

PRESENCE OF *S. AUREUS* AND *ENTEROCOCCUS SPP.* IN GOAT'S CHEESE AND THEIR ANTIBIOTIC RESISTANCE

Lucia Pol'áková, Eva Dudriková, Juraj Gallo

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate strains of *Staphylococcus spp.* and *Enterococcus spp.* from artisanal goat's cheese during 30 days of ripening, and to determine their antibiotic resistance. Of the total received isolates, 53 (72.60%) isolates were confirmed as *Staphylococcus spp.*, from which was only 5.66% (n = 3) detected as *S. aureus*; and 91 (82.72%) isolates were confirmed as *Enterococcus spp.* by multiplex PCR. Antibiotic resistance was tested by disc diffusion method. The 69.81% (n = 37) of staphylococci and 56.04% (n = 51) *Enterococcus spp.* as resistant were detected to one and more antibiotic drugs. Staphylococci were resistant to penicillin 69.81%, ampicillin 49.06%, oxacillin 39.62%, erythromycin 20.75%, and gentamycin 16.68%. The highest resistance of enterococci was to cephalothin 42.86% and clindamycin 23.08%.

Keywords: *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, antibiotic resistance, goat's cheese

ÚVOD

Mikroflóra každého syra je jedinečná bez ohľadu na pridávanú štartovaciu kultúru alebo cielených sekundárnych mikroorganizmov (napr. plesne a kvasinky). V syroch sa vyskytujú nielen žiaduce mikroorganizmy pozitívne ovplyvňujúce vlastnosti syra, ale i nežiaduce mikroorganizmy, ktoré môžu negatívne ovplyvniť jeho senzorké a mikrobiologické vlastnosti (Beresford et al., 2001; Görner a Valík, 2004). EFSA (The European Food Safety Authority) podniká kroky na vytvorenie vhodného predpokladu bezpečnosti (Qualified Presumption of Safety (QPS)) vedúceho k bezpečnému ohodnoteniu mikroorganizmov používaných pri produkcii potravín a krmív (EFSA, 2007).

Stafylokoky predstavujú ubikvitárne baktérie, ktoré sa nachádzajú na koži a mukózných membránach teplokrvných zvierat a ľudí, a môžu byť izolované zo životného prostredia, napr. z pôdy, vzduchu, vody, ako aj z celej rady potravín vrátane fermentovaných mäsových výrobkov a syrov. Okrem toho, sú baktérie *Staphylococcus spp.* všeobecne považované za najfrekvencovanejšie sa vyskytujúce pôvodcov zápalu mliečnej žľazy prežúvavcov (Vasil', Elečko a Fotta, 2007). Rod *Staphylococcus spp.* zahŕňa 42 reálne opísaných druhov (DSMZ, 2009; DSMZ, 2010), ktoré sa tradične rozdeľujú na koagulázo-pozitívne (KPS) a koagulázo-negatívne stafylokoky (KNS). Koagulázo-negatívne stafylokoky (KNS) sú predominantnou skupinou baktérií izolovaných pri mastitidách na celom svete (Sampimonetal et al., 2009, Zadoks a Watts, 2009). Výskyt koagulázo-negatívnych stafylokokov v niektorých chovov kráv, oviec a kôz na Slovensku publikovali viacerí autori (Dudriková, 1998; Petřík et al., 2001, Vasil' et al., 2001, 2005; Pilipčincová et al., 2010). Na druhej strane, niektoré koagulázo-negatívne druhy ako *S. condimenti*, *S. equorum*, *S. piscifermentans*, *S. succinus* sa dávajú do spojitosti s potravinami a/alebo sa zapájajú do spontánnej fermentácie. Kmene ako *S. equorum* a *S. succinus subsp. casei* sú izolované zo zašpinyých a/ alebo z povrchu zrejúcich syrov (Bockelmann, 2002; Place et al., 2002; Place et al., 2003). Preto kmene týchto druhov stafylokokov môžu byť potenciálom pre budúcu aplikáciu v potravinách ako štartovacie alebo protektívne kultúry

(Seitter et al., 2011). Dominantnú flóru stafylokokov v prostredí a syrov predstavujú druhy *S. equorum* (39,0%) and *S. saprophyticus* (26,7%). Tieto dva druhy sú dominantnými na povrchu niektorých syrov zrejúceho pod mazom talianskeho pôvodu (Fontana et al., 2010). Dokonca niektoré štúdie navrhujú zahrnúť *S. equorum* ako súčasť štartovacích kultúr pre zrejúce syry pod mazom a polotvrde syry švajčiarskeho typu (Bockelmann, 2002; Irlinger, 2008). Prítomnosť *S. saprophyticus* je na syroch typická, zisťuje sa najmä v kyslom tvarehu a kozích syroch (Bockelmann and Hoppe-Seyler, 2001; Irlinger, 2008). Druh *S. aureus* je zriedka prítomný v úplne zrejúcich syroch, pretože má tendenciu vymiznúť počas obdobia zrenia v dôsledku prevládajúcich podmienok v syroch, ako je napríklad nízka vodná aktivita (a_w) v kombinácii s nízkymi hodnotami pH a produkciou bakteriocínov (Jorgensen et al., 2005). Bakteriocíny sú produkované baktériami mliečného kvasenia (BMK), ktoré tvoria významnú skupinu mikroorganizmov v surovom mlieku a výrobkov pochádzajúcich zo surového mlieka. K BMK patria aj najvýznamnejšie rody ako *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* a *Enterococcus* (Jay et al., 2005). Zvláštnu pozornosť je potrebné venovať enterokokom, ktoré predstavujú veľkú časť autochtonných baktérií. Na ich prítomnosť v mlieku a v mliečnych výrobkoch sú dva názory: (1) a to buď ako riziková alebo cudzorodá či nežiaduca flóra, ktorá poukazuje na nízku hygienu počas produkcie a spracovania mlieka ako dôsledku priamej kontaminácie (zvieracími a ľudskými fekáliami) a nepriamej kontaminácie (kontaminovanými vodnými zdrojmi, dojacími zariadeniami, povrchom vmena, uskladňovacími tankami na mlieko a pod.) (Gelsomino et al., 2002; Giraffa, 2002), (2) ako prospešná flóra prispievajúca k výrobe unikátnych tradičných produktov a nových medziproductov, v ktorých tieto mikroorganizmy majú ochranný účinok voči nežiaducej mikroflóre, resp. majú vlastnosti probiotických baktérií (Bhardwaj, 2008). BMK majú význam pri výrobe fermentovaných mliečnych výrobkov a syrov.

Cieľom práce bolo (1) získať z kozieho syra vyrobeného z nepasterizovaného mlieka bez pridania štartovacej

kultúry kmene rodu *Staphylococcus spp.*, identifikovať *S. aureus* a *Enterococcus spp.*, (2) potvrdiť ich pomocou

multiplexovej PCR a (3) stanoviť u získaných a potvrdených izolátov citlivosť k vybraným antibiotikám.

MATERIÁL A METODIKA

V roku 2010 sa uskutočnila izolácia kmeňov stafylokokov a enterokokov z 30 vzoriek kozieho syra vyrobeného v domácich podmienkach z nepasterizovaného kozieho mlieka bez pridania štartovacej mliekarenskej kultúry, zrejúceho 30 dní. Na analýzu sa odoberali vzorky kozieho syra v priebehu obdobia zrenia v pravidelných intervaloch (1d, 3d, 7d, 15d, 30d), ktoré sa spracovali podľa metódy **STN ISO 6887**. Stafylokoky sa získavali izoláciou na selektívno-diagnostickú pôdu Baird Parker (*Himedia laboratories, India*) pri 37 °C 24 hod. a enterokoky na selektívnom diagnostickom médiu *M-Enterococcus agar* (*Himedia laboratories, India*) pri 37 °C 24 - 48 hod. Z príslušných pôd sa sterilnou ézou odobralo 1 - 12 suspektných kolónii z každej vzorky, ktoré sa 2x purifikovali cez selektívno-diagnostickú pôdu podľa príslušnosti získaného izolátu. Čistota izolátov sa kontrolovala na krvnom agare (*Merck, Germany*). Takto purifikované izoláty sa konzervovali v BHI médiu (*Himedia laboratories, India*) s obsahom glycerolu (1:1) a skladovali pri -20 °C. Rodová príslušnosť suspektných izolátov *Staphylococcus spp.* a *Enterococcus spp.* sa uskutočnila pomocou fenotypových testov (1. Stafylokoky - plazmo-koagulázový test (*Imuna, Šarišské Michaľany*), katalázový test, farbenie podľa Grama; 2. enterokoky - katalázový test, PYRA - test (*Pliva Lachema, ČR*), farbenie podľa Grama, tvorba eskulínu) a genomických metód (1. Stafylokoky - pomocou multiplexovej PCR podľa **Strommenger et al. (2003)** a **Martineau et al. (1998)** za použitia primerov Sauni 1 a Sauni 2 amplifikujúcich 16 rDNA gén, ktorý je prítomný iba u kmeňov stafylokokov

a primerov Sau 1 a Sau 2 amplifikujúcich špecifické sekvencie prítomné iba u kmeňov *S. aureus* (SA) 2. Enterokoky - PCR metódou podľa **Ke et al. (1999)** za použitia primerov (Ent 1 5' - TAC TGA CAA ACC ATT CAT GAT G - 3'; Ent 2 5' - AAC TTC GTC ACC AAC GCG AAC - 3'; InKO1 5' - GGA GGA AGG TGG GGA TGA CG - 3', InKO2 5' - ATG GTG TGA CGG GCG GTG TG - 3' (**Martineau et al. (1996)**). Izolácia genomickej DNA získaných kmeňov sa uskutočnila pomocou 20 % Chelexu 100 (*Biorad, USA*). PCR produkty sa elektroforeticky separovali v 2 % agarozovom gély (*Invitroge, USA*) pri 100 V 90 mA 45 min a vizualizovali UV svetlom po ofarbení *Gold View (E coli)*.

U geneticky potvrdených kmeňov sa zisťovala citlivosť k vybraným antibiotikám pomocou diskovej difúznej metódy na Muller Hinton agare (*Himedia laboratories, India*). V prípade identifikovaných kmeňov rodu *Staphylococcus spp.* sa sledovala citlivosť k Ampicilín 10 µg/disk (AMP10), Vankomycín 30 µg/disk (VAN30), Erytromycín 15 µg/disk (ERY15), Oxacilín 5 µg/disk (OX5), Penicilín 10 U (P10), Tetracyklín 30 µg/disk (TET30), Chloramfenikol 30 µg/disk (CMP30), Gentamycín 10 µg/disk (G10) a kmeňov rodu *Enterococcus spp.* k Ampicilín 10 µg/disk (AMP10), Erytromycín 15 µg/disk (ERY15), Tetracyklín 30 µg/disk (TET30), Vankomycín 30 µg/disk (VAN30), Oflaxacín 5µg/disk (OFL5), Cefalotín 30 µg/disk (CLT30), Penicilín 10 µg/disk (P10), Chloramfenikol 30 µg/disk (CMP30), Klindamicín 2 µg/disk (CLI2) (*HiMedia Laboratories, India*). Výsledky sa interpretovali podľa **CLSI (2006)**.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z celkového počtu získaných izolátov sa doposiaľ preskúmalo 76 suspektných izolátov rodu *Staphylococcus spp.* a 110 suspektných izolátov rodu *Enterococcus spp.*, z ktorých pomocou multiplexovej PCR bolo potvrdených 53 izolátov ako *Staphylococcus spp.* a 91 izolátov ako *Enterococcus spp.* Z konfirmovaných izolátov stafylokokov boli tri izoláty identifikované ako *S. aureus*, čo predstavuje 5,66 % z celkového počtu. **Williams and Withers (2010)** uvádzajú, že najvyššia frekvencia výskytu alimentárnych patogénov prežívajúcich v syroch vyrobených na farmách je *S. aureus*, kde ho detegovali v 40 % z analyzovaných vzoriek syrov ale najmä zo syrov vyrobených z organického mlieka, kde ho detegovali v 7 prípadoch z 12 testovaných organických syrov vyrobených z nepasterizovaného mlieka. Všetky ostatné potvrdené izoláty *Staphylococcus spp.* boli plazmo-koagulázo negatívne a ani v jednom prípade nebola zaznamenaná prítomnosť hemolýzy na krvnom agare. Potvrdené kmene obidvoch rodov boli následne testované na antibiotickú rezistenciu k vybraným antibiotikám.

Z celkového počtu stafylokokov sa pomocou diskovej difúznej metódy zistilo 69,81 % kmeňov *Staphylococcus spp.* a 56,04 % kmeňov *Enterococcus spp.* rezistentných na jedno a viac použitých antibiotík.

Najvyššia antibiotická rezistencia u *Staphylococcus spp.* sa zaznamenala na penicilín 69,81 %, ampicilín 49,06 %, oxacilín 39,62 %, erytromycín 20,75 %, gentamycín 16,98 % a najnižšia na vankomycín 7,55 %, tetracyklín 5,66 % a chloramfenikol 1,88 %. Intermediálna citlivosť sa zaznamenala k štyrom použitým antibiotikám: erytromycín 16,98 %, gentamycín 13,21 %, tetracyklín 7,55 % a chloramfenikol 5,66 %. Súčasne sa zistili aj multirezistentné kmene. Rezistenciu k jednému antibiotiku malo 16,98 % stafylokokov. Najviac stafylokokov bolo rezistentných k dvom antibiotikám (18,87 %), k trom (13,21 %) a štyrom použitým antibiotikám (11,32 %). V jednom prípade bola zaznamenaná rezistencia k piatim použitým antibiotikám a v štyroch prípadoch bola zaznamenaná rezistencia k šiestim použitým antibiotikám. Celkovo bolo citlivých na všetkých osem vybraných antibiotík 30,16 % kmeňov *Staphylococcus spp.* Všetky tri získané kmene *S. aureus* boli rezistentné na ampicilín a penicilín (tab. 1). Výsledky našej práce korelujú s výsledkami iných autorov (**Resch et al., 2008; Zell et al., 2008; Faria et al., 2009**). **Soares et al. (in press)** pri zisťovaní celkového profilu antibiotickej citlivosti medzi stafylokokmi, odhalili, že najvyššie percento rezistencie bolo zistené pre penicilín (30,5%), následne ampicilín (24,8%), erytromycín (22,9%) a tetracyklín (15,2%). Najnižšia

rezistencia bola zistená pre cephalexín (6,7%), gentamycín (6,7%) and oxacilín (4,8%).

V prípade kmeňov rodu *Enterococcus spp.* bola najvyššia rezistencia zistená na antibiotiká cefalotín 42,86 % a clindamycín 23,08 %. Rezistencia k ďalším použitým antibiotikám bola veľmi nízka (tab. 2). Intermediálna citlivosť sa zistila k štyrom vybraným antibiotikám: cefalotín 36,26 %, erytromycín, vankomycín (16,68 %), oflaxacín 9,89 %. Počet multirezistentných kmeňov bol nízky, t.j. 21,57 %. Najviac kmeňov *Enterococcus spp.* malo rezistenciu k dvom antibiotikám (15,69 %), k trom (3,92 %) a v jednom prípade k štyrom antibiotikám (1,96 %). V predchádzajúcej našej štúdii, v ktorej sme sledovali antibiotickú rezistenciu kmeňov rodu *Enterococcus spp.* pochádzajúcich z kozieho mlieka, kozích syrov, srvátky a prostredia sme zistili veľmi vysokú rezistenciu k vybraným antibiotikám oproti teraz dosiahnutým výsledkom. Najvyššia rezistencia bola preukázaná ku klindamycínu (85,19 %), vankomycínu (65,43 %), ampicilínu (60,49 %), penicilínu (53,09 %), cefalotínu (50,62 %), erytromycínu (45,68 %), oflaxacínu (39,51 %) a najnižšia k tetracyklínu (18,52 %) a chloramfenikolu (13,58 %). Intermediálna citlivosť sa zaznamenala k siedmim antibiotikám: erytromycín (25,93 %), chloramfenikol (17,28 %), oflaxacín (16,05 %), cefalotín (14,81 %), tetracyklín (12,35 %) a rovnaké percento (2,47 %) sa zistilo k vankomycínu a klindamycínu. Rovnako i počet multirezistentných enterokokov bol vyšší, a to na päť (23,46 %), ďalej na sedem (17,28 %), dva (16,05 %) a tri (12,35 %) druhy použitých antibiotík. Súčasne sa zistilo, že tri kmene (3,70 %) sú rezistentné na osem použitých antibiotík a v jednom prípade (1,23 %) sa zistila rezistencia voči všetkým použitým antibiotikám (Pol'áková et al., 2010). Za posledných desať rokov pribudli štúdie dokazujúce u izolátov enterokokov z mlieka rezistenciu na rôzne typy antibiotík používaných aj v liečbe ľudí. Araya et al. (2005) u enterokokov izolovaných zo surového mlieka zistili rezistenciu na erytromycín, tetracyklín, chloramfenikol a u 8 % izolátov aj na vankomycín.

Šustáčková et al. (2003) u izolátov enterokokov zo surového mlieka zistili rezistenciu na chloramfenikol, tetracyklín a erytromycín. Fabianová et al. (2010) vo vzorkách surového kravského mlieka zistili najvyššiu citlivosť enterokokov (n = 46) na teikoplanín (97,9 %) a najvyššiu rezistenciu na tetracyklín. Rezistencia enterokokov na vankomycín predstavovala len 4,5 %. Cortéz at al. (2006) vyzolovali zo vzoriek kozieho mlieka 7 izolátov enterokokov, z ktorých boli rezistentné na vankomycín. Cupáková et al. (2010) uvádza, že všetky izoláty *E. faecalis* zo surového i pasterizovaného ovčieho mlieka boli rezistentné ku klindamycínu, cefalotínu a oflaxacínu. V prípade enterokokov pochádzajúcich z prvých strekov mlieka, Čanigová et al. (2010) zistili u 5 % izolátov (druh *E. faecalis*) rezistenciu na vankomycín, pričom sa vôbec v ich prípade nepotvrdila rezistencia na ampicilín a teikoplanín. Avšak u enterokokov izolovaných pôvodne z bazénových vzoriek mlieka títo autori nezistili rezistenciu na vankomycín, čo vysvetľujú náhodným výberom kolónií na izoláciu alebo pomerne nízkym výskytom vankomycín-rezistentných kmeňov enterokokov. Zistili však prekvapujúco vysoké percento izolovaných kmeňov rezistentných na tetracyklín (50 %).

Netreba zabúdať, že aj koagulázo-negatívne stafylokoky môžu byť rovnako ako *S. aureus* producentmi enterotoxínov a ako BMK môžu tvoriť biogénne aminy (Witte et al., 2008), čo môže viesť k vzniku alimentárnej intoxikácie. Okrem toho, z hľadiska patogenity je dôležitým kritériom pri hodnotení bezpečnosti ich prítomnosti: prítomnosť prenosných markerov rezistencie na antibiotiká. Kmene KNS izolovaných z potravín a klinických izolátov, sú často rezistentné na jedno alebo niekoľko antibiotík (Resch et al., 2008), čím sa stávajú zdrojom génu kódujúceho antibiotickú rezistenciu (Perrenten et al., 1997).

Tabuľka 1 Prehľad antibiotickej citlivosti kmeňov *S. aureus* k vybraným antibiotikám

Kmeň <i>S.aureus</i>	AMP 10			VAN 30			ERY 15			OX 5			P 10			TET 30			C 30			G10		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	S	I	R	I	S	R	I	S	R	I	S
1	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
2	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
3	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+

R- rezistentné, I- intermediálne citlivé, S- citlivé

Tabuľka 2 Percentuálny prehľad antibiotickej rezistencie *Enterococcus spp.*

	AMP10	VAN30	ERY15	CLT30	OFL5	P10	TET30	CMP	CLI2
R	2,20	3,30	1,10	42,86	1,10	2,20	9,89	0	23,08
I	-	16,48	16,48	36,26	9,89	-	13,19	0	8,79
S	97,80	80,22	82,42	20,88	89,01	97,80	76,92	100	68,13
Σ	100	100	100	100	100	100	100	100	100

R- rezistencia, I- intermediálna citlivosť, S- citlivosť

ZÁVER

Z našich výsledkov vyplýva, že syry vyrobené z nepasterizovaného mlieka bez pridania štartovacej kultúry nepredstavujú nebezpečenstvo výskytu

alimentárneho patogéna *S. aureus*, ak sú dodržané hygienické požiadavky pri získavaní mlieka, ktoré pochádza od zdravých jedincov podľa požiadaviek

Nariadenia ES č. 853/2004 v znení neskorších predpisov a netrpia zápalom mliečnej zľazy. Rovnako aj osoby, ktoré manipulujú s mliekom a mliečnymi výrobkami nie sú latentnými nositeľmi *S. aureus*. Nesmieme avšak zabúdať, že výrobky z nepasterizovaného mlieka môžu okrem bakteriálnych ochorení, byť potenciálnym rizikom prenosu vírusových ochorení. V súčasnosti však viacero autorov poukazuje na to, že potraviny sa stávajú možným

prostredím, v ktorom dochádza k výmene informácií o antibiotickej rezistencii medzi bakteriálnymi druhmi, čo následne cez potravinový reťazec môže ovplyvňovať liečbu pomocou antibiotík v humánnej medicíne. Okrem týchto uvedených rizík, výrobky bez tepelnej úpravy majú väčšiu diverzitu baktérií, ktoré môže podmieňovať tvorbu určitých špecifických vlastností daných výrobkov.

LITERATÚRA

ARAYA, M., DAVIDOVICH, G., CHAVES, C. 2005. Identification of *Enterococcus* sp. isolated from raw milk samples coming from the metropolitan area of Costa Rica and evaluation of its antibiotic sensibility pattern. In *Archivos Latinoamericanos de Nutricio*, vol. 55, 2005, no. 2, p. 161-166.

BERESFORD, T. P., FITZIMONS, N. A., BRENNAN, N. L., COGAN T. M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. In *Microbiol. Int. Dairy J.*, vol. 11, 2001, no. 4-7, p. 259-274.

BHARDWAJ, A., MALIK, R. K., CHAUHAN, P. 2008. Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. In *Indian J. Microbiol.*, vol. 48, 2008, no. 3. p. 317-325.

BOCKELMANN, W. 2002. Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. In *International Dairy Journal*, vol. 12, 2002, no. 2-3, p. 123-131.

BOCKELMANN, W., HOPPE-SEYLER, T. 2001. The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. In *International Dairy Journal*, vol. 11, 2001, no 4-7 p. 307-314.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2006. In *16th Informational Supplement. CLSI document M100-S16*. Wayne, PA, USA, 2006, 92p.

CORTÉS, C., De la FUENTE, R., CONTRERAS, A., SÁNCHEZ, A., CORRALES, J. C., RUIZ-SANTANITA, J. A., ORDEN, J. A. 2006. Occurrence and preliminary study of antimicrobial resistance of enterococci isolated from dairy goats in Spain. In *Internat. J. Food Microbiol.*, vol. 110, 2006, no 1, p. 100-103.

CUPÁKOVÁ, Š., DUŠKOVÁ, M., JANŠTOVÁ, B., NECIDOVÁ, L., KARPÍŠKOVÁ, R. 2010. Druhové zastoupení a rezistence enterokoků izolovaných ze syrového a pasterovaného ovčieho mléka. In *Celostátní přehledky sýrů 2010. Výsledky přehledů a sborník přednášek konference Mléko a sýry*. Praha leden 2010, s. 242-244. ISBN 978-80-7080-760-6.

ČANIGOVÁ, M., KREBS-ARTIMOVÁ, A., KROČKO, M., DUCKOVÁ, V. 2010. Antibiotická rezistencia enterokokov izolovaných z rôznych zdrojov v prvovýrobe mlieka. In *Celostátní přehledky sýrů 2010 Výsledky přehledů a sborník přednášek konference Mléko a sýry*. Praha leden 2010, p. 237-241, ISBN 978-80-7080-760-6.

DUDRIKOVÁ, E., PILIPČINEC, E., BURDOVÁ, O. 1998. Stafylokoky izolované z ovčieho mlieka iné ako *Staphylococcus aureus*. In: Zborník XIX. Hygiena alimetorum, ŠVS SR a UVL, Košice, 1998, 66-67.

DSMZ, 2009. Nomenclature up-to-date: Approved lists, validation lists. Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen. Retrieved from the web: <http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_infophp?genus=STAPHYLOCOCCUS>.

DSMZ, 2010. Bacterial nomenclature up-to-date (Approved lists, validation lists). Deutsche Sammlung für

Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig, Germany April 2010. Retrieved from the web: <<http://www.dsmz.de/download/bactnom/bactnamepdf>>.

EFSA, 2007. EFSA public consultation on the Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for the safety assessment of microorganisms deliberately added to food and feed. European Food Safety Authority. Retrieved from the web: <http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620759439.htm>.

FABIANOVÁ, J., DUCKOVÁ, V., ČANIGOVÁ, M., KROČKO, M. 2010. Výskyt enterokokov v kravskom mlieku a ich rezistencia na antibiotiká. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no 2, p 17-21, ISSN 1337-0960.

FARIA, C., VAZ-MOREIRA, I., SERAPICOS, E. NUNES, O. C., MANAIA, C. M. 2009. Antibiotic resistance in coagulase negative staphylococci isolated from wastewater and drinking water. In *Sci. Total Environ.*, vol. 407, 2009, no. 12, p. 3876-3882, ISSN: 0048-9697.

FONTANA, C., CAPPÀ, F., REBECCHI, A., COCCONCELLI, P. S. 2010. Surface microbiota analysis of Talleggio, Gorgonzola, Casera, Scimudin and Formaggio di Fossa Italian cheeses. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 138, 2010, no. 3, p. 205-211.

GELSOMINO, R., VANCANNEYT, M., COGAN, T. M., CONDON, S., SWINGS, J. 2002. Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, 2002, p. 3560-3565.

GIRAFFA, G. 2002. Enterococci from foods. In *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 26, 2002, no. 2, p. 163-171.

GÖRNER, F., VALÍK, E. 2004. In *Aplikovaná mikrobiológia požívateľin*. Malé Centrum, Bratislava, ISBN : 80-967064-9-7, 528 p.

IRLINGER, F. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 126, 2008, no. 3, p. 302-310.

JAY, J. M., LOESSNER, M. J., GOLDEN, D. A. 2005. *Modern Food Microbiology*. Springer Science, NY USA, 790 p. ISBN: 0-387-23180-3.

JORGENSEN, H. J., MØRK, T., RØRVIK, L. M. 2005. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. In *Journal of Dairy Science*, vol. 88, 2005, no. 11, 3810-3817.

KE, D., PICARD, F. J., MARTINEAU, F., MÉNARD, C. H., ROY, P. H., OUELLETTE, M., BERGERON, M. G. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. In *J. Clin. Microbiol.*, vol. 37, 1999, no. 11, p. 3497-3503.

MARTINEAU, F., PICARD, F. J., ROY, P. H., OUELLETTE, M., BERGERON, M. G. 1996. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. In *J. Clin. Microbiol.*, vol. 34, 1996, no. 12, p. 2888-2893.

MARTINEAU, F., PICARD, F. J., ROY, P. H., OUELLETTE, M., BERGERON, M. G. 1998. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid

- identification of *Staphylococcus aureus*. In *J. Clin. Microbiol.*, vol. 36, 1998, p. 618-623.
- PERRETEN, V., SCHWARZ, F., CRESTA, L., BOEGLIN, M., DASEN, G., TEUBER, M. 1997. Antibiotic resistance spread in food. In *Nature*, vol. 389, 1997, p. 801-802, ISSN 0028-0836.
- PETRÍK, P., TRÁVNIČEK, M., ČÍŽEK, M., FOTTA, M., MARDZINOVÁ, S. 2001. Identifikácia koaguláza negatívnych stafylokokov izolovaných zo surového mlieka oviec a kôz. In: *Zborník Aktuálne problémy epizootológie a infektológie, november 2001*, 142-146.
- PILIPČINCOVÁ, I., BHIDE, M., DUDRIKOVÁ, E., TRÁVNIČEK, M. 2010. Genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from Sheep milk in Slovakia. In *Acta Vet., Brno*, vol. 79, 2010, no. 4, p. 269-275. ISSN 0001-7213 (printed), ISSN 1801-7576 (electronic).
- PLACE, R. B., HIESTAND, D., BURRI, S., M. TEUBER, M. 2002. *Staphylococcus succinus* subsp. *Casei* subsp. nov., a dominant isolate from a surface ripened cheese. In *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 25, 2002, no. 3, p. 353-359.
- PLACE, R. B., HIESTAND, D., GALLMANN, H. R., TEUBER, M. 2003. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses, *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 26, 2003, no. 1, 30-37.
- POLÁKOVÁ, L., GALLO, J., DUDRIKOVÁ, E., FRIČOVÁ, L., CUPÁKOVÁ, Š., ŠPILOVSKÁ, S. 2010. Sledovanie antibiotickej citlivosti *Enterococcus spp.* In *III. Vedecká konferencia stretnutie mladých vedeckých pracovníkov v potravinárstve*. Gabčíkovo, 2.-3. december 2010, p. 285-291, ISBN 978-80-227-3411-0.
- RESCH, M., NAGEL, V., HERTEL, C. 2008. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. In *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 127, 2008, p. 99-104, ISSN: 0168-1605.
- SAMPIMONETAL, O. C., ZADOKS, R. N., DEVLIEGHER, S., SUPRE, K., HAESBROUCK, F., BARKEMA, H. W., SOL, J., LAM, T. J. G. M. 2009. Performance of API Staph ID 32 and Staph-Zym for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. In *Vet. Microbiol.*, vol. 136, 2009, p. 300-305, ISSN 0378-1135.
- SEITTER (NÉE RESCH), M., CHRISTIANE NERZ, CH., ROSENSTEIN, R., GÖTZ, F., HERTEL, CH. 2011. DNA microarray based detection of genes involved in safety and technologically relevant properties of food associated coagulase-negative staphylococci. In *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 145, 2011, no. 2-3, p. 449-458.
- SOARES, J. C., MARQUES, M. R., TAVARIA, F. K., PEREIRA, J. O., MALCATA, F. X., MANUELA M. PINTADO, M. M. in press. Biodiversity and characterization of *Staphylococcus* species isolated from a small manufacturing dairy plant in Portugal. In *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 146, 2011, no. 2.
- 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.*, vol. 43, 2003, p. 4089-4094, Online ISSN: 1098-660X, Print ISSN: 0095-1137.
- STN ISO 6887: 1997. In *Mikrobiológia. Všeobecné pokyny na prípravu riedení pri mikrobiologickom skúšaní*.
- ŠUSTÁČKOVÁ, A., NÁPRAVNÍKOVÁ, E., NAVRÁTILOVÁ, P. 2003. Potraviný živočišného pôvodu jako vektor rezistence k antibakteriálním látkam. In *Zborník Aktuálne problémy riešené v agrokomplexe*. Nitra, SPU, 2003, p. 328-342, ISBN 80-8069-295-5.
- VASIL, M., ELEČKO, J., FOTTA, M., JACKOVÁ, A., KALINÁČOVÁ, V., SIKLENKA, P. 2001. (Záverčná správa) Výskumný ústav veterinárnej medicíny Košice, 2001, 38 p.
- VASIL, M., ELEČKO, J., FOTTA, M. 2007. Výskyt baktérií *Staphylococcus spp.* v mlieku prežúvavcov. In: *Zborník Hygiena alimenterum XXVIII, Štrbské pleso-Vysoké Tatry, 2-4 mája. 2007*, 111-115, ISBN 978-80-8077-055-6.
- WILLIAMS, A. G., WITHERS, S. E. 2010. Microbiological characterisation of artisanal farmhouse cheeses manufactured in Scotland. In *Int. J. Dairy Technology*, vol. 3, 2010, p. 305-476.
- WITTE, W., CUNY, C., KLARE, I., NUBEL, U., STROMMINGER, B., WERNER, G. 2008. Emergence and spread of antibiotic-resistant Gram-positive bacterial pathogens. In *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 298, 2008, no. 5-6, p. 365-377, ISSN 1438-4221.
- ZADOKS, R. N., WATTS, J. L. 2009. Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. In *Vet. Microbiol.*, vol. 134, 2009, p. 20-28, ISSN 0378-1135.
- ZELL, C., RESCH, M., ROSENSTEIN, R., ALBRECHT, T., HERTEL, C., GOTZ, F. 2008. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. In *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 127, 2008, p. 246-25, ISSN 0168-1605.

Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA MŠ SR 1/0638/09 and KEGA MŠ SR no. 3/128-001UVL-4/2010.

Komenského 71, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: durikova@uvm.sk

MVDr. Juraj Gallo. Department of Food Hygiene and Technology, Institute of Milk Hygiene and Technology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenského 71, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: gallo44@gmail.com