

SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS IN STRAINS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM COW'S MILK

Jana Pukáčová, Lucia Poľáková, Eva Dudriková

ABSTRACT

Strains of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) were isolated from individual milk samples of 500 lacting cows from different areas in Slovakia (PH 1 – Košice region, 300 samples; PH 2 – Žilina region, 200 samples). The statistical significance between both dairy farms included in the experiment in the presence of genus *Staphylococcus* isolated on Baird-Parker agar from milk samples was $p < 0,0001^{***}$. Totally, 122 milk samples were positive for the presence of *Staphylococcus aureus* (83 Košice regions, 52 Žilina regions). All 122 isolates of *S. aureus* were sensitive for the methicilin as detected by interpretative criteria developed by NCCLS (2002). For 122 *S. aureus* isolates, we compared antibiotic susceptibility results determined by the standardized agar diffusion assay with the PCR assay for the detection of antibiotic resistance *mecA* gene. For all isolates, we found a correlation between the results of the PCR and those of classical resistance testing. The obtained results were confirmed by PCR analysis, according to which, any of our tested isolate of *S. aureus* from all 122 individual milk samples from both experimental dairy farms were not positive for the presence of *mecA* gene coding the methicilin resistance.

Keywords: milk, antibiotic resistance, *mecA* gene, PCR

ÚVOD

Bezpečnosť potravín je kľúčovým faktorom, ktorý vedie k tomu, aby sa vyrábali kvalitné potraviny bez škodlivých účinkov na zdravie ľudí. Rastúce nároky spotrebiteľov na zdravé, výživné a vhodné potraviny vedú k neustálemu zdokonaľovaniu už existujúcich techník a k novému vývoju v spracovaní potravín ako aj k návrhom produkovať bezpečné potraviny, ktoré si zachovávajú nutričnú a senzorickú kvalitu. Žiadaným faktorom v procese spracovania potravín je zvýšiť potravinovú bezpečnosť, zlepšiť mikrobiologické a chemické vlastnosti potravín a odstrániť nežiaduce toxické zložky. Na identifikácii konkrétneho rizika so stanovením preventívnych ochranných opatrení je založený HACCP systém kvality a hygienickej a zdravotnej bezpečnosti vyrábaných produktov, ktorý má prvoradý význam v potravinárskom priemysle, počnúc od výroby až po spotrebu.

Z hľadiska technológie získavania a spracovania mlieka v mliekarskom priemysle predstavujú závažné mikrobiologické nebezpečenstvo baktérie *Staphylococcus aureus*. Z mnohých metabolitov produkovaných stafylokokmi najväčšie riziko pre zdravie konzumentov predstavujú enterotoxíny, ktoré po požití môžu vyvolať otravu potravinami - stafylokokovú enterotoxikózu (LeLoir et al., 2003; Lembo et al., 2003; Hage a Tran, 2004; Smitandí a Sternesjö, 2004).

Staphylococcus aureus sa vyskytuje v prachu, vo vzduchu, vo vode a v odpadových vodách, môže infikovať mlieko pri dojení, pochádza z mliečnej žľazy pri jej ochoreniach (Pyörälä, 2002), alebo sa do mlieka dostane kontamináciou z rúk, tváre, dutiny ústnej a nosovej pracovníkov prichádzajúcich s mliekom do styku v rôznych fázach jeho výroby a spracovania (Garcia et al., 1980; Bramley et al., 1984). Stafylokoky sa obvyčajne zisťujú u 30 - 50 % zdravých ľudí v nosnej dutine, na koži býva výskyt nižší (5 - 30 %). Stafylokoky adaptované na zvieratá môžu byť preukázané ako nosičské kmene u zdravých ľudí, najmä u tých, čo častejšie prichádzajú do

úzkého styku so zvieratami a môžu sa podieľať pri vzniku infekcií napr. zápalov mliečnej žľazy (Anderson, 1990; Cardoso et al., 1999; Burdová, 2001).

Na základe mnohých štúdií sa konštatovalo, že pretrvávajúca doslova harmonický vzťah medzi hosťiteľom a stafylokokmi, ktoré bežne perzistujú na koži, v nose, ústach a hrdle (Minor a Marth, 1972; 1976). Bohužiaľ táto harmónia sa naruší v prípade, že sa stafylokoky stávajú príčinným činiteľom vyvolávajúcim rôzne infekcie na rôznych miestach tela (Cunningham et al., 1996; Beekhuizen et al., 1997; Crossley a Archer, 1997).

Staphylococcus aureus sa v surovom mlieku vyskytuje dosť pravidelne, i keď v nízkych počtoch v porovnaní s inými druhmi a skupinami mikroorganizmov. Prítomnosť bakteriálnych látok, ostatnej konkurenčnej mikroflóry a chladenie mlieka zabraňujú jeho pomnoženiu a syntéze enterotoxínov (Tsen et al., 1997; Shoshani et al., 1999). Nízke počty *Staphylococcus aureus* v mlieku nie sú nebezpečné z hľadiska enterotoxikózy, ale môžu spôsobiť infekciu u ľudí s imunosupresiou, najmä detí. K stafylokokovej intoxikácii dochádza obvyčajne po skonsumovaní menej ako 1 µg toxínu v kontaminovanej potrave, čo v prípade dobrého producenta toxínu predstavuje asi 10^5 - 10^6 zárodkov enterotoxigénnych kmeňov *Staphylococcus aureus* v jednom grame potraviny (Soomro et al., 2003; Jorgensen et al., 2005).

Staphylococcus aureus má značný patogénny potenciál a veľká schopnosť adaptability na vonkajšie faktory prostredia spôsobuje, že sa stáva čoraz odolnejší voči antibiotikám. Selektívne tlaky prostredia, ako aj nadmerné používanie antibiotík, významne prispeli k budovaniu stafylokokovej rezistencie. Na začiatku šesťdesiatych rokov (1961) sa objavili prvé kmene rezistentné voči meticylínu a ostatným beta-laktámovým antibiotikám, tradične nazývané meticylín rezistentné kmene *S. aureus* (MRSA) (Kiššová, 2008).

V sedemdesiatych rokoch sa MRSA kmene stali prakticky po celom svete hlavnou príčinou

nozokomiálnych infekcií. Opakovaná liečba antibiotikami indukuje expresiu *mecA* kmeňov a dochádza k rýchlemu šíreniu v nemocniciach. *Staphylococcus aureus* reprezentuje kolonizátora a patogéna nielen pre ľudí, ale aj pre živočchy. Lee (2003) poukázal na fakt, že kontaminované potraviny živočíšneho pôvodu, mlieko a mliečne výrobky, predstavujú riziko infekcie MRSA pre ľudí. Gény kódujúce meticilínovú rezistenciu sú umiestnené na jedinom mobilnom genetickom elemente, a to na stafylokokovej chromozómovej kazete *SCCmec*. Do dnešnej doby bolo popísaných 6 druhov *SCCmec*. Tieto elementy sa môžu zabudovať do genómu MRSA a pretvoriť ho na rezistentný druh. Ich rozvoj prispieva k narastaniu počtu infekcií spôsobených MRSA po celom svete (Oliveira et al., 2006).

Cieľom práce bolo vyhodnotiť zbierku izolátov *Staphylococcus aureus* z individuálnych vzoriek surového mlieka získaného na dvoch vybraných produkčných hospodárstvach z rôznych oblastí Slovenska (Košícký kraj a Žilinský kraj) a u týchto izolátov popísať citlivosť k vybraným antibiotikám a prítomnosť génu kódujúceho rezistenciu na meticilín.

MATERIÁL A METÓDY

V práci sme použili zbierku izolátov *S. aureus* zo vzoriek surového kravského mlieka od 500 dojníc v rôznom štádiu laktácie, u ktorých klinickým vyšetrením mliečnej žľazy a NK-testom neboli zistené zápalové procesy. Vzorky surového mlieka boli odobraté na produkčnom hospodárstve (PH 1) situovanom v Košíckom kraji (n = 300) a na katastrálnom území produkčného hospodárstva (PH 2) situovaného v Žilinskom kraji (n = 200). Vzorky mlieka (rovnaké diely z každej štvrti, cca 10 ml), získané počas večerného dojenja boli odobraté asepticky po vydojení prvých strekov mlieka, zmiešané *anapartes* a ihneď uložené do chladiaceho boxu pri teplote + 4 °C až + 6 °C do spracovania. Vzorky boli spracované ihneď po príchode do laboratória.

Vo vzorkách surového mlieka sme *S. aureus* stanovili na Baired-Parkerovom agare (HiMedia, India) podľa EN ISO 6888-1:1999. Vyrastené suspektné kolónie sme prekultivovali na krvný agar obsahujúci 5 % baraních erytrocytov a inkubovali 24 hod. pri teplote 37 °C. Tieto 24 hod. kultúry sme použili na ďalšie testy: cytidín deaminázový test, založený na deaminácii cytidínu na rozlíšenie *S. aureus* od ďalších stafylokokov (Krasuski et al., 2007); Sevatest Stafylo PK (Imuna, Šarišské Michaľany) predstavuje plazmakoagulázový test na testovanie prítomnosti voľnej koagulázy skúmavkovou reakciou; Staphytest 16, ktorým sme identifikovali zástupcov rodu *Staphylococcus* (Lachema Brno, ČR). Získané izoláty *S. aureus* uvedenými testami sme potvrdili molekulárnou metódou PCR (Martineau et al., 1998; Strommenger et al., 2003; Hein et al., 2005).

Na detekciu *mecA* génu, ktorý kóduje meticilínovú rezistenciu, sme použili PCR reakciu podľa Strommengera et al. (2003), ktorou sa amplifikuje 532 bp dlhá časť tohto génu.

V objeme 50 µl reakčnej zmesi bol 1 µl genomickej DNA, 10 mmol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,8), 3 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 200 µmol.l⁻¹ dNTP, 12,5 pmol.l⁻¹ každého primeru a 1

jednotka *Taq* DNA polymerázy (Ecoli s.r.o.). Primery použité v PCR na amplifikáciu *mecA* génu sú uvedené v Tab. 1. Na amplifikáciu *mecA* génu sme použili nasledovné podmienky:

Iniciačná denaturácia pri 94 °C po dobu 3 min.,

30 cyklov:

94 °C, 30 s.,

55 °C, 30 s.,

72 °C, 30 s.,

Po poslednom cykle nasledovala ešte finálna extenzia 4 min. pri 72 °C.

Tab. 1 Primery použité v PCR na amplifikáciu *mecA* génu (Zdroj: Strommenger et al., 2003)

Gén	Primer	Nukleotidová sekvencia 5' – 3'	Veľkosť produktu
<i>mecA</i>	mecA-F	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	532 bp
	mecA-R	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	

PCR produkty sme analyzovali pomocou elektroforézy v 1 % agarózových géloch (Invitrogen), ponorených v TAE tlmivom roztoku, ktorý mal nasledovné zloženie: 242 g TRIS, 57,1 ml kyselina octová ľadová, 100 ml 0,5 mol.l⁻¹ EDTA (pH 8,0), doplnená destilovanou vodou do 1 l (Sambrook et al., 1989). Elektroforéza prebiehala približne 45 min. pri 120 V (Zdroj napätia Consort EV 243, UK). Agarózové gély sme po elektroforéze ofarbili etídium bromidom (10 mg/ml) a následne vizualizovali pomocou UV lampy. Na základe pohyblivosti v agarózových géloch sme porovnávaním so 100 bp štandardom (Sigma) určili veľkosť fragmentov.

Izoláty *S. aureus* sme testovali na citlivosť voči vybranej škále antibiotík difúznou diskovou metódou (NCCLS, 2002) na Müeller-Hintonovom agare. Suspenziu pripravenú z testovaného izolátu sme vatovým tampónom naniesli na povrch Müeller-Hinton pôdy. Pomocou dávkovača antibiotických diskov Oxoid sme naniesli jednotlivé antibiotické disky a platne sme inkubovali 16 - 24 hod. pri 37 °C. Po inkubácii sme odmerali priemery inhibičných zón rastu baktérií v milimetroch a porovnali ich s hraničnými veľkosťami inhibičných zón, ktoré sú stanovené pre jednotlivé antibiotiká. Výsledok ukazuje, či je kmeň citlivý (C), rezistentný (R) alebo stredne citlivý (MC) na testované antibiotikum.

Na testovanie antibiotikorezistencie sme použili nasledovné testovacie disky (Oxoid) s týmto množstvom účinnej látky: amoxicillin-clavulanat (20 µg + 10 µg), ampicillin (10 µg), erythromycin (15 µg), lincomycin (10 µg), methicillin (10 µg), neomycin (30 µg), novobiocin (30 µg), oxacillin (5 µg), penicillin (10 IU), streptomycin (10 µg) a tetracycline (30 µg).

Na štatistické porovnanie výsledkov našej experimentálnej práce sme použili analýzu rozptylu ANOVA a metódu testu dobrej zhody chí-kvadrát a Tukeyov porovnávací test (Microsoft Excel 2007 a GraphPad Prism 5).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkovo sme odobrali päťsto individuálnych vzoriek surového kravského mlieka, a to 300 ks z produkčného hospodárstva situovaného v Košickom kraji (PH 1) a 200 ks vzoriek z produkčného hospodárstva nachádzajúceho sa v Žilinskom kraji (PH 2). Z 500 individuálnych vzoriek surového kravského mlieka bolo 53,2 % bakteriologicky

pozitívnych (Tab. 2). Z týchto vzoriek surového kravského mlieka bol klasickou mikrobiologickou metódou izolovaný rod *Staphylococcus* v 122 vzorkách mlieka. Medzi sledovanými produkčnými hospodárstvami bola zistená štatisticky významnosť v pozitívite vzoriek mlieka na rod *Staphylococcus* $p < 0,0001^{***}$ (Tab. 3).

Tab. 2 Prehľad bakteriologického vyšetrenia surového kravského mlieka v PH 1 (Košický kraj) a PH 2 (Žilinský kraj) Zdroj: Vlastná tabuľka

kraj	PH 1		PH 2	
	počet	(%)	počet	(%)
vyšetrené spolu	300	100	200	100
pozitívne celkom	181	60,33	85	42,5
negatívne celkom	119	33,67	115	57,5
vyšetrené spolu	500 (100%)			
pozitívne celkom	266 (53,2 %)			
negatívne celkom	234 (46,8 %)			

Tab. 3 Prehľad bakteriologického vyšetrenia surového kravského mlieka v PH 1 (Košický kraj) a PH 2 (Žilinský kraj) so zameraním na druh *Staphylococcus aureus* (Zdroj: Vlastná tabuľka)

rod	PH 1 (n = 181)		PH 2 (n = 85)		spolu (n = 266)		štatistická významnosť $p < 0,0001$ ***
	počet	%	počet	%	počet	%	
<i>S. aureus</i>	83	47,73	39	24,38	122	45,86	

Izolované a identifikované kmene *S. aureus* klasickými metódami sme uskladnili vo forme glycerínovej konzervy pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do ďalšieho laboratórneho spracovania PCR metódou.

Celkovú genomickú DNA sme izolovali metódou podľa Heina et al. (2005). Po príslušnej izolácii sme supernatant použili ako zdroj celkovej DNA na identifikáciu *S. aureus*. PCR metódou, pomocou primerov Sauni 1 a Sauni 2, ktoré amplifikujú 16S rDNA gén prítomný iba u kmeňov stafylokokov a primerov Sau 1 a Sau 2, ktoré amplifikujú špecifické sekvencie prítomné iba u kmeňov *S. aureus*, sme potvrdili, že sa jedná o izoláty *S. aureus*.

Pomocou multiplexovej polymerázovej reťazovej reakcie sme sledovali prítomnosť *mecA* génu, ako génu, ktorý kóduje meticilínovú rezistenciu. Ani jeden nami potvrdený kmeň *S. aureus* izolovaný zo surového kravského mlieka experimentálnych dojníc z obidvoch produkčných hospodárstiev, nebol nositeľom génu *mecA*, ktorý určuje meticilínovú rezistenciu.

Izoláty *S. aureus* sme testovali na citlivosť voči vybranej škále antibiotík difúznou diskovou metódou na Müller-Hintovom agare tak, ako to uvádza N CCLS (2002).

Výsledky *in vitro* citlivosti izolátov *S. aureus* diskovou metódou sú uvedené v Tab. 4. Z Tab. 4 vyplýva, že všetky izoláty *S. aureus* boli citlivé voči meticilínu a oxacilínu (100 %), nad 90 % bola citlivosť zistená pri antibiotiku typu amoxicilín-klavulanát (95,90 %). Linkomycín a streptomycín boli účinné na 86,89 %, resp. 83,61 % izolátov *S. aureus* zo vzoriek mlieka experimentálnych dojníc. U ostatných sledovaných antibiotík bola citlivosť na izoláty *S. aureus* nižšia a napr. penicilín bol účinný len u 54,92 % izolátov *S. aureus* z individuálnych vzoriek mlieka dojníc získaných na obidvoch produkčných hospodárstvách. Na penicilín a ampicilín bolo 26,22 % resp. 16,40 % izolátov *S. aureus* zo vzoriek mlieka experimentálnych dojníc rezistentných. Na tetracyklín resp. erytromycín bolo citlivých 75,41 % resp. 72,95 % nami izolovaných kmeňov *S. aureus* z individuálnych vzoriek surového kravského mlieka.

Štatistické hodnotenie *in vitro* citlivosti izolátov *S. aureus* diskovou metódou zo vzoriek surového kravského mlieka experimentálnych dojníc odobratých v sledovaných produkčných hospodárstvách je uvedené v Tab. 5.

potravinárstvo

Tab. 4 *In vitro* citlivosť koagulázapozitívnych kmeňov *S. aureus* izolovaných z individuálnych vzoriek surového kravského mlieka od 122 dojníc (Zdroj: Vlastná tabuľka)

účinná látka antibiotika (koncentrácia) PH 1 = 83 PH 2 = 39		<i>S. aureus</i> (n = 122)					
		C		R		MC	
		Počet	(%)	Počet	(%)	Počet	(%)
Amoxicillin-Clavulanat (20 µg + 10 µg)	spolu	117	95,90	0	0	5	4,10
	PH1	80	96,39	0	0	3	3,62
	PH 2	37	94,87	0	0	2	5,13
Ampicillin (10 µg)	spolu	83	68,03	20	16,40	19	15,57
	PH1	47	56,63	19	22,89	17	20,48
	PH 2	36	92,31	1	2,56	2	5,13
Erythromycin (15 µg)	spolu	89	72,95	18	14,75	15	12,30
	PH1	58	69,88	13	15,66	12	14,46
	PH 2	31	79,49	5	12,83	3	7,69
Lincomycin (10 µg)	spolu	106	86,89	16	13,11	0	0
	PH1	67	80,72	16	19,28	0	0
	PH 2	39	100	0	0	0	0
Methicillin (10 µg)	spolu	122	100	0	0	0	0
	PH1	83	100	0	0	0	0
	PH 2	39	100	0	0	0	0
Neomycin (30 µg)	spolu	90	73,77	0	0	32	26,23
	PH1	67	80,72	0	0	16	19,28
	PH 2	23	58,97	0	0	16	41,03
Novobiocin (30 µg)	spolu	82	67,21	28	22,95	12	9,84
	PH1	59	71,08	20	24,10	4	4,82
	PH 2	23	58,98	8	20,51	8	20,51
Oxacillin (5 µg)	spolu	122	100	0	0	0	0
	PH1	83	100	0	0	0	0
	PH 2	39	100	0	0	0	0
Penicillin (10 IU)	spolu	67	54,92	32	26,22	23	18,86
	PH1	49	59,03	18	21,69	16	19,28
	PH 2	18	2,56	14	35,89	7	17,95
Streptomycin (10 µg)	spolu	102	83,61	20	16,39	0	0
	PH1	63	75,90	20	24,10	0	0
	PH 2	39	100	0	0	0	0
Tetracycline (30 µg)	spolu	92	75,41	30	24,59	0	0
	PH1	64	77,11	19	22,89	0	0
	PH 2	28	71,79	11	28,21	0	0

C - citlivý; R - rezistentný, MC - stredne citlivý, PH 1 - Košický kraj, PH 2 - Žilinský kraj

Z Tab. 5 vyplýva, že pri porovnaní štatistickej významnosti citlivosti, strednej citlivosti, resp. rezistencie izolátov *S. aureus* zo vzoriek surového mlieka experimentálnych dojníc na sledované antibiotiká pomocou diskovej metódy boli zistené rozdiely na úrovni $p < 0,0001^{***}$ pre ampicilín (citlivý), $p < 0,0001^{***}$ pre streptomycín (citlivý). Všetkých 39 izolátov *S. aureus* (100 %) získaných zo vzoriek mlieka z PH 2 bolo na streptomycín citlivých. V skupine izolátov *S. aureus* zo

vzoriek mlieka odobraných na PH 1 bolo na streptomycín citlivých 75,90 % testovaných kmeňov *S. aureus*, čo je o 24,10 % menej.

Rozdiely v rezistencii izolátov *S. aureus* zo vzoriek surového mlieka experimentálnych dojníc na sledované antibiotiká pomocou diskovej metódy boli zistené na hladine významnosti $p < 0,0035^{**}$ pre ampicilín a $p < 0,0026^{**}$ pre linkomycín.

Tab. 5 Štatistické hodnotenie *in vitro* citlivosti izolátov *S. aureus* izolovaných z individuálnych vzoriek surového kravského mlieka v PH 1 a PH 2 (Zdroj: Vlastná tabuľka)

účinná látka antibiotika (koncentrácia)	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (n =122)		
	C	R	MC
Amoxicillin-Clavulanat (20 µg + 10 µg)	p < 0,6543 ns	-	p < 0,0035 **
Ampicillin (10 µg)	p < 0,0001 ***	p < 0,0035 **	p < 0,0328 *
Erythromycin (15 µg)	p < 0,3821 ns	p < 0,7890 ns	p < 0,3827 ns
Lincomycin (10 µg)	p < 0,0026 **	p < 0,0026 **	-
Methicillin (10 µg)	-	-	-
Neomycin (30 µg)	p < 0,0151 *	-	p < 0,0151 *
Novobiocin (30 µg)	p < 0,2168 ns	p < 0,8181 ns	p < 0,0178 *
Oxacillin (5 µg)	-	-	-
Penicillin (10 IU)	p < 0,2418 ns	p < 0,1228 ns	-
Streptomycin (10 µg)	p < 0,0003 ***	-	-
Tetracycline (30 µg)	p < 0,6525 ns	-	-

C - citlivý; R - rezistentný, MC - stredne citlivý; PH 1 - Košický kraj, PH 2 - Žilinský kraj

Niektoré izoláty *S. aureus* zo vzoriek mlieka experimentálnych dojníc vykazovali strednú citlivosť na niektoré testované antibiotiká zvolenou metódou. Rozdiely boli pozorované aj medzi sledovanými produkčnými hospodárstvami, na ktorých prebiehal experiment. Jednalo sa najmä o amoxicilín-klavulanát (p < 0,0035^(**)), ampicilín (p < 0,0328^(**)), neomycín (p < 0,0151^(*)) a novobiocín (p < 0,0178^(*)). Pri erytromycíne nebola zistená štatistická významnosť p < 0,3827^(ns) v strednej citlivosti tohto antibiotika na testované izoláty *S. aureus* z mlieka experimentálnych dojníc.

Najznámejší zástupca *Staphylococcus aureus* býva opakovane spájaný s etiológiou množstva infekcií a intoxikácií u zvierat a ľudí (Ball, 2002; Choi et al., 2006; Johnson et al., 2007). Predstavuje prakticky všadeprítomnú, pomerne ľahko a rýchlo zmeneným podmienkam prispôsobujúcu sa baktériu (Foster, 2004).

Venovať sa problematike výskytu *S. aureus* v surovom kravskom mlieku vrátane štúdia, či daný kmeň *S. aureus* je nositeľom génov nesúcich rezistenciu na vybrané antibiotiká, ako je napr. metilín má svoje opodstatnenie aj v súčasnosti, nakoľko tento patogénny mikroorganizmus pre mliečnu žľazu môže vyvolávať ochorenia pre človeka práve tým, že niektoré kmeň *S. aureus* vylučujú do mlieka enterotoxíny a ohrozujú zdravie konzumenta, resp. vznikajú problémy v humánnej medicíne pri liečbe ľudí antibiotikami v dôsledku sa zvyšovania rezistencie u kmeňov *S. aureus* (Vasil', 2001, 2008).

Závažným celosvetovým problémom sa hlavne v poslednom desaťročí stáva nárast rezistencie mikroorganizmov k antimikrobiálnym látkam. Pravdepodobnou príčinou tohto nepriaznivého trendu je

nadmerné a nie vždy vhodne indikované podávanie týchto látok. Nárast rezistentných izolátov je zaznamenávaný aj u stafylokokov a týka sa nielen humánnej medicíny, ale aj veterinárneho lekárstva (Karpíšková et al., 2009).

Úžasná schopnosť adaptability *S. aureus* na vonkajšie faktory prostredia, ako aj nadmerné používanie antibiotík, významne prispeli k budovaniu stafylokokovej rezistencie. Vlastníctvo faktorov virulencie udeľuje tomuto druhu schopnosť vyvolať široké spektrum infekcií. Baktérie *S. aureus* sú príčinou drobných kožných zápalov, alimentárnych intoxikácií, až po život ohrozujúce pneumónie, osteomyelitídy, syndrómy toxického šoku, bakteriálne endokarditídy a septické stavy. Nachádzame ich ako nosičské kmene na nosovej sliznici, asi u tretiny ľudskej populácie, na koži, v prostredí, ale aj v potravinách (Líšková a kol., 2001).

Za posledných 50 rokov *S. aureus* úspešne odolával antimikrobiálnej chemoterapii a prekonal všetky terapeutické prostriedky (Hiramatsu et al., 2001).

Na prelome 21. storočia boli odhalené jeho genómové sekvencie a vedci začali využívať genetické poznatky v liečbe a prevencii stafylokokových infekcií. Zavedenie penicilínu do klinickej praxe v roku 1942, pomohlo obmedziť rozširovanie stafylokokov, avšak už v roku 1947 sa objavil prvý rezistentný kmeň. Ako uvádza Jevons (1961), v roku 1959 sa podarilo vyvinúť nové polosyntetické beta-laktámové antibiotikum – metilín a už v roku 1961 bol zaznamenaný vo Veľkej Británii prvý výskyt metilín-rezistentný *S. aureus*, ktorý sa začal pomaly rozširovať. Novú nádej priniesol v 80-tych rokoch objav vankomycínu, ktorý sa však začal nekontrolovane predpisovať a používať, čo viedlo k vzniku rezistencie aj na vankomycín (Hattori et al., 2001; Hiramatsu et al., 1997).

Multirezistentné kmene *S. aureus* sa častejšie vyskytujú v humánnej medicíne, aj keď nárast týchto izolátov sa čoraz častejšie zaznamenáva aj vo veterinárnom lekárstve a prevalencia týchto kmeňov je rôzna v rôznych regiónoch (**Karpíšková et al., 2009**).

Ako uvádzajú vo svojej štúdií Gentilini et al. (2000), 64 % izolátov získaných z bovinných mastitíd bolo rezistentných na jedno alebo viac antibiotík, pričom žiadne z týchto izolátov neboli rezistentné na oxacilín, cefalosporín a kombináciu ampicilín-sulbaktám. Na penicilín, gentamicín a erytromycín zaznamenali 40,3 % rezistenciu. Vyššiu rezistenciu humánnych izolátov *S. aureus* popísali **Normano et al. (2007)**, 58,7 % na ampicilín, 42 % na erytromycín a 34,9 % izolátov bolo rezistentných na tetracyklín. Podobne vysokú rezistenciu v izolátoch

S. aureus z bovinných mastitíd na erytromycín (93,1 %), linkomycín (45,8 %), spiramycín (41,7 %) a klindamycín (36,1 %) zaznamenali **Wang et al. (2008)**.

V našej práci sme u koagulázopozitívnych kmeňov *S. aureus* izolovaných z individuálnych vzoriek surového kravského mlieka zistili, že všetky izoláty *S. aureus* boli citlivé voči meticilínu a oxacilínu (100 %), nad 90 % bola citlivosť zistená pri antibiotiku typu amoxicilín-klavulanát (95,90 %). Linkomycín a streptomycín boli účinné na 86,89 %, resp. 83,61 % izolátov *S. aureus* zo vzoriek mlieka experimentálnych dojníc. U ostatných sledovaných antibiotík bola citlivosť na izoláty *S. aureus* nižšia a napr. penicilín bol účinný len u 54,92 % izolátov *S. aureus* z individuálnych vzoriek mlieka dojníc získaných na obidvoch produkčných hospodárstvach.

Na penicilín a ampicilín bolo 26,22 % resp. 16,40 % izolátov *S. aureus* zo vzoriek mlieka experimentálnych dojníc rezistentných. Na tetracyklín resp. erytromycín bolo citlivých 75,41 % resp. 72,95 % nami izolovaných kmeňov *S. aureus* z individuálnych vzoriek surového kravského mlieka. Naše dosiahnuté výsledky sa zhodujú aj s výsledkami, ktoré udáva **Vasil' et al. (2007)**.

Metódou PCR sme rovnako zistili, že izoláty *S. aureus* nie sú nositeľmi génu *mecA*, ktorý určuje meticilínovú rezistenciu. Tieto naše údaje sú v rozpore s údajmi **Leeho (2003)**, ktorý u kmeňov *S. aureus* izolovaných z kráv uvádza až 53 % izolátov pozitívnych pre *mecA* gén. **Lee (2003)** popísal najväčší počet pozitívnych izolátov MRSA u hovädzieho dobytku v Kórei, pričom väčšina kmeňov pochádzala z mlieka, ale len časť kráv s pozitívnymi nálezmi *S. aureus* vykazovala známky mastitídy. Tieto výsledky na jednej strane korelujú s našimi výsledkami, ktoré sme zistili pri izolácii *S. aureus* z parenchýmu mliečnej žľazy aj napriek tomu, že u nami izolovaných kmeňov *S. aureus* sme nezistili PCR metódou gén pre rezistenciu na meticilín a na druhej strane, kmene boli na meticilín citlivé. V Maďarsku boli zistené výsledky, ktoré poukázali na to, že MRSA kmene *S. aureus* boli izolované z mlieka kráv so známkami subklinickej mastitídy (**Juhász-Kaszanyitzky, 2007**).

Kontaminované potraviny živočíšneho pôvodu vrátane mlieka, predstavujú riziko infekcie MRSA pre ľudí len vzácnne, ale aj tu existuje potenciálne nebezpečenstvo prenosu týchto kmeňov na pracovníkov v potravinárstve. Izoláty MRSA kmeňov boli zistené vo vzorkách mlieka a syrov (**Lee, 2003; Normanno, 2007; van Loo, 2007**).

Prítomnosť *S. aureus* bola preukázaná napríklad v kravskom mlieku a v mliečnych výrobkoch v Taliansku; kontaminované boli najmä syry – mozzarella a pecorino (**Normanno et al., 2005; Firinu et al., 2003**).

Kerouanton et al. (2007) zistili, že z 33 izolátov *S. aureus* izolovaných od ľudí a oviec pri podozrení na otravu jedlom boli dva izoláty (6 %) rezistentné na meticilín. Ako uvádza **Jones et al. (2002)**, aj keď už boli popísané dva prípady ochorenia z kontaminovaných potravín MRSA, v ktorých bol zdrojom kontaminácie potravinársky pracovník kolonizovaný týmito baktériami, vznik ochorenia v súvislosti s konzumáciou potravín kontaminovaných MRSA sa však zatiaľ nepovažuje za príliš pravdepodobný.

Kmene MRSA sú veľkým globálnym klinickým a ekonomickým problémom.

V sedemdesiatych rokoch sa v humánnej medicíne MRSA kmene stali prakticky po celom svete hlavnou príčinou nozokomiálnych infekcií. Opakovaná liečba antibiotikami indukuje expresiu *mecA* kmeňov a dochádza k rýchlemu šíreniu stafylokokov v nemocniciach. Dôležitý je fakt, že tieto kmene kolonizujú nemocničný personál, ktorý je potenciálnym zdrojom nákazy pre pacientov. Osídľujú aj dýchací trakt a sekréty z pľúc sa môžu prenášať kašľaním a kýchaním (**Gosbell et al., 2001**).

Epidemiologický význam MRSA vo svete stále stúpa. Napríklad v USA stúpol výskyt MRSA z 2,4 v roku 1975 na alarmujúcich 40 - 60 % po roku 1990. V Európe udávajú škandinávské krajiny výskyt stále okolo 1 %, naopak Španielsko, Taliansko, Francúzsko viac ako 30 %. V roku 2006 zaznamenali v Taliansku až 40 % prevalenciu tohto patogéna (**Normanno et al., 2007**).

Ako uvádza **Karpíšková et al. (2009)** v Českej republike bol prvý krát v nemocniciach zaznamenaný výskyt MRSA v roku 2001, kedy bolo hlásených 6 %, v roku 2005 to bol už viac ako dvojnásobok (13 %).

V slovenských nemocniciach podľa dostupných výsledkov z rôznych monitorovacích štúdií (ESAR, EARSS) sa výskyt MRSA pohybuje v intervale 5 - 8 %. U kmeňov *S. aureus* získaných z komunitných respiračných infekcií je výskyt MRSA približne 0,5 % (**Líšková et al., 2004**). Kmene MRSA spôsobujú v nemocničných zariadeniach závažné problémy, často vykazujú rezistenciu k celej rade antimikrobiálnych látok a tým značne komplikujú prípadnú liečbu pacientov.

Rozvoj rezistencie k β-laktámovým antibiotikám a jej široké spektrum u MRSA má ničivý dopad na liečbu stafylokokových infekcií a je spôsobená modifikáciou proteínu PBP2a, ktorý sa vyznačuje nízkou afinitou k β-laktámovým antibiotikám, ktorými sú napríklad oxacilín, kloxacilín, dikloxacilín, floxacilín, meticilín, a nafcilín a k penicilínom rezistentným voči penicilináze (**Katayama, 2000; Hartman a Tomasz, 1981; Archer et al., 1994**).

Podstata rezistencie spočíva v tom, že v prítomnosti β-laktámových antibiotík jedine PBP2a zostáva aktívny, ostatné PBP sú inaktivované, pretože majú vysokú afinitu k týmto antibiotikám a rýchlo sa acylujú aj za nízkej koncentrácie antibiotika. PBP2a katalyzuje zosieťovanie peptidoglykánových monomérov v bunkovej stene a preberá tak úlohu v jej syntéze (**Berger-Bächi a Rohrer, 2002**). Ako uvádza **Pinho et al. (2001)**, vysoký stupeň rezistencie je dosiahnutý, len keď PBP2a spolupracuje s transglykozyázovou doménou (TGáza) natívneho proteínu PBP2 necitlivou k penicilínu.

Modifikácia proteínu PBP2a u stafylokokov je kódovaná génom *mecA*, ktorý sa nachádza na stafylokokovej chromozómnej kazete (SCC*mec*) a je horizontálne prenosný (Katayama, 2000). Tento spôsob prenosu je hlavným mechanizmom, uplatňujúcim sa pri šírení rezistencie na meticilín, medzi rôznymi druhmi stafylokokov (Silva, 2001).

Stafylokoková chromozómová kazeta SCC*mec* je významným stafylokokovým ostrovom patogenity SAPI (21-67 kb), ktorý je špecificky začlenený do chromozómu v mieste *attB*SCC blízko začiatku replikácie (Ito et al., 1999). SCC*mec* je preferovaným miestom, kde sa začleňujú mobilné genetické elementy. Integráciou SCC*mec* do genómu *S. aureus* vzniká meticilín-rezistentný kmeň, ktorý je odolný voči takmer všetkým β-laktámovým antibiotikám (Hiramatsu et al., 2001), ktoré sa používajú tak v humánnej ako aj veterinárnej medicíne.

MRSA kmene dlhodobo prežívajú v prostredí a môžu byť zdrojom vzniku a šírenia rezistencie na ďalšie mikroorganizmy. V posledných rokoch sa stále častejšie používajú čistiace prípravky s antibakteriálnym účinkom, ktoré môžu podobne ako antibiotiká blokovать špecifické receptory pre syntézu mastných kyselín. Niektoré štúdie uvádzajú, že časté používanie antibakteriálnych prostriedkov v prostredí môže viesť k zvýšeniu rezistencie mikroorganizmov k antibiotikám, napríklad izoláty *S. aureus* s nižšou citlivosťou na kationaktívny tenzid - benzalkoniumchlorid, sú tiež rezistentné k beta-laktámovým antibiotikám. Je teda pravdepodobné, že časté požívanie tejto látky v prostredí môže prispievať aj k častejšiemu výskytu MRSA v prostredí (Karpíšková et al., 2009).

ZÁVER

Základom výroby kvalitného mlieka, ako východiskovej suroviny pre ďalšie spracovanie, je dobrý zdravotný stav mliečnej žľazy dojníc, pričom práve ochorenie mliečnej žľazy je v dnešnej dobe najväčším zdravotným problémom v chovoch dojníc a chovateľ, aby mohol produkovať mlieko vysokej kvality, musí ho získavať od zdravých jedincov (Bradley, 2002). Všeobecne je známe, že častý výskyt zápalov mliečnej žľazy dojníc, je aj v súčasnosti jedným z dôležitých faktorov, ktorý nielen negatívne ovplyvňuje celkový zdravotný stav dojníc, ale výrazne zasahuje aj do oblasti kvality mlieka.

Infekčná mastitída kráv (*Mastitis infectiosa bovum*) je podľa Medzinárodnej mliekárenskej federácie (IDF, 1971) definovaná ako zápalová zmena mliečnej žľazy, ktorá je okrem fyzikálnych, chemických a mikrobiologických zmien charakterizovaná aj vzostupom počtu somatických buniek, obzvlášť leukocytov v mlieku a patologickými zmenami v tkanive mliečnej žľazy (Vasiľ, 2001).

Uvádza sa, že *S. aureus* je najčastejšie izolovaným pôvodcom mastitíd vo svete (Hutton et al., 1990; Bradley a Green, 2002), mastitídy vyvolané zárodkami *S. aureus* sa na Slovensku vyskytujú v rozpätí od 10,0 do 25,0 % v závislosti na lokalite (Vasiľ, 2001).

Vzhľadom k tomu, že v súčasnej dobe, pokiaľ je nám známe, nie sú k dispozícii štatistické údaje o pôvodcoch mastitíd kráv na Slovensku, nakoľko "Program prevencie

a tlmenia mastitíd" bol na Slovensku posledný krát vypracovaný v roku 1991 a to na roky 1992 – 1993. Od tejto doby nie sú k dispozícii prehľadné a potrebné údaje. V surovom kravskom mlieku bol v rôznych štúdiách potvrdený výskyt 4 - 12 % toxínogénnych kmeňov *S. aureus*, vyššie percento sa vyskytlo len medzi izolátmi z akútnych mastitíd. Vo Francúzsku v regióne Cammembert boli zo 62 % vzoriek surového kravského mlieka izolované stafylokoky, ale aj iní autori izolovali stafylokoky až zo 61 % odobratých vzoriek surového mlieka (Desmaures et al., 1997; Ombui et al., 1992).

Konkrétna situácia výskytu jednotlivých bakteriálnych pôvodcov mastitíd je v rôznych chovoch dojníc rozdielna a závisí od troch biosystémov – dojnica, prostredie, mikroorganizmy a od uplatňovania protimastitídnych programov (Hofírek a Haas, 2003).

Zabezpečovanie racionálnej výživy ľudskej populácie kladie zvýšené nároky na dosahovanie dobrej kvantitatívnej, ale najmä kvalitatívnej úrovne surového kravského mlieka. Kvalita mlieka ako vstupnej suroviny je súborom všetkých vlastností mlieka, ktoré sú významné pre konzumentov i spracovateľov, čiže spĺňajú potravinársko-technologické, nutrično-fyziologické a hygienické hľadiská. Tieto hľadiská sa koncentrujú na hygienické požiadavky, optimálne chemické zloženie, na vyhovujúce chemické, fyzikálne, technologické a senzorické vlastnosti surového mlieka ako suroviny na ďalšie spracovanie pre výživu ľudí.

Aj napriek tomu, že v nami izolovaných a potvrdených kmeňoch *S. aureus* z individuálnych vzoriek surového kravského mlieka od experimentálnych dojníc sme ani v jednom prípade nezistili metódou PCR, že izoláty *S. aureus* sú nositeľmi génu *mecA*, ktorý určuje meticilínovú rezistenciu, je potrebné sa tejto problematike venovať aj naďalej, a to najmä v súvislosti s možným vznikom ekologických mliečnych fariem, resp. už aj dnes na niektorých miestach Slovenska prebiehajúcim predajom mlieka priamo z farmy prostredníctvom mliečnych automatov.

Acknowledgments:

This work was supported by grant project KEGA MŠ SR 3/128-001UVL-4/2010 a VEGA VEGA MŠ SR č. 1/0638/09.

LITERATÚRA

ANDERSON, J. C. 1990. *Staphylococcus*. In Gyles, C. L. and Thoen, C. O. (eds) Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Iowa State University Press, Ames, IA, 1990, 2nd edn, p. 14-20.

ARCHER, G. L., NIEMEYER, D. M., THANASSI, J. A., PUCCI, M. J. 1994. Dissemination among *staphylococci* of DNA sequences associated with methicillin resistance. In *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38, 1994, p. 447-454.

BALL, D. 2002. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* now a major pathogen in PEG site infections. In *Am. J. Gastroent.*, 97, (7) 2002, p. 1713-1716.

BEEKHUIZEN, H., GEVEL, J. S., OLSSON, B., BENTEN, I. J., FURTH, R. 1997. Infection of human vascular endothelial cells with *Staphylococcus aureus* induces hyperadhesiveness for human monocytes and granulocytes. In 38, *J. Immunol.*, 158 (2), 1997, p. 774-782.

BERGER-BÄCHI, B., ROHRER, S. 2002. Factors influencing methicillin resistance in *staphylococci*. In *Arch. Microbiol.*, 178, 2002, p. 165-171.

- BRADLEY, A. J. 2002. Bovine mastitis: An Evolving Disease. In *Veterinary J.*, 164, 2002, p. 116-128.
- BRADLEY, A. J., GREEN, M. J. 2002. The Changing of *E. coli* Mastitis. *Satelit Symposium, XXII WBC*. Hannover: Novel Aspects of Mastitis Therapy, 2002, p. 4-11.
- BRAMLEY, A. J., MCKINNON, C. H., STAKER, R. T., SIMPKIN, D. L. 1984. The effect of udder infection on the bacterial flora of the bulk milk of ten dairy herds. In *J. Appl. Bacteriol.*, 57, 1984, p. 317-323.
- BURDOVÁ, O. 2001. *Hygiena a technológia mlieka a mliečnych výrobkov*. Košice: UVL, 2001, 342 p.
- CARDOSO, H. F., SILVA, N., SENA, M. J., CAMARO, L. S. 1999. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. In *Let. Appl. Microbiol.*, 29, (5) 1999, p. 347-349.
- CROSSLEY, K. B., ARCHER, G. L. 1997. *The staphylococci in human disease*. New York: Churchill Livingstone. 1997.
- CUNNINGHAM, R., COCKAYNE, A., HUMPHREYS, H. 1996. Clinical and molecular aspects of the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bone and joint infections. In *J. Med. Microbiol.*, 44, 1996, p. 157-164.
- DESMASURES, A., BAZIN, F., GUEGUEN, M. 1997. Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. In *J. Appl. Microbiol.*, 83, 1997, p. 53-58.
- EN ISO 6888-1:1999, Mikrobiológia – Stanovenie počtu koagulázapozitívnych stafylokokov (*Staphylococcus aureus* a ďalšie druhy), horizontálna metóda s použitím Baird-Parkerovho agarového média.
- FIRINU, A., VIRGILIO, S., MULA, G., POGGIO, A., ZUCCON, D., PIRINO, T., SIAS, S., NORMANNO, G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N. C. et al. 2003. Presenza e caratterizzazione enterotossica di *Staphylococcus aureus* in alimenti di origine animale. *Industrie Alimentari XLII*, 2003, p. 613-617.
- FOSTER, T. J. 2004. The *Staphylococcus aureus* „superbug“. In *J. Clinin. Invest.*, 114, (12) 2004, p. 1693-1696.
- GARCIA, M. L., MORENO, B., BERGDOLL, M. S. 1980. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. In *Appl. Environm. Microbiol.*, 1980, p. 548-553.
- GOSBELL I. B., MERCER J. L., NEVILLE S. A. 2001. Non-multiresistant and multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired infections. In *Med. J.*, 174, 2001, p. 627-630.
- HAGE, K., TRAN, T. N. 2004. Isolation of *Staphylococcus aureus* from ron & postenrised milk. In *California State Sci. Fair J.*, 2004, p. 1311,
- HARTMAN, B., TOMASZ, A. 1981. Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. In Agents Chemother.*, 19, 1981, p. 726-735.
- HATTORI, M., OGASAWARA, N., HAYASHI, H., HIRAMATSU, K. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In *Lancet*, 357, 2001, p. 1225-1240.
- HEIN, I., JORGENSEN, H. J., LONCAREVIC, S., WAGNER, M. 2005. Quantification of *Staphylococcus aureus* in unpasteurised bovine and caprine milk by real-time PCR. In *Res. Microbiol.*, vol. 156, no. 4, 2005, p. 554-563.
- HIRAMATSU, K., HANAKI, H., INO, T., YABUTA, K., OGURI, T., TNOVER, F.C. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. In *J. Antimicrob. Chemother.*, 40, 1997, p. 135-136.
- HIRAMATSU, K., CUI, L., KURODA, M., ITO, T. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In *Trends Microbiol.*, 9, 2001, p. 486-493.
- HOFÍREK, B., HAAS, D. 2003. Kategorizace zdraví mléčné žlázy, klinické formy mastitid a jejich terapie. In *Sborník referátů odborného semináře Mastitidy skotu*. Brno 3. 5. 2003, 31, p. 10-23.
- HUTTON, C. T., FOX, L. K., HANCOCK, D. D. 1990. Mastitis control practices: Differences between herds with high and low milk somatic cell counts. In *J. Dairy Sci.*, 73, 1990, p. 1135.
- CHOI, C. S., YIN, C. S., BAKAR, A. A. 2006. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among healthy adults. In *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 39, 2006, p. 458-464.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION 1971. A monograph on bovine mastitis. Part 1. Economist, aetiology and diagnosis, *International Dairy Federation Annual Bulletin*, 1971.
- ITO, T., KATAYAMA, Y., HIRAMATSU, K. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. In *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1999, p. 1449-1458.
- JEVONS, M. P. 1961. 'Celbenin'- resistant staphylococci. In *Br. Med. J.*, 1, 1961, p. 124-125.
- JOHNSTON, C. P., STOKES, A. K., ROSS, T. 2007. *Staphylococcus aureus* colonization among healthcare workers at a tertiary care hospital. In *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 28, 2007, p. 1404-1407.
- JONES, T. F., KELLUM, M. E., PORTER, S. S., BELL, M., SCHAFFNER, W. 2002. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In *Emerging Infectious Diseases*, 8, 2002, p. 82-84.
- JØRGENSEN, H. J., MØRK, T., HØGÅSEN, H. R., RØRVIK, L. M. 2005. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. In *J. Appl. Microbiol.*, 99, (1) 2005, p. 158-166.
- JUHÁSZ-KASZANYITZKY, E., JANOSI, S., SOMOGYI, P., DAN, A., GRAAF-VAN, BLOOIS, L., DUIJKEREN, E., WAGENAAR, J. A. 2007. MRSA transmission between cows and humans. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 2007, p. 630-632.
- KARPÍŠKOVÁ, R., ŠTÁSTKOVÁ, Z., KARPÍŠKOVÁ, S. 2009. Nálezy metilicilin rezistentních *Staphylococcus aureus* u zvířat. In *Veterinářství*, 59, 2009, p. 34-38.
- KATAYAMA, Y., ITO, T., HIRAMATSU, K. 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 2000, p. 1549-1555.
- KEROUANTON, A., HENNEKINNE, J. A., LETERTRE, C., PETIT, L., CHESNEAU, O., BRISABOIS, A., DEBUYSER, M. L. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. In *Int. J. Food Microbiol.* 115, 2007, 3, p. 369-375.
- KIŠŠOVÁ, M. 2008. Molekulárna podstata rezistencie kmeňov *Staphylococcus aureus* na metilicín: Bakalárska práca, Brno: Masarykova univerzita, 2008, 57 p.
- KRASUSKI, A., MICHNOWSKA-SWINCOW, E., JARZEMBOWSKI, T. 2007. Cytidine deamination assay to differentiate *Staphylococcus aureus* from other staphylococci. In *Let. Appl. Microbiol.*, 45, (5) 2007, p. 497-503.

- LEE, J. H. 2003. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. In *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2003, p. 6489-6494.
- LE LOIR, Y., BARON, F., GAUTIER, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. In *Genet. Mol. Res.*, 312, (1) 2003, p. 63-76.
- LEMBO, A., KALIS, C., KIRSCHNING, C. J., MITOLO, V., JIRILLO, E., WAGNER, H., GALANOS, C., FREUDENBERG, M. A. Differential contribution of Toll-like receptors 4 and 2 to the cytokine response to *Salmonella enteritica* serovar *Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in mice. In *Infect. Immun.*, 71, (10), 2003, p. 6058-6062.
- LÍŠKOVÁ, A., DUBAJOVÁ, V., GLOSOVÁ, L., HANZEN, J., HUPKOVÁ, H., MACĚKOVÁ, L., MOLOKÁČOVÁ, M., NOVÁKOVÁ, E., PURGELOVÁ, A. 2004. Mení sa stav citlivosti najčastejších respiračných patogénov na antiinfekčné liečivá? In *Lekársky Obzor*, 53 (10), 2004, p. 369-371.
- MARTINEAU, F., PICARD, F. J., ROY, P. H., QUELLETTE, M., BERGERON, M. G. 1998. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. In *J. Clin. Microbiol.*, 36, 3, 1998, p. 618-623.
- MINOR, T. E., MARTH, E. H. 1976. *Staphylococci* and their significance in food. Elsevier Scient. Publ. Inc., Amsterdam, 1976, p. 99-125.
- MINOR, T. E., MARTH, E. H. 1972. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food intoxications. A review III. *Staphylococci* in dairy food. In *J. Milk Food Technol.*, 35, 1972, p. 77-81.
- NATIONAL COMMITTEE for CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) M31-A2. 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals approved standards. NCCLS, Wayne, Pa, USA, 2002.
- NORMANNO, G., CORRENTE, M., SALANDRA, G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N. C., PARISI, A., GRECOC, G., BELLACICCO, A. L., VIRGILIO, S., CELANO, G. V. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. In *International J. Food Microbiology*, 117, 2007, p. 219-222.
- OLIVEIRA, D. C., MILHEIRICO, C., DE LENCASTRE, H. 2006. Redefining a structural variant of *staphylococcal* cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. *Antimicrob. In Agents Chemother.* 50, 2006, p. 3457-3459.
- OMBUI, J. N., ARIMI, S. M., KAYIHURA M. 1992. Raw milk as a source of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and enterotoxins in consumer milk. In *East. Afr. Med. J.*, 69, 1992, p. 123-125.
- PINHO, M., DE LENCASTRE, H., TOMASZ, A. 2001. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant *staphylococci*. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 2001, p. 10886-10891.
- PYÖRÄLÄ, S. 2002. New strategies to prevent mastitis. In *Reprod. Domest. Anim.*, 37, (4) 2002, p. 211-216.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York, 253 p.
- SHOSHANI, E., LEITNER, G., HANOCHI, B., SARAN, A., SHPIGEL, N. Y., BERMAN, A. 1999. Mammary infection with *Staphylococcus aureus* in cows: progress from inoculation to chronic infection and its detection. In *J. Dairy Res.*, 97, (2) 1999, p. 155-169.
- SILVA, F. R. 2001. Isolation and molecular characterization of methicillin resistant coagulase negative staphylococci from nasal flora of healthy humans at three community institutions in Rio de Janeiro City. In *Epidemiology and Infection*, 127, 2001, p. 57-62.
- SMITANDI, A., STERNESJÖ, A. 2004. Prevalence of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in milk from large- and small-scale producers in Kenya. In *J. Dairy Sci.*, 87, 2004, p. 4145-4149.
- SOOMRO, A. H., ARAIN, M. A., KHASKHELI, M., BHUTTO, B., MEMON, A.Q. 2003. Isolation of *Staphylococcus aureus* from milk products sold at sweet-meat shops of Hyderabad (Pakistan). In *On Line J. Biol. Sci.*, 3, (1), 2003, p. 91-94.
- STROMMINGER, B., KETTLITZ, C., WERNER, G., WITTE, W. 2003. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. In *J. Clin. Microbiol.*, 41, (9) 2003, p. 4089-4094.
- TSEN, H. Y., Yu, G. K., HU, H. H. 1997. Comparison of type enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from geographically far distant locations by pulsed field gel electrophoresis. In *J. Appl. Microbiol.*, 82, (4), 1997, p. 485-493.
- VAN LOO, I. H., DIEDEREN, B. M., SAVELKOUL, P. H., WOUDEBERG, J. H., ROSENDAAL, R., VANBELKUM, A., LEMMENS-DEN TOOM, N., VERHULST, C., VANKEULEN, P. H., KLUYTMANS, J. A. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands. In *Emerging Infectious Diseases*, 13, 2007, p. 1753-1755.
- VASIE, M. 2001. *Mastitidy*. In: Choroby hovädzieho dobytku. Prešov: Vydavateľstvo M & M, 2001, s. 673-717.
- VASIE, M. 2007. Comparison of etiology of environmental mastitis in two herds of dairy cows. In *Slovak J. Anim. Sci.*, 40, (3), 2007, p. 132-140.
- VASIE, M., ELEČKO, J., FOTTA, M., BÍREŠ, J. 2008. Možnosti ovplyvnenia výskytu mastitíd u dojníc chovaných vo veľkovýrobných podmienkach. In: Zb. Ekológia a veterinárna medicína. UVL Košice, 2008, p. 303-308. ISBN 978-80-8077-084-6.
- WANG, Y., WU, C. M., LU, L. M., REN, G. W., CAO, X. Y., SHEN, J. Z. 2008. Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. In *Vet. Microbiol.*, 130, (1-2), 2008, p. 118-125.

Contact address:

MVDr. Pukáčová Jana, Regional Veterinary and Food Administration Dolný Kubín, Pelhřimovská 2055/7, 02601 Dolný Kubín, Slovakia, E-mail: jana.pukacova@gmail.com
 MVDr. Lucia Poľaková, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Institute of Hygiene and technology of milk, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: polakova@uvm.sk
 doc. MVDr. Eva Dudriková, PhD., University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Institute of Hygiene and technology of milk, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: dudrikova@uvm.sk