. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet Microbiol* 2006; 115(1-3): 199-207.
21. Turutoglu Hulya, Senay Ercelik, Dilek Ozturk. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine mastitis. *Bull Vet Inst Pulawy* 2006; 50: 41-5.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je finansiran sredstvima Ministarstva nauke Republike Srbije TR 31086

This work was financed by Ministry of Science of the Republic of Serbia funds, TR 31086

ENGLISH

FINDING OF COAGULASE NEGATIVE STAPHYLOCOCCI IN THE HERD WITH AN INCREASED NUMBER OF SOMATIC CELLS IN MILK AND THEIR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY

Vera Katić, Nataša Rajić Savić

Coagulase-negative staphylococci (CNS) are generally considered to be opportunistic pathogens. Controlling CNS mastitis is difficult because the epidemiology is not clear, and the CNS group consists of about 40 different *Staphylococcus* species.

Therefore, the aim of this study was to determine the prevalence of coagulase-negative staphylococci in milk of the cows with subclinical mastitis, as well as to determine different CNS species isolated from quarter milk samples for their susceptibility to antimicrobials used commonly for mastitis therapy. On the farm where there was found an increase of somatic cells in bulk milk, 112 dairy cows were examined by mastitis test. From 52 udder quarters where mastitis test showed an increase of somatic cells, milk samples were taken for bacteriological examination. For isolating the causes of mastitis there was used blood agar. Identification of the causative agents of mastitis was carried out on the ba-

sis of colony appearance on blood agar and their physiological characteristics. Coagulase-positive staphylococci sensitivity which cause mastitis was tested by Kirby Bauer method. For susceptibility testing there were used commercially produced discs containing: 10 IU penicillin, amoxicillin/clavulanic acid (20 + 10 µg), cloxacillin 25 µg, 30 µg amoxicillin, cephalexin 30 µg, ceftiofur 30 µg, 15 µg lincomycin, gentamicin and tetracycline 30 µg. The sensitivity of microorganisms was evaluated on the basis of inhibition zone diameter recommended by the manufacturer and was labeled as sensitive (S) moderately sensitive (I) or resistant (R).

Coagulase-negative staphylococci were isolated from 61.53% of samples from cows with subclinical mastitis, making them the most common cause of subclinical mastitis. The highest resistance of coagulase-negative staphylococci was found to penicillin G (58.33% of isolates). Full sensitivity of coagulase-negative staphylococci was found to amoxicillin / clavulanic acid (100% of isolates), a good sensitivity to ceftiofur (83.33% of isolates), cefalexin (70.83% of isolates) and ceftriaxone (41.66% of isolates).

Key words: coagulase negative staphylococci, mastitis, antimicrobials, milk, somatic cells

РУССКИЙ

ОБНАРУЖЕНИЕ КОАГУЛАЗООТРИЦАТЕЛЬНЫХ СТАФИЛОКОККОВ С УВЕЛИЧЕНИЕМ ЧИСЛОМ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В МОЛОКЕ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Вера Катич, Наташа Раич Савич

Коагулазоотрицательные стафилококки считаются условно-патогенными микроорганизмами. Подавление мастита, вызванного коагулазонегативными стафилококками трудно, потому что эпидемиология болезни не понятна и группа коагулазоотрицательных стафилококков составляет более 40 различных видов стафилококков.

Целью данного исследования было определить распространенность коагулазоотрицательных стафилококков в молоке коров со субклиническим маститом, а также исследовать и их чувствительность к выбранным противомикробным препаратам. Мастит тестом обследовано 112 молочных коров на ферме, где отметили увеличение количества соматических клеток в молоке. Из 52 вымени, у которых мастит тестом доказали увеличение числа соматических клеток, взяли молоко для бактериологического исследования. Для выделения причин мастита был использован кровяной агар. Идентификация причин мастита была сделана на основе внешнего вида колоний на кровяном агаре и физиологических характеристик. Чувствительность коагулазоотрицательных стафилококков на патогены мастита испытали используя метод Кирби Бауэра. Для испытания чувствительности были использованы коммерческие диски, содержащие: 10 IU пенициллин, амоксициллин/клавуланат (20+10 µg), 25 µg клоксациллин, амоксициллин 30 µg, 30 µg цефалексин, цефтиофул 30 µg, 15 µg линкомицин, гентамицин и тетрациклин 30 µg 30 µg. Чувствительность микроорганизмов оценивали на основании диаметра зоны подавления в соответствии с рекомендациями производителя и обозначали их чувствительными (S) умеренно чувствительными (I) или устойчивыми (R).

Коагулазоотрицательные стафилококки были изолированы из 61,53% проб молока коров с субклиническим маститом, что делает их наиболее частой причиной субклинического мастита. Большинство коагулазоотрицательных стафилококков были устойчивыми к пенициллину G (58,33% изолятов). Все изоляты коагулазоотрицательных стафилококков были чувствительными к амоксициллину/клавулановой кислоте, 83,33% изолятов были чувствительными к цефтиофуру, 70,83% изолятов были чувствительными к цефалексину и 41,66% изолятов были чувствительными к цефтриаксону.

