GENSKA ANALIZA IZOLATA STREPTOKOKA IZ UZORAKA KRAVLJEGA MLIJEKA

Fumić, Tihana

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:211485

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Tihana Fumić

GENSKA ANALIZA IZOLATA STREPTOKOKA IZ UZORAKA KRAVLJEGA MLIJEKA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.

University of Zagreb

Faculty of Veterinary Medicine

Tihana Fumić

STREPTOCOCCAL GEN SEQUENCE ANALYSES FROM MILK SAMPLES IN DAIRY COWS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2021

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Tihana Fumić

GENSKA ANALIZA IZOLATA STREPTOKOKA IZ UZORAKA KRAVLJEGA MLIJEKA

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Doc. dr. sc. Miroslav Benić

Izv. prof. dr. sc. Nino Maćešić

Zagreb, 2021.

University of Zagreb

Faculty of Veterinary Medicine

Tihana Fumić

STREPTOCOCCAL GEN SEQUENCE ANALYSES FROM MILK SAMPLES IN DAIRY COWS

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Doc. dr. sc. Miroslav Benić

Izv. prof. dr. sc. Nino Maćešić

Zagreb, 2021

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

I Z J A V A

Ja, TIHANA FUMIĆ, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/-la drugim izvorima do onih navedenih u radu.

_____

(potpis studenta)

Zagreb, 2021.

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojim mentorima doc. dr. sc. Miroslavu Beniću i izv. prof. dr. sc. Nini Maćešiću koji su mi svojim velikim znanstvenim iskustvom i bezuvjetnom potporom pomogli tijekom studija, te u izradi ove disertacije. Hvala Vam što ste prvenstveno divni ljudi, a tek onda stručnjaci!

Zahvaljujem cijelom osoblju Klinike za porodništvo i reprodukciju, te Hrvatskom veterinarskom institutu na potpori tijekom istraživanja i dr.sc. Sanji Duvnjak, mag. biol. mol. na pomoći pri izvođenju molekularnih testova.

Posebnu zahvalu upućujem svojem mentoru dodiplomske nastave prof. dr. sc. Ivici Valpotiću na trudu koji je uložio pregledavajući doktorski rad i na savjetima koji su doprinijeli da rad bude kompletniji i pregledniji.

Veliko hvala firmi ZO - INVEST, d.o.o. koja mi je omogućila stipendiju ovog doktorskog studija.

Hvala mojim roditeljima koji su mi bili velika pomoć i podrška tijekom školovanja, od samog početka, do danas.

Hvala mojoj Baki na brojnim satima čuvanja djeteta, jer je mama morala pisati.

SAŽETAK

GENSKA ANALIZA IZOLATA STREPTOKOKA IZ KRAVLJEGA MLIJEKA

Mastitis je multikauzalna bolest uzrokovana interakcijama između mikroorganizma, domaćina i okoliša. Najznačajniji uzročnici mastitisa krava su bakterije iz rodova *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Echerichia* i drugi koliformni mikroorganizmi. U većini kliničkih laboratorija, identifikacija streptokoka temelji se na biokemijskim testovima. S obzirom da niti jedan klasifikacijski sustav nije potpuno točan, razvoj i primjena metoda genskih analiza unaprijedio je identifikaciju streptokoka. Ciljevi ovog istraživanja bili su dobiti detaljniji uvid u zastupljenost pojedinih vrsta streptokoka u etiologiji mastitisa krava, kao i u javno-zdravstveno značenje infekcija mliječne žlijezde prouzročenih streptokokima, te u podudarnost rezultata klasične mikrobiološke pretrage i identifikacije streptokoka molekulatnim metodama.

Mikrobiološka pretraga provedena je u skladu s opće prihvaćenim preporukama opisanima u *Laboratory handbook on bovine mastitis* Primarno izdvajanje i identifikaciju streptokoka provedeno je korištenjem podloge eskulin krvni agar. Nakon identifikacije sojeve smo do daljnjih pretraga čuvali na glicerin bujonu na temperaturi od -20 °C. Zamrznute sojeve revitalizirali smo ponovnim nacjepljivanjem na eskulin krvni agar. Za potrebe genotipizacije koristili smo izdvajanje pomoću kitova na automatiziranom uređaju za izdvajanje DNK. Pri molekularnoj identifikaciji vrste *Streptococcus sp* koristili smo početnice pA i pH. Tipizacija sljedova za više lokusa (*Multi-locus sequence typing*, MLST) vrlo je diskriminatorna tehnika, jer se zasniva na tipiziranju sljedova veličine približno 500 bp unutar fragmenata 7 tzv. "*house-keeping*" gena. Proučavali smo četiri različite vrste *Streptococcus sp.* te je za svaku pojedinu vrstu korišten drugačiji skup lokusa. Primjerice, za *S. agalactiae (adhP, pheS, atr, glnA, sdhA, glcK* i *tkt*), za *S. uberis (*gki, recP, ddl, tdk, arcC, tpi, i yqiL), za *S. canis* (gki, gtr, murl, mutS, recP, Xptgc i yqiZ), a za *S. dysgalactiae* (gki, gtr, murl, mutS, recP, xpt I atoB). Kombinacija alela na svakom lokusu sačinjava sedmeročlani brojčani kod koje smo međusobno uspoređivali na osnovu kategoričkog koeficijenta i

prosječne udaljenosti dva klastera (eng. *unweighted pair group method with arithmetic mean*).

Molekularnom identifikacijom streptokoka pretražena su 54 izolata soja bakterija iz uzoraka mlijeka, a za 47 sojeva je potvrđeno da pripadaju rodu *Streptococcus,* i to 6 *S. agalactiae*, 10 *S. dysgalactiae*, 2 *S. canis* i 31 *S. uberis,* dok su 3 soja pripadalii vrsti *Enterococcus faecalis*, a 4 su soja pripadali vrsti *Lactococcus lactis*. Sve smo sojeve uspjeli tipizirati MLST tehnikom. U tipiziranim uzorcima *S. agalactiae* definirali smo 4, u *S. dysgalactiae* 7, u *S. canis* 1 , a u *S. uberis* 22 različita alelna profila. Najzasupljeniji alelni profil u *S. agalactiae* bio je ST314. Najpolimorfniji lokusi su *atr i glcK* s Hunter-Gaston indeksom raznolikosti (HGDI) od 0,73. Slijede *adhP, glnA, sdhA i tkt,* s HGDI indeksom od 0,60. Najmanje polimorfan bio je *pheS* s HGDI indeksom od 0,33. Alelni profil ST305 bio je zastupljen u najvećem broju uzoraka *S. dysgalactiae*. Najpolimorfniji lokus bio je *mutS* s HGDI indeksom 0,86. Slijede *gki i xpt* s HGDI indeksom od 0,71 odnosno 0,64 te *gtr*, *recP* i *atoB* s indeksom 0,46. Najmanje polimorfan bio je *murI* s HGDI indeksom od 0,25. Za dva izdvojena soja *S. canis* bio je određen identični alelni profil ST9. HGDI indeks na svim lokusima jednak je 0, jer nema polimorfizma s obzirom da je na dva soja idemtificiran isti ST. Svi alelni tipovi *S. uberis* bili su do sada nepoznati u bazi podataka. Najzastupljeniji ST je ST1203 s 9 uzoraka. ST1210 utvrđen je u dva uzorka dok su ostali ST u uzorcima zastupljeni s jednim uzorkom za pojedini alelni profil. Najpolimorfniji lokusi su *tdk i arcC* s HGDI indeksima 0,85, odnosno 0,82. Slijede gki, *ddl, rec i tpi* lokusi s HGDI indeksima 0,79; 0,57 i 0,55. Najmanje polimorfan bio je *yqiL* s HGDI indeksom od 0,30.

Dobiveni rezultati sekvenciranjem gena omogućili su usporedbu genskih odsječaka streptokoka s odsječcima streptokoka analiziranim drugdje u svijetu. Provedeno istraživanje otvara put daljnjim istraživanjima molekularne epidemiologije streptokoknih uzročnika mastitisa. Naime, zaključili smo da bi za neke vrste streptokoka laboratorijske postupke treba proširiti radi uvrđivanja njihove zoonotske naravi.

Ključne riječi: mastitis; *Streptococcus sp.;* mikrobiološka pretraga; molekularna pretraga; *house keeping* geni; MLST

EXTENDED SUMMARY

STREPTOCOCCAL GEN SEQUENCE ANALYSES FROM MILK SAMPLES IN DAIRY COWS

Objectives: Mastitis is the most expensive disease in dairy cows. It is of multicausal etiology as the result of interactions among microorganisms, the host and the environment. The most important pathogens of bovine mastitis are *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli* and the other coliform microorganisms. Numerous Streptococcus species are important pathogens in animals and humans. Among the streptococci that are the main pathogens of bovine hosts are species such as S. agalactiae, S. uberis and S. dysgalactiae, which are also the most common mastitis pathogens in dairy cows. In the most clinical laboratories, the identification of streptococci is based on biochemical tests, and. in this way, up to 10-15% of isolated strains are misidentified. The strains within a particular species may differ in the same property, whereas the same strain may show biochemical variability. Since there is no classification system ompletely accurate, the development and application of genetic analysis methods improved the identification of streptococci. The aim of this research was to establish a detailed insight into the presence of certain types of streptococci in the etiology of the mastitis in dairy cows, to recognize public health significance of mammary gland infections caused by streptococci and to determine compliance of the results obtained by the classic microbiological analyses with those obtained by identification of the causative agents using molecular methods.

Materials and Methods: The samples taken for bacteriological culture, prior regular milking, were collected aseptically in sterile 10 mL tubes, without additives, according to the National Mastitis Council recommendations and kept at 4 ^{o}C during transport. The samples were analyzed within 12 hours following the collection. The described microbiological testing was performed in accordance with generally approved recommendations as described in the *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. The primary streptoccci isolation and identification were performed using aesculin blood agar. After identification, the strains were stored in glycerol broth at the temperature of - 20 ^{o}C. The frozen strains were revitalized by repeated inoculations on aesculin

blood agar. During storage, the vitality of the strains was examined using random selection method. Isolation of DNA from the selected strains for species confirmation by genes detection and sequencing were carried using the so-called “cultural” isolation method. The DNA for further analyses was isolated with commercial kits and automated device. For molecular identification of *Streptococcus sp.* was used method based on gene sequencing and coding for 16S RNA, and comparison of sequences with sequences in the available databases. The primers used for molecular identification of species were pA and pH. The obtained amplification products were sequenced using the Sanger method in Macrogen Europe B. V., Amsterdam, The Netherland. The obtained sequences were compared with the sequences listed in the internationally available database NCBI (National Center for Biotechnology Information) and RDP (Ribosomal database Project) througu BioNumeric 7.6.3 software.

The multilocus sequence typing (MLST) is a method based on determining DNA fragment sequences of approximately 450 bp size in seven *housekeeping* genes of *S. agalactiae (adhP, pheS, atr, glnA, sdhA, glcK* and *tkt*), *S. uberis (*gki, recP, ddl, tdk, arcC, tpi, and yqiL), *S. canis* (gki, gtr, murl, mutS, recP, Xptgc and yqiZ) and *S. dysgalactiae* (gki, gtr, murl, mutS, recP, xpt and atoB). Obtained type of sequences, *i.e.* allele profiles represent the SequenceType (ST). The obtained amplification products were sequenced using the Sanger method in Macrogen Europe B. V., Amsterdam, Netherland. The obtained nucleotide sequences were aligned, verified and compared using the BioNumerics software (version 7.6; applied Maths, Kortrijk, Belgium). Allele and ST are determined using *Streptococcus* MLST http://pubmlst.org/ database that can be loaded and used *via* BioNumerics software. Each species of *Streptococcus* sp. has a separate database. The combination of alleles on each locus consists of seven-member numerical code in which we compared each other based on the categorical coefficient and unweighted pair group method with arithmetic mean.

Results: In the study, 54 strains of bacteria isolated from milk samples from udder quarters of dairy cows with subclinical mastitis were examined using molecular methods. By conventional microbiological examination, the strains were identified to the species (*S. agalactiae, S. dysgalactiae i S. uberis*) or to the genus (*Streptococcus* spp.) without final identification of the species. Out of 54 examined bacterial strains,

47 of them were confirmed to belong to the genus *Streptococcus spp.,* 6 strains of *Streptococcus agalactiae*, 10 strains of *Streptococcus dysgalactiae*, 2 of *Streptococcus canis* and 31 strain of *Streptococcus uberis*, while 3 strains belonged to *Enterococcus faecalis* and 4 strains to the species *Lactococcus lactis*. All 47 *Streptococcus sp.* strains were typed using the MLST technique. The MLST is a highly discriminating technique because it is based on typing sequences of approximately 500 bp size within fragments of 7 so-called „house-keeping“ genes. Each different sequence of genes represents another allele. The combination of alleles to seven loci is an allele profile or ST. Since it is possible to have a large number of alleles in each locus, the samples do not have the same profile randomly. In this research we have studied four different species of Streptococcus sp. and a different set of loci was used for each species.

In typed samples of *S. agalactiae* 4 different allele profiles were defined. The most common ST was ST314. The other STs were represented in the samples with one sample for each allelic profile. Allele profiles were examined at 7 loci: *adhP, pheS, atr, glnA, sdhA, glcK*, and *tkt*. The most polymorphic loci were *atr* and *glcK* with the Hunter-Gaston discriminatory index (HGDI) of 0.73. It is followed by *adhP*, *glnA*, *sdhA* and *tkt* with the HGDI index of 0.60. The least polymorphic was *pheS* with the HGDI index of 0.33. Using the eBURST algorithm, we defined that there were no allelic profiles form a group, *i. e.* that they were "singletons". No local distribution of allelic profiles was visible from the Minimum spanning tree (MST) view. In the samples of *S. dygalactiae* were defined 7 different allele profiles. The most common ST was ST305. Allelic profiles were examined at 7 loci: *gki, gtr, murI, mutS, recP, xpt*, and *atoB*.The most polymorphic locus was *mutS* with the HGDI index of 0.86. It is followed by *gki* and *xpt* with the HGDI index of 0.71 and 0.64, respectively, and *gtr*, *recP* and *atoB* with an index of 0.46. The least polymorphic was *murI* with the HGDI index of 0.25. Using the eBURST algorythm, we have defined only one cluster to which ST305 and ST453 belong. The regional grouping of the samples from our research was clearly visible from the MST presentation. In the typed S. canis samples, we have defined one allelic profile. An identical ST9 allele profile was determined for the two isolated strains. Allelic profiles were examined at 7 loci: *gki, gtr, murI, mutS, recP, xpt*, and *yqiZ*. The HGDI at all loci was equal to 0 because there is no polymorphism since the same ST was identified on two strains. There is

no grouping using the eBURST algorythm. From the MST presentation it is clear that *Streptococcus canis* strains identified in our research belong to one of the most represented groups in the Europe, ST9 which very likely, forms a clonal cluster in which ST9 is even a carrier. In the *S. uberis* samples, we have defined 22 different allelic profiles. All allelic types have so far been unknown in the database. The most common ST was ST1203 with 9 samples. ST1210 was determined in 2 samples while the other STs were represented with one sample for each allelic profile. The allelic profiles of *S. uberis* were examined at 7 loci: *arcC, ddl, gki, recP, tdk, tpi* and *yqiL*. The most polymorphic loci were *tdk* and *arcC* with the the the HGDI indices of 0.85 and 0.82, respectively. It is followed by *gki*, *ddl*, *rec* and *tpi* with HGDI indices of 0.79; 0.57 and 0.55. The least polymorphic was *yqiL* with the HGDI index of 0.30. Using the eBURST algorythm, we have defined one group of three allelic profiles: ST1212, ST1224 and ST1228. No significant regional grouping of allelic profiles was visible from the MST view. Nevertheless, it should be noted that we conducted the study on 31 samples of which the vast majority have newly-identified STs. Allelic profiles are original due to new alleles at the *arcC* locus.

Conclusion: In conclusion, the concordance of the conventional microbiological identification to the genus level with molecular identification was high (87%). The identification of the species by conventional microbiological procedures mostly coincides with *S. uberis* molecular identification and least for *S. agalactiae*. The research paves the way for further molecular epidemiology studies of streptococcal mastitis pathogens, because for some streptococcus strains laboratory procedures should be extended to determine their zoonotic nature and potential.

Key words: mastitis, *Streptococcus sp.,* MLST, microbiological analyses, molecular analyses, *house-keeping* genes

SADRŽAJ

1. **UVOD** 1

2. **PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA** 4

2.1. Povijest 4

2.2. Klasifikacija bakterija roda Streptococcus 5

2.2.1. Podjela streptokoka na osnovu tipa hemolize 6

2.2.2. Podjela streptokoka prema grupno specifičnom antigenu 6

2.3. Faktori virulencije 8

2.4. Patogeneza streptokoknih infekcija 9

2.4.1. Adherencija i kolonizacija 10

2.4.2. Intracelularna invazija 11

2.5. Značaj streptokoka u etiologiji mastitisa 11

2.5.1. Streptoccocus agalactiae 12

2.5.2. Streptokoki iz okoliša 14

2.5.3. Streptococcus dysgalatiae 15

2.5.4. Streptococcus uberis 16

2.6. Infekcije ostalim vrstama streptokoka 19

2.6.1. Streptococcus pyogenes 19

2.6.2. Streptococcus pneumoniae 19

2.6.3. Streptococcus porcinus 20

2.6.4. Streptococcus canis 20

2.6.5. Streptococcus equi subsp. equi 21

2.6.6. Streptococcus equi subsp. zooepidemicus 21

2.7. Metode tipizacije streptokoka 22

2.7.1. M tipizacija 23

2.7.2. T tipizacija 24

2.7.3. Emm tipizacija 24

2.7.4. Multigenska analiza 25

2.7.5. RAPD tipizacija 27

2.7.6. PFGE tipizacija 27

2.7.7. Vakcine 28

2.8. Razvrstavanje streptokoka u serološke skupine 29

2.9. Genotipizacija streptokoka 30
2.10. Odnos prema antimikrobnim tvarima 34
3. **OBRAZLOŽENJE TEME** 36
4. **MATERIJAL I METODE** 37
4.1. Materijal 37
4.1.1. Uzorkovanje sekreta vimena mliječnih krava 37
4.2. Metode 37
4.2.1. Uzimanje uzoraka mlijeka 37
4.2.2. Obrada uzoraka mlijeka u laboratoriju 37
4.2.4. Molekularne pretrage vrste Streptococcus sp. 41
4.3. Tipizacija sekvencioniranjem na više lokusa 43
5. **REZULTATI** 47
5.1. Molekularna identifikacija izolata streptokoka 47
5.2. Rezultati MLST tipizacije 50
5.2.1. Streptococcus agalactiae 51
5.2.2. Streptococcus dysgalactiae 54
5.2.3. Streptococcus canis 56
5.2.4. Streptococcus uberis 58
6. **RASPRAVA** 62
7. **ZAKLJUČCI** 76
8. **POPIS LITERATURE** 77
9. **ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA** 103

1. UVOD

U mliječnoj industriji mastitis je jedan od najvažnijih problema u ekonomskom, dijagnostičkom i javnozdravstvenom pogledu. Ekonomski gubitci se očituju u smanjenoj proizvodnji i lošijoj kvalieti mlijeka, troškovima liječenja i odbacivanju mlijeka neprikladnog za prehranu ljudi. Mlijekom se mogu prenositi i uzročnici bolesti ljudi i tako predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi. Mastitis je upala mliječne žlijezde bez obzira na uzrok. Multikauzalna je bolest i rezultat je interakcije između mikroorganizma, domaćina i okoliša. Istraživanja pokazuju da se više od 130 mikroorganizama povezuje sa etiologijom mastitisa. Najznačajni uzročnici mastitisa krava su bakterije roda *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Echerichia coli* i drugi koliformni mikroorganizmi. Porodica *Streptococcacae* jedna je od šest porodica reda *Lactobacillales*, razreda *Bacilli*. Obuhvaća rodove *Streptococcus* i *Lactococcus*. Brojne vrste roda *Streptococcus* važni su uzročnici bolesti u čovjeka i životinja. Među streptokoke kojima je glavni domaćin govedo ubrajaju se vrste *S. agalactiae*, *S. uberis* i S. *dysgalactiae*, koji su ujedno i najčešći streptokoki, uzročnici mastitisa u krava.

Bakterija *S. agalactiae* izrazito je kontagiozni obligatni patogen mliječne žlijezde. U pravilu izaziva perzistirajuće infekcije slabijeg intenziteta upale, ali niskog stupnja samoizlječenja. Inficirane, a neotkrivene krave predstavljaju rezervoar infekcije. Budući da je S. agalactiae obligatni intramamarni patogen, kravlje vime smatra se jedinim izvorom uzročnika u mlijeku. Stoga se i u slučajevima detekcije ovog uzročnika u stajskom uzorku mlijeka smatra da je izvor mliječna žlijezda. Budući da može duže vrijeme preživjeti samo u mliječnoj žlijezdi te da je osjetljiv na penicilin, podložan je iskorjenjivanju iz stada muznih krava. Uz primjenu biosigurnosnih mjera, stado se može održavati u stanju slobodnom od infekcija ovim uzročnikom.

Od ranih 70-ih godina prošlog stoljeća bakteriju *S. uberis* istraživači svrstavaju u oportunističke patogene iz okoliša budući da je u više navrata izdvojen iz stelje, fecesa i sa kože te iz mliječne žlijezde krava. Među najznačajnijim je uzročnicima mastitisa krava širom svijeta uključujući zemlje s intenzivnom mljekarskom

proizvodnjom poput SAD, Nizozemske, Kanade, Ujedinjenog Kraljevstva, a trend veće učestalosti mastitisa prouzročenog ovim uzročnikom opisan je i u Republici Hrvatskoj. Uzročnik se smatra glavnom preprekom u kontroli mastitisa krava, djelomice i stoga što mu epidemiologija nije u potpunosti istražena.

Bakterija *Streptococcus dysgalactiae* dugo se smatrala uvjetno patogenim uzročnikom mastitisa krava. U posljednje vrijeme je provedeno relativno malo istraživanja fokusiranih na ovog uzročnika, no ona naglašavaju da se ovaj uzročnik može ponašati i kao kontagiozni i kao uvjetno patogeni patogen *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* smatra se životinjskim patogenom i često je povezan s kliničkim i supkliničkim mastitisom u krava. U novije vrijeme uzročnik je povezan s pojavom sindroma nalik toksičnom šoku u krava gnojnim poliartritisom u janjadi, bakterijemijom u pasa, sustavnom granulomatoznom bolešću i teškom septikemijom u riba. U posljednje vrijeme naglašava se povezanost ovog uzročnika s različitim infekcijskim stanjima u ljudi kao što su celulitis, artritis nakon artoplastičnog zahvata i endokarditis.

Identifikacija streptokoka temelji se na biokemijskim osobinama, sposobnosti hemolize i serološkom grupiranju po Lancefieldovoj. Prema serološkim osobinama streptokoki se dijele u skupine A, B, C, D, E, F ,G, H te tzv. *viridans* skupinu koju nije moguće serološki svrstati ni u jednu od skupina. Identifikacija streptokoka još uvijek je problematična, obuhvaća 99 priznatih vrsta od kojih su mnogi povezani s bolestima kod ljudi i životinja. Grupa streptokoka *Viridans* obuhvaća četiri filogenetske grupe: *Mitis*, *Mutans*, *Salivarius* i *Anginosus*. Međutim, serološke skupine po *Lancefieldovoj* nisu vrsno specifične. U većini kliničkih laboratorija, identifikacija streptokoka temelji se na biokemijskim testovima. Na ovaj način krivo se identificira 10 do 15% izdvojenih sojeva. Sojevi unutar određene vrste mogu se razlikovati u istom svojstvu, dok isti soj može pokazivati biokemijsku varijabilnost. Osim toga, male promjene u intenzitetu reakcije biokemijskog testa mogu polučiti pogrešan krajnji rezultat.

S obzirom da niti jedan klasifikacijski sustav nije potpuno točan, razvoj i primjena metoda genskih analiza unaprijedio je identifikaciju streptokoka. Tijekom posljednjeg desetljeća brojne molekularne metode, kao što su ribotipizacija (*ribotyping*), amplificirana ribosomska restrikcijska analiza, metoda lančane reakcije polimerazom (eng. *Polymerasa chain reaction*; PCR), oligonukleotidno ispitivanje te

određivanje slijeda baza u odsječku gena (sekvencioniranje) omogućili su puno bržu i točniju identifikaciju streptokoka.

Cilj ovog istraživanja je utvrditi detaljniji uvid u zastupljenost pojedinih vrsta streptokoka u etiologiji mastitisa krava i javno-zdravstveno značenje infekcija mliječne žlijezde prouzročenih streptokokima, te podudarnost rezultata klasične mikrobiološke pretrage i identifikacije streptokoka molekularnim metodama.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Povijest

Hipokrat (*Hippocrates*), ”otac medicine”, u 4. st. p. n. e. opisao je kliničke slike streptokoknih infekcija. Alexander Gordon 1795. godine navodio je da je etiološki agens puerperalne groznice mikroorganizam okruglog oblika (DENNY, 2000.).Naziv roda *Streptococcus* prvi je opisao bečki kirurg Teodor Billroth 1874. godine, iskoristivši grčke riječi *streptos* za lanac i *kokhos* za zrno (DENNY, 2000.). Vjeruje se da je Fehleisen prvi izolirao streptokok, odnosno koke raspoređene u lancima 1883. godine, premda se u literaturi najčešće navodi da je prvu izolaciju obavio Louis Pasteur iz krvi pacijentice sa puerperalnom sepsom. Rosenbach je zaslužan za naziv vrste *S. pyogenes*. Streptokoki su ubrzo dovedeni u vezu sa brojnim infekcijama kao što su faringitis, šarlah, pneumonija, erizipel i impetigo. Početkom 20. st. Hugo Schottmueller i J. H. Brown napravili su podjelu streptokoka na osnovu tipa hemolize, a tridesetih godina 20. st. Rebecca Craighill Lancefield, američka mikrobiologinja, napravila je klasifikaciju β hemolitičkih streptokoka i opisala M protein, na osnovu kojega će kasnije biti napravljenana serotipizacija *S. pyogenes.*

Uvođenje tehnologija genetskog inžinjerstava sedamdesetih godina prošlog stoljeća omogućilo je novi pristup u analizi čimbenika virulencije na razini gena, ali nije imala veći značaj dok nisu postali dostupni odgovarajući vektori za kloniranje streptokoka. Prvi klonirani gen kod streptokoka odgovoran je za rezistenciju na eritromicin, nakon toga geni za strepokinazu, strepotokokni pirogeni egzotoksin A, i M protein (FERRETTI i KÖHLER, 2016.).

Doba genoma započelo je prvom cjelovitom sekvencom genoma Hemophilus influenze (FLEISHMANN i sur., 1995.), a potom je uslijedilo sekvencioniranje nekoliko drugih genoma. Prvi cjeloviti niz streptokoknog genoma skupine A prijavljen je za soj M1 (FERRETTI i sur., 2001.), a potom su prijavljeni brojni kompletni genomi drugih sojeva M tipa. Njihovi redosljedi dostupni su u genetskoj banci NIH https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/ .

2.2. Klasifikacija bakterija roda *Streptococcus*

Streptokoki su kuglaste ili jajolike bakterije međusobno povezane u parove ili nizove različite duljine. Najčešće su fakultativni anaerobi, ne stvaraju spore, gram-pozitivni su i uglavnom nisu pokretni. Porodica *Streptococcacae* jedna je od šest porodica reda *Lactobacillales*, razreda *Bacilli*. Obuhvaća rodove *Streptococcus* i *Lactococcus*. Naziv dolazi od grčkih riječi *streptos*-svinut i *kokos*-zrno. Široko su rasprostranjeni u prirodi kao normalna flora sluznica životinja i čovjeka, a neke vrste roda *Streptococcus* važni su uzročnici bolesti u čovjeka i životinja. U medicinskom smislu bakterije toga roda dijele se na tri skupine: skupinu oralnih streptokoka, skupinu piogenih streptokoka i skupinu ostalih streptokoka. Streptokokima u širem smislu pripadaju i enterokoki i laktokoki (NAGLIĆ i sur., 2005.). Rod *Streptococcus* obuhvaća više od 20 vrsta. Među streptokoke kojima je glavni domaćin govedo ubrajaju se vrste *S*. *agalactiae*, *S*. *uberis* i S. *dysgalactiae*, koji su ujedno i najčešći streptokoki, uzročnici mastitisa u krava. Među povremene uzročnike mastitisa i drugih patoloških promjena u govedu ubrajaju se i vrste *S*. *bovis*, *S*. *pneumoniae*, *S*. *pyogenes*, i *S*. *equi subsp. zooepidemicus*.

Vrste roda *Streptococcus* pokazuju široki spektar epidemioloških i ekoloških karakteristika. Na primjer, mnoge su vrste ograničene na ljude ili na jednog životinjskog domaćina, poput *Streptococcus equi* subsp. *Equi* je ograničen na konje, dok *S. agalactiae* inficira više domaćina, od ljudi do riba koštunjača (*Osteichthyes*). Neke se vrste smatraju zaraznim (prenose se izravno između domaćina), dok se druge smatraju ekološkim (prenose se između okoliša i domaćina: primjerice, *S. uberis* može se prenijeti s tla na krave). Jedna vrsta u skupini (*S. thermophilus*) nije patogena i intenzivno se koristi u mliječnoj industriji (PRICE i sur., 2012.).

U nekim od najranijih klasifikacija streptokoka, ime bakterijske vrste je sadržalo i ime bakterijske bolesti. Takav način klasifikacije je unosio brojne zabune, pa je vremenom sistematizacija uznapredovala. Danas se najčešće koriste navedene klasifikacije bakterija roda *Streptococcus*: prema tipu hemolize, podjela na osnovu antigenskih osobina i kombinirana podjela prema Shermanu.

2.2.1. Podjela streptokoka na osnovu tipa hemolize

Shottmuller (1903.) napravio je prvu klasifikaciju streptokoka na osnovu tipa hemolize na krvnom agaru. Tako je podijelio streptokoke u tri kategorije:

1. alfa (α) hemolitičke streptokoke, koje nepotpuno razgrađuju hemoglobin do bilirubina i na krvnom agaru stvaraju zelenu zonu hemolize oko kolonija,
2. beta (β) hemolitičke streptokoke, koje potpuno razgrađuju hemoglobin do bilirubina, stvarajući prozračno-žutu zonu hemolize oko kolonija i
3. gama (γ) hemolitičke streptokoke ili ne-hemolitičke streptokoke.

2.2.2. Podjela streptokoka prema grupno specifičnom antigenu

Rebecca Lancefield je 1928. godine identificirala grupno specifičnu C-tvar. Na osnovu antigenskih karakteristika C-polisaharida stanične stjenke koja posjeduje većina grupa i teihonske kiseline (grupe D i N), učinila je podjelu streptokoka na grupe označene slovima od A do H i od K do V (LANCEFIELD, 1933.). Za razvrstavanje u skupine i identifikaciju streptokoka najvažniji je polisaharidni antigen stanične stjenke, tzv. C-tvar. Pojedine vrste posjeduju polisaharidnu kapsulu i fimbrije.

Vrste koje izazivaju oboljenja životinja pripadaju skupinama A, B, C, D, E, G, L i V. Ovakvom podjelom nisu obuhvaćeni svi streptokoki jer pojedine vrste (*S. uberis*, *S. parauberis*, *S. pneumoniae*) nemaju grupno specifični antigen, pa se ne mogu klasificirati na ovaj način.

Suvremena podjela streptokoka temelji se na analizi podjedinice ribonukleinske kiseline streptokoka. Tim načinom svi streptokoki su podijeljeni u šest skupina: piogena, anginosus, mitis, salivarius, bovis i mutans (Tablica 1.).

Tablica 1. Klasifikacija vrsta iz roda *Streptococcus* prikazanih po serološkim skupinama

VRSTA	SKUPINA	HEMOLIZA	NOSILAC
PIOGENI			
S. pyogenes	A	β (α)	čovjek
S. agalactiae	B	β	čovjek, stoka
S.equi			
Subsp. equi	C	β	konj, magarac
Subsp. zooepidemicus	C	β	mnoge životinje
S. dysgalactiae			
subsp. dysgalactiae	C, L	α β -	svinja, stoka
subsp. equisimillis	C, G	β	čovjek
S. canis	G	β	mnoge životinje
S. iniae	-	β α	dupin
S. porcinus	E, P, U, V	β	svinja
S. uberis	-, E	α	stoka
S. parauberis	-, E	α	stoka
S. hyointestinalis	-	α	svinja
ANGINOSUS			
S. anginosus	-, F, A, C, G	α β	čovjek
S. constelatus	-, A, C	α β	čovjek
S. intermedius	-F, G	α β	čovjek
MITIS			
S. mitis	O, K.-	α	čovjek
S. oralis	-	α	čovjek
S. pneumoniae	-	α	čovjek
S. gordonii	H1, H2, -	α	čovjek
S. sunguis	H1, -	α	čovjek
S. parasanguis	-	α	čovjek
S. crista	-	α	čovjek
SALIVARIUS			
S. salivarius	H2, K.-		čovjek
S. vestibularis	-		čovjek
S. thermophiolus	-		mlijeko, mliječni proizvodi
BOVIS			
S. bovis	D	-, α	stoka, ovca, svinja
S. equinus	D	α	čovjek, pas, golub
S. alactolyticus	D	α, -	konj,druge životinje, svinja, pile
MUTANS			
S. mutans	-, E	-, β α	čovjek
S. cricetus	-	-, α	hrčak, čovjek, štakor
S. sobrinus	-	α, -	čovjek
S. downeii	-	-	majmjun
S. rattus	-	-	štakor, čovjek
S. macacae	-	-	majmun
S. ferus	-	-	štakor
OSTALI STREPTOKOKI			
S. suis	D	β α, -	svinja, stoka
S. acidominimus	-	α	stoka
S. intestinalis	-, G	β	svinja
S. caprinus			divlja koza
O = rijetki oblik hemolize			

Modificirano prema BEGOVAC i sur., 2006.

2.3. Faktori virulencije

Faktori virulencije pomažu uzročniku pri prodoru i otpornosti na obranu domaćina. Faktore virulencije streptokoka možemo podjeliti na strukturirane faktore virulencije, toksine streptokoka i enzime streptokoka.

Strukturirani faktori virulencije sastoje se od kapsule, M-proteina, F-proteina i lipoteihoične kiseline. Kapsula se nalazi na površini stanice i sastoji se iz hijaluronske kiseline ili polisaharida koja štiti bakteriju od fagocitoze. M-protein omogućava zaštitu od fagocitoze i sprečava interakciju sa komplementom. Zahvaljujući sposobnosti vezanja fibrinogena, koji prikriva receptore za C_3b na površini stanice. Nadalje, inhibira aktivaciju komplemenata alternativnim putem i na taj način sprječava odlaganje C_3b komponente i naknadnu opsonizaciju (BISNO i sur., 2003.). Sastoji se od polimera *ramnoze* i *N-acetilglukozamina* (FERRETTI i sur., 2016.).

F-protein posjeduje receptor za *fibronektin* koji je glavni stanični protein eukariotske stanice, pa se smatra da on predstavlja glavni faktor (adhezin) koji omogućava pričvrščivanje za tkivo domaćina (epitel ždrijela iil koža). Lipoteihoična kiselina ima također ulogu glavnog faktora (adhezin), dok lipidni dio ovih molekula predstavlja mjesto vezivanja sa *fibonektinom* (CLEARY i sur., 1992.).

Toksini streptokoka su pirogeni (eritrogeni) egzotoksin, streptolizin S, streptolizin O i hemolizin.

Pirogeni (eritrogeni) egzotoksin djeluje kao superantigen koji nespecifično stimulira T-limfocite što dovodi do otpuštanje citokina (interleukin-1 i faktor nekroze tumora) koji su odgovorni za nastanak šoka i oštećenja tkiva. Samim time, djeluju na termoregulaciju domaćina i izaziva povišenu temperaturu (BISNO i sur., 2003.).

Streptolizin S lizira (uništava) eritrocite, leukocite i trombocite, dok streptolizin O također lizira eritrocite, ali djeluje u anaerobnim uvjetima. Ugrađuje se citoplazmatsku membranu različitih eukariotskih stanica i stvaraju transmembranske pore što dovodi do lize i smrti stanice. Hemolizin ima ulogu u lizi lipida (MADDEN i sur., 2001.).

Enzimi streptokoka obuhvaćaju streptokinazu, deoksiribonukleazu (DNA-za) i hijaluronidazu.

Streptokinaza dovodi do razgradnje fibrina i doprinosi prodoru bakterija kroz inficirana tkiva (SUN i sur., 2004.), a DNA-za depolimerizira slobodne DNA i time smanjuje viskoznost gnojnog sadržaja olakšavajući bakterijama da prodiru. Hijaluronidaza razgrađuje hijaluronsku kiselinu vezivnog tkiva i omogućava širenje streptokoka kroz tkiva domaćina (LUKOMSKI i sur., 1999.).

2.4. Patogeneza streptokoknih infekcija

Mastitis je jedna od najčešćih bolesti mliječnih goveda u cijelom svijetu, jer uzrokuje najveće gubitke u mliječnom gospodarstvu (MAĆEŠIĆ i sur., 2016.). Ima značajan utjecaj sa stanovišta javnog zdravstva, prerade mlijeka i dobrobiti životinja. Ekonomski gubitci se očituju kroz smanjenu proizvodnju mlijeka, velike troškove liječenja, prijevremeno izlučivanje životinja, vrijednost odbačenog mlijeka te smanjenu plodnost.

U patogenezi mastitisa ključnu ulogu ima urođeni imunosni odgovor koji je prva linija obrane nakon što patogen prodre u mliječnu žlijezdu. Upala je standardna reakcija organizma na ozljedu bilo kakvog fizičkog, kemijskog ili biološkog uzroka, no prije svega to je vitalni zaštitni mehanizam, koji uključuje proizvodnju reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), fagocitne mehanizme, izlučivanje protumikrobnih tvari, stvaranje ožiljkastog tkiva i neovaskularizaciju te promjene tkivne strukture zahvaćenog organa ili tjelesnog prostora. Metaboličko opterećenje nastalo prilikom prelaska iz perioda zasušenja u period rane laktacije je dodatno potencijalni izvor oksidansa i ROS-a u mliječnih krava i pogodovni čimbenik za nastanak oksidacijskog stresa i upalnog odgovora (WELLNITZ i sur., 2012.). Antioksidacijski status krava u peripartalnom razdoblju je stoga oslabljen i posljedično oksidacijski stres i upalni odgovor mogu predisponirati osjetljivosti krave za intramamarne infekcije (IMI) i mastitis. Povezanost između upalnog odgovora i oksidacijskog stresa tijekom IMI i mastitisa ukazuje na njihovu važnu ulogu u patogenezi bolesti mliječne žlijezde te

stoga bolje razumijevanje takvog sinergizma može doprinijeti razvoju novih pristupa u prevenciji i liječenju IMI-a i mastitisa (TURK i sur., 2017.).

Inicijalni korak u patogenezi streptokoknih infekcija je adherencija. Da bi uspostavio kolonizaciju streptokoki imaju brojne mehanizme kojima izbjegava učinak imunosnog odgovora domaćina. Za širenje infekcije odgovorni su čimbenici invazivnosti, a ponovljene infekcije i kliconoštvo se jednim dijelom mogu objasniti i internalizacijom bakterije.

2.4.1. Adherencija i kolonizacija

Interakcija između patogena i domaćina počinje vezivanjem površinskih streptokoknih liganada za receptore na površini stanica. Čvrsta adherencija streptokoka, umnožavanje i kolonizacija faringealnih i epidermalnih epitelnih stanica onemogućava uklanjanje bakterija obrambenim mehanizmima domaćina, poput eksfolijacije (CUNNINGHAM, 2000.). Među čimbenicima koji određuju adherenciju su adhezini (mikrobne molekule koje posreduju pričvrščivanju za stanice) i receptori domaćina za koje se adhezini vežu. Adhezini se dijele na polisaharidne (kapsula, lipoteihoična kiselina) i proteinske (fimbrijalni i nefimbrijalni). Dosada je opisano najmanje 17 različitih streptokoknih adhezina (BISNO, 2003.), od kojih su najbolje proučeni M protein, LTA (Limfotoksin alfa) i protein SfbI (Protein F1) (COURTNEY i sur., 1992.), GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza), GVP (galaktoza vezujući protein), (VALENTIN-WEIGAND i sur., 1992.), KVP (kolagen vezujući protein) (engl. *streptococcal collagen-like surface protein*, Scl) (VISAI i sur., 2018.), SOF (PILKA, 2002.), FBP54 (fibrinogen-binding protein) (COURTNEY i sur., 1994.) i kapsula. Oni se vezuju za različite ekstracelularne molekule, ali i za integralne površinske stanične receptore: fibronektin, fibrinogen, kolagen, vitronektin, antigen CD44i antigen CD46. M protein ima ulogu u adherenciji za keratinocite, vezivanjem za antigen CD46. Lipoteihoična kiselina je značajna u adherenciji za oralnu sluznicu i najvećim dijelom je odgovorna za adherenciju streptokoka (BEACHEY i OFEK, 1976.).

2.4.2. Intracelularna invazija

Posljednjih godina brojni autori potvrđuju da streptokok grupe A pored adherencije za epitelne stanice ima sposobnost i intracelularne invazije (LAPENTA i sur., 1994.). Utvrđeno je da stupanj invazije zavisi od ekspresije M proteina i SfbI (Protein F1) proteina, zbog čega se oni smatraju i invazinima. Visok stupanj internalizacije uočen je kod serotipa M1 (DOMBEK i sur., 1999.), koji se često povezuje sa invazivnim infekcijama. Tijekom intracelularne invazije streptokoka grupe A dolazi do rekombinacije staničnog cito-kostura.

2.5. Značaj streptokoka u etiologiji mastitisa

Mastitis je najskuplja bolest mliječnih krava (BRADLEY, 2002.). Multikauzalna je bolest i rezultat je interakcije između mikroorganizma, domaćina i okoliša. Istraživanje WATTSA (1988.) pokazuje da se više od 137 mikroorganizama povezuje sa etiologijom mastitisa. Najznačajni uzročnici mastitisa krava su bakterije roda *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Echerichia coli* i drugi koliformni mikroorganizmi. (RADOSTITS i sur., 2000., BENIĆ i sur., 2018.). Najveći broj mastitisa uzrokuju nekontagiozne bakterije, a među njima su najučestalije *E. coli* i *Streptococcus* spp. (POUTREL i sur., 2018.).

Vrsta *S. agalactiae* uzročnik je mastitisa u krava, a može se ustanoviti i kao uzročnik metritisa ili pobačaja u krava, kobila, krmača te artritisa i upale pluća u svinja. Streptokoki skupine B uzrokuju neonatalnu septikemiju u ljudi, a mogu uzrokovati i meningitis. Vrsta *S. dysgalactiae* također je uzročnik upale vimena u krava koja se očituju kao kataralni galaktoforitis i mastitis. Osim u mliječnoj žlijezdi, često se nalazi na tonzilama i na povrijeđenoj koži.

Važnost pojedinog mikroorganizma, kao uzročnika mastitisa kod mliječnih krava, ovisna je o prirodi mikroorganizma, infekcijskoj dozi, te uvjetima držanja. Budući da je većina uzročnika mastitisa ubikvitarna, mastitis ne možemo iskorijeniti ali ga možemo držati pod kontrolom (MAĆEŠIĆ, 2010., BENIĆ i sur., 2018.).

Uzročnici mastitisa dobro se razmnažaju u mlijeku i imaju sposobnost iskorištavanja laktoze kao izvora ugljika. Uzročnici osiguravaju brzu i adekvatnu opskrbu dušikom korištenjem proteolitičke aktivnosti hidrolizom kazeina. Takvi uvjeti pogoduju njihovu rastu. Dolazi do promjene u sastavu mlijeka zbog izlaska plazme u mlijeko, povećane proteolitičke aktivnosti i razvoja upale (BRAMLEY i DODD, 1984.). Uzročnici mastitisa mogu se podijeliti na kontagiozne mikroorganizme i uvjetovane ili mikroorganizme iz okoliša. Nazivamo je i podjelom prema epidemiologiji uzročnika. Ovakva podjela je napravljena na temelju uobičajenih izvora infekcije i načinu širenja mikroorganizama.

2.5.1. *Streptoccocus agalactiae*

Streptococcus agalactiae je gram-pozitivna bakterija, kuglasta ili jajolika oblika, 0.6-1.2 μm u promjeru. Pretežno se nalaze u nizovima, pokatkad vrlo dugim, u kojima mogu biti poredani po dva, kao diplokoki. Bakterija *S. agalactiae* prvi je put opisana 1887. godine kao „uobičajena bakterija koja inficira vime goveda , uzrokujući bolest nazvana mastitis“ (NOCARD i MOLLEREAU, 1887.). To je dovelo do znatno niže proizvodnje mlijeka (RUEGG, 2017.), pa se vrsta zove *agalactiae* (s grčkog: a-, ne; galactos, mlijeko). Pripada serološkoj skupini B prema Lancefieldovoj, u sklopu koje se sojevi mogu na osnovi kapsularnih polisaharidnih antigena i proteinskih antigena razvrstati u nekoliko serovarova (Ia, Ia, Ic, II, III, IV i V, R, X). Te se dvije skupine međusobno razlikuju i drugim osobinama. Polisaharidni antigen drži se faktorom virulencije, a protutijela za taj antigen pridonose imunosti prema infekciji (NAGLIĆ i sur., 2005.). Bakterijska vrsta *S. agalactiae* vrlo je kontagiozna, prenosi se najčešće tijekom mužnje. Raste i razmnožava se gotovo isključivo u vimenu zaražene krave. Ako se u stado slobodno od ovog uzročnika uvede inficirana krava, može vrlo brzo inficirati skoro cijelo stado. Slučajevi mastitisa rijetko su jači od subkliničkih ili blagih kliničkih oblika, ali često traju vrlo dugo uzrokujući oštećenje žljezdanog dijela vimena koji služi za proizvodnju mlijeka. Zato infekcija bakterijom *S. agalactiae* ima značajan utjecaj na proizvodnju mlijeka. Kod infekcije ovim uzročnikom broj je somatskih stanica uvijek povišen.

Broj bakterija u mlijeku često može, ali ne mora, biti povišen. Stopa izlječenja je nešto niža kod infekcija koje duže traju (BAČIĆ, 2009., MAĆEŠIĆ 2010.). U stadima koja nemaju kvalitetno razvijene programe za kontrolu mastitisa, ovaj uzročnik predstavlja veliki problem. Infekcijom je zahvaćeno između 10 i 15% krava i 25% četvrti. Pojavnost infekcije u stadu manja od 10% rezultat je uspješnog programa kontrole mastitisa nastalih ovim uzročnikom (RADOSTITS i sur., 2000.). Glavno izvorište infekcije je mliječna žlijezda u kojoj se uzročnik razmnožava i izlučuje mlijekom. U dodiru s onečišćenim mlijekom inficiraju se ljudi, pribor za mužnju, zrak, tlo, stelja i različiti predmeti.

Mehanizam ulaska bakterije *S. agalactiae* u sisni kanal više ovisi o promjeru sisnog kanala nego o njegovoj dužini. Jednom kad uđe u vime, bakterija ima sposobnost vezanja na parenhim, a mikroklima vimena joj je potrebna za rast. Bakterija *S.agalactiae* se nalazi na površini mukoze i u mliječnim kanalićima, a može proći kroz stijenku kanalića u limfne žile i supramamarne limfne čvorove. Kod procjene razvoja intramamarne infekcije uzrokovane ovim uzročnikom među kravama postoji znatna razlika, ovisno o starosti krave i stupnju laktacije. Infekcije bakterijom *S. agalactiae* javljaju se uglavnom kod starijih krava i to na početku laktacije, te je jedini uzročnik mastitisa protiv kojega je liječenje antibioticima još uvijek tijekom laktacije (80-90% učinkovitosti), kao i tijekom suhostaja, izuzetno učinkovito (RADOSTITS i sur., 2000., BAČIĆ, 2009., MAĆEŠIĆ, 2010.). Najzaslužniji za smanjenje pojave kontagioznih uzročnika mastitisa je sustav kontrole mastitisa Plan u pet točaka (*The five point Plan*) koji je razvijen u Velikoj Britaniji još prije 50-tak godina. Njegovi elementi su:

- Dezinfekcija sisa prije i nakon mužnje
- Liječenje antibioticima svih krava u suhostaju
- Liječenje kliničkih mastitisa tijekom laktacije
- Pravilno održavanje muzne opreme
- Izlučivanje problematičnih krava iz uzgoja

Redovitom primjenom i poštivanjem nabrojanih postupaka vidljiva su poboljšanja u smislu smanjene pojavnosti ili potpunog iskorjenjivanja pojedinih oblika

kontagioznih mastitisa pogotovo onih uzrokovanih sa bakterijom *S. agalactiae* (BAČIĆ, 2009., MAĆEŠIĆ, 2010.).

2.5.2. Streptokoki iz okoliša

Streptokoki iz okoliša su gram pozitivne, katalaza negativne kugličaste bakterije. Ova grupa mikroorganizama u literaturi se često naziva „*Strep non-ag*“, jer uključuje sve streptokoke osim *Streptococcus agalactiae* (BAČIĆ, 2009.). Najčešće vrste streptokoka iz okoliša su *Streptococcus uberis* i *Streptococcus dyscalactiae*. Bakterije *S. uberis* i *Streptococcus agalactiae* izolirane su kod 20 do 25% subkliničkih i kliničkih slučajeva u Skandinavskim zemljama (SANDHOLM i sur., 1995.). Ostali, manje učestali uzročnici su *Streptococcus equi, Streptococcus viridans, Streptococcus equinus, Streptococcus pyogenes,* i *Streptococcus pneumoniae* (RADOSTITS i sur., 2000.). Streptokoke iz okoliša najčešće nalazimo u stelji, osobito slami, kao i na tijelu krava (ozlijedama kože, dlaci, sluznicama, usnama, vagini itd.).

U zemljama u kojima su intramamarne infekcije izazvane uzročnicima *S. aureus* i *S. agalactiae* značajno smanjene, udio infekcija uzrokovanih streptokokima iz okoliša izrazito se povećao. Istraživanje TODHUNTER i sur. (1995.) pokazalo je da je udio okolišnih streptokoka kod intramamarnih infekcija u suhostaju 5,5 puta veći nego tijekom laktacije. Otpornost krave, a osobito zdravog sisnog kanala važna je u kontroli okolišnih streptokoka (HOGAN i SMITH , 1992.). Stada koja provode uspješne programe za kontrolu mastitisa i dalje se suočavaju s problemima koje stvara ova vrsta uzročnika.

Streptokoki uzrokuju subkliničke i kliničke infekcije, češće blažeg tijeka od infekcija uzrokovanih koliformnim uzročnicima. Rizik da će inficirana četvrt iz subkliničkog prijeći u klinički oblik smanjuje se tijekom laktacije. Uobičajeno trajanje infekcije kraće je od mjesec dana, iako neki slučajevi prelaze u kronične i traju mjesecima. Bakterija *S. uberis* je najčešći streptokok iz okoliša. Vrsta *S. dysgalactiae* u nekim se stadima može ponašati i kao kontagiozni uzročnik izazivajući mnoštvo subkliničkih slučajeva i sporadične kliničke slučajeve. Streptokoki iz okoliša ponekad su odgovorni za visok broj bakterija u mlijeku (BAČIĆ, 2009., MAĆEŠIĆ 2010.).

Mastitisi uzrokovani streptokokima iz okoliša često se javljaju u ranoj laktaciji kao posljedica infekcije u prethodnom suhostaju. Blagog su do umjerenog očitovanja. Liječenje antibioticima na osnovi antibiograma je preporučljivo.

U većini slučajeva klinički znakovi nestaju spontano, ali to ne znači da nestaju i uzročnici. Iako učinkovitost i ekonomska opravdanost liječenja nisu dokazane, opće prihvaćeno pravilo jest da se kliničke infekcije uzrokovane streptokokima iz okoliša liječe antibioticima. Liječenje antibioticima poboljšava stopu kliničke izliječenosti, ponekad i stopu bakteriološke izliječenosti, pogotovo ako liječenje započnemo u ranoj fazi infekcije. Liječenje antibioticima u suhostaju učinkovito je u liječenju postojećih infekcija i prevenciji novih koje bi eventualno nastale u suhostaju. (BAČIĆ, 2009., MAĆEŠIĆ 2010.).

2.5.3. *Streptococcus dysgalatiae*

Bakterija *Streptococcus dysgalactiae* pripada Lancefieldovoj skupini C i smatra se uvjetovanim uzročnikom mastitisa.

Dijeli se u nekoliko biovarova. Današnji naziv *Streptococcus dysgalactiae* zajednički je naziv za sojeve koji su prethodno klasificirani kao *Streptococcus dysgalactiae* (uzročnik mastitisa), *Streptococcus eqisimilis* (rijetko uzrokuje mastitis u krava), streptokokna skupina L (uzročnici mastitisa) i G (patogeni za čovjeka) (NAGLIĆ i sur., 2005.). Vrsta *S. dysgalactiae* ubraja se među uzročnike upala vimena u krava koje se pretežno očituju kao kataralni galaktoforitis i akutni mastitis na početku laktacije. Bakterija *S. dysgalactiae* se osim u mlijeku često nalazi u tonzilama i vagini životinja. Infekcije se javljaju često tijekom suhostaja kod krava i junica što pokazuje neovisnost uzročnika i procesa mužnje (BRAMELY i DODD, 1984.). Povećanu pojavnost ozljeda, nadraženost sisa i sisnog kanala (zbog loše podešenih pulzatora i povišenog vakuma u muznom sistemu) često prati pojava većeg broja infekcija ovim uzročnikom. Infekcije sa bakterijom *S. dysgalactiae* često se događaju u zasušenih krava i junica. U Europi je zabilježeno kod krava u suhostaju i junica da je bakterija *S. dysgalactiae* jedan od inicijalnih mikroorganizama koji uzrokuju ljetni mastitis (BRAMELY i DODD., 1984., SANDHOLM i sur., 1995., RADOSTITS i sur.,

2000.).

U posljednje vrijeme je provedeno relativno malo istraživanja fokusiranih na ovog uzročnika, no ona naglašavaju da se ovaj uzročnik može ponašati i kao kontagiozni i kao uvjetno patogeni (okolišni) patogen (LUNDBERG i sur. 2016.). *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* smatra se životinjskim patogenom i često je povezan s kliničkim i supkliničkim mastitisom u krava (ABDELSALAM i sur. 2013., CERVINKOVA i sur., 2013.). Prema nedavno objavljenim radovima, uzročnik je povezan s pojavom sindroma nalik toksičnom šoku u krava (CHENIER i sur., 2008.) gnojnim poliartritisom u janjadi (LACASTA i sur., 2008.), bakterijemijom u pasa (VELA i sur., 2006.), sustavnom granulomatoznom bolešću i teškom septikemijom u riba (HAGIWARA i sur., 2009.).

2.5.4. *Streptococcus uberis*

Streptococcus (S.) uberis uzročnik je kliničkog i subkliničkog mastitisa čija se važnost u zdravlju vimena značajno povećala posljednjih desetljeća te je na većini mliječnih farmi najzastupljeni uzročnik mastitisa (KROMKER i sur., 2014.).

Streptococcus uberis nalazi se unutar reda *Lactobacillales* i porodice *Streptococcaceae*. Vrsta *S. uberis* su gram pozitivne, kuglastog oblika, poredane po dvije ili se nalaze u srednje dugim nizovima. Uzgaja se na krvnom agaru tvoreći α-hemolizu (alfa-zelenu hemolizu) oko kolonija. Pojedini sojevi nisu hemolitični. Antigenski sastav sojeva *S. uberisa* nije jedinstven. Postoje različiti načini klasifikacije streptokoka. Od 15 do 50% sojeva mogu se reakcijom precipitacije prema Lancefieldovoj uvrstiti u serološku skupinu E. Pojedini sojevi reagiraju s protutijelima za specifične antigene skupine G, P, U i B. Prema razlikovnim antigenima mogu se nepotpuno podijeliti u 3 do 11 serovarova (NAGLIĆ i sur., 2005.). U današnje vrijeme, molekularne metode (DNA-DNA hibridizacija ili 16S rDNA sekvencioniranje gena) koriste se za razlikovanje bakterijskih vrsta (KROMKER i sur., 2014.) kada vrijednost sličnosti manja od 70% ukazuje da uspoređeni sojevi pripadaju posebnim vrstama.

Bakterija *S. uberis* je serološki heterogena vrsta što je važna činjenica budući da heterogenost dovodi do značajnih razlika u vezi sa epidemiološkim svojstvima patogena (ZADOKS i sur., 2011.). Fenotipskim metodama nije moguće razlikovati *S. uberis* i *S. parauberis* (FACKLAM, 2002.). ZADAKOS i sur. (2005.) izolirali su nekoliko sojeva *S. uberis* koji su usko povezani sa *S. parauberis*. Nekoliko autora opisalo je (FORSMAN i sur., 1997., RIFFON i sur., 2001.) vrsno specifične početnice za identifikaciju *S. uberisa* primjenom PCR molekularne metode. FORSMAN i sur. (1997.) primjenili su par početnica STRU-UbI i STRU-UbII (veličina glavnog PCR produkta 330 bp) za identifikaciju *S. uberis* sa visokim stupnjem pouzdanosti. RIFFON i sur. (2001.) primjenili su početnice Sub 302, 396, 1546 i 2170 na osnovi GI br. 43370 i 2668550 (23S rDNA) kako bi dizajnirao PCR komplet za djagnostiku neovisan o kulturi. DNA *fingerprinting* korištenjem gel elektroforeze u pulsnom polju i nasumično pojačane polimorfne DNA primjenjeni su za procjenu raznolikosti sojeva *S. uberis* što odražava njihovu prilagodljivost u vimenu (McDOUGALL i sur., 2004., RATO i sur., 2008.). Nadalje, tipiziranje analizom više genskih slijedova (eng. *multilocus sequence analysis*, MLSA) poput lokusa arc, ddl, gki, recP, ddk, tpi, yqiL, hasA i hasC koristi se za opisivanje populacije S. uberisa kao i epidemioloških obilježja patogena (COFFEY i sur., 2006., TOMITA i sur., 2008.).

Faktori virulencije nisu poznati u potpunosti i predpostavlja se da se njihova ekspresija razlikuje između sojeva (MATTHEWS i OLIVER, 1993., KROMKER i sur., 2014.)

Bakterija *S. uberis* uvjetno je patogena i nalazi se u velikom broju u iskorištenoj slamnatoj stelji kod krava (HOGAN i SMITH, 1992., HUGHES, 1999., RADOSTITS i sur., 2000.) i u silaži. Vrsta *S. uberis* nema sposobnost vezanja na stanice domaćina kao što je imaju ostali streptokoki uzročnici mastitisa. Rijetko kolonizira sisni kanal i vjerojatno se umnožava direktno unutar sisnog kanala adhezijom na stanice epitela. Pojedini sojevi tvore kapsule koje nemaju antigenske osobine što povećava njihovu otpornost na fagocitozu. Bakterija *S. uberis* se povezuje s tzv. ljetnim mastitisima, koji se javljaju u zasušenih krava i junica u ljetnim mjesecima (BAČIĆ, 2009., MAĆEŠIĆ 2010.). Uzročnici *S. uberis* i *A. pyogenes* izolirani su iz muhe *Hydrotaea irritans* koju privlači sekret iz četvrti zahvaćenih mastitisom i često je uočavamo na kravama (SANDHOLM i sur., 1995.). Pojavnost novih IMI najveća je ljeti, podjednako kod krava na početku laktacije i u suhostaju. Povećani rizik IMI prije poroda može biti posljedica

gubitka keratinskog čepa iz sisnog kanala ili imunosupresije.

Postupci poput uranjanja sisa u dezinficijens i liječenje antibioticima kod zasušivanja, obično su neučinkoviti protiv mastitisa uzrokovanog bakterijom *S. uberis.* Učinkovitost liječenja ovog uzročnika je lošija u usporedbi s bakterijskim vrstama *S. agalactiae* i *S. dysgalactiae*, ali je bolja u usporedbi s vrstom *S. aureus* (BRAMELY i DODD, 1984.).

Bakterija *S. uberis* jedan je od glavnih uzroka kliničkog mastitisa u cijelom svijetu (RUEGG, 2012.). Ovaj se patogen smatra važnom preprekom u kontroli mastitisa kod mliječnih goveda, jer njegova epidemiologija nije u potpunosti razumljiva (ZADOKS i sur., 2003.). Iako se čini da je okoliš glavni rezervoar *S. uberis*, daljnje molekularne studije pružile su dokaz da se događa i zarazno prenošenje (RATO i sur.,2008, ABUREEMA i sur., 2014., LEELAHAPONGSATHON i sur., 2016., TOMAZI i sur., 2019.).

Vrsta *S. uberis* se javlja kao jedan od najčešćih uzročnika mastitisa u svijetu, pa tako i u Hrvatskoj. Prema istraživanju koje su proveli CVETNIĆ i sur. (2016.) u Hrvatskoj najznačajniji uzročnici mastitisa su *S. uberis* (28.8%) te *S. aureus* (15.5%) i *Streptococcus* spp. (13.8%). Rezultati analize uzročnika mastitisa u Makedoniji pokazuju znatno drugačiju etiološku sliku od rezultata koje su proveli MUFTIĆ i sur. (2019.) u Bosni i Hercegovini koji ukazuju na netipičnu etiološku sliku mastitisa (*S. aureus* 42.11%). Studija koju su objavili CVETNIĆ i sur. (2016.), kao i TRAJCHEV i NAKOV (2017.) ukazuju na znatnu razliku u broju i prevalenciji uzročnika između navedena tri istraživanja.

Istraživanjem kliničkog i subkliničkog mastititisa na 97 farmi u Engleskoj i Walesu dokazano je da su najčešći uzročnici *S. uberis* u 23,5% uzoraka (BRADLEY i sur., 2007., LUNDBERG i sur., 2014.).

2.6. Infekcije ostalim vrstama streptokoka

2.6.1. *Streptococcus pyogenes*

Bakterija *Streptococcus pyogenes* tipičan je predstavnik roda i prije svega je značajan kao uzročnik oboljenja ljudi (STEVENS, 2000.). Izvor infekcije je zaražena osoba kao bolesnik ili kliconoša. Bakterija se prenosi kapljičnim putem, direktnim kontaktom sa inficiranom ranom ili promjenama na koži. Prema mehanizmu oštećenja tkiva dijele se na oboljenja invazivnog karaktera (faringitis, piodermija, erizipel, celulitis, nekrozitirajući fascitis i miozitis), oboljenja toksemičnog karaktera (šarlah i streptokokni sindrom toksičnog šoka), te poststreptokokne sekvele (akutna reumatska groznica i akutni glomerulonefritis) (CARAPETIS i sur., 2005.).

U patologiji životinja ima značaj kao uzročnik mastitisa kod krava te iznimno rijetko limfadenitisa u ždrebadi.

2.6.2. *Streptococcus pneumoniae*

Bakterija koja uzrokuje pneumokoknu bolest u ljudi sa simptomima upale pluća, meningitisa i febrilne bakterijemije. Slabiji oblik bolesti manifestira se upalom srednjeg uha, bronhitisom i upalom sinusa. Pneumokok se prenosi direktnim kontaktom s respiratoornim izlučevinama oboljele ili zdrave osobe koja je kiconoša (nositelj) pneumokoka (PRATO i sur., 2010.). Prema podacima Hrvatskog Zavoda za Javno Zdravstvo iz 2018. godine, Hrvatska ima jednu od najnižih stopa prijava invazivne pneumokokne bolesti u EU. Stopa invazivne pneumokokne bolesti je 2015. godine u Hrvatskoj bila 0,4% na 100. 000 stanovnika.

2.6.3. *Streptococcus porcinus*

Bakterija koja uzrokuje streptokokni limfadenitis ili apscese, osobito u limfnim čvorovima vrata materinice (ABUBAKAR i sur., 2017.). Pripada skupini E, P, U, V i stvara beta-hemolizu. Obično su izolirani iz gornjih dišnih puteva, ždrijela, retrofaringealnih limfnih čvorova i genitalnog trakta gdje je nosioc bolesti svinja. Često uzrokuje vaginitis kod krmača i neonatalnu septikemiju tek novorođenih prasadi. *S. porcinus* također uzrokuje artritis, endokarditis i lezije na plućima kod starijih svinja (ABUBAKAR i sur., 2017.). Dijagnoza bolesti temelji se na kliničkoj slici i makroskopskim lezijama (STAATS i sur., 1997.).

2.6.4. *Streptococcus canis*

Streptococcus canis je beta-hemolitički streptokok iz grupe G koji kolonizira kožu, gornji dišni put i reproduktivni trakt pasa i mačaka (TIMONEY i sur., 2017.). *S. canis* je također važan uzročnik ovih vrsta, uzrokujući infekcije kože i urogenitalnog trakta, vanjske upale uha, upale pluća, endokarditis, septički artritis, septikemiju, nekrotizirajući fascitis i sindrom toksičnog šok streptokoka (MORROW i sur., 2016.). Izolacija *S. canis* od drugih životinja uključujući stoku za koje je poznato da uzrokuje klinički i subklinički mastitis goveda (HASSAN i sur., 2005.), te razne divlje životinjske vrste, uključujući minke (CHALMERS i sur., 2015.) i divlje mačke (HARIHARAN i sur., 2011.), ali i vodene sisavce (SEGUEL i sur., 2018.) i vidre (SIMPSON, 2006.). Vrsta *S. canis* ima zoonotski karakter sa sve većim brojem studija koje prijavljuju izolaciju *S. canis* od slučajeva infekcije kože i mekog tkiva, bakteremije i endokarditisa kod ljudi (TANIYAMA i sur., 2017). Iako je pokazano da su iste vrste *S. canis* pronađene i kod kućnih ljubimaca, stoke i ljudi (PINHO i sur., 2013.), genotipska karakterizacija izolata *S. canis* od divljih životinja je drugačija. Bakterija koja je primarno patogena kod životinja, a zatim kod ljudi. *S. canis* M-*like* protein je njegov primarni faktor virulencije (PINHO i sur., 2019.).

Genski podaci pokazali su da je bakterija *S. canis* povezana s beta-hemolitičkim *Streptococcus pyogenes* i *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, oba su humani patogeni s kojima *S. canis* dijeli mnoge moguće faktore virulencije (RICHARDS i sur., 2012.).

2.6.5. *Streptococcus equi subsp. equi*

Streptococcus equi subs. equi je gram pozitivni, β-hemolitički streptokok koji pripada Lancefield grupi C i smatra se da potječe od *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* (HARRINGTON i sur., 2002.). Dijeli oko 98% odgovarajuće DNA sličnosti sa *S. zooepidemicus,* a uzročnik je ždrebečaka, vrlo kontagiozne zarazne bolesti konja koja se u tipičnom obliku očituje pojavom visoke temperature i akutnog nosnog mukopurulentnog katara praćenog zagnojavanjem limfnih čvorova glave i vrata. U atipičnom obliku može se očitovati širenjem gnojnih procesa na limfne čvorove i organe prsne i trbušne šupljine (BOYLE i sur., 2018.). Bolest se prenosi direktnim i indirektnim putem, a odlikuje se velikim morbiditetom kada jednom uđe u populaciju. Češće se javlja u mladih konja, a može zahvatiti sve dobne skupine. Životinje kliconoše predstavljaju posebnu prepreku u trajnom suzbijanju ždrebećaka jer više godina mogu izlučivati uzročnika bez da sami pokazuju kliničke znakove bolesti. “Zlatnim standardom” u dijagnostici ždrebećaka smatra se kulturna pretraga brisa nosa ili nazofarinksa, nosnog ispirka ili gnojnog sadržaja dobivenog aspiracijom apscesa. Osim mikrobioloških, danas se dijagnostika upotpunjuje i korištenjem seroloških (ELISA) i molekularnih (PCR) metoda (NOLL i sur., 2020.).

2.6.6. *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*

Streptococcus equi subsp. zooepidemicus je gram pozitivni, β-hemolitički streptokok koji pripada Lancefield grupi C. Smatra se oportunističkim mikroorganizmom kod konja (NEWTON i sur., 2008.), ali može uzrokovati i infekcije kod drugih domaćih životinja poput goveda, ovce, koze, svinje, pasa i mačaka (BLUM

i sur., 2010.) *S. zooepidemicus* rijetko je izoliran kod ljudi. Većina objavljenih podataka o infekcijama u ljudi seže u drugu polovicu 1980. godine. Infekcije kod ljudi rijetke su i najčešće se prijavljuju nakon kontakta sa zaraženim konjima. Povremena infekcija ljudi prijavljena je kao posljedica konzumacije domaćeg sira ili nepasteriziranog mlijeka krava s mastitisom (MANDEL i sur., 1995.). Kod ljudi *S. zooepidemicu* može uzrokovati glomerulonefritis i reumatsku groznicu, koje su poznate posljedice infekcija sa bakterijom *S. pyogenes* (MURRAY i sur., 2007.). Meningitis i gnojni artritis također su prijavljeni (FRIEDERICHS i sur., 2010.). Dakle, infekcija vrstom *S. zooepidemicus* koja se prenosi s konja može uzrokovati ozbiljne bolesti kod ljudi i treba je smatrati zoonozom.

2.7. Metode tipizacije streptokoka

Tipizacija streptokoknih bakterija je metoda kojom se određuje karakterizacija sojeva unutar jedne bakterijske vrste. Tipizacijom bakterija se mogu odrediti izvor infekcije i putovi prenošenja uzročnika, što ima epidemiološki značaj. Da bi metoda tipizacije bila uspješna, identificirani tipovi bakterija trebali bi biti stabilni, tehnika bi trebala imati dovoljnu snagu prepoznavanja, te da bude jednostavna i da se može ponovno izvesti, a metoda standardizirana velikim brojem ponovljenih testiranja. Klasične metode tipizacije koje se temelje na fenotipskim i biokemijskim osobinama, zatim profilima rezistencije i ostalim, sve se više zamjenjuju metodama molekuloarne biologije, odnosno metodama genotipizacije (MILJKOVIĆ-SELIMOVIĆ i sur., 2009.).

TAPP i sur. (2003.) su sekvencionirali gen rnpB kod 50 vrsta streptokoka, te su napravili filogenetsku analizu i ocijenili mogućnost korištenja rnpB za genotipizaciju. Istraživanje je pokazalo da je gen rnpB prikladniji za filogenetsku analizu obzirom da je usko vezan uz vrstu. THOMPSON i sur. (2015.) ukazuju na mogućnost pouzdane identifikacije streptokoka uporabom *five housekeeping* gena (*aroE*, *ddl*, gki, *pheS* i *recA*).

Tipizacija streptokoka radi se još od 1928. godine, kada je Rebecca Lensfield opisala i uvela tzv. M tipizaciju, koja je bazirana na varijabilnim antigenskim karakteristikama termostabilnog i površnog M proteina. Danas se kao klasične, odnosno konvencionalne metode tipizacije najčešće primjenjuju: tipizacija M proteina, koja je dugogodišnji "zlatni standard", zatim tipizacija T proteina i OF tipizacija.

Zbog visoke cijene antiseruma, ograničene dostupnosti i poteškoća u interpretaciji M tipizacije, ukazala se potreba za uvođenjem novih metoda tipizacije. U novije vrijeme su, pored klasičnih, dostupne i metode molekularne biologije, odnosno genotipizacije. Danas je "zlatni standard" u tipizaciji streptokoka tzv. *emm* tipizacija, koja je zapravo "molekularni ekvivalent" M tipizacije. Pored navedene metode, postoje i mnoge druge koje se baziraju na metodama molekularne biologije, kao što sutipizacija sekvenciranja na više lokusa (engl. *multilocus sequence typing, MLST*), elektroforeza u pulsirajućem gelu (engl. *pulsed-field gel electrophoresis, PFGE*), metoda slučajnog umnažanja polimorfne DNA (engl. *randomly amplified of polymorphic* DNA, RAPD), višelokusna enzimska elektroforeza (engl. *multilocus enzyme electrophoresis, MLEE*), virtipizacija, fagotipizacija i druge (BOREK i sur., 2012.).

2.7.1. M tipizacija

Tipizacija streptokoka na osnovi razlika u građi preosjetljivog segmenta M proteina radi se još od tridesetih godina prošlog stoljeća (LANCEFIELD, 1933.). Do danas su opisana 93 M serotipa (FACKLAM i sur., 2002.). Broj serotipova je značajno manji, s obzirom da je došlo do preklapanja nekih tipova ili se ispostavilo da su nađeni kod drugih grupa beta hemolitičnih streptokoka.

M tipizacija se bazira na reakciji imunoprecipitacije bakterijskog ekstrakta i specifičnih antitijela na određeni tip M proteina. Ova reakcija je inicijalno odrađivana u epruvetama, ali je zbog velikog utroška seruma, kasnije modificirana u tzv. kapilarnu imunoprecipitaciju (SWIFT i sur., 1943.). Antitijela specifična na određeni M tip se dobivaju imunizacijom kunića streptokoknom vakcinom. Navedeni serum se najprije obrađuje u cilju eliminiranja antitijela specifičnih za druge streptokokne antigene i odlaže se u svojevrsne kontejnere. M protein se

može ekstrahirati tretiranjem kulture streptokoka kipućom klorovodičnom kiselinom (CUNNINGHAM, 2000.). Reakcija imunoprecipitacije se odvija u kapilari, tako što se ona prvo uranja u serum, a zatim u ekstrakt ispitivanog izolata i nakon inkubacije se očitava rezultat reakcije. Postupak se ponavlja sa različitim serumima, dok se ne uoči precipitirajuća linija. Kako je način pripreme seruma vrlo kompliciran, ova tehnika se primjenjuje u svega nekoliko referentnih laboratorija u Svijetu. Zbog ograničene dostupnosti, visoke cijene seruma i relativno visokog postotka sojeva koji se ne mogu tipizirati ovom metodom, u novije vrijeme se za tipizaciju streptokoknih bakterija sve više primjenjuju metode molekularne biologije.

Iako je opisano preko 90 različitih M serotipova GAS, nisu svi jednako zastupljeni u populaciji. Postotak zastupljenosti pojedinih M tipova je različita u pojedinim pokrajinama svijeta. Također je utvrđeno da se pojedini M tipovi streptokoka izoliraju češće kod nekih oboljenja (CUNNINGHAM, 2000.).

2.7.2. T tipizacija

Tipizacija T proteina temelji se na reakciji aglutinacije suspenzije bakterija digestirane tripsinom s kunićjim tipski specifičnim antiserumom za T protein.

Tako je i Fred Griffith 1934. godine na istoj osnovi napravio tipizaciju *S. pyogenes*. U testu aglutinacije koristio je ekstrakte streptokoka dobivenih iz uzoraka pacijenata oboljelih od različitih infekcija. Grifitov test je bio jednostavniji od inicijalnog, kojeg je opisala Lencefildova, pa se nekada više koristio. Danas je identificirano oko 30 različitih T tipova, pri čemu jedan soj streptokok grupe A može imati više različitih T tipova. Na osnovu T profila se može predvidjeti M tip.

2.7.3. *Emm* tipizacija

Superfamilija *emm* gena sastoji se od više od 20 gena koji kodiraju M i *M-like* proteine, koji imaju svojstvo vezivanja za imunoglobulin (Ig). Svaki soj GAS ne mora imati čitavi set navedenih gena. Na osnovu broja i organizacije *emm* subfamilije gena, postoji 5 glavnih *emm* kromosomskih profila. *Emm* tipizacija zasniva se na određivanju sekvence ~ 200 baznih parova na 5‘ kraju *emm* gena (centralni gen u superfamiliji *emm* gena). Definicija soja zasniva se na identifikaciji 90 baza koji

kodiraju 30 aminokiselina smještenih na N terminalnom dijelu M proteina (KAUFHOLD i sur., 1994., WHATMORE i sur., 1994., BEALL i sur., 1996.).

Genetska baza podataka NIH (GenBank) koja se može pretraživati i koja sadrži podatke o svim potvrđenim *emm* tipovima i podtipovima, kao i privremenim tipovima i podtipovima je http://www.ncbi.nlm.nih.gov. U bazu podataka neprekidno se dodaju sekvence gena novih *emm* tipova (privremeni tipovi „*ST*“).

RATO i sur. (2010.) istraživali su 304 uzorka mlijeka od 248 krava s 8 farmi u Portugalu. Za potvrdu identifikacije vrste *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae*, gen 16S rRNA pojačan je PCR-om i sekvencioniran *emm* tipizacijom kako je opisano na www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/M-ProteinGene_typing.htm. *Emm* gen kodira protein antifagocita M na površini koji nije amplificiran stoga nisu dobiveni tipovi *emm*- a. Pomoću PCR utvrđeno je da su goveđi *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae* sojevi (55,6%) nosili >1 GAS-specifični gen za bakteriofage i virulenciju.

2.7.4. Multigenska analiza

Genotipizacija patogenih izolata bakterija posebno je važna za istraživanje epidemiologije i genetičke raznolikosti bakterija. MAIDEN i sur. (1998.) su predložili metodu multigenske analize (engl. *multilocus sequence typing*, MLST) na modelu uzročnika meningitisa i drugih meningokoknih bolesti. Od tada je pristup genotipizaciji među laboratorijima izjednačen, olakšala se razmjena i usporedba dobivenih informacija te su se izgradile dostupne baze podataka. U posljednjih dvadeset godina ovaj model je prihvaćen i primjenjuje se za karekterizaciju sojeva patogenih bakterija. U dostupnim bazama podataka mogu se naći informacije za više od 100 bakterija (http://www.mlst.net/databases/; https://pubmlst.org/databases.shtml). Pri osmišljanju i uspostavljanju novog MLST sustava važna su tri elementa: izvor izolata koji će se koristiti u primarnoj analizi, izbor molekularnih markera, odnosno gena za karakterizaciju te dizajn početnica za umnažanje i sekvencioniranje ciljanih gena (URWIN i MAIDEN, 2003.). Za većinu humanih patogena u tipizaciji se koristi najmanje sedam lokusa i to najvećim dijelom konstitutivnih gena. Velika prednost multigenske tipizacije je relativno jednostavna usporedba alelnih profila izolata iz

cijelog svijeta kroz virtualne kolekcije. Moguće je direktno umnažanje ciljanih gena iz uzoraka bez potrebe uzgoja patogena u čistoj kulturi, što je posebno korisno za kliničke uzorke. Osim za istraživanje molekularne epidemiologije i populacijske genetike, ovaj pristup je primjenjiv i u svrhu istraživanja genetske varijabilnosti među sojevima različite virulencije, eventualno utvrđivanje porijekla te praćenja puteva i načina širenja pojedinih sojeva (FABRE i sur., 2011.).

Molekularna tipizacija sojeva, odnosno MLST je metoda genotipizacije, koja se temelji na umnožavanju i sekvenciranju sedam visoko konzerviranih, tzv. *house-keeping* gena, koji se nalaze u svakom bakterijskom kromosomu i kodiraju sintezu enzima od vitalnog značaja za bakterijsku stanicu (CANTU, 2014.). Svaki se izolat definira kao serija od sedam brojeva (alelni profil), koji definira tip sekvence (*engl. sequence type, ST*). Izolati s identičnim alelnim profilom imaju isti ST. Po završenom sekvencioniranju svih sedam gena šalje se zahtjev na stranicu http://www.mlst.net/databases, gdje se dobiva određeni alelni profil. Samim time možemo razmatrati i klonsku vezu između sojeva.

Bakterijski klonovi su sojevi koji imaju zajedničkog pretka i imaju iste alele u svakom *house-keeping* lokusu, odnosno imaju isti ST. MLST baza sadrži podatke preko 1000 različitih sojeva izoliranih od pacijenata sa blagim, pa sve do teških infekcija. Također, sadrži i podatke o sojevima rezistentnim na makrolide. Osnovna prednost MLST metode u odnosu na molekularne metode koje se zasnivaju na razdvajanju fragmenata DNA u gelu, sastoji se u tome što se rezultati MLST, dobiveni u različitim laboratorijima, mogu lako uspoređivati, upotrebljavanjem elektronskih podataka i MLST baze, bez potrebe za usporedbom slika gelova. MLST metoda ima veliki značaj u dugotrajnom evolucijskom praćenju sojeva, jer se promjene unutar sedam visoko konzerviranih gena akumuliraju vrlo sporo. Rezultati MLST, ali i drugih metoda genotipizacija, se mogu prikazati grafički, uporabom dendrograma (dijagram stabla), pri čemu se na vertikalnoj osi prikazuju izolati, a na horozontalnoj genska udaljenost između sojeva.

SCHOLZ i sur. (2012.) istraživali su DNA sekvence 16s rRNA gena i odabrane *housekeeping* gene od 634 soja *Streptococcus mitis* koji obuhvaćaju određene sojeve svih 13 priznatih vrsta. Svi sojevi su identificirani klaster analizom povezanim *housekeeping* genima. BISHOP i sur. (2009.) većinu sojeva identificirali su

postupkom MLST analize djelomično spojenim sekvencama housekeeping gena (*map*, *pfl*, *ppa*C, *pyk*, *rpo*B, *sod*A i *tuf*) i time su pridonjeli načelu redoslijeda i fenotipskog slijeda 16s rRNA.

KÄPPELI i sur. (2019.) proveli su istraživanje na 153 soja *S. uberis* izoliranih iz uzoraka mlijeka pomoću MLST-a koji je pokazao preciznost za 152 (99.3%) soja, te su ukupno potvrđene 103 različite vrste ST-a uključujući 91 novih ST *S. uberis*.

2.7.5. RAPD tipizacija

Metoda slučajnog umnažanja polimorfne DNA (engl. *randomly amplified of polymorphic* DNA, RAPD) se zasniva na upotrebi jednog primera, koji je nespecifičan i komplementaran sa ponavljajućim sekvencama grupe A streptokoka, što omogućava amplifikaciju više različitih produkata PCR metodom. U RAPD tipizaciji se koriste primeri koji imaju visoku moć razdvajanja i koji pokazuju novo umnožavanje segmenata DNA. U reakciji lančanog umnožavanja primer se nasumično veže za komplementarne segmente DNA. Shodno tome, kod različitih sojeva, dolazi do umnožavanja različitog broja fragmenata, različite veličine. Nakon elektroforetskog razdvajanja dobivaju se određeni RAPD profili, koji se međusobno mogu posložiti. RAPD tipizacija je ekonomična. No, slaganje rezultata dobivenih u različitim laboratorijima je problematično, jer je metoda osjetljiva na temperaturne i ostale promjene uvjeta amplifikacije, što između ostalog utječe i na obnavljanje (HUYNH i sur., 2006.).

2.7.6. PFGE tipizacija

PFGE genotipizacija, odnosno elektroforeza u pulsirajućem polju (engl. *pulsed-field gel electrophoresis, PFGE*) je metoda kojom se DNA fragmenti razdvajaju gel-elektroforezom u pulsirajućem, odnosno promjenljivom električnom polju. Nekoliko parova suprotno pozicioniranih elektroda osiguravaju izmjene električnog polja. Ovakva elektroforeza omogućava razdvajanje velikih molekula veličine i do 10 miliona baznih parova (bp). Zbog stalnih promjena smjera električnog polja, DNA

mijenja orijentaciju, okreće se u gelu, pa je na ovaj način moguće razdvojiti čak i pojedinačne kromosome.

Najprije se bakterijski sojevi ukalupljuju u agarozni gel, a potom inkubiraju sa restrikcijskim enzimom u cilju digestije i dobivanja fragmenata različitih dužina (20-800 kb). U odnosu od mjesta i broja restrikcijskih lokusa, u kojima enzim radi isijecanje (restrikcijskih mjesta), dobije se različiti broj fragmenta, različite dužine. Potom se radi elektroforeza u električnom polju sa promjenljivim smjerom struje. Nakon bojenja i vizualizacije proizvoda, pomoću kompjuterskog softvera ili golim okom se identificiraju PFGE profili. Dakle, na osnovi genskih razlika unutar bakterijske vrste, odnosno genskih polimorfizama, PFGE metodom radi se identifikacija genotipova. Genske varijacije koje se registriraju ovom metodom akumuliraju se u relativno kratkom vremenskom razdoblju, te je PFGE vrlo pogodan za kratkoročne epidemijske studije (MARTIN i sur.,1993., GAJIĆ 2014.).

2.7.7. Vakcine

Najnovija istraživanja iz područja vakcinacije, koja se bave zaštitom od infekcija izazvanih streptokokom grupe A, odnose se prije svega na ispitivanje M proteina i njegovih tipova. Brojni istraživači smatraju da bi korištenje konzerviranog segmenta M proteina u kreiranju vakcine bilo korisno, jer je njegova struktura ista kod svih bakterija ove vrste (FISCHETTI, 2000.), pa bi takva vakcina štitila od infekcija izazvanih svim serotipovima GAS. Vakcina koja bi sadržavala konzervirani dio M proteina brzo bi stimulirala masovnu produkciju specifičnih antitijela, koja bi potencijalno mogla dovesti do križne reakcije sa pojedinim tkivima domaćina. Stoga se, zbog sigurnosti vakcine, novija istraživanja sve više baziraju na ispitivanju pojedinih epitopa M proteina, koji su tipski specifični i za koje nije karakterističan fenomen molekularne mimikrije (DALE, 2000.). Da bi se postigla imunost na različite serotipove *S. pyogenes*, neophodno je da vakcina bude napravljena od varijabilnih segmenata M proteina različitih serotipova, odnosno da bude polivalentna. Kako se distribucija serotipova mijenja i sastav vakcine bi trebalo prilagođavati novonastaloj epidemiološkoj situaciji na određenoj teritoriji, u određenom vremenu.

Pored M proteina i drugi streptokokni antigeni su potencijalni kandidati za kreiranje vakcine protiv streptokoka: C5a peptidaza (OLIVE i sur., 2007.), SpeA, SpeC, SpeB (KAPUR i sur., 1994.), SfbI (SCHULZE i sur., 2003.) i drugi. Trenutno na tržištu nema dostupnih vakcina protiv infekcija izazvanih ovim patogenom, iako bi upotreba vakcine protiv GAS dovela ne samo do smanjenja incidencije streptokoknih invazivnih i neinvazivnih bolesti i kliconoštva, već i do smanjenja potrebe za antibioticima i redukcije rezistencije (GAJIĆ, 2014.). Veliki broj radova ukazuje da vakcina koja je pripremljena od inaktivirane bakterije smanjuje pojavu kliničkih i subkliničkih mastitisa. Preliminarni eksperimentalni uspjeh postigla je vakcina protiv Streptococcus uberis bazirana na plazminogen aktivatoru, PauA antigenu i protein G agarozi (antigen), što je znatno različit pristup u izradi vakcina u odnosu na druge, do tada, eksperimentalne ili komercijalne vakcine protiv mastitisa (YANCEY, 1993.). U Hrvatskoj, jedna od najzastupljenijih je inaktivirano cjepivo protiv S. uberis koja sadrži lipoteihoičnu kiselinu (djelatna tvar) i soj *S. uberis* 5616.

Streptokoki su vrlo slabi imunogeni, što dovodi do toga da efikasna vakcina protiv ovih mikroorganizama nije još uvijek pronađena, ali primjena autohtonih vakcina u prevenciji mastitisa može dati zadovoljavajuće rezultate (MAGAŠ, 2012.).

2.8. Razvrstavanje streptokoka u serološke skupine

Razvrstavanje streptokoka u serološke skupine obično se izvodi precipitacijom po Lancefieldovoj. Iscrpak u kojem se nalazi otopljen skupno specifičan polisaharidni antigen priprema se obradom bujonske kulture pretraživanog soja. U epruvetice se unesu antiserumi s protutijelima za polisaharidne antigene pojedinih skupina, a zatim se pretraživani iscrpak nasloji na antiserum. U roku od 30 minuta između seruma i iscrpka pojavljuje se zamućenje (precipitacijski prsten). Ostali antigeni stanične stijenke bjelančevinaste su građe i prema njima se sojevi streptokoka dijele na serovare. Spojevi nekih vrsta streptokoka, kao što je *S. pyogenes,* izlučuju niz važnih egzotoksina. Streptokokni eritrogeni toksini imaju pirogene osobine, pospješuju djelovanje endotoksina, djeluju kardiodepresivno, nespecifični su mitogeni T-limfocita a imaju i imunosupresivno djelovanje (VRHOVAC

i sur., 1997.). Nadalje, identifikacija *Streptococcacae spp*. temelji se na hemolitičkoj reakciji i serološkom grupiranja po Lancefieldu. Međutim, *Lancefield* skupine nisu vrsno specifične (FARROW i sur., 1984., LAWRENCE i sur., 1985.). Hemolitička aktivnost razlikuje se unutar vrste i ovisi o postupcima inkubacije, kao i podrijetlu krvi na supstratu. U kliničkim laboratorijima, današnja identifikacija streptokoka najviše je pouzdana na fenotipske testove. Navedeno daje adekvatnu vrsnu diferencijaciju, no može se krivo identificirati do 13 % analiziranih sojeva. (KIKUCHI i sur., 1995.). Sojevi unutar određene vrste mogu se razlikovati u istom svojstvu (BEIGHTON i sur., 1991.), dok isti soj može pokazivati biokemijsku varijabilnost (HILLMANN i sur., 1989., TARDIF i sur., 1989.). Osim toga, male promjene u dokazivanju fenotipskog testa mogu dati netočne rezultate. Iako niti jedan klasifikacijski sustav nije potpuno točan, razvoj genetske analize poboljšao je identifikaciju streptokoka. DNA hibridizacija (JACOBS i sur., 1996.), rDNA restrikcijska analiza (GILLESPIE i sur., 1997.), amplifikacija 16S - 23S (WHILEY i sur., 1995.) , *ddl* gena (GARNIER i sur., 1997.) , tDNA PCR (BAELE i sur., 2001.) i analiza slijeda (POYART i sur., 1998.) alternativne su metode koje omogućuju razlikovanje između vrsta.

RNA se najbolje očituje u podjeli bakterijskih vrsta. Sastoji se od jedne RNA molekule od približno 400 bp i bjelančevine od oko 120 aa (ALTMAN i sur., 1999.). Bakterijska RNaza P RNA podijeljene su na dvije glavne klase na temelju sekundarne strukture: tip A je najučestalija klasa, dok se tip B nalazi isključivo u malim (G + C; guanin-citozin) gram pozitivnim bakterijama. Sekundarna struktura RNase P RNA označuje mnoge bakterijske rodove i promjenu između *helix-a* (spirale), te daje korisne filogenetske informacije (HAAS i sur., 1998.).

2.9. Genotipizacija streptokoka

Uvođenje tehnologije genetskog inženjeringa 1970-tih godina omogućilo je novi pristup analizi faktora virulencije na razini gena, ali prednosti ove tehnike nisu zaživile sve dok nisu bili dostupni odgovarajući vektori za kloniranje streptokoka. Prvi gen koji je kloniran u streptokokima bio je odrednica otpornosti na eritromicin (BEHNKE i FERRETI, 1980.), a nedugo zatim i geni za streptokinazu (MALKE i FERRETTI,

1984.), streptokokni pirogeni egzotoksin A, M protein (SCOTT i FISCHETTI, 1983.). Dostupnost ovih gena omogućila je dovršetak analize sekvenci, kao i studije prekomjerne ekspresije za daljnja ispitivanja pojedinih proteina.

Identifikacija streptokoka je još uvijek problematična, obuhvaća 99 priznatih vrsta od kojih su mnogi povezani s bolestima kod ljudi i životinja (THOMPSON i sur., 2015.).

Novija istraživanja koristila su cijelu genomsku analizu kako bi utvrdili taksonomske odnose između bakterijske vrste (CROUCHER i sur., 2011.). THOMPSON i sur. (2015.) analizirali su zbirku od 67 kompletnih genoma kako bi odredili genomske markere u streptokoknih vrsta. Nadalje, idealan test za uspostavu genomske taksonomije streptokoka sačinjen je zahvaljujući dostupnosti cjelokupnih sekvenci genoma nekoliko srodnih vrsta (*S. mitis i S. oralis, S. pneumoniae i S. salivarius, S. thermophilus i S. vestibularis*).

Cijeli streptokokni genom čini jedan kromosom, a procjena veličine seže od 1.7 Mb (*S. infantis*) do 2.3 Mb (*S. sanguinis).* Filogenetska rekonstrukcija 16S rRNA i MLSA (multilokusni slijed analiza) ukazuje na sličnu topologiju. Postotak prosječne podudarnosti, odnosno istovjetnosti slijeda aminokiselina (AAI) između streptokoknih vrsta kreće se u rasponu od 68 % do 94 %,, dok u samoj vrsti varira od 95 % do 100 %. Bakterijske vrste smatraju se skupinom sojeva (uključujući i soj tipa) koje karakterizira određeni stupanj fenotipske konzistencije, te pokazuje > 70 % DNA - DNA hibridizacijske vrijednosti i preko 97 % 16S rRNA podudarnosti niza (STACKEBRANDT i sur. 1994., WAYNE i sur. 1987.). Identifikacija streptokoka temelji se na trenutnim taksonomskim standardima primjenom kombinacije 16s rRNA slijeda genske analize, DNA-DNA hibridizacije, te seroloških i fenotipskih podataka.

S obzirom da niti jedan klasifikacijski sustav nije potpuno točan, razvoj i primjena metoda genskih analiza unaprijedio je identifikaciju streptokoka. Tijekom posljednjeg desetljeća brojne molekularne metode, kao što su ribotipizacija, amplificirana ribosomska restrikcijska analiza, metoda lančane reakcije polimeraze, oligonukleotidno ispitivanje te određivanje slijeda baza sekvenciranjem omogućili su bržu i točniju identifikaciju streptokoka (TENG i sur., 2002., SCHLEGEL i sur., 2003., DRANCOURT i sur. 2004., DALEY i sur., 2005., HAANPERA i sur., 2007.).

Identifikacija izoliranih mikroorganizama metodama baziranim na PCR-u primjenjuje se od sredine 80-ih godina 20-og stoljeća (STEFAN i sur., 1988.). U tom razdoblju razvijeno je i uvedeno puno varijacija PCR metoda kojom se umnaža određeni ciljani gen ili varijabilna regija gena *in vitro* (BARTLETT i sur., 2003.). U PCR reakcijsku smjesu dodaju se početnice (umjetno sintetizirani oligonukleotidi smijera 5'-3' i 3'-5'), izolirana DNA (DNA kalup), enzim Taq polimeraza, deoksiribonukleotidi (A,T,C,G), pufer i sterilna voda. Magnezij koji se također dodaje može biti sastavni dio pufera ili se dodaje posebno. PCR reakcijska smjesa priređuje se najčešće u volumenu od 25 ili 50 µL. Sama PCR reakcija sastoji se od tri glavne faze ciklusa: faze denaturacije dvolančane molekule DNA, faze sparivanja početnica i faze produljivanja lanaca (KUCHTA i sur., 2006.). PCR metoda se bazira na djelovanju enzima *Taq* polimeraze, izoliranog iz bakterije *Thermus aquaticus* kojoj su prirodna staništa termalni izvori, te zbog toga ne gubi sposobnost umnožavanja DNA na temperaturama PCR reakcije, od 60-95°C (KUCHTA i sur., 2006.).

Optimizacija pojedinih faza PCR reakcije (temperature, ponavljanja ciklusa), te koncentracije pojedinih reagencija (početnice, DNA, enzim, deoksiribonukleotidi), najčešći su problemi koji se mogu pojaviti tijekom izvođenja eksperimenata. Također, potencijalni problemi mogu biti i kontaminacija početnica ili bilo koje reagencije ili neaktivnost enzima *Taq* polimeraze. Uzroci neuspješnosti eksperimenta ponekad se vrlo teško otkrivaju, a kod nekih izolata nikada. Osnovni cilj PCR reakcije jest umnožiti (amplificirati) ciljani gen ili regiju gena važnu za identifikaciju mikroorganizma. Najčešći cilj amplifikacije kod bakterija je 16S rRNA gen ili jedna od varijabilnih regija (V1-V9) 16S rRNA gena (CARDENAS i sur., 2008.), za čiju se amplifikaciju koriste univerzalne ili rod specifične početnice. U slučajevima kada se radi s većim brojem izolata za određene izolate da bi se dobio valjan rezultat, ponekad je potrebno mijenjati ili uvjete PCR reakcije ili početnice, jer primijenjeni protokol nužno ne mora biti jednako učinkovit za sve izolate. U daljnjim koracima pročišćuje se PCR produkt te se najčešće koristi enzimatska digestija umnoženog PCR produkta s kombinacijom enzima (2, 3 ili 4 enzima) koji su specifični za enzimatsku razgradnju umnoženog PCR produkta. Kombinacijom različitih restrikcijskih enzima dobivaju se različiti profili specifični za točno određenu vrstu (MANCINI i sur., 2012.). Produkti dobiveni PCR reakcijom i enzimatskom digestijom razlikuju se brojem baznih parova i razdvajaju se elektroforezom u agaroznom ili

poliakrilamidnom gelu kako bi se dobili specifični profili (KUCHTA i sur., 2006., COPOLA i sur., 2008.). Identifikaciju dobivenih profila moguće je provesti na dva načina. Prvi je usporedba dobivenih profila s profilima referentnih sojeva bakterija mliječne kiseline, a drugi provediv neovisno o prvom, ali i kao nadopuna prvom, jest sekvenciranje 16S rRNA gena od izolata reprezentativnih profila (COPOLA i sur., 2008., MANCINI i sur., 2012.). Dobivene sekvence se uspoređuju s nekom od raspoloživih baza podataka dostupnih na internetu. Kod nekih vrsta točna identifikacija uspoređivanjem dobivenih profila moguća je upotrebom samo jednog restrikcijskog enzima, ali kod nekih vrsta, genetski vrlo bliskih, potrebno je primijeniti tri ili četiri enzima za uspješnu identifikaciju izolata jer profili genetski vrlo bliskih mikrobnih vrsta, dobiveni primjenom jednog ili dva enzima, u nekim slučajevima mogu biti identični, što onemogućava identifikaciju vrste.

Jedan od mogućih postupaka molekularne identifikacije izolata, neovisan o enzimatskoj digestiji i sekvenciranju 16S rRNA gena, je korištenje vrsta-specifičnih početnica za dokazivanje prisutnosti točno određene vrste. Takva molekularna identifikacija ne koristi se često zbog toga što je u radu potrebno primijeniti mnogo vrsta specifičnih početnica, odnosno onoliko koliko se vrsta očekuje. Međutim, ovaj pristup može biti konačna potvrda za identifikaciju vrsta ili podvrsta koje nije moguće sa 100 %-tnom sigurnošću identificirati drugim metodama, te se može primijeniti za konačnu potvrdu identifikacije (TEMMERMAN i sur., 2004.). Također, ako rezultat sekvenciranja 16S rRNA gena ne daje potpuno jasnu identifikaciju već ostavlja mogućnost da se radi o dvije ili tri genetski bliske vrste, konačnu potvrdu identifikacije moguće je provesti s vrsnim-specifičnim početnicama (TEMMERMAN i sur., 2004.) ili DNA-DNA hibridizacijom (GORIS i sur., 2007.).

Danas uobičajene metode dokazivanja (serološke, molekularne i biološke) razvijene u zadnjih nekoliko desetljeća, osim što su usmjerene na točno određenog uzročnika, često nisu učinkovite u slučaju kad je infekcija prouzročena novim uzročnikom bolesti i/ili kombinacijom uzročnika koji genetički nisu slični. Nova generacija sekvenciranja (engl. Next Generation Sequencing, NGS) omogućuje izravan dokaz i dentifikaciju bakterija bez ili uz vrlo ograničeno znanje o njihovom genomu (VONČINA, 2017., VLAHOVIĆ i sur., 2020.). NGS je širom svijeta u velikom zamahu čime se otvara mogućnost novih dosega i u području veterinarske medicine. Na području veterinarske znanosti NGS olakšava istraživanje bioloških sustava na

razini koja donedavno nije bila moguća. Neupitna prednost tehnologija NGS povezana je s gotovo neograničenim uvidom u genske informacije različitih organizama i preciznijom analizom njigovih genoma (VLAHOVIĆ i sur., 2020.).

2.10. Odnos prema antimikrobnim tvarima

Britanski bakteriolog Alexander Fleming 1928. godine otkrio je penicilin, prvi antibiotik u svijetu. Od tada, otkriveno je mnogo različitih antibiotika koji se naširoko koriste za liječenje raznih bolesti u kliničkoj medicini. Međutim, zbog česte, ponekad i nepotrebne upotrebe antibiotika kako kod ljudi tako i kod životinja, sve je učestalija pojava smanjenog djelovanja antibiotika, te se javlja sve veći broj antibiotika rezistentnih bakterijskih vrsta. Otpornost bakterija na lijekove čini ozbiljnu prijetnju zdravlju i sigurnosti hrane. Stoga se javila potreba za pronalaskom alternativnih odnosno novih antimikrobnih tvari s manje nuspojava i manjom otpornosti na patogene bakterije koji bi zamijenili tradicionalne antibiotike (ZOU i sur., 2016.).

Antibiotici su vrlo djelotvorni lijekovi koji sprječavaju rast bakterija kod ljudi i životinja. Danas se sve više upotrebljavaju u liječenju životinja, iako njihova primjena nije uvijek učinkovita. Učestalim i nepotrebnim upotrebama antibiotika, dolazi do pojave rezistentnosti bakterijskih vrsta na antibiotike i njihovo djelovanje nema učinka. Bakterije se brzo prilagođavaju okolini, te brzo razvijaju mehanizam otpornosti na pripravke koji se koriste u liječenju. Velik broj antibiotika djeluje na isto ciljno mjesto u bakterijskoj stanici pa se uslijed toga bakterije vrlo brzo prilagode (HABRUN i sur., 2015.).

Bakterija može razviti rezistenciju na antibiotike na nekoliko načina. Geni odgovorni za rezistenciju mogu biti smješteni na kromosomu ili na plazmidu, ili pak i na jednoj i na drugoj staničnoj DNA (KALENIĆ, 2000.). Glavne pogreške prilikom liječenja su izbor nedjelotvornog antibiotika, krivo doziranje, davanje pogrešne kombinacije antibiotika, nastavak liječenja nakon pojave rezistentnosti. Pri odabiru antibiotika treba voditi računa o kliničkom djelovanju lijeka, toksičnosti za životinju, rizicima od nastanka mikrobne rezistentnosti, utjecaju na fiziološku mikrofloru (PINTARIĆ i ŠEOL MARTINEC, 2018.). Rezistencija bakterija na antibiotike nastaje:

malim promjenama na jednom paru baza u genomu, takozvanim točkastim mutacijama, te velikim promjenama u genomu, odnosno, preinakama velikih dijelova genoma ili unosom izvanjske DNA (procesima konjugacije, transformacije, transdukcije ili transpozicije) (KALENIĆ, 2000.). Porast rezistencije nekih bakterijskih sojeva, koji izazivaju mastitise, posljedica je njihove otpornosti, te se tako smanjuje stopa bakteriološkog izlječenja antibioticima u laktaciji i suhostaju. Stoga, potrebno je smanjiti učestalost korištenja antibiotika u liječenju krava, a poboljšati preventivne i higijenske mjere na farmi u cilju smanjenja broja mastitisa. Antibiotike treba koristiti ciljano, prema tipu uzročnika, obavezno se pridržavajudi navedenih uputa za uporabu i liječenje uvijek provesti do kraja (BAČIĆ, 2009.). U istraživanju, postotak osjetljivih sojeva *S. agalactiae* prema amoksicilinu s klavulanskom kiselinom i prema cefoperazonu iznosi oko 87%. Bakterije vrste *S. dysgalactiae* su u najvećem broju uzoraka bili osjetljivi na amoksicilin s klavulanskom kiselinom, dok su najveću rezistentnost imali prema streptomicinu (LESKOVEC i sur., 2015.).

Patogeni streptokoki osjetljivi su prema beta-laktamskim antibioticima kao što su penicilini i cefalosporini Često su otporni na tetracikline i flurokinolone, a prirodno su otporni prema gentamicinu, odnosno antibioticima iz skupine aminoglikozida. Stoga, potrebno je izbjegavati lijekove širokog spektra djelovanja, osim u slučajevima akutnog mastitisa kad je potrebno započeti liječenje životinje čim prije.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Očekujemo da će ovo istraživanje dati će detaljniji uvid u zastupljenost pojedinih vrsta streptokoka u etiologiji mastitisa krava. Naime, konvencionalnim biokemijskim metodama identifikacije, često nije moguće odrediti o kojoj se vrsti radi. Pojedine serološke skupine po Lancefieldovoj uključuju više različitih vrsta streptokoka. Nadalje, biokemijski profil različitih vrsta streptokoka može biti vrlo sličan, s neznatnim razlikama koje nisu dovoljne da bi se razlikovale vrste. Osim toga, streptokoki su pored stafilokoka najčešći uzročnici mastitisa krava. U skupini streptokoknih uzročnika mastitisa krava koje nije moguće konvencionalnim metodama dovoljno precizno odrediti vrstu nalaze se vrlo vjerojatno i vrste koje imaju zoonotski karakter.

S obzirom da niti jedan klasifikacijski sustav nije potpuno točan, razvoj i primjena metoda genskih analiza unaprijedio je identifikaciju streptokoka.

Stoga je namjera ovog istraživanja, između ostalog, pružiti uvid u prisutnost streptokoknih vrsta patogenih za čovjeka izdvojenih iz sekreta vimena krava. Slično istraživanje temeljeno na genskim analizama do sada nije provedeno u Republici Hrvatskoj. Stoga će rezultati biti višestruko korisn za praksu, a znanstveno začajni na domaćoj i međunarodnoj razini. S obzirom na navedeno ciljevi disertacije bili su slijedeći:

1. Utvrditi zastupljenost pojedinih vrsta streptokoka u etiologiji mastitisa krava.
2. Utvrditi zastupljenost vrsta streptokoka patogenih za čovjeka u etiologiji mastitisa krava, odnosno javno-zdravstveno značenje infekcija mliječne žlijezde prouzročenih streptokokima.
3. Istražiti podudarnost rezultata klasične mikrobiološke pretrage i identifikacije streptokoka s molekularnim metodama
4. Usporediti genske odječke streptokoka izdvojenih iz mliječne žlijezde krava u Hrvatskoj s odsječcima streptokoka analiziranim drugdje u svijetu.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Materijal

4.1.1. Uzorkovanje sekreta vimena mliječnih krava

Primarno izdvajanje i identifikaciju uzročnika (streptokoka) proveli smo korištenjem podloge eskulin krvni agar. Nakon identifikacije sojeve smo do daljnjih pretraga čuvali na glicerin bujonu na temperaturi -20 °C. Na spomenutoj podlozi sojevi se mogu čuvati do 5 godina. Zamrznute sojeve smo revitalizirali ponovnim nacjepljivanjem na eskulin krvni agar. Tijekom čuvanja slučajnim odabirom provjeravali smo vitalnost sojeva.

4.2. Metode

4.2.1. Uzimanje uzoraka mlijeka

Uzorci sekreta vimena krava za mikrobiološku pretragu uzimani su prije redovite mužnje. Nakon izmuzivanja prvih nekoliko mlazova mlijeka, vrhovi sisa temeljito su dezinficirani vatom namočenom u 70%-tni alkohol. Uzorci (oko 10 mL sekreta vimena) iz svake pojedinačne četvrti uzimani su u prethodno označene sterilne plastične epruvete.

Uzorci su transportirani na ledu i do obrade čuvani na +4 ℃, a obrađeni su u laboratoriju unutar 12 sati od uzimanja.

4.2.2. Obrada uzoraka mlijeka u laboratoriju

4.2.2.1. Mikrobiološka pretraga

Svaki uzorak testirali smo Zagrebačkim mastitis reagensom koji otkriva stupanj poremećenosti sekrecije na osnovi indirektnog dokazivanja broja somatskih stanica u sekretu mliječne žlijezde.

Mikrobiološku pretragu proveli smo u skladu s opće prihvaćenim preporukama opisanima u *Laboratory handbook on bovine mastitis* (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017.).

Iz uzorka svake pojedinačne četvrti nacijepili smo količinu od 0,01 mL na četvrtinu površine Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom eskulin-krvni agar. Pritom smo koristili mikrobiološku ušicu promjera 10 mm za jednokratnu uporabu.

Nacijepljene hranjive podloge inkubirali smo u termostatu pri 37℃ tijekom 24 sata nakon čega smo pristupili kontroli porasta kolonija na površini hranjive podloge. Ostatak uzorka čuvali smo u hladnjaku pri temperaturi od 4℃ do kraja pretrage. Uzorke koji su mastitis testom reagirali pozitivno, a u kojima nije bilo porasta mikrobne kulture nakon 24-satne inkubacije, nacijepili smo još jednom na polovicu površine Petrijeve zdjelice u količini od 0,1 mL, a kontrolu porasta obavljali smo u istim vremenskim razmacima.

Nakon inkubiranja nacijepljene hranjive podloge pristupili smo determinaciji poraslih bakterijskih kolonija. Pri prosudbi kolonija streptokoka u obzir smo uzimali morfološke (oblik, veličinu i strukturu kolonija) i fiziološke osobine (stvaranje pigmenta, sposobnost rasta na podlozi kanamicin eskulin azid agar, sposobnost izazivanja CAMP učinka, bojanje po Grammu, katalaza test, sposobnost razgradnje eskulina).

Katalaza test

Katalaza test koristili smo za razlikovanje streptokoka i stafilokoka. Test smo izvodili na način da smo na predmetno stakalce bakteriološkom ezom prenijeli koloniju ispitivane bakterijske kulture. Na nju smo kapnuli 1 kap 3%-tne otopine vodikovog peroksida. Pozitivna reakcija očituje se pojavom mjehurića i ukazuje da se radi o pripadnicima stafilokoka, dok izostanak mjehurića zraka ukazuje da se radi o streptokokima. Crvena krvna zrnca stvaraju katalazu i izazivaju pozitivnu reakciju pa treba spriječiti mogućnost uzimanja djelića krvne podloge kao ni izvoditi test izravno na podlozi koja sadrži krv.

4.2.2.2. Determinacija streptokoka

Kolonije porasle na krvnom agaru s eskulinom koje su morfološkim osobinama odgovarale streptokokima podvrnuli smo CAMP testu te provjerili sposobnost rasta na kanamicin eskulin azid agaru.

CAMP test

Test služi prvenstveno za razlikovanje S. agalactiae od ostalih beta-hemolitičnih streptokoka. Proveli smo ga tako što smo na površinu agara za ispitivanje CAMP fenomena nacijepili soj bakterije Staphylococcus aureus koji tvori beta-hemolizin cijelim promjerom hranjive ploče. Okomito na liniju nacijepljenog stafilokoka nacijepili smo ispitivani soj streptokoka s razmakom od 1-2 mm i inkubirali 18-24 sata na 37°C. Na istoj hranjivoj ploči može se istovremeno nacijepiti 10 izolata streptokoka (po 5 sa svake strane nacijepljenog stafilokoka).

Rezultate smo interpretirali uzimajući u obzir tvorbu CAMP fenomena koji se očituje potpunom hemolizom oblika polumjeseca u zoni nepotpune hemolize nacijepljenog stafilokoka (Streptococcus agalactiae) te morfološke i fiziološke osobine poraslih kolonija: veličinu, oblik i boju kolonija, razgradnju eskulina). Hidroliza eskulina očituje se promjenom boje podloge oko poraslih kolonija u zelenkastu do smeđe/crnu.

Nacjepljivanje na kanamicin eskulin azid agar

Podloga služi za razlikovanje pripadnika Streptococcus od roda Enterococcus. Test smo proveli nacjepljivanjem kolonija poraslih na eskulin-krvnom agaru po površini hranjive podloge i inkubiranjem u termostatu pri temperaturi od 37 °C do 3 dana.

Pripadnici roda *Streptococcus* ne rastu na ovoj podlozi za razliku od enterokoka. Stoga smo izolate koji su porasli na ovoj podlozi proglasili pripadnicima roda Enterococcus i nismo ih koristili u daljnjim fazama istraživanja.

4.2.2.3. Osnovne morfološke i fiziološke karakteristike streptokoka

Na krvnom agaru s eskulinom, streptokoki i enterokoki stvaraju sitne (1-3 mm u promjeru) glatke, providne (nepotpuno prozirne) kolonije konveksnog oblika. Zona oko kolonije može biti nehemolitična, okružena zelenkastom zonom zbog promijenjene boje eritrocita (α-hemoliza) ili potpuno hemolitična uslijed potpune lize eritrocita (β-hemoliza). Korištenje krvnog agara s eskulinom dopušta razlikovanje eskulin-negativne vrste *S. agalactiae* od streptokoka koji hidroliziraju eskulin.

S. agalactiae na krvnom agaru stvara sitne kolonije promjera 1-2 mm. Kolonije su vlažne, konveksne, providne blago plavkaste boje ako se gledaju prema svjetlu. Većinom su beta-hemolitične iako ima i nehemolitičnih kao i alfa-hemolitičnih. U mikroskopskom preparatu obojenom po Grammu uočavaju se gram-pozitivni koki u nizovima. Katalaza test je negativan, ne hidroliziraju eskulin, a u CAMP testu daju pozitivan rezultat, odnosno vidljiva je polumjesečasta zona potpune hemolize.

S. dysgalactiae na krvnom agaru stvara sitne kolonije promjera 1-2 mm. Kolonije su vlažne, konveksne i providne. Većinom su beta-hemolitične iako ima i nehemolitičnih kao i alfa-hemolitičnih. Po Grammu se pozitivno boje i poredani su u nizovima. Ne razgrađuju eskulin i ne stvaraju CAMP fenomen niti katalazu.

S. uberis na krvnom agaru stvara sine kolonije promjera 1-3 mm. Kolonije su vlažne, konveksne, s gušćim centrom, providne. Većinom su alfa-hemolitične na krvnom agaru mada mogu biti nehemolitične. U mikroskopskim preparatima obojenima po Grammu zapažaju se kao gram-pozitivni koki poredani u nizovima. Većina sojeva *S. uberis* nema sposobnost stvaranja CAMP fenomena, ali ima sposobnost razgradnje eskulina.

4.2.4. Molekularne pretrage vrste *Streptococcus sp*.

4.2.4.1. Izdvajanje DNK

Izdvajanje DNK iz uzoraka za potrebe potvrđivanja vrste provodili smo metodom takozvane "kulturelne" izolacije". Ušicu kulture *Streptococcus sp.* razmutili smo u 50 µl sterilne DNAse/RNAse-slobodne destilirane vode (MiliQ voda, vlastita proizvodnja) u epruveti od 2 ml. Ovu smjesu grijali smo 20 minuta na 95ºC u termobloku uz trajno tresenje. Potom smo epruvete centrifugirali na 14000 g kroz 1 minutu. Za potrebe pretrage koristili smo 2 ili 5 µl nadtaloga.

Za potrebe genotipizacije koristili smo izdvajanje pomoću kitova na automatiziranom uređaju za izdvajanje DNK veće kvalitete. Izdvajanje DNK iz uzoraka provodili smo komercijalno dostupnim kitom QIAcube DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača. Za potrebe pretrage koristili smo 2 ili 5 µL nadtaloga. Ušicu bakterijske kulture razmutili smo u 180 µL ATL pufera, dodali 20 µL proteinaze K i inkubirali na 56ºC do potpune lize. Tako pripremljene uzorke nadalje je obrađivao uređaj QIAcube (QIAGEN, Hilden, Njemačka), koji nastavlja izolaciju DNK. Daljni koraci koje prethodno spomenuti uređaj provodi su kako slijedi. Dobivenoj otopini dodaje 200 µL AL pufera i inkubira na 70ºC 10 minuta. Tada dodaje 200 µL etanola (96-100%) i kratko centrifugira. Sadržaj epruvete prenosi u epruvetu za filtriranje te centrifugira pri 6000g 1 minutu. Slijedi dodavanje 500 µL AW1 pufera i centrifugiranje pri 6000g 1 minutu. Postupak ponavlja i s AW2 puferom uz centrifugiranje pri punoj brzini 3 minute. Epruvetu za filtriranje prenosi u čistu epruvetu od 1,5 mL, dodaje 200 mL AE pufera, inkubira 1 minutu pri sobnoj temperaturi te centrifugira pri brzini od 6000g 1 minutu. Zadnji korak s AE puferom izvodi 2 puta zbog dobivanja veće količine izdvojene DNA.

4.2.4.2. Molekularna identifikacija vrste *Streptococcus sp.* na osnovu 16S rDNA

U istraživanju smo koristili metodu opisanu u EDWARDS i sur. (1989.). Zasniva se na sekvenciranja gena koji kodira za 16S rRNA te usporedbi dobivenih slijedova sa slijedovima u dostupnim bazama podataka.

Tablica 2. Početnice korištene za određivanje vrste *Streptococcus sp.*

Početnice	Redoslijed sekvenci
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
pH	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA

Reakcijsku mješavinu za svaki uzorak sastavljali smo od 10 µL otopine Multiplex Master Mix (QIAGEN, Hilden, Njemačka) čiji su osnovni sastojci u koncentracijama propisanim od proizvođača. U ovu otopinu dodali smo po 4 µL DNAase/RNAase-slobodne vode (QIAGEN, Hilden, Njemačka), 4 µL mješavine početnica (1 µM svaka) te 2 µL istraživanog izolata DNA. Ukupna količina reakcijske mješavine tako je iznosila 20 µL. Umnožavanje smo vršili pomoću Proflex uređaja (Applied Biosistems, SAD) prema programu: 95ºC/15 minuta, 30 ciklusa (94ºC/30 sekundi, 59ºC/60 sekundi, 72ºC/60 sekundi), završno produživanje na 72ºC/10 minuta te završetak reakcije na 4ºC. Proizvode umnožavanja analizirali smo kapilarnom elektroforezom na uređaju QIAxcel (QIAGEN, Hilden, Njemačka) uz biljeg veličine 100-2500 bp.

Dobivene proizvode umnožavanja sekvencirali smo metodom po Sangeru u Macrogen Europa, Nizozemska. Slijedove dobivene sekvenciranjem usporedili smo sa slijedovima dostupnim u internacionalno dostupnim bazama podataka NCBI (National Center for Biotechnology Information) i RDP (Ribosomal Database Project) kroz BioNumerics 7.6.3 software.

4.3. Tipizacija sekvencioniranjem na više lokusa

Tipizacija sekvenciranjem na više lokusa (engl. *Multi-locus sequence typing*, MLST) vrlo je diskriminatorna metoda karakterizacije na osnovu slijeda približno 450 bp velikih unutarnjih fragmenata nekoliko tzv. *housekeeping* gena. Različiti slijed nukleotida predstavlja drugi alel. Kombinacija alela na 7 lokusa (imena lokusa razlikuju se od vrste do vrste) čini alelni profil ili sekvencijski tip (engl. *sequence type* ST). Korištene su početnice prikazane u tablicama, ovisno o vrsti *Streptococcus sp*. Odabir lokusa, popis početnica te uvjete umnožavanja i sekvenciranja preuzeli smo sa internetske stranice http://pubmlst.org/ za svaku pojedinu vrstu.

Tablica 3. Početnice korištene za MLST[1] *Streptococcus agalactiae*

Lokus	Uzvodno (5' - 3')	Nizvodno (5' - 3')	Duljina produkta (bp)
***adhP* umnažanje**	GTTGGTCATGGTGAAGCACT	ACTGTACCTCCAGCACGAAC	672
sekvencioniranje	GGTGTGTGCCATACTGATTT	ACAGCAGTCACAACCACTCC	498
***pheS* umnažanje**	GATTAAGGAGTAGTGGCACG	TTGAGATCGCCCATTGAAAT	723
sekvencioniranje	ATATCAACTCAAGAAAAGCT	TGATGGAATTGATGGCTATG	501
***atr* umnažanje**	CGATTCTCTCAGCTTTGTTA	AAGAAATCTCTTGTGCGGAT	627
sekvencioniranje	ATGGTTGAGCCAATTATTTC	CCTTGCTCAACAATAATGCC	501
***glnA* umnažanje**	CCGGCTACAGATGAACAATT	CTGATAATTGCCATTCCACG	589
sekvencioniranje	AATAAAGCAATGTTTGATGG	GCATTGTTCCCTTCATTATC	498
***sdhA* umnažanje**	AGAGCAAGCTAATAGCCAAC	ATATCAGCAGCAACAAGTGC	646
sekvencioniranje	AACATAGCAGAGCTCATGAT	GGGACTTCAACTAAACCTGC	519
***glcK* umnažanje**	CTCGGAGGAACGACCATTAA	CTTGTAACAGTATCACCGTT	607
sekvencioniranje	GGTATCTTGACGCTTGAGGG	ATCGCTGCTTTAATGGCAGA	459
***tkt* umnažanje**	CCAGGCTTTGATTTAGTTGA	AATAGCTTGTTGGCTTGAAA	859
sekvencioniranje	ACACTTCATGGTGATGGTTG	TGACCTAGGTCATGAGCTTT	480

[1]MSLT – Multilocus sequence typing

Tablica 4. Početnice korištene za MLST[1] *Streptococcus uberis*

Gen	T_a	Veličina PCR proizvoda (bp)	Slijed početnice (5' - 3')	MLST duljina produkta (bp)
gki	55	564	5'-GACCGGACCCAAAACACAGTCACAGGTGCTTTT 5'-AAGAGAATCTGGATTTAGGATATTTGAAATATT	455
recP	60	531	5'-AATTCAGGTCACCCTGGCTTACCAATGGGTGCAGCC 5'-TGTGAAAGCCATTGATGTTGGACCATCAAGTGAAAT	372
ddl	60	503	5'-GTCTATATTGAAGGTAATGACTTGGAAGACTGT 5'-TACATGGACCACTGAGTGAATCCAGGCATAGTATTC	357
tdk	55	793	5'-TATTTTCATTTCATAATAAGTTAGTGGATTTAGTAA 5'-TTGATCATATATATTCATGTTATGAATCGTTCTCCT	500
arcC	55	518	5'-GTTTGTGACGCAAAATCTTTATCGATAACA 5'-ACTCATGGTAACGGACCACAAGTTGGTAAC	419
tpi	60	471	5'-GTTATTGGTCATTCAGAACGTCGTGATTACTTC 5'-GTCAAGTAATGCTAAGAAGCTATCTGCTTCAAGTGA	373
yqiL	55	574	5'-TTTCTTCTTTGAAACGATTATTTTTAAGTGCTTCAG 5'-CAAGCTCTAAGAACACCAATTGGTGCATTCGGAGGA	439

[1]MSLT – Multilocus sequence typing

Tablica 5. Popis početnica korištenih za MLST[1] *Streptococcus canis*

Početnica	Slijed početnice (5' - 3')	MSLT duljina produkta (bp)
gki-fwd	GCAGATTTTATTGGTATCGGTATGG	498
gki-rev	GTGAACGTAAGAATTCTCCTGCTG	
gtr-fwd	GGAATTGATTTAAACATTATGTCAGGAG	450
gtr-rev	CACAATAACGCCGCCATCCATA	
murI-fwd	TTATGGTCCAAGACCTGCTGAGC	438
murI-rev	TTTCAGGACTTGCCGTTGTGTAAAA	
mutS-fwd	AGGTCAGATGTTAGAGGCTAGG	405
mutS-rev	CCTAGTTCATCAAATAGAATAAGGGAA	
recP-fwd	TGTCCGCACCCTATCAATGGAT	459
recP-rev	CATCTTTCACAAGGATATGTTGCC	
Xptgc-fwd	TTACTTGAAGAACGCATCTTA	450
Xptgc-rev	ATGAGGTCACTTCAATGCCC	
yqiZ-fwd	CAGATGCTTTTAACAATTACCACATGG	434
ygiZ-rev	CCCATTCACATTCACGATTTCTGG	

[1]MSLT – Multilocus sequence typing

Tablica 6. Popis početnica korištenih za MLST[1] *Streptococcus dysgalactiae*

Lokus	Početnica	Slijed početnice (5' - 3')	Duljina produkta (bp)
gki	Gkigc-up	GGAATTGGTATGGGATCACCAGGAGC	498
	Gkigc-dn	AATTCTCCTGCTGCTGACAC	
gtr	Gtrgc-up	GCACAAGTATTATGGGCACA	450
	Gtrgc-dn	CACGGTCTGCGACTTC	
murI	Murlgc-up	GACCTGCTGAGCAAATTAGAGAATACACATGGG	438
	Murlgc-dn	CAGGACTTGCCGTTGTGTAAAAATGGTG	
mutS	MutS-up	GAAGAGTCATCTAGTTTAGAATACGAT	405
	MutS-dn	AGAGAGTTGTCACTTGCGCGTTTGATTGCT	
recP	RecPgc-up	GCAAATTCTGGACACCCAGG	459
	RecPgc-dn	CTTTCACAAGGATATGTTGCC	
xpt	Xptgc-up	TTACTTGAAGAACGCATCTTA	450
	Xptgc-dn	ATGAGGTCACTTCAATGCCC	
atoB	AtoBgc-up	ACGTTGCTCAGAAATATGGCAT	434
	AtoBgc-dn	AAAGTGTTGCTAGTCCTCTGGTTAC	

[1]MSLT – Multilocus sequence typing

Lančanom reakcijom polimerazom umnožili smo svih sedam lokusa po uzorku. Reakcijsku mješavinu za svaki uzorak sastavljali smo od 10 µL otopine HotStar Taq Master Mix (QIAGEN, Hilden, Njemačka) čiji su osnovni sastojci u koncentracijama propisanim od proizvođača. U ovu otopinu dodali smo po 7 µL DNAase/RNAase-slobodne vode (QIAGEN, Hilden, Njemačka), 0,5 µL svake početnice (10 µM svaka) te 2 µL istraživanog izolata DNA. Ukupna količina reakcijske mješavine tako je iznosila 20 µL. Umnožavanje smo vršili pomoću Proflex uređaja (Applied Biosistems, SAD) prema programu: 95ºC/15 minuta, 30 ciklusa (95ºC/60 sekundi, 55ºC/60 sekundi, 72ºC/60 sekundi), završno produživanje na 72ºC/10 minuta te završetak reakcije na 4ºC. Proizvode umnožavanja provjerili smo kapilarnom elektroforezom na uređaju QIAxcel (QIAGEN, Hilden, Njemačka) uz biljeg veličine 100-2500 bp. Dobivene proizvode umnožavanja slali smo na sekvenciranje prema metodi po Sangeru u Macrogen Europe B. V., Amsterdam, Nizozemska.

Dobivene sljedove nukleotida poravnali smo, provjerili i usporedili korištenjem BioNumerics programa (verzija 7.6; Applied Maths, Kortrijk, Belgija). Aleli i ST-ovi određuju se korištenjem *Streptococcus* MLST baze podataka http://pubmlst.org/ koja se može učitati i koristiti putem BioNumerics programa. Svaka vrsta *Streptococcus* sp. posjeduje odvojenu bazu podataka. Kombinacija alela na svakom lokusu sačinjava sedmeročlani brojčani kod koje smo međusobno uspoređivali na osnovu kategoričkog koeficijenta i na osnovu kategoričkog koeficijenta i prosječne udaljenosti dva klastera (eng. *unweighted pair group method with arithmetic mean*, UPGMA).

5. REZULTATI

5.1. Molekularna identifikacija izolata streptokoka

U istraživanju su molekularnim tehnikama pretražena 54 soja bakterija izdvojena iz uzoraka mlijeka pojedinačnih četvrti vimena krava sa subkliničkim mastitisom. Klasičnom mikrobiološkom pretragom izdvojeni sojevi identificirani su do vrste (*S. agalactiae, S. dysgalactiae i S. uberis*) ili do roda (*Streptococcus* spp.) bez konačne identifikacije vrste.

Metoda identifikacije se zasniva na umnožavanju gena za 16S ribosomsku RNA. U Tablici 7. su prikazani rezultati pretraživanja temeljeni na umnožavanju i sekvenciranju gena za 16S ribosomsku RNA.

Tablica 7. Rezultati sekvenciranja odsječka 16S RNA gena

Uzorak	Ur broj	Vrsta	Bakteriološki nalaz
3	67546/14	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*
4	1045/15	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus spp.*
7	2946/15	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*
8	67572/14	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus dysgalactiae*
9	2946/15	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*
10	4828/15	*Enterococcus faecalis*	*Streptococcus uberis*
11	6515/15	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*
12	6897/15	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus spp.*
13	7684/15	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*
14	7684/15	*Streptococcus agalactiae*	*Streptococcus dysgalactiae*
15	7684/15	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*
16	7684/15	*Streptococcus agalactiae*	*Streptococcus dysgalactiae*
17	18799/15	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*
18	23660/15	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus spp.*
19	29197/15	*Streptococcus dysgalactiae*	*Streptococcus dysgalactiae*

20	12143/15	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*
21	13548/15	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*
22	51033/15	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus spp.*
23	35676/15	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*
24	41025/15	*Enterococcus faecalis*	*Streptococcus spp.*
25	46621/15	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus spp.*
26	48872/15	*Enterococcus faecalis*	*Streptococcus spp.*
27	57712/12	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*
28	60539/15	*Streptococcus dysgalactiae*	*Streptococcus uberis*
29	2621/16	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*
30	26483/16	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus spp.*
31	32754/16	*Lactococcus lactis*	*Streptococcus spp.*
32	13880/16	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus spp.*
33	4211/16	*Streptococcus dysgalactiae*	*Streptococcus spp.*
34	3572/16	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*
35	13880/16	*Streptococcus dysgalactiae*	*Streptococcus uberis*
36	13907/16	*Streptococcus dysgalactiae*	*Streptococcus uberis*
37	33117/16	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus spp.*
38	36265/16	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus spp.*
39	36273/16	*Streptococcus dysgalactiae / canis*	*Streptococcus dysgalactiae*
41	36960/16	*Lactococcus lactis*	*Streptococcus spp.*
42	37251/16	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus spp.*
43	37279/16	*Streptococcus dysgalactiae*	*Streptococcus dysgalactiae*
44	37405/16	*Streptococcus agalactiae*	*Streptococcus dysgalactiae*
45	37405/16	*Lactococcus lactis*	*Streptococcus uberis*
46	1245/09	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*
47	1693/11	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*

48	21013/18	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*
49	6423/18	*Streptococcus dysgalactiae*	*Streptococcus dysgalactiae*
50	14600/18	*Streptococcus agalactiae*	*Streptococcus dysgalactiae*
51	24778/18	*Lactococcus lactis*	*Streptococcus uberis*
52	25349/18	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*
53	27541/18	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus spp.*
54	32365/18	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus spp.*
55	35407/18	*Streptococcus dysgalactiae / canis*	*Streptococcus dysgalactiae*
56	13038/16	*Streptococcus agalactiae*	*Streptococcus agalactiae*
57	PT1	*Streptococcus agalactiae*	*Streptococcus agalactiae*
58	PT2	*Streptococcus dysgalactiae*	*Streptococcus dysgalactiae*
59	PT3	*Streptococcus uberis*	*Streptococcus uberis*

Od 54 pretražena bakterijska soja, za njih 47 je potvrđeno da pripadaju rodu *Streptococcus* i to 6 *Streptococcus agalactiae*, 10 *Streptococcus dysgalactiae*, 2 *Streptococcus canis* i 31 *Streptococcus uberis.* dok su 3 soja pripadnici vrste *Enterococcus faecalis* a 4 soja pripadali su vrsti *Lactococcus lactis*.

Tablica 8. Podudarnost rezultata mikrobiološke i molekularne pretrage u identifikaciji bakterijskih sojeva uzročnika mastitisa u krava

Uzročnik	Mikrobiološki	Molekularno
Streptococcus agalactiae	2	6
Streptococcus dysgalactiae	11	10
Streptococcus uberis	24	31
Streptococcus spp.	17	-
Enterococcus faecalis	-	3
Lactococcus lactis	-	4
Ukupno	54	54

5.2. Rezultati MLST tipizacije

Svih četrdeset i sedam sojeva *Streptococcus sp.* smo uspjeli tipizirati MLST tehnikom. Tipizacija slijedova na više lokusa (engl. *multilocus sequence typing*, MLST) vrlo je diskriminatorna tehnika jer se zasniva na tipiziranju sljedova veličine približno 500-bp unutar fragmenata 7 tzv. "*house-keeping*" gena. Svaki različiti slijed na različitom genu predstavlja drugi alel. Kombinacija alela na sedam lokusa čini alelni profil (engl. *SequenceType*, ST). S obzirom da je moguć velik broj alela na svakom lokusu uzorci nemaju slučajno isti profil. U istraživanju smo proučavali četiri različite vrste *Streptococcus sp.* te je za svaku pojedinu vrstu korišten drugačiji skup lokusa.

U obradi rezultata koristili smo i eBURST *online* alat odnosno algoritam. Program baziran na algoritmu eBURST daje grafički prikaz međusobne povezanosti, odnosno umreženosti (eng. *minimum spaning tree network*, MST), genotipova ili alelnih profila. To je algoritam koji se najčešće koristi u obradi rezultata MLST-a. Za usporedbu rezultata najtočnije je uspoređivati rezultate obrađene istim algoritmom.

5.2.1. *Streptococcus agalactiae*

Tablica 9. Identifikacija alelnih profila vrste *Streptococcus agalactiae* s pomoću MLST[1] metode

UZORAK	MLST ST	*adhP*	*pheS*	*atr*	*glnA*	*sdhA*	*glcK*	*tkt*	eBURST[2]
CVI_14	314	16	1	2	2	9	2	2	single
CVI_56	67	13	1	1	13	1	1	5	single
CVI_16	314	16	1	2	2	9	2	2	single
CVI_50	103	16	1	6	2	9	9	2	single
CVI_57	23	5	4	6	3	2	1	3	single
CVI_49	314	16	1	2	2	9	2	2	single

[1]MSLT – Multilocus sequence typing

[2]eBURST – eBURST algoritam

U tipiziranim uzorcima definirali smo 4 različita alelna profila. Najzastupljeniji ST je ST314. Ostali ST su u uzorcima zastupljeni s jednim uzorkom za pojedini alelni profil (Tablica 9.).

Tablica 10. Prikaz alela prema pojedinom istraživanom genskom lokusu u vrste *Streptococcus agalactiae*

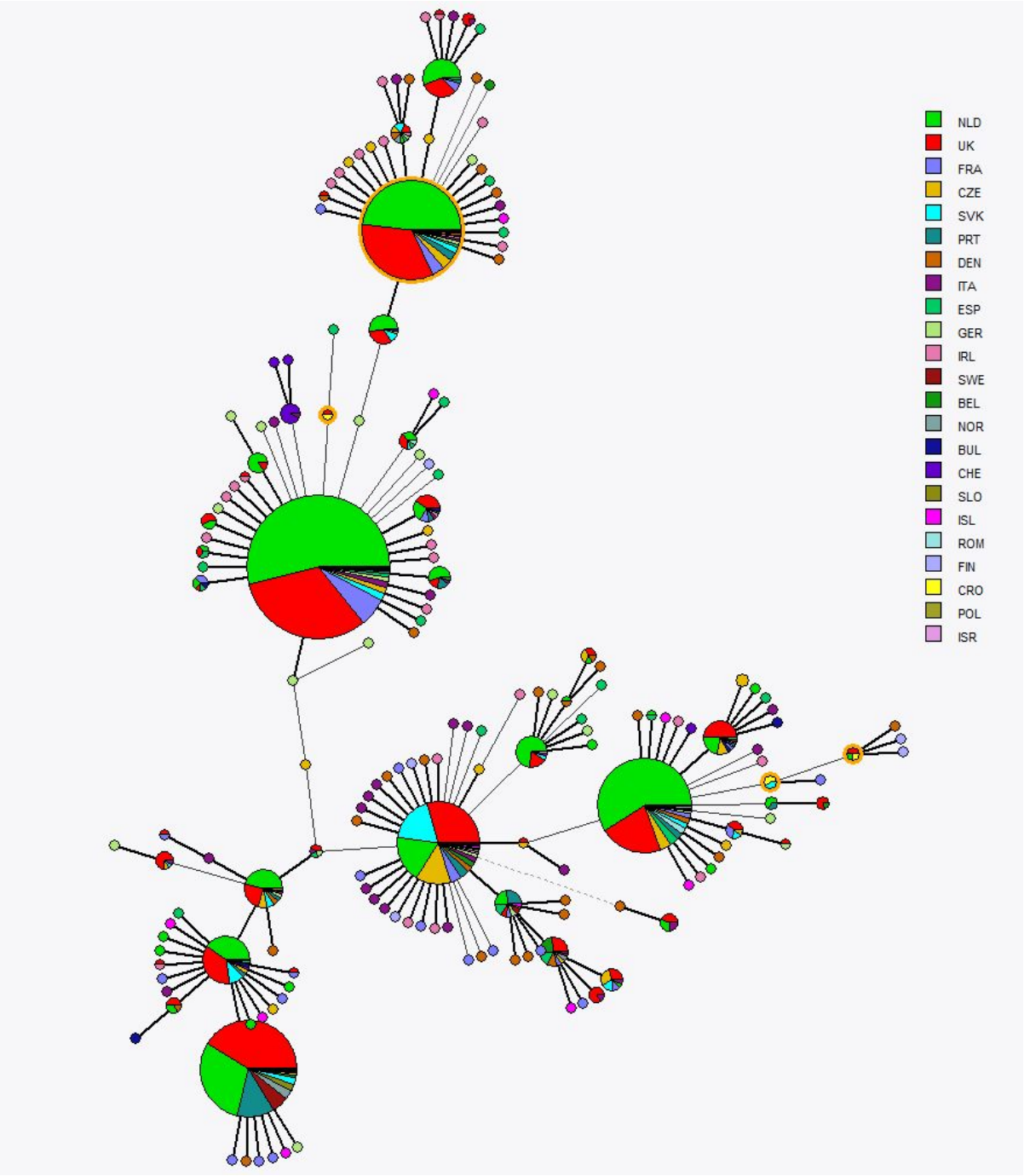
GEN	DULJINA SLIJEDA (bp)	BROJ ALELA	ALELI	HGDI[1]
adhP	~500	3	5, 13, 16	0,60
pheS	~500	2	1, 4	0,33
atr	~500	3	1, 2, 6	0,73
glnA	~500	3	2, 3, 13	0,60
sdhA	~500	3	1, 2, 6	0,60
glcK	~500	3	1, 2, 9	0,73
tkt	~500	3	2, 3, 5	0,60

[1]HGDI – Hunter-Gaston indeks raznolikosti (eng. *Hunter-Gaston discriminatory index*)

Alelni profili su istraživani na 7 lokusa: *adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK* i *tkt* (Tablica 10.). Najpolimorfniji lokusi su *atr i glcK* s Hunter-Gaston indeksom raznolikosti (eng. *Hunter-Gaston discriminatory indeks*, HGDI) od 0,73. Slijede ga *adhP, glnA, sdhA i tkt* s HGDI indeksom od 0,60. Najmanje polimorfan je *pheS* s HGDI indeksom od 0,33.

Korištenjem eBURST algoritma definirali smo da niti jedan alelni profil ne tvori grupu odnosno da su "pojedinačni" (engl. singletons, single).

Slika 1. prikazuje odnos sojeva *Streptococcus agalactiae* iz našeg istraživanja,a podrijetlom iz Hrvatske sa sojevima prisutnim u bazi podataka PubMLST, a podrijetlom iz različitih europskih zemalja. Iz MST prikaza nije vidljiva nikakva lokalna distribucija alelnih profila, s napomenom da je 6 uzoraka relativno mali uzorak za donošenje pouzdanih zaključaka.



Slika 1. *"Minimum spanning tree"* prikaz (engl. MST) odnosa alelnih tipova sojeva *Streptococcus agalactiae* iz našeg istraživanja sa sojevima iz različitih dijelova Europe. Sama priroda crta koje povezuju pojedine alelne tipove označavaju međusobnu povezanost odnosno udaljenost pojedinih alelnih tipova. Naime, razlika na jednom genskom lokusu odgovara udaljenosti od 1 (engl. *single locus variants*, SLV) (najdeblja puna crta); razlika na dva lokusa (engl. *double locus variants*, DLV) (tanja puna crta); razlika na tri lokusa (engl. *triple locus variants*, TLV) (još tanja puna crta); itd. Sojevi iz našeg istraživanja označeni su i narančastim krugovima.

5.2.2. *Streptococcus dysgalactiae*

Tablica 11. Identifikacija alelnih profila vrste *Streptococcus dysgalactiae* s pomoću MLST[1] metode

UZORAK	MLST ST	*gki*	*gtr*	*murI*	*mutS*	*recP*	*xpt*	*atoB*	eBURST[2]
CVI_19	305	41	43	35	36	50	64	39	G1
CVI_28	305	41	43	35	36	50	64	39	G1
CVI_33	453	41	43	35	34	50	64	39	G1
CVI_35	451	40	45	47	54	50	64	39	single
CVI_36	311	43	44	35	34	50	64	39	single
CVI_43	306	41	43	35	37	49	67	8	single
CVI_49	299	40	43	35	34	48	66	40	single
CVI_58	460	43	43	35	38	50	69	39	single

[1]MSLT – Multilocus sequence typing

[2]eBURST – eBURST algoritam

U tipiziranim uzorcima definirali smo 7 različitih alelnih profila. Najzastupljeniji ST je ST305 zastupljen s dva primjerka. Ostali ST su u uzorcima zastupljeni s jednim uzorkom za pojedini alelni profil (Tablica 11.).

Tablica 12. Prikaz alela prema pojedinom istraživanom genskom lokusu u vrste *Streptococcus dysgalactiae*

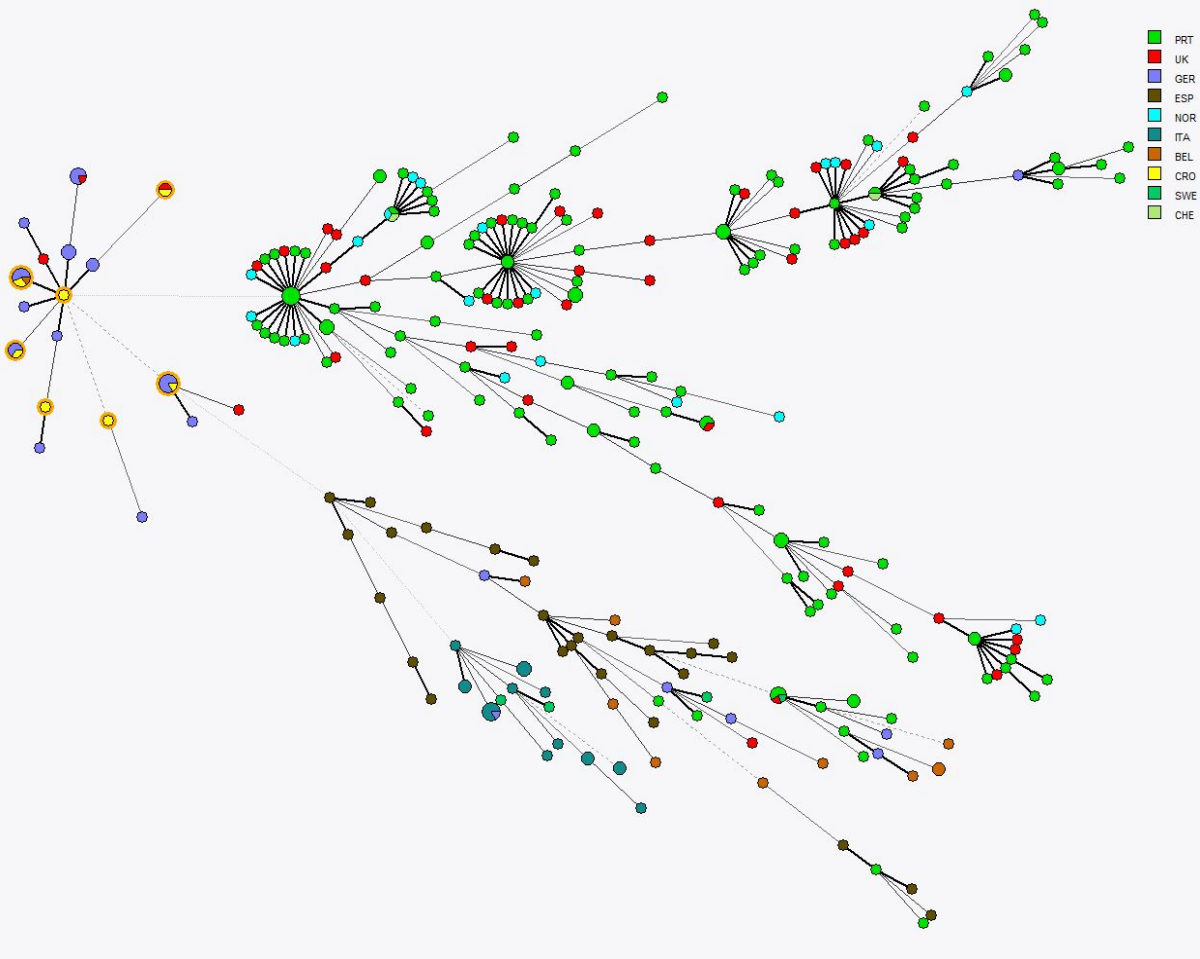
GEN	DULJINA SLIJEDA (bp)	BROJ ALELA	ALELI	HGDI[1]
gki	~500	3	40, 41, 43	0,71
gtr	~500	3	43, 44, 45	0,46
murI	~500	2	35, 47	0,25
mutS	~500	5	34, 36, 37, 38, 54	0,86
recP	~500	3	48, 49, 50	0,46
xpt	~500	4	64, 66, 67, 69	0,64
atoB	~500	3	8, 39, 40	0,46

[1]HGDI – Hunter-Gaston indeks raznolikosti (eng. *Hunter-Gaston discriminatory index*)

Alelni profili su istraživani na 7 lokusa: *gki*, *gtr*, *murI*, *mutS*, *recP*, *xpt* i *atoB* (Tablica 12.). Najpolimorfniji lokus je *mutS* s HGDI indeksom 0,86. Slijede ga *gki i xpt* s HGDI indeksom od 0,71 odnosno 0,64 te *gtr*, *recP* i *atoB* s indeksom 0,46. Najmanje polimorfan je *murI* s HGDI indeksom od 0,25.

Korištenjem eBURST algoritma definirali smo samo jedan klaster u koji pripadaju ST305 i ST453. Ostali alelni profili ne tvori grupu odnosno da "pojedinačni" su (engl. *singletons, single*).

Slika 2. prikazuje odnos sojeva *Streptococcus dysgalactiae* iz našeg istraživanja,a podrijetlom iz Hrvatske sa sojevima prisutnim u bazi podataka PubMLST, a podrijetlom iz različitih europskih zemalja. Iz MST prikaza jasno je vidljiva regionalna grupiranost uzoraka iz našeg istraživanja. Ipak, treba imati na umu da govorimo o maloj skupini od 8 uzoraka.



Slika 2. *"Minimum spanning tree"* prikaz (engl. MST) odnosa alelnih tipova sojeva *Streptococcus dysgalactiae* iz našeg istraživanja sa sojevima iz različitih dijelova Europe. Sama priroda crta koje povezuju pojedine alelne tipove označavaju međusobnu povezanost odnosno udaljenost pojedinih alelnih tipova. Naime, razlika na jednom genskom lokusu odgovara udaljenosti od 1 (engl. single locus variants, SLV)(najdeblja puna crta); razlika na dva lokusa (engl. double locus variants, DLV)(tanja puna crta); razlika na tri lokusa (engl. triple locus variants, TLV)(još tanja puna crta); itd. Sojevi iz našeg istraživanja označeni su i narančastim krugovima.

5.2.3. *Streptococcus canis*

Tablica 13. Identifikacija alelnih profila vrste *Streptococcus canis* s pomoću MLST[1] metode

UZORAK	MLST ST	*gki*	*gtr*	*murI*	*mutS*	*recP*	*xpt*	*yqiZ*	eBURST[2]
CVI_39	9	3	5	3	3	1	2	3	single
CVI_55	9	3	5	3	3	1	2	3	single

[1]MSLT – Multilocus sequence typing

[2]eBURST – eBURST algoritam

U tipiziranim uzorcima definirali smo jedan alelni profil. Za dva izdvojena soja određen je identični alelni profil ST9 (Tablica 13.).

Tablica 14. Prikaz alela prema pojedinom istraživanom genskom lokusu u vrste *Streptococcus canis*

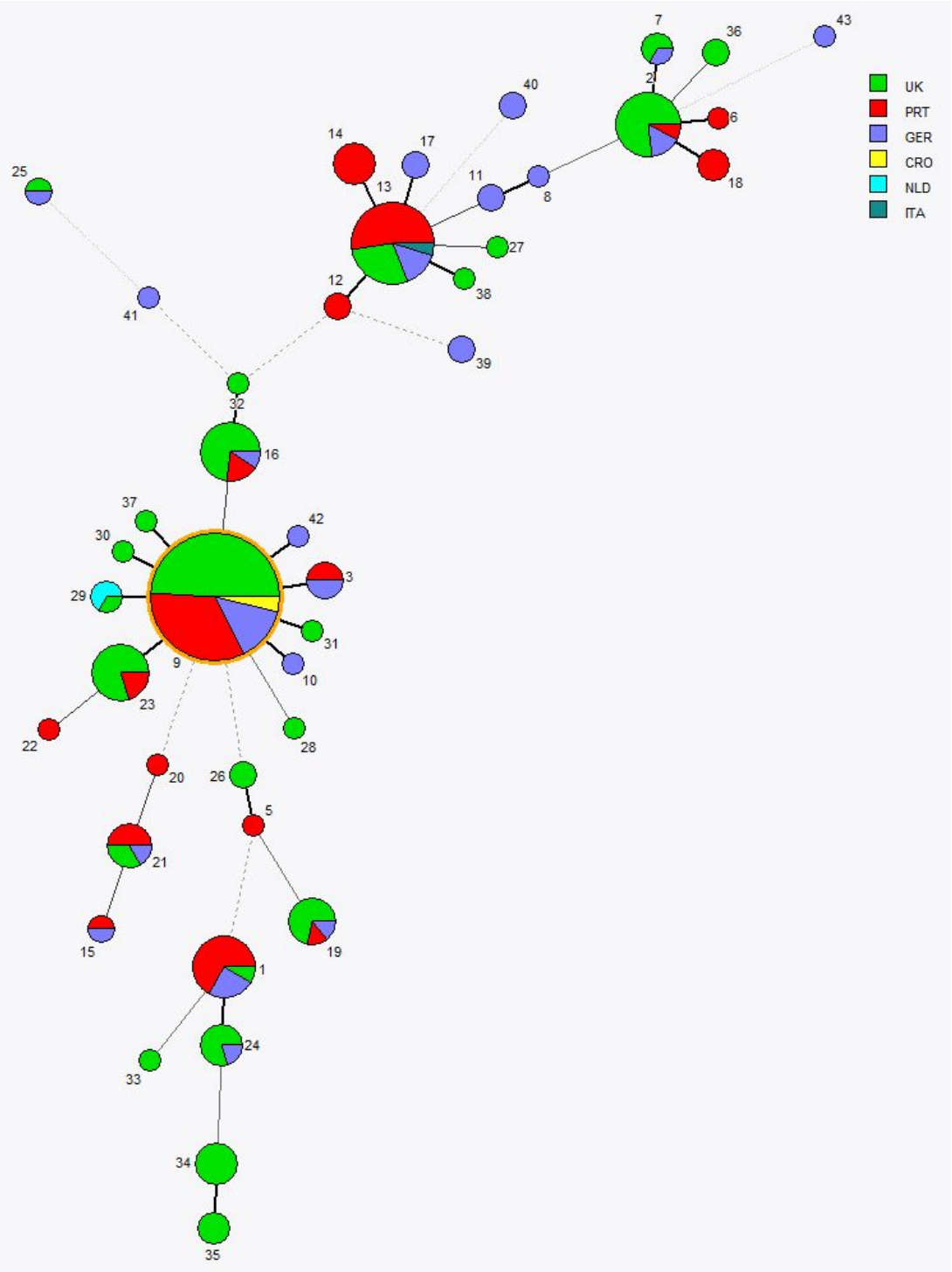
GEN	DULJINA SLIJEDA (bp)	BROJ ALELA	ALELI	HGDI[1]
gki	~500	1	3	0,00
gtr	~500	1	5	0,00
murI	~500	1	3	0,00
mutS	~500	1	3	0,00
recP	~500	1	1	0,00
xpt	~500	1	2	0,00
yqiZ	~500	1	3	0,00

[1]HGDI – Hunter-Gaston indeks raznolikosti (eng. *Hunter-Gaston discriminatory index*)

Alelni profili su istraživani na 7 lokusa: *gki*, *gtr*, *murI*, *mutS*, *recP*, *xpt* i *yqiZ* (Tablica 14.). HGDI na svim lokusima jednak je 0 jer nema polimorfizna s obzirom da je na dva soja idemtificiran isti ST.

Korištenjem eBURST algoritma ne postoji grupiranje u grupe.

Slika 3. prikazuje odnos sojeva *Streptococcus canis* iz našeg istraživanja,a podrijetlom iz Hrvatske sa sojevima prisutnim u bazi podataka PubMLST, a podrijetlom iz različitih europskih zemalja. Iz MST prikaza jasno je vidljivo da naši sojevi *Streptococcus canis* pripadaju jednoj od nazastupljenijih grupa u Europi ST9 koja, vrlo vjerojatno, tvori klonalni kluster u kojem je ST9 čak i nositelj.



Slika 3. *"Minimum spanning tree*" prikaz (engl. MST) odnosa alelnih tipova sojeva *Streptococcus canis* iz našeg istraživanja sa sojevima iz različitih dijelova Europe. Sama priroda crta koje povezuju pojedine alelne tipove označavaju međusobnu povezanost odnosno udaljenost pojedinih alelnih tipova. Naime, razlika na jednom genskom lokusu odgovara udaljenosti od 1 (engl. single locus variants, SLV)(najdeblja puna crta); razlika na dva lokusa (engl. double locus variants, DLV)(tanja puna crta); razlika na tri lokusa (engl. triple locus variants, TLV)(još tanja puna crta); itd. Grupa sa sojevima iz našeg istraživanja označena je i narančastim krugom.

5.2.4. *Streptococcus uberis*

Tablica 15. Identifikacija alelnih profila vrste *Streptococcus uberis* s pomoću MLST[1] metode

UZORAK	MLST ST	MLST CC	*arcC*	*ddl*	*gki*	*recP*	*tdk*	*tpi*	*yqiL*	eBURST[2]
CVI_3	1201		71	1	64	1	76	1	73	single
CVI_4	1202		72	37	5	2	2	1	73	single
CVI_7	1203		72	1	3	2	13	4	73	single
CVI_8	1203		72	1	3	2	13	4	73	single
CVI_9	1203		72	1	3	2	13	4	73	single
CVI_11	1222		73	1	27	2	107	1	73	single
CVI_12	1203		72	1	3	2	13	4	73	single
CVI_13	1223		74	1	4	4	5	4	73	single
CVI_15	1224	ST-5 complex	72	1	4	1	2	1	73	G1
CVI_17	1203		72	1	3	2	13	4	73	single
CVI_18	1203		72	1	3	2	13	4	73	single
CVI_20	1204		74	6	5	2	10	4	72	single
CVI_21	1205		71	1	43	2	107	1	73	single
CVI_22	1203		72	1	3	2	13	4	73	single
CVI_23	1203		72	1	3	2	13	4	73	single
CVI_25	1227	ST-5 complex	75	1	65	1	2	1	73	single
CVI_27	1166		42	1	4	2	29	1	34	single
CVI_29	1228		72	1	4	1	2	41	73	G1
CVI_30	1225		73	8	5	2	13	1	73	single
CVI_32	1206		76	5	4	1	2	1	73	single
CVI_34	1203		72	1	3	2	13	4	73	single
CVI_37	1207		73	11	4	2	51	4	15	single
CVI_38	1208		77	37	43	2	49	1	74	single
CVI_42	1209		71	37	43	2	2	1	73	single
CVI_46	1210		78	2	3	16	3	1	73	single
CVI_47	1210		78	2	3	16	3	1	73	single
CVI_48	1226		79	1	5	2	26	4	73	single
CVI_52	1229		78	1	65	1	62	1	73	single
CVI_53	1230		74	8	4	1	108	4	73	single
CVI_54	1211		71	37	5	1	39	1	74	single
CVI_59	1212	ST-5 complex	71	1	4	1	2	1	73	G1

[1]MSLT – Multilocus sequence typing

[2]eBURST – eBURST algoritam

U tipiziranim uzorcima definirali smo 22 različita alelna profila. Svi alelni tipovi do sada su bili nepoznati u bazi podataka. Najzastupljeniji ST je ST1203 s 9 uzoraka. ST1210 određen je u dva uzorka dok su ostali ST su u uzorcima zastupljeni s jednim uzorkom za pojedini alelni profil (Tablica 15.).

Tablica 16. Prikaz alela prema pojedinom istraživanom genskom lokusu u vrste *Streptococcus uberis*

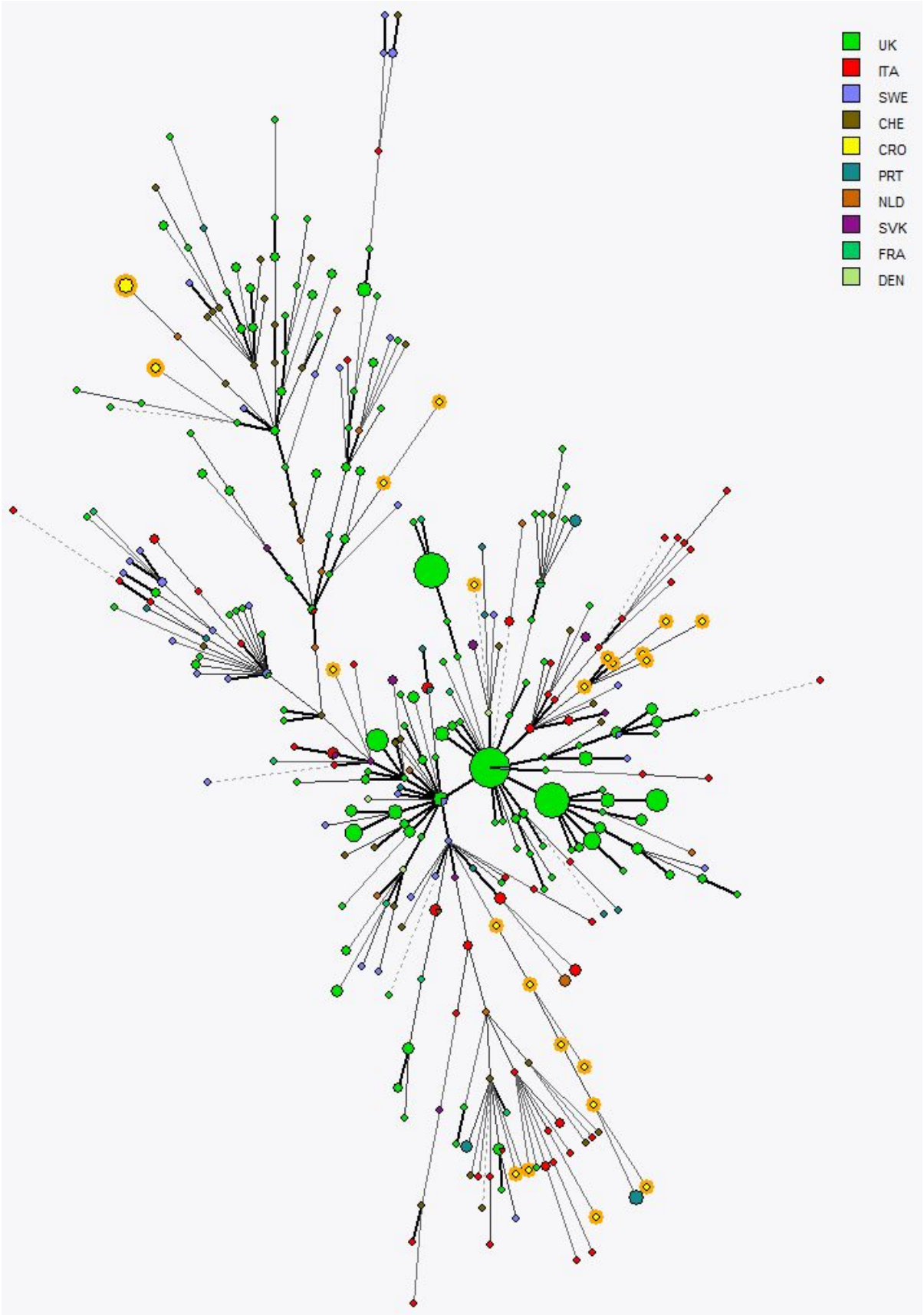
GEN	DULJINA SLIJEDA (bp)	BROJ ALELA	ALELI	HGDI[1]
arcC	~500	10	42, 71-79	0,82
ddl	~500	7	1, 2, 5, 6, 8, 11, 37	0,57
gki	~500	7	3, 4, 5, 27, 43, 64, 65	0,79
recP	~500	4	1, 2, 4, 16	0,55
tdk	~500	14	2, 3, 5, 10, 13, 26, 29, 39, 49, 51, 62, 76, 107, 108	0,85
tpi	~500	3	1, 4, 41	0,55
yqiL	~500	5	15, 34, 72, 73, 74	0,30

[1]HGDI – Hunter-Gaston indeks raznolikosti (eng. *Hunter-Gaston discriminatory index*)

Alelni profili su istraživani na 7 lokusa: *arcC*, *ddl*, *gki*, *recP*, *tdk*, *tpi* i *yqiL* (Tablica 16.). Najpolimorfniji lokusi su *tdk i arcC* s HGDI indeksima 0,85 odnosno 0,82. Slijede ga gki, *ddl, rec i tpi* s HGDI indeksima 0,79; 0,57 i 0,55. Najmanje polimorfan je *yqiL* s HGDI indeksom od 0,30.

Korištenjem eBURST algoritma definirali smo jednu grupu od tri alelna profila: ST1212, ST1224 i ST1228. Ostali alelni profili ne tvore grupe nego su "pojedinačni" (engl. *singletons, single*).

Slika 4. prikazuje odnos sojeva *Streptococcus uberis* iz našeg istraživanja,a podrijetlom iz Hrvatske sa sojevima prisutnim u bazi podataka PubMLST, a podrijetlom iz različitih europskih zemalja. Iz MST prikaza nije vidljiva nikakva značajna regionalna grupiranost alelnih profila. Ipak, treba imati na umu da smo istraživanje proveli na 31 uzorku od kojih velika većina ima novo-identificirani ST. Alelni profili su originalni mahom radi novih alela na *arcC* lokusu.


UK
ITA
SWE
CHE
CRO
PRT
NLD
SVK
FRA
DEN

Slika 4. "Minimum spanning tree" prikaz (engl. MST) odnosa alelnih tipova sojeva *Streptococcus uberis* iz našeg istraživanja sa sojevima iz različitih dijelova Europe. Sama priroda crta koje povezuju pojedine alelne tipove označavaju međusobnu povezanost odnosno udaljenost pojedinih alelnih tipova. Naime, razlika na jednom genskom lokusu odgovara udaljenosti od 1 (engl. single locus variants, SLV)(najdeblja puna crta); razlika na dva lokusa (engl. double locus variants, DLV)(tanja puna crta); razlika na tri lokusa (engl. triple locus variants, TLV)(još tanja puna crta); itd. Sojevi iz našeg istraživanja označeni su i narančastim krugovima

6. RASPRAVA

U većini dijagnostičkih laboratorija, za identifikaciju bakterija u rutinskoj dijagnostici koriste se različiti biokemijski testovi. Takav postupak zahtijeva dosta vremena, a često može rezultirati nezadovoljavajućim rezultatima unatoč složenim postupcima identifikacije kakvi se između ostalih primjenjuju i u identifikaciji streptokoka. Alternativa ovim postupcima su minijaturni biokemijski testovi poput API sustava, složeniji sustavi poput Vitek sustava, MALDI-TOF MS sustava identifikacije (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry,* MALDI-TOF MS) temeljenog na masenoj spetkrometriji, a u novije doba analizom genskih odrednica poput detekcije genskih markera specifičnih za vrstu kao što je 16S rRNA (MCDONALD i sur., 2005.).

Svi naši izolati korišteni u istraživanju bili su gram-pozitivni koki, katalaza negativni, karakteristične morfologije za streptokoke. Provjerena im je sposobnost razgradnje eskulina, prisutnost CAMP faktora. Sposobnost rasta na selektivnoj podlozi kanamicin eskulin azid agaru s dodatkom žučnih soli radi razlikovanja od enterokoka provjerena je i niti jedan izolat nije porastao nakon inkubacije u trajanju od 72 sata pri 37°C.

Od 54 bakterijska soja koja smo odabrali za istraživanje, za 47 (87 %) je potvrđeno da pripadaju rodu *Streptococcus*. Od sedam preostalih sojeva tri su pripadala vrsti *Enterococcus faecalis* i četiri vrsti *Lactococcus lactis*. Mikrobiološka identifikacija prikazana je u tablici 7. Najveći stupanj podudarnosti rezultata uočen je za vrstu *S. uberis*. Od 24 mikrobiološki identificirana soja njih 18 (75%) potvrđeni su genskim metodama. Preostalih 6 identificirano je kao *S. dysgalactiae* (3), *Lactococcus lactis* (2) i 1 *Enterococcus faecalis*. U skupini koja je mikrobiološki identificirana do roda, od 17 analiziranih sojeva, većina, odnosno 12 (71%) je genskim analizama identificirano kao *S. uberis,* 2 *kao Enterococcus faecalis,* 2 kao *Lactococcus lactis* i 1 kao *S. dysgalactiae.*

Naši rezultati su usporedivi s rezultatima koje su nedavno objavili WALD

i sur. (2017), nokon što su analizirali 336 izolata bakterije *S. uberis* izdvojene iz slučajeva mastitisa podijelivši ih u 2 skupine: jednu koja je imala tipičan porast na podlogama i biokemijske osobine dok su u drugu uvrstili izolate s barem jednom atipičnom osobinom. U skupini tipičnih predstavnika podudarnost rezultata mikrobiološke identifikacije s genskim probama iznosila je 96%, dok je u skupini atipičnih iznosila je 64%, u obje skupine zajedno 91%. Autori zaključuju da je u skupini s barem jednom atipičnom kulturelnom ili biokemijskom osobinom izražen preveliki biodiverzitet i da se pouzdanost rezultata može poboljšati uvođenjem jednostavnih dodatnih testova. Kada je u pitanju identifikacija vrste *S. uberis*, „urođena“ slabost rutinskih metoda rezultat je činjenice da izražene karakteristike ovog uzročnika variraju između izolata (ODIERNO i sur., 2006., KRÖMKER i sur., 2014., DUARTE i sur., 2015.). U rutinskoj identifikaciji atipične sojeve *S. uberis* može se zamijeniti sličnim bakterijama iz okoliša poglavito okolišnim streptokokima ili mliječno-kiselim bakterijama osobito pripadnicima roda *Lactococcus* (FORTIN i sur., 2003., WERNER i sur., 2014.).

Najizraženije neslaganje rezultata u našem istraživanju uočeno je kada je u pitanju vrsta *S. agalactiae*. Dva mikrobiološki identificirana soja potvrđena su i genskim analizama. Međutim 4 soja mikrobiološki identificirana kao *S. dysgalactiae* molekularnim su metodama identificirana kao *S. agalactiae*. U spomenuta 4 soja mikrobiološkim pretragama nije potvrđena sposobnost tvorbe CAMP fenomena. CAMP test služi za identifikaciju vrste *S. agalactiae* i visoko je specifičan za skupinu B po Lancefieldovoj kojoj ova vrsta pripada. Test se temelji na detekciji difuzibilnog ekstracelularnog bakterijskog proteina koji u sinergiji s beta-toksinom vrste *Staph. aureus* izaziva potpunu lizu ovčjih eritrocita u podlozi. CAMP faktor u vrste *S. agalactiae* kodira gen *cfb*. Analogni geni prisutni su i u drugih vrsta streptokoka kod kojih je izražen CAMP fenomen: *cfu* u vrste *S. uberis (*JIANG i sur., 1996*.)*, *cfa* u *S. pyogene*s (GASE i sur., 2000.) i *cfg* u *S. canis* (HASSAN i sur., 2000.), ali se međusobno razlikuju od *cfb* gena. Molekularnim je pretragama potvrđena prisutnost *cfb* gena u gotovo svim pripadnicima B skupine streptokoka po Lancefieldovoj (HASSAN i sur., 2000., KE i sur., 2000., ESTUNINGSIH i sur., 2002.). Međutim neki pripadnici skupine B po Lancefieldovoj su fenotipski, a djelomice i genotipski CAMP negativni (PODBIELSKI i sur., 1994., VANDAMME i sur., 1997., HASSAN i sur., 2000., HASSAN i sur., 2002.). Vezano za identifikaciju *S. agalactiae* u rutinskim

pretragama nameće se zaključak da svaki izdvojeni soj *S. dysgalactiae* treba podvrgnuti dodatnim biokemijskim testovima ili genskim analizama radi sigurnije identifikacije. Osim toga, sojeve iz zbirke koji ne pokazuju CAMP fenomen bilo bi uputno genski analizirati i vidjeti jesu li nosioci gena *cfb*.

Rod *Streptococcus* obuhvaća gram-pozitivne bakterije sferičnog ili ovoidnog oblika tipično složenih u obliku lanaca ili parova. Pripadnici roda fakultativno su anaerobni, nesporulirajući, katalaza-negativni. Među brojnim poznatim vrstama streptokoka koje naseljavaju ljudski ili životinjski organizam neke su značajni patogeni. BILLROTH je 1874. godine prvi opisao lančaste nizove bakterija iz rana nazvavši ih streptokokima. ROSENBACH je 1884. godine prvi opisao vrstu *Streptococcus pyogenes* izdvojivši je iz gnojne rane čovjeka. Više je istraživača nakon toga izoliralo streptokoke iz različitih izvora, uključujući *S. agalactiae* iz vimena te iz slučajeva pneumonije ljudi i konja (HARDIE i WHILEY, 1995.).

Zbog kompleksnijih nutritivnih zahtjeva streptokoka, izolacija na osnovnim hranjivim podlogama je manje uspješna nego na podlogama obogaćenima krvlju, serumom ili ugljikohidratima. Kolonije porasle na hranjivim podlogama su sitne, oko 1 mm nakon 24h inkubacije pri 37 °C, većinom nepigmentirane osim ako su uzgojene u posebnim uvjetima. Optimalna temperatura za izdvajanje i kultivaciju je 37 °C (TAGG i sur., 2011.). Brojne revizije u taksonomskoj podjeli streptokoka provedene su od samih početaka istraživanja streptokoka. U novije vrijeme uvriježena je podjela u 6 glavnih skupina s određenom vrstom kao nositeljem skupine te u skupinu u kojoj nositelj nije određen. Podjela se temelji na analizi odsječka gena 16S rRNA. Skupine su:

1. *Streptococcus pyogenes* skupina obuhvaća beta-hemolitične streptokoke patogene za ljude i životinje

2. *Streptococcus anginosus* skupina obuhvaća komenzale i oportunističke patogene pronađene u usnoj šupljini, probavnom i genitalnom traktu ljudi

3. *Streptococcus mitis* skupina uključuje patogenu vrstu S. pneumoniae i različite komenzale u usnoj šupljini

4. *Streptococcus salivarius* skupina uključuje mliječne streptokoke i komenzale usne šupljine ljudi

5. *Streptococcus bovis* skupina obuhvaća vrste pronađene u probavnom traktu više vrsta životinja

6. *Streptococcus mutans* skupina obuhvaća genetski različite različite, ali fenotipski slične vrste

7. Skupina bez nositelja definirana bolešću

Najznačajniji u veterinarskoj medicini su pripadnici *S. pyogenes* skupine, a obuhvaćaju, između ostalih, vrste koje uzrokuju mastitis krava *S. agalactiae, S. dysgalactiae, S. uberis, S. canis.* Pripadnici ove skupine u domaćina uzrokuju septikemiju ili infekciju dišnog sustava. Premda su većinom adaptirani na jednog domaćina, neki pripadnici skupine imaju zoonotski karakter i uzrokuju infekcije u ljudi koji su u bliskom kontaktu s nositeljem. Najbolje je opisan *S. pyogenes* koji u ljudi uzrokuje čitav niz patoloških stanja kao što su faringitis, impetigo, celulitis, nekrotizirajući fascitis, streptokokni sindrom septičnog šoka, reumatska groznica, glomerulonefritis.

Vrsta *S. agalactiae*, premda dugo poznata kao uzročnik mastitisa krava, često naseljava dišni, spolni i probavni trakt čovjeka te uzrokuje infekcije ljudi poglavito sepsu ili meningitis novorođenčadi. (BERARDI i sur., 2007.). Premda *S. agalactiae* na temelju serotipizacije po Lanefieldovoj pripada u skupinu B neovisno o porijeklu, sojevi porijeklom iz ljudi razlikuju se od sojeva izdvojenih iz životinja po patogenim i fenotipskim osobinama. Genotipiziranjem je utvrđeno da sojevi *S. agalactiae* ovisno o porijeklu (ljudi, životinje) tvore zasebne populacije. Ipak, novija istraživanja ukazuju da se određeni prijenos na ljude događa u slučajevima bliskog kontakta ljudi s govedima (MANNING i sur., 2010.). *S. agalactiae* je također zapažen i kao značajan patogen u akvakulturi izazivajući značajan pobol i smrtnost u farmski uzgajanih riba. Pored toga povezuje ga se s bolestima sisavaca i nesisavaca diljem svijeta (PEREIRA i sur., 2010.).

Dvije podvrste unutar *S. dysgalactiae* predložene su kao taksonomske kategorije. *S. dysgalactiae subspecies equisimilis* uključuje izolate iz ljudi i životinja koji pokazuju izrazitu beta-hemolizu, sadrže C ili G antigen po Lancefieldovoj, povremeno A ili L i posjeduju gene za virulenciju homologne vrsti *S. pyogenes*. *S. dysgalactiae subspecies dysgalactiae* izoliran je samo iz životinja, pokazuje alfa ili

beta hemolizu ili je nehemolotičan te posjeduje C ili L antigen po Lancefieldovoj. Fenotipski slične, ali genetski različite vrste *S. uberis* i *S. parauberis* značajni su uzročnici mastitisa i za razliku od većine piogenih streptokoka su alfahemolitične ili nehemolitične. Neki sojevi regiraju s antiserumom B, E, G ili P po Lancefieldovoj (GROSCHUP i sur., 1991.). *Streptococcus canis* tvori velike kolonije, a pripada skupini G po Lancefieldovoj. Najčešće se izdvaja iz uzoraka porijeklom od pasa i krava s mastitisom. Povremeno uzrokuje infekcije u ljudi (LAM i sur., 2007.).

Ostali pripadnici piogenih streptokoka su *S. equi subsp. equi, S. equi subsp. zooepidemicus, S. equi subsp. ruminatorum, S. porcinus, S. pseudoporcinus, S. hyointestinalis, S. hyovaginalis , S. thoraltensis, S. halichoeri, S. phocae, S. castoreus, S. didelphis, S. iniae, S. urinalis, S. pluranimalium*.

Pored zajedničkih morfoloških i kulturelnih osobina koje dijeli s ostalim streptokokima, *S. agalactiae* se od ostalih streptokoka razlikuje po sposobnosti tvorbe ekstracelularnog produkta koji u prisutnosti stafilokoknog beta toksina izaziva potpunu hemolizu na agaru s dodatkom krvi. Ova je osobina prema istraživačima koji su je prvi opisali nazvana CAMP fenomen (Christie, Atkins, Munch-Peterson). U rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici ovaj se fenomen koristi za razlikovanje *S. agalactiae* tako da se u podloge s dodatkom krvi dodaje u podlogu stafilokokni beta toksin ili se na podlogu s dodatkom krvi nacjepljuje soj *Staphylococcus aureus* koji tvori nepotpunu hemolizu u obliku pruge, a okomito na prugu ispitivani soj streptokoka tako da se pruge ne dodiruju. CAMP fenomen očituje se zonom potpune hemolize polumjesečasta oblika. *S. agalactiae* ne razgrađuje eskulin. Ako se uzgaja u anaerobnim uvjetima na podlogama s pH vrijednošću iznad 7.3 i s dodatkom škroba stvara karotenoidni pigment. Tvorba pigmenta postojanija je u sojeva izdvojenih iz ljudi, nego u sojeva iz goveda. Bakteriju je moguće uspješno izdvojiti iz uzoraka mlijeka nakon smrzavanja budući da smrzavanje ne utječe na njezinu vijabilnost. Bakterijske stanice imaju sposobnost adherencije na stanice mliječne žlijezde, a sama mliječna žlijezda predstavlja mikro okoliš pogodan za rast i razmnožavanje vrste *S. agalactiae*. Među različitim sojevima je opažena razlika u patogenosti, a ona je povezana sa sposobnošću adherencije (KEEFE, 1997.).

Bakterija *S. agalactiae* izrazito je kontagiozni obligatni patogen mliječne žlijezde. U pravilu izaziva perzistirajuće infekcije slabijeg intenziteta upale, ali niskog

stupnja samoizlječenja. Inficirane a neotkrivene krave predstavljaju rezervoar infekcije. Budući da je *S. agalactiae* obligatni intramamarni patogen, kravlje vime smatra se jedinim izvorom uzročnika u mlijeku. Stoga se i u slučajevima detekcije ovog uzročnika u stajskom uzorku mlijeka smatra da je izvor mliječna žlijezda. Budući da može duže vrijeme preživjeti samo u mliječnoj žlijezdi te da je osjetljiv na penicilin, podložan je eradikaciji iz stada muznih krava. Uz primjenu biosigurnosnih mjera, stado se može održavati u stanju slobodnom od infekcija ovim uzročnikom.

Tijekom 50-ih godina prošlog stoljeća ovaj je uzročnik bio jedan od glavnih uzročnika mastitisa. Primjenom mjera kontrole bolesti i promjenama u zakonodavstvu tijekom 1960-ih skoro je iskorijenjen iz stada muznih krava u sjevernoj Europi, a takvo stanje glede proširenosti uzročnika nastavljeno je do kraja stoljeća. U posljednjih 20-ak godina okolnosti u primarnoj proizvodnji mlijeka su se promijenile. Broj stada muznih krava je smanjen, prosječni broj krava po farmi je povećan, a sve je češća primjena automatizirane mužnje na farmama. Istovremeno je porastao i udio farmi na kojima je zabilježena infekcija ovim uzročnikom (LYHS i sur., 2016.). U Danskoj je broj takvih farmi utrostručen u prvim godinama 21. stoljeća (MWEU i sur., 2012.), a sličan trend je uočen i u Švedskoj i Norveškoj (KATHOLM i sur., 2012.).

U novije vrijeme brojna istraživanja nastoje rasvijetliti molekularnu epidemiologiju i gensku različitost bakterije *S. agalactiae*. Neka istraživanja koja koriste tipiziranje sekvenci na više lokusa unutar tzv. *housekeeping* gena (MLST) ukazuju na adaptiranost određenih sekvencijskih tipova (ST) za određenog domaćina te na odvojeno grupiranje humanih i goveđih sojeva (CHEN SWAINE, 2019.). Tipičnim klasterima u koje spadaju goveđi tipovi smatraju se CC67 i CC23 (YANG i sur., 2013., CHEN SWAINE, 2019.). Najčešći sekvencijski tipovi koji se smatraju adaptiranima na goveda su ST67 i ST103. ST67 pripada klonalnom kompleksu CC67. Smatra se najproširenijim tipom i do sada je potvrđen u Brazilu (CARVALHO-CASTRO i sur., 2017.), Francuskoj, Ujedinjenom Kraljevstvu (BISHARAT i sur., 2004.) i SAD (SPRINGMAN i sur., 2014.). U istraživanju LYHS i sur. (2016.) koje je obuhvatilo 81 soj izoliran iz ljudi u Finskoj i Švedskoj te 108 sojeva izdvojenih iz goveda u ove dvije zemlje većina utvrđenih sekvencijskih tipova (54%) pripadala je tipovima koji napadaju oba domaćina. Autori su zaključili da je demarkacijska linija između sojeva različite specifičnosti prema određenom domaćinu poroznija nego što

se ranije smatralo. Sojevi izdvojeni iz ljudi tvore 6 klastera: CC1, CC10, CC17, CC19, CC23 i CC26 (WANG i sur., 2017.).

U našem istraživanju detektirali smo 4 sekvencijska tipa: ST314, ST23, ST67 i ST103. Tri od sedam sekvenciranih sojeva *S. agalactiae* u našem istraživanju pripadaju tipu ST314. Isti je tip potvrđen u Kolumbiji (COBO-ÁNGEL i sur., 2018.). U istraživanju provedenom u Švedskoj koje je obuhvatilo ljudske i goveđe izolate, ST314 je potvrđen u kravljih izolata (LYHS i sur., 2016.). ST23 sekvencijski tip do sada je izdvojen iz većeg broja domaćina i smatra se da ima najširi spektar domaćina. Infekcije ovim tipom zabilježene su u hladnokrvnih i toplokrvnih organizama uključujući ljude, goveda, pse, krokodile i tuljane. Odrasli ljudi su nosioci ovog tipa dok u novorođenčadi uzrokuje neonatalnu infekciju. Često se izdvaja iz krava i poznat je kao uzročnik mastitisa (DELLANOY i sur., 2013.). Premda se ne smatra patogenim za ribe (DELLANOY i sur., 2013.), u pokusnoj infekciji tilapije sojevima ovog tipa izdvojenog iz ljudi, mortalitet je iznosio 70-100% (WANG i sur., 2017.). Sojevi izdvojeni iz ljudi i krava serološki se razlikuju premda pripadaju istom ST tipu. Serološka specifičnost rezultat je različitog slaganja četiriju ugljikohidratnih komponenti u jedinstvenu ponavljajuću jedinicu u kapsuli bakterije. Strukturalna različitost rezultat je raznolikosti unutar genskog klastera koji kodira biosintezu bakterijske kapsule. Izmjena gena koji kodiraju tip kapsule odvija se horizontalno pa stoga bliski ST tipovi sintetiziraju različite kapsule (BROCHET i sur., 2006.). ST67 smatra se najčešćim tipom kada su u pitanju vrsta *S. agalactiae* porijeklom iz mastitisa goveda i u nekim istraživanjima dvije trećine pretraženih izolata pripadalo je ovom tipu (BICHARAT i sur., 2004.). Sekvencijski tipovi izdvojeni iz ljudi su puno raznolikiji u usporedbi s tipovima goveđeg porijekla, koji uglavnom obuhvaćaju ST67 i njegov varijantu ST61. Infekcija prouzročena vrstom *S. agalactiae* u ljudi može biti smještena u više organskih sustava dok je u krava zahvaćena samo mliječna žlijezda pa to može biti razlogom manje heterogenosti goveđih izolata. Pretpostavlja se da je ljudski neonatalni klon ST17 evoluirao iz goveđeg ST 67 (BISHARAT i sur., 2004., ZADDOKS i sur., 2011.).

U novije vrijeme sojevi unutar klonalnog kompleksa CC103 postali su značajni uzročnici mastitisa krava u europskim i azijskim zemljama, a pripadnik kompleksa ST485 sve je češći nalaz u ljudi u Kini (WANG i sur., 2018.). Pripadnici CC103 uzrokuju infekcije uljudi i životinja. Dosad su izdvojeni iz pasa, mačaka, goveda i riba.

Filogenetske analize ukazuju da CC103 formira zasebni evolucijski ogranak u odnosu na druge klonalne komplekse unutar skupine streptokoka. Ljudski i goveđi izolati, pripadnici CC103, pokazuju blisku evolucijsku povezanost. Unutar CC103 generiralo se više sekvencijskih tipova, između ostalih ST103: ST103 inficira ljude i goveda i nema formiranih zasebnih evolucijskih ogranaka. Stoga se smatra da nije evoluirao na jednom domaćinu i da se ljudi i goveda mogu međusobno inficirati ovim sekvencijskim tipom (WANG i sur., 2018.).

Vrsta *Streptococcus dysgalactiae* je po pitanju taksonomije bila izvorom konfuzija. Naziv je u početku bio predložen za različite goveđe streptokoke, dok je naziv *Streptococcus equisimilis* bio predložen za beta-hemolitične streptokoke skupine C po Lancefieldovoj porijeklom iz ljudi. Osamdesetih godina 20. stoljeća u vrstu *S. dysgalactiae* bili su uvršteni samo alfa-hemolitički streptokoki goveđeg porijekla. Nakon toga, sistematika je doživjela promjenu koja se temeljila na rezultatima molekularnih pretraga. Naime rezultati polučeni tehnikom hibridizacije DNK ukazali su da goveđi sojevi *S. dysgalactiae, S. equisimilis* i streptokoki skupina G i L po Lancefieldovoj koji tvore velike kolonije zapravo čine jednu vrstu *S. dysgalactiae*. Stoga je prihvaćena nova podjela u dvije podvrste pa danas *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae* obuhvaća izolate porijeklom iz životinja, a podvrsta *S. dysgalactiae subsp. equisimilis* obuhvaća beta-hemolitične izolate iz čovjeka te streptokoke koji tvore velike kolonije a posjeduju C i G antigen po Lancefieldovoj (JENSEN i MOGENS, 2011.).

Morfološke i kulturelne osobine ovog uzročnika slične su drugim streptokokima. To su gram-pozitivni, katalaza negativni i oksidaza pozitivni koki koji tvore kratke i srednje duge nizove. Optimalna temperatura za rast je 37°C. Rast se ne zapaža na temperaturi nižoj od 10°C i višoj od 45°C. Rast također zaustavlja dodatak 6.5% NaCl, 40% žuči, bacitracina te pH 9.6 (ABDESALAM i sur., 2013.). Oko poraslih kolonija uočava se alfa hemoliza ili hemoliza nije izražena, a podvrsta *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae* pripada skupini C po Lancefieldovoj.

U posljednje vrijeme je provedeno relativno malo istraživanja fokusiranih na ovog uzročnika, no ona naglašavaju da se ovaj uzročnik može ponašati i kao kontagiozni i kao uvjetno patogeni (okolišni) patogen (LUNDBERG i sur., 2016.). *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* smatra se životinjskim patogenom i često je

povezan s kliničkim i supkliničkim mastitisom u krava (ABDELSALAM i sur., 2013., CERVINKOVA i sur., 2013.). Prema nedavno objavljenim radovima, uzročnik je povezan s pojavom sindroma nalik toksičnom šoku u krava (CHENIER i sur., 2008.) gnojnim poliartritisom u janjadi (LACASTA i sur., 2008.), bakterijemijom u pasa (VELA i sur., 2006.), sustavnom granulomatoznom bolešću i teškom septikemijom u riba (HAGIWARA i sur., 2009.). U posljednje vrijeme pojavljuju se izvješća i radovi koji naglašavaju povezanost ovog uzročnika s različitim infekcijskim stanjima u ljudi kao što su celulitis, artritis nakon artoplastičnog zahvata i endokarditis. Čini se ipak da su takvi slučajevi rijetki i da uloga ove bakterijske podvrste u patogenezi ljudskih infekcija nije do kraja jasna (ALVES-BARROCO i sur., 2019.).

O izdvajanju, patogenosti, rasprostranjenosti pojedinih sekvencijskih tipova podvrste *S. dysgalactiae subsp.dysgalactiae* u dostupnoj literaturi gotovo da i nema podataka za razliku od podvrste *S. dysgalactiae subsp.equisimilis.* Molekularna epidemiologija podvrste *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae* istražena je tehnikom gel elektroforeze u pulsirajućem polju (LUNDBERG i sur., 2016.). Autori su ukazali na različitost pulsotipova između stada premda se isti tipovi mogu naći u više stada što se u velikoj mjeri podudara i sa našim nalazom. Naime ukupno 8 analiziranih sojeva pripadalo je u 7 sekvencijskih tipova. Samo je ST305 zastupljen s dva soja, dok su ST453, ST451, ST311, ST306, ST299 i ST460 prisutni s po jednim pretraženim sojem. Pretraživanjem javno dostupnih podataka u međunarodnoj bazi (https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-dysgalactiae) vidljivo je da su svi tipovi, izuzev ST453 za kojeg nema javno dostupnih podataka, porijeklom iz goveda, a za većinu je navedeno da potječu iz slučajeva mastitisa krava.

Vrstu *S. uberis* povezanu s mastitisom krava prvi je opisao Diernhofer 1932. (KHAN, 2002.). *S. uberis* je gram-pozitivni, katalaza negativni streptokok koji ima sposobnost razgradnje eskulina. Često se izdvaja iz uzoraka mlijeka sa supkliničkim ili kliničkim mastitisom. U rutinskoj dijagnostici u mikrobiološkim laboratorijima ponekad ga se ne identificira dovoljno pouzdanim metodama pa se nakon detaljnije analize izolata prvotno identificiranih kao *S. uberis* otkrije da se izolat razlikuje od ovog patogena (COFFEY i sur., 2006.). Od ranih 70-ih godina prošlog stoljeća ovog uzročnika istraživači svrstavaju u oportunističke patogene iz okoliša budući da je u više navrata izdvojen iz stelje, fecesa i sa kože te iz mliječne žlijezde krava (DAVIES i sur., 2016.).

Među najznačajnijim je uzročnicima mastitisa krava širom svijeta uključujući zemlje s intenzivnom mljekarskom proizvodnjom poput SAD (WILSON i sur., 1997.), Nizozemske (BARKEMA i sur., 1999.), Kanade (SARGEANT i sur., 1998., OLDE RIEKERING i sur., 2008.), Ujedinjenog Kraljevstva (LEIGH, 1999.), Australije (PHUEKTES i sur., 2001.) i Francuske (BOTREL i sur., 2010.). Trend veće učestalosti mastitisa prouzročenog ovim uzročnikom opisan je i u Republici Hrvatskoj (CVETNIĆ i sur., 2016a.). Uzročnika se smatra glavnom preprekom u kontroli mastitisa krava, djelomice i stoga što mu epidemiologija nije u potpunosti rasvijetljena (ZADOKS i sur., 2003.). Primarni rezervoar uvjetno patogenih uzročnika mastitisa je okoliš krave, a izloženost uzročniku nije vezana isključivo za proces mužnje. Izvori uzročnika *S. uberis* u okolišu krave su dijelovi tijela, gnoj, pašnjak te stelja. Nove infekcije mogu se zapaziti i u zasušenih krava te u junica prije teljenja. Budući da se zasušene krave i junice ne muzu, infekcije u ovih skupina životinja ne mogu nastati prijenosom s krave na kravu u izmuzištu. Stoga je okoliš najvjerojatniji izvor infekcije (ZADOKS i sur., 2003.). Naglašavanje okoliša kao izvorišta ovog uzročnika infekcije mliječne žlijezde djelomice je rezultat neuspjeha u iskorjenjivanju zaraze primjenom higijenskih mjera koje su učinkovite u kontroli kontagioznih uzročnika mastitisa (BRAMLEY, 1984.). Međutim primjena molekularnih metoda u istraživanjima ukazala je na činjenicu da postoji i izravan prijenos s krave na kravu i da u nekim stadima dominira isti soj (BASEGGIO i sur., 1997., COFFEY i sur., 2006.).

Intramamarne infekcije prouzročene sa *S. uberis* mogu protjecati u kliničkom i subkličkom obliku i varirati u duljini trajanja. Subkliničke infekcije mogu ugroziti uspjeh provedbe mjera za kontrolu mastitisa jer protječu nezapaženo, bez vidljivih znakova mastitisa. Takve infekcije obično su dugotrajnije. Kronične infekcije mliječne žlijezde prouzročene ovom vrstom u više su navrata dokumentirane (OLIVER i sur., 1998.) a neki autori su ukazali na njihovu moguću ulogu u širenju za vrijeme mužnje (PEELER i sur., 2000.). Suvremena istraživanja koja kombiniraju terenska zapažanja s rezultatima molekularnog tipiziranja podupiru stavove o povremenoj kontagioznoj naravi ovog uzročnika. Više istraživača pokušalo je povezati soj s kliničkom slikom ili epidemiološkim značajkama soja kao što su perzistencija infekcije, klinička slika infekcije ili povezanost s brojem somatskih stanica u mlijeku. Čini se da individualni čimbenici povezani sa životinjom više određuju trajanje infekcije od samog soja bakterije (PULLINGER i sur., 2007.).

Molekularne metode istraživanja *S. uberis* datiraju iz 1990-ih godina prošlog stoljeća. U većini provedenih istraživanja u kojima su korištene molekularne metode naglašena je izrazita heterogenost izolata *S. uberis* (PULLINGER i sur., 2006., TOMITA i sur., 2008., REYES i sur., 2019.). Unatoč heterogenosti uzročnika, aseptično uzet uzorak iz pojedinačne četvrti vimena obično sadrži samo jedan soj *S. uberis* (PHUEKTES i sur., 2001.). Čak i nakon eksperimentalne infekcije s više sojeva *S. uberis* jedan od sojeva dominira (PRYOR i sur., 2009.). Perzistirajuća infekcija jedne četvrti s uzastopnim izdvajanjem istog soja češća je pojava nego istovremeno izdvajanje istog soja iz različitih četvrti iste krave (MCDOUGALL i sur., 2004.). Istovremena infekcija više krava u stadu istim sojem opisana je i pripisuje se prijenosom uzročnika s krave na kravu (PHUEKTES i sur., 2001., KHAN, 2002., TOMITA i sur., 2008.).

Tipiziranje odsječaka na više lokusa (MLST) temelji se na bilježenju promjena u tzv. *house keeping* genima koji se u evoluciji sporo mijenjaju budući da kodiraju neke temeljne funkcije stanice. U svojoj osnovi MLST se temelji na određivanju slijeda nukleotida u odsječku odabranih gena. Genski lokusi odabrani su na temelju činjenice da se nalaze u svakom organizmu i da su varijacije unutar lokusa selektivno neutralne. Odsječci koji se analiziraju veličine su 400-500 baznih parova i mogu se brzo, ekonomično i pouzdano analizirati u oba smjera koristeći set početnica (COFFEY i sur., 2006.). Unatoč izraženoj heterogenosti populacije *S. uberis* izdvojene iz mliječne žlijezde do sada su definirana 3 glavna klonalna kompleksa (engl. *clonal complex*, CC). Izolati *S. uberis* izdvojeni iz mlijeka u Ujedinjenom Kraljevstvu najvećim dijelom pripadaju klonalnom kompleksu CC5, u Novom Zelandu najčešći je CC143, dok je CC86 potvrđen u Australiji, Ujedinjenom Kraljevstvu i Novom Zelandu, ali je u svim spomenutim zemljama manje zastupljen od dvaju spomenutih CC-a (TOMITA i sur., 2008., PULLINGER i sur., 2006.). CC5 uglavnom se povezuje s kliničkim mastitisom, CC143 sa subkliničkim mastitisom, a CC86 sa latentnom infekcijom mliječne žlijezde (TOMITA i sur., 2008.). Ova povezanost između CC i tipa mastitisa nije apsolutna. Naime premda u Novom Zelandu dominira CC143, čest je klinički oblik mastitisa (MCDOUGALL i sur., 2004.), dok u Ujedinjenom Kraljevstvu je češći subklinički oblik unatoč dominaciji CC5 među izolatima *S. uberis* (BRADLEY i sur., 2007.). Iz objavljenih radova možemo zaključiti da je vrsta *S. uberis* oportunistički uvjetno patogeni uzročnik iz okoliša koji se

povremeno može prenositi s krave na kravu, odnosno poprimiti karakter kontagioznog uzročnika vjerojatno zbog prihvaćanja mobilnih genetičkih elemenata koji favoriziraju preživljavanje ili prijenos bakterije ili zbog propusta u upravljanju zdravljem stada (ZADOKS i sur., 2011.).

U našem istraživanju analizirali smo ukupno 31 soj vrste *S. uberis*. Dio sojeva mikrobiološki je pravilno identificiran do vrste (18/31), jedan dio do roda (12/31), dok je jedan soj *S. uberis* pogrešno identificiran kao *S. dysgalactiae*. Ukupno su determinirana 22 različita sekvencijska tipa. Najzastupljeniji tip je ST1203 kojemu je pripadalo 9 izolata. Ostali tipovi zastupljeni su s po jednim primjerkom. Svi identificirani tipovi su do sada nezabilježeni u bazi podataka. Tri utvrđena tipa (ST1212, ST1224, ST1227) pripadaju ST5 kompleksu. Korištenjem eBURST algoritma definirali smo jednu grupu u koju pripadaju tri alelna profila: ST1212, ST1224 i ST1228 dok svi ostali alelni profili ne tvore grupe nego su "pojedinačni".

Premda su sekvencijski tipovi identificirani u našem istraživanju različiti od tipova utvrđenih u drugim istraživanjima ipak možemo zaključiti da se naši rezultati podudaraju s rezultatima drugih istraživača po utvrđenoj heterogenosti, odnosno po broju utvrđenih sekvencijskih tipova unutar analizirane populacije pripadnika vrste *S. uberis*. Iako nemamo detaljnih epidemioloških podataka o stadima iz kojih izolati potječu, anamnestički podatak o naravi mastitisa nam je poznat, odnosno svi izolati potječu iz slučajeva subkliničkog mastitisa bez izraženih kliničkih simptoma. U budućim sličnim istraživanjima posebnu pozornost treba obratiti na ST1203 i druge eventualno ponavljajuće tipove te utvrditi njihovu potencijalnu kontagioznu narav.

S. canis izvorno je opisan kao beta-hemolitički streptokok izdvojen iz pasa i krava koji posjeduje G antigen po Lancefieldovoj (DEVRIESE i sur., 1986.). Izdvojen je iz više vrsta domaćina: psa, štakora, vidrice, lisice, japanskog rakuna i čovjeka. Važan je oportunistički patogen mačaka i pasa u kojih inficira središnji živčani sustav, dišni sustav, mokraćno-spolni sustav, krv, kožu, kosti, krvožilni sustav i trbušne organe. U pasa i mačaka infekcija se može razviti u teške oblike poput streptokoknog toksičnog šok sindroma, nekrotizirajućeg fascitisa, septikemije, pneumonije, meningitisa pa i čestih smrtnih ishoda dok u krava izaziva mastitis. Sve je više izvješća o infekcijama koje *S. canis* uzrokuje u ljudi s kliničkim manifestacijama sličnima onima zapaženima u mačaka i pasa. U ljudi su zabilježene infekcije mekih

tkiva, bakterijemija, urinarne infekcije, infekcije kostiju, pneumonija i smrtni ishod uslijed sepse.

Vrsta *S. canis* filogenetski se smatra srodnom s vrstama *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, i *Streptococcus pyogenes.* Vrsta je beta-hemolitična i pripada skupini G po Lancefieldovoj. Smatra se da je učestalost infekcije ljudi vrstom *S. canis* moguće podcijenjena jer identifikacija po Lancefieldovoj, koja se često koristi u kliničkoj praksi, ne može razlikovati vrstu od podvrste *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (RICHARDS i sur., 2012.). *S. canis* u više je navrata izdvojen iz krava koje su bolovale od mastitisa. U ranije opisanim slučajevima izdvajani su streptokoki skupine G po Lanciefieldovoj bez identifikacije vrste pa su neki autori zaključili da bi se moglo raditi o ovoj vrsti (EBERHARDT i GUSS, 1970.). WATTS i sur. (1984.) opisali su epizootiju mastitisa prouzročenu streptokokima G skupine u stadu mliječnih krava, a WATTS (1988.) karakterizira streptokoke izdvojene iz mliječne žlijezde te među izdvojenim streptokokima identificira *S. canis*. HASSAN i sur. (2005.) opisali su epizootiju subkliničkog mastitisa prouzročenu sa *S. canis* u stadu muznih krava u Njemačkoj, navodeći da se radi o do tada najmasovnijem opisanom slučaju mastitisa prouzročenom ovim uzročnikom. U stadu s 49 muznih krava iz 31 četvrti 11 krava izdvojen je *S. canis*. Vrsta *S. canis* opisana je i uvrštena među kontagiozne uzročnike budući da se infekcija prenosi s krave na kravu (FOX i GAY, 1993.). Porijeklo infekcije u nekim slučajevima nije potpuno jasno i smatra se da izvor infekcije mogu biti druge životinje, prvenstveno mačka i pas (HASSAN i sur., 2005., RICHARDS i sur., 2012.).

U našem istraživanju za dva smo izdvojena streptokoka koji su klasičnim bakteriološkim metodama identificirani kao *Streptococcus* spp. molekularnim metodama utvrdili da su pripadnici vrste *S. canis*. Oba su analizirana soja pripadala sekvencijskom tipu ST9. U više je navrata potvrđeno da ovom sekvencijskom tipu pripadaju izolati izdvojeni iz ljudi, pasa i mačaka, a izdvojen je iz krava kao uzročnik mastitisa. Sekvencijski tip ST9 najčešće je detektirani tip u kućnih ljubimaca u Portugalu i Njemačkoj. Vrlo je blizak tipovima ST3 i ST10 od kojih se razlikuje samo na jednom lokusu (PINHO i sur., 2013.).

Budući da za spomenute izolate nemamo epidemioloških ni anamnestičkih podataka možemo samo pretpostaviti da su mogući izvor infekcije bili psi, mačke, druge domaće životinje ili ljudi na gospodarstvu. Zbog moguće zoonotske naravi ovog uzročnika pri izdvajanju ovog uzročnika iz mlijeka bilo bi uputno pretražiti ostale moguće domaćine koji dalaze u kontakt s muznim kravama.

7. ZAKLJUČCI

1. Podudarnost rezultata dobivenih klasičnom bakteriološkom identifikacijom izolata uzročnika mastitisa krava do razine roda *Streptococcus* spp. s genskom identifikacijom visoka je, i iznosi 87%.

2. Identifikacija vrsta klasičnim mikrobiološkim postupcima najviše se podudara s genskom identifikacijom za vrstu *S. uberis*, a najmanje za vrstu *S. agalactiae.*

3. U skupini streptokoka koje nije bilo moguće identificirati do vrste klasičnim bakteriološkim postupcima, najviše je bilo pripadnika vrste *S. uberis.*

4. U skupini streptokoka koje nije bilo moguće identificirati do vrste klasičnim bakteriološkim postupcima, identificirana je vrsta *S. canis*, sekvencijski tip ST9, koji je patogen i za čovjeka.

5. Među analiziranim pripadnicima vrste *S. agalactiae* utvrđeni su zoonotski sekvencijski tipovi ST23 i ST103.

6. Stoga bi za takve vrste streptokoka laboratorijske postupke trebalo proširiti radi utvrđivanja njihove zoonotske naravi i potencijala.

8. POPIS LITERATURE

ABDELSALAM, M., A. ASHEG, A. E. EISSA (2013): Streptococcus dysgalactiae: An emerging pathogen of fishes and mammals. Int. J. Vet. Sci. Med. 1, 1–6.

ABUBAKAR, R., H. E. MADOROBA, O. ADENUBI , D. MORAR-LEATHER, F. O. FASINA (2017): Bacterial pathogens of pigs with particular reference to Escherichia coli: A systematic review and meta-analysis. J. Vet. Med. Anim. Health 9, 159-185.

ABUREEMA, S., P. SMOOKER, J. MALMO, M., DEIGHTON (2014): Molecular epidemiology of recurrent clinical mastitis due to *Streptococcus uberis*: Evidence of both an environmental source and recurring infection with the same strain. J. Milk Sci. 97, 285-290.

ALTMAN, S., L. A. KIRSEBOM (1999): Ribonuclease P. U: The RNA World (Ur. Gesteland, R. F., T. R. Cech, J. F. Atkins), Cold Spring Harbor, NY, str. 351–380.

ALVES-BARROCO, C., C. ROMA-RODRIGUES, L. R. RAPOSO, C. BRÁS, M. DINIZ, J. CAÇO, P. M. COSTA, I. SANTOS-SANCHES, A. R. FERNANDES, (2019): Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae isolated from milk of the bovine udder as emerging pathogens: In vitro and in vivo infection of human cells and zebrafish as biological models. Microbiology Open 8, e00623.

BAČIĆ, G. (2009): Dijagnostika i liječenja mastitisa u goveda. 1. izd., Veterinarski fakultet sveučilišta u Zagrebu. Zagreb. str. 29-42.

BAELE, M., V. STORMS, F. HAESEBROUCK, L. A. DEVRIESE, M. GILLIS, G. VERSCHRAEGEN, T. DE BAERE, M. VANEECHOUTTE (2001): Application and evaluation of the interlaboratory reproducibility of tRNA intergenic length polymorphism analysis (tDNA-PCR) for identification of Streptococcus species. J. Clin. Microbiol. 39, 1436-1442.

BARKEMA, H. W., Y. H. SCHUKKEN, T. J. LAM, M. L. BEIBOER, G. BENEDICTUS, A. BRAND (1999): Management practices associated with the incidence rate of clinical mastitis. J. Dairy Sci. 82, 1643– 1644.

BARTLETT, J. M., S. D. STIRLING (2003): A short history of the polymerase chain reaction. Methods Mol. Biol. 226, 3-6.

BASEGGIO, N., P. D. MANSELL, J. W. BROWNING, G. F. BROWNING (1997): Strain differentiation of isolates of streptococci from bovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis. Mol. Cell Probes 11, 349–354.

BEACHEY, E. H., I. OFEK (1976): Epithelial cell binding of group A streptococci by lipoteichoic acid on fimbriae denuded of M protein. J. Exp. Med. 143, 759–771.

BEALL, B., R., FACKLAM, T., THOMPSON (1996): Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. J. Clin. Microbiol. 34, 953-958.

BEDEKOVIĆ, T., N. LEMO, LJ. BARBIĆ, Ž. CVETNIĆ, I. LOJKIĆ, M. BENIĆ, Ž. ČAČ, M. LOJKIĆ, J. MADIĆ (2013): Influence of category, herd size, grazing and management on epidemiology of bovine viral diarrhoea in dairy herds. Acta Vet. Brno 82, 125-130.

BEGOVAC, J., D. BOŽINOVIĆ, M. LISIĆ, B. BARIŠIĆ, S. SCHOENWALD (2006): Infektologija. Profil international, Zagreb, str. 566– 588.

BEHNKE, D., J. J. FERRETTI (1980): Molecular cloning o fan erythromycin resistance determinant in streptococci. J. Bact. 144, 806-813.

BEIGHTON, D., J. M. HARDIE, R. A. WHILEY (1991): A scheme for the identification of viridans streptococci. J. Med. Microbiol. 35, 367-372.

BENIĆ, M., B. HABRUN, G. KOMPES, Ž. MIHALJEVIĆ, Ž. CVETNIĆ, M. BRSTILO, M. CERGOLJ, N. MAĆEŠIĆ (2012): The association of milk cell subsets with management and physiological factors in cows with a natural streptococcal udder infection. Milchwissenschaft 67, 296-299.

BENIĆ, M., B. HABRUN, G. KOMPES, Ž. MIHALJEVIĆ, Ž. CVETNIĆ, M. CERGOLJ (2012): Cell content in milk from cows with S. aureus intramammary infection. Vet. arhiv 82, 411-422.

BENIĆ, M., N. MAĆEŠIĆ, L. CVETNIĆ, B. HABRUN, Ž. CVETNIĆ, R. TURK, D. ĐURIČIĆ, M. LOJKIĆ, V. DOBRANIĆ, VESNA, H. VALPOTIĆ, J. GRIZELJ, D. GRAČNER, J. GRBAVAC, M. SAMARDŽIJA (2018): Bovine mastitis: a persistent

and evolving problem requiring novel approaches for its control - a review. Vet. arhiv 88, 535-557.

BERARDI, A., L. LUGLI, D. BARONCIANI, R. CRETI, K. ROSSI, M. CICCIA, L. GAMBINI, S. MARIANI, I. PAPA, L. SERRA, E. TRIDAPALLI, F. FERRARI (2007): Group B streptococcal infections in a northern region of Italy. Pediatrics 120, 487–493.

BILANDŽIĆ, N., M. ĐOKIĆ, M. SEDAK, B. SOLOMUN, I. VARENINA, Z. KNEŽEVIĆ, M. BENIĆ (2011): Trace element levels in raw milk from northern and southern regions of Croatia. Food chem. 127, 63-66.

BISHARAT, N., D. W. CROOK, J. LEIGH, R. M. HARDING, P. N. WARD, T. J. COFFEY, M. C. MAIDEN, T. PETO, N. JONES (2004): Hyperinvasive neonatal group B streptococcus has arisen from a bovine ancestor. J. Clin. Microbiol. 42, 2161–2167.

BISHOP, C. J. (2009): Assigning strains to bacterial species via the internet. BMC Biol. 7, 3.

BISNO, A. L., M. O . BRITO, C. M. COLLINS (2003): Molecular basic of group A streptococcal virulence. Lancet. Infect. Dis. 3, 191-200.

BLUM, S., D. ELAD, N. ZUKIN, I. LYSNYANSKY, L. WEISBLITH, S. PERL, O. NETANEL, D., DAVID (2010): Outbreak of Streptococcus equi subsp. zooepidemicus infections in cats. Vet. Microbiol. 144, 236-239.

BOREK, A. L., K. OBSZANSKA, W. HRYNIEWICZ, I. SITKIEWICZ (2012): Typing of Streptococcus pyogenes strains using the phage profiling method. Virulence 6, 534-538.

BOTREL, M. A., M. HAENNI, E. MORIGNAT, P. SULPICE, J. Y. MADEC, D. CALAVAS (2010): Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France. Foodborne Pathog. Dis. 7, 479-87.

BOYLE, A. G., J. F. TIMONEY, J. R. NEWTON, M. T. HINES, A. S. WALLER, B. R., BUCHANAN (2018): Streptococcus equi Infections in Horses: Guidelines for

Treatment, Control, and Prevention of Strangles—Revised Consensus Statement. J. Vet. Intern. Med. 32, 633-647.

BRADLEY, A. J. (2002): Bovine mastitis: An evolving disease. Vet. J. 164, 116-128.

BRADLEY, A. J., K. A. LEACH, J. E. BREEN, L. E. GREEN, M. J. GREEN (2007): Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Vet Rec. 160, 253-7.

BRAMLEY, A. J. (1984): Streptococcus uberis udder infection – a major barrier to reducing mastitis incidence. Br. Vet. J. 140, 328–335.

BRAMLEY, A. J., F. H. DODD (1984) : Reviews on progress of dairy science: mastitis control - progress of dairy science and prospects. J. Dairy Res. 51, 481-512.

BROCHET, M., E. COUVÉ, M. ZOUINE, T. VALLAEYS, C. RUSNIOK, M. C. LAMY, , C. BUCHRIESER, F. TRIEU-CUOT, C. POYART, P. GLASER (2006): Genomic diversity and evolution within the species Streptococcus agalactiae. Microbes Infect. 8, 1227-1243.

CANTU, A. (2014): Rates of evolution and point mutations of bacterial plant pathogens compared to bacterial vertebrate pathogens. Disertation. The University of Texas. Texas. USA.

CARAPETIS, J. R., A. C. STEER , E. K. MULHOLLAND, M. WEBER (2005): The global burden of group A streptococcal diseases. Lancet. Infect. Dis. 5, 685-94.

CARDENAS, E., J. M. TIEDJE (2008): New tools for discovering and characterizing microbial diversity. Curr. Opin. Biotech. 19, 544-549.

CARVALHO-CASTRO, G. A., J. R SILVA, L. V. PAIVA, D. A. C. CUSTODIO, R. O. MOREIRA, G. F. MIAN, I. A. PRADO, A. CHALFUN-JUNIOR, G. M. COSTA (2017): Molecular epidemiology of Streptococcus agalactiae isolated from mastitis in Brazilian dairy herds. Braz. J. Microbiol. 48, 551–559.

CERVINKOVA, D., H. VLKOVA, I. BORODACOVA, J. MAKOVCOVA, V. BABAK, A. LORENCOVA, I. VRTKOVA, D. MAROSEVIC, Z. JAGLIC (2013). Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. Vet. Med. 58, 567–575.

CHALMERS, G., J. MCLEAN, D. B. HUNTER, M. BRASH, D. SLAVIC, D. L. PEARL (2015): Staphylococcus spp., Streptococcus canis and Arcanobacterium phocae healthy Canadian farmed mink and mink with pododermatitis. J. Vet. Res. 79, 129–135.

CHEN SWAINE, L. (2019): Genomic Insights Into the Distribution and Evolution of Group B Streptococcus. Front. Microbiol. 10, 1447.

CHÉNIER, S., M. LECLÈRE, S. MESSIER, G. FECTEAU (2008): Streptococcus dysgalactiae cellulitis and toxic shock like syndrome in a brown swiss cow. J. Vet. Diagn. Invest. 20, 99–103.

CHUANG, Y., Y. C. HUANG, T. Y. LIN (2005): Toxic shock syndrome in children: epidemiology, pathogenesis, and mangement. Paediatr. Drugs 7, 11-25.

CLEARY, P., U. PRABU, J. DALE, D. WEXLER, J. HANDLEY (1992): Streptococcal C5a pepetidase is ahigh specific endopeptidase. Infect. Immuno. 60, 5219-5223.

COBO-ÁNGEL, C., A. S. JARAMILLO-JARAMILLO, L. M. LASSO-ROJAS, S. B. AGUILAR-MARIN, J. SANCHEZ, J. C. RODRIGUEZ-LECOMPTE, A. CEBALLOS-MÁRQUEZ, R. N. ZADOKS (2018): Streptococcus agalactiae is not always an obligate intramammary pathogen: Molecular epidemiology of GBS from milk, feces and environment in Colombian dairy herds (Open Access) PLoS ONE, 13.

COFFEY, T. J. G. D. PULLINGER, R. URWIN, K. A. JOLLEY, S. M. WILSON, M. C. MAIDEM, J. A. LEIGH (2006): First insights into the evolution of Streptococcus uberis: a multilocus sequence typing scheme that enables investigation of its population biology. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1420-1428.

COPOLA, S., G. BLAIOTTA, D. ERCOLINI (2008): Dairy Products. U: Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods (Cocolin, L., D. Ercolini, ur.). Springer-Verlag. New York, str. 31-90.

COURTNEY, H. S., R. J. DOYLE, I. OFEK, D. L. HASTY (1992): Multiple adhesins of Streptococci. Infect. Immun. 60, 2147-2152.

COURTNEY, H. S., Y. LI, J. B. DALE, D. L. HASTY (1994): Cloning, sequencing, and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein group A streptococci. Infect. Immun. 62, 3937–3946.

CROUCHER, N. J., S. R. HARRIS, C. FRASER (2011): Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. Pub. Med. Sci. 331, 430-4.

CUNNINGHAM, M. W. (2000): Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. Clin. Microbiol. Rev. 13, 470-511.

CVETNIĆ, L., M. BENIĆ, B. HABRUN, G. KOMPES, M. STEPANIĆ, M., SAMARDŽIJA (2016): Pojava i suzbijanje mastitisa na farmi mliječnih krava-prikaz slučaja. Vet. Stn. 47, 387-394.

CVETNIĆ, L., M. SAMARDŽIJA, B. HABRUN, G. KOMPES, M. BENIĆ (2016): Microbiological monitoring of mastitis pathogens in the control of udder health in dairy cows. Slov. Vet. Res. 53, 131-140.

DALE, J. B. (2000): Multivalent Group A Streptococcal Vaccines. U: Streptococcal infections: clinical aspects, microbiology and molecular pathogenesis (Stevens, D. L., E. L. Kaplan, ur.). Oxford Univerity Press. New York, str. 390-433.

DALEY, P., D. L. CHURCH, D. B. GREGSON, S. ELSAYED (2005): Species-level molecular identification of invasive "*Streptococcus milleri*" group clinical isolates by nucleic acid sequencing in a centralized regional microbiology laboratory. J. Clin. Microbiol. 43, 2987-2988.

DAVIES, P. L., J. A. LEIGH, A. J. BRADLEY, S. C. ARCHER, R. D. EMES, M. J. GREEN (2016): Molecular epidemiology of Streptococcus uberis clinical mastitis in dairy herds: strain heterogeneity and transmission. J. Clin. Microbiol. 54, 68–74.

DELANNOY, C. M., M. CRUMLISH, M. C. FONTAINE, J. POLLOCK, J. FOSTER, M. P. DAGLEISH, J. F. TURNBULL, R. N. ZADOKS (2013): Human Streptococcus agalactiae strains in aquatic mammals and fish. BMC Microbiol. 13, 41.

DENNY, FW. JR (2000): History of hemolytic streptococci and associated diseases, U: Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular

Pathogenesis (Stevens, D. L., E. L. Kaplan, ur.), Oxford University Press, New York. str. 1-18.

DEVRIESE, L. A., J. HOMMEZ, R. KILPPER-BALZ, K. H. SCHLEIFER. (1986): Streptococcus canis sp. nov.: a species of group G streptococci from animals. Int. J. Syst. Bacteriol. 36, 422–425.

DIERNHOFER, K. (1932): Aesculinbouillon als holfsmittel fur die differenzierung von euter- und milchstreptokokken bei massenuntersuchungen. Milchwirtsch. Forsch. 13, 368-374.

DRANCOURT, M., V. ROUX, P. E. FOURNIER, D. RAOULT (2004): rpoB gene sequence-based identification of aerobic gram-positive cocci of the genera Streptococcus, Enterococcus, Gemella, Abiotrophia, and Granulicatella. J. Clin. Microbiol. 42, 497-504.

DUARTE, C.M., P. P. FREITAS, R. BEXIGA (2015): Technological advances in bovine mastitis diagnosis: An overview J. Vet. Diagn. Invest. 27, 665-672.

EBERHART, R. J., S. B. GUSS (1970): Group G streptococci in the udders of a Pennsylvania dairy herd. J. Am. Vet. Med. Assoc. 157, 1195–1199.

EDWARDS, U., T. ROGALL, H. BLOCKER, M. EMDE, E. C. BOTTGER (1989): Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 17, 7843–7853.

ENRIGHT, M. C., B. G. SPRATT, A. KALIA, J. H. CROSS, D. E. BESSEN (2001): Multilocus sequence typing ofStreptococcus pyogenes and the relationship between emm type and clone. Infect. Immun. 69, 2416-2427.

ESTUNINGSIH, S., I. SOEDARMANTO, K. FINK, C. LÄMMLER, I. W. T. WIBAWAN (2002): Studies on Streptococcus agalactiae isolated from bovine mastitis in Indonesia. J. Vet. Med. B 49, 185-187.

FABRE, A., G. BALAKISHIYEVA, I. EMBER, A. OMAR, Z. ACS, M. KOLBER, L. KAUZNER, M. DELLA BARTOLA, J. L. DANET, X. FOISSAC (2011): StAMP

encoding the antigenic membrane protein of stolbur phytoplasma is useful for molecular epidemiology. Bull. Insectology. 64, 21-22.

FACKLAM, R. (2002): What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin. Microbiol. Rev. 15, 613-30.

FARROW J. A. E., M. D. COLLINS (1984): Taxonomic studies on streptococci of serological groups C, G and L and possibly related taxa. Syst. Appl. Microbiol. 5, 483-493.

FERRETTI, J. J., W. M. MCSHAN, D. AJDIC, D. J. SAVIC, G. SAVIC, K. LYON (2001): Complete genome sequence of an M1 strain of Streptococcus pyogenes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 98, str. 4658–4663.

FERRETTI, J., W. KÖHLER (2016): History of Streptococcal Research. U: Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations (Ferretti, J. J., D. L. Stevens, V. A. Fischetti, Ur.) Oklahoma City, University of Oklahoma Health Sciences Center, Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK333430/

FISCHETTI, V. A. (2000): Protection Against Group A Streptococcal Infection. 19, 371-389.

FLEISCHMANN, R. D., M. D. ADAMS, O. WHITE, R. A. CLAYTON, E. F. KIRKNESS, A. R. KERLAVAGE (1995): Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. Science 269, 496–512.

FLEMING, A. (1928): On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. Bull. World Health Organ. 79, 780–90.

FORSMAN, P., A. TILSALA-TIMISJARVI, T. ALATOSSAVA (1997): Dentification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. Microbiology 143, 3491-3500.

FORTIN, M., S. MESSIER, J. PARÉ, R. HIGGINS (2003): Identification of catalase-negative, non-beta-haemolytic, gram-positive cocci isolated from milk samples. J. Clin. Microbiol. 41, 106-109.

FOX, L. K., J. M. GAY (1993): Contagious mastitis. Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract., 9, 475–487.

FRIEDERICHS, J., S. HUNGERER ,R. WERLE, M. MILITZ, V. BÜHREN (2010): Human bacterial arthritis caused by Streptococcus zooepidemicus: report of a case. Int. J. Infect. Dis. Suppl. 3, 233-235.

GAJIĆ, V. I. (2014): Fenotipska i genotipska karakterizacija i klonska povezanost faringealnih izolata streptokoka grupe a rezistentnih na makrolide u Srbiji. Doktorska disertacija. Medicinski Univerzitet u Beogradu. Beograd. Srbija.

GARNIER, F., G. GERBAUD, P. COURVALIN, M. GALIMAND (1997): Identification of clinically relevant viridans group streptococci to the species level by PCR. J. Clin. Microbiol. 35, 2337–2341.

GASE, K., J. J. FERRETTI, C. PRIMEAUX, W. M. MCSHAN (1999): Identification, cloning and expression of the CAMP-factor gene (cfa) of group A streptococci. Infect. Immun. 67, 4725–4731.

GILLESPIE, B. E., B. M. JAYARAO, S. P. OLIVER (1997): Identification of Streptococcus species by randomly amplified polymorphic deoxyribonucleic acid fingerprinting. J. Dairy Sci. 80, 471–476.

GORIS, J., K. Z. KONSTANTINIDIS, J. A. KLAPPENBACH, T. COENYE, P. VANDAMME, J. M. TIEDJE (2007): DNA-DNA hybriditazion values and their relationship to whole genome sequence similarities. Int. J. Sys. Evol. Microbiol. 57, 81-91.

GRIFFITH, F. (1934): The serological classification of S. pyogenes. J. Hyg. 34, 542-584.

GROSCHUP, M. H., G. HAHN, J. F. TIMONEY (1991): Antigenic and genetic homogeneity of Streptococcus uberis strains from the bovine udder. Epidemiol. Infect. 107, 297–310.

HAANPERA, M., J. JALAVA, P. HUOVINEN, O. MEURMAN, K. RANTAKOKKO-JALAVA (2007): Identification of Alpha-Hemolytic Streptococci by the 16S rRNA Gene and by Use of VITEK 2. J. Clin. Microbiol. 45, 762-770.

HAAS, E. S., J. W. BROWN (1998): Evolutionary variation in bacterial RNase P RNAs. Nucleic Acids Res. 26, 4093–4099.

HABRUN, B., G. KOMPES, T. KIŠ, I. LOHMAN JANKOVIĆ (2015): Antimikrobna rezistencija u veterinarskoj medicini: nastanak i značaj. Zbornik sažetaka Veterinarska znanost i struka 2015. 1. – 2. listopad 2015., Zagreb, Hrvatska. 15-20.

HAGIWARA, H., R. TAKANO, M. NOGUCHI, M. NARITA (2009): A study of the lesions induced in Seriola dumerili by intradermal or intraperitoneal injection of Streptococcus dysgalactiae. J. Comp. Pathol. 140, 25–30.

HARDIE, J. M., R. A. WHILEY (1995): The genus Streptococcus. U: The Genera of Lactic Acid Bacteria. The Lactic Acid Bacteria (Wood, B. J. B., W. H. Holzapfel, ur.), vol 2. Springer, Boston, MA, str. 448-460.

HARIHARAN, H., V. MATTHEW, J. FOUNTAIN, A. SNELL, D. DOHERTY, B. KING (2011): Aerobic bacteria from mucous membranes, ear canals, and skin wounds of feral cats in Grenada, and the antimicrobial drug susceptibility of major isolates Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 34, 129–134.

HARRINGTON, D., J. SUTCLIFFE, I. C. N. CHANTER (2002).:The molecular basis of Streptococcus equi infection and disease. Microb. Infect. 4, 501-510.

HASSAN, A. A., A. ABDULMAWJOOD, A. Ö. YILDIRIM, K. FINK, C. LÄMMLER, R. SCHLENSTEDT (2000): Identification of streptococci isolated from various sources by determination of cfb gene and other CAMP-factor genes. Can. J. Microbiol. 46, 946–951.

HASSAN, A. A., Ö. AKINEDEN, C. LÄMMLER, R. HUBER-SCHLENSTEDT (2002): Molecular characterization of phenotypically CAMP-negative Streptococcus agalactiae from bovine mastitis. J. Vet. Med. B 49, 257–259.

HASSAN, A. A., O. AKINEDEN, E USLEBER (2005): Identification of Streptococcus canis Isolated from Milk of Dairy Cows with Subclinical Mastitis. J. Clin. Microbiol. 43, 1234–1238.

HILLMANN, J. D., S. W. ANDREWS, S. PAINTER, P. STASHENKO (1989): Adaptive changes in a strain of Streptococcus mutans during colonization of the human oral cavity. Microb. Ecol. Health Dis. 2, 231-239.

HOGAN, J. S., K. L. SMITH (1992): Creating a quality environment: bedding. Proceedings of National Mastitis Council, 23-25 January. Madison, Wisconsin, str. 201-203.

HUGHES, J. (1999): Bedding systems and mastitis. Proceedings of British Mastitis Conference, 8 October. Stoneleight, Great Britain, str. 73-78.

HUYNH, B. H., B. A. FOGARTY, P. NANDI, S. M. LUNTE (2006): A microchip electrophoresis device with on-line microdialysis sampling and on-chip sample derivatization by naphthalene 2,3-dicarboxaldehyde/2-mercaptoethanol for amino acid and peptide analysis. J. Pharm. Biomed. Anal. 42, 529-534.

IVIĆ, I. (2011): Promjenjiva priroda bolesti uzrokovanih streptokokom grupe A. Paediatr. Croat. 55, 20-27.

JACOBS, J. A., C. S SCHOT, A. E. BUNSCHOTEN, L. M. SCHOULS (1996): Rapid species identification of ‘‘Streptococcus milleri’’ strainsby line blot hybridization: identification of a distinct 16S rRNA population closely related to Streptococcus constellatus. J. Clin. Microbiol. 34, 1717-1721.

JENSEN, A, K. MOGENS (2011): Delineation of Streptococcus dysgalactiae, Its Subspecies, and Its Clinical and hylogenetic Relationship to Streptococcus pyogenes. J. Clin. Microbiol. 50, 113-126.

JIANG, M., L. A. BABIUK, A. A. POTTER (1996): Cloning, sequencing and expression of the CAMP-factor gene of Streptococcus uberis. Microb. Path. 20, 297–307.

KALENIĆ, S. (2000): Rezistencija bakterija na antibiotike. Medicus. 9, 149-153.

KÄPPELI, N., M., MORACH, K., ZURFLUH, S., CORTI, M., NUESCH-INDERBINEN, R., STEPHAN (2019): Sequence Types and Antimicrobial Resistance Profiles of Streptococcus uberis Isolated From Bovine Mastitis. Front. Vet. Sci. 6, 234.

KAPUR, V., J. T. MAFFEI, R. GREER, S. LILL, G. J. ADAMS, J. M., MUSSER (1994): Vaccination with streptococcal extracellular cysteine protease (interleukin-1 beta convertase) protects mice against challenge with heterologous group A streptococci. Microb. Pathog. 16, 443-450.

KATHOLM, J., T. W. BENNEDSGAARD, M. T. KOSKINEN, E. RATTENBORG (2012): Quality of bulk tank milk samples from Danish dairy herds based on real-time polymerase chain reaction identification of mastitis pathogens. J. Dairy Sci. 95, 5702–5708.

KAUFHOLD, A., A. PODBIELSKI, G. BAUMGARTEN, M. BLOKPOEL, J. TOP, L. SCHOULS (1994): Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes. FEMS Microbiol. Lett. 119, 19-26.

KE, D., C. MENARD, F. J. PICARD, M. BOISSINOT, M. OUELLETTE, P. H. ROY, M. G. BERGERON (2000): Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. Clin. Chem. 46, 324–331.

KEEFE, G. P. (1997): Streptococcus agalactiae mastitis: a review. Can. Vet. J. 38, 429-437.

KEROS, T., L. JEMERŠIĆ, J. PRPIĆ, M. BENIĆ, B. ROIĆ, D., BRNIĆ (2013): Genetic variability of microsatellites in autochthonous Podolian cattle breeds in Croatia. Acta Vet. Brno 82, 135-140.

KHAN, UL-HAQ I. (2002): Identification and Further Characterization of Streptococcus uberis and Streptococcus parauberis Isolated from Bovine Milk Samples. Dissertation. Faculty of Veterinary Medicine Justus-Liebig-University, Giessen Germany.

KIKUCHI, K., T. ENARI, K. TOTSUKA, K. SHIMIZU (1995): Comparison of phenotypic characteristics, DNA-DNA hybridization results, and results with a commercial rapid biochemical and enzymatic reaction system for identification of viridans group streptococci. J. Clin. Microbiol. 33, 1215-1222.

KROMKER, V., F. REINECKE, J. H. PADUCH, N. GRABOWSKI (2014): Bovine Streptococcus uberis Intramammary Infections and Mastitis. Clin. Microbial. 3, 157.

KUCHTA, T., H. DRAHOVSKA, D. PANGALLO, P. SIEKEL (2006): Application of Polymerase Chain Reaction to Food Analysis. VUP Food Research Institute, Bratislava, Slovakia, str. 13-24.

LACASTA, D., L. M. FERRER, J. J. RAMOS, A. LOSTE, J. P. BUESO (2008): Digestive pathway of infection in Streptococcus dysgalactiae polyarthritis in lambs. Small Rumin. Res. 78, 202–205.

LAM, M. M., J. E. CLARRIDGE 3RD, E. J. YOUNG, S. MIZUKI (2007): The other group G Streptococcus: Increased detection of Streptococcus canis ulcer infections in dog owners. J. Clin. Microbiol. 45, 2327–2329.

LANCEFIELD, R. C. (1928): Variants of hemolytic Streptococci; their relation to type-specific substance, virulence, and toyin. J. Exp. Med. 48, 751-767.

LANCEFIELD, R. C. (1933): A serological differentiation of human and other groups of streptococci. J. Exp. Med. 59, 441–158.

LAWRENCE, J., D. M. YAJKO D. W. K. HADLEY (1985): Incidence and characterization of beta-hemolytic Streptococcus milleri and differentiation from S. pyogenes (group A), S. equisimilis (group C), and large-colony group G streptococci. J. Clin. Microbiol. 22, 772-777.

LEELAHAPONGSATHON, K., Y. H., SCHUKKEN, T. PINYOPUMMINTR, W. SURIYASATHAPORN (2016): Comparison of Transmission Dynamics Between Streptococcus Uberis and Streptococcus Agalactiae Intramammary Infections. J. Milk Sci. 99, 1418–1426.

LEIGH, J. A (1999): Streptococcus uberis: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? Vet. J. 157, 225–238.

LESKOVEC, P., D. BENDELJA LJOLJIĆ, M. BENIĆ, A. KOSTELIĆ, Ž. CVETNIĆ, A. ANTUNAC (2015): Osjetljivost izdvojenih uzročnika mastitisa prema antimikrobnim tvarima. Mljekarstvo. 65, 149-158.

LOPPIN, E., A. FERGUSON (2009): Gram-positive toxic shock syndromes. Lancet. Infect. Dis. 9, 281-90.

LUKOMSKI, S. C., A. MONTGOMERY, J. RURANGIRWA, R. S. GESKE, J. P. BARRISH, G. J. ADAMS, J. M. MUSSER (1999): Extracellular cysteine protease produced by S. pyogenes participates in the pathogenesis of invasive skin inf. And dissemination in mice. Inf. Imm. 67, 1779-1788.

LUNDBERG, A., A. K. NYMAN, A. ASPAN, S. BORJESSON, H. E. UNNERSTAD, K. P. WALLER (2016): Udder infections with Staphylococcus aureus, Streptococcus dysgalactiae, and Streptococcus uberis at calving in dairy herds with suboptimal udder health. J. Dairy Sci. 99, 2102-2117.

LUNDBERG, A., A., NYMAN, H. E., UNNERSTAD, K. P., WALLER (2014): Prevalence of bacterial genotypes and outcome of bovine clinical mastitis due to Streptococcus dysgalactiae and Streptococcusube ris. Acta. Vet. Scand. 56, 80-86.

LYHS, U., L. KULKAS, J. KATHOLM, K. P. WALLER, K. SAHA, R. J. TOMUSK, R. N. ZADOKS.(2016): Streptococcus agalactiae Serotype IV in Humans and Cattle, Northern Europe. Emerg. Infect. Dis. 22, 2097-2103.

MAĆEŠIĆ, N. (2010): Učinkovitost pojedinih metoda zasušivanja krava. Doktorska disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb. Hrvatska.

MAĆEŠIĆ, N., G. BAČIĆ, K. BOŽIČEVIĆ, M. BENIĆ, T. KARADJOLE, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, M. LOJKIĆ, M. EFENDIĆ, I. BAČIĆ, M. PAVLAK (2016): Assessment of the Zagreb mastitis test in diagnosis of mastitis in dairy cattle. Vet. arhiv 86, 475-485.

MAĆEŠIĆ, N., T., KARADJOLE, G., BAČIĆ, M., BENIĆ, M., KARADJOLE, S., VINCE, M., LIPAR, M., CERGOLJ (2012): Aetiology and prevalence of bovine intramammary infection at drying off. Vet arhiv 82, 125-131.

MADDEN, J. C., N. RUIZ, M. CAPARON (2001): Cytolisin-mediated translocation a func. Equivalent of type 3 secretion in grampositive bacteria. Cell 104, 143-152.

MAGAŠ, V. (2012): Priprema, ispitivanje imunogenosti i ocena efikasnosti vakcine u profilaksi nastanka mastitisa kod krava. Doktorska disertacija. Veterinarski fakultet Univerziteta u Beogradu. Beograd, Srbija.

MAIDEN M. C. J., J. A. BYGRAVES, E. FEIL, G. MORELLI, J. E. RUSSEL, R. URWIN, Q. ZHANG, J. ZHOU, K. ZURTH, D. A. CAUGANT, I. M. FEAVERS, M. ACHTMAN, B. G. SPRATT (1998): Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Nat. Acad .Sci. USA. 95, 3140–3145.

MALKE, H., J. J., FERRETTI (1984): Streptokinase:cloning,expression,and excretion by E. coli. Proc. Nat. Acad .Sci. USA. 81, 3557-3561.

MANCINI, A., C. LAZZI, V. BERNINI, E. NEVIANI, M. GATTI (2012): Identification of dairy lactic acid bacteria by tRNAAla-23S rDNA RFLP. J. Microbiol. Methods 91, 380-390.

MANDELL, G. L., J. E. BENNETT, R. DOLIN (1995): Mandell, Douglas and Bennetts Principles and Practice of Infectious, 4th ed., Churchill Livingstone, New York. str. 2916.

MANNING, S. D., A. C. SPRINGMAN, A. D. MILLION, N. R. MILTON, S. E. MCNAMARA, P. A. SOMSEL, P. BARTLETT, H. D. DAVIES (2010): Association of Group B Streptococcus colonization and bovine exposure: A prospective cross-sectional cohort study. PLoS One. 5, e8795.

MARTIN, D. R., L. A. SINGLE (1993): Molecular epidemiology of group A streptococcus M type 1 infections. J. Infect. Dis. 167, 1112–1117.

MATTHEWS, K. R., S. P. OLIVER (1993): Encapsulation of streptococci isolated from bovine milk. Zentralbl. Veterinarmed. B 40, 597-602.

MCDONALD, W. L., B. N. FRY, M. A. DEIGHTON (2005): Identification of Streptococcus spp. causing bovine mastitis by PCR–RFLP of 16S–23S ribosomal DNA. Vet. Microbiol. 111, 241–246.

McDOUGALL, S., T. J. PARKINSON, M. LEYLAND, F. M. ANNISS, S. G. FENWICK (2004): Duration of infection and strain variation in Streptococcus uberis isolated from cows milk. J. Dairy Sci. 87, 2062-2072.

MILJKOVIĆ-SELIMOVIĆ, B., B. KOCIĆ, T. BABIĆ, LJ. RISTIĆ (2009): Bacterial typing methods. Acta Fac. Med. Naiss. 26, 225-233.

MORROW, B. L., R. MCNATT, L. JOYCE, S. MCBRIDE, D. MORGAN, C. TRESSLER (2016): Highly pathogenic beta-hemolytic streptococcal infections in cats from an institutionalized hoarding facility and a multi-species comparison. J. Feline Med. Sitrg. 18, 318–327.

MUFTIĆ, A., Z. MAKSIMOVIĆ, M. RIFATBEGOVIĆ (2019): Etiologija mastitisa u Bosni i Hercegovini. Veterinaria 68, 17-20.

MURRAY, P. R., E. J. BARON, J. H. JORGENSEN, M. L. LANDRY, M. A. PFALLER (2007): Manual of Clinical Microbiology, 9. izdanje., ASM Press, Oxford, UK, str., 2256.

MWEU, M. M., S. S. NIELSEN, T. HALASA, N. TOFT (2012): Annual incidence, prevalence and transmission characteristics of Streptococcus agalactiae in Danish dairy herds. Prev. Vet. Med. 106, 244–250.

NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ, LJ. PINTER (2005): Veterinarska mikrobiologija, 1. izdanje. Zrinski d.d., Čakovec, Zagreb, str.,19-29.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL (2017): Laboratory handbook on bovine mastitis 3. izdanje. National Mastitis Council, Verona, Wisconsin, USA. str. 27-54.

NEWTON, J. R., R. LAXTON, J. WOOD, L. CHANTER (2008): Molecular epidemiology of Streptococcus zooepidemicus infection in naturally occurring equine respiratory disease. Vet. J. 175, 338-345.

NOCARD, M., R. MOLLEREAU (1887): Sur Une Mammite Contagieuse Des Vaches Laitieres. Ann. Inst. Pastir 1, 109.

NOLL, L. W., C. P. A. STOY, Y. WANG, E. G. PORTER, N. LU, X. LIU, A. BURKLUND, L. PEDDIREDDI, G. HANZLICEK, J. HENNINGSON, M. M. CHENGAPPA, J. BAI (2020): Development of a nested PCR assay for detection of S. equi subsp.equi in clinical equine specimens and comparison with a qPCR assay. J. Microbiol. Methods 172, 105887.

ODIERNO, L., L. CALVINHO, P. TRAVERSSA, M. LASAGNO, C. BOGNI, E. REINOSO (2006): Conventional identification of Streptococcus uberis isolated from bovine mastitis in Argentinean dairy herds J. Dairy Sci., 89, 3886-3890.

OLDE RIEKERINK, R. G., H. W. BARKEMA, D. F. KELTON, D. T. SCHOLL (2008): Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. J. Dairy Sci. 91, 1366–1377.

OLIVE, C., K. SCHULZE, H. K. SUN, T. EBENSEN, A. HORVATH, I. TOTH, C. A. GUZMAN (2007): Enhanced protection against Streptococcus pyogenes infection by intranasal vaccination with a dual antigen component M protein/SfbI lipid core peptide vaccine formulation. Vaccine. 25, 1789-1797.

OLIVER, S. P., B. E. GILLESPIE, B. M. JAYARAO (1998): Detection of new and persistent Streptococcus uberis and Streptococcus dysgalactiae intramammary infections by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. FEMS Microbiol. Lett. 160, 69–73.

PANG, M., L. SUN, T. HE, H. BAO, L. ZHANG, Y. ZHOU, H. ZHANG, R. WEI, Y. LIU, R. WANG (2019): Molecular and virulence characterization of highly prevalent Streptococcus agalactiae circulated im bovine dairy herds. Vet. Res. 48, 65.

PEELER, E. J., M. J. GREEN, J. L. FITZPATRICK, K. L. MORGAN, L. E. GREEN (2000): Risk factors associated with clinical mastitis in low somatic cell count British dairy herds. J. Dairy Sci. 83, 2464 –2472.

PEREIRA, U. P., G. F. MIAN, I. C. OLIVEIRA, L. C. BENCHETRIT, G. M. COSTA, H. C. P. FIGUEIREDO (2010): Genotyping of Streptococcus agalactiae strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. Vet. Microbiol. 140, 186–192.

PHUEKTES, P., P. D. MANSELL, R. S. DYSON, N. D. HOOPER, J. S. DICK, G. F. BROWNING (2001): Molecular epidemiology of Streptococcus uberis isolates from dairy cows with mastitis. J. Clin. Microbiol. 39, 1460–1466.

PILKA, E. S. (2002): Studies of interactions of staphylococcal and streptococcal peptides with a type- I module pair of human fibronectin. Oxford University Research Archive. https://ora.ox.ac.uk/objects/uuid:23556ec6-fb6a-47a6-892b-15a9d00cc860 [online]. Pristup: 15. svibnja 2019.

PINHO, M. D., G. FOSTER, C. POMBA, M. P. MACHADO, J. L. BAILY, T. KUIKEN, J. M. CRISTINO, M. RAMIREZ and Portuguese Group for the Study of Streptococcal

Infections (2019): S. canis are a single population infecting multiple animal hosts despite the diversity of the universally present M-like protein SCM. Front Microbiol. 10, 631.

PINHO, M. D., S. C. MATOS, C. POMBA, A. LÜBKE-BECKER, L. H. WIELER, S. PREZIUSO (2013): Multilocus sequence analysis of Streptococcus canis confirms the zoonotic origin of human infections and reveals genetic exchange with Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis. J. Clin. Microbiol. 51, 1099–1109.

PINTARIĆ, S., B. ŠEOL MARTINEC, (2018): Rezistencija enterokoka na antibiotike i preporuke za liječenje. Vet. stn. 49, 105-116.

PODBIELSKI, A., O. BLANKENSTEIN, R. LÜTTICKEN (1994): Molecular characterization of the cfb gene encoding group B streptococcal CAMP-factor. Med. Microbiol. Immunol. 183, 239–256.

POGAČIĆ, T., S. ŠINKO, Š. ZAMBERLIN, D. SAMARDŽIJA (2013): Mikrobni sastav kefirnih zrna. Mljekarstvo 63, 3-14.

POUTREL, B., S. BAREILLE, G. LEQUEUX, F. LEBOEUF (2018): Prevalence of Mastitis Pathogens in France: Antimicrobial Susceptibility of Staphylococcus aureus, Streptococccus uberis and Escherichia coli. J. Vet. Sci. Technol. 9, 2.

POYART, C., G. QUESNE, S. COULON, P. BERCHE, P. TRIEU-CUOT (1998): Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. J. Clin. Microbiol. 36, 41-47.

PRATO, R., S. TAFURI, F. FORTUNATO, D. MARTINELLI (2010): Why it is still important that countries know the burden of pneumococcal disease. Hum. Vaccin. 6, 918─921.

PRICE, C. E., A. ZEYNIYEV, O. P. KUIPERS, J. KOK (2012): From meadows to milk to mucosa-adaptation of Streptococcus and Lactococcus species to their nutritional environments. FEMS Microbiol. Rev. 36, 949-971.

PRYOR, S. M., R. T. CURSONS, J. H. WILLIAMSON, S. J. LACY-HULBERT (2009): Experimentally induced intramammary infection with multiple strains of Streptococcus uberis. J. Dairy Sci. 92, 5467-5475.

PULLINGER, G. D., M. LÓPEZ-BENAVIDES, T. J. COFFEY, J. H. WILLIAMSON, R. T. CURSONS, E. SUMMERS, J. LACY-HULBERT, M. C. MAIDEN, J. A. LEIGH (2006a): Application of Streptococcus uberis multilocus sequence typing: analysis of the population structure detected among environmental and bovine isolates from New Zealand and the United Kingdom. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1429-1436.

PULLINGER, G. D., T. J. COFFEY, M. C. MAIDEN, J. A. LEIGH (2007): Multilocus-sequence typing analysis reveals similar populations of Streptococcus uberis are responsible for bovine intramammary infections of short and long duration. Vet. Microbiol. 119, 194-204.

RADOSTITS, O. M., C. C. GAY, D. C. BLOOD, W. HINCHCLIFFK (2000): Veterinary Medicine. Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses. 9. izdanje (Radostits, O. M., C. C. Gay, D. C. Blood, W. Hinchcliffk, Ur.). Saunders Ltd. Philadelphia. str. 603-700.

RATO, M. G., R. BEXIGA, S. F. NUNES, C. L. VILELA, I. SANTOS-SANCHES (2010): Human group A Streptococcci Virulence Gene is Bovine Group C. Emerg. Infect. Dis. 16, 116-119.

RATO, M. G., R. BEXIGA, S. F. NUNES, L. M. CAVACO, C. L. VILELA, I. SANTOS-SANCHES (2008): Molecular Epidemiology and Population Structure of Bovine Streptococcus uberis. J. Dairy Sci. 91, 4542–4551.

REYES, J., J. C. RODRIGUEZ-LECOMPTE, A. BLANCHARD, J. T. MCCLURE, J. SÁNCHEZ (2019): Molecular variability of Streptococcus uberis isolates from intramammary infections in Canadian dairy farms from the Maritime region. Can. J. Vet. Res. 83, 168–176.

RICHARDS, V. P., R. N. ZADOKS, P. D. PAVINSKI BITAR, T. LEFÉBURE, P. LANG, B. WERNER, L. TIKOFSKY, P. MORONI, M. J. STANHOPE (2012): Genome characterization and population genetic structure of the zoonotic pathogen, Streptococcus canis. BMC Microbiol. 12, 293.

RIFFON, R., K. SAYASITH, H. KHALIL, P. DUBREUIL, M. DROLET, J. LAGACE (2001): Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. J. Clin. Microbiol. 39, 2584-2589.

RUEGG, P. L. (2012): New Perspectives in Udder Health Management. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 28, 149–163.

RUEGG, P. L. (2017): A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. J. Milk Sci. 100, 10381–10397.

SANDHOLM, M., T. HONKANEN-BUZALSKI, L. KAARTINEN, S. PYORALA (1995): The Bovine Udder and Mastitis. (Sandholm, M., T. Honkanen-Buzalski, L. Kaartinen, S. Pyorala, Ur.). Gummerus Press. Jyvaskyla, Finland. str., 75-103.

SARGEANT, J. M., H. M. SCOTT, K. E. LESLIE, M. J. IRELAND, A. BASHIRI (1998): Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: frequency of occurrence and bacteriological isolates. Can. Vet. J. 39, 33–38.

SCHLEGEL, L., F. GRIMONT, P. A. D. GRIMONT, A. BOUVET (2003): Identification of major streptococcal species by rrn-amplified ribosomal DNA restriction analysis. J. Clin. Microbiol. 41, 657-666.

SCHOLZ, C. F. P., K. POULSEN, M. KILIAN (2012): Novel Molecular Method for Identification of Streptococcus pneumoniae Applicable to Clinical Microbiology and 16S rRNA Sequence-Based Microbiome Studies. J. Clin. Microbiol. 50, 1968-1973.

SCHOTTMULLER, H. (1903): Die Artunterscheidung der für den Menschen pathogenen Streptokokken durch Blutagar. MMV Münch. Med Wochenschr. 50, 849.

SCHULZE, K., E. MEDINA, G. CHHATWAL, S. GUZMAN (2003): Stimulation oflong-lasting protection against Streptococcus pyogenes after intranasal vaccination with non adjuvanted fibronectin-binding domain of the SfbI protein. Vaccine 21, 1958-1964.

SCOTT, J. R., V. A., FISCHETTI (1983): Expression of streptococcal M protein in E. coli. Science. 221, 758-760.

SEGUEL, M., J. GUTIÉRREZ, C. HERNÁNDEZ, F. MONTALVA, C. VERDUGO (2018): Respiratory Mites (Orthohalarachne diminuata) and β-hemolytic Streptococci-Associated Bronchopneumonia Outbreak in South American Fur Seal Pups (*Arctocephalus australis*). J. Wild Dis. 54, 380–385.

SIMPSON, V. R. (2006): Patterns and significance of bite wounds in Eurasian otters (*Lutra lutra*) in southern and south-west England. Vet. Rec. 158, 113–119.

SPRINGMAN AC, LACHER DW, WAYMIRE EA, WENGERT SL, SINGH P, ZADOKS RN, DAVIES HD, MANNING SD (2014): Pilus distribution among lineages of group B streptococcus: an evolutionary and clinical perspective. BMC Microbiol. 14, 159.

STAATS, J., I. FEDER, O. OKWUMABUA, M. CHENGAPPA (1997): Streptococcus suis: past and present. Vet. Res. Commun. 21, 381-407.

STACKEBRANDT, E., B. M. GOEBEL (1994): Taxonomic Note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S ribosomal-RNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 4, 846–849.

STEFAN, R. J., R. M. ATLAS (1988): DNA Amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental-samples. Appl. Environ. Microbiol. 54, 2185-2191.

STEVENS, D. L. (2000): Life-threatening streptococcal infections: scarlet fever, necrotizing fasciitis, myositis, bacteremia, and streptococcal toxic shock syndrome. U:Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis (Stevens, D. L., E. L. Kaplan, Ur.). Oxford University Press, New York. str. 163-179.

SUN, H., U. RINGDAHL, J. W. HOMEISTER, W. P. FAY, N. C. ENGLEBERG, A. Y. YANG, L. S. ROZEK, X. WANG, U. SJOBRING, D. GINSBURG (2004): Plasminogen is a critical host pathogeneticity factor for group A Streptoc. Inf. Science. 305, 1283-1286.

SWIFT, H. F., A. T. WILSON, R. C. LANCEFIELD (1943): Typing Group A Hemolytic Streptococci By M Precipitin Reactions In Capillary Pipettes. J. Exp. Med. 78, 127–133.

TAGG, J., P. WESCOMBE, J. BURTON (2011): Streptococcus: a brief update on the current taxonomic status of the genus. U: Lactic Acid Bacteria (Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen, A. von Wright, ur.), CRC Press, Boca Raton, Florida. str.123–146.

TANIYAMA, D., Y. ABE, T. SAKAI, T. KIKUCHI, T. TAKAHASHI (2017): Human case of bacteremia caused by Streptococcus canis sequence type 9 harboring the scm gene. ID Cases 7, 48–52.

TAPP, J., M. THOLLESSON, H. BJORN (2003): Phylogenetic relationships and genotyping of the genus Streptococcus by sequence determination of the RNase P RNA gene, rnpB. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1861-1871

TARDIF, G., M. C. SULAVIK, G. W. JONES, D. B. CLEWELL (1989): Spontaneous switching of the sucrose-promoted colony phenotype in Streptococcus sanguis. Infect. Immun. 57, 3945-3948.

TEMMERMAN, R., G. HUYS, J. SWINGS (2004): Identification of lactic acid bacteria:culture-dependent and culture-independent methods. Trends Food Sci. Tech. 15, 348-359.

TENG, L. J., P. R. HSUEH, J. C. TSAI, P. W. CHEN, J. C. HSU, H. C. LAI, C. N. LEE, S. W. HO (2002): groESL sequence determination, phylogenetic analysis, and species differentiation for viridans group streptococci. J. Clin. Microbiol. 40, 3172–3178.

THOMPSON, C. C., V. E. EMMEL, E. L. FONSECA, M. A. MARIN, A. C. P. VICENTE (2015): Streptococcal taxonomy based on genome sequence analyses. F1000Research 2013, 2, 67.

TIMONEY, J. F., S. VELINENI, B. ULRICH, P. BLANCHARD (2017): Biotypes and ScM types of isolates of Streptococcus canis from diseased and healthy cats. Vet. Rec.180, 358.

TODHUNTER, D. K., K. L. SMITH, J. S. HOGAN, W. P. WEISS (1995): Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. J. Dairy Sci. 78, 2366-2374.

TOMAZI, T., B. G. ALVES, A. F. DE SOUZA FILHO, M. B. HEINEMANN, M. V. DOS SANTOS (2019): Genotyping and antimicrobial resistance of Streptococcus uberis isolated from bovine clinical mastitis. Plos One 14, e0223719.

TOMITA, T., B. MEEHAN, N. WONGKATTIYA, J. MALMO, G. PULLINGER, J. LEIGH, M. DEIGHTON (2008): Identification of Streptococcus uberis Multilocus Sequence Types Highly Associated with Mastitis. Appl. Environ. Microbiol. 74, 114–124.

TRAJCHEV, M., D. NAKOV, M. PETROVSKA, G. JANKOSKA (2017): Mastitis pathogens and their antimicrobial susceptibility in early lactacion dairy cows. Agric. For., 63, 41-50.

TURK, R., M. KOLEDIĆ, N. MAĆEŠIĆ, M. BENIĆ, V. DOBRANIĆ, D. ĐURIČIĆ, L. CVETNIĆ, M. SAMARDŽIJA (2017): The role of oxidative stress and inflammatory response in the pathogenesis of mastitis in dairy cows. Mljekarstvo 67, 91-101.

URWIN R., M. C. J. MAIDEN (2003): Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol. 11, 479 – 487.

VALENTIN-WEIGAND, P., K. MMORIARTY (1992): Mycobacterium paratuberculosis binds fibronectin Fixation de Mycobacterium paratuberculosis sur la fibronectine. Res. Microbiol. 143, 75-79.

Vandamme, P., L. A. Devriese, B. Pot, K. Kersters, P. Melin (1997): Streptococcus difficile is a nonhemolytic group B, type Ib Streptococcus. Int. J. Syst. Bacteriol.47, 81–85.

VELA, A. I., E. FALSEN, I. SIMARRO, E. ROLLAN, M. D. COLLINS, L. DOMINGUEZ, J. F. FERNANDEZ-GARAYZABAL (2006): Neonatal mortality in puppies due to bacteremia by Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae. J. Clin. Microbiol. 44, 666–668.

VISAI, L., E. SAINO, A. SCRIBANTE, F. ROSTI, C. R. ARCIOLA, C. POGGIO (2018): Adhesion of Streptococcus Mutans to Different Restorative Materials. Int. J. Artif. Organs. 32, 671-677.

VLAHOVIĆ, K., G. GREGURIĆ GRAČNER, M. PAVLAK, D. ŠPOLJARIĆ, L. PAJURIN, M. POPOVIĆ (2020): Nova generacija sekvenciranja u veterinarskoj medicini- pregled 1. dio. Vet. Stn. 51, 175-185.

VLAHOVIĆ, K., G., GREGURIĆ GRAČNER, M., PAVLAK, D., ŠPOLJARIĆ, L., PAJURIN, M., POPOVIĆ (2020): Nova generacija sekvenciranja u veterinarskoj medicini- pregled 2. dio. Vet. Stn. 51, 305-315.

VONČINA, D. (2017): „Next generation sequencing“ u dijagnostici virusa i viroida vinove loze. Zbornik sažetaka 61. seminara biljne zaštite, 7-10. veljače 2017. Opatija, Hrvatska. str. 55.

VRHOVAC, B., I., BAKRAN, M., GRANIĆ, B., JAKŠIĆ, B., LABAR, B., VUCELIĆ (1997): Stafilokokne bolesti. U: Interna medicina (Vrhovac, B.,Ur.). Naprijed, Zagreb. str. 1582.

WALD, R., M. BAUMGARTNER, V. URBANTKE, B. STESSL, T. WITTEK (2017): Diagnostic accuracy of a standardized scheme for identification of Streptococcus uberis in quarter milk samples: A comparison between conventional bacteriological examination, modified Rambach agar medium culturing, and 16S rRNA gene sequencing. J. Dairy Sci. 100, 1459-1499.

WANG, R., L. LI, T. HUANG, Y. HUANG, W. HUANG, X. YANG, A. LEI, M. CHEN, (2018). Phylogenetic, comparative genomic and structural analyses of human Streptococcus agalactiae ST485 in China. BMC Genom. 19, 716.

WANG, R., L. LI, Y. HUANG, T. HUANG, J. TANG, T. XIE, A. LEI, F. LUO, J. LI, Y. HUANG, Y. SHI, D. WANG, M. CHEN, Q. MI, W. HUANG (2017): Pathogenicity of Human ST23 Streptococcus agalactiae to Fish and Genomic Comparison of Pathogenic and Non-pathogenic Isolates. Front. Microbiol. 8, 1933.

WATTS, J. L. (1988): Characterization and identification of streptococci isolated from bovine mammary glands. J. Dairy Sci. 71, 1616–1624.

WATTS, J. L. (1988a): Etiology agents of bovine mastitis. Vet. Microbiol. 16, 41-66.

WATTS, J. L., S. C. NICKERSON, J. W. PANKEY (1984): A case study of Streptococcus group G infection in a dairy herd. Vet. Microbiol. 9, 571–597.

WAYNE, L. G., D. J. BREENER, R. R. COLWELL (1987): Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 463-464.

WELLNITZ, O., R. M., BRUCKMAIER (2012): The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. Vet. J. 192, 148-152.

WERNER, B., P. MORONI, G. GIOIA, L. LAVÍN-LCONERO, A. YOUSAF, M. E. CHARTER, B. M. CARTER, J. BENNETT, D. V. NYDAM, F. WELCOME, Y. H. SCHUKKEN (2014): Short communication: Genotypic and phenotypic identification of environmental streptococci and association of Lactococcus lactis ssp. Lactis with intramammary infections among different dairy farms J. Dairy Sci. 97, 6964-6969.

WHATMORE, A. M., V. KAPUR, D. J. SULLIVAN, J. M. MUSSER, M. A. KEHOE (1994): Non-congruent relationships between variation in emm gene sequences and the population genetic structure of group A streptococci. Mol. Microbiol. 14, 619-631.

WHILEY, R. A., B. DUKE, J. M. HARDIE, L. M. C. HALL (1995): Heterogeneity among 16S–23S rRNA intergenic spacers of specieswithin the ‘Streptococcus milleri group’. Microbiology 141, 1461-1467.

WILSON, D. J., R. N. GONZALEZ, H. H. DAS (1997): Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. J. Dairy Sci. 80, 2592–2598.

YANCEY, R. J. (1993): Recent advences in bovine vaccine technology. J. Dairy Sci. 76, 2418.

YANG, Y., Y. LIU, Y. DING, L. YI, Z. MA, H. FAN (2013): Molecular Characterization of Streptococcus agalactiae Isolated from Bovine Mastitis in Eastern China. PLoS ONE 8, e67755.

ZADOKS, R. N, J. R. MIDDLETON, S. MCDOUGALL, J. KATHOLM, Y. H. SCHUKKEN (2011): Molecular epidemiology of mastitis pathogen of dairy cattle and comparatiove relevance to humans. J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia 16, 357-372.

ZADOKS, R. N., B. E. GILLESPIE, H. W. BARKEMA, O. C. SAMPIMON, S. P. OLIVER, Y. H. SCHUKKEN (2003): Clinical, epidemiological and molecular characteristics of Streptococcus uberis infections in dairy herds. Epidemiol. Infect. 30, 335–349.

ZADOKS, R. N., Y. H. SCHUKKEN, M. WIEDMANN (2005): Multilocus Sequence Typing of Streptococcus uberis Provides Sensitive and Epidemiologically Relevant Subtype Information and Reveals Positive Selection in the Virulence Gene pauA. J. Clin. Microbiol. 43, 2407.

ZOU, X., L. ZHANG, Z. WANG, Y. LOU (2016): Mechanisms of the Antimicrobial Activities of Graphene Materials. J. Am. Chem. Soc. 138, 2064-2077.

9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

Tihana Fumić rođena je 29.01.1985. godine u Zagrebu. Završila je Osnovnu školu „Bukovac“. Prvu Privatnu Gimnaziju s pravom javnosti završila je 2003. godine. Iste godine je upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 09.07.2010. Poslijediplomski doktorski studij je upisala u veljači 2011. godine. Pripravnički staž je odradila pri Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ u Službi za Zaštitu okoliša i zdravstvene ekologije. Danas radi u privatnom uredu ZO-INVEST d.o.o. u Zagrebu koji stipendira doktorski studij. Majka je kćeri Tise.

Popis objavljenih radova

FUMIĆ, T. (2010): Mikrobna ažuriranja u peradarstvu. Meso, 5, 256-257.

TRPČIĆ, I., B. NJARI, N. ZDOLEC, Ž. CVRTILA FLECK, **T. FUMIĆ**, L. KOZAČINSKI (2010): Mikrobiološka kakvoća i ocjena svježine konzumnih jaja. Meso,5, 286-293.

ZDOLEC, N., A. MARIĆ, B. NJARI, B. MIOKOVIĆ, L. KOZAČINSKI, Ž. CVRTILA FLECK, V. DOBRANIĆ, I. FILIPOVIĆ, **T. FUMIĆ** (2010): Osjetljivost na antimikrobne tvari *Leuconostoc spp*. iz svježeg kravljeg sira. Zbornik sažetaka, 39. Hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka s međunarodnim sudjelovanjem.

ŠPOLJARIĆ, D., **T. FUMIĆ**, D. KEZIĆ, H. VALPOTIĆ, V. FABIJANIĆ, M. POPOVIĆ, S. SLADOLJEV, I. VALPOTIĆ (2011): *Beta-glukan*: prirodni modifikatori imunosnog odgovora nedovoljno poznati u veterini. Veterinarska stanica,4,361-376.

MEDVID, V., N. ZDOLEC, V., DOBRANIĆ, Ž. CVRTILA FLECK, **T. FUMIĆ**, B., NJARI (2011): Buerteilung der Milchqualität auf Grund der mikrobiologischen, zitometrischen und akuten Phasenindikatoren der Eutergesundheit. Tierärztliche Umschau,11,456-460.

MIKUŠ, T., M. ŠKRIVANKO, Z. KOZAČINSKI, **T. FUMIĆ**, B. NJARI (2010): Aktualnosti u problematici procjene zdravstvene ispravnosti mesa divljači s posebnim osvrtom na nalaz parazita *Trichinella spiralis* i mezocerkariju *alaria alata*. Meso, 6, 352-355.

FUMIĆ, T., T., MIKUŠ (2011): Janjetina. Meso, 2, 105-108.

SUČIĆ, R., L. KOZAČINSKI, Ž. CVRTILA FLECK, B. NJARI, I. FILIPOVIĆ, **T. FUMIĆ**, M. BRATULIĆ (2011): Effect of storage on poultry meat quality. Maso,5,31-32.

GUTIĆ, S., **T. FUMIĆ** (2012): *Listeria monocytogenes* kao opasnost za sigurnost hrane životinjskog podrijetla. 5.Hrvatski veterinarski kongres s međunarodnim sudjelovanjem. Tuheljske toplice, 10.-13. listopada 2012. Zbornik radova, str.63.-70.

DŽAFIĆ, N., **T. FUMIĆ**, B. NJARI (2012): Uzgoj dagnji *Mytilus galloprovincialis* kao sigurne hrane. Meso, 4, 322-327.

MAJHEN, M., **T. FUMIĆ**, Ž. CVRTILA FLECK, B. NJARI (2012): Postupak s klaoničkim nusproizvodima nakon obrade peradi. Meso ,4, 333-338.

BAČIĆ, G., N. MAĆEŠIĆ T. KARADJOLE, M. LOJKIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, M. SAMARDŽIJA, M. BENIĆ, J. DAUD, **T. FUMIĆ**, I. BAČIĆ (2019): Najnovija istraživanja i dostignuća u dijagnostici i liječenju mastitisa u krava. Zbornik predavanja 10. naučni simpoziju Reprodukcija domaćih životinja i bolesti mlečne žlezde.Veterinarski Uneverzitet u Beogradu.Beograd. str. 135-141.