



**Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје**  
**Факултет за ветеринарна медицина – Скопје**



Марија Јани Раткова Мановска

**“Ентеротоксогени соеви на стафилококи во млечната  
индустрија во Р.С. Македонија“**

Докторска дисертација

**Скопје, 2021**

Докторанд:  
МАРИЈА ЈАНИ РАТКОВА МАНОВСКА

Тема:  
“ЕНТЕРОТОКСОГЕНИ СОЕВИ НА СТАФИЛОКОКИ ВО МЛЕЧНАТА  
ИНДУСТРИЈА ВО Р.С.МАКЕДОНИЈА“

Лабораториските испитувања за докторската дисертација беа изработени во Лабораторијата за микробиологија на храна и добиточна храна и во Лабораторијата за молекуларни анализи на храна и генетски модификувани микроорганизми, при Институтот за храна на Факултетот за ветеринарна медицина - Скопје.

Ментор:

Проф.д-р Павле Секуловски,  
Факултет за ветеринарна медицина -Скопје

Датум на одбрана: 21.12.2021 година

Комисија за одбрана:

Проф.д-р Деан Јанкулоски (претседател)  
Факултет за ветеринарна медицина -Скопје

Проф.д-р Павле Секуловски,  
Факултет за ветеринарна медицина -Скопје

Проф.д-р Зехра Хајрулаи-Муслиу,  
Факултет за ветеринарна медицина -Скопје

Проф.д-р Велимир Стојковски,  
Факултет за ветеринарна медицина -Скопје

Проф.д-р Ромел Велев,  
Факултет за ветеринарна медицина -Скопје

На мојот татко.

На моето семејство, за животната сила, безрезервната поддршка и неизмерната  
љубов.

На раководството на ФВМ-С, моите соработници, колеги и пријатели, кои влијааа врз  
моето секојдневно професионално оформување и усовршување, за советите,  
укажаната доверба и поддршката во секој чекор од почетокот на докторските студии.

# СОДРЖИНА

Кратка содржина

Abstract

Листа на кратенки

1. ВОВЕД .....	14
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА .....	17
2.1 <i>Staphylococcus</i> spp. ....	17
2.1.1 Историјат .....	17
2.1.2 Таксономија .....	17
2.1.3 Морфологија и биохемиски карактеристики.....	18
2.1.4 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
2.1.5 Коагулаза-негативните стафилококи (CoNS).....	25
2.1.6 Вирулентни фактори кај стафилококите .....	27
2.1.7 Продукција на биофилм .....	30
2.1.8 Распространетост на стафилококите и стафилококните заболувања.....	32
2.2 Стафилококни ентеротоксини (SEs) .....	34
2.2.1 Поделба и номенклатура на SEs .....	34
2.2.2 Карактеристики на стафилококните ентеротоксини .....	36
2.2.3 Регулација на продукцијата на ентеротоксини.....	40
2.2.3.1 Регулација на продукцијата на класичните ентеротоксини (SEA-SEE).....	41
2.2.3.2 Регулација на некласичните ентеротоксини .....	43
2.2.4 Влијание на факторите поврзани со храната врз производството на ентеротоксини .....	44
2.2.5 Распространетост на ентеротоксоген <i>Staphylococcus aureus</i> во млекото и млечните производи.....	47
2.2.6 Алиментарни интоксикации предизвикани од стафилококните ентеротоксини (SFP) .....	49
2.3 Антимикробна отпорност.....	55
2.4 Регулација.....	60
3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО.....	63
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ .....	65

4.1 Материјал.....	65
4.2 Методи .....	65
4.2.1 Микробиолошки испитувања.....	65
4.2.1.1 Постапка за подготовка на мостри .....	66
4.2.2 Метод за енумерација на коагулаза позитивните соеви.....	66
4.2.3 Докажување на коагулаза позитивните стафилококи .....	67
4.2.4 Фенотипска идентификација на стафилококите .....	67
4.2.5 Фенотипско докажување на продукција на SEs од изолати со VIDAS SET2.....	68
4.2.6 Фенотипско докажување на антимикробна отпорност .....	69
4.3 Молекуларни анализи на изолатите .....	71
4.3.1 Молекуларна детекција на гени за продукција на ентеротоксини .....	72
4.3.2 Молекуларна детекција на гени за детекција на генот за идентификација на <i>S. aureus</i> - 23s, генот за продукција на нуклеазата- <i>nuc</i> генот, и генот <i>tesA</i> носител на резистентноста кон метицилин.....	74
4.3.3 Молекуларен метод за утврдување на 5 гени за продукција на биофилм со два мултиплекс протоколи.....	76
4.4 Анализа на параметрите за методи за детекција и идентификација .....	77
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА .....	78
5.1 Резултати од изолација, енумерација и фенотипска идентификација на соевите .....	78
5.1.1 Докажување на коагулаза позитивни соеви .....	78
5.1.2 Енумерација на коагулаза позитивни стафилококи.....	81
5.1.3 Фенотипска идентификација на <i>Staphylococcus</i> spp. ....	83
5.1.3.1 Фенотипска идентификација на изолати добиени од сурово млеко .....	84
5.1.3.2 Фенотипска идентификација на изолати добиени од млечни производи.....	86
5.1.3.3 Фенотипска идентификација на изолати добиени од брисеви .....	88
5.2 Молекуларна детекција на 23s генот и <i>nuc</i> генот за докажување на <i>S. aureus</i> со конвенционална PCR метода .....	90
5.2.1 Молекуларна детекција на 23s генот за докажување на <i>S. aureus</i> кај изолати од млеко .....	90
5.2.2 Молекуларна детекција на 23s генот за докажување на <i>S. aureus</i> на соеви изолирани од млечните преработки .....	91
5.2.3 Молекуларна детекција на 23s генот за докажување на <i>S. aureus</i> на соеви изолирани од брисеви.....	92
5.2.4. Молекуларна детекција на ген за продукција на нуклеаза.....	93

5.2.5 Споредбена анализа на резултатите за идентификација на <i>S. aureus</i> .....	95
5.3 Фенотипско докажување на продукција на SEs од изолати со методот VIDAS SET2....	96
5.3.1 Фенотипско докажување на продукција на SEs од изолати добиени од млеко со VIDAS SET2 .....	96
5.3.2 Фенотипско докажување на продукција на SEs од изолати од млечните преработки со VIDAS SET2.....	97
5.3.3 Фенотипско докажување на SEs во изолати од брисеви со VIDAS SET2 .....	98
5.4 Молекуларна идентификација на гени за продукција на ентеротоксини со конвенционален PCR .....	99
5.4.1 Детекција на гени за продукција на ентеротоксини кај изолатите од млеко со конвенционален PCR .....	100
5.4.2 Детекција на гени за продукција на ентеротоксини кај изолатите од млечни производи со конвенционален PCR.....	105
5.4.3 Детекција на гени за продукција на ентеротоксини кај изолатите од брисеви со конвенционален PCR .....	109
5.4.4 Споредбена анализа на резултатите за детекција на продукција на ентеротоксини .....	110
5.5 Молекуларна детекција на гени за продукција на биофилм со конвенционален PCR..	111
5.5.1 Молекуларна детекција на гени за продукција на биофилм кај изолатите од млеко .....	112
5.5.2 Молекуларна детекција на гени за продукција на биофилм кај изолатите од млечни производи.....	114
5.5.3 Молекуларна детекција на гени за продукција на биофилм кај изолатите од брисеви .....	115
5.6 Профил на фенотипска отпорност кон антибиотици на ентерогените соеви .....	116
5.6.1 Фенотипска антимикуробна отпорност на изолатите добиени од млеко .....	120
5.6.2 Фенотипска антимикуробна отпорност на изолатите добиени од млечни производи .....	123
5.6.3 Фенотипска антимикуробна отпорност на изолатите добиени од брисеви.....	125
5.7 Молекуларна детекција на генот за резистентност кон метицилин.....	127
5.7.1 Споредбена анализа на резултатите добиени за одредување на отпорност кон метицилин .....	129
6. ЗАКЛУЧОЦИ .....	131
7. ПРЕПОРАКИ.....	134
8. ЛИТЕРАТУРА.....	136

## КРАТКА СОДРЖИНА

Стафилококите како убиквитарни микроорганизми присутни се на различни површини во животната средина и животните, опремата за продукција на храна, храната како и кај човекот. Еден од најзначајните претставници на родот е *Staphylococcus aureus*, сигнификантен патоген за животните и за луѓето, пред се заради вирулентните својства кои може да ги поседува, како резултат на комбинација на гени кои продуцираат токсини, инвазивни компоненти и антибиотска резистентност. Способноста на соевите на *S. aureus* да продуцираат еден или повеќе стафилококни ентеротоксини (SEs) е поврзана со појавувањата на стафилококните труења со храна, кои се јавуваат при ингестија на храната која ги содржи. Интоксикациите со *S. aureus* од храна, обично се наведени како трети или четврти најчести болести во многу земји (по труењата предизвикани од *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, а понекогаш и *E. coli* O157).

За целите на ова истражување беа анализирани вкупно 1662 мостри, од кои 333 мостри млеко, 1160 мостри на млечни производи и 169 мостри на брисеви во период од 5 години (2016-2020). Соевите беа детектирани и докажани според ИСО 6888-1 „Хоризонтален метод за енумерација на коагулаза позитивни стафилококи,.. Фенотипска идентификација на соевите беше утврдена со употреба на GP картички на автоматизираниот систем за идентификација Vitek 2 (Biomerieux, Франција). За фенотипската детекција на способноста на соевите за продукција на ентеротоксини беше употребен mini VIDAS SET2 тест китот, кој претставува ензимски поврзан флуоресцентен тест (ELFA). Исто така фенотипски беше утврдена и антимикробната отпорност на соевите со картичката ASTP-580 на Vitek 2. Молекуларните анализи на изолатите опфатија: идентификацијата на 23s генот на *S. aureus*, *nuc*-генот, детекција на 11 гени за продукција на ентеротоксини (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *ser*, *sej* и *sep*), 5 гени за продукција на биофилм (*icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* и *bap*) и *mecA* генот носител на резистентност кон метицилин.

Утврдивме присуство на вкупно 215 (12.9%) соеви на стафилококи, со преваленца на коагулаза позитивни 9.6% и коагулаза негативни стафилококи 3.4% Според енумерацијата, 4.8% од мострите сурово млеко и 0.7% од млечните производи



беа незадоволителни според соодветната легислатива. Најзастапен од изолатите беше *S.aureus* 73.2% кај изолатите од млеко и 68.4% кај изолатите од млечните производи, додека кај брисевите, најзастапен беше *S. epidermidis* 37.5%. Со употреба на PCR методот, *S. aureus* беше утврден во поголем број на изолати во споредба со фенотипскиот метод. Соевите на *S. aureus* го поседуваа *nuc*-генот во следните проценти 98.9%/97.9%/66.7% за изолатите од млекото/млечните производи/брисевите, соодветно. Со фенотипскиот метод за докажување на продукција на SEs, mini VIDAS SET2, позитивна реакција добивме кај 41 изолат (33.3%) од изолатите од млекото, 29 (38.2%) од млечните производи и 2 (12.5%) од брисевите. Со PCR, гените за продукција на SEs, беа утврдени кај 85 (69.1%) соеви кај млекото, 38(50%) кај млечните преработки и 5 (31.6%) кај брисевите. Вкупно 18 ентеротоксогени изолати од сите мостри не беа *S. aureus*. Со молекуларниот метод утврдени беа 10 од испитаните 11 гени, најзастапени беа *seg* и *sei*, не беше откриен ниту еден изолат со *see* ген, а имаше изолати кои носеа од 1 до 5 гени. Гените за продукција на биофилм, беа детектирани кај 58.5% од изолати од млекото, кај 67.1% од изолатите од млечните производи и кај 56.3% од изолатите кај брисевите. Фенотипски, најголема отпорност соевите изолирани од млекото и млечните производи покажаа кон аминокликозидната група на антибиотици, потоа кон  $\beta$ -лактамските, додека кај изолатите од брисевите беше спротивно. Вкупно 15 соеви фенотипски покажаа отпорност на метицилин, од кои 6 беа стафилококи кои не се *S. aureus*. Генот за отпорност кон метицилин *mecA*, беше утврден кај 9 изолати, од кои 4 не беа *S. aureus*.

Овие резултати укажуваат на присуство на ентеротоксогени соеви на различни видови на стафилококи во испитаните мостри, што ја наметнува потребата од превземање на соодветна превентива, како правилната санитација и хигиенска практика, употреба на безбедни суровини, правилни навики при манипулација со готовите производи и потреба од понатамошно следење на состојбата со SEs со цел да имаме безбедна храна и превенција кон појавите на интоксикациите.

**Клучни зборови:** млеко, млечни производи, стафилококи, *S. aureus*, ентеротоксини, PCR, гени за биофилм, метицилин-резистеност.

## ABSTRACT

Staphylococci are ubiquitous microorganisms and can be present on various surfaces in the environment and animals, food production equipment, food as well as humans. One of the most important representatives of the genus is *Staphylococcus aureus*, a significant pathogen for animals and humans, primarily due to the virulent properties it may possess as a result of a combination of genes that produce toxins, invasive components and antibiotic resistance. The ability of the strains of *S. aureus* to produce one or more staphylococcal enterotoxins (SEs) is associated with the occurrence of staphylococcal food poisoning, which occurs when ingesting the food it contains. The occurrence of *S. aureus* food intoxications is usually listed as the third or fourth most common foodborne illness in many countries (after poisonings caused by *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, and sometimes *E. coli* O157).

For the purposes of this research, a total of 1662 samples were analyzed, including 333 samples of milk, 1160 samples of dairy products and 169 samples of swabs in a period of 5 years (2016-2020). The strains were detected and confirmed according to ISO 6888-1 "Horizontal method for enumeration of coagulase positive staphylococci". Phenotypic identification of the strains was determined using GP cards of the Vitek 2 automated identification system (Biomérieux, France). The mini VIDAS SET2 test kit, which works as an enzyme-linked fluorescence test (ELFA), was used for phenotypical detection of the ability of strains to produce enterotoxins. Antimicrobial resistance of the strains was also phenotypically determined with Vitek 2, AST P-580 card. Molecular analyzes of the isolates included: identification of the 23s gene of *S. aureus*, *nuc* gene, detection of 11 genes for the production of enterotoxins (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *ser*, *sej* and *sep*), 5 genes for biofilm production (*icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* and *bap*) and the *mecA* gene carrying methicillin resistance.

We determined presence of 215 (12.9%) strains of staphylococci in total, with a prevalence of coagulase positive 9.6% and coagulase negative staphylococci 3.4%. According to the enumeration, 4.8% of the raw milk samples and 0.7% of the dairy products were unsatisfactory according to the relevant legislation. The most common isolate was *S. aureus* with 73.2% in milk isolates and 68.4% in dairy isolates, while the most common in

swabs was *S. epidermidis* 37.5%. Using the PCR method, *S. aureus* was detected in a larger number of isolates compared to the phenotypic method. *S. aureus* strains possessed the *nuc* gene in 98.9% / 97.9% / 66.7% of milk / dairy products / swab isolates, respectively. With the phenotypic method for detecting of SEs production, mini VIDAS SET2, 41 isolates (33.3%) from milk isolates, 29 (38.2%) from dairy products and 2 (12.5%) from swabs gave a positive reaction. By PCR, genes for the production of SEs were detected in 85 (69.1%) strains in milk, 38 (50%) in dairy products and 5 (31.6%) in swabs. A total of 18 enterotoxigenic isolates from all samples were not *S. aureus*. The molecular method identified 10 of the 11 genes examined, the most common being *seg* and *sei*, no isolates with the *see* gene were detected, and there were isolates carrying from 1 to 5 genes. Genes for biofilm production were detected in 58.5% of milk isolates, 67.1% of dairy isolates and 56.3% of swab isolates. Phenotypically, the highest resistance of milk and dairy strains was detected against the aminoglycoside group of antibiotics, then to  $\beta$ -lactams, while in swab isolates it was the other way around. A total of 15 strains phenotypically showed methicillin resistance, of which 6 were non-*S. aureus* staphylococci. The methicillin *mecA* resistance gene was identified in 9 isolates, 4 of which were not *S. aureus*.

These results indicate the presence of enterotoxigenic strains of different types of staphylococci in the tested samples, which imposes the need to take appropriate prevention, such as proper sanitation and hygienic practice, use of safe raw materials, proper habits when handling finished products and the need for further monitoring of the condition with SEs in order to have safe food and prevention of intoxication.

**Keywords:** milk, dairy products, staphylococci, *S. aureus*, enterotoxins, PCR, biofilm genes, methicillin-resistance.

Кратенки	Значење на кратенката
µg/ml	Микрограм на милилитар
µl	Микролитар
mm	Милиметри
ng	Нанограм
AAD	Дијареа поврзана со антибиотици
<i>agr</i>	Регулатор на ацесорни гени
$a_w$	Активност на вода
BHI	Brain hearth infusion бџион
BlaZ	Ген за β-лактамази
BPA	Baird Parker Agar
bp	Базен пар
CA-MRSA	МРСА стекнат од заедницата (околината)
cfu/ml	colony forming units/ml Единици кои формираат колонии во милилитар
cfu/cm <sup>2</sup>	colony forming units/ cm <sup>2</sup> Единици кои формираат колонии на сантиметар квадратен
CoNS	Коагулаза негативни стафилококи
CPS	Коагулаза позитивни стафилококи
DNA	Дезоксирибонуклеинска киселина
EFSA	European Food Safety Authority
<i>egc</i>	Кластер на гени на ентеротоксини
Eh	Редокс потенцијал
ELISA	Ензимски поврзан имуносорбентски тест
FBO	Food borne outbreaks-Појави на труења од храна
<i>ica</i> ABCD	Оперон за продукција на биофилм
<i>icaR</i>	Регулаторен ген за оперонот <i>ica</i> ABCD
ID	Инфективна доза
ISO	International Organization for Standardization
kD	Кило далтон
LD	Летална (смртоносна) доза
log	Логаритам
LukED	Леукоцидин
MGES	Мобилни генетски елементи
<i>mecA</i>	ген за отпорност кон метицилин
MIC	Минимална инхибиторна концентрација
MRSA	Метицилин резистентен <i>S. aureus</i> (МРСА)
MSCRAMMS	Молекули на адхезивен матрикс
MSSA	Метицилин осетлив <i>S. aureus</i>
NA-MRSA	Болнички стекната МРСА
NaCl	Натриум хлорид

NAS	Стафилококи што не се <i>S. aureus</i>
<i>nuc</i>	Ген за продукција на нуклеаза
PIA	Полисахариден меѓуклеточен адхерин
PBP2a	Пеницилин поврзувачки протеин
PCR	Полимеразна верижна реакција
pIB485	Пеницилазен плазмид
pH	Активност на водородни јони (водороден показател)
PVL	Panton-Valentine леукоцидин
RNA	Рибонуклеинска киселина
Rot	Репресор на токсини
Sags	Супер антигени
SaPIs	Патогени острови на <i>S. aureus</i>
<i>sar</i>	Стафилококен ацесорен регулатор
SEAs	Секреторни ентеротоксини
SCC	Стафилококна хромозомска касета
SCCmecs	Стафилококна хромозомска касета на метицилин резистентни острови
SE(A-Z)	Стафилококни ентеротоксини (од А до Z)
Seg	Гени на стафилококни ентеротоксини
SEI	Стафилококен ентеротоксин I
Sels	Слични на стафилококни ентеротоксини
Ses	Стафилококни ентеротоксини
SFP	Стафилококно труење со храна
<i>spp.</i>	Вид
<i>ssl</i>	Кластер на слични на стафилококни ентеротоксини
<i>subsp.</i>	Подвид
TBE	Tris-Borate-EDTA
Tnase	Термонуклеаза
TSA	Триптон соја агар
TSST-1	Токсин на токсичен шок-1
VISA	Ванкомицин интермедиентен <i>S. aureus</i>
VRSA	Ванкомицин резистентен <i>S. aureus</i>
<i>vSa</i>	Геномски острови
WHO	Светска здравствена организација
<i>φent1, φent2</i>	Псеудогени
ЕУ	Европска Унија
САД	Соединети Американски држави
ФВМС	Факултет за ветеринарна медицина Скопје

## 1. ВОБЕД

*Staphylococcus aureus* е важен патоген заради комбинацијата на токсин-поврзаната вирулентност, инвазивноста и антибиотската резистентност. Токсин-поврзаната вирулентност се должи на способноста да продуцираат еден или повеќе стафилококни ентеротоксини (SEs) (Normanno и сор., 2005).

Една од најчестите болести која ја предизвикува *Staphylococcus aureus*, е стафилококното труење со храна (SFP), кое е резултат на ингестија на стафилококни ентеротоксини (SEs). Стафилококните ентеротоксини се произведени во храната од страна на ентеротоксогените соеви на коагулаза позитивни стафилококи (CPS), пред сè *S. aureus* (Ikeda и сор., 2005; Tirado и Schmidt, 2001, Janstova и сор., 2014).

Појавата на интоксикациите со *S. aureus* од храна, се обично трети или четврти најчести болести, предизвикани од храна во многу земји (на пример, се наоѓаат на листата по *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, а понекогаш и *E. coli* O157). За разлика од сите останати болести наведени во листата на најбројни, кои редовно се пријавуваат, се следат и се евидентираат, појавата на интоксикациите од стафилококи обично поминува неевидентирани или погрешно дијагностицирани. Тоа се должи на фактот дека таа е само-лимитирачка и обично се поврзува со домашна храна или со служење на веќе подготвена храна во угостителски објекти (Yasmine Motarjemi и сор., 2014).

Стафилококите и млечните производи се тесно поврзани со историјата на епидемиите на труење со храна низ целиот Свет. Особено, утврдувањето на *Staphylococcus aureus* како нивен причинител, несомнено претставува обележје во областа на истражувањата за безбедноста на храната. Првата забележана појава на стафилококно труење со храна (SFP) се припишува на конзумација на чедар сирење во Мичиген во 1884 година (Bergdoll, 1979). Неколку години подоцна, Барбер во 1914г. (Barber, 1914) ги утврдил како предизвикувачки агенси на труење со храна при конзумација на кравјо маститично млеко. *S. aureus* останува главен причинител на

болести кои се пренесуваат преку храна и тоа преку млекото и млечните производи, особено сирењата (De Buyser и сор., 2001, Delmas и сор., 2006). Вистинската застапеност не е соодветно евидентирана, но има и социјално и економско значење, во однос на губење на продуктивноста кај заболениот, земање на болнички денови и болнички сметки и секако загуби во индустријата со храна, кетеринг компаниите и рестораните (Argudín и сор., 2010, Rajković и сор., 2016).

Типизирањето на гените на стафилококните ентеротоксини (SEg), претставува значајна алатка за истовремено докажување на *S. aureus* и добивање информации за неговиот ентеротоксоген потенцијал. Постоечките комерцијални имунолошки китови ги детектираат само класичните SEs, додека поново откриените SEs се изоставени, и покрај тоа што се развиени широк спектар на дијагностички методи со цел да се разбере нивната потенцијална улога во SFP. До денес, молекуларните методи за детекција на гените одговорни за синтеза на SEs, претставуваат најосетлив и најсоодветен метод, кој се користи во последните две децении. Како резултат на овие методи, објавени се бројни студии за присуството на гени на не-класичните ентеротоксини при појава на SFP (Chao и сор., 2015; Johler и сор., 2015; Cheng и сор., 2016; Song и сор., 2016; Shen и сор., 2017; Umeda и сор., 2017). Сите податоци, најчесто потврдуваат присуство и на повеќе SEs, кои можат да придонесат за појава на SFP.

Некои автори сугерираат дека, проширувањето на постојните повеќекратни анализи е веројатно најефикасната стратегија за откривање на сите SEs (Liang и сор. 2015; Adhikari и сор. 2016; Nia и сор. 2016). Меѓутоа, постои загриженост во врска со високиот ризик од вкрстена реакција, кои бараат пообемни тестирања со цел да се развие оваа идеја.

Антимикробната отпорност е исто така многу важно прашање за јавното здравје во целиот Свет. Развикоот на резистентноста кај бактериските патогени секако е поврзана со екстензивната терапевтска употреба на антибиотиците или со нивната употреба како промотори на раст во производството на животни (Aestrup, 1999). Освен тоа што има голема патогена различност, *S. aureus* може брзо да се прилагоди на селективениот притисок на антибиотиците. Релевантен пример за тоа е метицилин резистентниот *S. aureus* (MRSA), кој е главна причина за повеќето од

нозокомијалните или „болнички“ инфекции на *S. aureus* (Pereira, 2009). Инфекциите предизвикани од метицилин резистентниот *S. aureus* (MRSA) се широко познати како причини за морталитет во целиот Свет (Pesavento, 2007; Ho, 2008; Ardic, 2010).

Од горенаведеното, може да се заклучи дека, во иднина кога се испитува експресијата на SEs, неопходно е да се земат во предвид повеќе аспекти. Тие аспекти се однесуваат на варијантите на токсинот, специфичностите на сојот на стафилококите и влијанијата на надворешните стресни фактори, околината или видот на храна што се испитува и при тоа резултатите не треба да се генерализираат. Сето ова ќе придонесе за предвидување и одржување на високи стандарди за безбедност на храната и подобрување на здравјето на луѓето и животните.



## 2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

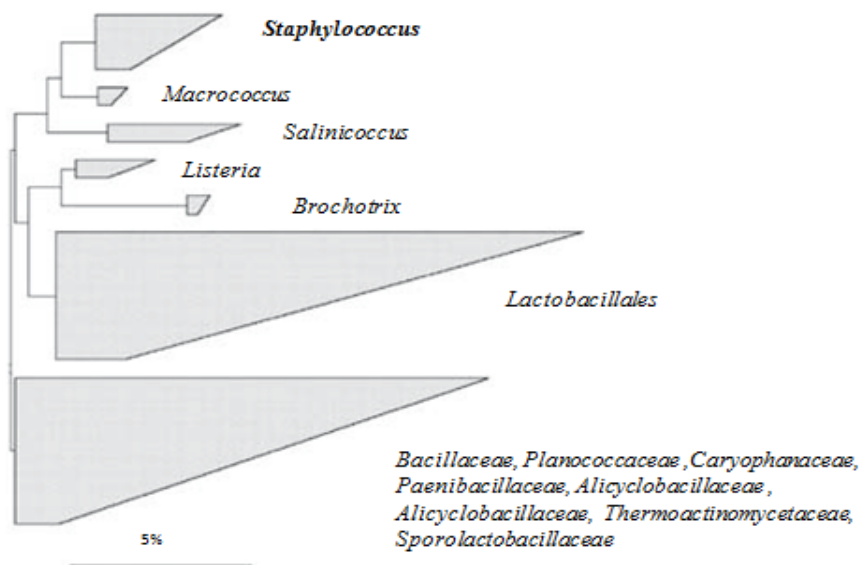
### 2.1 *Staphylococcus* spp.

#### 2.1.1 *Историјат*

Стафилококите за прв пат ги опишал шкотскиот хирург, г-дин Александар Огстон во 1882 година, гледајќи микроскопски препарат од содржината од апцес на колено. Огстон, опишувајќи ги групите на бактерии кои личат на грозје, го пронашол и нивниот најпатоген претставник *Staphylococcus aureus*. Четири години подоцна, А.Ј. Розенбах успеал да добие чиста култура на два вида на колонии на коки на цврст медиум. Колониите кои имале „златен“ изглед ги нарекол *Staphylococcus aureus*, додека колониите кои биле бели ги нарекол *Staphylococcus albus*, денеска познат како *Staphylococcus epidermidis* (Rosenbach, 1884).

#### 2.1.2 *Таксономија*

Името на родот *Staphylococcus* доаѓа од грчкиот збор „стаφυλή“, (стафиле) што значи "грозд" и "κόκκος", (кокос) или "зрно" со што е опишан и самиот изглед на бактеријата. Родот *Staphylococcus*, содржи Грам-позитивни бактерии со ниска содржина на DNA (дезоксирибонуклеинска киселина) G+C (33-40mol%) кои припаѓаат на фамилијата *Staphylococcaceae*, ред Bacillales, класа Bacilli, phylum Firmicutes (Koneman и сор., 2005, Brooks и сор., 2007). Како што е прикажано на слика 1, овој род е тесно поврзан со бацилите и други грам-позитивни бактерии со ниска содржина на DNA G + C, како што се ентерококи, стрептококи, лактобацили и листерија (Götz и сор., 2006).



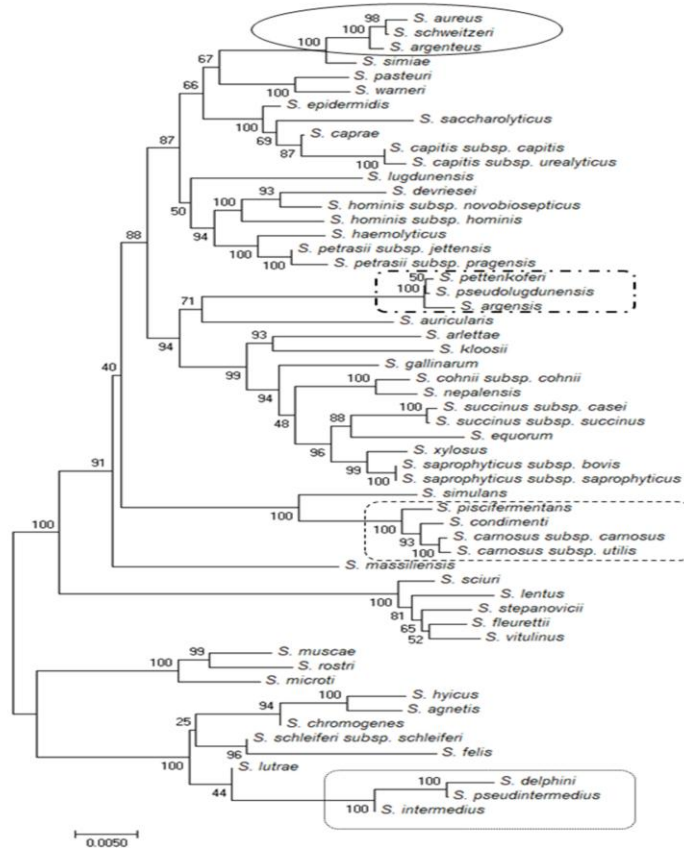
**Слика 1.** Филограм на родот *Staphylococcus* од ред Bacillales базирано на 16s rRNA анализа според Götz и сор., 2006. Должината на линијата изнесува околу 5% од претпоставената скала на секвенцата.

### 2.1.3 Морфологија и биохемиски карактеристики

Бактериите од родот *Staphylococcus* се Грам позитивни коки (0.5-1.5  $\mu\text{m}$  во дијаметар) кои може да бидат поединечни, во пар, во тетради, во кратки ланци (3 до 4 клетки) или во кластери во вид на грозје. Тие се факултативни анаероби, неспорогени, неподвижни, халотолерантни и продуцираат каталаза. Се јавуваат како патогени или коменсали кај животните и кај луѓето, имаат респираторен и ферментативен метаболизам, вршат спора ферментација на многу јаглени хидрати при што произведуваат млечна киселина но не произведуваат гасови (Argudin и сор., 2010). Растат добро на повеќе типови на микробиолошки подлоги, на крвен агар формираат 1-2 мм тркалезни и мазни колонии кои најчесто се пигментирани (од бела до темно жолта боја) и може да бидат опкружени со зона на  $\beta$ -хемолиза (Chanda и сор., 2010, Brooks и сор., 2007). Овие организми се отпорни на неповолни услови на животната средина, сува средина и на топлина (издржуваат температура од 50°C за 30 минути). Може да се изолираат од нефизиолошка средина дури и месеци по инокулацијата. Особена карактеристика е нивниот капацитет да растат во високи концентрации на сол, а повеќето од нив растат во средина со 10% NaCl (Schleifer и сор., 1981, Götz и сор., 2006; Vos и сор., 2009; Hennekinne и сор., 2010). Врската на

глицин-интерпептид во пептидогликанот на клеточниот ѕид ги прави подложни на лиза под дејство на лизостафинот, но се отпорни на лиза од лизозим (Kloos, 1884).

На почетокот на 21 век утврдени се околу 50 видови и подвидови (Gyles и сор., 2004). Видовите од родот се класифицирани врз основа на производството на ензимот коагулаза, во две главни групи: коагулаза позитивни (CPS), вклучувајќи ги видовите *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* и *S. delphini*; и коагулаза негативни (CoNS), каде има повеќе од 30 различни видови, при тоа *S. hyicus* е варијабилно коагулаза позитивен и често е вклучен меѓу коагулаза-негативните микроорганизми (Cunha, 2009a) (Слика 2). Поголемиот дел од бактериите од родот *Staphylococcus* се безопасни, воедно и нештетни, и нормално се наоѓаат на кожата и мукозните мембрани кај луѓето и други организми.



Слика 2. Филогенеза на родот *Staphylococcus* и еволутивните односи на стафилококите врз основа на 16S-23S rRNA регионот. Растојанијата беа пресметани со помош на методот Jukes-Cantor и анализите биле спроведени во MEGA7. (Kosecka-Strojek, 2019)

Врз основа на DNA секвенците од четири гени (16S rRNA, dnaJ, groB и tuf), стафилококите неодамна биле класифицирани во 15 групи, групирани во шест видови групи *Auricularis*, *Hyicus-Intermedius*, *Epidermidis-Aureus*, *Saprophyticus*, *Simulans* и *Sciuri* (Lamers и соp., 2012).

Табела 1. Видови во родот <i>Staphylococcus</i>						
Групи на видови						референци
<i>Auricularis</i>	<i>Hyicus-Intermedius</i>	<i>Epidermidis – Aureus</i>	<i>Saprophyticus</i>	<i>Simulans</i>	<i>Sciuri</i>	
	<i>S. chromogenes</i> *	<i>S. epidermidis</i> *	<i>S. xylosus</i> *	<i>S. simulans</i> **		De Visscher и соp., 2014
	<i>S. hyicus</i> *	<i>S. haemolyticus</i> **				Piessens и соp., 2011.
		<i>S. aureus</i> *				
<i>S. auricularis</i> *		<i>S. hominis</i> *	<i>S. equorum</i> <i>S. cohnii</i> *		<i>Sciuri</i> * <i>S. fleurettii</i> *	De Visscher и соp., 2014 Piessens и соp., 2011.
	<i>S. muscae</i>	<i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. nepalensis</i>	<i>S. piscifermentans</i>	<i>S. stepanovicii</i>	
	<i>S. microti</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. vitulinus</i>	
	<i>S. rostri</i>	<i>S. simiae</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. condimenti</i>	<i>S. pulvereri</i>	
	<i>S. agnetis</i>	<i>S. caprae</i>	<i>S. succinus</i>		<i>S. lentus</i>	
	<i>S. felis</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. arlettae</i>			
	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pasteurii</i>	<i>S. kloosi</i>			
	<i>S. lutrae</i>	<i>S. devriesei</i>	<i>S. pettenkoferi</i>			
	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. massiliensis</i>			
	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. jettensis</i>				
	<i>S. delphini</i>	<i>S. petrasii</i>				
		<i>S. argenteus</i>				
		<i>S. schwitzeri</i>				
*најчесто изолирани во случаи на маститис						
** овие 2 соеви освен во маститис се најчесто изолирани од околината (Piessens и соp., 2012)						

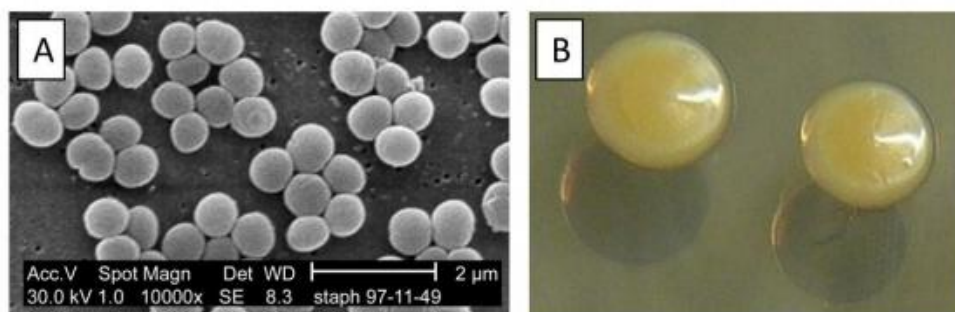
Со поновите испитувања утврдено е дека групирањето во посочените групи CPS и CoNS не е јасно ограничено, затоа што кај некои видови на CoNS забележана е активност на згрутчување на крвната плазма. На пример, неодамна соеви на *S. chromogenes* (23 од 42 изолати со почетни двосмислени видови идентификација) изолирани од биволи (*Bubalus bubalis*) со субклинички маститис во Бразил, биле докажани како причинители за згрутчување на крвната плазма, иако

авторите не го споменале тоа во преваленцата утврдена во нивната лабораторија (Dos Santos и сop., 2016).

Исто така било потврдено дека сите соеви на *S. aureus* не се коагулаза позитивни (Młynarczyk и сop, 1998). Иако, овој фенотип е редок, може да ја комплицира дијагнозата на *S. aureus* во лаборатории кои се потпираат на коагулаза тест, нагласувајќи ја употребата на методи за молекуларна идентификација кои имаат висока точност. Со оглед на отстапките кај соевите, некои истражувачи во поново време стафилококите ги групираат две групи: *S. aureus* и не-*aureus* стафилококи (NAS) за да се избегне евентуалната компликација во толкувањето (Condas и сop., 2017a, Condas и сop., 2017b).

### 2.1.4 *Staphylococcus aureus*

Поради производството на каротеноиден пигмент, колониите на овие бактерии се златни (жолти) по боја, оттаму и дошло името на видот „*aureus*“, што значи „златно,“. Преставува факултативен анаероб, макроскопски колонијата има раст од 6-8mm во дијаметар, округла е со јасни рабови, транспарентна и мазна. Може да расте во широк опсег на температури (6–48° C со оптимални 35–41°C), pH (од 4 до10, оптимална од 6-7), активност на вода ( $a_w = 0.83 \geq 0.99$ , оптимална 0.99) и концентрации на NaCl од 0-20% (Schmitt и сop., 1990, Shelin и сop., 2011, Hennekinne и сop., 2012).



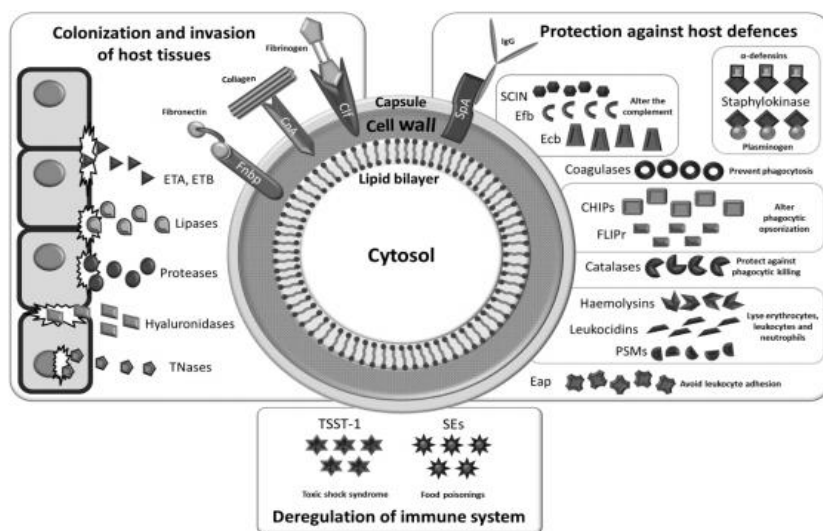
Слика 3. (3-A) Морфологија на *S. aureus* под скен-електронска микроскопија (CDC ID #6486), (3-B) колонии на *S. aureus* на Тryptic soy агар

*S. aureus* често може да се најде како дел од нормалната микробиолошка флора кај луѓето и животните. Кај луѓето може да е нормално присутен на кожата, назофаринсот, вагината и гастроинтестиналниот тракт, но често се наоѓа и во

болници на различни делови од опремата и кај пациентите. *S. aureus* е утврден кај 30-50% од човечката популација, како транзиторен или постојан член на микробиотата, без да предизвика било каква симптоматологија (Partida и сор., 2010). Нормалната кожа и мукозните мембрани се ефикасни бариери кои го спречуваат продорот на овој патоген во ткивата. Кога таа бариера од некоја причина е разорена пр. повреда, операција или некој друг медицински третман, *S. aureus* е способен да продре во ткивото и да предизвика инфекција (Levinson, 2006). Познат е уште како еден од најчестите опортунистички патогени, кој може да произведе најразлични вирулентни фактори (на пр. токсини, фактори за инвазивност и отпорност на антибиотици). Врз основа на различните комбинации на тие вирулентни фактори, може да предизвика широк спектар на симптоми, почнувајќи од појава на фурункули, апцеси, импетиго, па се до појава на токсичен шок синдром, ендокардитис, остеомиелитис, и септикемија (Le Loir и сор., 2003). Освен кај луѓето, *S. aureus* е исто така способен да предизвика разновидни инфекции кај животните (на пример, маститис, синовитис, артритис, ендометритис, фурункули, гноен дерматитис, пиемија и септикемија), што може да има значителни економски загуби во прехранбената индустрија (Schleifer и Bell, 2009). Производството на различни токсини и способноста да создаваат биофилмови, се двата главни вирулентни фактори на *Staphylococcus* spp., кои влијаат на патогенезата кај неговиот домаќин. Има мултифакторијални вирулентни способности, кои вклучуваат широк спектар на површински и внатрешни фактори, кои пак содржат цела палета на различни биохемиски ентитети, вклучувајќи протеини, полисахариди, пептидогликани. Некои од овие фактори се способни да го избегнат одбранбениот механизам на телото и му овозможуваат на *S. aureus* да продре во ткивата, да ги колонизира и да се шири на други ткива. Воочено е дека постои поврзаност меѓу подврстите на *S. aureus* и одредени болести кај кои биле изолирани, како и експресија на одредени фактори, што укажува на нивната важност и патогеност.

Факторите на вирулентност не се пронајдени кај сите подврсти на *S. aureus*, уште повеќе што оваа бактерија се смета дека постојано ги изненадува научниците со откривање на нови и поинакви фактори одговорни за патогеност (Koneman и сор. 2005). Тие вклучуваат производство на коагулаза, хемолизин, ентеротоксини,

биофилм и механизми за избегнување на имунолошкиот систем на домаќинот. *Staphylococcus aureus* и другите видови на коагулаза-позитивни стафилококи произведуваат ензим наречен коагулаза кој делува како тромбин, т.е го конвертира фибриногенот во фибрин. Фибринот се формира на местото на инфекција т.е кај продорот на патогенот и претставува бариера за фагоцитите кои имаат потешкотии да го разградат, со што патогенот се заштитува од имунолошкиот систем на домаќинот. Хемолизините се други важни протеини произведени од стафилококите и други бактериски видови кои ги лизираат црвените крвни клетки на домаќинот и предизвикуваат клеточна смрт. Иако *S. aureus* се смета за екстрацелуларен патоген, може да ги избегне оксидативните дејства на фагоцитите во различни клетки на цицачите и да се размножува во клетката-домаќин. Неодамна, студијата на Kubica и соработниците (Kubica и сор., 2008) открива дека *S. aureus* користи различна техника при интеракција со макрофаги. Наместо брзо убивање на клетката-домаќин, патогенот преживува во макрофагот до четири дена, пред да се размножи и да се лизира клетката. Еден важен ензим што игра клучна улога во опстанокот на овој организам во рамките на макрофагите е производството на каталаза. Каталазата го разложува водородниот пероксид (еден од главните играчи во оксидативниот стрес) до вода и кислород. Макрофагите потенцијално би можеле да бидат средство за ширење на *S. aureus* во рамките на домаќинот.



Слика 4. Главни патогени детерминанти на *S. aureus* (Sánchez, 2014)

Факторите на вируленција кои ги поседува *S. aureus*, а кои му овозможуваат да инфицира различни ткива на домаќинот се:

1) **Површински протеини**- за да може патогенот да ја започне инфекцијата, најнапред треба да стигне до ткивото и да се прилепи за клетките на домаќинот или за ткивото. За таа цел *S. aureus* излучува протеини кои му овозможуваат прифаќање за протеините на домаќинот. Таков фактор на пр. е фибриноген врзувачкиот фактор (clumping factor), но постојат и други (Bjerketorp, 2004).

2) **Фактори кои им овозможуваат ширење на бактериите во ткивата.** Тие вклучуваат леукоцидин, кинази, хијалуронидаза. Леукоцидинот е супстанција која ги уништува леукоцитите или ја инхибира нивната активност, т.е ја спречува фагоцитозата која претставува една од клучните механизми на одбрана против стафилококите. Хијалуронидазата го хидролизира интрацелуларниот матрикс во ткивата составен од кисели мукополисахариди и на тој начин им овозможува на коките да се прошират на соседните делови во ткивото.

3) **Површински фактори кои ја инхибираат фагоцитната ингестија.** Такви фактори се капсулата и протеинот А. Капсуларниот полисахарид ја попречува одбраната на домаќинот преку инхибиција на врзувањето на антителата. Протеинот А ја врзува молекулата на IgG во погрешна насока и со тоа ја нарушува фагоцитозата и опсонизацијата.

4) **Каротеноиди и каталазата** се биохемиски фактори кои ја зголемуваат веројатноста *S. aureus* да ја преживее фагоцитоза. Каротеноидниот пигмент има антиоксидативна активност и му помага на патогенот да го избегне уништувањето од страна на реактивниот кислород што го користи организмот за да се одбрани. Каталазата го инактивира токсичниот водород пероксид, формиран во фагоцитните клетки по ингестијата на микроорганизмите.

5) **Фактори за маскирање** – овозможуваат *S. aureus* да не биде препознаен од страна на имунолошки систем. Тука спаѓаат протеин А, коагулаза и фактор на згрутчување. Коагулазата е екстрацелуларен протеин кој се врзува за протромбинот и станува ензимски активен при што ја катализира конверзијата на фибриноген во фибрин. При тоа се создаваат фибрински облоги околу самите стафилококи кои ги штитат бактериите од имунолошкиот одбранбен систем на домаќинот-организам.



Факторот на згрутчување на сличен начин создава бариера околу стафилококите со која се заштитени.

6) **Токсини** кои ја оштетуваат т.е ја лизираат клеточната мембрана на еукариотите се: хемолизин, леукотоксин, леукоцидин Panton-Valentine (PVL). Алфа-хемолизин е најпознатиот токсин што ја оштетува мембраната, се врзува за чувствителните клетки како што се моноцитите кои имаат  $\alpha$ -хемолизин рецептори, а потоа создава пори низ кои може да поминуваат катјоните, а крајниот исход е клеточно лизирање. Бета-токсинот ги оштетува мембраните богати со липиди. Гамма-токсинот наречен леукотоксин дејствува заедно со леукоцидин и ги оштетува леукоцитите и липидните мембрани. Делта-токсинот е мал пептид кој го создаваат речиси сите под видови на *S. aureus*, но неговата улога сè уште не е добро позната.

7) **Егзотоксини** кои го оштетуваат ткивото на домаќинот и предизвикуваат симптоми на болеста се стафилококни ентеротоксини (SEA до SEIZ), TSST, ET. *S. aureus* секреторните ентеротоксини (SEAs) и токсин на синдром на токсичен шок (TSST-1) се два вида токсини со супер антигенска активност (McCormick и сор., 2001)

8) **Фактори одговорни за отпорност на антибактериски супстанции** (Kopelman и сор., 2005, Gyles и сор., 2004). Докажано е дека губењето на само еден фактор не влијае значително на фенотипот на вирулентност (Kropes и сор., 2005). Според тоа патогеноста на *S. aureus* зависи не само од соодветната внатрешна улога на секој поединечен фактор, туку и од нивната интеракција (Meier и сор., 2001).

### **2.1.5 Коагулаза-негативните стафилококи (CoNS)**

Коагулаза-негативните стафилококи (CoNS) многу често се наоѓаат кај луѓето, и кај животните и може да се појават и кај храната. Тие се дел од нормалната флора, можат да предизвикаат инфекции само доколку надворешните бариери на кожата или слузокожата се оштетени поради рани, импланти на туѓо тело, односно стануваат патогени само во одредени околности и инфекциите што ги предизвикуваат најчесто се поврзани со присуство на туѓи тела во организмот. Бактериите што припаѓаат на оваа група воглавно се помалку вирулентни и изразуваат само неколку фактори на вирулентност (Longauer и сор., 2006). Интересот за овие соеви почнал да се зголемува заради нивната зголемена важност во болничките инфекции и присутноста во

клиничката микробиологија, и нивната способност да колонизираат катетри и друга опрема, доведувајќи до бактеремии и можни сепси (Brooks и соp., 2007, Cunha и соp., 2009б). Тешко е да се разликуваат патогените CoNS од оние непатогени кои се појавуваат како нормална флора, бидејќи нивните вирулентни фактори сè уште не се добро дефинирани или испитани. Сепак, спроведени се студии со CoNS, во кои кај овие видови се испитуваат веќе познатите фактори на вирулентност како кај *S. aureus*. Резултатите покажале дека CoNS поседуваат некои од факторите, со што е заклучено дека CoNS треба да се сметаат за исто толку опасни како што е опасен и *S. aureus* за луѓето и за животните (Türkyilmaz и Kaya, 2006). Дobar пример за една таква непатогена/патогена бактерија од родот *Staphylococcus* е *Staphylococcus epidermidis*. Тој може да биде разновиден по својата патогеност. Некои подвидови на *S. epidermidis* се агресивни и предизвикуваат сериозни инфекции, додека други се непатогени, во некои случаи дури и корисни организми (Zhang и соp., 2003). Таа бактерија е присутна на кожата ( $10^3$ - $10^4$  cfu/cm<sup>2</sup>кожа) на речиси сите здрави луѓе каде што има заштитна улога зафаќајќи го местото на кожата и слузницата и спречувајќи го прифаќањето на патогените бактерии за нив. Како член на нормалната флора, таа игра двојна улога – во одржувањето на здравјето и во предизвикување на болести. Иако овие бактерии не се патогени на вообичаените анатомски места, тие можат да бидат патогени на други делови на телото, за кои не се нормална флора. Болестите најчесто се предизвикуваат кај луѓе со ослабен имунолошки систем (Levinson и соp., 2006).

За разлика од *S. aureus*, малку се знае за механизмот на патогеност на *S. epidermidis*. Познати се некои вирулентни фактори на *S. epidermidis* како делта-токсинот, хемолизинот, липазата и протеазата (Michelim и соp., 2005). Способноста да формираат биофилмови на пластични уреди (како што се катетри и медицински протези) се смета за главен вирулентен фактор на *S. epidermidis*, но и други коагулаза-негативни стафилококи. Биофилмот може да се опише како заедница на микробиолошки клетки прилепени на одредена површина (ткиво или имплант). Адхезијата е проследена со пролиферација, а се покажало дека производството на биофилм е под генетска контрола (Longauerova и соp., 2006). Други видови бактерии кои припаѓаат на CoNS се ретко патогени, како што се *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S.*

*hominis*, *S. capitis*, *S. intermedius*, *S. schaleiferi*, *S. simulans*. *S. lungdunesis* е ново откриен вид и веројатно е повеќе патоген од другите CoNS што предизвикуваат инфекции како што се ендокардитис, остеомиелитис и сепса. Одредени CoNS се специјално дистрибуирани само во одредени области на телото, *S. capitis* на главата, *S. auricularis* на надворешниот аудитивен канал, *S. saprophyticus* во делот помеѓу вагината и дебелото црево (перинеум) и воделот на препоните (Longauerova и сор., 2006).

Некои бактерии од родот *Staphylococcus* дејствуваат како корисни бактерии. Некои од нив, ин витро можат да произведат антивирусна супстанција која има инхибиторен ефект врз одредени вируси во ткивна култура или ин виво кај лабораториски животни. *S. haemolyticus* и некои други стафилококи поседуваат еден тип на ензим липаза. Овие ензими имаат уникатни својства – хирална селективност и селективност според должината на синцирот и благодарение на овие карактеристики тие се користат масовно во индустриското производство и синтеза на масни киселини, масла, масти, естри и пептиди.

Има докази дека стафилококните хромозомски касети се идентификувани и кај други *Staphylococcus* spp., конкретно во CoNS (Hanssen и сор. 2007, Mombach и сор., 2007). Студиите посочуваат дека CoNS најверојатно се резервоари за повеќе типови SCC<sub>mec</sub> и се потенцијално извор за нови типови и варијанти, што ги поддржува шпекулациите дека SCC потекнува од CoNS (Hanssen и сор., 2007, Hisata и сор., 2005). Дополнително во harboring касетите, CoNS обично се поотпорни на метицилин и други антимикуробни агенси, а исто така и почесто го носат генот *mecA* во споредба со *S. aureus* (Chang и сор., 2007, McKay, 2008, Sidhu и сор., 2007).

### **2.1.6 Вирулентни фактори кај стафилококите**

Со цел да се идентификуваат видовите бактерии од родот *Staphylococcus* кои се потенцијално способни да предизвикаат болести, во соодветните лаборатории се вршат испитувања за присуство на т.н. вирулентни фактори кои служат како еден вид маркер за откривање на патогени бактерии (Bler, 1962). Факторите на вирулентност може да се поделат во две категории: фактори кои им овозможуваат на коките да го колонизираат домаќинот и да развијат инфекција, и оние фактори кои го оштетуваат

ткивото или ја нарушуваат нормалната функција на ткивото. Во првата категорија спаѓаат фактори како што се коагулазата и леукоцидинот, а во втората категорија се вклучуваат токсините и хемолизинот. Основните чекори во развојот на инфекцијата предизвикана од бактериски патогени се: 1) прифаќање и влегување во телото, 2) одбрана на домаќинот од патогени микроорганизми, 3) ширење на инфекција и појава на повеќе фокуси на инфекција, 4) директно оштетување на домаќинот или индиректно преку сопствениот одбранбен систем создаден против патогените, и 5) пренос на инфекција од еден организам на друг (Gyles и сор., 2004).

Бактериите предизвикуваат болест преку два главни механизми: инвазија и производство на токсини. Инвазијата е способност да навлезат во ткивата. Овој механизам вклучува механизми за колонизација (адхезија и почетно размножување), производство на екстрацелуларни супстанции кои ја поддржуваат инвазијата и способност да се заобиколат одбранбените механизми на домаќинот. Бактериите можат да произведат два вида токсини - егзотоксини и ендотоксини. Егзотоксините се ослободуваат од бактериските клетки и можат да дејствуваат на ткивата далеку од местото каде што растат бактериите. Ендотоксините се супстанции врзани за клетките (на пример, компоненти на липолисахаридната мембрана). Некои бактериски токсини, исто така, може да играат важна улога во инвазијата (Levinson и сор., 2006). За да се утврдат факторите на вирулентност кај стафилококите, потребно е да се опфатат следниве тестови: тест за коагулаза, тест за DNase, тест за термонуклеаза (TNase), тест за капсули, формирање слуз, формирање на биофилм, тест за хемолизин, тест за продукција на токсин (Türkyilmaz и Kaya, 2006, Bler, 1962).

Стафилококната нуклеаза е термостабилна нуклеаза кодирана од *nuc* генот, која ги хидролизира DNA и RNA во клетките домаќини, предизвикувајќи уништување на ткивото и ширење на стафилококите (Hu и сор., 2013). Исто така, го промовира „бегството“, на микроорганизмите кога тие се задржуваат од страна на неутрофилните екстрацелуларни стапици (NETs), овозможувајќи им на бактериите да го избегнат овој одбранбен механизам на домаќинот (Kennedy и сор., 2017). Со децении, генот *nuc* се смета за златен стандард за идентификација на *Staphylococcus aureus* и се уште се користи (McClure и сор., 2017, Torres и сор., 2019). Сепак, *nuc* генот е откриен кај стафилококи од животинско потекло, кои не се *S. aureus* (Gudding, 1983). Покрај

тоа, стафилококната термонуклеаза е биофилмски инхибитор што ја деградира DNA од животната средина поврзана со биофилмот (Mann и сор., 2009).

Патогеноста е механизмот со кој микроорганизмот предизвикува болест кај домаќинот. Степенот на патогеност на микроорганизмите се изразува со терминот вирулентност што е квантитативна мерка за патогеност и се мери како број на организми потребни за да предизвикаат болест. 50% смртоносна доза ( $LD_{50}$ ) е бројот на микроорганизми потребни за да се убијат половина од сите заразени организми, и 50% инфективна доза ( $ID_{50}$ ) е бројот потребен за да предизвика инфекција кај половина од изложените домаќини. Детерминанти на вирулентноста на патогенот се неговите генетски или биохемиски или структурни карактеристики, што овозможуваат патогенот да предизвика болест кај домаќинот. Односот помеѓу патогенот и домаќинот е динамичен, бидејќи секој ги менува активностите и функциите на другиот. Исходот од таквиот однос зависи од вирулентноста на патогенот и релативниот степен на отпорност или подложност на домаќинот, што пак е во голема мера условено од ефективноста на одбранбениот систем на домаќинот. Патогените стафилококи често имаат и дополнителни генетски елементи како што се плазмиди, „патогени острови“ (кластери на DNA кои содржат гени поврзани со патогеност) и транспозони. Гените кои што ја кодираат продукцијата на токсини или отпорност на антибактериски супстанции може да се пренесат помеѓу видовите (Pichon и Felden, 2005). Микроорганизмот е патоген доколку е способен да предизвика болест кај луѓето, животните или растенијата. Освен фактори на вирулентност на стафилококите, односот помеѓу домаќинот и самата бактерија, исто така, одредува дали бактеријата од родот стафилококи е патогена за својот домаќин или не. Во нормални физиолошки околности на организмот, само неколку стафилококи се вклучени во почетната инвазија на домаќинот. Откако овие бактерии ќе добијат отворен пристап до ткивото, потребно е да најдат на соодветна средина, за да можат слободно да растат и да се размножуваат. Метаболичките производи произведени од домаќинот може да имаат поволен или штетен ефект врз нив, т.е. или ги снабдуваат со корисни хранливи материи или го спречуваат нивниот раст. Секако дека видот и јачината на одговорот на домаќинот кон инфекција е под влијание на многу фактори како што се возраста на домаќинот и неговиот метаболички и

ендокрин статус (Bier, 1962). Овие соеви можат да преживеат и да се размножуваат во храната и се добро познати по појава на интоксикации предизвикани од храна (Le Loir и сор., 2003).

### **2.1.7 Продукција на биофилм**

„Биофилмот е микробиолошка статична заедница која се состои од клетки кои се неповратно прикачени на супстратот или меѓусебно поврзани, вградени во матриксот на екстрацелуларни полимерни супстанции што тие ги произвеле, и со изменет фенотип во однос на стапката на раст и транскрипција на генот“ (Donlan и Costerton, 2002). Особено во прехранбената индустрија, формирањето на биофилм може да придонесе за упорни состојби на расипување и опстојување на патогени бактерии во околината за преработка на храна, следствено зголемувајќи ги можностите за крос-контаминација, што може да вклучи сериозен ризик за здравјето на потрошувачите како и последователни економски загуби поради отповикувањето на контаминирани прехранбени производи. Постапувањето на бактериите на површината генерира повисок степен на стабилност во растот на клетките и овозможува корисни меѓу-клеточни интеракции, како што се кворум-сензорите и генетската размена (Elias и Vanin, 2012).

Во случај на кворум-сензорност, молекулите за сигнализација со ниска молекуларна маса наречени авто-индуктори (AI) ја регулираат генетската експресија, метаболичката соработка и конкуренција, физичкиот контакт и производството на бактериоцин, обезбедувајќи механизам за самоорганизација и регулирање на клетките на биофилмот (Elias и Vanin, 2012; Van-Houdt и Michiels, 2010). Во меѓувреме, трансферот на мобилни генетски елементи помеѓу блиските биофилмски клетки овозможува стекнување на нова антимикуробна отпорност, вирулентни фактори и способности за преживување во животната средина (Madsen и сор., 2012). Бактериските клетки во биофилмовите се заштитени од широк спектар на стресови од околината, што доведува до повисок степен на опстанок. Имаат екстрацелуларна матрица која дејствува како бариера што ја забавува инфилтрацијата, ги неутрализира, врзува и ефикасно ги дифузира до суб-летални концентрации антимикуробните и антибиотските агенси (на пр. хлор, оксацилин, ванкомицин) пред

да можат да стигнат до целните клетки (Bridier и сор., 2011a; Singh и сор., 2010). Исто така таа ги намалуваат другите неповолни надворешни ефекти како што се УВ светлина, токсични метали, киселост, сушење, соленост и одбраната на домаќинот (Hall-Stoodley и сор., 2004).

Развојот на биофилмот на *S. aureus* е откриен на различни биотски и абиотски површини, вклучувајќи човечки ткива, медицински помагала (на пр. вградени катетри, вештачки срцеви залистоци, протези за коски и зглобови), прехранбени производи и во капацитети за преработка на храна (Devita и сор., 2007; Simon и Sanjeev, 2007). Потенцијалот на *S. aureus* да предизвика болест се основа на неговата способност да продуцира широк спектар на вирулентни фактори кои придонесуваат за бактериската инвазија (Ferry и сор., 2005). Тука спаѓаат факторите кои се одговорни за поврзување, прилепување и формирање на биофилмот (Ferry и сор., 2005). Формирањето на биофилм ја засилува вирулентноста на бактериските видови, вклучувајќи го и *S. aureus* (Ferry и сор., 2005, Otto и сор., 2008). Формирањето на биофилм од *S. aureus* вклучува три главни фази: адхезија, созревање и дисперзија на бактериските клетки (Otto и сор., 2008). Основниот чекор во формирањето на биофилмот на *S. aureus* е почетното поврзување, што се постигнува со експресијата на различни компоненти на микробиолошка површина кои ги препознаваат молекулите на адхезивниот матрикс (MSCRAMMs) (Otto и сор., 2008). Колониите на *S. aureus* првично се прилепуваат едни со други, а потоа се прошируваат до структурно динамични структури на биофилмови во текот на подоцнежните фази на адхеренцијата. Созревањето на матриксот на биофилмот во повеќеслојни модели е иницирано од полисахаридниот меѓуклеточен адхерин (PIA), синтетизиран од  $\beta$ -1, 6-поврзани Н-ацетил д-глукозамини (PNAG) (Periasamy, 2012). Синтезата на PIA е посредувана од страна на локусот на меѓу-клеточниот адхезин (*ica*), кој вклучува четири основни гени, *icaA*, *icaB*, *icaC* и *icaD*, како и регулаторен ген, (*icaR*) (McKenney и сор., 1998). Овие гени ги кодираат соодветните протеини ICAA, ICAB, ICAC и ICAD. Производството на лигавата супстанција е овозможено со ко-експресија на гените *icaA* и *icaD* (Atshan и сор., 2012). Улогата на *icaB* не е целосно разјаснета, но *icaC* дејствува како рецептор за полисахариди (McKenney и сор., 1998). Се покажало дека соевите што го содржат кластерот *icaADBC* се потенцијални

производители на биофилмови (Atshan и сор., 2012). Покрај тоа, протеинот кој е поврзан со биофилмот (Вар) е од витално значење за примарното поврзување на *S. aureus* и формирање на биофилм (Cucarella и сор., 2004, Lassa и сор., 2006).

### **2.1.8 Распространетост на стафилококите и стафилококните заболувања**

Стафилококите се убиквитарни микроорганизми што значи дека се присутни насекаде во околината и можат да се најдат во воздухот, прашината, канализацијата, храната или на опремата за продукција на храна, површините на животната средина и животните, а присутни се исто така и кај човекот (Yasmine Motarjemi и сор., 2014). Познато е дека *S. aureus* е многу чест микроорганизам кај луѓето и животните, така што 20-30% се долгорочни носители без манифестација на симптоми, додека околу 60% се интермитентни носители. Тој претставува дел од нивната нормалната флора (предниот дел на назофаринксот, грлото, рацете или косата), колонизатор е на кожата или мукозните мембрани на респираторните, горните дигестивните и урогенитални патишта, и женскиот генитален тракт каде има заштитна улога (Yasmine Motarjemi и сор., 2014). Поради тоа лесно можат да се шират од животните на луѓето и обратно, преку контакт или преку вектори (Aarestrup, 2006; Koneman и сор., 2005). Најразновидната група на коменсали што ја населуваат кожата и мукозната мембрана на животните и луѓето се коагулаза негативни стафилококи (CoNS). Овие бактерии не се силни патогени и главно предизвикуваат болест само во одредени ситуации и кај групи на високо ризичните пациенти (Türkyilmaz и Кауа., 2006).

Некои стафилококи се високо специфични за домаќинот, на пример, *S. capitis* subsp *capitis* се наоѓа како дел од нормалната флора на човечката кожа, предниот дел на главата и вратот, додека *S. auricularis* се наоѓа првенствено во надворешниот слушен канал. Некои видови се наоѓаат само кај животните и најчесто се патогени кај нивните домаќини. Така, на пример, *S. intermedius* е вмешан во различни инфекции кај кучињата, додека *S. hyicus* е застапен кај живината и свињите (Phillips и Kloos, 1981).

Овие бактерии обично не предизвикуваат инфекции кај домаќинот, но под одредени околности, кога кожата е повредена или е подложена на големи хируршки процедури, тие можат да станат агресивни, продорни и патогени. Последиците од



изменетото, сега патогено бактериско однесување може да бидат поблаги, како што е формирање на чиреви или длабоки рани, па се до системски инфекции, настанок на сепса, што во некои случаи може да доведе и до смрт. Овие бактерии претставуваат посебна опасност во болниците каде што можат да бидат причина за т.н. "нозокомиални", односно "болнички" инфекции. Бактеријата што ја предизвикува болничката инфекција може да стигне до својот домаќин преку болнички инструменти, медицински персонал, други пациенти или може да потекнува од нормалната флора на домаќинот.

*Staphylococcus aureus*, еден од најпатогените членови на коагулаза позитивната група на стафилококи, е одговорен за широк спектар на заболувања, вклучувајќи инфекции на кожа, меки ткива и коски, пневмонија и бактеремија итн. (Lipsky и сор., 2007, Brooks и сор., 2007). Тие првенствено се познати како нозокомијални патогени, меѓутоа, поради зголемување на фреквенцијата на останати заболувања како што е појавата на труења со храна од овие соеви, станале познати и по заболувања во заедницата (Martins и Cunha, 2007).

CoNS се сметаа за неважни во однос на нивната улога како агенци кои предизвикуваат инфекции сè до 1980 -тите. Оттогаш, CoNS се познати како значајни опортунистички патоген кај луѓето и животните. Тие се први на листата за мономикробни бактериски болнички инфекции на крвотокот во САД, по нив доаѓаат *S. aureus* и ентерококите (Zhang и сор., 2009). *S. epidermidis* е најчестиот извор на инфекција со CoNS, како што се инфекции поврзани со интраваскуларен катетер, нозокомијална бактеремија, ендокардитис, инфекции на уринарниот тракт и хируршки рани, инфекции на централниот нервен систем, офталмолошки инфекции, инфекции поврзани со перитонеална дијализа и инфекции на протетички зглобови (Widerstrom и сор., 2012). Кај животните, CoNS предизвикуваат неколку заболувања како што се супуративни инфекции, маститис, артритис и инфекција на уринарниот тракт (Lee, 2003). Други видови на CoNS кои имаат клиничко значење се *S. hemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis* и членови на групата *S. scuri* (Piette и Verschraegen, 2009). Групата на видови на *S. scuri* е составена од видовите *S. scuri*, *S. lentus*, *S. vitulinus* и *S. fleuretti*. Претставуват доминантни колонизатори кај глодарите, верверички и други животни, и се поврзани со тешки инфекции кај луѓето како што

се ендокардитис, септичен шок, уринарна и инфекција на рани (Stepanovic и сор., 2003). Исто така, *S. saprophyticus* е добро познато дека предизвикува инфекции на уринарниот тракт кај жени, а воедно јадењето на контаминирана храна е еден од векторите што може да доведе до колонизација и инфекција (Widerstrom и сор., 2012). Според тоа, клиничкото значење на соевите и нивните „резервоари“ може да варираат во зависност од видот на организмот. Генерално, инфекциите предизвикани од родот стафилококи, кои се широко распространети во природата, се од големо значење за ветеринарното и јавното здравје (Martins и Cunha, 2007).

## 2.2 Стафилококни ентеротоксини (SEs)

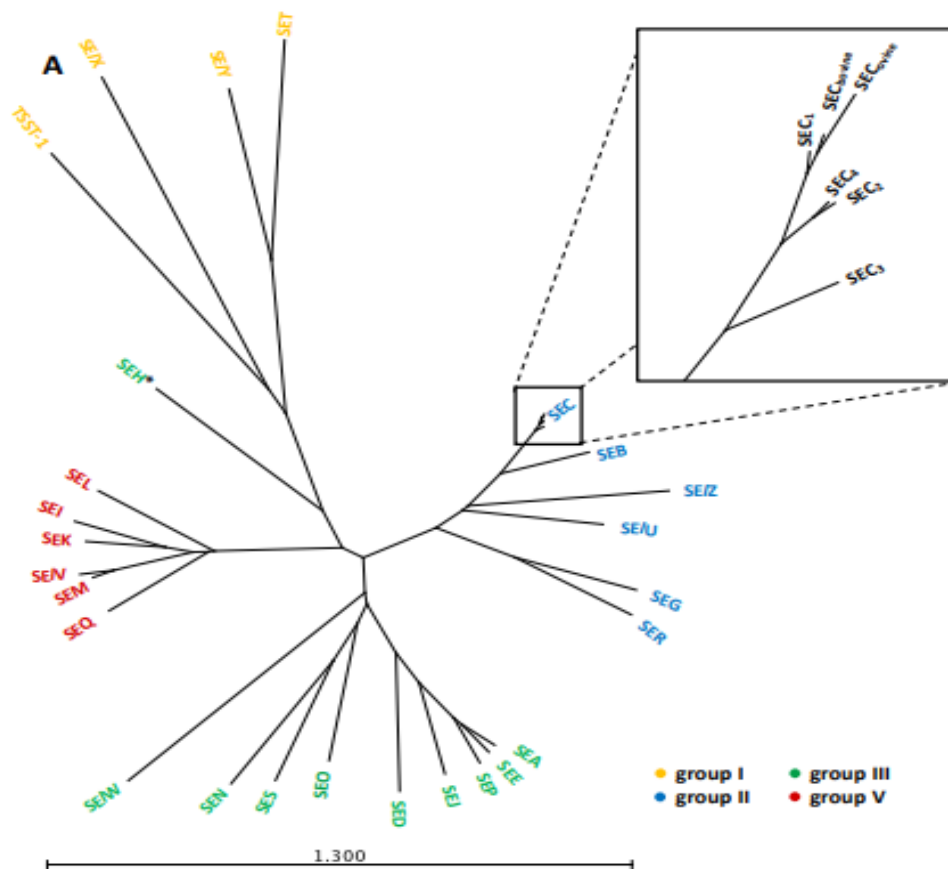
Ова супер семејство на протеини има многу заеднички карактеристики: тие се не-гликозилирани протеини со единечен-синцир со хомологна, глобуларна структура и мала молекуларна тежина (19-29 kDa; Thomas и сор., 2006). Овие пептиди се класифицирани како суперантигени на пирогени токсини (SAGs) и имаат способност да мобилизираат големи количини на Т-клетки (20–30%) (Pinchuk и сор., 2010; Choi и сор., 1989; Schlievert и сор., 1995). Првиот токсин SEA бил изолиран во 1959 (Casman, 1960, Bergdoll и сор., 1959) кратко потоа биле откриени SEB и SEC (Bergdoll и сор., 1965, Casman и сор., 1963). Сите новооткриени ентеротоксини последователно биле именувани по азбучен ред на абecedата.

### 2.2.1 Поделба и номенклатура на SEs

До сега опишани се 25 SEs (SEA–SEIZ), не вклучувајќи ги варијантите и TSST-1 (претходно познат како SEF), при тоа често се откриваат нови типови (Fetsch и сор., 2018). SEA–SEE се сметаат за „класични ентеротоксини“, додека SEG – SEIZ се нарекуваат „нови ентеротоксини“. Тие можат да се поделат во две групи: вистински SEs, кои ги претставуваат токсините со докажан еметички потенцијал испитан кај rhesus мајмуните. Втората група се токсини слични на ентеротоксини (SEIs), кои ги опфаќаат оние што немаат еметичка активност или кои не се тестирани кај примати-мајмуни (Bergdoll, 1988; Lina и сор., 2004; Fetsch и сор., 2018; Fisher и сор., 2018). Сепак, оваа поделба застарела, бидејќи за многу нови токсини со тестовите врз мајмуни, била потврдена нивната еметичката активност (Omoe и сор., 2013). Со тоа

новите токсини биле вброени во можни причинители на SFP (Ikeda и сор., 2005; Jørgensen и сор., 2005). Дополнително, за да се поедностави тестирањето, било предложено како модели за тестирање да се земат ласици или азискиот стаорец (Hu и сор., 2003; Wright и сор., 2000).

Врз основа на нивните нуклеотидни и аминокиселински секвенци, SEs и SEIs можат да се поделат во неколку групи (Wilson и сор., 2018):



Слика 5. Дрво на сличност засновано на секвенци на SEs, вклучувајќи сигнални пептиди (секвенци на SEC) изработено од работна група на CLC genomics. Боите значат филогенетски пирогеени токсин суперантиген (Sag) групи според Wilson и сор., 2018. SEN беше гр. III или одделно во гр. IV.

Како што споменавме погоре, бројни SEs и SEIs се откриени по откривањето на класичните (SEA-SEE), но, иако била дефинирана номенклатурата на SE (Lina и сор., 2004), настанала делумна конфузија во именувањето на последните гени. Thomas и сор. (2006) го откриле SEIU2 во егс типот 4, потоа Collery и Smyth (2007) утврдиле дека неговата секвенца се разликува од онаа на SEIU и предложиле да се

нарече SEIW. Меѓутоа, потоа бил откриен друг SEI-сличен токсин со различна нуклеотидна и аминокиселинска секвенца и со друга хромозомска локација и исто така бил наречен SEIW (Okumura и сop., 2012). Во 2011 и 2015 година се откриени SEIX, SEIY и SEIZ (Wilson и сop., 2011; Ono и сop., 2015; Spoor и сop., 2015). Уште два нови SEIs се пронајдени од Zhang и сop. (2018), кој ги именувал овие SEI26 и SEI27, но ги обележал како SEI27 и SEI28, додавајќи дополнителна димензија на ова веќе збунувачко сценарио. Точна анотација на сите SEs/SEIs гени што се пронајдени при секвенционирање на геномот на соеви на *S. aureus* се потврдени во студијата на Chieffia и сop. (2020) (Табела2), во согласност со Tuffs и сop. (2018). Правилно обележаните SEs/SEIs ќе придонесат за подобрување и стандардизирање на компаративните геномски анализи на соевите на *S. aureus*.

### **2.2.2 Карактеристики на стафилококните ентеротоксини**

Првично, SEs биле дифиренцирани со имунолошки методи, додека денеска се препорачува да се идентификува поврзаноста на новиот токсин преку секвенсна хомологија (доколку > 90% од хомологната секвенца е еднаква со некој токсин, се работи за варијанта, а доколку е помалку од 90 има детерминирање на нов токсин (Lina и сop., 2004)

Генетската локација на SEs се разликува многу помеѓу токсините и може дури и да варира во ист тип на SE (Табела 2).

Табела 2. Стафилококни ентеротоксини, филогенетска групација, локација на гени и еметичка активност. Референците се превземени и адаптирани од Etter и сop. 2020 и Grispoli и сop. 2021, НД= не е детерминирано.

Ентеротоксин (филогенетска група)	Еметичка активност	Генетска база	референци
SEA (SEA)	+	Prophage ( $\phi$ Sa3ms, $\phi$ Sa3mw, $\phi$ 252B, $\phi$ NM3, $\phi$ Mu50a)	Betley и Mekalanos, 1985
SEB (SEB)	+	SaPIs (SaPI1, SaPI2, SaPI3, SaPI4, SaPImw2, SaPIrki4) Plasmid (pZA10)	Novick и соp., 2001
SEC (SEB)	+	SaPIs, Plasmid	Fitzgerald и соp., 2001
SEC1 (SEB)	+	SaPINuSA $\alpha$ 2 <sup>1</sup> , pZA10	Fitzgerald и соp., 2001
SEC2 (SEB)	+	SaPITokyo <sup>1</sup>	Fitzgerald и соp., 2001
SEC3 (SEB)	+	SaPIn1/SaPIm1 <sup>2</sup>	Fitzgerald и соp., 2001
SEC4 (SEB)	НД	SaPImw2	Viana и соp., 2010
SECbovine (SEB)	НД	SaPIbov1	Viana и соp., 2010
SECovine (SEB)	НД	SaPIbov5 <sup>a</sup> , SaPIov1	Viana и соp., 2010
SED (SEA)	+	Plasmid (pIB485-like)	Bayles и Landolo, 1989
SEE (SEA)	+	Prophage (hypothetical)	Couch и соp., 1988
SEG (SEB)	+	<i>egc</i> ( <i>egc</i> 1-4) Prophage ( $\phi$ Sa3ms)	Jarraud и соp., 2001
SEH (SEA)	+	Transposon (MGEwm2/mssa476seh/ $\Delta$ seo)	Le Loir и соp., 2003
SEI (SEI)	+	<i>egc</i> ( <i>egc</i> 1-3)	Jarraud и соp., 2001
SEJ (SEA)	НД	Plasmid (pIB485-like, pF5)	Отое и соp., 2003
SEK (SEI)	+	SaPIs (SaPIbov1, SaPI1, SaPI3, SaPI5) Prophage ( $\phi$ Sa3ms, $\phi$ Sa3mw)	Yarwood и соp., 2002
SEL (SEI)	+	SaPIs (SaPIbov1, SaPI3, SaPIn1, SaPIm1, SaPImw2)	Fitzgerald и соp., 2001
SEM (SEI)	+	<i>egc</i> ( <i>egc</i> 1-2)	Jarraud и соp., 2001
SEN (SEA)	+	<i>egc</i> ( <i>egc</i> 1-4)	Jarraud и соp., 2001
SEO (SEA)	+	<i>egc</i> ( <i>egc</i> 1-4) Transposon (MGEwm2/mssa476 seh/ $\Delta$ seo)	Jarraud и соp., 2001
	+	Prophage ( $\phi$ Sa3n, $\phi$ N315, $\phi$ Mu3A)	Kuroda и соp., 2001

Ентеротоксин (филогенетска група)	Еметичка активност	Генетска база	референци
<b>SEP (SEA)</b>			
<b>SEQ (SEI)</b>	+	SaPIs (SaPI1, SaPI3, SaPI5) Prophage (φSa3ms, φSa3mw)	Yarwood и сор., 2002
<b>SER (SEB)</b>	+	Plasmid (pIB485-like, pF5)	Омоє и сор., 2003
<b>SES (SEA)</b>	+	Plasmid (pF5)	Оно и сор., 2008
<b>SET (SEIX)</b>	+	Plasmid (pF5)	Оно и сор., 2008
<b>SEIU (SEB)</b>	НД	<i>egc(egc2-3)</i>	Letertre и сор., 2003
<b>SEIW = SEIU<sup>2</sup> <sup>3</sup>(SEA)</b>	НД	<i>egc(egc4)</i>	Thomas и сор., 2006
<b>SEIV (SEI)</b>	НД	<i>egc(egc4)</i>	Thomas и сор., 2006
<b>SEIX (SEIX)</b>	НД	Chromosome	Wilson и сор., 2011
<b>SEIY (SEIX)</b>	НД	Chromosome	Оно и сор., 2015
<b>SEIZ (SEB)</b>	НД	Chromosome	Wilson и сор., 2018

<sup>1</sup> Островите за патогеност на *S. aureus* (SaPIs) биле утврдени преку нуклеотид NCBI BLAST;

<sup>2</sup> SaPI<sub>m1</sub> (MU50) и SaPI<sub>n1</sub> (N315) се идентични;

<sup>3</sup> Предложено е SEIU<sup>2</sup> да се преименува во SEIW.

Дистрибуцијата на гените кои ја носат способноста за продукција на ентеротоксини кај соевите на *S. aureus* е различна, некои од нив се на стабилните региони на хромозомот (т.е на кластерот на ентеротоксигени гени - *Egc*), а другите се наоѓаат на мобилни генетски елементи (MGEs). MGEs претставуваат сегменти на DNA кои што носат ензими и други протеини кои имаат способност да се движат хоризонтално меѓу бактериските клетки (Argudin и сор., 2010, Malachowa и DeLeo, 2010). Кај *S. aureus*, главните MGEs се: профагите, “патогените острови” на *S. aureus* (SaPIs), геномски остров *vSa*, плазмиди, транспозони и стафилококни касетни хромозоми (SCCs). За сите е утврдено дека носат SE гени, освен SCCs кои типично ги носат гените на резистентност вклучувајќи го и *mecA* (Lindsay, 2011). Повеќето MGEs можат да се движат со висока фреквенција меѓу изолатите на *S. aureus*, дури и при траењето на инфекција (Goerke и Wolz, 2004; Lindsay и Holden, 2006; Lindsay, 2011).

Како и повеќето од објавените фаги на *S. aureus*, оние што ги содржат SE гените (*sea*, *selk*, *selp* и *selq*) припаѓаат на фамилијата *Siphoviridae*, „лизогенифаги,, при тоа трите *se/sel* гени (*sea*, *selk* и *selq*) се присутни заедно на ΦSa3ms и ΦSa3mw, додека единечни *se/sel* гени (*sea* или *selp*) се носени од други профаги (Argudin и сор., 2010, Wallin-Carlquist и сор., 2010).

Плазмидите се одамна препознаени како ефикасни вектори за хоризонтален трансфер на резистентноста и вирулентноста меѓу бактериите. Кај *S. aureus* има два видови на плазмиди, кои содржат гени: *sej* и *ser*, а се поврзани најчесто со *sed* (pIB485-сличен) или со *ses* и *set* (pF5) (Ono и сор., 2008).

SEB и SEC се наоѓаат на патогени острови SaPIs (Novick и сор., 2001; Novick, 2003), тие се мобилни елементи кои можат да се најдат и кај другите видови на стафилококи. Комплетната нуклеотидна секвенца позната е за околу 20 SaPIs, и некои од нив носат по повеќе гени, на пр. *tst* генот може да биде заедно со *selk* и *selq* на SaPI1, со *sec3* и *sell* на SaPIm1 и SaPIn1, и со *sell* и *sec* на SaPIbov1; *seb*, *selq* и *selk* се утврдени на SaPI3; *selk* и *selq* на SaPI5; и *sec4* и *sell2* на SaPImw2. Индукцијата на SaPI се претпоставува дека прави зголемување на бројот на копии на гените на токсините, оттаму прави и зголемување на продукцијата на токсин, како што е опишано и за лизогените фаги (Novick и Subedi, 2007; Baba и сор., 2008).

SEB е единствениот познат стафилококен ентеротоксин што е испитуван како биолошко воено оружје. Заради неговата стабилност и потенцијална едноставност во производството и распрснувањето, имало голем интерес за него во Студената војна. SEB бил проучен во аеросолизирана форма за употреба како оружје. Многу мала количина (0,004 µg/kg) е ефикасна за предизвикување симптоми, а доза од 0,02 µg/kg може да биде смртоносна (Rajagopalan и сор., 2006). Вдишување на SEB доведува до отежнато дишење и болка во градите неколку часа по изложувањето. Со голема изложеност, може да се појават посериозни симптоми како што се висока температура, пулмонален едем, можен синдром на акутен респираторен дистрес или септичен шок (Rajagopalan и сор., 2006). Симптомите биле испитани и во студии на животни и во неколку случајни лабораториски несреќи.

Егс кластерот содржи оперон на гени што ги кодираат SEG, SEI, SEM, SEN и SEO и два псевдогени, *fent1* и *fent2* (Jarraud и сор., 2001). За *S. aureus* кој ги

произведува овие гени, т.е го поседува *egc* кластерот е докажана неговата превалентност кај човечки изолати (van Belkum и соp., 2006). Подоцна е опишана и втората варијанта на *egc<sub>2</sub>* која содржи *SeI* ген (*selu*). Бришењето, дуплирањето и рекомбинацијата на геномите во овој кластер често доведуваат до генерирање на нови видови на ентеротоксини и варијанти (Thomas и соp., 2006). Два гени на токсини, *SeIX* (Wilson и соp., 2011) и *SEIY* (Ono и соp., 2015) се наоѓаат исклучиво на геномот, додека *see* се наоѓа на дефектен фаг (Le Loir и соp., 2003). Стафилококни касетни хромозоми (SCCs) се носители на *seh* и *selo* гените. Со оглед на широкиот спектар на различни генетски основи за производството на ентеротоксини, лесно е да се разбере дека изолатите на *S. aureus* значително се разликуваат: околу 80% од изолатите носат просечно 5-6 различни SE гени (Umeda и соp., 2017).

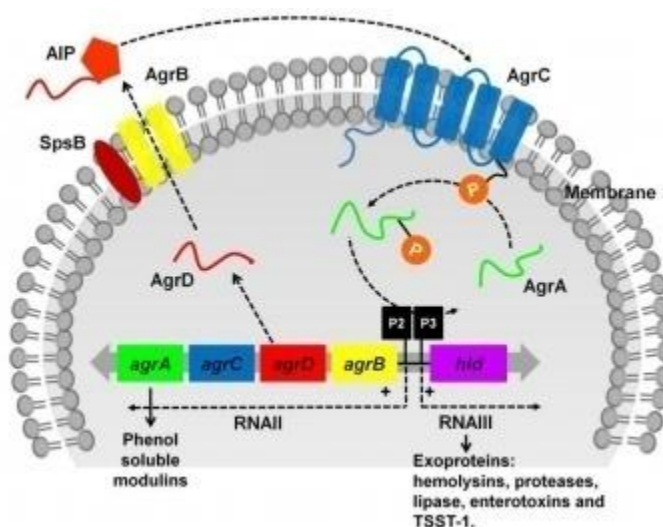
### **2.2.3 Регулација на продукцијата на ентеротоксини**

Експресијата на гените може да биде изразена во една околина, а супресирана во друга, со оглед на тоа што храната е комплексна средина, еден ист сој може да продуцира токсин во една а да не продуцира во друга храна. Оттаму, присуството на гените треба да ни користи како индикатор дека тој микроорганизам може да продуцира токсини во соодветната средина.

Сé уште не е комплетно актуелното знаење за регулирање на производството на ентеротоксините, со оглед на тоа што е познато дека *S. aureus* е способен да одговори соодветно на промените во околината, користејќи комбинација на кворум-сензорност и најмалку уште 16 дво-компонентни системи и многу транс-активни регулаторни протеини (Naag и Vagnoli, 2016). Сите тие системи им овозможуваат на бактериите брзо да се прилагодат на стресните фактори преку регулирање на експресијата на гените поврзани со важните физиолошки карактеристики, вклучително и производството на ентеротоксини. Секој систем може директно или индиректно да ја контролира транскрипцијата на специфични групи на гени и еден единствен ген може да биде под влијание на повеќе системи, што доведува до активирање на многу слоеви на регулација (Fisher и соp., 2018). Најдобро познатите регулаторни системи на стафилококите се *agr* (accessory gene regulator) (Vasconcelos и Cunha, 2010), *sar*



(staphylococcal accessory regulator, поделени на *sarA*, *sarS*, *sarT* и *sarR*) (McCulloch, 2006) и *rot* (repressor of toxins) (McNamara и соp., 2000), кои можат да влијаат директно на продукцијата на токсините (Слика 6). Кворум-сензорност е терминот на механизмот на „комуникација“ меѓу бактериите со помош на кој бактеријата може да ја „согледа“ густината на растот на бактеријата во медиумот, и овој механизам е важен кај стафилококите бидејќи некои дополнителни протеини (како што се вирулентните фактори) се изразуваат само во одредени фази на раст (Thoendel и соp., 2011).



**Слика 6.** Шематски приказ на *agr* регулаторните системи на *S. aureus*. (Sánchez, 2014) (*agr* –оперонот се состои од две транскрипциски единици RNAII и RNAIII, управувани од промоторите P2 и P3, соодветно. RNAII е оперон на четири гени, *agr* BDCA, кодира AgrB одговорен за обработка и извоз на AgrD, претходник на AIP. На ниво на праготна AIP, AgrC ќе биде автофосфорилиран, што ќе доведе до фосфорилација на AgrA. AgrA ја активира експресијата на RNAIII, со што се зголемува секрецијата на токсините и ензимите на *S. aureus*)

### 2.2.3.1 Регулрање на продукцијата на класичните ентеротоксини (SEA-SEE)

Производството на ентеротоксини поврзани со бактериофагите (SEA и SEE) генерално е конститутивно, иако во литературата се опишани соеви со исклучително ниско и високо ниво на производство на SEA (Thomas и соp., 2007; Wallin-Carlquist и соp., 2010). *Sea* генот се наоѓа на полиморфна фамилија на лизогени бактериофаги вметнати во бактерискиот геном, кои обично се однесуваат како профаги (Betley и Mekalanos, 1985). Докажано е дека транскрипцијата на *sea* е поврзана со животниот циклус на кодирачкиот профаг (Сао и соp., 2012) и е поттикнат од бактерискиот стрес

(Zeaki и сop., 2015б). Идентификувани се шест различни прогени кои го носат *sea* (u252B, uMu3, uMu50A, uNM3, uSa3ms и uSa3mw) и најчесто сите ги поседуваат гените за ентеротоксин А, стафилокиназа и комплементарниот инхибитор (Goerke и сop., 2009). Различните профаги даваат различни нивоа на производство на SEA (Borst и Betley, 1994).

Анализите на нуклеотидната секвенца на соседните региони покажале дека соевите што произведуваат SEA може да се поделат во две главни групи, SEA 1 и SEA 2 (Wallin Carlquist и сop., 2010) со постоење на два промотори региони (P1 и P2). P1 се наоѓа веднаш над *sea* кај двете групи (Borst и Betley, 1994), при тоа латентниот промотор кој е поврзан со фагите P2 изгледа дека е поврзан со поттикот на производството на SEA, кој е поврзан со стрес (Sumbly и Waldor, 2003). SEA се продуцира од средната експоненцијална фаза на раст, но не е регулирана со дополнителниот ген регулатор *agr*, за разлика од *seb*, *sec* и *sed*, за кои е потребен функционален *agr* за максимална експресија (Balaban и сop., 2000).

И покрај различните генетски основи, производството на трите класични ентеротоксини кои не се поврзани со фаги (SEB, SEC и SED) обично се случува помеѓу експоненцијалната и стационарната фаза на бактериски раст (Zhang и Stewart 2000) и е регулирано со дополнителен систем за регулирање на гени (*Agr*) (Betley и Mekalanos, 1985; Regassa и сop., 1991; Derzelle и сop., 2009). Генот *seb* се наоѓа на островот на патогеност SaPI3 на *S. aureus* (Novick и сop., 2001), додека *sec* постои во повеќе варијанти (C1, C3, Cbov), пронајдени на различни острови на патогеност (SaPI4, SaPI<sub>n1/m1</sub> и SaPI<sub>bov</sub>, соодветно; Novick, 2003). Постојат некои индикации дека ниски количини на SEB се произведуваат веќе експоненцијална фаза на раст и може да се појави во микробиолошките култури веќе за 4-6 часа.

Генот *sed*, од друга страна, се наоѓа на 27,6 kb плазмид пеницилиназа (pIB485; Bayles и Landolo, 1989). Системот *Agr* е кворум-осетлив систем, се активира при висока густина на клетките и се состои од два различни транскрипти: RNAII, кој ги кодира структурните гени *agrA*, *agrB*, *agrC* и *agrD* и RNAI, регулатор на RNA. Активираната форма на *AgrA* ги регулира промоторите P2 и P3, што доведува до генерирање на повеќе RNAII и RNAIII, што е интрацелуларен ефектор на генската регулација кај *S. aureus*, што резултира со позитивна повратна врска (Koenig и сop.,

2004). Кога системот Agr е индуциран, RNAIII посредува во репресијата на Rot (Boisset и сop., 2007). Важно е дека сите овие регулаторни елементи реагираат на различни стресови и стимулуси на околината, на пр. висока температура, алкална pH вредност, висока соленост, катаболити, анаеробни и хипоксични состојби (Mashruwala и Boyd, 2017). Сите овие механизми доведуваат до зголемена транскрипција на секретираниите фактори на вирулентност, како што се ентеротоксини, и до намалена транскрипција на сет на гени што кодираат протеини на клеточниот сид (Dunman и сop., 2001). Мора да се напомене дека SEB, SEC и SED се само делумно регулирани со системот Agr и исто така можат да бидат независно произведени (Yarwood и Schlievert, 2003)

Производството на SEC најчесто се поврзува со соеви отпорни на метицилин, инвазивни и изолирани од болести кај животните (Hu и сop., 2005). Некои видови на говеда на изолираниот сој на *S. aureus* носат говедски патоген остров кој кодира три суперантигени и тоа SEC-говедски, TSST-1 и SEL (Fitzgerald и сop., 2001). Сличноста во нуклеотидните секвенци и начините на врзување на антитела, резултирале да има честа појава на крос реакција меѓу ентеротоксините SEA и SEE, и меѓу SEB и SEC (Lee и сop., 1978). SEE е екстрацелуларен протеин, кој е продуциран како прекурсор протеин, и не е често поврзан со интоксикации.

### **2.2.3.2 Регулирање на неklasичните ентеротоксини**

Познавањето на регулацијата на неklasичните ентеротоксини почнува да се зголемува во последниве години. Се чини дека, за разлика од мнозинството класични ентеротоксини, регулирањето на поновите ентеротоксини често пати е независно од Agr, со исклучок на SEH и SEI (Derzelle и сop., 2009). Производството на ентеротоксини кодирани во *egc* оперонот (SEG, SEI, SEM, SEN, SEO и SEIU) е највисоко во почетните фази на фазата на експоненцијален раст (Kusch и сop., 2011). Овој кластер е превалентен за хумани изолати. Од друга страна, производството на SEH е доминантно во доцната експоненцијална фаза на бактериски раст и се чини дека е позитивно регулирано од Rot (Sato'o и сop., 2015 година).

#### **2.2.4 Влијание на факторите поврзани со храната врз производството на ентеротоксини**

Храната претставува високо сложен матрикс во однос на микробиолошката содржина, температурата на складирање, рН вредноста, солта, кислородот и достапноста на хранливи материи во споредба со микробиолошките медиуми за раст (Valero и сор., 2009). Преживувањето и растот на *S. aureus* во секоја средина се поврзани со присуството на одредени хранливи материи (на пример, аминокиселини со разгранет синџир; Grispoli и сор., 2019a). Во храната, *S. aureus* често формира биофилм, каде што е овозможена молекуларна сигнализација и комуникацијата помеѓу клетките, која е многу релевантна во споредба со планктонската состојба во која што се наоѓа сојот ако го одгледуваме во бујонот како лабораториска култура. Под исти услови, различни соеви можат да произведат различни количини на SE и во различни фази на раст. Ова се одразува и во значителна варијабилност во количините и видовите на SEs произведени од *S. aureus* кои растат во оптимални услови. Сите овие параметри можат да влијаат врз производството на ентеротоксин од страна на *S. aureus* во храната.

Според истражувањата, температурата влијае повеќе на синтезата на ентеротоксини, и тоа на тие SEs поврзани со профагите и со оние не поврзани со профагите, отколку што влијае на бактерискиот раст во храната (Schelin и сор., 2011). Докажано е дека ефектот на температурата врз производството на SEA може да варира, во зависност од присутната варијанта на профагот. Општо земено, производството на SEA во храната било откриено помеѓу 10°C и 45°C, при тоа зголемување на производството на токсини е поврзано со зголемување на температурата (Tsutsuura и сор., 2013). Тие се отпорни и на процесот на пастеризација на млекото и на стерилизација на конзервирана храна (Sutherland и сор., 1994, Smyth и сор., 2005). Топлинската стабилност на SEs не е иста за сите нив и зависи од матриксот на храна и концентрацијата на токсини, се намалува по редослед SEC > SEB > SEA. Загревањето на SEC 30 минути на 60 °C не резултирало со било каква промена во серолошките реакции. Меѓутоа, било забележано губење на серолошката реакција на SEA по неговото загревање 3 минути на 80 °C или 1 мин на 100 °C. Исто така, треба да се спомене дека дури и откако SEs ќе ја загубат серолошката активност

при детекцијата со имунолошките тестови, тие можат да останат биолошки активни (Rajkovic и сор., 2016). Стабилноста кон топлината зависи од медиумот во кој сенаоѓа токсинот, рН вредноста, концентрацијата на сол и други фактори на животната средина поврзани со нивото на денатурација на токсинот (Balaban и сор., 2000).

Опсегот на рН за производство на SEs во храната е 5-9,6, со оптимална вредност помеѓу 7 и 8. Се чини дека *S. aureus* има поголема толеранција кон варијација на рН под аеробни услови отколку во анаеробни услови за раст. Млечната киселина се чини дека го инхибира формирањето на токсини, особено на оние зависни од Agr (SEB, SEC и SED) (Schelin и сор., 2011). Докажано е дека употребата на не-дисоцирана млечна киселина го зголемува производството на SEA во Brain Heart infusion бујонот (Rosengren и сор., 2013 година). Sihto и сор. (Sihto и сор., 2016) објавиле дека стресот од млечната киселина нема значаен ефект врз експресијата на *sed*. Сепак, SEA и SED се произведуваат во храна под поширок опсег на рН, редокс потенцијал (Eh) и активност на вода ( $a_w$ ) отколку другите SEs, што ни појаснува зошто SEA и SED се главните токсини вклучени во стафилококното труење со храна (Rajkovic, 2007).

Во храна со намалена активност на вода и во аеробни услови, ентеротоксините може да се произведат дури и ако  $a_w$  вредноста е од 0,86 до 0,89 (на 22-17% NaCl). Изгледа дека производството на SEB е почувствително на намалена активност на вода отколку производството на SEA. Додека SEA се произведува на  $a_w$  од 0,87-0,89 (20-17% NaCl), SEB се произведува само во тесен опсег од 2-5% NaCl ( $a_w$  0,99-0,97) (Ewald и сор., 1998)

Долната граница на активност на вода за производство на ентеротоксини во храната од страна на *S. aureus* која е пријавена во литературата е 0,86. Се чини дека SEB и SEC се почувствителни на овој параметар. Од друга страна, горната граница на концентрација на NaCl е 12% (Schelin и сор., 2011). Благ стрес од страна на NaCl (2%) може да доведе до индукција на фаги и последователно зголемување на производството на SEA во храната. Sihto и сор. (Sihto и сор., 2017) покажале дека благи стресни состојби, слични на оние со кои се среќава *S. aureus* во многу намирници (NaCl 4,5%, нитрити 150 mg/L, гликоза 30%, рН 6), можат силно да влијаат на експресијата на *seb*, при тоа гликозата и NaCl ја намалуваат активност на

*seb* како промотор. Исто така било забележано дека експресијата на *sec* е под влијание на гликоза и NaCl стрес: 1,2M (моларна) концентрација на NaCl довело до 16-кратно намалување на *sec* mRNA и SEC протеинот (Regassa и Betley, 1993). Друга студија покажала дека NaCl (4,5%) и гликозниот стрес може да ја намалат експресијата на *sed* (Sihto и сор., 2015). Производството на SEs е оптимално во аеробни услови. Се испитувал и ефектот на ко-култивирање на *Lactococcus lactis* и *S. aureus* во различни средини. Утврдено е дека мешана култура со *L. lactis* при константна pH вредност од 6,6 немала влијание врз растот на *S. aureus*, но силно ја намалило продукцијата на *sec*. Во истата студија е објавено зголемување на експресијата на *sea* за време на стационарната фаза на раст. Од друга страна, експресијата на другите SEs била намалена (*sel*) или немало влијание (*sek*, *seg*, *seh*; Even и сор., 2009). Студиите покажале инхибиторски потенцијал кон растот на *S. aureus* и производството на SEs со одбрани стартер култури (*Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* и *Enterococcus faecalis*; De-Xian и сор., 2020) во свежи сирења (Nogueira и сор., 2019).

Физичко-хемиските параметри на сирењето се под влијание на бактериската флора и обратно, растот на бактериите зависи од присутните хранливи материи (на пр., азот и јаглерод) и физичко-хемиски услови (на пр., киселост, температура и соленост) во храната. Различните технологии за сирење создаваат физичко-хемиски параметри и бактериски заедници кои се повеќе или помалку попустливи за растот на *S. aureus*. Однесувањето на *S. aureus* во сирењето зависи од процесот на правење сирење и на неговиот капацитет да се спротивстави на различните стресови кои се присутни во сирењето. Свежите сирења се подготвуваат од сурово или пастеризирано млеко, се конзумираат свежи, без зреење помеѓу 5 и 30 дена по подготовка. Било забележано зголемување на популацијата на *S. aureus* од 2 до 3 log кај фета сирење во текот на првите 24 часа по вештачка контаминација со *S. aureus* со концентрација од  $10^5$  и  $10^7$  cfu (Erkmen, 1995). Потоа, бројноста на *S. aureus* се намалила на почетното ниво на контаминација по 75 дена, што е во зависност од концентрацијата на сол, активноста на стартер културите и време на складирање. Меките сирења претставуваат голема и разновидна категорија. Истражувања за растот на *S. aureus* за време правењето на мекото сирење од говедско или од козјо млекото објавиле зголемување на популацијата ( $\sim 3 \log_{10}$ ) во текот на првата фаза од процесот ( $\sim 22$  ч),

од инокулација до солење (Meurand и сор. 1998, Vernozy-Rozand и сор., 1998). По периодот на раст, популацијата на *S. aureus* обично останува стабилна за време на зреењето, но зависи од температурата на зреење и рН на производот. Поволните услови за раст на *S. aureus* кај овие сирења, исто така, влијаат и на производството на SEs. Според тоа, Meurand и сор. (Meurand и сор., 1998) забележале варијација на производството на SEA од 1 до 3,2 ng/g со иницијална популација на *S. aureus* од  $10^3$  до  $10^6$  cfu/g достигнувајќи максимални концентрации од  $10^5$  до  $3 \times 10^7$  cfu/g за 22 часа. Заклучено било дека, меките сирења се поволни средини за раст на *S. aureus*, што всушност може да вклучи санитарни проблеми особено во случаи кога има почетна контаминација поголема од  $10^3$  cfu/g. Полу-тврдите и тврдите сирења варираат во однос на нивниот состав, формат и надворешен изглед (разлики во аспектот на зреењето или микробната флора). Овие сирења се карактеризираат со користење на чекор за брзо одводнување (30 до 90 мин), како и имање на ограниченост во закиселувањето. Ризикот од раст на *S. aureus* главно зависи од примена на термички третмани на коагулираното млеко (на пр. 52-55 °C максимум 60 мин за Emmental, Gruyère) или каде нема (на пр. Cheddar, St-Nectaire и Tomme). Во овие сирења, популацијата на *S. aureus* од почетното ниво на контаминација во текот на првите 6 часа од производството независно од рН поради бавната стапка на закиселување. Сепак, растот на *S. aureus* помеѓу 6 и 24 часа зависи од рН вредноста постигната во 6 часа: колку е покисела урда, толку е помал растот (Delbes и сор., 2006). Карактеристично е сирењето чедар, каде солењето и намалувањето на температурата ја зголемуваат популацијата на *S. aureus*, веројатно и заради ниската активност на starterот како одговор на зголемената концентрација на сол (Ibrahim и сор., 1981a). SEA бил детектиран во чедар сирење дури по 3 години на зреење независно од рН вредноста (Tatini и сор., 1971).

### ***2.2.5 Распространетост на ентеротоксоген Staphylococcus aureus во млекото и млечните производи***

Повеќето податоци кои се достапни во литературата за распространетоста и карактеризацијата на ентеротоксогениот *S. aureus* кај фармските животни, се фокусирани на животните што произведуваат млеко и често пати се поврзани со

дијагноза на маститисот. *S. aureus* е чест предизвикувачки агенс на воспаление на млечната жлезда, што може да доведе до принудно колење или смрт кај заболените животни, зголемен број на антимикробни третмани и сериозни економски загуби за млечната индустрија, поради намаленото производство на млеко и дополнителните трошоци за ветеринарните третмани (Francoz и сор., 2017). Стафилококите можат да предизвикаат различни форми на маститис, клинички перакутен, акутен и хроничен маститис, и секако формата кај која немаме видливи промени на млекото и вимето, субклинички маститис. Најчестите начини на трансмисија на *S. aureus* во стадото е кога од инфицираната млечна жлезда се пренесува на неинфицираните во текот на молзењето преку крпите за чистење на вимето, рацете на молзачите или опремата за молзење (Petersson-Wolfe и сор., 2010). Обично појавите на интоксикации се поврзуваат со конзумирањето на храна богата со протеини, манипулирана т.е преработена храна, на пр. подготовки од месо, кремасти и млечни производи (DeBuyser и сор., 2001) кои се вектори на аминокиселини и пептиди со мала молекуларна тежина кои го поддржуваат преживувањето и растот на *S. aureus* (Peles и сор., 2007).

Постојат многу студии кои го анализираат присуството на *S. aureus* што произведува SEs во примероци од млеко од маститични крави, овци и кози низ целиот свет. Меѓу поновите, DeXian и сор. (2020) објавил присуство на *S. aureus* во 12% од примероците на кравјо млеко во Кина, каде 41% биле ентеротоксогени, Alghamdi и сор. (2020) во 36% кај говедско млеко и 35% кај биволско во Египет утврдиле *S. aureus*, каде 36% од изолатите биле ентеротоксогени. Grispoli и сор. (2019) анализираше 12 фарми за млечни говеда во централна Италија. Изолатите имале преваленца која се движи од 47% за *see* до 6% за *seb* и *sec*. Растот на *S. aureus* може да се појави главно во сурово млеко како последица на несоодветна температура за време на складирањето, или во првите чекори за правење сирење, особено кај сирењата од сурово млеко, кога размножувањето на патогенот не е спречено од активноста на млечно-киселинските бактерии (Charlier и сор., 2009). Технологиите што се користат за производство на сирови сирења од овчо и козјо млеко и отсуството на термичките третмани, како што се термизација или пастеризација, не даваат осигурување дека ќе се контролира размножувањето на *S. aureus*. Различни студии



спроведени за распространетоста на патогенот во фазите на правење сирење, покажале зголемување на бројот на *S. aureus* до шест часа по обликувањето на сирењето, кога е постигната најниската рН вредност на сирењето (Pisano и сор., 2007; Jakobsen и сор., 2011). Сирењата, особено оние направени од сурово млеко, се одговорни за околу 5% од вкупните епидемии поради стафилококна интоксикација предизвикана од храна во Европа (Европска Комисија, 2003). Распространетоста на *S. aureus* кај сирењата со сурово млеко од преживари се движела помеѓу 60% и 100%, шест часа по обликувањето (Pisano и сор., 2007, Scarano и сор., 2007, Jaskobsen и сор., 2011). Во текот на оваа фаза, просечниот број на *S. aureus* постепено се намалува, поради модификациите на хемиските параметри на сирењето, како што се рН вредноста, активноста на водата, редокс потенцијалот и присуството на инхибиторни супстанции различни од млечната киселина (Vernosi-Rozand и сор., 1998).

#### **2.2.6 Алиментарни интоксикации предизвикани од стафилококните ентеротоксини (SFP)**

Интоксикациите со ентеротоксини се едни од најчестите форми на болести предизвикани од храна и се јавуваат при ингестија на храна контаминирана со стафилококни ентеротоксини (SEs), произведени од страна на ентеротоксогените соеви на коагулаза позитивните стафилококи (CPS), генерално на *S. aureus*.

Кога станува збор за историјата на труењата со храна низ целиот Свет, стафилококите и млечните производи се многу поврзани. Првото нотифицирано труење од храна со стафилококи (SFP) било предизвикано од конзумирање на cheddar сирењево Мичиган, САД во 1884 (Bergdoll, 1979). Неколку години подоцна во 1914, Barber (Barber, 1914) демонстрирал дека стафилококите биле причинител на труење со храна при ингестија на кравјо маститично млеко каде што токсичната супстанца била продуцирана кога млекото било оставено на собна температура. И покрај интензивните испитувања *S. aureus* останал главен агенс за предизвикување на болести предизвикани од храна низ целиот Свет (Ikeda и сор., 2005; Tirado и Schmidt, 2001).

*S. aureus*, во светски размери претставува еден од главните причинители на маститисот кај кравите (Rabello, 2005), прв причинител инволвиран во болестите

предизвикани од храна добиени од млеко и млечни производи (Delmas и сор., 2006) и воедно спаѓа меѓу најчестите причинители на интоксикации од храна низ целиот Свет (Normanno, 2005). Преодминантно изолиран при интоксикациите е *S. aureus*, а од останатите коагулаза позитивни стафилококи е *S. intermedius*, кој е единствен стафилокок кој не е *S. aureus* а е причинител на евидентирана интоксикација предизвикана од храна (Loir, 2003). Од тие причини млекото и млечните производи може да претставуваат ризик по здравјето на конзументите. Имајќи во предвид дека SEs се термо-стабилни и може да опстојуваат во храната и откако ќе се инактивираат вегетативните облици, примероците во кои отсуствуваат CPS или се под нивото, утврдено со регулативата на ЕУ, доколку се во доволни количини сè уште може да предизвикаат SFP (Fusco и сор., 2018). Дополнително, познато е дека освен петте класични SEs (SEA-SEE), постојат нови SEs и SE-слични ентеротоксин (SEIs) (Fusco и сор., 2018, Zhang и сор., 2018). Исто така, воедно е докажано дека тие неодамна опишани SEs предизвикуваат SFP, или нивните гени се откриени кај соеви на *S. aureus* вклучени во овој тип на труење со храна (Johler и сор., 2015a; Roussel и сор., 2015; Sato'o и сор., 2015; Suzuki и сор., 2015; Hu и сор., 2017; Umeda и сор., 2017; Zhao и сор., 2017; Ciupescu и сор., 2018; Guidi и сор., 2018). Најновите наоди потврдуваат дека и тие претставуваат опасност за здравјето на потрошувачите и дека откривањето на SEs во сурово млеко и други матрици, особено ако се работи за случаи на SFP, треба да се фокусира и да вклучи испитување на сите SEs/Sels познати досега (Chieffia и сор., 2020).

Повеќето епидемии на SFP се припишуваат на SEA, иако тоа може да се смета за релативно, бидејќи комерцијалните тестови кои се во употреба не можат да ги детектираат другите SEs/SEIs освен SEA-SEE. Додека SEA е најчестиот токсин поврзан со интоксикација со храна поврзана со стафилококи, SEB освен со интоксикацијата со храна, проучен е за потенцијална употреба како инхалирачко биоружје (Leg и сор., 2006). Се претпоставува дека SED е вториот најчест стафилококен токсин поврзан со труење со храна во светот, а една студија покажа дека биле потребни само многу мали количини на овој токсин за да се предизвика труење. SEE исто така е документиран во некои случаи на труење со храна, додека SEF е имплициран кај синдромот на токсичен шок (Pinchuk и сор., 2010). SEG, SEN и SEI не

се толку добро проучени како останатите, но се поврзани со една појава на труење со храна во Тајван (Chen и сор. 2004). SEN е исто така идентификувана како една од причините за масовно труење со храна поврзана со конзумирање на млеко во Осака, Јапонија во 2000 година (Ikeda и сор., 2005). Многу соеви произведуваат повеќе видови на токсини и често е нејасно кој ентеротоксин бил причина за SFP. Исто така се веројатни и појави на синергистички ефекти на различни токсини. SFP може да се појави со секоја храна која обезбедува доволно извори на јаглерод и аминокиселини за раст на *S. aureus*.

Како резултат на овие карактеристики, SEs се сметаат за сериозна закана за јавното здравје и известувањето за појава на труење со храна предизвикано од нив е задолжително од 2005 година (Регулатива на Комисијата (ЕК) бр. 1441/2007 од 5 декември 2007 година). Центарот за контрола на болести во САД проценува дека секоја година се јавуваат 240.000 случаи на стафилококно труење со храна (SFP), што довело до 1000 хоспитализации и шест смртни случаи (Scallan и сор. 2011). Согласно извештајот на EFSA од 2010, стафилококните интоксикации сочинуваат 6.4% од сите појави на болести од храна, и се наоѓа меѓу 4-те главни причини за труења од храна по *Salmonella spp.* (42.3%), вирусите во храната (12.5%) и *Campylobacter spp.* (8.1%) согласно извештаите на EFSA (2010, 2011, 2012). Согласно тие EFSA извештаи, стафилококните интоксикации имаат поголема стапка на смртност од случаите 7% од вкупниот број на случаи, во споредба со вирусите од храната 2.2% и *Campylobacter spp.* 1.1% од вкупниот број на смртни случаи.

Само во ЕУ, 114 случаи од појава на заболувања од храна во 2018 биле предизвикани од термо-стабилните SEs (EFSA. Zoonoses Report 2018, EFSA. Zoonoses Report, 2019).

Појавата на болести предизвикани од бактериски токсини претставуваат важен дел од сите FBO пријавени во ЕУ во 2019 година (n = 997; 19,3% од сите епидемии) и главно се класифицирани како епидемии со слаб доказ. Овие епидемии предизвикале вкупно 10.555 случаи, 361 хоспитализација и 14 смртни случаи. Повеќето од овие појави на болести биле пријавени како општи епидемии (n = 54) и опфатиле вкупно 1.324 случаи (94,6% од сите случаи на појава предизвикани од *S. aureus*). Најтешка форма на интоксикација била опишана во Италија, каде на 44 од 70 случаи (62%) им

беа потребни хоспитализации. Не се пријавени смртни случаи поради труење со *S. aureus* за 2019 год.

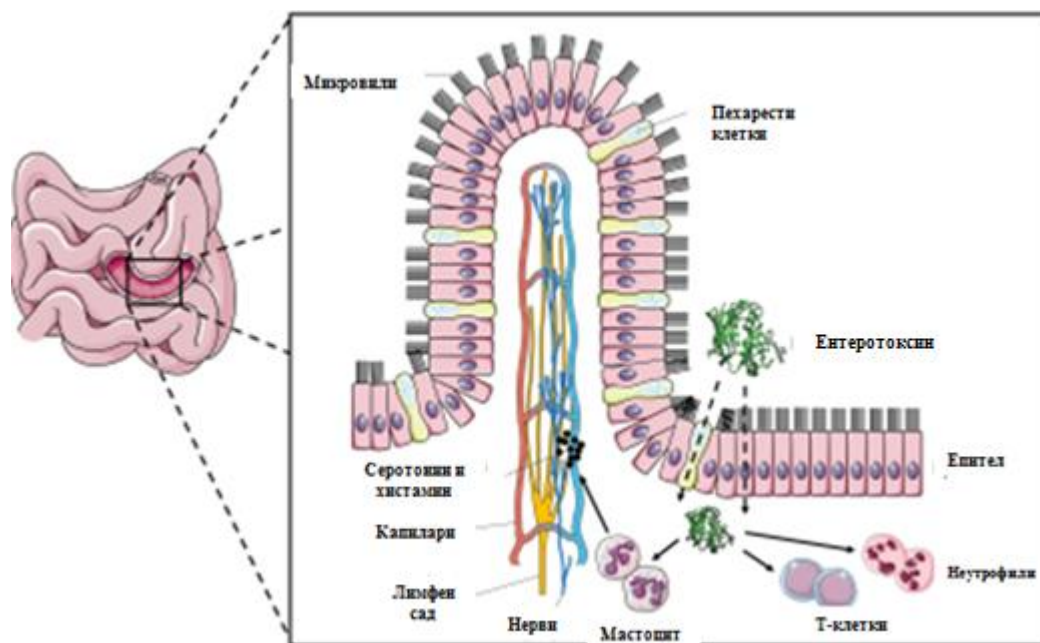
Термостабилните еметички SEs предизвикуваат гастроентеритис кај луѓето при ингестија на храна која ги содржи овие ентеротоксини. SEs се отпорни и на повеќето протеолитички ензими, пепсин или трипсин, исто така и на химотрипсин, ренин и папаин. Инкубациониот период на болеста се движи од 30 минути до 8 часа, но обично е во рамките на 2-4 часа (Yasmine Motarjemi и сор., 2014). Пациентите пријавуваат симптоми на гадење и повраќање, често придружени со воденеста дијареја и треска. Тежината на болеста зависи од количината на ингестираниот токсин и општата здравствена состојба на конзументот. Во тешки случаи, пациентите може да имаат главоболка, мускулни грчеви, тешка дијареа и загуби на електролити со слабост и низок крвен притисок или шок. Пациентите обично се опоравуваат во рок од 2 дена, но може да трае подолго во потешки случаи, при што може да има потреба од хоспитализација. Смртта од стафилококни труења со храна е ретка, иако може да се појави кај постари луѓе, доенчињата и сериозно изнемоштените лица, или ако количината на токсинот е прекумерна, била пријавена стапка на смртност од 0.03 до 4.4% (Doyle и Veuchat, 2007; Yasmine Motarjemi и сор., 2014). Интоксикационата доза на SEs е помала од 1,0 µg претходно формиран ентеротоксин, но има извештаи за болести кои следат по ингестија во опсег на нанограми, 20-200 ng кај високо чувствителни лица (Asao и сор., 2003, Yasmine Motarjemi и сор., 2014). Дозата на SEs кои предизвикуваат еметичка активност кај мајмуните по орална администрација се движи од 5 до 600 µg/животно (Hu и сор., 2014). Минималната доза потребна за интоксикација кај луѓето е  $144 \pm 50$  ng/човек за SEA и 0,4 µg/човек за SEB. Сите SELs што беа тестирани предизвикаа еметичка реакција кај мајмуните во доза од 100 µg/kg (Rajkovic и сор., 2016). Освен постоечките гастроинтестинални симптоми, постојат SEs кои делуваат како суперантигени и да продуцираат токсичен шок синдром (Banks и сор., 2003, Ellis и сор., 2003). Иако еметичките и суперантигените активности се две одделни функции локализирани на одделни домени на протеините, постои голема корелација помеѓу овие активности и во повеќето случаи губењето на активноста на суперантигенот резултира со губење на еметската активност како што е опишано. Посериозни се ефектите при инхалација на ентеротоксините, што ја имплицирало

употребата истите како биолошко оружје. Дозата за аеросолизиран стафилококен ентеротоксин В (SEB) за 50 % од човечката популација е 0.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , додека леталната доза за 50 % од луѓето кои што се изложени е 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Hursh, 1995).

Контаминацијата на храната може да се појави како директен резултат од присуството на бактериите кај животните кои ја произведуваат храната, или се должи на лошата хигиена за време на производството, складирањето или продажбата на прехранбените производи (Kotzekidou, 2013). Луѓето и добитокот се сметаат за главни резервоари за пренос на ентеротоксиген *S. aureus* (Fisher и сор., 2018). Лошата лична хигиена на ракувачите со храна, неправилните практики за ракување со храна и несоодветното одржување на ланецот за ладење на храната се идентификувани како главни фактори кои го дозволуваат бактерискиот раст во матриксот на храна и придонесуваат за SFP (Schelin и сор., 2011, Fetsch и сор., 2018). Често, воздухот, прашина, и површините што доаѓаат во контакт со храната можат да послужат како вектори за трансфер на *S. aureus*. Поради толеранцијата на топлина на SEs, загревањето на храната може да го елиминира *S. aureus*, но SEs остануваат еметички активни (Le Loir и сор., 2003). Добро е познато дека температурите под 7°C и 10°C можат да го намалат ризикот од раст на *S. aureus* и производство на ентеротоксин, соодветно, многу храни сечуваат на повисоки температури од сензорни причини, и многу процеси вклучуваат чекори под дозволените услови за раст (Schelin и сор., 2011 година). SEs се стабилни при високи температури: на пр. тие не се целосно уништени за време на пастеризација (15 секунди на 72°C) и суровиот ентеротоксин А останува активен на 100°C 2 часа во бујон и на 121°C за 28 мин во печурки (Hennekinne и сор., 2012), при висока или ниска рН вредност. Тие се исто така отпорни на протеолитички ензими; оттука тие ја задржуваат својата активност во дигестивниот тракт по ингестијата (Argudin и сор., 2010). Спречувањето на растот на *S. aureus* и последователно производство на ентеротоксини е од големо значење за да се минимизира ризикот од труење со храна. Сепак, испитувањата покажаа дека проценката на ризикот од SFP со ин-витро модели (течни култури со бактерии во планктонска состојба) или само врз основа на бројот на колонии е несигурна (Zeaki и сор., 2014). Всушност, факторите поврзани со храната (температура, рН, концентрација на шеќер или сол, присуство на конкурентни микроорганизми, итн.)

имаат големо влијание врз стапката на раст, времетраењето на lag фазата и вирулентноста на генската експресија на *S. aureus* (Schelin и сор., 2011). Разбирањето на однесувањето на ентеротоксинот што го произведува *S. aureus* во автентични, сложени матрикси на храна и ефектот на факторите на стрес врз производството на ентеротоксин е од клучно значење за подобрување на моделите за проценка на ризик, безбедноста на потрошувачите и квалитет на производот на храна.

SEs се генерално многу отпорни кон надворешни стресни фактори како што се топлина, киселост и гастрични ензими (Pinchuk и сор., 2010). Откако ќе стигнат до тенкото црево, тие влегуваат во lamina propria преку мукозните клетки или епителните клетки (Hu и сор., 2014). Овој процес може да се олесни во присуство на други вирулентни фактори на *S. aureus* (Edwards и сор., 2012). SEA го стимулира 5-хидрокситриптамин (серотонин) и делува кон ослободување на хистамин од мастоцитите (Ono и сор., 2012, Ono и сор., 2019). Се претпоставува дека овој принцип важи за сите еметички SE кои поседуваат дисулфидна врска. Серотонинот делува на вагусниот нерв предизвикувајќи еметички одговор во мозокот (Wells и сор., 1993, Hu и сор., 2007). SEs пенетрираат и низ црево, и активираат локален и системски имун одговор, при што се активираат инфламаторни медијатори, и тука улогата на T-клетките и активирањето на неутрофили е се уште нејасна, но може да биде фактор што придонесува кон инвазијата на *S. aureus* на цревниот епител (Fisher и сор., 2018). Активноста на вагусниот нерв била демонстрирана во многу постари експерименти, кои покажале дека кај мајмуните по ваготомијата не се појавувале еметички симптоми при ингестија на SEs (Sugiyama и сор., 1965). Основниот принцип на емезија предизвикана од SEs е илустриран на следната слика:



Слика 7. Начин на делување на ентеротоксинот во цревата, (Scarano 2011)

### 2.3 Антимикробна отпорност

Откривањето на антибиотиците е едно од најголемите медицински достигнувања на почетокот на дваесеттиот век до денес, така што третманот на бактериски инфекции сè уште во голема мера зависи од употребата на антибиотици. Низ целиот Свет, постои голема количина на антибиотици која не се употребува директно при третмани на луѓето за лечење на одредени состојби, туку им се даваат на животните со цел подобра продукција на храна и секако при ветеринарни третмани. Антимикробните супстанции се користат како промотори на раст кај животните кои се одгледуваат за продукција на месо, при што влијаат на зголемување на мускулната маса кај животните за пократок период користејќи ја истата количина на храна (Henton и сор., 2011). Нивната лесна достапност, ниска цена на чинење како и нивната ефективност довеле до злоупотреба при нивната употребата. Несоодветната, несвесна или прекумерна употреба на антибиотиците довела до појава на механизми на резистентност кај таргетните микроорганизми кон антимикробните супстанции. Антимикробната резистентност се јавува кога бактеријата ја менува нејзината молекуларна структура со цел да ги намали или елиминира ефектите на антибиотиците. Резистентноста на антибиотици е проблем на

јавното здравје заради кој се зголемува морбидитетот и морталитетот од инфективните заболувања со сериозно големи социо-економски трошоци (Alvan и сор., 2011).

Отпорноста кон пеницилин кај *S. aureus* била забележана само една година по неговото воведување, а во раните 1950-ти, три четвртини од соевите на *S. aureus* во големите болници во многу земји станале отпорни на пеницилин. Во моментот, 90%–95% од клиничките соеви на *S. aureus* ширум светот се отпорни на пеницилин (Sakoulas и Moellering, 2008). Отпорноста се должи на производството на пеницилиназа (или  $\beta$ -лактамаза). Повеќе од 90% од стафилококните изолати сега произведуваат  $\beta$ -лактамаза, која ги инактивира  $\beta$ -лактамските антибиотици со хидролиза на нивниот  $\beta$ -лактамски прстен. BlaZ генот ја кодира  $\beta$ -лактамазата и е дел од транспонираниот елемент на плазмидот, кој често содржи и гени отпорни на други антибиотици, (на пример, гентамицин и еритромицин).

Појавата на метицилин резистентниот *S. aureus* (MRSA) за прв пат е опишана 1961, две години (1959) откако метицилинот како антибиотик за прв пат е пуштен на пазарот (комерцијално име: celbenin) и всушност повеќето од нозокомијалните или „болнички“ инфекции се причинети токму од MRSA (Pereira и сор., 2009), која е широко позната како причина за морталитет низ целиот Свет (Pesavento и сор., 2007). Главните настани во историјата на отпорност на антибиотици кај соевите на *S. aureus* се карактеризираат со појава и бесконечен пораст на *S. aureus* отпорна на пеницилин (PRSA), зголемена преваленца на MRSA, вклучително и стекнати во болница (NA-) и стекнати во заедницата (CA) -MRSA, појава на ванкомицин-интермедиентен *S. aureus* (VISA), проследено со појава на *S. aureus* отпорен на ванкомицин (VRSA) (Cin Kong и сор., 2016). Ванкомицин 5 генот за резистентност од организми како *Enterococcus faecalis*, може по природен пат да се префрли на *S. aureus* во гастроинтестиналниот тракт, што довело до тоа да 1996 е пријавена првата VISA, додека 2002 година е пријавена првата VRSA, според Центарот за контрола на болести од САД. Првиот извештај за CA-MRSA се објавил во 1993 година од Западна Австралија и го опишал набљудувањето на CA-MRSA кај пациенти Аборицини во оддалечените заедници. CA - MRSA се генетски различни од NA-MRSA соевите. Ова сугерира дека CA-MRSA не потекнува од изолати кои “избегале” од болничкиот амбиент. Се чини дека CA-



MRSA се појавила de novo од воспоставените CA-MSSA изолати. Предизвикуваат повеќе од 32 сериозни и потенцијално смртоносни инфекции се поврзани со соеви на CA-MRSA откриени дека содржат гени за леукоцидин Пантон-Валентин и со поголема преваленца на гени за токсини (особено SEB), во споредба со онаа поврзана со NA-MRSA (Boucher и сор. , 2010).

Храната е важен вектор за пренос на резистентноста кон антибиотици. Ваквиот трансфер може да се случи со помош на остатоци од антибиотици во храната, преку пренос на резистентни патогени кои се пренесуваат преку храна или преку ингестија на резистентни соеви кои потекнуваат од оригиналната микрофлора на храната и преку трансфер на резистентноста меѓу патогените микроорганизми. Соевите на *S. aureus* често се отпорни на антибиотска терапија поради нивниот капацитет да произведат езополисахаридна бариера и поради нивната локација која е најчесто во микроапсцесите, кои го ограничуваат дејството на лековите (Pesavento и сор., 2007). Освен тоа што има голем диверзитет во патогените својства, меѓу другото, *S. aureus* може брзо да се прилагоди на селективниот притисок на антибиотиците. Во повеќето случаи, отпорноста на повеќе антимикробни агенси кај стафилококите е поттикната од стекнување на дискретни генетски „дополнителни“ елементи кои содржат плазмиди, транспонирани генетски елементи (вметнување на секвенци и транспозони) и геномски острови. Ваквите елементи ги инкорпорираат гените за антимикробна отпорност и се разменуваат преку хоризонтален трансфер на гени (HGT) помеѓу меѓусебно поврзани бактериски соеви, па дури и помеѓу различни видови и родови. Сите конвенционални микробиолошки HGT механизми на трансдукција, трансформација и конјугација биле демонстрирани кај стафилококите. Особено важна детерминанта на резистентност кај стафилококите е онаа кон метицилин и други  $\beta$ -лактамски соединенија, заради што овие соеви се поврзани со озлогласениот акроним MRSA. Островите за стафилококна патогеност (SaPIs) и стафилококната хромозомска касета со островите на отпорност кон метицилин (SCCmec), претставуваат две добро дефинирани класи на нови мобилни елементи кои се претпоставува дека се одговорни за хоризонталниот трансфер на SA<sub>g</sub> и одредени детерминанти на резистентност. Впечатливо изгледа тоа што SaPIs носат

само *Sag* детерминанти, додека *SCCmec* носат детерминанти само за резистентност (Ortega и сop., 2010).

Отпорноста на метицилин се јавува поради стекнување на генот *mecA* кој го кодира протеинот за врзување на пеницилинот (PBP) од 78 kDa, наречен PBP2a, кој има многу низок афинитет за метицилин и повеќето други  $\beta$ -лактамски лекови.  $\beta$ -лактамските антибиотици делуваат со врзување за PBP во клеточниот ѕид, што резултира со нарушување на синтезата на пептидогликанскиот слој и смрт на бактеријата. Бидејќи  $\beta$ -лактамските антибиотици не можат да се врзат за PBP2a, синтезата на пептидогликанскиот слој и синтезата на клеточниот ѕид можат да продолжат (Deurenberg и сop., 2007). Додека нормалниот *S. aureus* користи три протеини кои врзуваат пеницилин, PBPs 1, 2 и 3, за да се катализира вкрстено поврзување на пептидогликанот, MRSA има дополнителна компонента, PBP 2 или 2a, која има низок афинитет за  $\beta$ -лактами. Последователно, MRSA се отпорни на сите  $\beta$ -лактами. Антимикробната резистентност на MRSA соевите се должи на пеницилин врзувачкиот протеин 2a (PBP2a), кој е енкодиран со генот *mecA* кој е лоциран на подвижен елемент од стафилококната хромозомна касета *mec* (*SCCmec*) (Lim и сop., 2002) До денес, дефинирани се девет типови на *SCCmec* (типови од I до VIII и VT), кои може да се разликуваат според типот на генскиот комплекс на *scg* што посредува во специфичната ексцизија на локацијата и вметнување на касетата *SCCmec* надвор или во бактерискиот геном и класата на *mec* комплекс што ја носат.

Постојат неколку истражувања кои ја анализирале распространетоста на гените за ентеротоксин кај изолатите на *S. aureus* отпорни на метицилин и осетливи на метицилин (MSSA). Се смета дека добитокот е може да бидат извор за MRSA соеви за луѓето (Juhász-Kaszanyitzky и сop., 2007). Колонизацијата на добитокот кој се чува за добивање на млеко со резистентните соеви, може да влијае и на производството на млеко и дополнително може да преставува ризик од инфекција за лучето кои работат во близок контакт со кравите или конзумираат сурово млеко (Juhász-Kaszanyitzky и сop., 2007).

Sila и сop. (2009) пронашле 7 гени почесто присутни во изолираните MRSA: *sea*, *seb*, *sed*, *seg*, *sei*, *sej* и *eta*, кои го кодираат производството на ентеротоксините A, B, D, G, I, J и ексфолијативниот токсин A. Од друга страна, *pvl*, *tst* и *sec* гените за

Panton-Valentine леукоцидинот, TSST-1 и SEC биле најчести кај MSSA. Normanno и сор. (2007) проучиле 160 соеви на *S. aureus* добиени од храна од животинско потекло од производи од Италија и во 6 (3.75%) од нив бил присутен генот *mecA*. При тоа, секој од тие соеви синтетизирале и ентеротоксини, поточно 2 соеви синтетизирале SEA и SED (33.3%), еден сој SEC и SED (16.6%), 2 соја SED (33.3%) и еден сој SEC (16.6%). Иако потеклото на SCC<sub>mec</sub> е непознато, доказите за размена на DNA меѓу видовите се пронајдени помеѓу CoNS и *S. aureus* (Deurenberg и сор., 2007). Опишана е и честа конверзија на *S. aureus* чувствителен на метицилин (MSSA) во MRSA со латерален трансфер на SCC<sub>mec</sub>, што сугерира дека MSSA е потеклото на MRSA и дека MRSA соеви може да еволуираат повеќе пати независно, наместо од еден вид на предци. Покрај MRSA, коагулаза негативните стафилококи отпорни на метицилин може да содржат SCC<sub>mec</sub>. Се покажа дека изолатите на *S. epidermidis* отпорни на метицилин од 1970-тите содржат SCC<sub>mec</sub> типови I-IV. Други студии пронајдоа нови типови SCC<sub>mec</sub>, или SCC елементи без *mecA*, кои би можеле да бидат резервоар за острови за отпорност на антибиотици, во *S. aureus* (Deurenberg и сор., 2007).

Сепак, улогата и изворот на контаминација преку храната се уште не се јасни, бидејќи се достапни само неколку трудови за присуството и можното потекло на MRSA во храната. Корелацијата на резистентноста кон антибиотици и ентеротоксигеноста на *S. aureus* не е јасно поддржана со објавени резултати кои покажуваат дека труењето со храна предизвикано од MRSA е различно од она што е предизвикано од MSSA, освен во однос на разликата во распространетоста на SE гени кај овие две популации. За возврат, улогата на резистентноста кон антибиотици во патогеноста на ентеротоксигениот *S. aureus* е откриена под специфични услови, на пр., развој на AAD (дијареа поврзана со антибиотици). Измената на цревната флора од антибиотска терапија се чини дека е важна во однос на изразувањето на патогените својства на цревната MRSA, често пати единствената бактерија која е способна да го преживее присуството на антимицробните средства. Клиничките параметри се повисоки кај пациенти со AAD колонизирани со ентеротоксигена MRSA отколку кај оние кои страдаат од дијареа која не е поврзана со MRSA или колонизирани со не ентеротоксигена MRSA (Boyce и Havill, 2005).

## 2.4 Регулатива

За да се осигура безбедноста на храната и да се заштити здравјето на конзументите со цел да се намали можниот ризик од стафилококни интоксикации, создадена е Регулативата на Европската Комисија 2073/2005/ЕС каде што се наведени барањата за детекција и енумерација на коагулаза позитивни стафилококи во сирењата (вклучувајќи ги и овчите и козјите сирења). SEs се испитуваат превентивно кога бројката на коагулаза позитивните стафилококи е еднаква и поголема од  $10^5$  cfu/g. Истото правило е вклучено и во нашиот Правилник за посебни барања кои се однесуваат на микробиолошките критериуми за храната во член 1.28 (Сл. В. на Р.М. 100/2013). Necidová, и соp. (Necidová и соp., 2012) како и Jablonski и Bohach (Jablonski и Bohach, 2001) во своите истражувања сепак утврдиле дека *S. aureus* во опсег од  $10^3$  cfu/g до  $10^5$  cfu/g е способен да продуцира ентеротоксини во количини кои може да претставуваат ризик по здравјето на конзументите. Одредени автори сметаат дека легислативните документи ја лимитираат детекцијата на ентеротоксините според појавата на *S. aureus* утврдена како cfu/g храна, каде не се зема во предвид соодветната експресија на токсините, со што покажуваат недостатоци и пропусти во анализите (Etter и соp., 2020).

По проценката на ризикот во однос на контаминацијата на сирењата воведен бил така наречениот нов хигиенски пакет Регулативата на Европската Комисија бр. 1441/2007/ЕС, кој го земал во предвид фактот дека стафилококните ентеротоксини (SEs) можат да се продуцираат или да останат активни во храната независно дали популацијата на SE-продуцирачки CPS се намалила или можеби повеќе не може да биде детектирана во производите во времето на пуштање на истите во промет. Заради тоа, новите Европски стандарди се засноваат на контролирана анализа изведена во текот на процесот кога се очекува популацијата на CPS да биде најголема и границите на количината на CPS при што се зема во обзир и технологијата на сирењето: максималната вредност (M) варира од  $10^2$  cfu/g на продукт (кај незрееено сирење направено од сирово млеко кое поминало пастеризација или појак термички третман) до  $10^5$  cfu/g (кај сирења направени од сирово млеко). Над тие M вредности, треба да се испитаат SEs согласно со Европскиот скрининг метод за детекција на стафилококни ентеротоксини во млеко и млечни производи.

Во однос на методите на испитување на ентеротоксините, за целите на Европскиот скрининг метод за детекција на стафилококни ентеротоксини се употребува ISO 19020: 2017 кој го специфицира методот за детекција стафилококните ентеротоксини SEA, SEB, SECs, SED и SEE во храната. Тоа е имунолошки-базиран метод, каде што имаме ензимски-поврзан имуносорбентски тест (ELISA), кој може да биде брз (1.5–24h) и многу чувствителен (детектира 0.1–1 ng/ml ентеротоксини) (Su и Wong, 1997). Врз основа на оваа реакција направени се два комерцијално достапни китови од различни производители. Со цел да се детектира присуството и на останатите 16 постоечки гени на производство на ентеротоксини се развиле соодветни методи на PCR (polymerase chain reaction), мултиплекс PCR, и real-time PCR (Klotz и соp., 2003; Letertre и соp., 2003). Sergeev и соp. (2004) ја комбинирале PCR вклучувајќи сет на прајмери дизајнирани да амплифицираат конзервирана секвенца на познати SE гени и олигонуклеотиден микросет за SE гени. Со овој комбиниран метод успеал да ги сплоти двете техники: PCR може да ги детектира таргет гените дури ако се присутни во ниски концентрации; и DNA–DNA хибридизација, која ја зголемува специфичноста и дозволува паралелна анализа на мултипни SE секвенци во исто време. Со оваа техника можат да се разјаснат комплексноста и епидемиологијата на SE гените и текот на болестите предизвикани од одредена комбинација на гени.

Во Р.С. Македонија според Правилникот за посебни барања кои се однесуваат на микробиолошките критериуми за храната (Сл. В. на Р.М. 100/2013) потребно е да се изврши енумерација на коагулаза позитивни стафилококи во сирењата (вклучувајќи ги и овчите и козјите сирења) и при тоа се бара превентивна анализа на SEs само во случај кога нивниот број е еднаков или поголем од  $10^5$  cfu/g. Но, според проценката на ризикот во однос на контаминацијата на сирењата и според Регулативата на Европската Комисија бр. 1441/2007/ЕС, како и според најновите истражувања, фактите укажуваат дека треба да се внимава и да се земат во обзир и помали контаминации со *S. aureus* и до  $10^3$  cfu/g.

Имајќи предвид дека SEs се термо-стабилни и затоа може да опстојуваат во храната и откако ќе се инактивираат вегетативните облици, примероците во кои отсутствуют CPS или се под нивото утврдени со регулативата на ЕУ сè уште може да

содржат SEs во доволни количини за да предизвикаат SFP (Fusco и сop., 2018). Дополнително, познато е дека освен петте класични SEs (SEA-SEE), постојат нови SEs и SE-слични ентеротоксин (SEIs) кои не се вклучени во комерцијално достапните китови за тестирање а можат да предизвикаат SFP (Hu и сop., 2017; Umeda и сop., 2017; Zhao и сop., 2017; Ciupescu и сop., 2018; Guidi и сop., 2018, Fusco и сop., 2018; Zhang и сop., 2018). Овие наоди укажуваат на тоа дека новите SEs/SEIs се потенцијална причина за појава на труења предизвикани од храна и укажуваат дека има потреба од студии насочени кон истражување на вистинскиот ентеротоксоген потенцијал на *S. aureus* што ги содржи овие токсини, како и преваленцата на овие токсини.

Со оглед на тоа што во нашата држава сè уште немаме мониторинг план согласно Европските регулативи, големо значење е да се направи испитување во кое ќе се добијат податоци за присуството и количеството на присутните стафилококи, пред сè на *S. aureus* во млекото како и во домашните сирења, воедно да се испита способноста на тие соеви да продуцираат ентеротоксини независно од количината на бактериите, за да се утврди можно присуство на ентеротоксогени соеви во храната на нашите трпези.

### 3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Почетната идеја за ова истражување беше да се насочиме кон утврдување на карактеристиките на соевите на *S. aureus* присутни во млекото и млечните производи, како најпотврден патоген од родот на стафилококи воопшто, и да добиеме информации за рапростанетоста на ентеротоксогените соеви во овие производи. Како што истражувавме, вниманието ни го привлекоа и останатите видови на стафилококи присутни во примероците од млечната индустрија, кои ги добивавме во популацијата бактерии заедно со *S. aureus* и сакавме да провериме дали и тие можеби поседуваат слични патогени својства како горе посочениот *S. aureus*, затоа вклучивме и дел од нив ги во нашето истражување. Генералното знаење и податоците во врска со оваа тема во делот на безбедност на храната беа ограничени и се речиси неиспитани во нашата земја, земајќи ја веројатно пред сè во обзир нормативата дадена во легислативата за безбедност на млечни производи, што ни беше дополнителен стимул да се анализираат што повеќе примероци со цел да добиеме што пореална слика за нашиот предмет на истражување.

Оттаму произлегоа и нашите финални цели во оваа докторска дисертација:

1. Да се утврди застапеноста и дистрибуцијата на бројноста пред се на коагулаза позитивните стафилококи во примероците од млечната индустрија;
2. Да се направи фенотипска идентификација на добиените изолати со Vitek 2;
3. Молекуларна идентификација на *S. aureus* со утврдување на 23s генот;
4. Детекција на ген за продукција на нуклеаза;
5. Споредбена анализа на двата методи за идентификација на *S. aureus*;
6. Фенотипско утврдување на производството на ентеротоксини со помош на ензимски поврзан флуоресцентен тест (ELFA) mini VidasSET2;
7. Детекција на гени за продукција на ентеротоксини со конвенционален мултиплекс PCR ;

8. Споредбена анализа на двата методи за детекција на ентеротоксогени соеви;
9. Детекција на гени за продукција на биофилм;
10. Фенотипско утврдување на антимикробната отпорност на соевите;
11. Детекција на генот носител на резистентноста на метицилин.
12. Споредбена анализа на резултатите добиени за одредување на отпорност кон метицилин



## **4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ**

### **4.1 Материјал**

Во изработката на оваа докторска дисертација беа вклучени 215 соеви на стафилококи добиени од вкупно 1662 примероци на млеко, млечни производи и брисеви. Мострите беа анализирани во период од 2016-2020 година, дел од нив беа собирани директно кај самите млекопроизводители, дел беа купувани по малопродажни објекти и целосните анализи беа работени во Лабораторијата за Микробиологија на храна и добиточна храна и Лабораторијата за молекуларна анализа на храна и генетски модификувани микроорганизми при Институтот за храна на ФВМ-Скопје.

### **4.2 Методи**

#### ***4.2.1 Микробиолошки испитувања***

За микробиолошкото испитување, мострите беа земени во оригиналните пакувања или на стерилен начин. Мострите млеко беа земени во стерилни чашки, од посебни млеко-производители. Мострите на сирење беа во нивното финално комерцијално пакување, а во однос на времето на зреење или периодот од времето на производството, тој се движеше од 1 недела до 6 месеци. Брисевите беа земени со помош на стерилни брисеви, кои се комерцијално достапни, како сув-влажен брис, со земање на примерок на одредена површина во нашиот случај  $25 \text{ cm}^2$ , при што најпрво од таа површина во три правци беше земен примерок со брис натопен во стерилен раствор, а потоа истата површина беше помината со сув брис, финално двата брисеви беа потопени во 10ml стерилен раствор.

#### **4.2.1.1 Постапка за подготовка на мостри**

Подготовката за микробиолошката анализа започнуваше истиот ден кога се земени примероците или по складирање на 4°C, но не подолго од 24 часа. Подготовката на иницијалната суспензија се изведуваше согласно стандардите за подготовка на храна ISO 6887-1: 1999, каде за енумерација на коагулаза позитивни стафилококи ни требаа 10 g т.е ml од производот и се разредуваа стерилно со 90 ml Рингеров раствор (Oxoid, BR0052). Млеката беа инокулирани и без разредување со цел да се изолираат бактериите и во оние мостри каде што се застапени во мал број. Брисевите беа потопени во 10 ml Maximum recovery diluent (MRD, Oxoid CM0733), пред да продолжиме со инокулација на агар.

#### **4.2.2 Метод за енумерација на коагулаза позитивните соеви**

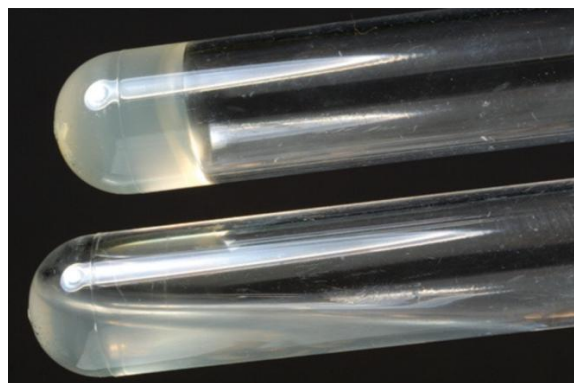
Сите примероци беа анализирани согласно ISO 6888-1:1999 „Хоризонтален метод за енумерација на коагулаза позитивни стафилококи,, со цел да се утврди присуството и бројноста на коагулаза позитивните стафилококи пред се на *Staphylococcus aureus*. Стерилните иницијални суспензии од примероците со помош на spread методот беа засеани на плочи со Baird Parker агар (Sigma, В 1051). По инкубација од 48 часа на 37°C, можеше да се утврди присуството и бројот на коагулаза позитивни стафилококи на агарот. Карактеристичните колонии, доколку беа утврдени, по 5 од плоча, понатаму беа засеани на неселективен TSA agar (Oxoid, CM0131), за да можат соодветно да се анализираат со биохемиските тестови за конфирмација на коагулаза позитивни стафилококи.



Слика бр. 8. Изглед на типични коагулаза позитивни колонии на Baird Parker agar

#### 4.2.3 Докажување на коагулаза позитивните стафилококи

Чистите култури на колониите од неселективниот агар, беа суспендирани во епрувета со 5 ml Brain Heart Infusion Broth (BHI, Oxoid, CM1135), по што се инкубираа 24 часа на 37°C. Потоа беа потврдени биохемиски со коагулаза тест, кој се изведуваше со 300µl на плазма од зајак (Remel™ Coagulase Plasma, R21060) во која ставаме 100µl од претходно инкубираниот BHI бујон, по што повторно беа инкубирани 24 часа на 37°C. Со овој тест беа утврдени коагулаза позитивните соеви, кои го продуцираат егзо-ензимот коагулаза кој го трансформира растворливиот фибриногенот во нерастворлив фибрин, со што прави коагулација на плазмата. Доколку 2/3 од плазмата е коагулирана, тестот се сметаше за позитивен.



Слика 9. Изглед на коагулаза позитивен тест (горна епрувета), коагулаза негативен тест (долна епрувета)

#### 4.2.4 Фенотипска идентификација на стафилококите

Сите добиени соеви беа идентификувани со помош на употреба на достапни автоматизирани китови за идентификација со GP-ID картичката на апаратот Vitek 2

Compact system (Biomerieux, Франција). Се правеше суспензија на секој изолат со оптичка густина од 0.52-0.63 McFarland-и во 3 ml на 0.45% физиолошки раствор, која се проверуваше со дензиметар Vitek Densicheck. Секоја суспензијата се поврзуваше со соодветната картичката за Грам позитивни бактерии, каде по направени 64 биохемиски тестови идентификацијата на изолатите се финализираше за 6-8 часови.



Слика 10. BioMérieux VITEK<sup>®</sup> 2 Compact систем

#### ***4.2.5 Фенотипско докажување на продукција на SEs од изолати со VIDAS SET2***

Способноста на добиените соеви да продуцираат ентеротоксини, фенотипски беше испитана со помош на тестот VIDAS SET 2 кој работи како ензимски поврзан флуоресцентен тест (ELFA), за квалитативна и семиквалитативна детекција на 7 серотиопови на ентеротоксини (SEA, SEB, SEC<sub>1</sub>, SEC<sub>2</sub>, SEC<sub>3</sub>, SED и SEE). Прво, од секоја култура се земаше посебна колонија која беше инокулирана во епрувета со 5ml Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, CM1135). По инкубација од 24 часа на 37°C, бујанот се центрифугираше на 4°C, 15 минути на 4000 g. Супернатантот добиен по центрифугирањето, беше издвоен и му беше измерена рН, која по потреба беше подесувана со NaOH 1M за да финално биде 7.5-8. Од вака подесениот супернатант се

земаше 500  $\mu$ l за тестот. Изолатите беа подготвени според протоколите за слични тестови со овој (SET RPLA екстракција и ENTEROTOX-F, Denka Seiken Co., Ltd., Japan) (Vernozy-Rozand и сор. 2004, Shiun-Bi Su и сор.,2005, Radovanovic и сор. 2020), а понатаму беше следен општиот протокол за детекција од производителот. Овој имуноанализатор е високо осетлив со опсег на детекција 0.25 до 1.0 ng/g на токсин, заради флуоресцентниот означувач во стрипот. Сите чекори на ELISA методот автоматски беа завршени и резултатот беше добиен за 80 мин.



Слика 11 Изглед на основните компоненти на bioMérieux VIDAS SET 2 тест китот



Слика 12 Изглед на системот bioMérieux VIDAS

#### 4.2.6 Фенотипско докажување на антимикробна отпорност

Фенотипското докажување на антимикробната отпорност беше направена со помош на Vitek 2 Compact system (Biomérieux, Франција) и AST-P580 картичките (картички за *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. и *Streptococcus agalactiae*). Со помош на автоматскиот анализатор, кој се базира на бујонска микродилуција во 64 микробунарчиња, се определуваа минималните инхибиторни концентрации (MIC) за секој од лепезата на антимикробните супстанции кои ги содржеше картичката. Инокулумот беше подготвен од свежа култура на единечна колонија, по нејзина инкубација од 24h на 37°C на TSA, при што со стерилна еза беа земени неколку колонии и беше направена суспензија во 3 ml стерилен 0.45% физиолошки раствор со турбидитет од 0.52-0.63 McFarland-и. Од суспензијата се префрлаше 200  $\mu$ l во епрувета со нови 3ml 0.45% физиолошки раствор, потоа растворот се поврзуваше со

**Табела 3.** Фамилии на антибиотици од панелот на AST-P580 и лимити за дефинирање на резистентни соеви

Група на антибиотици	Антибиотик	Опсег на MIC µg/mL	Граница за резистентност MIC µg/mL
Aminoglycosides	<b>Gentamicin</b>	0.5-16	>1
	<b>Tobramycin</b>	1-16	> 1
Beta-lactames	<b>Benzylpenicillin</b>	0.125-05	> 0.125 <sup>1</sup>
	<b>Oxacillin</b>	0.25-4	>2 <sup>1,2</sup> > 0.25 CoNS <sup>2</sup>
Quinolones	<b>Levofloxacin</b>	0.125-8	> 1
	<b>Moxifloxacin</b>	0.25-8	> 0.25
Macrolides	<b>Erythromycin</b>	0.25-8	> 2 <sup>3</sup>
Lincosamides	<b>Clindamycin</b>	0.25-2	> 0.5 <sup>4</sup>
Oxazolidinone	<b>Linezolid</b>	0.5-32	> 4
Glycopeptides	<b>Teicoplanin</b>	0.5-32	> 2 <sup>5</sup>
	<b>Vancomycin</b>	0.5-16	> 2 <sup>5</sup>
Tetracyclines	<b>Tetracycline</b>	1-16	> 2 <sup>6</sup>
	<b>Tigecycline</b>	0.125-1	> 0.5
Fosfomycin	<b>Fosfomycin</b>	16-128	> 32 <sup>7</sup>
Furanes	<b>Nitrofurantoin</b>	16-256	> 64
Fusidic Acid	<b>Fusidic Acid</b>	0.5-32	> 1
Mupirocin	<b>Mupirocin</b>	2-8	Не е применливо
Rifampicines	<b>Rifampicin</b>	0.5-32	> 0.5
Trimethoprim/ Sulfonamides	<b>Trimethoprim/ Sulfamethoxazole</b>	8-256	> 4

<sup>1</sup> Повеќето *S. aureus* соеви се производители на пеницилиназа, а некои се отпорни и на метицилин. И двата механизми ги прават отпорни benzylpenicillin, phenoxymethylpenicillin, ampicillin, amoxicillin, piperacillin и ticarcillin. Изолатите кои се сензитивни на benzylpenicillin и sefoxitin, значи дека се сензитивни на сите пеницилини. Изолатите кои се резистентни на benzylpenicillin, но сензитивни на sefoxitin, се подложни на комбинации на β-лактамаза инхибитори, на isoxazolylpenicillins (oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin и flucloxacillin) и nafcillin. Изолатите кои се отпорни на sefoxitin отпорни се на сите пеницилини.

<sup>2</sup> *S. aureus*, *S. lugdunensis* и *S. saprophyticus* со MIC вредности на оксацилин > 2 mg/L се претежно отпорни на метицилин поради присуството на генот *mecA* или *mecC*. Повремено, вредностите на оксацилин може да се високи во отсуство на ген носител на резистентноста. Овие изолати се нарекуваат БОРСА (граничен отпорен на оксацилин *S. aureus*). EUCAST не препорачува систематски скрининг за БОРСА.

<sup>3</sup> Еритромицинонот може да се користи за да се утврди сензитивноста на азитромицин, кларитромицин и рокситромицин.

<sup>4</sup> Индуцибилната отпорност на клиндамицин може да се открие со антагонизам на активноста на клиндамицин со макролиден агенс. Доколку не е откриен, тогаш пријавете го изолатот како тестиран според клиничките MIC. Доколку е откриен, се пријавува како отпорен.

<sup>5</sup> Ретка е појавата на резистентни соеви, секој таков изолат треба да се пријави во референтна лабораторија.

<sup>6</sup> Изолатите осетливи на тетрациклин се исто така осетливи на доксициклин и миноциклин, но некои отпорни на тетрациклин може да абидат осетливи на миноциклин и/или доксициклин. Доколку е потребно, треба да се користи метод на MIC за тестирање на чувствителноста на доксициклин на изолати отпорни на тетрациклин.

<sup>7</sup> Референтен метод за овој антибиотик е агар-димуција.

картичките и започнуваше анализата. Како контрола се користеше референтен сој на *S. aureus* ATCC 29213. Антибиотиците беа поделени на антибиотски фамилии, доколку имавме резистентност на супстанцијата претставник на фамилијата, се интерпретираа и останатите супстанции вклучени во таа група т.е фамилија. Резултатите се интерпретираа според критериумите на EUCAST Clinical Breakpoints (EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 11.0, валидни од 2021-01-01.) истите се запишани во Табела 3, и се однесуваат на *S. aureus* и CoNS. Соевите се дефинирани како резистентни или сензитивни според добиената минимална инхибиторна концентрација по 9-12 часовна анализа.

#### 4.3 Молекуларни анализи на изолатите

Сите изолати на стафилококи, понатаму беа испитувани со помош на конвенционален PCR за следниве карактеристики :

- триплекс PCR за детекција на генот за идентификација на *S. aureus* - 23s, генот за продукција на нуклеаза-*nuc* генот, и генот *mecA* носител на резистентноста кон метицилин.
- утврдување на присуство на 11 најчести гени за продукција на ентеротоксини со два мултиплекс протокола (M1 и M2)
- утврдување на 5 гени за продукција на биофилм со два мултиплекс протоколи.

Изолацијата на бактериската DNA се изведуваше од свежа култура на чист бактериски изолат од неселективен TSA агар, со суспендирање на неколку колонии во 50µl Phosphate Buffered saline (PBS, Sigma Aldrich). Потоа лизирањето на бактериските колонии, се правеше преку инкубација на суспензијата 10 мин на 95°C во MRC Thermo shaker 50 (UK) (Pinto и сор. 2005). Вака добиениот термолизат се центрифугираше на 10.000 g/4 минути со Hettich Mikro 120, по што 30 µl од супернатантот на термолизатот беше поделен во по три аликвоти во стерилни епендорф туби, кои се чуваа на -20°C се до нивната употреба за понатамошните протоколи за PCR тестирања.



#### 4.3.1 Молекуларна детекција на гени за продукција на ентеротоксини

За да се детектираат SEs гените, беше воспоставен протокол со два мултиплек PCR-и, работен со парови на прајмери за секвенците според протоколот од Европската Референтна лабораторија за коагулаза позитивни стафилококи (EU-RL-CPS, Anses, France) (Kerouanton и соp., 2007). Референтните соеви на *S. aureus*: FRI S6 (*sea, seb*), FRI 137 (*sec, seg, seh, sei*), FRI 326 (*see*), FRI 361 (*23s Rna, sec, sed, ser, seg, sei, sej*), 367F (*seg, sei, sep*), кои се користеа како позитивни контроли беа добиени од EURL-CPS. Единаесетте парови на прајмери дизајнирани за определените таргет гени дадени се во Табела 4 и Табела 5.

**Табела 4.** Амплификациски модели за *sea, seb, sec, sed, see* и *ser* гени за мастер микс 1

Целен ген	Прајмер	Секвенца 5'→3'	Големина (bp)	референца
<i>sea</i>	GSEAR-1	GGT TAT CAA TGT GCG GGT GG	102	Mehrotra и соp., 2000
	GSEAR-2	CGG CAC TTT TTT CTC TTC GG		
<i>seb</i>	GSEBR-1	GTA TGG TGG TGT AAC TGA GC	164	Mehrotra и соp., 2000
	GSEBR-2	CCA AAT AGT GAC GAG GAG TTA GG		
<i>sec</i>	GSECR-1	AGA TGA AGT AGT TGATGT GTA TGG	451	Mehrotra и соp., 2000
	GSECR-2	CAC ACT TTT AGA ATC AAC CG		
<i>sed</i>	GSEDR-1	CCA ATA ATA GGA GAA AAT AAA AG	278	Mehrotra и соp., 2000
	GSEDR-2	ATT GGT ATT TTT TTT CGT TC		
<i>see</i>	SA-U	TGT ATG TAT GGA GGT GTA AC	213	Sharma и соp., 2000
	SA-E rev	GCC AAA GCT GTC TGA G		
<i>ser</i>	SER-1	AGA TGT GTT TGG AAT ACC CTA T	123	Chiang и соp., 2008
	SER-2	CTA TCA GCT GTG GAG TGC AT		

**Табела 5.** Амплификациски модели за *seg, seh, sei, sej* и *sep* за мастер микс 2

Целен ген	Прајмер	Секвенца 5'→3'	Големина (bp)	референца
<i>seg</i>	SEG-F	GTT AGA GGA GGT TTT ATG	198	Ваниа и соp., 2006
	SEG-R	TTC CTT CAA CAG GTG GAG A		
<i>seh</i>	SEH-F	CAA CTG CTGATT TAG CTC AG	173	Ваниа и соp., 2006
	SEH-R	CCC AAA CAT TAG CAC CA		
<i>sei</i>	SEI-F	GGC CAC TTT ATC AGG ACA	328	Ваниа и соp., 2006
	SEI-R	AAC TTA CAG GCA GTC CA		
<i>sej</i>	SEJ-F	GTT CTG GTG GTA AAC CA	131	Ваниа и соp., 2006
	SEJ-R	GCG GAA CAA CAG TTC TGA		
<i>sep</i>	SEP-F	TCA AAA GAC ACC GCC AA	396	Ваниа и соp., 2006
	SEP-R	ATT GTC CTT GAG CAC CA		



Методата се изведуваше со финален волумен од 25  $\mu\text{l}$  кој го содржеше следново:

1. Platinum Multiplex PCR Master Mix (2X) - 12,5  $\mu\text{l}$
2. Primer Mix - 5  $\mu\text{l}$
3. Бактериска DNA - 2,5  $\mu\text{l}$
4. Вода слободна од нуклеази- 5  $\mu\text{l}$

За изведување на PCR реакциите беа користени следните температурни профили на Techne TC-412 според упатството за мастер миксот:

За продуктите во мастер миксот 1 се употребуваше следниот протокол:

1. Иницијална денатурација на 95°C/ 2 минути  
35 циклуси
2. Денатурација на 94°C/30 секунди
3. Прилепување на прајмери 60°C/30 секунди
4. Екстензија на 72°C/60секунди
5. Финална екстензија на 72°C /10 минути.



Слика 13. Изглед на PCR Techne TC-412

За продуктите во мастер миксот 2 се употребуваше следниот протокол:

1. Иницијална денатурација на 95°C/ 2 минути  
37 циклуси
2. Денатурација на 94°C/30 секунди
3. Прилепување на прајмери 53°C/40 секунди
4. Екстензија на 72°C/90 секунди
5. Финална екстензија на 72°C /7 минути

За да се прочитаат и интерпретираат резултатите, реакционите продукти беа раздвоени со помош на стандардна гел електрофореза со употреба на 2% агароза гел (Agarose, Millipore 1.01236.0500) со 1xTBE пуфер (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Пред да се излее гелот во кацичката, во него беше додаден етидиум бромид (Sigma, E1510) во количина од 3 $\mu\text{l}$ /100ml гел. За проценка на големината на

добиените фрагменти беше искористен маркер со позната молекулска маса 100 bp DNA ladder (Solis Biodyne) со стандардни фрагменти од 100 до 1000 bp. PCR-продуктите беа нанесувани со волумен од 3  $\mu$ l претходно помешани со 1.5  $\mu$ l на 3x Loading buffer (6x DNA loading Dye, Thermo). Електрофорезата се одвиваше при напон од 90V и времетраење од 90 мин. По електрофорезата, геловите со PCR-продуктите и тежинските маркери кои беа ставени на посебно означени колони од гелот, визуелно беа читани со помош на UV transilluminator (Gel Doc, XR+ Bio-Rad). Сите CoNS изолати, кои на гел електрофореза покажаа присуство на најмалку еден од гените за продукција на ентеротоксини беа повторно анализирани.



Слика14. Када за електрофореза Easycast B2/TSF



Слика15. UV transilluminator (Gel Doc, XR+ Bio-Rad)

#### ***4.3.2 Молекуларна детекција на гени за детекција на генот за идентификација на S. aureus - 23s, генот за продукција на нуклеазата-пис генот, и генот mecA носител на резистентноста кон метицилин.***

DNA термолизатите добиени како што е опишано во точка 4.3 се употребуваа и за оваа реакција. Се одмрзнуваа пред употреба, заедно со мастер микс смесата. Листата на прајмери за овој триплекс е дадена подолу во табела 6.

**Табела 6.** Аплификациски протокол за триплексот за гените 23s, *nuc* и *mecA*

Целен ген	Прајмер	Секвенца 5'→3'	Големина (bp)	референца
<i>nuc</i>	F	GCGATTGATGGTGGATACGGT	279	Brackstad и соp., 1992
	R	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC		
23s	STAUR4	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC	1250	Straub и соp., 1999
	STAUR6	AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC		
<i>mecA</i>	F	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG	162	Oliveira и соp., 2002
	R	CCACTTCATATCTTGTAACG		

Методата се изведуваше со финален волумен од 25  $\mu$ l кој го содржеше следново:

1. Platinum Multiplex PCR Master Mix (2X) - 12,5  $\mu$ l
2. Primer Mix - 5  $\mu$ l
3. Бактериска DNA - 2,5  $\mu$ l
4. Вода слободна од нуклеази- 5  $\mu$ l

За изведување на PCR реакциите беа користени следните температурни профили според упатството за мастер миксот:

1. Иницијална денатурација на 95°C/ 2 минути  
35 циклуси
2. Денатурација на 95°C/30 секунди
3. Прилепување на прајмери 60°C/90 секунди
4. Екстензија на 72°C/ 75секунди
5. Финална екстензија на 72°C /10 минути

Начинот на подготовка на гелот и нанесувањето на PCR продуктите е идентично како опишаното во 4.3.1. Кај овој триплекс реакционите продукти беа раздвоени со употреба на 1.5% агароза гел со 1xTBE пуфер, со додавање на 3 $\mu$ l етидиум бромид/100ml гел, при напон од 80V и времетраење од 130мин. Како дополнителен референтен сој за овој мултиплекс беше користен 14.2 MRSA (*mecA*) сојот добиен од EURL-AR од Данска, тој ги содржеше сите 3 гени кои ги испитувавме со овој метод. За проценка на големината на добиените фрагменти беше искористен

маркер со позната молекулска маса (100 bp DNA ladder). Геловите визуелно беа читани со помош на UV transilluminator (Gel Doc, XR+ Bio-Rad).

#### 4.3.3 Молекуларен метод за утврдување на 5 гени за продукција на биофилм со два мултиплекс протоколи

DNA термолизатите добиени како што е опишано во точка 4.3 беа користени и за оваа реакција. Листата на прајмери за овој протокол е дадена во табелата 7 во понатамошниот текст, каде во заграда до целниот ген е запишан и мастер миксот во кој била употребена.

Табела 7. Амплификациски протокол за гените за биофилм

Целен ген	Прајмер	Секвенца 5'→3'	Големина (bp)	референца
<i>icaA</i> (M1)	F	ACACTTGCTGGCGCAGTCAA	188	Alfatemi и cop. 2014
	R	TCTGGA ACCAACATCCAACA		
<i>icaB</i> (M2)	F	AGAATCGTGAAGTATAGAAAATT	900	Mehrotra и cop. 2000
	R	TCTAATCTTTTCATGGAATCCGT		
<i>icaC</i> (M2)	F	ATGGGACGGATTCCATGAAAAAGA	1075	Mehrotra и cop. 2000
	R	TAATAAGCATTAATGTTCAATT		
<i>icaD</i> (M2)	F	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	198	Mehrotra и cop. 2000
	R	AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA		
<i>bar</i> (M1)	F	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC	971	Cucarella и cop. 2004
	R	GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC		

Смесата на мастер миксот, како и температурните профили за изведувањето на PCR реакциите беа како во претходната метода (4.3.2).

Реакционите продукти беа раздвоени со помош на стандардна гел електрофореза со употреба на 1.5% агароза гел со 1xTBE пуфер, со додавање на етидиум бромид 3µl/100ml гел, при напон од 80V и времетраење од 120 мин. Како референтен сој за M2 беше користен 14.2 MRSA (*mecA*) сојот добиен од EURL-AR Данска, при тоа тој го содржеше *icaD*. За останатите гени немаше соодветен референтен сој. Геловите визуелно беа читани со помош на UV transilluminator (Bio-Rad).

#### 4.4 Анализа на параметрите за методи за детекција и идентификација

Добиените резултати за исти параметри кои беа добиени со различен метод, беа употребени за да се утврди дијагностичка сензитивност и селективност на методот, како и позитивни и негативни предиктивни вредности. Статистичката анализа беше направена согласно табелата (2x2 табела на непредвидливост) и објаснувањето подолу (Kateete и сор., 2010).

**Табела 8.** Табеларен приказ на параметрите за пресметка на сензитивност, специфичност, PPV и NPV

Резултат од тестот	Позитивен резултат со друг тест	Негативен резултат со друг тест	Вкупно
Позитивен	A	B	a+b
Негативен	C	D	c+d
Вкупно	a+c	b+d	(a+b)+(c+d)=n

a= вистински позитивни

b= лажни позитивни

c= лажни негативни

d= вистински негативни

n = вкупен број на испитани примероци/изолати

Дијагностичка сензитивност% (Sen) =  $d/(b+d) \times 100$

Дијагностичка специфичност% (Sp) =  $a/(a+c) \times 100$

Позитивни предиктивни вредности%(PPV) =  $a/(a+b)$ : претставува процент од позитивните кои навистина ќе бидат позитивни

Негативни предиктивни вредности%(NPV) =  $d/(d+c)$ : претставува процент од негативните кои навистина ќе бидат негативни

## 5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

### 5.1 Резултати од изолација, енумерација и фенотипска идентификација на соевите

#### 5.1.1 Докажување на коагулаза позитивни соеви

По завршената енумерација и изолација на стафилококите добиени од сите мостри, односно од млекото, млечните преработки и брисевите од млечна индустрија, беа добиени вкупно 215 (12.9%) соеви на стафилококи, кои беа со карактеристичен раст на коагулаза позитивни стафилококи. Потоа со коагулаза тестот беа потврдени коагулаза позитивните, и добиените изолати беа поделени во две групи: група коагулаза позитивни  $n=159$  (74%) и коагулаза негативни стафилококи  $n=56$  (26%). Најголем дел од коагулаза позитивните стафилококи беа добиени од мострите сурово млеко  $n=101$  (63.5%), потоа од мострите на различни видови на сирења  $n=47$  (29.6%), мострите урда  $n=5$  (3.1%) и мострите на кашкавал и брисеви дадоа ист број на соеви, секој по 3 изолати (1.9%). Според матрицата на мострите, најголемата преваленца на изолати беше утврдена кај мострите свежо млеко 30.3%, потоа кај сирењата 6.3%, па кај мострите на урда 3.4%, кашкавал со 1.1%, или заедно за сите млечни преработки 4.7%, и брисевите со слична преваленца како кај кашкавалите од 1.8%. Прегледот на добиените резултати е прикажан во Табела 9.

Тестот со плазма од зајак, беше користен за да го детектира ензимот коагулаза, според кој стафилококите се поделени на коагулаза позитивни и коагулаза негативни. Ензимот коагулаза делува на фибриногенот од плазмата и формира фибринско згрутчување кое потоа ги обиколува и воедно ги заштитува стафилококите од фагоцитоза и ги штити од другите клеточни или растворливи одбранбени механизми на организмот (Nara Cavalcanti Andrade и соp., 2021).

Поделба на изолираните *Staphylococcus* spp. соеви според коагулаза тестот

Анализирани мостри	Бројност на коагулаза позитивни/негативни стафилококни соеви од испитаните мостри (вкупно/%)										Преваленца во однос на вкупниот број на мостри	
	2016 Бр. на мостри		2017 Бр. на мостри		2018 Бр. на мостри		2019 Бр. на мостри		2020 Бр. на мостри			
	CPS	CoNS	CPS	CoNS	CPS	CoNS	CPS	CoNS	CPS	CoNS	CPS	CoNS
Сурово млеко	172 (51.7%)		20 (6%)		/		141 (42.3%)		/		333 (20%)	
	44 (27.7%)	19 (33.9%)	6 (3.8%)	1 (1.8%)	/	/	51 (32.1%)	2 (3.6%)	/	/	101 (63.5%)	22 (39.3%)
Млечни преработки – сирење	190		220		200		70		61		741 (44.6%)	
	9 (5.7%)	5 (8.9%)	8 (5.1%)	0	11 (6.9%)	5 (8.9%)	16 (10.1%)	0	3 (1.9%)	5 (8.9%)	47 (29.6%)	15 (26.8%)
Млечни преработки – кашкавал	76		80		60		28		30		274 (16.5%)	
	1 (0.6%)	0	0	2 (3.6%)	1 (0.6%)	0	1 (0.6%)	0	0	3 (5.4%)	3 (1.9%)	5 (8.9%)
Млечни преработки – урда	16		60		38		11		20		145 (8.7%)	
	0	0	1 (0.6%)	1 (1.8%)	0	0	3 (1.9%)	0	1 (0.6%)	0	5 (3.1%)	1 (1.8%)
Вкупно млечни преработки	282		360		298		109		111		1160 (69.8%)	
	10 (6.3%)	5 (8.9%)	9 (5.7%)	3 (5.4%)	12 (7.5%)	5 (8.9%)	20 (12.6%)	0	4 (2.5%)	8 (14.3%)	55 (34.6%)	21 (37.5%)
Брисеви	/		52		/		60		57		169 (10.2%)	
	/	/	2 (1.2%)	3 (5.4%)	/	/	0	4 (7.1%)	1 (0.6%)	6 (10.7%)	3 (1.9%)	13 (23.2%)
Вкупно според години:	454		432		298		310		168		1662	
	54 (34%)	29 (42.8%)	17 (10.7%)	7 (12.5%)	12 (7.5%)	5 (8.9%)	71 (44.7%)	6 (10.7%)	5 (3.1%)	14 (25%)	159 (9.6%)	56 (3.4%)
<b>Вкупен број на изолирани соеви на <i>Staphylococcus</i> spp.</b>											<b>215 (12.9%)</b>	

Во однос на светските истражувања, Medeiros и сор. (2019), утврдиле присуство на коагулаза позитивни стафилококи кај 80% од испитаните сирења. При анализа на 415 примероци од меко сирење, Savić Radovanović и сор. (2020) утврдиле присуство на коагулаза-позитивни стафилококи во 85 (20,48%). Слични резултати добиле и Агајо и сор. (2002), кои откриле коагулаза-позитивни стафилококи во 20% од примероците од меко сирење во Бразил, додека El-Sharoud и Spano (2008) не утврдиле присуство на *S. aureus* во примероците од меко сирење од локалните пазари во Египет. Од друга страна, во истражувањето на Rosengren и сор. (2010), коагулаза-позитивните стафилококи биле откриени кај 69% (38/55) од примероците на сирење од сурово млеко, додека кај сирењата направени од пастеризирано млеко биле застапени со 6% (6/96). Во истражувањето на Bhati и сор. (2019), добиле вкупно 107 изолати на *S. aureus*, 51 (54.3%) биле изолати од млеко, 35 (53%) биле добиени од брисеви од површини на виме и 21 (41.2%) од рацете на молзачите.

Во истражување во Полска, од Rola и сор. (2016), CPS биле изолирани кај 122 (50%) од вкупно 244 испитани мостри на млеко, сирење и брисеви. Кај млекото биле детектирани кај 12 (46.2%) и кај сирењето кај 18 мостри (69.2%). Од вкупно испитани 102 брисеви, 25 (24.5%) биле позитивни на CPS, и тоа најфреквентни биле оние изолирани од рацете на производителите на сирење (11 од 26; 42.3%) и на цистерните за млеко (7 од 26; 26.9%). Во анализите на Gokmen и сор. (2013), кои исто така испитувале млеко, сирење и брисеви од млечната индустрија, утврдиле дека од 80 примероци млеко, добиле 93 изолати на CPS и 52 на CoNS, кај сирењето имале 28.7% CPS изолати, и 57.5 % CoNS. Кај брисевите кои биле вкупно 240, земени од цистерни за млеко, канти и раце на вработени, добиле 28 CPS изолати (11.7%) и 73 изолати на коагулаза негативни стафилококи (30.4%).

Овие бактерии може да дојдат во свежото млеко или со директно излучување од вимето на кравата кај клинички или субклинички стафилококен маститис или заради слабата хигиена на вимето преку фекална контаминација (Callon и сор., 2008). Кај сирењата произведени од сурово млеко, најчесто се појавуваат како резултат на примарна контаминација од употребеното млеко добиено од животни со латентна инфекција или субклинички маститис. Во помал број на случаи, кај сирењата може да се појават како последица на лошата хигиена и неследење на добрата хигиенска



практика за време на процесот на правење сирење. Секако доколку овие бактерии ги има во работната околина во производните објекти, како и на рацете на операторите, можноста за вкрстена контаминација е една од опциите зошто бактериите би биле присутни во финалниот млечен производ.

### ***5.1.2 Енумерација на коагулаза позитивни стафилококи***

Откако карактеристичните коагулаза позитивни стафилококи беа тестирани со коагулаза тестот, броењето беше направено согласно хоризонталниот метод за енумерација на CPS, ISO 6888: 1999, по што мострите беа поделени во соодветни групи според бројот на бактерии.

Мострите млеко беа поделени во две групи, според членот 19 од Правилникот за посебни барања за безбедноста и хигиената при изведувањето на официјалните контроли на млекото и млечните производи (Сл. Весник на Р.М. бр.26/2012), прва група до 2000 cfu/ml и втората група со бројка над 2000 cfu/ml. Втората група би била незадоволителна според горе споменатиот Правилник. Во групата на незадоволителните мостри, спаѓаа 16 од вкупно 101 мостра со изолати на коагулаза позитивни стафилококи или 15.8%, со бројност од 2000 до 4900 cfu/ml (3.3 -3.7 log cfu/ml), останатите мостри вкупно 85 од 101 мостра (84.2%) се движеа во границите од 10-2000 cfu/ml (1-3.3log cfu/ml).

Мострите на сирење, кашкавал и урда беа поделени според параметрите дадени во Правилникот за посебни барања кои се однесуваат на микробиолошките критериуми за храната (Сл. Весник на Р.М. 100/2013), каде што според членот 2.2.4 за бројноста на коагулаза позитивните стафилококи е дозволено да има присуство на истите кај 2 единици од испитани 5 единици од една мостра на производ, и тие треба да се движат меѓу 100 cfu/g и 1000 cfu/g. Доколку само една единица има над 1000 cfu/g, целата мостра се смета за незадоволителна. Со оглед на тоа што кај мострите од ова истражување немаше по 5 испитани единици од мостра, за горна граница беше утврдена да е 1000 cfu/g, па кај оние мостри каде што беа изброени CPS над 1000 cfu/g, толкувањето е дека таа мостра е незадоволителна според посочениот член. Кај сирењата, вкупно 39 од вкупно 47 изолати со CPS или 83% имаа од 20-1000 cfu/g (1.3-3 log/g), додека 8/47 или 17% имаа CPS од 1000-6.000 cfu/g (3-3.8log/g) и би се

толкувале како незадоволителни. Кај кашкавалите кај сите мостри енумерацијата се движеше од 20-200 cfu/g (1.3-2.3log/g). Кај мострите урда се движеше од 60-600 cfu/g (1.8-2.8 log/g).

За брисевите значајно беше само дали имаат или немаат присуство на коагулаза позитивни стафилококи, воедно не постоеше толкување на резултатите бидејќи немаме соодветни параметри во актуелната легислатива, при тоа 3-те брисеви со CPS имаа бројност која се движеше од 1-4 cfu/cm<sup>2</sup> анализирана површина.

Во однос на податоците од светските испитувања, во студијата на Medeiros и сор. (2019) сите енумерации на коагулаза-позитивните стафилококи кај сирењата, биле помали од 10<sup>5</sup>cfu/g, при тоа сите соеви биле идентификувани како *S. aureus*. Од друга страна, резултатите што ги добиле Sampaio и Nader Filho (2000) во карактеристични бразилски сирења (Мато Гросо), 50% од примероците покажале бројки на CPS повисоки од дозволените. Savić Radovanović и сор. (2020) утврдиле дека бројноста на CPS кај сирењата се движела од 1-5.79 log cfu/g, при тоа 9.1 % биле во рамките до 100 cfu/g, додека останатите од 100 до над 10.000 cfu/g. Во истражувањето на Rola и сор. (2016), утврдиле дека бројноста на CPS зависи од видот на мострата. Кај две фарми немало утврдено позитивни, додека кај останатите фарми енумерацијата во млекото се движела од 0–1.0 до 0–5.0 log<sup>10</sup> cfu/ml. Сите полу-готови производи на формирано сирење имале CPS кои се движеле во рамките од 1.30 до 6.04 log<sup>10</sup>cfu/g. Додека кај готовите производи бројноста се движела од 0 до 7.41 log<sup>10</sup>cfu/g. Кај брисевите земени од работната околина, највисок број на CPS бил детектиран кај брисевите од рацете на производителите на сирење (4.34 log<sup>10</sup>cfu/брис). Tondo и сор. (2000) објавиле дека *S. aureus* бил присутен во 90,4% од примероците од сурово млеко со просечна бројност од 3,54 log<sup>10</sup> cfu/ml.

Бројноста на *S. aureus* кај млекото зависи од правилно изведеното молзење и хигиената. При добра хигиенска практика во фармите, контаминацијата на млекото со *S. aureus* би требало да се движи од 100-200 cfu/ml (2-2.3log<sup>10</sup> cfu/ml), но во случај на присуство на бактерии и воспаление во вимето, бројот на овие микроорганизми може да се зголеми до 4 log<sup>10</sup>cfu/ml (Asperger и сор., 2003). Во случај кога не постојат ниту клинички ниту субклинички маститис, едно од можните објаснувања за повисокото ниво на *S. aureus* во примероците на сурово млеко може да биде нивна крос-

контаминација од опремата за молзење или од персоналот вклучен во фазата на молзење.

Во истражување на Rola и сор. (2016), резултатите покажале дека нивото на контаминација на сирењето постепено се зголемува за време на неговото производство. Онаму каде млекото имало квалитетни параметри, а при тоа и брисевите земени од околината или рацете на производителите на сирење биле негативни за CPS, бројот на стафилококи во зрелото сирење било  $\leq 5 \log^{10} \text{cfu/g}$ , додека онаму каде и млекото и брисевите биле позитивни, финалните производи имале стафилококи и од  $6-7 \log^{10} \text{cfu/g}$ . Зголемување на бројноста на *S. aureus*, за традиционално сирење од кравјо млеко било утврдено во етапата од млеко до урда и од други автори (Jakobsen и сор., 2011). Овие зголемени нивоа може да се објаснат со физичкото заробување на *S. aureus* во урдата и неговата способност брзо да расте во млекото, што е докажано со нивното време на генерирање од 0,8 часа на 25 °C (Tatini и сор., 1971; Le Marc и сор. 2009). Друг можен извор на контаминација се операторите во производството на сирење, бидејќи *S. aureus* често се наоѓа на кожата на производителите на сирење (Lawryniewicz-Paciorek и сор., 2007, André и сор., 2008).

Практично со контролата врз растот на *S. aureus* за време на ферментација на сирењето или други производи добиени од сурово млеко значи дека се превенира евентуалното производство на ентеротоксини. Појавата на коагулаза-позитивните стафилококи во сирењата произведени од пастеризирано млеко може да се објаснат од сиромашните хигиенски практики или последователна вкрстена контаминација од околината, често од валкани раце на операторите или од опремата, при тоа дополнителни фактори за нивен успешен раст се високата активност на вода (0,94 до 0,96) и високата pH вредност (6,0- 6,2) (Savić Radovanović и сор., 2020).

### **5.1.3 Фенотипска идентификација на *Staphylococcus spp.***

Сите изолати кои беа со карактеристичен раст на селективната подлога за коагулаза позитивни стафилококи, беа изолирани за коагулаза тестот, по што секој од нив независно од резултатот на коагулаза тестот беа анализирани и идентификувани со картичката за Грам-позитивни бактерии, GP-ID на Vitek 2 (Biomerieux).

### 5.1.3.1 Фенотипска идентификација на изолати добиени од сурово млеко

Од вкупно 333 мостри на сурово млеко, беа добиени вкупно 123 изолати (36.9%) на *Staphylococcus* spp., поточно n=63 (51.2%), n=7 (5.7%) и n=53 (43.1%) поделени соодветно по години: 2016 год., 2017 год и 2019 год.

**Графикон 1.** Идентификација на соевите стафилококи изолирани од млеко со Vitek 2



Од изолатите на *Staphylococcus* spp. добиени од анализите во временски период од 3-те посочени години, со помош на Vitek 2 беа идентификувани следниве соеви: *S. aureus* 73.2 % (n=90), *S. epidermidis* 16.3% (n=20), *S. haemolyticus* 3.3% (n=4), *S. xylosus* 2.4% (n=3), *S. warneri* 1.6 % (n=2), *S. sciuri* 1.6 % (n=2), *S. chromogenes* 0.8% (n=1) и *S. simulans* 0.8% (n=1). Процентот на точност на идентификацијата на соевите добиен со Vitek 2GP-ID картичката, за сите идентификувани соеви се движеше од 85-99% што укажуваше на многу добра до одлична идентификација. Резултатите дадени по години се прикажани во Графикон 1.

Процент на застапеност на *S. aureus* во вкупниот број на мостри млеко со 90 изолати изнесуваше 27%, а останатите стафилококи од кои сите беа коагулаза негативни беа застапени со 34 изолати или 10.2% од вкупниот број на мостри. Во споредба со странските трудови, во истражувањето на DeXian и sor. (2020) било објавено дека присуството на *S. aureus* било утврдено во 12% од примероците на

млеко (56/462) добиени од клинички и субклинички маститични крави во провинцијата Лианонинг во Кина. Algamal и сор. (2020) објавиле преваленца на *S. aureus* во примероци од млеко од одделни четвртини во провинцијата Исмаилија (Египет) од 36% (53/146) кај говедата и 35% (31/88) кај биволите. Khemiri и сор. (2019) пријавиле присуство на *S. aureus* во 47 од 150 примероци (31.3%) од кравјо млеко девет мали семејни фарми во Тунис. Додека Jorgensen и сор. (2005) изолирал *S. aureus* кај 75% кај примероци од кравјо млеко, истотака во поголем процент го утврдил и Fusco и сор. (2011) каде *S. aureus* бил застапен кај 54% од промероците свежо млеко. Во анализата на Gokmen и сор. (2013), добиле вкупно 49 изолати на *S. aureus* (61,25%), од коагулаза негативните најзастапени два видови биле *S. simulans* 17/52 (32.6%) и *S. lentis* 13/52 (25%). Освен тие коагулаза негативни изолати, утврдиле уште *S. xylosum* n=7, *S. saprophyticum* n=5, *S. haemolyticum* n=4, *S. epidermidis* кој заедно со *S. auricularis* бил утврден кај 3 изолати. Andrade C. Nara и сор. (2021), исто така со фенотипскиот метод Vitek 2 GP-ID картичките добиле одлична (96 до 99% веројатност) и многу добра (93 до 95% веројатност) идентификација на изолатите. Во мострите на овчо млеко утврдиле 31 *S. aureus* (22.5%) и седум различни видови на CoNS со 20 изолати (14.5%): *S. chromogenes* (9), *S. epidermidis* (3), *S. auricularis* (2), *S. haemolyticum* (2), *S. simulans* (2), *S. lentus* (1) и *S. rostri* (1).

Првите пет видови на CoNS најчесто изолирани во случаи на маститис вклучуваат: *S. chromogenes*, *S. xylosum*, *S. epidermidis*, *S. simulans* и *S. haemolyticum*, иако нивната преваленца секако варира помеѓу студиите (Supre и сор., 2011, Fry и сор., 2014). Сето тоа ни укажува на постоење на CoNS соеви кои можат да се карактеризираат со вирулентни и патогени особини. *S. epidermidis*, покрај тоа што предизвикува маститис, е и една од водечките причини за болнички инфекции и се смета за вид кој е адаптиран на човекот. Се смета дека човечките коменсални соеви и говедските соеви на *S. epidermidis* се тесно поврзани (Savijoki и сор., 2014), што сугерира дека луѓето би можеле да бидат резервоари на соеви поврзани со маститисот кај говедата. *S. chromogenes* исклучително ретко може да се најде во средина на млекарските фарми и ретко ги колонизира луѓето, па затоа се смета за вид кој се адаптира на домаќинот (Pyorala и Taponen, 2009, DeVisscher и сор., 2014). Една од можностите е дека екстра-мамарните места кај кравите се резервоари на овие

бактерии, но тоа бара попрецизна идентификација на видовите и типизирање на соевите. Се претпоставува дека секое млечно стадо може да има уникатна екстра-млечна микробиота на CoNS (DeVisscher и сор., 2014), воедно и дека микробиотата го штити вимето од патогени микроби. Сепак, заштитниот ефект не е целосно потврден и сè уште е дискутабилен, но изолирани биле соеви како на пример, соеви на *S. chromogenes* добиени од врвот на боската кои покажале инхибиторен (сличен на бактериоцин) ефект против *S. aureus* и *S. agalactiae* (Braem и сор., 2014), што може да е и изолиран случај, затоа што тој сој општо земено е најраспространетиот вид на CoNS што предизвикува маститиси.

### **5.1.3.2 Фенотипска идентификација на изолати добиени од млечни производи**

Од испитаните млечни производи (сирење, кашкавал и урда), беа добиени вкупно 76 изолати на *Staphylococcus* spp. или 6.5% од вкупните мостри, поточно n=15 (19.7%), n=12 (15.8%), n=17 (22.4%), n=20 (26.3%) и n=12 (15.8%) поделени соодветно по години : 2016 год., 2017 год., 2018 год., 2019 год. и 2020 год.

Од изолатите добиени од испитувањето на млечните производи, беа идентификувани следниве соеви: *S. aureus* 68.4% (n=52), *S. epidermidis* 15.9% (n=12), *S. warneri/conhii* 10.5% (n=8), *S. haemolyticus* 2.6% (n=2), и *S. shleiferi* 2.6% (n=2). Процентот на точност на идентификацијата на соевите добиен со Vitek 2, за сите идентификувани соеви се движеше од 89-99% што укажуваше многу добра до одлична идентификација. Единствено исклучок беа соевите запишани како *S. warneri/conhii* каде што Vitek 2 со GP ID картичката не ни даде конечна идентификација на сојот, туку даваше 50% идентификација за секој од нив и од таа причина ги наведуваме и двата соеви.

**Графикон 2.** Идентификација на соевите изолирани од млечни преработки со Vitek 2



Во однос на мострите од кои се добиени изолатите, утврдивме дека 84.6% или 44 од идентификуваните *S. aureus* потекнувале од сирење, потоа 9.6 % или 5 изолати од мострите урда и 3 изолати или 5.8% од мострите кашкавал. Исто така најголем број од останатите добиени соеви на стафилококи потекнуваа од мострите на сирење. Преваленцата е прикажана во Табела бр.10.

**Табела 10.** Поделба на идентификувани *Staphylococcus spp.* според вид на производ

Вид на мостра	Број (%) на идентификувани соеви на <i>Staphylococcus spp.</i>				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. warneri/conhii</i>	<i>S. shleiferi</i>
<b>сирење</b>	<b>44 (84.6 %)</b>	8 (66.7%)	2 (100%)	6 (75%)	2 (100%)
<b>кашкавал</b>	3 (5.8%)	3 (25%)	0	2 (25%)	0
<b>урда</b>	5 (9.6%)	1(8.3%)	0	0	0
Вкупно:	52	12	2	8	2

Во анализата на Gokmen и сор. (2013), добиле само 3 изолати на *S.aureus* од сирењето кое го испитувале што било 13% од добиените CPS изолати, додека од коагулаза негативните најзастапени два видови биле *S. xylosus* 24/46 (52.2%) и *S. carnosus* 13/46 (28.3%). Освен тие коагулаза негативни изолати, во сирењата ги

утврдиле и уште и *S. saprophyticus* кај 7 изолати (15.1%) и *S. auricularis* кај 2 изолати (4.4%). Fooladi и сор. (2010) утврдиле дека 32% од млечните производи биле контаминирани со *S. aureus*. Фенотипската карактеризација што ја извеле De Andrade и сор. (2019), им овозможила идентификација на 193 изолати (117 од традиционални сирења и 76 индустриски произведени сирења), со преваленца: *S. aureus* (106/193), *S. xylosus* (40/193), *S. cohnii ssp. cohnii* (17/193), *S. saprophyticus* (6/193), *S. epidermidis* (4/193), *S. hyicus* (4/193), *S. lentus* (4/193), *S. sciuri* (4/193), *S. cohnii spp. urealyticus* (2/193), *S. haemolyticus* (2/193), *S. chromogenes* (1/193), *S. lugdunensis* (1/193), *S. hominis* (1/193) и *S. intermedius* (1/193). Висок процент на *S. aureus* (100%) бил пронајден во примероците на традиционалното coalho сирење и *S. xylosus* (87,5%) и *S. cohnii ssp. cohnii* (50%) во примероци од индустриски произведено сирење. Во друга студија на Vieira (2017), биле анализирани 179 изолати на стафилококи добиени од колонијалното сирење што се продава во Порто Алегре, Бразил, каде ги идентификувале следниве видови во 33% од примероците: *S. equorum* (10, 5.6%), *S. vitulinus* (6, 3.3%), *S. hyicus* (4, 2.2%), *S. saprophyticus* (4, 2.2%), *S. epidermidis* (3, 1.8%), и со по еден изолат (0.5%) следниве видови: *S. carnosus*, *S. carnosus subsp. carnosus*, *S. capitis*, *S. chromogenes*, *S. fleurettii*, *S. haemolyticus*, *S. succinus subsp. casei* и *S. warneri*. Високата фреквенција на соеви на коагулаза-негативни стафилококи како и различноста во видовите, кои секако зависат и од начинот на одгледување на животните, хигиената, производството и бактериските култури присутни во околината и кај животните, повторно обрнуваат внимание истите да се земат во предвид за скрининг на субклинички маститис како и подобра хигиенска практика, со цел да бидат присутни во што помал број.

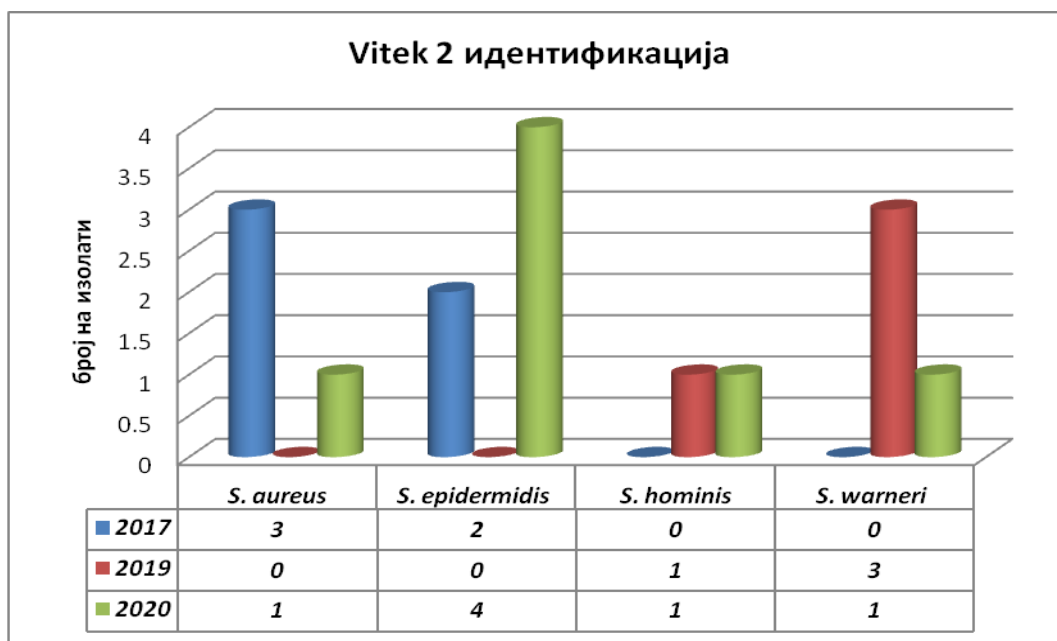
### **5.1.3.3 Фенотипска идентификација на изолати добиени од брисеви**

Од брисевите земени од работни површини и раце на вработени, беа добиени вкупно 16 изолати на *Staphylococcus* spp. од 169 мостри или 9.5%, поточно n=5 (31.2%), n=4 (25%) и n=7 (43.8%) поделени соодветно по години: 2017 год., 2019 год и 2020 год. Тие беа биохемиски идентификувани со Vitek 2, при што се утврдија следниве соеви: *S. aureus* 25% (n=4), *S. epidermidis* 37.5% (n=6), *S. warneri* 25% (n=4) и



*S. hominis* 12,5% (n=2). Процентот на точност на идентификацијата за сите идентификувани соеви се движеше од 88-99% што укажуваше на одлична идентификација со Vitek 2.

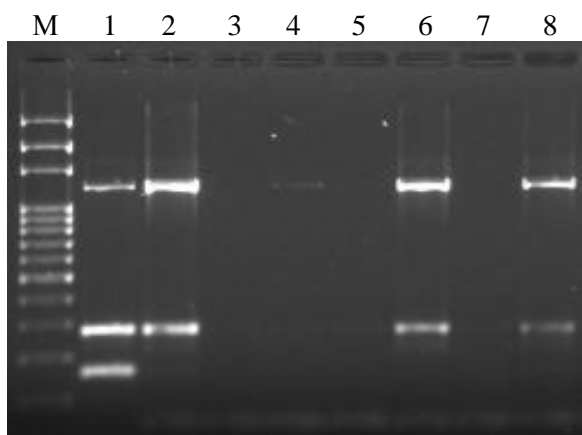
**Графикон 3.** Идентификација на соевите изолирани од брисеви со Vitek 2



Во истражувањето на Gokmen и сор. (2013), кај изолатите од брисеви земени од цистерни за млеко, канти за сирење и раце на вработени, утврдиле 9 изолати на *S.aureus* или 32% од добиените CPS изолати, додека од коагулаза негативните најзастапени два видови биле *S. lentus* 33/73 (45.2%) и *S. hominis* 23/73 (31.5%) од вкупно изолираните коагулаза негативни стафилококи. Освен тие коагулаза негативни изолати, во сирењата ги утврдиле и уште и *S. saprophyticus* 4/73 (5.5%), *S. auricularis* кај 3 изолати (4.1%) и *S. chromogenes* во 1 изолат (1.4%). Во истражувањето на Lee и сор. (2012), биохемиски идентификуваниот *S.aureus* бил изолиран во примероци од брис од раце на вработени и опрема за молзење во 3,3% (n = 120) и 3,6% (n = 389), соодветно.

## 5.2 Молекуларна детекција на 23s генот и *nuc* генот за докажување на *S. aureus* со конвенционална PCR метода

Сите фенотипски конфирмирани стафилококи беа испитани на присуство на 23s генот, со кој се потврдува идентификацијата на *S. aureus*. Конфирмација на генот беше направена со конвенционална PCR метода работена во триплекс, со испитување на следните гени : 23s, *nuc* и *mecA*. Резултатите за 23s и *nuc* генот се прикажани подолу според матриксот од кој е добиен изолатот. Присуството на останатиот ген е објаснет во понатамошниот текст заради полесна следливост на резултатите.

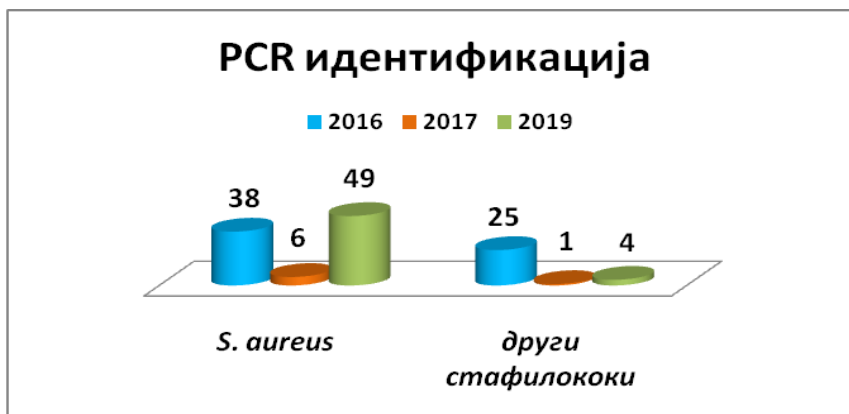


**Слика 16.** Визуелизација на PCR ампликони на 23s, *nuc* и *mecA* гените М: 100-бр скала Линија 1: референтен сој 14.2 MRSA ги содржи *mecA* – 162 bp, *nuc* – 279 bp и 23s = 1250bp гените; Линија 2,6 и 8 ги содржат *nuc* – 279 bp и 23s = 1250bp гените

### 5.2.1 Молекуларна детекција на 23s генот за докажување на *S. aureus* кај изолати од млеко

Со помош на мултиплекс PCR методот и добиените резултати за детекција на 23s генот, изолатите од млеко беа групирани според добиените анализи на следниве групи на *Staphylococcus* spp.: *S. aureus* и останати *Staphylococcus* spp. видови. Од вкупно 123 изолати на млеко, *S. aureus* беше утврден во 93 изолати (75.6%), т.е. во 38 изолати (40.8%) од 2016, 6 изолати (6.5%) во 2017 и 49 изолати (52.7%) во 2019 година. Останатите видови на стафилококи беа утврдени во 30 изолати (24.4%) од вкупно изолираните, т.е. во 25 изолати (83.4%) од 2016 год., 1 изолат (3.3%) во 2017 год. и 4 изолати (13.3%) во 2019 година.

**Графикон 4.** Идентификација на 23s ген кај соевите изолирани од млеко со PCR



Во нашето истражување беа анализирани и коагулаза негативни стафилококи, за кои се очекуваше дека не го поседуваат овој ген. Едно од истражувањата е на Proietti и сор. (2010) од Централна Италија, каде генот се користел за потврда на фенотипски докажаните изолати на *S. aureus* од кравјо млеко, и тука имало 100% совпаѓање. Akineden и сор. (2001) од испитани 103 коагулаза позитивни изолати од млеко исто така кај сите бил утврден генот 23s и биле идентификувани како *S. aureus*. Во истражувањето на Bhati и сор. (2019) добиле вкупно 107 изолатина *S. aureus* идентификувани со 23s генот, од кои 51 (54.3%) биле изолати од млеко.

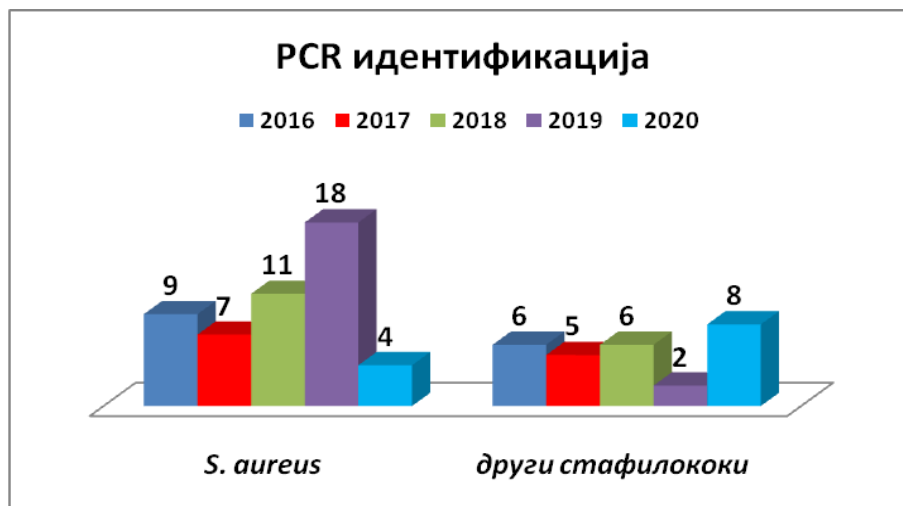
### 5.2.2 Молекуларна детекција на 23s генот за докажување на *S. aureus* на соеви изолирани од млечните преработки

Од вкупно анализирани 76 изолати добиени од млечните преработки, *S. aureus* беше утврден во 49 изолати (64.5%), т.е во 9 изолати (18.4%) од 2016 год., 7 изолати (14.3%) во 2017 год., 11 изолати (22.4%) во 2018 год., 18 изолати (36.7%) во 2019 година и 4 изолати (8.2%) во 2020 година. Од сирењата беа изолирани 41 изолат (83.7%), од кашкавалите 3 изолати (6.1%) и од мострите урда 5 изолати (10.2%).

Останати видови на стафилококи беа утврдени во 27 изолати (35.5%) од вкупно изолираните 76. Поточно во 6 изолати (22.2%) од 2016 год., 5 изолати (18.6%) во 2017 год., 6 изолати (22.2%) во 2018 год., 2 изолати (7.4%) во 2019 година и 8 изолати (29.6%) во 2020 год. или вкупно 21 изолат (77.8%) од сирења, 5 изолати

(18.5%) од кашкавали и 1 изолат (3.7%) од мострите урда. Резултатите добиени за двете групи според години се дадени во Графикон бр.5.

**Графикон 5.** Идентификација на 23s ген кај соевите изолирани од млечни производи со PCR

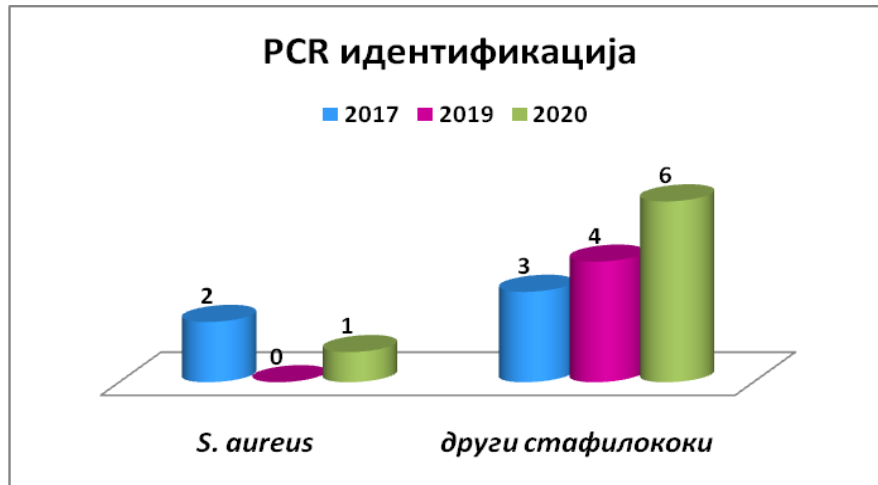


Cremonesi и сор. (2017), анализирале 33 свежи, меки, полутврди и тврди сирења направени од свежо млеко, со помош на класични микробиолошки и молекуларни техники, со цел да го идентификуваат *S. aureus*. При тоа класичните биохемиски тестови биле во согласност со молекуларните кај сите изолати, кои биле позитивни на 23s rRNA, *coa* и *nuc* гените.

### 5.2.3 Молекуларна детекција на 23s генот за докажување на *S.aureus* на соеви изолирани од брисеви

Кај 16-те соеви на *Staphylococcus* spp. добиени од брисевите, со мултиплекс PCR методот за детекција на 23s генот за докажување на *S.aureus* беа добиени следниве резултати: 23s беше утврден кај 3 изолати (18.7%), и тоа 2 изолати од 2017год. и 1 изолат 2020 год. Останатите видови на стафилококи беа утврдени во 13 изолати (81.3%), 3 (23.1%) во 2017 год., 4 (30.8%) во 2019 год. и 6 (46.1%) во 2020 год.

**Графикон 6.** Идентификација на 23s ген кај соевите изолирани од брисеви со PCR

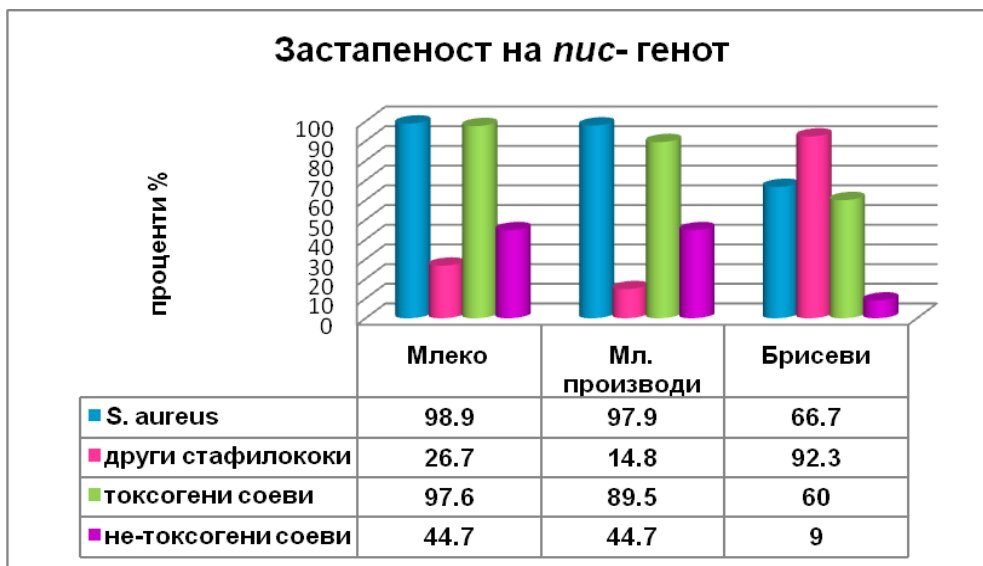


Во истражувањето на Bhati и сор. (2019), добиле вкупно 107 изолати на *S. aureus* идентификувани со 23s генот, каде имало изолати и од млеко, но од нив 35 (53%) биле добиени од брисеви од површини на виме и 21 (41.2%) од рацете на молзачите.

#### 5.2.4. Молекуларна детекција на ген за продукција на нуклеаза

Конфирмација на генот беше направена со конвенционална PCR метода работена во триплекс, со испитување на следните гени : 23s, *nuc* и *tecA*. Резултатите за *nuc*-генот и процентот на позитивни соеви се прикажани подолу во Графикон 12. Употребени беа специфични амплификациски прајмери за засилување на сегмент од генот *nuc* (ген кој ја кодира термостабилната ендонуклеаза на коагулаза-позитивен стафилококи).

**Графикон 12.** Процентуална застапеност на *nuc*-генот кај стафилококните соеви



Според податоците, соевите на *S. aureus* (92/48/2) го поседуваа овој ген во 98.9%/97.9%/66.7% од изолатите за млекото/млечните производи/брисевите соодветно. За млекото и за млечните производи процентите се приближни, но драстично е помал процентот кај брисевите што можеби се должи на малиот број на испитани изолати. Кај останатите стафилококи кои не се *S. aureus*, изолирани од млеко, млечни производи и брисеви, генот *nuc* е застапен со 26.7%, 14.8% и 92.3% соодветно (7/4/12), што ни укажува за негова присутност и кај стафилококите што не се *S. aureus*, а воочливо беше тоа што процентот за оваа група на бактерии драстично е поголем кај изолатите добиени од брисевите. Вкупно добивме 3 соеви на *S. aureus* кои беа без детектиран *nuc*-ген, додека истиот беше утврден кај 4 останати коагулаза позитивни изолати од кои 2 се *S. shleiferi* и 2 неидентификувани, и кај 6 CoNS (*S. epidermidis* n=2, *S. warneri/conhii* n=1, *S. chromogenes* n=1, *S. xylosus* n=1, *S. sciuri* n=1).

Во испитувањето на Yildirim и sor. (2019), од вкупно 50 испитани млека, *S. aureus* бил утврден во 35 (70%), и кај 32 (91.4%) од нив бил утврден е *nuc* генот, што соодветствување со нашите резултати. Во истото истражување кај сирењата, од 60 мостри изолирале 62 различни соеви, од кои 18 (29%) го имале *nuc* генот. Во истражување во Полска, Rola и sor. (2016), CPS биле изолирани кај 122 (50.0%) од вкупно 244 испитани мостри на млеко, сирење и брисеви, при тоа генот *nuc* бил

утврден кај сите коагулаза позитивни изолати. Во истражувањето на Andrade и сор. (2021), *nuc* генот бил откриен во 67 од 137 сите изолати (48,9%), од кои само 35 биле *S. aureus*. Всушност, сите *S. aureus* во тоа истражување го содржеле генот *nuc*, додека повеќето CoNS не го содржеле (70/101), но сепак бил утврден и кај голем дел од нив 30.7%. Освен *S. aureus*, *nuc* позитивни изолати биле следниве: *S. chromogenes* (8), *S. warneri* (4), *S. auricularis* (3), *S. caprae* (3), *S. hyicus* (3), *S. lentus* (3), *S. epidermidis* (2), *S. simulans* (2), *S. capitis*(1), *S. haemolyticus* (1), *S. hominis* (1) и *Staphylococcus* spp. (1). Ова исто така се совпаѓа со нашите резултати каде имавме изолати на CoNS за кои утврдивме присуство на генот.

Присуството на *nuc* генот, се користел за идентификување и потврдување на *S. aureus* (Kateete и сор., 2010, McClure и сор., 2017). Сепак, *nuc* генот во поновите испитувања е присутен кај повеќето или кај сите изолати на *S. aureus*; но сега опишани се и такви изолати кои не го носат овој ген, како што се опишани и изолати на CoNS кои можат да го поседуваат (Xu и сор., 2015).

### 5.2.5 Споредбена анализа на резултатите за идентификација на *S. aureus*

Според добиените резултати за идентификација на *S. aureus*, можеме да ги анализираме податоците добиени од Vitek2 и PCR методот. Според податоците издвоени во табелата, можеме да ги одредиме следните 4 параметри за анализите добиени со Vitek2 GP-ID картичката: дијагностичката сензитивност на за идентификација на *S. aureus* е 94%, дијагностичката специфичност е 95.9%, позитивната предиктивна вредност изнесува 97.2% и негативната предиктивна вредност изнесува 91.3%.

**Табела 11.** Табеларен приказ на параметрите за пресметка на сензитивност, специфичност, PPV и NPV

Изолати	23s позитивни PCR	23s негативни PCR	Вкупно
<i>S. aureus</i> Vitek 2	142	4	146
Останати стафилококи Vitek 2	6	63	69
Вкупно	148	67	215

### 5.3 Фенотипско докажување на продукција на SEs од изолати со методот VIDAS SET2

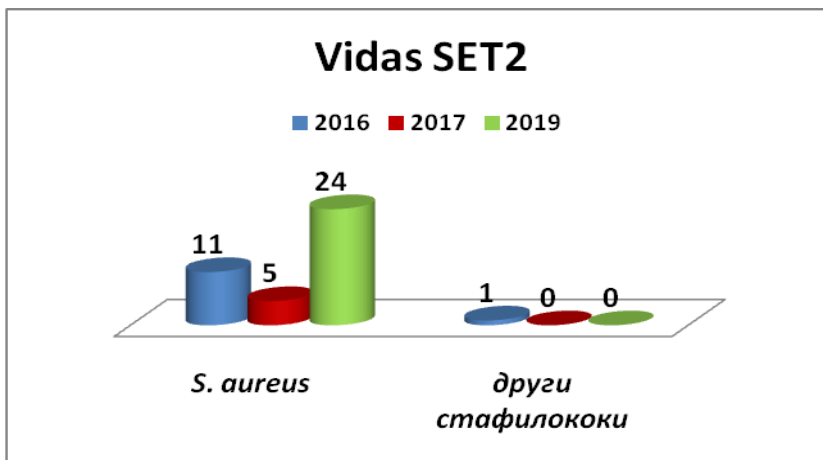
По фенотипското докажување на соевите на стафилококите, изолатите беа анализирани за фенотипско утврдување на продукција на ентеротоксини со помош на ензимски поврзан флуоресцентен тест (ELFA) VIDAS (Biomerieux) методот со VIDAS SET2, со кој се утврдува присуството на SEA, SEB, SEC и SED во микробиолошкиот медиум со изолат.

#### 5.3.1 Фенотипско докажување на продукција на SEs од изолати добиени од млеко со VIDAS SET2

Од 123 изолати добиени од сирово млеко во период од 3 години, беа утврдени вкупно 41 позитивен изолат (33.3%) со стриповите на VIDAS SET2 тестот. Поточно позитивни се 12 соеви (29.3%) од 2016 год., 5 соеви (12.2%) од 2017 год. и 24 соеви (58,5%) од 2019 година.

При тоа 40 соеви (97.5%) припаѓаат на видот *S. aureus*, еден сој (2.4%) е коагулаза позитивен стафилокок што не е *S. aureus*, за него немаме соодветна идентификација на Vitek 2.

Графикон 7. Фенотипско докажување на продукција на SEs кај изолати од млеко со VIDAS SET 2





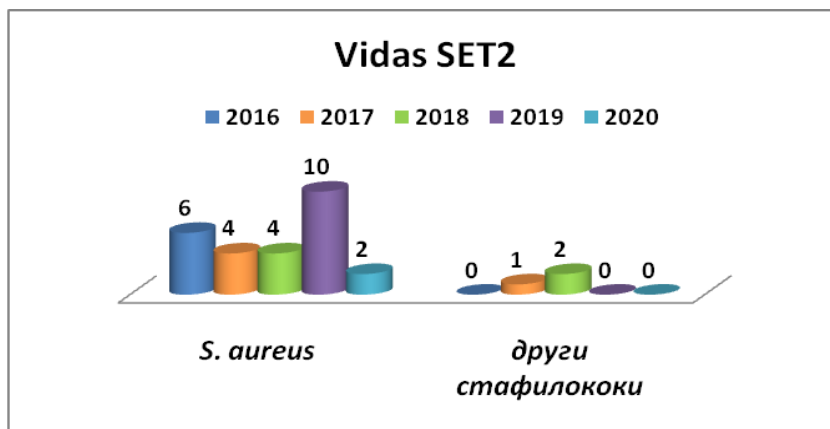
Во однос на истражувањата од светската литература, во истражувањето на *Roia* и сор. (2016), добиле 122 изолати на CPS (50.0%) од вкупно 244 испитани мостри на млеко, сирење и брисеви. Тие ги тестирале изолатите кои им дале позитивен резултат на PCR (вкупно 55), со овој метод и кај супернатантите од изолатите, продукцијата на ентеротоксините од експресијата на *sea—see* гените, резултирале со позитивен резултат кај 31 сој од вкупно 55 (56.4%) изолати.

### 5.3.2 Фенотипско докажување на продукција на SEs од изолати од млечните преработки со VIDAS SET2

Од 76-те изолати добиени од млечните преработки во период од 5 години, беа утврдени вкупно 29 позитивни изолати (38.2%) со стриповите на VIDAS SET2 тестот. По години добиени се следните позитивни соеви: 2016 n=6 (20.7%); 2017 n=5 соеви (17.2%); 2018 n=6 соеви (20.7%); 2019 n=10 (34.5%) и 2020 година n=2 (6.9%).

При тоа 25 соеви (86.2%) припаѓаат на видот *S. aureus*, а 4 соеви (13.7%) се од останатите видови на стафилококи изолирани 2017 и 2018 год. Во овие 4 соеви спаѓаат: *S.shleiferi*, *S. epidermidis*, и два коагулаза позитивни соеви кои што не се *S.aureus*, за кои немаме соодветна идентификација на Vitek 2. Од сирењата добиени се 23 позитивни изолати (79.3%) или тоа се 37.1% вкупниот број на соеви изолирани од сирења, од кои 19 изолати се *S. aureus*, другите 4 се во групата на останатите стафилококи.

Графикон 8. Фенотипско докажување на SEs во изолати од млечни производи со VIDAS SET 2



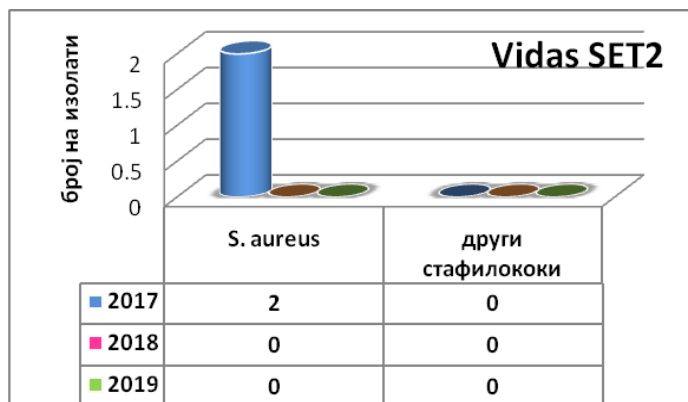
Кај кашкавалите беа добиени 2 позитивни изолати (6.9%) т.е ги има кај 25% од изолатите кои потекнуваат од кашкавал. Кај урдата како производ беа добиени 4 позитивни изолати (13.8%) или тоа е 66.7% од вкупните изолати добиени од урдата.

Во однос на светските анализи на детекција на ентеротоксогени соеви изолирани од сирење со оваа метода, Vernozy-Rozand и сор. (1996), утврдиле дека меѓу 187 соеви на *Staphylococcus* spp. изолирани од млеко, сурутка и козјо сирење само 5,9% биле во можност да го произведат ентеротоксини. Holeckova и сор. (2002), откриле дека меѓу 51 соеви изолирани од сирење од овчо млеко произведени во Словачка, 39,2% биле во можност да произведат ентеротоксини. Во наодите на Savic Radovanovic и сор. (2020) од Србија, од вкупно 85 изолати на коагулаза позитивни стафилококи добиени од сирење, со овој метод утврдиле дека 26 изолати или 30.59% продуцирале ентеротоксини. Сепак, чувствителноста и специфичноста на ELFA методот може да варираат во зависност од чистотата на реагенсите и нивото на експресија на токсини. Aitichou и сор. (2004) објаснил дека границата на чувствителност во комбинација со можноста за вкрстена реактивност и интерференции својствени за анализираната матрица, како што е алкалната фосфатаза, се главните недостатоци на имуно-анализите, така што што секако постои реална потребата за развој на нови методи за дијагноза на токсини (Hennekinne и сор., 2012).

### **5.3.3 Фенотипско докажување на SEs во изолати од брисеви со VIDAS SET2**

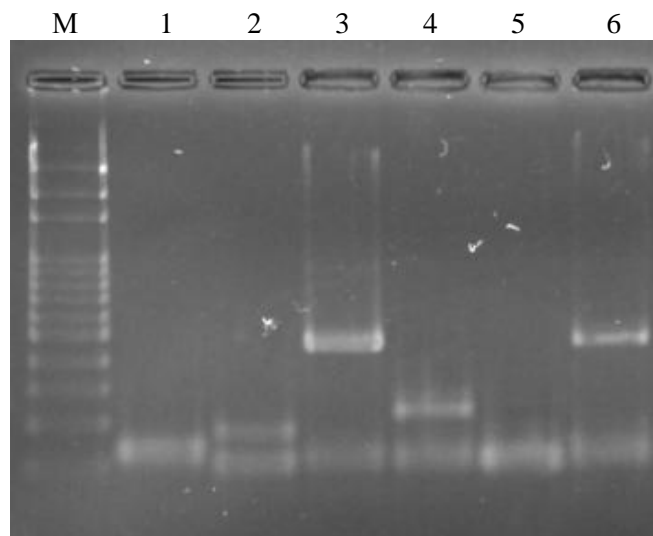
Кај брисевите позитивна реакција на VIDAS SET2 добивме кај 2 изолати (12.5%) на *S. aureus* од 2016 година, изолирани од примерок на брис земен од работна површина и брис од вработен. Тоа значи дека 12.5% од соевите изолирани од брисевите дале позитивна реакција за продукција на ентеротоксини со помош на VIDAS SET2.

**Графикон 9.** Фенотипско докажување на SEs во изолати од брисеви со VIDAS SET 2



#### 5.4 Молекуларна идентификација на гени за продукција на ентеротоксини со конвенционален PCR

Добиените соеви ги анализираме со два мултиплекс PCR протоколи, за да го утврдиме присуството на 11-те најчести гени за продукција на ентеротоксини кај стафилококите, ги изразивме во табели за секој матрикс на мостра посебно.

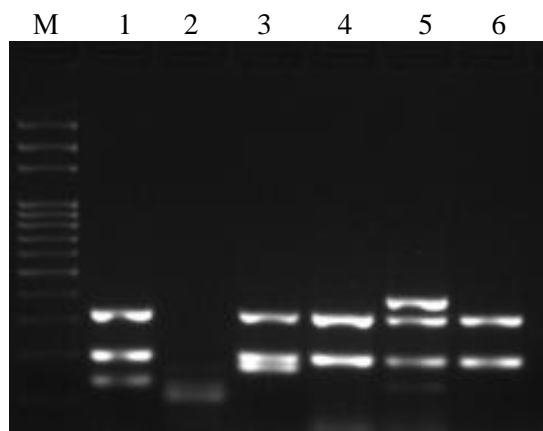


**Слика 17.** Визуелизација на PCR ампликони на мултиплекс 1 за ентеротоксини, М: 100-bp скала  
 Линија 1: го содржи *ser* – 123 bp, Линија 2 ги содржи *sea* – 102 bp и *seb* – 164 bp, Линија 3 и 6 ги содржат гените *sea*-102 bp и *sec*- 451bp, Линија 4 ги содржи *sea*- 102 bp и *sed* – 278 bp, Линија 5 го содржи *sea* – 102 bp,

#### 5.4.1 Детекција на гени за продукција на ентеротоксини кај изолатите од млеко со конвенционален PCR

Сите комбинации на SE гени добиени со помош на мултиплекс PCR протоколите од изолатите од млеко ги прикажавме во Табела бр.12. Од вкупно 123 изолати на стафилококи, присуство на гени за продукција на ентеротоксини утврдивме во 85 (69.1%) соеви. Кај 77 (90.6%) од нив носител на гените беше *S. aureus*, додека кај 8 (9.4%) од нив се работеше за други соеви на стафилкоки: *S.haemolyticus*, *S. warneri*, 6 соеви на стафилококи кои не се *S. aureus* а се носители на *nuc* генот (*S.chromogenes*, *S.epidermidis*, *S.sciuri*, *S. xylosus* и 2 неидентификувани). Вкупно добивме 27 соеви со присуство на 1 ген (31.8%), најчести беа соевите со 2 гени, вкупно 38 (44.7%), потоа со 3 гени вкупно 16 (18.8%), со 4 гени добивме 3 изолати (3.5%) и еден изолат со 5 гени за продукција на ентеротоксини (1.2%).

Соевите кај кои не беше детектирано присуство на ниту еден од 11-те испитувани гени, беа вкупно 38 (30.9%). *S. aureus* беше застапен со 16 соеви (42%) или тоа е 17.2% од вкупниот број на *S. aureus* изолати добиени од млеко. CoNS имаа 20 негативни изолати (52.6%), и уште 2 соеви на стафилококи (5.3%) кои беа носители на *nuc* генот, без адекватна идентификација или тоа е 73.3% од сите останати стафилококи.



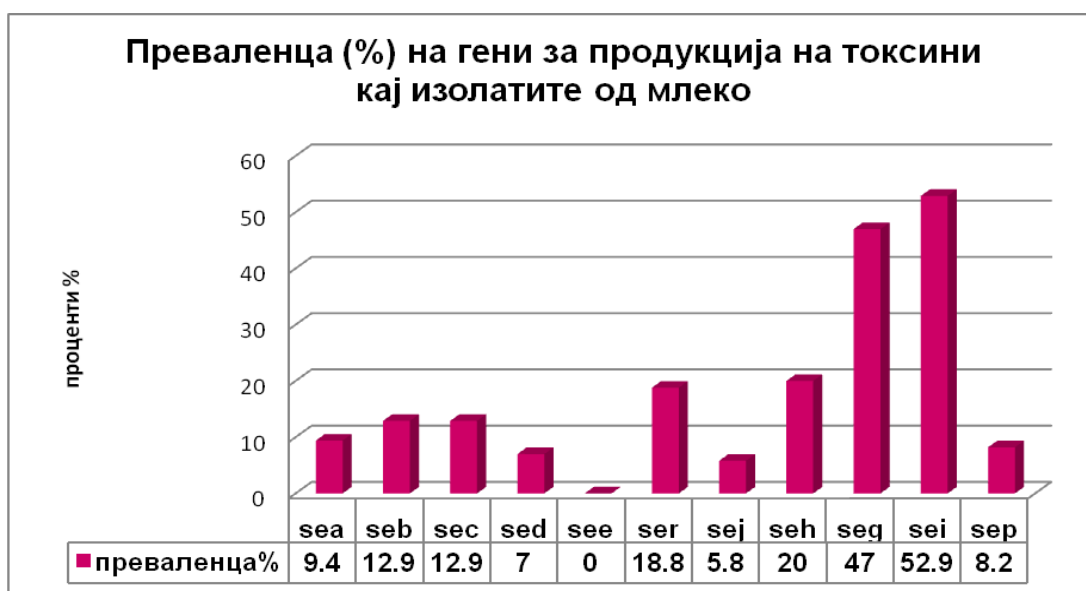
**Слика 18.** Визуелизација на PCR ампликони на мултиплекс 2 за ентеротоксини, М: 100-бр скала  
Линија 1: референтен сој 14А ги содржи *sej* – 131 bp, *seg*– 198 bp и *sei*- 328bp гените; Линија 3 ги содржи *seh* – 173 bp, *seg*– 198 bp и *sei* - 328bp гените, Линија 4 и 6 ги содржат *seg*-198 bp и *sei*- 328bp гените, Линија 5 ги содржи *seg*- 198 bp, *sei* - 328bp и *sep* – 396 bp гените

**Табела 12.** Комбинации на изолирани SEg кај *Staphylococcus* spp. изолирани од млеко.

Број на гени	Комбинација на SE гени	Број (%) на изолати	Вид на стафилококи
1	<i>sea</i>	1	<i>S. aureus</i>
	<i>ser</i>	4	<i>S. aureus</i>
	<i>sec</i>	3	<i>S. aureus</i>
	<i>seh</i>	13	12- <i>S. aureus</i> , 1- <i>nuc</i> + <i>S. epidermidis</i>
	<i>sei</i>	5	1- <i>S. aureus</i> , 3- <i>nuc</i> + ( <i>S. chromogenes</i> , <i>S. sciuri</i> и неидент.) 1- <i>S. warneri</i>
	<i>sep</i>	1	<i>S. aureus</i>
2	<i>sea, ser</i>	1	<i>S. aureus</i>
	<i>sea, seb</i>	2	<i>S. aureus</i>
	<i>seg, sei</i>	25	23- <i>S. aureus</i> , 1- <i>S. haemolyticus</i> , 1- <i>nuc</i> + <i>S. xylosus</i>
	<i>sed, sej</i>	4	<i>S. aureus</i>
	<i>ser, seb</i>	3	<i>S. aureus</i>
	<i>ser, sep</i>	1	<i>S. aureus</i>
	<i>seh, sei</i>	1	<i>S. aureus</i>
	<i>seh, sep</i>	1	<i>nuc</i> +
3	<i>seg, sei, sep</i>	2	<i>S. aureus</i>
	<i>sec, seg, sei</i>	5	<i>S. aureus</i>
	<i>sea, ser, she</i>	2	<i>S. aureus</i>
	<i>sed, ser, sej</i>	1	<i>S. aureus</i>
	<i>ser, seg, sei</i>	2	<i>S. aureus</i>
	<i>ser, sed, sec</i>	1	<i>S. aureus</i>
	<i>seb, ser, seg</i>	1	<i>S. aureus</i>
	<i>seb, seg, sei</i>	2	<i>S. aureus</i>
4	<i>sea, seb, seg, sei</i>	2	<i>S. aureus</i>
	<i>sec, seg, sei, sep</i>	1	<i>S. aureus</i>
5	<i>seb, sec, seg, sei, sep</i>	1	<i>S. aureus</i>
0	Негативни	38 (30.9%)	CoNS (n=20), <i>S. aureus</i> (n=16), <i>nuc</i> + (n=2)
1 до 5 SEg	Позитивни	85 (69.1%)	

Според застапеноста на поделни гени, беше утврдено дека кај изолатите од млеко имаше најголема застапеност на *sei* со детекција кај 45 изолати (52.9%) и *seg* со детекција кај 40 изолати (47%), најмалку изолати беа утврдени со генот *sej* (5 изолати), додека генот *see* не беше детектиран.

**Графикон 10.** Преваленца на различните гени за продукција на токсини кај изолатите на стафилококи од млеко



Во однос на резултатите добиени за присуство на гените за продукција на токсини кај изолатите од млеко, во оваа студија најзастапен беше *sei* со 52.9% и *seg* со 47% од сите изолати, додека најмалку застапени беа *sed* 7% и *see* кој што не беше детектиран. Кај соевите кои беа групирани во останати стафилококи т.е беа CoNS или беа со присуство на *nuc* ген а не се *S. aureus*, ентеротоксогените соеви беа застапени со 26.7%. Тоа се 8 соеви, кај кои детектиравме присуство на *sei* 37,5% и *seh* и *seg* секој со по 25% и *sep* 12.5%.

*Sea* генот се наоѓа на профаг (Borst и сор. 1994) и лесно може да се дисеминира меѓу *Staphylococcus* spp. соевите. Неговиот производ, ентеротоксин А, често се поврзува со труење со храна бидејќи е токсичен при мали концентрации (Balaban

2000). Во студијата кај Priscila Luiza Mello и сор. (2016), *sea* бил најзастапен ген со 18.2%, додека вкупно соеви кои продуцирале ентеророксини 76 (41.9%) од 181 соеви беа позитивни за барем еден од проучените гени. *Sea* бил откриен кај 33 (18,2%) од изолатите, *seb* во 14 (7,7%), *sec* во 27 (14,9%), *sed* во 1 (0,5%), *see* во 15 (8,2%), *seg* во 3 (1,6%), *seh* во 46 (25,4%), *sei* во 12 (6,6%) и *ser* во 3 (1,6%). *Sej* генот не бил откриен во ниту еден од испитаните соеви. Во истражувањето на Acosta и сор. (2017) од испитаните гени (*sea*, *seb*, *sed*, *seg*, *seh* и *sei*) кај соевите на *S. aureus*, изолирани од млеко, забележано било присуство кај 48,1% (13/27) од испитуваните соеви и утврдени биле: *sea* со 33,3%, *seh* 18,5%, *sei* 11,1% и *sed* 7,4%.

Helak со сор. (2019) кај испитување на CoNS кај млеко од крави вкупно испитани 163 изолати на коагулаза негативни изолати кај 32 (19.6%) утврдиле присуство на гени за продукција на ентеротоксини, каде што присуството на *seg* било 25% како втор најзастапен ген, каде процентот е идентичен со нашите наоди при тоа носител на гените бил *S. haemolyticus*.

Генот *sec* се наоѓа на патогените острови и може да се подели на три подтипови (*sec1*, *sec2* и *sec3*) врз основа на антигенските разлики и врз животинскиот домаќин со кој е поврзан. Генот *sed* се наоѓа на плазмидот pIB485 и SED е вториот најчест токсин поврзан со труење со храна (Balaban, 2000). Мала количина на овој ентеротоксин може да предизвика болест, главно кај деца и постари лица (Veras и сор., 2008). Истата студија (Veras и сор., 2008) покажало производство на стафилококни ентеротоксини од страна на CoNS користејќи имунолошки анализи. Генот на *see* беше откриен во низок процент (8,2%) или не бил пронајден како во студијата на Srinivasan и сор. (2006) кој ги истражувал соевите на *S. aureus* изолирани од млеко крави со маститис во регионот Тенеси, САД. Ниту еден од 78 –те изолати не бил позитивен за тој ген. Генот *see* се наоѓа на профаг и студиите покажале дека генот *see*, *sed* и *sea* се тесно поврзани, со 81% хомологија на секвенцата помеѓу *see* и *sea* (Balaban, 2000). Иако генот *sei* беше откриен само во мал процент (6,6%), тој бил присутен во соевите на CoNS, што е важен факт кој ретко се опишува во литературата. Покрај тоа, во студијата на Srinivasan и сор., 47 (60,3%) од 78 –те изолирани изолати на *S. aureus* го носеле генот. Овие податоци ја нагласуваат

важноста на познавањето на подвижните генетски елементи што можат да ги пренесат овие гени меѓу *Staphylococcus* spp. (Lawrynowicz-Paciorek и сop., 2007).

DeXian и сop. (2020) откриле е дека 41% (23/56) од тие изолати се носители на еден или повеќе гени кои кодираат ентеротоксини. Изолатите со *seg* (27%) биле најзастапени, проследени со *sea* (16%), *seb* (7%) и *sec* (7%). Algammal и сop. (2020), 36% од изолатите биле ентеротоксогени, при што 27% од нив беа позитивни за *sea*, 7% позитивни за *sec* генот и ниту еден позитивен за генот на *seb* и *sed*. Fursova и сop. (2020) истражувала 21 сој на *S. aureus* изолирани од маститис од говеда во седум региони во Западна Русија користејќи анализа на секвенца на целиот геном. Ниту еден од испитаните соеви не содржел гени кои ги кодираат класичните ентеротоксини од *sea-see*. Сепак, 38% од изолатите се класифицирани како токсиногени содржејќи *seg* и *sei*. Идентификувале и гени кои ги кодираат SE-сличните протеини (*sel*): *selm*, *seln*, *selo* и *selv*. Grispoldi и сop. (2019б) ги анализирале изолираните *S. aureus* од 12 фарми за млечни говеда во централна Италија. Изолатите имале преваленца која се движи од 47% за *see* до 6% за *seb* и *sec*. Khemiri и сop. (2019) утврдиле 16 гени за кодирање на ентеротоксин, со преваленца која се движи од 47% за *sed* до 2% за *ser* и *selp*.

Гените на ентеротоксините откриени кај некои изолати на CoNS можат да бидат нестабилни. Според феноменот забележан од Park и сop. (2011), интензитетот на PCR ампликоните кај ентеротоксогените говедски CoNS ослабува или дури и целосно исчезнува по неколку пасажи на бактериите. Оваа појавата беше забележана и во нашето истражување, при што беа направени соодветен број на повторувања на анализите кај CoNS изолатите кои покажаа присуство на најмалку еден ген за продукција на SEs. Резултатите кои се повторуваа, беа земени во предвид, додека сите останати беа отфрлени. Тоа ја отвара можноста дека некои генетски елементи што содржат SEg кај изолатите на CoNS се однесуваат поинаку од истите кај *S. aureus*. Еволутивно би можело да се објасни дека CoNS би биле со минлив статус на интер- и интра-видов трансфер на SE-гените и важен резервоар на гени поврзани со вирулентност, кои значително придонесуваат за еволуцијата на ентеротоксогеноста на *S. aureus* (Kassem и сop., 2011).



#### **5.4.2 Детекција на гени за продукција на ентеротоксини кај изолатите од млечни производи со конвенционален PCR**

Од вкупно 76 изолати на стафилококи добиени од млечните производи, присуство на гени за продукција на ентеротоксини беа утврдени во 38 (50%) соеви. Кај 30 (79%) од нив носител на гените беше *S. aureus*, додека кај 8 (21%) од нив се работеше за други соеви на стафилококи:  $n=2$  *S. epidermidis*, *S. warneri/conhii* и уште еден *nuc* негативен сој неидентификуван, 4 соеви на стафилококи кои не се *S. aureus*, а се носители на *nuc* генот ( $n=S. shleiferi, *S. warneri/conhii* и 1 неидентификуван). Вкупно беа добиени 16 соеви со присуство на 1 ген (42.1%), тие беа и најзастапените соеви кај млечните производи, потоа соевите со 2 гени вкупно 11 (29%), со 3 гени вкупно 4 (10.5%) и со 4 гени беа добиени 7 изолати (18.4%).$

Соевите кај кои немаше детектирано присуство на ниту еден од 11-те испитувани гени, беа вкупно 38 (50%). *S. aureus* беше застапен со 18 соеви (47.3%) или тоа е 36.7% од вкупниот број на *S. aureus* изолати добиени од млечни производи. CoNS имаа 20 негативни изолати (52.6%). Комбинациите на детектираните гени според мострите се прикажани во Табела 13.

Според застапеноста на поделни гени, беше утврдено дека кај изолатите од млечни производи имаше најголема застапеност на *sei* со детекција кај 18 изолати (47.4%) и *seg* со детекција кај 14 изолати (36.8%), најмалку изолати беа утврдени со гените *sec* и *sed* утврдени кај 3 изолати, додека генот *see* не беше детектиран.

Беше направена и уште една поделба на мострите, според потеклото на животните, со што се увиде дека беа добени вкупно 33 изолати (43.4%) од производи од кравјо млеко, а 24 изолати (31.6%) од производи од овчо млеко, останатите 19 изолати беа од производи добиени од мешано млеко. Кај изолатите од кравјите производи, вкупно 15 (45.4%) се ентеротоксогени изолати, од кои 12% се носители и на 3 гени, најзастапен е *sei* со 53.3%. Кај изолатите од овчите производи, 17 (70.8%) се ентеротоксогениизолати, каде 5 (20.8%) од нив се носители на 4 гени за продукција на токсини. Најзастапен ген кај овчите производи бил *seh* и *sei*, секој од нив застапен во 6 изолати (35.3%).

Табела 13. Комбинации на изолирани SEg кај *Staphylococcus* spp. изолирани од млечни производи

Број на гени	Комбинација на SE гени	Број (%) на изолати	Вид на стафилококи	Вид на мостра
1	<i>sea</i>	3 (7.9%)	<i>S. aureus</i>	Кашкавал n=1 , биено сирење n=2
	<i>seb</i>	1 (2.6%)	<i>S. shleiferi, nuc+</i>	Бело сирење
	<i>ser</i>	2 (5.3%)	<i>S. aureus,</i>	Овчо биено Сирење
			<i>S. epidermidis</i>	кравјо сирење
	<i>seh</i>	4 (10.5%)	<i>n=3 S. aureus,</i>	Овчо сирење
			<i>n=1 nuc</i> и <i>23s</i> негативен	Овчо сирење
	<i>sei</i>	3 (7.9%)	<i>n=1 nuc+</i> , <i>S. warnerii/conhii</i>	Сирење
			<i>n=1 S. epidermidis,</i>	Кравјо сирење
			<i>n=1 S. warnerii /conhii</i>	Мешан кашкавал
<i>sep</i>	3 (7.9%)	<i>S. aureus</i>	Овчо биено сирење	
2	<i>seb, ser</i>	1 (2.6%)	<i>S. aureus</i>	Сирење
	<i>seb, sej</i>	1 (2.6%)	<i>S. aureus</i>	Бело сирење
	<i>sed, sej</i>	3 (7.9%)	<i>S. aureus</i>	Овча урда
	<i>ser, sej</i>	1 (2.6%)	<i>S. aureus</i>	Бело сирење
	<i>seg, sei</i>	4 (10.5%)	<i>S. aureus</i>	Биено сирење, овчо сирење, n=2 кравјо сирење
	<i>ser, seh</i>	1 (2.6%)	<i>S. aureus</i>	Биено сирење
	<i>seb, seg, sei</i>	1 (2.6%)	<i>S. aureus</i>	Сирење
3	<i>sec, seg, sei</i>	3 (7.9%)	<i>2-S. aureus,</i>	Урда, сирење
			<i>1-nuc+</i> , <i>23s</i> негативен	сирење со пиперка
4	<i>sea, seb, seg, sei</i>	1 (2.6%)	<i>S. aureus</i>	Кашкавал
	<i>sea, seh, seg, sei</i>	1 (2.6%)	<i>S. shleiferi, nuc+</i>	Биено сирење
	<i>seb, seg, sei, sep</i>	1 (2.6%)	<i>S. aureus</i>	Биено овчо сирење
	<i>seb, sej, seg, sei</i>	1 (2.6%)	<i>S. aureus</i>	Овчо сирење
	<i>seb, sej, seh, sei</i>	1 (2.6%)	<i>S. aureus</i>	Овчо сирење
	<i>ser, seh, seg, sei</i>	1 (2.6%)	<i>S. aureus</i>	Овчо сирење
	<i>ser, seg, sei, sep</i>	1 (2.6%)	<i>S. aureus</i>	Биено овчо сирење
0	негативни	38 (50%)		<i>S. aureus</i> (n=18), останати стафилококи (n=20)
	ПОЗИТИВНИ	38 (50%)		

**Графикон 11.** Преваленца на различните гени за продукција на токсини кај изолатите на стафилококи од млечни производи



Присуството на гените за продукција на ентеротоксини кај *S. aureus* добиен од сирења е многу варијабилно кај различни автори. Има студии со резултати каде процентите на ентеротоксогени соеви кои се движат од 3,6% (Arcuri и сор., 2010) до 100% (Najera-Sanches и сор., 2003). Во однос на детекцијатана гените, *sec* генот бил утврден кај 21% од изолатитево студијата на Medeiros и сор.(2019), 25% од тестираните изолатиза Kav и сор. (2011), 72,9%. кај изолатите на Arcuri и сор. (2004). Гените *sea* и *see* биле откриени во 40%, додека *seb* кај 30% кај изолатите од Kareish - сирење од Mousa и сор. (2017). Во студија Ertas и сор. (2010) утврдиле присуство на 4 изолати (1,3%) *sea* и 2 (0,6%) *seb* и 1 (0,3%) *sed*. Од испитувањата од Норвешка индицирале дека 14.7% од CPS изолатите од различни фази на продукција на сирењето поседувале гени за ентеротоксини, каде најзастепени биле *seg* (72.7%) и *sei* (27.3%) (Jørgensen и сор., 2005). Во наодите на Savic Radovanovic и сор. (2020) од Србија, од 85 тестирани изолати кај 26 (30.59%) бил детектиран *sea*; во 24 изолати заедно со претходниот бил утврден и *seb*, додека не утврдиле ниту еден *sec*, *sed* и *see*. Во Франција, SEA се наведува како најчеста причина за труење (69,7%) кај 31 појава на труења пријавени во периодот 1981-2002 година, и предизвикани од различна храна, како на пр. млеко, млечни производи, месо и салати. Најчести детектирани

гени во тие интоксикации биле *sea*, *sed*, потоа *sei* и *seh*, ретко *seb* и *sec*, додека генот *see* исто како и во ова истражување не бил детектиран (K erouanton и сop. 2007). Во истражувањето на бразилските сирења на De Andrade и сop. (2019), присуството на гени било забележано во 49,5% (47/95) од тестираните соеви, со преваленца на генот *seh* во 53,2% од изолатите, *seg* во 46,8%. Гените кои го кодираат ентеротоксинот SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEI, SEJ и SEL не биле откриени во испитуваните изолати. Помеѓу видовите со коагулаза-негативни стафилококи како носители на гените *seg* и *seh*, ги утврдиле: *S. cohnii* sp. *cohnii*, *S. cohnii* sp. *urealyticus*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. hyicus*, *S. lentus*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus* и *S. xylosus*.

Резултатите од истражувањата имаат големи варирања и се разликуваат во различни земји т.е. подрачја. Hummerjohann и сop. (2014) и Normanno и сop. (2007) објавиле дека многу од нивните анализирани примероци имаа и SEs/SEIs-позитивни и SEs/SEIs-негативни колонии во исто време. Како причина, тие ја истакнале важноста за тестирање на поголем број на колонии по мостра, со што се зголемува можноста да биде откриена ентеротоксогена колонија. Исто така употребувајќи го PCR методот, и можноста за евентуално тестирање на повеќе колонии, па дури и пулови (групи) на колонии можеби треба да се земат во предвид за да се зголемат шансите за откривање позитивни изолати. Друга причина зошто некаде се детектираат а некаде не овие гени, како причина може да биде наведена и употребата на различна секвенца за прајмери, т.е може да има разлики во однос на спастичноста и сензитивноста на различните прајмери.

Во истражување на Rola и сop. (2016), од изолати на млеко, сирење и брисеви, SE гените биле утврдени во 55 (45.1%) изолати. Поголемиот дел од нив биле позитивни на 3 маркери за ентеротоксини, т.е *sed* + *sej* + *ser* и *sec* + *seg* + *sei* (26 (47.3%) и 3 (5.4%) изолати, соодветно). Некои CPS поседувале само еден ген *sep* (15; 12.0%) или *sea* (1; 1.8%) или комбинација од 4 гени *sed* + *sej* + *sep* + *ser* (1; 1.8%). За коегзистенција на *sed* и *sej* претходно биле опишани и од други автори исе должи на заедничката локација на гените на истиот плазмид (Zhang и сop., 1998). Слично во истражувањето на Hummerjohann и сop. (2014) покажа декакај изолатите на *S. aureus* доминирала комбинацијата на *sed*, *sej* и *ser* кај швајцарските сирења од сурово млеко. Од друга страна, сегашните резултати се во спротивност со студиите од Јапонија,

Австрија, Франција и Турција, каде што генот *sec* бил најчест откриен кај *S. aureus* кој потекнувал од млеко и суровомлечни сирења (Loncarevic и сор. 2005, Morandi и сор. 2007, Katsuda и сор., 2005, Kav и сор., 2011). Овие податоци можеби укажуваат на преваленца на одредени ентеротоксогени *S. aureus* во различни географски региони т.е. појавата на одредени соеви може да варира во зависност од земјата, традицијата, начинот на одгледување на млечните грла и начинот на продукцијата на производите, како и бактериските заедници присутни во нив.

#### 5.4.3 Детекција на гени за продукција на ентеротоксини кај изолатите од брисеви со конвенционален PCR

Од изолатите добиени од брисевите од работни површини и од раце на вработени, кои вкупно беа 16, кај 5 (31.6%) од нив беше детектирано присуство на гени за продукција на ентеротоксини. Три соеви поседуваа само еден ген, а кај два од нив беа утврдени 2 гени. Најчест утврден ген исто така беше *sei* кај 4 изолати или 80% од позитивните. При тоа 3 изолати (60%) кои поседувале ген/и биле *S.aureus*, останатите 2 (40%) биле идентификувани како *S. hominis*.

Табела 14. Комбинации на изолирани SEg кај *Staphylococcus* spp. изолирани од брисеви

Бр.	Вид на стафилококи	Број (%) на изолати	Гени за токсини од multiplex 1						Гени за токсини од multiplex 2				
			<i>sea</i>	<i>ser</i>	<i>seb</i>	<i>see</i>	<i>sed</i>	<i>sec</i>	<i>sej</i>	<i>seh</i>	<i>seg</i>	<i>sei</i>	<i>sep</i>
1.	<i>S. aureus</i> (раб. површина В6)	1 (6,25)									x	x	
2.	<i>S. aureus</i> (раце на вработен С8)	1 (6,25)					x						
3.	<i>S. aureus</i> (работно одело 7)	1 (6,25)										x	x
4.	<i>S. hominis</i> (раб. површина А4)	1 (6,25)										x	
5.	<i>S. hominis</i> (раце вработен 13)	1 (6,25)										x	
	Вкупно позитивни:	5 (31.6)	0	0	0	0	1 (20)	0	0	0	1 (20)	4 (80)	1 (20)

Во прилог на податоците од брисевите, во едно истражување утврдиле дека застапеноста на ентеротоксигени стафилококи кајработниците за преработка на храна изнесува 17% (El-Shenawy и сор., 2014). Од испитувањата од Норвешка утврдиле дека од 19 земени брисеви, нашле 9 (47.4%) изолати кои имале гени за продукција на ентеротоксини, каде најзастепен бил *sea* во 7 изолати (77.8%) и *seb* во 2 (22.2%) (Jørgensen и сор., 2005). Откриено било исто така дека токсинот SEA е добиен од човечки носители поприсутен во преработките на храна, отколку од самата храна, но за другите токсини било утврдено дека имаат спротивна преваленца (Fueyo и сор., 2005).

#### **5.4.4 Споредбена анализа на резултатите за детекција на продукција на ентеротоксини**

Добиените резултати од анализите со VIDAS SET2 и со мултиплекс PCR методот беа анализирани така што во предвид беше земена детекцијата само на оние гени од мултиплекс PCR-от кои што беа и фенотипски детектирани со VIDAS SET2, тоа *sesea*, *seb*, *sec*, *sed* и *see*. Според податоците издвоени во табелата, можеше да се одредат следните 4 параметри за анализите на VIDAS SET2 тест стрипот: дијагностичката сензитивност е 87.4%, дијагностичката специфичност е 92.8%, позитивната предиктивна вредност изнесува 72.2% и негативната предиктивна вредност изнесува 97.2%.

Во студијата на Jørgensen и сор. (2005) утврдиле дека кај 6 изолати кои биле позитивни на продукција на SEA, не успеале да го утврдат присуството на генот *sea*, што го препишале на можноста за постоење на нова варијанта на *sea* која не е откриена или на крос-реакција на имунолошкиот тест. Забележана е блиска генетска асоцијација меѓу гените *sed*, *sej* и *ser* или меѓу гените *sed* and *sej*, според резултатите на Vimercati и сор. (2006) и Fournier и сор. (2008). Тие гени се лоцирани на плазмид pIB485 и се одвоени со интергенетски регион кој е помал од 1 Kb. Во нашето истражување карактеристично беше тоа што кај 12 изолати кои ни дадоа позитивен тест на VIDAS SET 2, детектиран бил генот *ser*, кој е на ист плазмид со *sed*, кој

молекуларно не бил детектиран, но спаѓа во групата на токсини кои би се утврдиле со помош на VIDAS SET2.

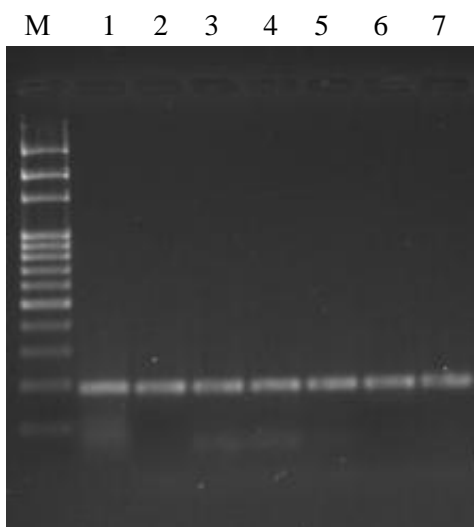
**Табела 15.** Одредување на *Sen*, *Sep*, PPV и NPV за Vidas SET2

Изолати	позитивни PCR	негативни PCR	Вкупно
Позитивни на Vidas SET2	52	20	72
Негативни на Vidas SET2	4	139	143
Вкупно	56	159	215

### 5.5 Молекуларна детекција на гени за продукција на биофилм со конвенционален PCR

Во однос на детекција на гените за продукција на биофилм, беше анализирано присуството на *ica* оперонот (*icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*) и генот *bar* за детекција на биофилм поврзаниот протеин (*bar*). Резултатите според видот на мострите ги изразивме во понатамошниот текст, единствено што е заедничко за сите мостри е дека беа детектирани изолати со *icaB*, *icaC* и *bar* гени.

Производството на биофилм се смета за еден од главните вирулентни фактори кој, покрај заштитата од одбранбените механизми на домаќинот, ги штити бактериите и од антимикуробните агенси (Flemming и сор., 2016). Перзистентноста на изолатите што произведуваат биофилм во амбиентот на млекарите ја подобрува дисперзијата на вирулентните фактори преку трансферот на генетскиот материјал на другите бактерии (Turchi и сор., 2020). Главните компоненти на биофилмот се матрицата на егзополисахариди, протеини и eDNA, заедно со бактериските клетки (Buttner и сор., 2015). Егзополисахаридот, полисахаридниот меѓуклеточен адхезин (PIA), е не-протеински адхезин кој помага во бактериска адхезија на различни површини, што го сочинува првиот критичен настан при воспоставување инфекција (Arciola и сор., 2015). Стафилококна PIA е кодирана со *ica* оперон (Otto, 2018), а протеинот поврзан со биофилм (*Bar*) е површински протеин поврзан со клеточниот сид кодиран со генот *bar*.



**Слика 20.** Визуелизација на PCR ампликони за детекција на гени за биофилм, М: 100-бр скала. Линија 1 до 7 го содржат *icaD* генот – 198 бр.

### 5.5.1 Молекуларна детекција на гени за продукција на биофилм кај изолатите од млеко

Кај изолатите на стафилококи добиени од млекото, кај 72 (58.5%) од вкупно 123 изолати бил утврден барем еден ген за продукција на биофилм. При тоа најзастапен ген бил *icaA* утврден кај 67 (93%) од позитивните изолати, потоа *icaD* утврден кај 49 (68%) изолати, додека како комбинација двата гени беа утврдени кај 44 (61.1%) од вкупно позитивните изолати. Кај вкупно 51 изолат (41.5%) беше утврдано присуство на ниту еден ген.

**Табела 16.** Детектирани гени за продукција на биофилм кај *Staphylococcus* spp. изолирани од млеко

Видови на соеви	Комбинација на гени за продукција на биофилм (%)			
	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>icaA+icaD</i>	Без гени
<i>S. aureus</i>	17	5	38	33
Други стафилококи	6	0	6	18
Токсогени соеви	21	5	36	21
Не-токсогени соеви	2	0	8	30
Вкупно:	<b>23 (18.6%)</b>	<b>5 (4%)</b>	<b>44 (35.7%)</b>	<b>51(41.5%)</b>
Позитивни 72 (58.5%)	<b>23+44=67 (93%)</b>	<b>5+44=49 (68%)</b>	<b>44 (61.1%)</b>	/



Bissong и Ateba (2020) анализирајќи изолати на *S. aureus* добиени од млеко, ги утврдиле сите 5 гени за продукција на биофилм, биле детектирани кај 58 (75.3%) од изолатите, меѓу кои *icaA* бил најзастапен (49,63.6%), по него следеле *icaB* (48, 62.3%), *icaD* (43, 55.8%) и *icaC* (30, 38.9%). *Var* генот бил утврден во најмалку соеви (12, 15.6%). Marques и сор. (2017) ги утврдиле гените *icaA* и *icaD* во 17 (85%) и 19 (95%) изолати, соодветно. 16 изолати биле позитивни на двата гени додека единствено 1 изолат(5%) бил позитивен на *var*. Ниската застапеност на *var* генот посочува дека веројатно *ica*-зависниот механизам, продуцентот на слуз-лига, може да биде примарно одговорен за адхезија и формирање на биофилм од страна на соевите, како што е утврдено и од страна на Vautour и сор. (2009). Кај анализата на Andrade и сор. (2021), од 44 анализирани изолати на *Staphylococcus*, 29 имале гени за продукција на биофилм (65.9%). *Var* генот бил застапен кај 8, *icaA* кај 7, *icaD* кај 19 изолати, заедно *icaA* со *icaD* кај 5 изолати. Изолатите кои формирале биофилм припаѓале на следниве видови: *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. auricularis*, *S. simulans* и *S. warneri*. Ниту еден од изолираните *S. aureus* не го носел генот *var*, додека 8 од 18 CoNSго носеле овој ген. При тоа *icaD* го утврдиле само кај *S. aureus*. Ниту еден од изолатите кои го носат генот *var* ги немал гените *ica*. Ниската преваленца на генот *var* кај *S. aureus* покажува дека *ica* механизмот, може да биде главниот одговорен за адхезија и формирање на биофилм кај овој вид. Откриле дека сите изолати од козјо млеко на *S. epidermidis* произведувале биофилм во оваа студија, во согласност со наодите на други автори кои пријавиле *S. epidermidis* како најчесто пронајден вид во човечки инфекции поврзани со биофилм (Park и сор., 2011).

Општо земено, *ica* локусот е поприсутен во изолатите на *S. aureus* од случаи на маститис во споредба со CoNS. Неодамнешните студии за маститис на говеда објавија 95-100% преваленца *ica* локусот кај изолатите на *S. aureus* (Prenafeta и сор., 2014, Felipe и сор., 2017), но помала преваленца кај CoNS (Piessens и сор, 2012, Martins и сор., 2017). Но има и такви студии каде 85% од 54 изолатите на CoNS биле класифицирани како производители на биофилм и сите биле изолирани од интрамамарни инфекции (Tremblay и сор., 2013). Ова може да сугерира дека стафилококите изолирани од инфекции навистина се подобри создавачи на биофилм и овој фенотип може да придонесе за хронична инфекција. Вреди да се забележи дека

изолатите користени во овие студии биле воглавно од кравјо млеко. Piessens и неговите колеги анализирале 40 изолатиза формирање на биофилм, со изолати од кравјо млеко и изолати од животната средина и само 22,5% се сметале за формирачи на биофилм (Piessens и сор., 2012).

*IcaA* и *icaD* се главните гени во формирањето на биофилм бидејќи придонесуваат за биосинтезата на егзополисахариди. Полисахаридниот слуз на биофилмовите, ја овозможува бактериската адхезија на биоматеријалите, која не се отстранува и покрај повторливите чистења и миења, поради тоа најчесто присуството на ваквите бактерии кај млекото се поврзува со биофилмовите на машините за молзење. Во биофилмот тие се заштитени од антибиотици, средства за дезинфекција, стресови од околината и фагоцитоза поради присуството на егзополисахаридниот матрикс, практично им претставува форма на преживување со која се спротиставува на стресовите од околината. Антибиотската резистеност се јавува заради намалената дифузија на лекот во биофилмот, а воедно и антибиотиците делуваат на активни метаболизирачки бактерии, додека тие во биофилмот се метаболички неактивни. Утврдено било дека *in vitro*, МИС-от и минималната бактерицидна концентрација може да се 100-1000 пати поголеми внатре во биофилмот отколку на планктонските делови (Hoiby и сор., 2010).

### **5.5.2 Молекуларна детекција на гени за продукција на биофилм кај изолатите од млечни производи**

Кај изолатите на стафилококи добиени од млечните производи, кај 51 (67.1%) од вкупно 76 изолати бил утврден барем еден ген за продукција на биофилм. Најзастапен ген бил *icaA* утврден кај 42 (82.4%) од позитивните изолати, потоа *icaD* утврден кај 32 (62.7%) изолати, додека како комбинација двата гени беа утврдени кај 23 (45%) од вкупно позитивните изолати. Изолатите кај кои нема утврдено присуство на ниту еден ген се 25 (32.9%).

**Табела 17.** Детектирани гени за продукција на биофилм кај *Staphylococcus* spp. изолирани од млечни производи

Видови на соеви	Комбинација на гени за продукција на биофилм (%)			
	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>icaA+icaD</i>	Без гени
<i>S. aureus</i>	15	8	18	8
Други стафилококи	4	1	5	17
Токсогени соеви	13	7	12	6
Не-токсогени соеви	6	2	11	19
Вкупно:	19	9	23	25 (32.9%)
51 (67.1%)	<b>19+23=42</b> <b>(82.4%)</b>	<b>9+23=32</b> <b>(62.7%)</b>	<b>23</b> <b>(45%)</b>	/

### 5.5.3 Молекуларна детекција на гени за продукција на биофилм кај изолатите од брисеви

Кај изолатите добиени од брисевите, кај 9 (56.3%) од вкупно 16 изолати бил утврден барем еден ген за продукција на биофилм. Генот *icaA* бил утврден кај сите позитивни изолати т.е. 9 (100%) изолати, *icaD* утврден само во комбинација со *icaA* кај 2 (22.2%) изолати. Изолатите кај кои нема утврдено присуство на ниту еден ген се 7 (43.7%).

**Табела 18.** Детектирани гени за продукција на биофилм кај *Staphylococcus* spp. изолирани од брисеви

Видови на соеви	Комбинација на гени за продукција на биофилм (%)		
	<i>icaA</i>	<i>icaA+icaD</i>	Без гени
<i>S. aureus</i>	1	1	1
Други стафилококи	6	1	6
Токсогени соеви	3	1	1
Не-токсогени соеви	4	1	6
Вкупно:	7	2	7 (43,7%)
9 (56.3%)	7+2= 9 (100%)	2 (22.2%)	/

## **5.6 Профил на фенотипска отпорност кон антибиотици на ентерогените соеви**

Ентеротоксогените соеви ги испитавме и за утврдување на антимикуробната отпорност, со помош на Vitek 2 AST-P580 картичките каде што се испитуваа на антибиотиците дадени во табелите со резултатите. При тоа изолатите отпорни на 3 и повеќе антимикуробни групи се сметаа за соеви мулти-резистентни на антибиотици (MDR) (Magiorakos и соp., 2012).

Во табела 19, прикажан е опсегот на MIC-овите на сите анализирани соеви на ентеротоксигени стафилококи, поделени на *S. aureus* и останати стафилококи, според добиените резултати за фенотипската анализа на антимикуробната отпорност согласно опсегот на концентрации на антимикуробните средства кои ги содржи картичката AST-P580.

**Табела 19.** Прегледот на опсегот на МИС на изолатите на стафилококи. Белите полиња во табелата го означуваат опсегот на концентрации и интервалот на МИС од картичката AST P-580.

Антибиотик	Група на соеви на стафилококи	Минимум инхибиторни концентрации (µg/mL)													
		0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Gentamicin	<i>S. aureus</i>				40			4	30	35		1			
	Други стафилококи				23			2	1	3					
Tobramycin	<i>S. aureus</i>					38		34	8	19	10	1			
	Други стафилококи					23		2		2		2			
Benzylpenicillin	<i>S. aureus</i>	≤ 42	5	5			58								
	Други стафилококи	≤ 21	1	1			6								
Oxacillin	<i>S. aureus</i>			90		10	5		2	3					
	Други стафилококи			23					6						
Levofloxacin	<i>S. aureus</i>		55		40	15									
	Други стафилококи		16		8	5									
Moxifloxacin	<i>S. aureus</i>			108	2										
	Други стафилококи			29											
Erythromycin	<i>S. aureus</i>			100	10										
	Други стафилококи			27							2				

Ентеротоксогени соеви на стафилококи во млечната индустрија во Р.С. Македонија

<b>Clindamycin</b>	<i>S. aureus</i>			106			2	2							
	Други стафилококи			26					2	1					
<b>Linezolid</b>	<i>S. aureus</i>				20	5	85								
	Други стафилококи				5		23	1							
<b>Teicoplanin</b>	<i>S. aureus</i>				105		5								
	Други стафилококи				27	1			1						
<b>Vancomycin</b>	<i>S. aureus</i>				75		20	15							
	Други стафилококи				17		5	7							
<b>Tetracycline</b>	<i>S. aureus</i>					100	4		2	4					
	Други стафилококи					28						1			
<b>Tigecycline</b>	<i>S. aureus</i>		90	20											
	Други стафилококи		19	10											
<b>Fosfomycin</b>	<i>S. aureus</i>								95		7	4	1	3	
	Други стафилококи								11		4		1		3
<b>Nitrofurantoin</b>	<i>S. aureus</i>										/	/	/	/	/
	Други стафилококи										/	/	/	/	/
<b>Fusidic Acid</b>	<i>S. aureus</i>				108				1	1					

	Други стафилококи				29										
<b>Mupirocin</b>	<i>S. aureus</i>						110								
	Други стафилококи						29								
<b>Rifampicin</b>	<i>S. aureus</i>				110										
	Други стафилококи				29										
<b>Trimethoprim/ Sulfamethoxazole</b>	<i>S. aureus</i>									(≤10) 110					
	Други стафилококи									(≤10) 29					

### 5.6.1 Фенотипска антимицробна отпорност на изолатите добиени од млеко

Анализирани беа вкупно 85 изолати, од кои 77 беа идентификувани како *S. aureus*, останатите 8 беа групирани како останати стафилококи, резултатите се запишани во Табела бр.20. Вредностите на оксацилин можат да бидат високи и во отсуство на ген носител на резистентноста, во тој случај тие изолати се нарекуваат BORSA (граничен отпорен на оксацилин *S. aureus*). EUCAST не препорачува систематски скрининг за BORSA.

Табела 20. Антимицробна отпорност на ентеротоксогените изолати на *Staphylococcus* spp. изолирани од млеко

Антимицробна супстанца	<i>S. aureus</i> (R%)77	Останати стафилококи (R%)8	Антимицробна супстанца	<i>S. aureus</i> (R%)77	Останати стафилококи (R%)
<b>Cefoxitin Screen</b>	Поз. 6.5% (5)	Her./100%	+Doripenem	7.8%(6)	25%(2)
<b>Benzyloxacillin</b>	54.5%(42)	25%(2)	+Ertapenem	7.8%(6)	25%(2)
+Amoxicillin	54.5%(42)	25%(2)	+Imipenem	7.8%(6)	25%(2)
+Ampicillin	54.5%(42)	25%(2)	+Meropenem	7.8%(6)	25%(2)
+Amoxicillin/Clavulanic Acid	7.8%(6)	25%(2)	+Amikacin	64.9%(50)	37.5%(3)
+Ampicillin/Sulbactam	7.8%(6)	25%(2)	<b>Gentamicin</b>	62.3%(48)	37.5%(3)
+Carbencillin	54.5%(42)	25%(2)	<b>Tobramycin</b>	64.9%(50)	37.5%(3)
+Ticarcillin	54.5%(42)	25%(2)	<b>Levofloxacin</b>	0%	0%
+Ticarcillin/Clavulanic Acid	7.8%(6)	25%(2)	<b>Moxifloxacin</b>	0%	0%
+Azlocillin	54.5%(42)	25%(2)	<b>Inducible Clindamycin Resistance</b>	Her. /100%	12.5%(1)
+Mezlocillin	54.5%(42)	25%(2)	+Azithromycin	0%	12.5%(1)
+Piperacillin	54.5%(42)	25%(2)	+Clarithromycin	0%	12.5%(1)
+Piperacillin/Tazobactam	7.8%(6)	25%(2)	+Dirithromycin	0%	12.5%(1)
+Cloxacillin	7.8%(6)	25%(2)	<b>Erythromycin</b>	0%	12.5%(1)
+Dicloxacillin	7.8%(6)	25%(2)	+Roxithromycine	0%	12.5%(1)
+Flucloxacillin	7.8%(6)	25%(2)	<b>Clindamycin</b>	5.2%(4)	12.5%(1)
+Methicillin	7.8%(6)	25%(2)	<b>Linezolid</b>	0%	0%
+OxacillinMIC	7.8%(6)	25%(2)	<b>Teicoplanin</b>	0%	0%
<b>Oxacillin</b>	7.8%(6)	25%(2)	<b>Vancomycin</b>	0%	0%
+Ceftaroline	/	/	+Doxycycline	0%	0%
+Cefaclor	7.8%(6)	25%(2)	+Minocycline	0%	0%
+Cefadroxil	7.8%(6)	25%(2)	<b>Tetracycline</b>	5.2%(4)	12.5%(1)
+Cefalexin	7.8%(6)	25%(2)	<b>Tigecycline</b>	0%	0%
+Cefazolin	7.8%(6)	25%(2)	<b>Fosfomicin</b>	3.9%(3)	12.5%(1)
+Cefuroxime	7.8%(6)	25%(2)	<b>Nitrofurantoin</b>	/	/



+Cefpodoxime	7.8%(6)	25%(2)	<b>Fusidic Acid</b>	2.6%(2)	0%
+Cefotaxime	7.8%(6)	25%(2)	<b>Mupirocin</b>	0%	0%
+Ceftriaxone	7.8%(6)	25%(2)	<b>Rifampicin</b>	0%	0%
+Cefepime	7.8%(6)	25%(2)	<b>Trimethoprim/ Sulfamethoxazole</b>	0%	0%

Беа добиени вкупно 5 *S. aureus* изолати позитивни на скринингот за цефокситин, што укажува дека тие се отпорни на сите пеницилини. Вкупно 8 изолати беа отпорни и на синергистичните комбинации на антибиотици со клавулонска киселина. Тие 8 изолати беа отпорни и на оксацилин и претставуваат можни носители на гени за отпорност кон метицилин. Шест изолати беа идентификувани како *S.aureus*, а 2 се од групата на останатите стафилококи (при тоа двата изолати поседуваат *nuc*-ген, едниот е идентификуван како *S.xylosus*, а другиот не беше идентификуван, тој е коагулаза позитивен стафилокок што не е *S.aureus*). Изолатот *S. xylosus* беше отпорен и на клиндамицин скрининг тестот. Најголема отпорност кај сите изолати од млеко беше утврдено дека има кон аминокликозидната група на антибиотици: гентамицин 62.3%, тобрамицин 64.9% и амикацин 64.9% кај *S. aureus*, и со по 37.5% на сите 3 антибиотици кај останатите стафилококи. Потоа втора по големина отпорност беше конбензилпеницилинот од  $\beta$ -лактамските антибиотици 54.5% кај *S. aureus* и 25% кај останатите стафилококи. Беа добиени вкупно 10 изолати (11.8%) кои се мулти-резистентни, што значи дека беа отпорни на 3 и повеќе групи на антибиотици, во овој случај се движеа до 5 групи. Сите беа *S. aureus*, освен еден изолат кој беше *S. xylosus*.

Во истражувањето на Andrade и сор. (2021), од 137 стафилококни изолати од млеко анализирани за антимикуробна чувствителност, 15 (10.9%) биле мулти-резистентни, 36 биле резистентни на две антимикуробни категории и 61 на една антимикуробна категорија, според класификацијата предложена од Magiorakos и сор. (2012). Стафилококните изолати главно биле отпорни на стрептомицин (50/137), пеницилин (38/137), ампицилин (34/137), линкомицин (33/137), оксацилин (22/137), флоксацилин (21/137), и тетрациклин (17/137), како што било објавено и во трудот на Queiroga и сор. (2018). Покрај тоа, повеќето CPS изолати биле отпорни на стрептомицин и линкомицин, додека CoNS изолатите главно биле отпорни на  $\beta$ -лактамите и тетрациклините. Сите *S. aureus* изолати биле осетливи на амоксицилин+

клавуланска киселина, истото го утврдиле и кај изолатите на CoNS. Изолатите отпорни на повеќе лекови (MDR) припаѓале на следните видови: *S. aureus* (8), *S. lentus* (3), *S. chromogenes* (2), *S. caprae* (1) и *S. warneri* (1). Сензитивност на сите групи антибиотици покажале 24 стафилококни изолати. И во други студии се опишувале стафилококите изолирани од млеко од мали преживари и нивната мултирезистентност (Franca и сop. 2012). Додека спротивно на тоа, Taponen и Pyorala (2009) објавиле дека мулти-резистентните соеви се почести кај CoNS отколку кај *S. aureus* изолиран кај говедски маститис.

Еден изолат на *S. aureus* и еден CPS *Staphylococcus* spp. биле отпорни на оксацилин, додека CoNS оксацилин отпорните изолати биле следните: *S. chromogenes* (5), *S. caprae*(4), *S. lentus* (3), *S. simulans* (3), *S. epidermidis* (2), *S. auricularis* (1), *S. hominis* (1) и *S. warneri* (1). Други автори исто така пријавиле присуство на отпорни на метицилин коагулаза-негативни стафилококи (MR-CNS) (Barbier и сop., 2010, Yamada и сop., 2017).

Tibeви сop (2021), во изолати од млеко, брисеви од виме и раце на молзачи, утврдиле отпорност на пеницилин 94%, ампицилин 92%, тетрациклин 74%, на цефокситин 4% кои би биле можни MRSA изолати. Мулти-резистентноста била утврдена кај 10.4% од изолатите.

*S. aureus* кој отпорен на антибиотици во млечните производи може да биде добиен од два извора; или од маститична крава или од човечки носител вклучен во производство, транспортот или преработката на млечната храна. *S. aureus* е еден од најчестите предизвикувачки агенси на клинички и субклинички маститис, а со тоа и на продолжена или несоодветна употреба од антибиотиците за третман на маститис, што доведува до развој на отпорност на повеќе лекови. Тоа е главен проблем во развојот на отпорни соеви на дадена географска локација, каде не функционираат практично регулативите и има многу практики на злоупотреба на антибиотици. Тука спаѓа употребата на антибиотици добиени без рецепт и администрација на погрешна доза во несоодветен број денови од страна на неовластен персонал. Воедно и достапноста на нелегални ветеринарни лекови на отворениот пазар ги охрабрува фармерите сами да ги лекуваат своите болни животни. Сите овие главни практики на злоупотреба го зголемуваат преовладувачкиот проблем со отпорност на антибиотици

во ветерината. Секако, треба да се спомене и употребата на антибиотици како промотор на растот која е исто така една од причините за развој на отпорност кај соевитена глобално ниво, но ова има помала широка примена во пракса.

### **5.6.2 Фенотипска антимикробна отпорност на изолатите добиени од млечни производи**

Испитани беа вкупно 38 изолати, од кои 30 беа идентификувани како *S. aureus*, останатите 8 спаѓаа во групата останати стафилококи, добиените резултати се внесени во Табела 21.

Беа добиени 5 *S. aureus* изолати позитивни на скринингот за цефокситин, што укажува дека тие се отпорни на сите пеницилини, исто така тие беа отпорни и на синергистичните комбинации на антибиотици со клавулонска киселина. Тие 5 изолати беа отпорни и на оксацилин и претставуваат можни носители на гени за отпорност кон метицилин. Добиени беа и 5 изолати кои беа отпорни на метицилин, 3 од нив беа идентификувани како *S. aureus*, а двата останати изолати поседуваат *nuc*-ген, едниот е идентификуван како *S.warner/conhii*, за другиот не беше идентификуван, тој е коагулаза позитивен стафилокок што не е *S.aureus*. Беше утврдено присуство на еден изолат резистентен на теикопланин, со оглед на тоа што таквите соеви се многу ретки според EUCAST истиот би требало да се пријави во референтна лабораторија за дополнителни испитувања. Најголема отпорност кај сите изолатите од сирење беа утврдени исто како и кај млекото дека имаат кон аминогликозидната група на антибиотици: гентамицин и тобрамицин со 70% и амикацин 66.7% кај *S. aureus*, и гентамицин и тобрамицин со 12.5% и амикацин 25% кај останатите стафилококи. Потоа втора по големина отпорност покажале кон бензилпеницилинот од  $\beta$ -лактамските антибиотици 46.7% кај *S. aureus* и 50% кај останатите стафилококи. Беадобиени вкупно 5 изолати (13.2%) кои се мулти-резистентни, што значи дека беа отпорни на 3 и повеќе антибиотици. Од нив 2 не се *S. aureus*, еден со *nuc*-ген, идентификуван како *S.warner/conhii*, другиот беше идентификуван, тој е CoNS.

**Табела 21.** Антимикробна отпорност на ентеротоксогените изолати на *Staphylococcus* spp. изолирани од млечни производи

Антимикробна супстанца	<i>S. aureus</i> (R%) 30	Останати стафилококи (R%) <sup>8</sup>	Антимикробна супстанца	<i>S. aureus</i> (R%)	Останати стафилококи (R%)
<b>CefoxitinScreen</b>	Поз. 10%(3)	Поз. 25%(2)	+Doripenem	10%(3)	25%(2)
<b>Benzylopenicillin</b>	46.7%(14)	50%(4)	+Ertapenem	10%(3)	25%(2)
+Amoxicillin	46.7%(14)	50%(4)	+Imipenem	10%(3)	25%(2)
+Ampicillin	46.7%(14)	50%(4)	+Meropenem	10%(3)	25%(2)
+Amoxicillin/Clavulanic Acid	10%(3)	25%(2)	+Amikacin	66.7%(20)	25%(2)
+Ampicillin/Sulbactam	10%(3)	25%(2)	<b>Gentamicin</b>	70%(21)	12.5%(1)
+Carbencillin	46.7%(14)	50%(4)	<b>Tobramycin</b>	70%(21)	12.5%(1)
+Ticarcillin	46.7%(14)	50%(4)	<b>Levofloxacin</b>	0%	0%
+Ticarcillin/Clavulanic Acid	10%(3)	25%(2)	<b>Moxifloxacin</b>	0%	0%
+Azlocillin	46.7%(14)	50%(4)	<b>InducibleClindamycinResistance</b>	Her. /100%	Her. /100%
+Mezlocillin	46.7%(14)	50%(4)	+Azithromycin	0%	12.5%(1)
+Piperacillin	46.7%(14)	50%(4)	+Clarithromycin	0%	12.5%(1)
+Piperacillin/Tazobactam	10%(3)	25%(2)	+Dirithromycin	0%	12.5%(1)
+Cloxacillin	10%(3)	25%(2)	<b>Erythromycin</b>	0%	12.5%(1)
+Dicloxacillin	10%(3)	25%(2)	+Roxithromycine	0%	12.5%(1)
+Flucloxacillin	10%(3)	25%(2)	<b>Clindamycin</b>	0%	25%(2)
+Methicillin	10%(3)	25%(2)	<b>Linezolid</b>	0%	0%
+OxacillinMIC	10%(3)	25%(2)	<b>Teicoplanin</b>	0%	12.5%(1)
<b>Oxacillin</b>	10%(3)	25%(2)	<b>Vancomycin</b>	0%	0%
+Ceftaroline	/	/	+Doxycycline	0%	0%
+Cefaclor	10%(3)	25%(2)	+Minocycline	0%	0%
+Cefadroxil	10%(3)	25%(2)	<b>Tetracycline</b>	6.7%(2)	0%
+Cefalexin	10%(3)	25%(2)	<b>Tigecycline</b>	0%	0%
+Cefazolin	10%(3)	25%(2)	<b>Fosfomycin</b>	0%	12.5%(1)
+Cefuroxime	10%(3)	25%(2)	<b>Nitrofurantoin</b>	/	/
+Cefpodoxime	10%(3)	25%(2)	<b>FusidicAcid</b>	0%	0%
+Cefotaxime	10%(3)	25%(2)	<b>Mupirocin</b>	0%	0%
+Ceftriaxone	10%(3)	25%(2)	<b>Rifampicin</b>	0%	0%
+Cefepime	10%(3)	25%(2)	<b>Trimethoprim/Sulfamethoxazole</b>	0%	0%

### 5.6.3 Фенотипска антимикуробна отпорност на изолатите добиени од брисеви

Од брисевите беа анализирани сите 16 изолати, добиените резултати сеприкажани во Табела 22.

Табела 22. Антимикуробна отпорност на изолатите на *Staphylococcus* spp. изолирани од брисеви

Антимикуробна супстанца	<i>S. aureus</i> (R%) <sup>3</sup>	Останати стафилококи (R%) <sup>13</sup>	Антимикуробна супстанца	<i>S. aureus</i> (R%)	Останати стафилококи (R%)
<b>CefoxitinScreen</b>	Поз. 0%	Поз. 15.4%(2)	+Doripenem	0%	15.4%(2)
<b>Benzylopenicillin</b>	66.7%(2)	15.4%(2)	+Ertapenem	0%	15.4%(2)
+Amoxicillin	66.7%(2)	15.4%(2)	+Imipenem	0%	15.4%(2)
+Ampicillin	66.7%(2)	15.4%(2)	+Meropenem	0%	15.4%(2)
+Amoxicillin/Clavulanic Acid	0%	15.4%(2)	+Amikacin	33.3%(1)	15.4%(2)
+Ampicillin/Sulbactam	0%	15.4%(2)	<b>Gentamicin</b>	33.3%(1)	15.4%(2)
+Carbenicillin	66.7%(2)	15.4%(2)	<b>Tobramycin</b>	33.3%(1)	15.4%(2)
+Ticarcillin	66.7%(2)	15.4%(2)	<b>Levofloxacin</b>	0%	0%
+Ticarcillin/Clavulanic Acid	0%	15.4%(2)	<b>Moxifloxacin</b>	0%	0%
+Azlocillin	66.7%(2)	15.4%(2)	<b>Inducible Clindamycin Resistance</b>	Her. /100%	Her. /100%
+Mezlocillin	66.7%(2)	15.4%(2)	+Azithromycin	0%	0%
+Piperacillin	66.7%(2)	15.4%(2)	+Clarithromycin	0%	0%
+Piperacillin/Tazobactam	0%	15.4%(2)	+Dirithromycin	0%	0%
+Cloxacillin	0%	15.4%(2)	<b>Erythromycin</b>	0%	0%
+Dicloxacillin	0%	15.4%(2)	+Roxithromycine	0%	0%
+Flucloxacillin	0%	15.4%(2)	<b>Clindamycin</b>	0%	0%
+Methicillin	0%	15.4%(2)	<b>Linezolid</b>	0%	0%
+Oxacillin MIC	0%	15.4%(2)	<b>Teicoplanin</b>	0%	0%
<b>Oxacillin</b>	0%	15.4%(2)	<b>Vancomycin</b>	0%	0%
+Ceftaroline	0%	15.4%(2)	+Doxycycline	0%	0%
+Cefaclor	0%	15.4%(2)	+Minocycline	0%	0%
+Cefadroxil	0%	15.4%(2)	<b>Tetracycline</b>	0%	0%
+Cefalexin	0%	15.4%(2)	<b>Tigecycline</b>	0%	0%
+Cefazolin	0%	15.4%(2)	<b>Fosfomycin</b>	33.3%(1)	15.4%(2)
+Cefuroxime	0%	15.4%(2)	<b>Nitrofurantoin</b>	/	/
+Cefpodoxime	0%	15.4%(2)	<b>Fusidic Acid</b>	0%	0%
+Cefotaxime	0%	15.4%(2)	<b>Mupirocin</b>	0%	0%
+Ceftriaxone	0%	15.4%(2)	<b>Rifampicin</b>	0%	0%
+Cefepime	0%	15.4%(2)	<b>Trimethoprim/Sulfamethoxazole</b>	0%	0%

Беа добиени 2 изолати позитивни на скринингот за цефокситин кои што не се *S. aureus*, што укажува дека тие се отпорни на сите пеницилини, исто така тие беа отпорни и на синергистичните комбинации на антибиотици со клавулонска киселина, додека останатите изолати отпорни на пеницилините беа осетливи на синергизмот со клавулонската киселина. Тие 2 изолати ни дадоа и отпорност на оксацилин и отпорност на метицилин, едниот поседуваше *nuc*-ген, идентификуван како *S. epidermidis* изолиран од рафт за кашкавал, другиот беше идентификуван како *S. hominis*, изолиран од работна површина.

Најголема отпорност изолатите од брисевите покажаа кон  $\beta$ -лактамските антибиотици 66.7% кај *S. aureus* и 15.4% кај останатите стафилококи. Потоа втора по големина отпорност утврдивме дека имаат кон аминокликозидната група на антибиотици: гентамицин, тобрамицин и амикацин со 33.3% кај *S. aureus*, и 15.4% кај останатите стафилококи. Истите проценти на отпорност изолатите ги имаа и кон фосфомицинот. Кај брисевите не беа добиени изолати кои се мулти-резистентни, т.е. немаше отпорност на 3 и повеќе антибиотски категории, беа добиени само 6 соеви отпорни на 2 антибиотски групи.

Во истражувањето на Rola и сор. (2016), испитувале со метод на микродилуција на комерцијални панели DKVP microplates (Trek Diagnostic Systems, Thermo Fisher Scientific, East Grinstead, UK), што е истиот метод само во оваа студија се работеше за микродилуција на картички, резистентноста кон пеницилин била утврдена кај 62 од 122 изолати (50.8%) што било и најчесто меѓу испитуваните *S. aureus*, потоа резистеност на хлорамфеникол (7; 5.7%), тетрациклин (5; 4.1%), сулфаметоксазол (1; 0.8%) еритромицин (1; 0.8%) и стрептомицин (1; 0.8%). Од 62-та изолати отпорни на пеницилин, 9 биле исто така отпорни и на други антимикуробни супстанции: 4 на хлорамфеникол, 3 на тетрациклин, 1 на сулфаметоксазол и 1 на хлорамфеникол заедно со стрептомицин.

Повеќето од CPS (47,5%) биле отпорни на еден антимикуробен лек кој е типичен за соеви од ветеринарно потекло, додека кај човечки изолати преовладуваат прилично мулти-резистентни соеви (Werckenthin и сор., 2001). Според извештајот на европските лекови Агенцијата, во Полска во 2012 година пеницилините, тетрациклините и сулфонамидите сочинуваат над 75% од вкупно продадени

ветеринарни антимикуробни агенци. Добиените резултати покажаа и отпорност на хлорамфеникол во 5,7% од изолатите тестиран, иако овој антибиотик е забранет во Европската унија за животни одгледани за човечка потрошувачка.

### 5.7 Молекуларна детекција на генот за резистентност кон метицилин

Сите изолати кои беа фенотипски анализирани за антимикуробна отпорност беа повторно анализирани со молекуларна детекција за потврдување на генот за резистентност кон метицилин и евентуалното присуство на MRSA во изолати од млечната индустрија. Конфирмација на генот беше направена со конвенционална PCR метода работена во триплекс, со испитување на следните гени: *23s*, *nuc* и *mecA*. Резултатите за *mecA* -генот и мострите од кои се добиени позитивните соеви се прикажани подолу во Табела бр.23.

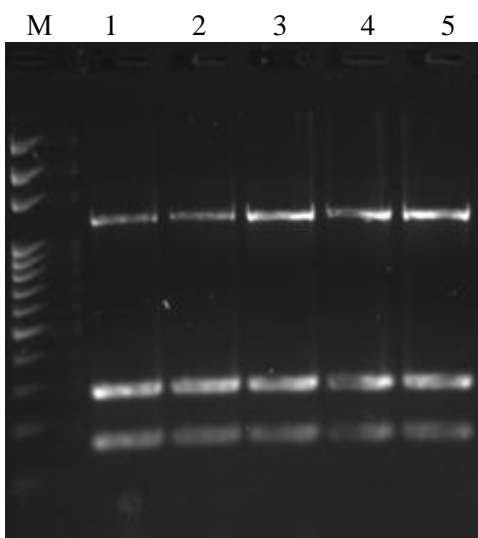
Табела 23. Мостри од кои се изолирани стафилококи носители на генот- *mecA*

Бр.	Мостра	Број (%) на изолати	Комбинација на гени детектирани со PCR				Идентификација
			<i>23s, nuc, mecA</i>	<i>sea, seb, sec, sed, see, ser</i>	<i>sej, seg, sei, seh, sep</i>	<i>icaA, icaB, icas, icaD, vap</i>	
1.	Сурово млеко (A8)	1	<i>23s, nuc, mecA</i>	/	<i>seg, sei</i>	<i>icaA, icaD</i>	<i>S. aureus</i>
2.	Сурово млеко (F6)	1	<i>23s, nuc, mecA</i>	Vidas +	/	<i>icaA, icaD</i>	<i>S. aureus</i>
3.	Сурово млеко (C7)	1	<i>nuc, mecA</i>	/	<i>seg, sei</i>	<i>icaA</i>	<i>S. xylosus</i>
4.	Биено сирење (I2,I3,I4)	3	<i>23s, nuc, mecA</i>	/	<i>sep</i>	<i>2-icaA, icaD, 1-icaA</i>	<i>S. aureus</i>
5.	Сирење (A3)	1	<i>nuc, mecA</i>	/	<i>sei</i>	<i>icaA</i>	<i>S. warneri/conhii</i>
6.	Сирење со пиперка(E2)	1	<i>nuc, mecA</i>	<i>sec</i>	<i>seg, sei</i>	<i>icaA, icaD</i>	CPS што не е <i>S. aureus</i>
7.	Брис од рафт за кашкавал(D8)	1	<i>nuc, mecA</i>	/	/	<i>icaA</i>	<i>S. epidermidis</i>
	Вкупно позитивни:	9(2.4%)	n=5 ( <i>23s, nuc</i> ), n=4 ( <i>nuc</i> )	1	5	9	n=5 ( <i>S. aureus</i> ) n=1 (останати стафилококи), n=3 CoNS

За соевите, беше утврдено дека секој од нив содржеше еден или два гени за продукција на биофилм, и исто така сите го содржеа генот *nuc*. Пет од изолатите беа *S. aureus*, останатите беа *S. xylosus*, *S. warneri/conhii*, *S. epidermidis* и CPS што не е *S. aureus*.

Normanno и сор. (2007) проучиле 160 соеви на *S. aureus* добиени од храна од животинско потекло од производи од Италија и во 6 (3.75%) од нив бил присутен генот *mecA*. При тоа секој од тие соеви синтетизирале и ентеротоксини, поточно 2 соеви синтетизирале SEA и SED (33.3%), еден сој SEC и SED (16.6%), 2 соја SED (33.3%) и еден сој SEC (16.6%). Во истражувањето на Andrade и сор. (2021), не биле откриени стафилококни изолати кои го содржат генот *mecA*, иако фенотипски било откриено дека два изолати биле отпорни на оксацилин и клоксацилин истовремено, еден само за оксацилин и седум само за клоксацилин. Сепак, Barrero-Domínguez и сор. (2019) исто така не го откриле *mecA* ген во сој MRSA отпорен на цефокситин. Во тие случаи, постојат веројатно други механизми за отпор кои ја даваат фенотипската резистентност, постои хиперпродукција на  $\beta$ -лактамаза, модифицирани протеини кои врзуваат пеницилин, различни SCC<sub>mec</sub> елементи, како и наводни *mecA* мутации (Xu и сор., 2008, Paterson и сор. 2014). Tarekgne (2016) за својот докторски труд, испитувала присуство на MRSA, кај 32 соеви на фенотипски средно/целосно оксацилин отпорни на *S. aureus* добиени од млеко и млечни производи. Ниту еден од соевите не бил позитивен за овие гени. Сепак, анализата на фенотипските резултати на секој изолат на секој антибиотик откриле дека од тие 32 соеви, 28 (87%) биле целосно сензитивни на амоксицилин/клавуланска киселина. Таквите соеви на *S. aureus* се именувани како граничен оксацилин резистентен *S. aureus* (BORSA). BORSA покажува отпорност на антибиотици од групата лактам, како што се оксацилин и метицилин, преку надворешен механизам не-посредуван од *mecA*. BORSA развива средна или целосна отпорност на оксацилин поради главно високото производство на  $\beta$ -лактамаза што може делумно да ја хидролизиралактамската група. Понатаму, Becker и сор. (2018) неодамна објавија присуство на *mecB* ген во изолат на MRSA, кој бил негативен за гените *mecA* и *mecC*.





**Слика 20.** Визуелизација на PCR ампликони на 23s, *nuc* и *mecA* гените М: 100-бр скала Ланија 1: референтен сој 14.2 MRSA ги содржи *mecA* – 162 бр, *nuc* – 279 бр и 23s = 1250бр гените, Ланија 2 до 5 ги содржи *mecA* – 162 бр, *nuc* – 279 бр и 23s = 1250бр гените

### 5.7.1 Споредбена анализа на резултатите добиени за одредување на отпорност кон метицилин

Добиените резултати за присуството на отпорност кон метицилин од фенотипската анализа со Vitek 2 AST-P580 и со молекуларниот триплекс PCR метод се дадени во табела бр. 24. Според нив може да се одредат следните 4 параметри за перформансите на Vitek 2 AST-P580: дијагностичката сензитивност е 92.5%, дијагностичката специфичност е 92.4%, позитивната предиктивна вредност изнесува 53.3% и негативната предиктивна вредност изнесува 99.5%.

**Табела 24.** Одредување на Sen, Sep, PPV и NPV за Vitek 2 AST-P580

Изолати	<i>mecA</i> позитивни PCR	<i>mecA</i> негативни PCR	Вкупно
Позитивни на Vitek 2 AST-P580	8	7	15
Негативни на Vitek 2 AST-P580	1	199	200
Вкупно	9	206	215

Во анализите на Horstkotte и сор. (2002), со нововклучениот тест за отпорност на оксацилин во Vitek 2 системот при анализа на CoNS, утврдиле висока сензитивност и специфичност 97.5 и 98.7%, соодветно. Пробале и со алтернативни вредности за лимитот на MIC-от од 1, 2, или 4 µg/ml што резултирало со измена во специфичност од 84%, 90.7%, и 97.3%, соодветно. Во однос на сензитивноста се појавиле помали измени 98.4%, 97.5%, and 97.5%, соодветно.

Потврдата за присуството на генот *mecA*, до неодамна беше „златен стандард“ за откривање на *S. aureus* (MRSA) отпорен на метицилин ширум светот. Меѓутоа, наодите на истражувачка група на Универзитетот во Кембриџ предводена од проф. Марк Холмс, установила присуство на нов хомологен ген на *mecA* (*mecC*, порано наречен *mecALGA251*) во *S. aureus* добиен од луѓе и говеда. Овие наоди предизвикуваат сериозна загриженост во врска со можното животинско потекло на изолатите што го содржат овој ген, како и во врска со потребата да се ажурираат методите за откривање на отпорност кон метицилин, што ќе треба да се надополни со понатамошно тестирање за идентификација на *mecC* генот (Nara и сор., 2021). Истражувањата од нашата студија за присуство на ген за отпорност кон метицилин, покажаа големи разлики при споредбата на резултатите од фенотипските и молекуларните анализи. Соевите кај кои фенотипски беше утврдена отпорност кон метицилин, а кај кои со PCR не го детектиравме присуството на генот *mecA*, не беа дополнително анализирани за присуство на новооткриените гени *mecB* и *mecC*.

## 6. ЗАКЛУЧОЦИ

Врз основа на добиените резултати од нашето истражување произлегуваат следниве заклучоци :

1. Од вкупно 1662 мостри на млеко, млечни производи и брисеви од млечната индустрија, изолиравме вкупно 215 (12.9%) соеви на стафилококи, со преваленца на коагулаза позитивни  $n=159$  (9.6%) и коагулаза негативни стафилококи  $n=56$  (3.4%). Најголем дел од коагулаза позитивните стафилококи беа изолирани од мострите сурово млеко 63.5%, потоа од мострите на различни видови на сирења 29.6%, мострите урда 3.1% и мострите на кашкавал и брисеви идентично со 1.9%. Преваленца на изолатите во однос на матрицата на мострите беше следната: свежо млеко 30.3%, млечни преработки 4.7% и брисевите со 1.8%.
2. Според енумерацијата на CPS, 4.8% од мостритесурово млеко беа незадоволителни според Правилникот за посебни барања за безбедноста и хигиената при изведувањето на официјалните контроли на млекото и млечните производи. Кај млечните производи само 0.7% беа незадоволителни според Правилникот за посебни барања кои се однесуваат на микробиолошките критериуми за храната.
3. Со фенотипска идентификација со Vitek 2, од изолатите од млеко ( $n=123$ ) беа утврдени *S. aureus* 73.2%, *S. epidermidis* 16.3%, *S. haemolyticus* 3.3%, *S. xyloso* 2.4%, *S. warneri* и *S. sciurico* по 1.6 %, *S. chromogenes* и *S. simulans* со по 0.8%. Од млечните производи од 76 изолати беа идентификувани: *S. aureus* 68.4%, *S. epidermidis* 15.9%, *S. warneri/conhii* 10.5%, *S. haemolyticus* и *S. shleiferi* со по 2.6%. Кај брисевите, 16 соеви беа идентификувани како: *S. epidermidis* 37.5 %,

*S. aureus* и *S. warneri* со по 25% и *S. hominis* 12,5%.

4. Со молекуларна идентификација 23s генот карактеристичен за *S. aureus* беше утврден кај 93 изолати (75.6%) од млеко, 49 изолати (64.5%) од млечни преработки и кај брисевите во 3 изолати (18.7%).
5. Со молекуларна детекција на *nuc*-генот, кој треба да го содржат коагулаза позитивните соеви, беше утврдено дека соевите на *S. aureus* го поседуваа овој ген во следните проценти 98.9%/97.9%/66.7% за изолатите од млеко/млечните производи/брисевите, соодветно. Кај останатите стафилококи кои не се *S. aureus*, изолирани од млеко, млечни производи и брисеви, генот *nuc* беше застапен со 26.7%, 14.8% и 92.3% соодветно.
6. Споредбената анализа на двата методи за идентификација, покажа дека дијагностичката сензитивност на Vitek 2 за идентификација на *S. aureus* во однос на PCR детекцијата е 94%, дијагностичката специфичност е 95.9%, позитивната предиктивна вредност изнесува 97.2% и негативната предиктивна вредност изнесува 91.3%.
7. Со фенотипскиот метод за докажување на продукција на ентеротоксини mini Vidas SET 2, беа утврдени вкупно 41 позитивен изолат (33.3%) од изолатите од млекото, 29 позитивни изолати (38.2%) од млечните производи и 2 изолати (12.5%) од брисевите.
8. Со молекуларниот метод со конвенционален мултиплекс PCR, беше утврдена застапеност на ентеротоксогени соеви кај 85 (69.1%) соеви кај млекото, 38 (50%) кај млечните преработки и 5 (31.6%) кај брисевите. Вкупно 18 ентеротоксогени изолати од сите мостри не беа *S. aureus*.
9. Со молекуларниот метод утврдени беа 10 од испитаните 11 гени и тоа: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *ser*, *sej* и *sep*, не беше детектиран ниту еден изолат со *seeg* ген. Најзастапени кај изолатите млекото и млечните преработки беа *seg* и *sei*, кај изолатите од брисевите *sei*. При тоа кај изолатите беше детектирана

застапност од 1 до 5 гени, тие со 2 гени беа најзастапени кај млекото, а со еден ген кај млечните производи и брисевите.

10. Споредбената анализа за детекцијата на ентеротоксогените изолати со двата методи, покажа дека фенотипскиот метод VIDAS SET2 во споредба со молекуларниот има помала дијагностичката сензитивност и истата изнесуваше 87.4%, дијагностичката специфичност беше 92.8%, позитивната предиктивна вредност изнесуваше 72.2% и негативната предиктивна вредност изнесуваше 97.2%.
11. Гените за продукција на биофилм, беа детектирани кај 72 изолати (58.5%) од млеко, кај 51 изолат (67.1%) од млечните производи и 9 изолати (56.3%) кај брисевите. Утврдени беа *icaA*, *icaD* и нивна комбинација, а ниту еден изолат не ги содржеше *bar*, *icaB* и *icaC*. Вкупно 16 изолати кои не се *S. aureus* имаа присуство на еден од гените.
12. Фенотипски беше утврдено дека најголема отпорност на соевите од млекото и млечните производи беше утврдена кон аминогликозидната група на антибиотици, потоа кон  $\beta$ -лактамските. Кај изолатите од брисевите беше обратно. Беа изолирани 12 соеви отпорни на сите пеницилини, од кои 4 не беа *S. aureus*. Вкупно 15 соеви беа отпорни на метицилин, од кои 6 беа стафилококи кои не се *S. aureus*.
13. Генот за отпорност кон метицилин *mecA*, беше утврден кај 9 изолати, од кои 4 не беа *S. aureus*.
14. Споредбената анализа за резистеноста кон метицилин на Vitek 2 AST-P580 методот во однос на молекуларната детекција, покажа дијагностичката сензитивност од 92.5%, дијагностичката специфичност од 92.4%, позитивната предиктивна вредност 53.3% и негативната предиктивна вредност 99.5%.

## 7. ПРЕПОРАКИ

Препораките кои произлегоа од добиените резултати и стекнати искуства во текот на изработката на овој труд, може да се поделат на препораки што се однесуваат на млеко-производителите и млечната индустрија, како и препораки во однос на анализите и легислативата поврзана со нив.

Превентивата на стафилококната контаминација на млечните производи, треба да започне и да се спроведе преку реално следење и спроведување на хигиенските практики. За таа цел неопходна е практична едукација особено на операторите кои ракуваат со сурово млеко и молзењето на млечните грла, што се отсликува преку правилна дезинфекција на вимето, правилно молзење како и пријавување на било какви симптоми или промени кај молзните грла кои би укажувале на појава на маститис, со цел рано откривање на инфекциите и нивно правилно лекување. Хигиенските стратегии во млечната индустрија, мора да бидат така дизајнирани што ќе придонесат за контролирањето на широко распространетата стафилококна заедница, спречување на контаминацијата на млекото и млечните производи, а со тоа намалување и на придружните економски загуби и можните ефекти врз јавното здравје. Потребно е правилно спроведување на технологиите на производство, како и обучување на персоналот кој манипулира со готовите производи со цел да се спречат дополнителни стафилококни контаминации на финалните производи, а преку тоа и можните интоксикации.

Брзото и ефикасно откривање на ентеротоксогените изолати во храната е од суштинско значење за безбедноста на потрошувачите. Прво, покрај пропишаните норми во легислативата, во мострите може да нема количина на CPS поголема од  $10^5$  cfu/g, но тие да бидат присутни во мострата и да бидат ентеротоксогени, при поволни услови можно е да продуцираат ентеротоксини кои доколку се конзумираат може да доведат до интоксикации. Од таа причина нужно е да се алармира за потребата за

спроведување на Мониторинг план за следење и утвдување на ентеротоксини во храната, согласно Европскиот мониторинг план и во нашата држава. Особено во прилог на тоа оди и податокот дека интоксикациите се со самолимитирачки тек, и најчесто се непријавени или нецелосно потврдени во анализите на јавното здравје, каде точниот причинител како токсин никогаш не е потврден.

Во однос на лабораториските анализи, дополнително треба да се внимава на изведувањето на коагулаза тестот или да се спроведува дополнителна конфирмација, со оглед на тоа што може да се случи да се утврди постоење и на коагулаза негативни *S. aureus*, како што постојат и CoNS кои можат да ни дадат позитивен коагулаза тест. Се посочува и потребата од воведување на молекуларните процедури опишани во оваа студија, за да се подобри сензитивноста и специфичноста на веќе постоечките ELFA анализи. Особено е важно да не се пропушти откривањето на присуството на новоопишаните гени на стафилококните ентеротоксини, бидејќи не постои достапна имуноанализа за нивно откривање, а сепак постојат во мострите во доволен број.

Резултатите посочија дека воедно треба да се обрати внимание и на коагулаза негативните стафилококи, чие што присуство не се опфаќа и не се бара со ниту една регулатива за безбедност на храната, сепак во нашето истражување беше утврдено дека се присутни во испитаните мостри и можат да бидат ентеротоксогени, а при тоа да останат недетектирани. Потребни се исто така дополнителни студии за карактеризација на ентеротоксигенскиот потенцијал на CoNS во храната.

Загрижувачко е и присуството на стафилококи отпорни на метицилин и мулти-резистентните соеви, како меѓу CPS и така и кај CoNS изолатите од примероците од млеко и сирење, со што се потврдува потребата за строги контроли во однос на употребата на антибиотиците, како и строги контроли на храната, со цел да ја спречиме дисеминацијата на резистентни соеви во циклусот на храната од фарма до вилушка.

## 8. ЛИТЕРАТУРА

1. Aarestrup, F. M., Larsen, H. D., Eriksen, N. H., Elsberg, C. S., and Jensen, N. E. 1999. Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *APMIS* 107: 425–430;
2. Aarestrup, F. M. & Schwarz, S. 2006. Antimicrobial resistance in *staphylococci* and *streptococci* of animal origin. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press, Washington, DC: 187-212;
3. Acosta, A. C.; Santos, S.J. S.; Albuquerque, L.; Soares, K.D. A.; Mota, R.A.; Medeiros, E.S. 2017. Frequência de genes codificadores de toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite de tanques expansões comunitários. *Pesq. Vet. Bras.* v.37. n.7, 691-696;
4. Adhikari RP, Haudenschield C, Sterba PM, Sahandi S, Enterlein S, Holtsberg FW, Aman MJ. 2016. Development of a novel multiplex electrochemiluminescent-based immunoassay for quantification of human serum IgG against 10 *Staphylococcus aureus* toxins. *J Immunol Methods.* 430: 33–42;
5. Aitichou, M., Henkens R., Sultana A.M., Ulrich R.G., Ibrachim M.S., 2004. Detection the *Staphylococcus aureus* enterotoxin A and B genes with PCR-EIA and a hand-held electrochemical sensor. *Molecular and Cellular Probes*, v. 18, (373-377);
6. Akineden O., Annemuller C., Hassan A.A., Lammler C., Wolter W., and Zschock M., 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol 8: 959–964
7. Akineden Ö, Hassan AA, Scheider E, Usleber E. 2008. Enterotoxinogenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. *International Journal of Food Microbiology.* 124:211–216;
8. Algammal AM, Enany ME, El-Tarabili RM, Ghobashy MOI, Helmy YA. 2020. Prevalence, antimicrobial resistance profiles, virulence and enterotoxins-determinant genes of MRSA isolated from subclinical bovine mastitis in Egypt. *Pathogens.* 9(5):362;
9. Alvan, G., Edlund, C., Heddini, A., 2011. The global need for effective antibiotics-A summary of plenary presentations. *Drug Resistance Updates*, 14, 70-76;



10. Andrade Nara C., Laranjo M., Matiuzzi Costa M. and Cristina Queiroga M., 2021: Virulence Factors in *Staphylococcus* Associated with Small Ruminant Mastitis: Biofilm Production and Antimicrobial Resistance Genes, *Antibiotics* 2021, 10, 633;
11. André, M.C.D.P.B.; Campos, M.R.H.; Borges, L.J.; Kipnis, A.; Pimenta, F.C.; Serafini, A.B., 2008. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. *Food Control.*, 19, 200–207;
12. Asperger, H.; Zangerl, P. 2003. *Staphylococcus aureus*. In *Encyclopaedia of Dairy Sciences*; Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA: 2563–2569;
13. Araújo VS, Pagliares VA, Queiroz ML, Freitas-Almeida AC., 2002. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J. of App. Microbiology*, 92: 1172-1177;
14. Arciola, C.R.; Campoccia, D.; Ravaioli, S.; Montanaro, L. 2015. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: Structural and regulatory aspects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 5, 7;
15. Arcuri F.E, Angelo F.F.,Guimaraes M.F.M.,Talon R., Borges M.F.B.,Leroy S., Loiseau G., Lange C.C.,Andrade N.J., and Montet D. 2010. Toxigenic status of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk and Minas frescal cheese in Brazil, *J. Food Prot.*, Vol. 73, No. 12;
16. Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR. 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins (Basel)*. 2(7):1751–1773;
17. Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H, Kozaki S. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol Infect.* 130(1): 33–40;
18. Asperger H., Zangerl P., 2003. *Staphylococcus aureus*. In *Encyclopedia of Dairy Science*. Editors Roginski H, Fuquay J, Fox P, San Diego: Academic Press: 2563-2569;
19. Atshan, S.S.; Nor Shamsudin, M.; Sekawi, Z.; Lung, L.; Hamat, R.A.; Karunanidhi, A.; Ali, A.M.; Ghaznavi-Rad, E.; Moghaddam, H.G.; Seng, J.S.C. 2012. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Biotech.*, 1–10;

20. Aydin A, Sudagidan M, Muratoglu K. 2011. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. *International Journal of Food Microbiology*. 148:99–106;
21. Baba, T.; Bae, T.; Schneewind, O.; Takeuchi, F.; and Hiramatsu K. 2008. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. *J. Bacteriol.* 190: 300–310;
22. Balaban N, Rasooly A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*. 2000;61:1–10;
23. Barber M.A. 1914. Milk poisoning due to a type of *Staphylococcus albus* occurring in the udder of a healthy cow. *Philipp J Sci Sect B* 9:515–519;
24. Barbier, F.; Ruppé, E.; Hernandez, D.; Lebeaux, D.; Francois, P.; Felix, B.; Desprez, A.; Maiga, A.; Woerther, P.L.; Gaillard, K.; 2010. Methicillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococci* in the Community: High Homology of SCCmecIVa between *Staphylococcus epidermidis* and Major Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.*, 202, 270–281.
25. Barrero-Domínguez, B.; Luque, I.; Galán-Relaño, Á.; Vega-Pla, J.L.; Huerta, B.; Román, F.; Astorga, R.J. 2019. Antimicrobial resistance and distribution of *Staphylococcus* spp. pulsotypes isolated from goat and sheep bulk tank milk in Southern Spain. *Foodborne Pathog. Dis.*, 16, 723–730.
26. Bayles KW, Landolo JJ. 1989. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol.* 171(9):4799–4806.
27. Becker, K.; van Alen, S.; Idelevich, E.A.; Schleimer, N.; Seggewiß, J.; Mellmann, A.; Kaspar, U.; Peters, G. 2018. Plasmid-Encoded transferable *mecB*-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.*, 24, 242–248.
28. Bergdoll, M.S.; Sugiyama, H.; Dack, G.M. 1959. Staphylococcal enterotoxin. I. Purification. *Arch. Biochem. Biophys.* 85, 62–69;
29. Bergdoll, M.S.; Borja, C.R.; Avena, R.M. 1965. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin, C. *J. Bacteriol.* 90, 1481–1485;
30. Bergdoll, M.S. 1979. Foodborne infections and intoxications. In: Riemann H, Bryan FL (eds) *Staphylococcal intoxication*. Academic, New York: 443–494;

31. Bergdoll, M.S. 1988. Monkey feeding test for staphylococcal enterotoxin. *Methods Enzymol.* 165, 324–333;
32. Betley, M.J, Mekalanos, J.J. 1985. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science.* 229(4709):185–187;
33. Bhati T., Gaurav K., Choudhary S., Diwakar and Kataria K. A., 2019. Molecular detection of some virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis in arid and semi-arid regions of India. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 8(11): 2350-2362.
34. Bissong, M.E.A. and Ateba, C. N., 2020. Genotypic and Phenotypic Evaluation of Biofilm Production and Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk, North West Province, South Africa, *Antibiotics* 9, 156;
35. Blair, J. E., 1962. What is a staphylococcus? *Bacteriol. Rev.* 26, 375-381;
36. Boisset S, Geissmann T, Huntzinger E, Fechter P, Bendridi N, Possedko M, Chevalier C, Helfer AC, Benito Y, Jacquier A., 2007. *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev.* 21(11):1353–1366;
37. Borst, D.W, Betley, M.J. 1994. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression correlate with sea allele class. *Infect Immun.* 62(1):113–118;
38. Boucher, H., Miller, L.G. and Razonable R.R. 2010. Serious infections caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 51(2):183–197;
39. Boyce, J.M. and Havill, N.L. 2005. Comparison of BD Gene Ohm methicillinresistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) PCR versus the CHROMagar MRSA assay for screening patients for the presence of MRSA strains. *J. Clin. Microbiol.* 46 (1): 350-351;
40. Braem, G., B. Stijlemans, W. Van Haken, S. De Vlieghe, L. De Vuyst, and F. Leroy. 2014. Antibacterial activities of coagulase-negative staphylococci from bovine teat apex skin and their inhibitory effect on mastitis-related pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 116(5):1084-1093;
41. Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Dubois-Brissonnet, F., 2011a. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* 27, 1017–1032;
42. Brooks G. F., Carroll K. C., M. D., Jawetz E., Butel J. S., Morse S. A., 2007. *Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology.* 24th edition, McGraw-Hill Professional, pp. 197-233;

43. Buchanan RL, Smith JL, Long W. 2000. Microbial risk assessment: dose-response relations and risk characterization. *Int J Food Microbiol.* 58(3):159–172;
44. Buttner, H.; Dietrich, M.; Rohde, H. 2015. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: Mechanisms and molecular interactions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 5, 14;
45. Cady, C.N., Fusco, V., Maruccio, G., Primiceri, E., Batt, A.C., 2016. In: A G (Ed.), *Micro and Nanotechnology Based Approaches to Detect Pathogenic Agents in Food*. Academic Press;
46. Callon, C.; Gilbert, F.B.; Cremoux, R.D.; Montel, M.C. 2008. Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of *S. aureus* contamination from milk to cheese in goat cheese farms. *Food Control.*, 19, 143–150;
47. Cao R, Zeaki N, Wallin-Carlquist N, Skandamis PN, Schelin J, Rådström P. 2012. Elevated enterotoxin A expression and formation in *Staphylococcus aureus* and its association with prophage induction. *Appl Environ Microbiol.* 78(14): 4942–4948;
48. Carfora, V., Caprioli, A., Marri, N., Sagrafoli, D., Boselli, C., Giacinti, G., Giangolini, G., Sorbara, L., Dottarelli, S., Battisti, A., Amatiste, S. 2015. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy, *International Dairy Journal*, 42: 12-15;
49. Casman, E.P. 1960. Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. *J. Bacteriol.* 79, 849–856;
50. Casman, E.P.; Bergdoll, M.S.; Robinson, J. 1963. Designation of staphylococcal enterotoxins. *J. Bacteriol.* 85, 715–716;
51. Cin Kong, Hui-min Neoh, Sheila Nathan, 2016. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy, *Toxins* 8,72, 1-21;
52. Ciupescu, L.M., Auvray, F., Nicorescu, I.M., Meheut, T., Ciupescu, V., Lardeux, A.L., 2018. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains and evidence for the involvement of non-classical enterotoxin genes in food poisoning outbreaks. *FEMS Microbiol. Lett.* 365;
53. Chao G, Bao G, Cao Y, Yan W, Wang Y, Zhang X, Zhou L, Wu Y. 2015. Prevalence and diversity of enterotoxin genes with genetic background of *Staphylococcus aureus* isolates from different origins in China. *Int J Food Microbiol.* 211: 142–147;
54. Chanda, S., Vyas, B., Vaghasiya, Y. & Patel, H. 2010. Global resistance trends and the potential impact of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and its 95 solutions. *Current Research*,

- Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. 2nd Series. Spain: Formatex: 444-450;
55. Chang, W., C. Lu, C. Huang, Y. Chuang, N. Tsai, S. Chen, C. Chang, H. Wang, C. Chien, and J. Wu. 2007. Epidemiology of adult staphylococcal meningitis in southern Taiwan: a clinical comparison of *Staphylococcus aureus* infection and coagulase-negative staphylococcal infection. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60:262;
  56. Chen, T.R.; Chiou, C.S. and Tsen, H.Y. 2004. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.* 92: 189–197;
  57. Cheng J, Wang Y, Cao Y, Yan W, Niu X, Zhou L, Chen J, Sun Y, Li C, Zhang X., 2016. The distribution of 18 enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains from different sources in East China. *Foodborne Pathog Dis.* 13(4):171–176;
  58. Choi, Y.; Kotzin, B.; Herront, L.; Callahan, J.; Marrack, P.; Kappler, J. 1989 Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin “superantigens” with human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8941–8945;
  59. Collery, M.M., Smyth, C.J., 2007. Rapid differentiation of *Staphylococcus aureus* isolates harbouring *egc* loci with pseudogenes  $\psi$ ent1 and  $\psi$ ent2 and the *selu* or *seluv* gene using PCR-RFLP. *J. Med. Microbiol.* 56, 208–216;
  60. Commission regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L338, 2007: 1–26.
  61. Condas, L. A. Z., J. De Buck, D. B. Nobrega, D. A. Carson, S. Naushad, S. De Vlieghe, R. N. Zadoks, J. R. Middleton, S. Dufour, J. P. Kastelic, and H. W. Barkema. 2017a. Prevalence of non-aureus staphylococci species causing intramammary infections in Canadian dairy herds. *J. Dairy Sci.* 100(7):5592-5612;
  62. Condas, L. A. Z., J. De Buck, D. B. Nobrega, D. A. Carson, J. P. Roy, G. P. Keefe, T. J. DeVries, J. R. Middleton, S. Dufour, and H. W. Barkema. 2017b. Distribution of nonaureus staphylococci species in udder quarters with low and high somatic cell count, and clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 100(7):5613-5627;
  63. Couch JL, Soltis MT, Betley MJ. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol.* 170(7):2954–2960;

64. Cremonesi P., Perez G., Pisoni G., Moroni P., Morandi S., Luzzana M., Brasca M. and Castiglioni B. 2007. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Letters in Applied Microbiology* 45:586–591.
65. Cucarella, C.; Tormo, M.A.; Ubeda, C.; Trotonda, M.P.; Monzón, M.; Peris, C.; Amorena, B.; Lasa, I.; Penadés, J.R. 2004. Role of biofilm—Associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 72, 2177–2185;
66. Cunha, M. L. R. S. 2009a. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* and bovine Mastitis. *Int. J. Med. Biol. Frontiers*. 15: 1031-1042;
67. Chieffia D., Fanellia F., Chob G.-S., Schubert J., Blaiottad G., Charles M.A.P. Franzb, Baniac J., Fusco V. 2020. Novel insights into the enterotoxigenic potential and genomic background of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. *Food Microbiol.*90;
68. De Andrade C.P.A., De Fatimaborges M., De Figueiredo T.A.E., Arcuri F.E., 2019. Diversity of *Staphylococcus* coagulase-positive and negative strains of Coalho cheese and detection of enterotoxin encoding genes, Curitiba, v. 36, n. 1;
69. De Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V. 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int J Food Microbiol.* 67(1–2):1–17;
70. Delmas G, Gallay A, Espié E, Haeghebaert S, Pihier N, Weill FX, De Valk H, Vaillant V, Desenclos JC 2006. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005, *Bull. Epidemio. Hebd.* pp 418–422;
71. Derzelle S, Dilasser F, Duquenne M, Deperrois V. 2009. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cells growth. *Food Microbiol.* 26(8):896–904;
72. De Visscher, A., K. Supre, F. Haesebrouck, R. N. Zadoks, V. Piessens, E. Van Coillie, S. Piepers, and S. De Vlieghe. 2014. Further evidence for the existence of environmental and host-associated species of coagulase-negative staphylococci in dairy cattle. *Vet. Microbiol.* 172(3-4):466-474;
73. De Vita, M.D., Wadhera, R.K., Theis, M.L., Ingham, S.C., 2007. Assessing the potential of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* transfer to foods and customers via a survey of hands, hand-contact surfaces and food-contact surfaces at foodservice facilities. *J. Foodserv.* 18, 76–79;
74. De Vlieghe, S., G. Opsomer, A. Vanrolleghem, L. A. Devriese, O. C. Sampimon, J. Sol, H. W. Barkema, F. Haesebrouck, and A. de Kruif. 2004. In vitro growth inhibition of major mastitis pathogens

- by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers. *Vet. Microbiol.* 101(3):215-221;
75. De-Xian Z, Yao L, Xiao-Qing Y, Hong-Yu S, Wang Q, Ze-Hui Z, Yao-Chuan L, Chun-Lian T, Can-Can C, Ming-Chun L. 2020. In vitro antibiotic susceptibility, virulence genes distribution and biofilm production of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in the Liaoning Province of China. *Infect Drug Resist.* 13:1365–1375;
76. Donlan, R., Costerton, J., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193;
77. Dos Santos, D. C., C. C. Lange, P. Avellar-Costa, K. R. Dos Santos, M. A. Brito, and M. Giambiagi-deMarval. 2016. *Staphylococcus chromogenes*, a Coagulase-Negative Staphylococcus Species That Can Clot Plasma. *J. Clin. Microbiol.* 54(5):1372-1375.
78. Doyle MP, Beuchat LR. 2007. Food microbiology: Fundamentals and frontiers. 3rd ed. Washington (DC): ASM Press;
79. Deurenberg, R.H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich, A.W., Bruggeman, C.A. and Stobberingha, E.E. 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 222–235;
80. Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, Brown EL, Zagursky RJ, Shlaes D, Projan SJ. 2001. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the agr and/or sarA loci. *J Bacteriol.* 183(24):7341–7353;
81. Edwards, L.A.; O'Neill, C.; Furman, M.A.; Hicks, S.; Torrente, F.; Pérez-Machado, M.; Wellington, E.M.; Phillips, A.D.; Murch, S.H. 2012. Enterotoxin-producing staphylococci cause intestinal inflammation by a combination of direct epithelial cytopathy and superantigen-mediated T-cell activation. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 624–640;
82. EFSA. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report; EFSA Journal: Parma, Italy, 2019; Volume 17;
83. EFSA. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control, EFSA Journal: Parma, Italy, 2020;
84. El-Sharoud WM, Spano G., 2008. Diversity and enterotoxigenicity of *Staphylococcus spp.* associated with domiati cheese. *Journal of Food Protection*, 71(12):2567-2571;

85. El-Shenawy M., Tawfeek M., El-Hosseiny L., El-Shenawy M., Farag A., Baghdadi H., Saleh O., Mañes J., Soriano J., 2014. Cross Sectional Study of Skin Carriage and Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* among Food Handlers. *Open J. of Med. Microbiology*, 4:16-22;
86. Elias, S., Banin, E., 2012. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 990–1004;
87. Ellis, M., A. Serreli, P.Coque-Navarro, U.Hedstrom, A. Chacko, E. Siemkowicz, and R. Mollby. 2003. Role of staphylococcal enterotoxin A in a fatal case of endocarditis. *J. Med. Microbiol.* 52:109-112;
88. Erkmen, O.1995 Behavior of *Staphylococcus aureus* in Turkish Feta cheese during manufacture and ripening. *J Food Prot* 58:1201–1205;
89. Ertas, N.,Gonulalan Z.,Yildirim Y., Kum E., 2010. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique, *International Journal of Food Microbiology* 142, (74–77);
90. Etter, D., Schelin J., Schuppler M. and Johler S., 2020. Staphylococcal Enterotoxin C—An Update on SEC Variants, Their Structure and Properties, and Their Role in Foodborne Intoxications, *Toxins* 12,584;
91. Even, S., Charlier, C., Nouaille S., Ben, Zakour NL, Cretenet M., Cousin FJ, Gautier M, Coccagn-Bousquet M, Loubiere P, Le Loir Y. 2009. *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. *Appl Environ Microbiol.* 75(13):4459–4472;
92. Ewald S, Notermans S. 1998. Effect of water activity on growth and enterotoxin D production of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology.*6:25–30;
93. Felipe, V., C. A. Morgante, P. S. Somale, F. Varroni, M. L. Zingaretti, R. A. Bachetti, S. G. Correa, and C. Porporatto. 2017. Evaluation of the biofilm forming ability and its 219 associated genes in *Staphylococcus* species isolates from bovine mastitis in Argentinean dairy farms. *Microb. Pathog.* 104:278-286;
94. Ferry, T.; Perpoint, T.; Vandenesch, F.; Etienne, J.2005. Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 7, 420–428;
95. Fetsch, A.; Johler, S. 2018. *Staphylococcus aureus* as a foodborne pathogen. *Curr. Clin. Microbiol.* 9, 1–8;
96. Fisher EL, Otto M, Cheung GYC. 2018. Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. *Front Microbiol.* 9:436;



97. Flemming, H.-C.; Wingender, J.; Szewzyk, U.; Steinberg, P.; Rice, S.A.; Kjelleberg, 2016. S. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.*,14, 563–575;
98. Francoz D, Wellemans V, Dupr e JP, Roy JP, Labelle F, Lacasse P, Dufour S. 2017. Invited review: a systematic review and qualitative analysis of treatments other than conventional antimicrobials for clinical mastitis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 100(10):7751–7770;
99. Fitzgerald JR, Monday SR, Foster TJ, Bohach GA, Hartigan PJ, Meaney WJ, Smyth CJ. 2001. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J Bacteriol.* 183(1):63–70;
100. Fooladi, I. A. A.,Tavakoli, H.R.; Nadaeri, A., 2010. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in domestic dairy products. *Iranian Journal of Microbiology.* 2 (3): 135-140;
101. Fournier, C., Kuhnert, P., Frey, J., Miserez, R., Kirchhofer, M., Kaufmann, T., Steiner, A. and Graber, H. U. 2008. Bovine *Staphylococcus aureus*: Association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Res. Vet. Sci.* 85: 439–448.
102. França, C.A.; Peixoto, R.M.; Cavalcante, M.B.; Melo, N.F.; Oliveira, C.J.B.; Veschi, J.A.; Mota, R.A.; Costa, M.M., 2012. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus spp.* from small ruminant mastitis in Brazil. *Pesqui. Veterinária Bras.*, 32, 747–753.
103. Fry, P. R., J. R. Middleton, S. Dufour, J. Perry, D. Scholl, and I. Dohoo. 2014. Association of coagulase-negative staphylococcal species, mammary quarter milk somatic cell count, and persistence of intramammary infection in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 97(8):4876-4885;
104. Fueyo, J.M., Mendoza M.C., Martin M.C., 2005. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. *Microbes Infect.*, 7 (2):187-194;
105. Fursova, K., Sorokin A., Sokolov S., Dzhelyadin T., Shulcheva I., Shchannikova M., Nikanova D., Artem'eva O., Zinovieva N., Brovko F., 2020. Virulence factors and phylogeny of *Staphylococcus aureus* associated with bovine mastitis in Russia based on genome sequences. *Front Vet Sci.* 7:135;
106. Fusco, V.; Quero, G.M.; Morea, M.; Blaiotta, G. and Visconti, A. 2011. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* harbouring the enterotoxin gene cluster (egc) and quantitative detection in raw milk by real time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 144:528-537;

107. Fusco, V., Blaiotta, G., Becker, K., 2018. Chapter 12 - Staphylococcal food poisoning. In: Grumezescu, A.M., Holban, A.M. (Eds.), Food Safety and Preservation. Academic Press: 353–390;
108. Goerke C, Pantucek R, Holtfreter S, Schulte B, Zink M, Grumann D, Broker BM, Doskar J, Wolz C. 2009. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. J Bacteriol. 191(11):3462–3468;
109. Gokmen M., Gurbuz U., Torlak E., Makalesi A.I.M., 2013. Identification of *Staphylococcus* spp. isolated in different production stages of white cheese and detection of enterotoxin, Kocatepe Vet. J. 6(2): 7-11;
110. Götz F., Bannerman T. & Schleifer K-H..2006.The Genera Staphylococcus and Micrococcus, Prokaryotes 4:5–75, chapter 1.2.1
111. Grispoli L, Massetti L, Sechi P, Iulietto MF, Ceccarelli M, Karama M, Popescu PA, Pandolfi F, Cenci-Goga BT. 2019b. Short communication: characterization of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. J Dairy Sci. 102(2):1059–1065;
112. Grispoli L., Karama M., Armani A., Hadjicharalambous Ch. & Cenci-Goga T. B. 2021.*Staphylococcus aureus* enterotoxin in food of animal origin and staphylococcal food poisoning risk assessment from farm to table Italian Journal of animal science 20 no.1, (677–690);
113. Goerke, C., Matias y Papenberg, S., Dasbach, S., Dietz, K., Ziebach, R., Kahl, B. C., Wolz, C. 2004. Increased frequency of genomic alterations in *Staphylococcus aureus* during chronic infection is in part due to phage mobilization. J. Infect. Dis. 189, 724–734;
114. Gudding, R. 1983 Differentiation of staphylococci on the basis of nuclease properties. J. Clin. Microbiol. 1983, 18, 1098–1101;
115. Guidi, F., Duranti, A., Gallina, S., Nia, Y., Petruzzelli, A., Romano, A., 2018. Characterization of a staphylococcal food poisoning outbreak in a workplace canteen during the post-earthquake reconstruction of central Italy. Toxins 10;
116. Gyles C. L., Prescott J. F., Songer J. G., Thoen C. O., 2004. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Third edition, Wiley-Blackwell, pp. 3-13, 43-57
117. Haag AF, Bagnoli F. 2016. The role of two-component signal transduction systems in *Staphylococcus aureus* virulence regulation. Curr Top Microbiol Immunol. 409:145–198;
118. Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat. Rev. 2, 95–108;

119. Hanssen, A., J. Sollid. 2007. Multiple staphylococcal cassette chromosomes and allelic variants of cassette chromosome recombinases in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from Norway. *Antimicrobial Agents Chemother.* 51:1671;
120. Heidinger JC, Winter CK, Cullor JS. 2009. Quantitative microbial risk assessment for *Staphylococcus aureus* and Staphylococcus enterotoxin A in raw milk. *J Food Prot.* 72(8):1641–1653;
121. Helak I., E. G. Daczowska-Kozon, and A. A. Dłubała. 2019 Short communication: Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk in Poland, *J. Dairy Sci.* 103:3076–3081;
122. Hennekinne, J.A.; Ostyn, A.; Guillier, F.; Herbin, S.; Pruger, A. L. and Dragacci, S. 2010. How Should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized? *Toxins* 2: 2106-2116;
123. Hennekinne J-A, De Buysse M-L, Dragacci S. 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev.* 36(4):815–836;
124. Henton, M.M.; Eagar, H.A.; Swan, G.E.; van Vuuren, M. 2011. Antibiotic management and resistance in livestock production. *S. Afr. Med. J.*, 101, 583–586;
125. Hisata, K., K. Kuwahara-Arai, M. Yamanoto, T. Ito, Y. Nakatomi, L. Cui, T. Baba, M. Terasawa, C. Sotozono, S. Kinoshita, Y. Yamashiro, and K. Hiramatsu. 2005. Dissemination of methicillin-resistant *staphylococci* among healthy Japanese children. *J. Clin. Microbiol.* 43:3364;
126. Hoiby, N., T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, and O. Ciofu. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35(4):322-332;
127. Holeckova B, Holoda E, Fotta M, Kalinacova V, Gondol J, Grolmus J. 2002. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 9 (2),179-182;
128. Hu, D.; Omoe, K.; Shimoda, Y.; Nakane, A.; Shinagawa, K. 2003. Induction of emetic response to staphylococcal enterotoxins in the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Infect. Immun.* 71, 567–570;
129. Horstkotte A.M., Knobloch K-M. J., Rohde H., Dobinsky S., and Mack D. 2002. Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative *Staphylococci* with the VITEK 2 System, *J. Clin. Microbiol.*,: 3291–3295.
130. Hu, D.L.; Nakane, A. 2014. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. *Eur. J. Pharmacol.* 722, 95–107;

131. Hu, Y.; Meng, J.; Shi, C.; Hervin, K.; Fratamico, P.M.; Shi, X. 2013. Characterization and comparative analysis of a second thermonuclease from *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Res.* 2013, 168, 174–182;
132. Hu, D.L., Ono, H.K., Isayama, S., Okada, R., Okamura, M., Lei, L.C., 2017. Biological characteristics of staphylococcal enterotoxin Q and its potential risk for food poisoning. *J. Appl. Microbiol.* 122, 1672–1679;
133. Hummerjohann, J., Naskova, J., Baumgartner, A., & Graber, H.U. 2014. Enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* genotype B as a major contaminant in Swiss raw milk cheese, *Journal of Dairy Science*, 97: 1305-1312;
134. Hursh S, McNally R, Fanzone J Jr, Mershon M. 1995. Staphylococcal Enterotoxin B Battlefield Challenge Modeling With Medical and Non-Medical Countermeasures. Joppa, MD: Science Applications International Corp; Technical Report MBDRP-95-2;
135. Ibrahim GF, Baldock AK, Radford DR, Ireland LB 1981a. Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production in cheddar cheese produced with variable starter activity. *J Food Prot* 44:263–267;
136. Ikeda, T.; Tamate, N.; Yamaguchi, K.; Makino, S.I. 2005 Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 2793–2795;
137. Jablonski, L. M. and Bohach, G., 2001. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle M. P., Beuchat, L. R., Montville, T. J. (ed): *Food microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington: ASM Press, 411–434;
138. Jakobsen, R.A.; Heggebo, R.; Sunde, E.B.; Skjervheim, M. 2011. *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. *Food Microbiol.*, 28, 492–496;
139. Janstova, B., Jr., L. Necidova, A. Skockova, and B. Janstova. 2014. Staphylococcal enterotoxin production in model samples of milk and fresh cheese. *J. Food Nutr. Res.* 53:389–392;
140. Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougel C, Etienne J, Vandenesch F, Bonneville M, Lina G. 2001. Egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 166(1):669–677;

141. Johler, S., Giannini, P., Jermini, M., Hummerjohann, J., Baumgartner, A., Stephan, R., 2015a. Further evidence for staphylococcal food poisoning outbreaks caused by egc-encoded enterotoxins. *Toxins* 7, 997–1004;
142. Jørgensen, H.J.; Mathisen, T.; Løvseth, A.; Omoe, K.; Qvale, K.S.; Loncarevic, S. 2005. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiol. Lett.*, 252, 267–272;
143. Jørgensen H., Mørkm L., Rørvi k L., 2005. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm of small-scale production of raw milk cheese. *J Dairy Sci*, 88 (11):3810-3817;
144. Juhász-Kaszanyitzky, E.; Jánosi, S.; Somogyi, P.; Dán, A.; Bloois, L.G.; Van Duijkeren, E.; Wagenaar, J.A. 2007. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg. Infect. Dis.*, 13, 630–632;
145. Kateete, D., Kimani C., Katabazi F., Okeng A., Okee M, Nanteza A, Joloba M., Najjuka F. 2010 Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2010, 9:23;
146. Katsuda, K.; Hata, E.; Kobayashi, H.; Kohmoto, M.; Kawashima, K.; Tsunemitsu, H.; Eguchi, M. 2005. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. *Vet. Microbiol.*, 105, 301–305.
147. Kassem II. 2011; Chinks in the armor: the role of the nonclinical environment in the transmission of *Staphylococcus* bacteria. *American Journal of Infection Control*. 39:539–541;
148. Kav K., Col R., Ardic M., 2011. Characterisation of *Staphylococcus aureus* isolates from white brined Urfa cheese. *J. Food Prot.* 74(11), (1788-1796);
149. Kavanaugh, J.S., Thoendel, M., Horswill, A.R. 2007. A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing. *Mol Microbiol*. 65(3):780–798;
150. Kenny, E.F.; Herzig, A.; Krüger, R.; Muth, A.; Mondal, S.; Thompson, P.R.; Brinkmann, V.; Bernuth, H.V.; Zychlinsky, A. 2017. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *eLife*, 6;
151. Kérouanton A., Hennekinne J.A., Letert re C., Petit L., Chesneau O., Brisabois A., De Buyser M.L., 2007 Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiol*, 115: 369–375;

152. Kim HJ, Griffiths MW, Fazil AM, Lammerding AM. 2009. Probabilistic risk model for staphylococcal intoxication from pork-based food dishes prepared in food service establishments in Korea. *J Food Prot.* 72(9):1897–1908;
153. Khemiri M, Abbassi MS, Elghaieb H, Zouari M, Dhahri R, Pomba C, Hammami S. 2019. High occurrence of enterotoxigenic isolates and low antibiotic resistance rates of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk from cows and ewes. *Lett Appl Microbiol.* 68(6):573–579;
154. Kloos, W.-S. 1884. KH: Genus IV. *Staphylococcus*. Rosenbach .1035: 865-1595;
155. Koneman E. W, Winn W. C., Allen S. D., Janda W. M., Schreckenberger P. C., Procop G. W., Woods G. L., 2005. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th edition, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 623-671;
156. Koenig R.L., Ray JL, Maleki S.J., Smeltzer M.S., Hurlburt B.K. 2004. *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNIII-agr regulatory region. *J Bacteriol.* 186(22): 7549–7555;
157. Kotzekidou P. 2013. Microbiological examination of ready-to-eat foods and ready-to-bake frozen pastries from university canteens. *Food Microbiol.* 34(2): 337–343;
158. Kropec A., Maira-Litran T., Jefferson K. K., M. Grout M., Cramton S. E., Gotz F., Goldmann D. A., and Pier G. B., 2005. Poly-N-Acetylglucosamine Production in *Staphylococcus aureus* Is Essential for Virulence in Murine Models of Systemic Infection. *Infection and Immunity* 73, 6868-6876;
159. Kubica, M., Guzik, K., Koziel, J., Zarebski, M., Richter, W., Gajkowska, B., et al. 2008. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE* 3:e1409;
160. Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 357(9264):1225–1240;
161. Kusch, K., Hanke, K., Holtfreter, S., Schmutde, M., Kohler, C., Erck, C., Wehland, J., Hecker, M., Ohlsen K, Broker B, 2011. The influence of SaeRS and r(B) on the expression of superantigens in different *Staphylococcus aureus* isolates. *Int J Med Microbiol.* 301(6):488–499;
162. Lamers, R. P., G. Muthukrishnan, T. A. Castoe, S. Tafur, A. M. Cole, and C. L. Parkinson. 2012. Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. *BMC Evol. Biol.* 12:171;

163. Langley RJ, Ting YT, Clow F, Young PG, Radcliff FJ, Choi JM, Sequeira RP, Holtfreter S, Baker H, Fraser JD. 2017. Staphylococcal enterotoxin-like X (SEIX) is a unique superantigen with functional features of two major families of staphylococcal virulence factors. *PLoS Pathog.* 13(9);
164. Lassa, I.; Penades, J.R. 2006 A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res. Microbiol.* 157: 99–107;
165. Lawrynowicz-Paciorek, M.; Kochman, M.; Grochowska, A.; Windyga, B. 2007. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. *Int. J. Food Microbiol.*, 117, 319–332;
166. Lee S. H. I., Camargo C. H., Gonçalves J. L., Cruz A. G., Sartori B. T., Machado M. B., and Oliveira C. A. F. 2012. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in milk and the milking environment from small-scale dairy farms of São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis, *J. Dairy Sci.* 95 :7377–7383;
167. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res.* 2(1):63–76;
168. Le Marc, Y.; Valfk, L.; Medvedová, A. 2009. Modelling the effect of the starter culture on the growth of *Staphylococcus aureus* in milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 129, 306–311;
169. Ler, S.G.; Lee, F.K. and Gopalakrishnakone, P. 2006. Trends in Detection of Warfare Agents. *Detection Methods for Ricin, Staphylococcal Enterotoxin B and T2 Toxin. J. Chromatogr. A.* 1133: 1–12;
170. Letertre, C, Perelle S, Dilasser F, Fach P. 2003. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol.* 95(1): 38–43;
171. Levinson, W., 2006. *Review of medical microbiology and immunology.* 9th edition, McGrawHill Professional, pp. 1-119;
172. Liang M, Zhang T, Liu X, Fan Y, Xia S, Xiang Y, Liu Z, Jinnian L. 2015. Development of an indirect competitive enzymelinked immunosorbent assay based on the multiepitope peptide for the synchronous detection of staphylococcal enterotoxin A and G proteins in milk. *J Food Prot.* 78(2): 362–369;
173. Lim, D.; Strynadka, N.C. 2002. Structural basis for the  $\beta$ -lactam resistance of PBP2a from methicillin—Resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 9: 870–876;
174. Lina, G., Bohach, G.A., Nair, S.P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E., Mariuzza, R., 2004. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J. Infect. Dis.* 189: 2334–2336;

175. Lindsay J.A., Holden M.T.G. 2006. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *FunctIntegr Genomics* 6:186–201;
176. Lindsay, J.A. 2011. Genomics of *Staphylococcus*. In *Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens* ed. Wiedmann, M. and Zhang, W. pp. 237–265. New York, NY: Springer;
177. Lindqvist R, Sylven S, Vagsholm I. 2002. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *Int J Food Microbiol.* 78(1–2):155–170;
178. Lipsky, B. A., Weigelt, J. A., Gupta, V., Killian, A. & Peng, M. M. 2007. Skin, soft tissue, bone, and joint infections in hospitalized patients: epidemiology and microbiological, clinical, and economic outcomes. *Skin* 28(11): 1290-1298;
179. Loncarevic, S.; Jørgensen, H.J.; Løvseth, A.; Mathisen, T.; Rørvik, L.M. 2005. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *J. Appl. Microbiol.*, 98, 344–350;
180. Longauerova A., 2006. Coagulase negative staphylococci and their participation in pathogenesis of human infections. *Bratisl Lek Listy.* 107, 448–452;
181. Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18, 268–281.
182. Madsen, J.S., Burmølle, M., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., 2012. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65, 183– 195;
183. Mann, E.E.; Rice, K.C.; Boles, B.R.; Endres, J.L.; Ranjit, D.; Chandramohan, L.; Tsang, L.H.; Smeltzer, M.S.; Horswill, A.R.; Bayles, K.W. 2009. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS ONE*, 4;
184. Malachowa N, DeLeo FR. 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci.* 67(18):3057–3071;
185. Martins, A. & Cunha, M. L. 2007. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiology and immunology* 51(9): 787-795;



186. Martins, K. B., P. Y. Faccioli, M. F. Bonesso, S. Fernandes, A. A. Oliveira, A. Dantas, L. F. Zafalon, and M. L. Cunha. 2017. Characteristics of resistance and virulence factors in different species of coagulase-negative staphylococci isolated from milk of healthy sheep and animals with subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 100(3):2184-2195;
187. Marques V.F. , Motta, C.C., Soares, S.B., deMelo D.A., deOliveira Coelho S.M., da Silva Coelho I., Barbosa H. S., de Souza M. M. S., 2017. Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis, *Brasiliian Journal of Microbiology* 48, 118-124;
188. Mashruwala AA, Boyd JM. 2017. The *Staphylococcus aureus* SrrAB regulatory system modulates hydrogen peroxide resistance factors, which imparts protection to aconitase during aerobic growth. *PLoS One.* 12(1);
189. Medeiros M.I.M., Nader Filho A., Jordano R., Ruz V., Medina L.M., García V. 2019. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and its toxins in cheeses from the region of Andalusia, Spain *J Dairy Vet Anim Res.* 8(1): 33–36;
190. Meyrand A, Boutrand-Loei S, Ray-Gueniot S, Mazuy C, Gaspard CE, Jaubert G, Perrin G, Lapeyre C, Vernozy-Rozand C. 1998. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. *J Appl Microbiol* 85:537–544;
191. McCabe W. R., 1964. Studies of Staphylococcal infections. I. Virulence of *Staphylococci* and characteristics of Infections in embryonated eggs. *Journal of Clinical Investigations* 43, 2146–2157;
192. McClure, J.A.; ZaalDeLongchamp, J.; Conly, J.M.; Zhang, K. 2017. Novel Multiplex PCR Assay for Detection of Chlorhexidine Quaternary Ammonium, Mupirocin, and Methicillin Resistance Genes, with Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, 55, 1857–1864;
193. McCormick, J. K., Yarwood, J. M. & Schlievert, P. M. 2001. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annual Reviews in Microbiology* 55(1): 77-104;
194. McCulloch, J. A. 2006. Avaliação da funcionalidade do locus accessory gene regulator (agr) em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com suscetibilidade e aderência aos glicopeptídeos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo;
195. McKay, A. 2008. Antimicrobial resistance and heat sensitivity of oxacillin-resistant, *mecA*-positive *Staphylococcus spp.* from unpasteurized milk. *J. Food Prot.* 71:186;

196. McKenney, D.; Ubner, J.H.; Muller, E.; Wang, Y.; Goldmann, D.A.; Pier, G.B. 1998. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesion. *Infect. Immun.*, 66, 4711–4720;
197. McNamara, P. J.; Milligan-Monroe, K. C.; Khalili, S. and Proctor, R. A. 2000. Identification, cloning, and initial characterization of *rot*, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* 182 (11): 3197-3203;
198. Mlynarczyk, G., M. Kochman, M. Lawrynowicz, P. Fordymacki, A. Mlynarczyk, and J. Jeljaszewicz. 1998. Coagulase-negative variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* strains isolated from hospital specimens. *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.* 288(3):373-381.
199. Mombach Pinheiro Machado, AB., K. Reiter, R. Paiva, and A. Barth. 2007. Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *J. Med. Microbiol.* 56:1328;
200. Morandi, S.; Brasca, M.; Lodi, R.; Cremonesi, P.; Castiglioni, B. 2007. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Vet. Microbiol.*, 124, 66–72
201. Mørk T, Kvitle B, Mathisen T, Jørgensen HJ. 2010. Bacteriological and molecular investigations of *Staphylococcus aureus* in dairy goats. *Veterinary Microbiology.* 2010;141:134–141;
202. Mousa W. S., Abdeen E., Hussein H. and Hadad Gh., 2017. Prevalence and multiplex PCR for enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical mastitis and Kareish cheese, *J. Infect. Dis. Preve. Med.* v5:4;
203. Najera-Sanches, G., Rodrigues M.R., Olvera P.R., de la Garza M.L., 2003. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *Journal of Food Protection*, v. 66, n. 6: 1055-1062;
204. Necidová, L. Janštová, B. Karpíšková, R. 2012: Dynamics of staphylococcal enterotoxin production in model experiments simulating the fresh cheese environment. *Acta Veterinaria*, 81, 2012: 391–396;
205. Nia Y, Mutel I, Assere A, Lombard B, Auvray F, Hennekinne JA. 2016. Review over a 3-year period of European Union Proficiency Tests for detection of staphylococcal enterotoxins in food matrices. *Toxins (Basel)*. 8(4):107;

206. Nogueira Vicoso G, Vieira Botelho C, Botta C, Bertolino M, Fernandes de Carvalho A, Nero LA, Cocolin L. 2019. Impact of co-cultivation with *Enterococcus faecalis* over growth, enterotoxin production and gene expression of *Staphylococcus aureus* in broth and fresh cheeses. *Int J Food Microbiol.* 2:308;
207. Normanno, G.; Corrente, M.; La Salandra, G.; Dambrosio, A.; Quaglia, N.C.; Parisi, A.; Greco, G.; Bellacicco, A.L.; Virgilio, S.; Celano, G.V. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *Int. J. Food Microbiol.*, 117, 219–222;
208. Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiswirth B, Vandenesch F, Moghazeh S. 1995. The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet.* 248(4):446–458;
209. Novick R.P. 2003. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid.* 49(2):93–105;
210. Novick RP, Schlievert P, Ruzin A. 2001. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes Infect.* 3(7): 585–594;
211. Novick, R. P. and Subedi, A. 2007. The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*. *Chem. Immunol. Allergy.* 93: 42–57;
212. Ogston, A., 1882. Micrococcus poisoning. *J. Anat. Physiol.* 17, 24–58;
213. Okumura, K., Shimomura, Y., Murayama, S.Y., Yagi, J., Ubukata, K., Kirikae, T., 2012. Evolutionary paths of streptococcal and staphylococcal superantigens. *BMC Genom.* 13, 404;
214. Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K. 2003. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect Immun.* 71(10): 6088–6094;
215. Omoe, K.; Hu, D.-L.; Ono, H.K.; Shimizu, S.; Takahashi-Omoe, H.; Nakane, A.; Uchiyama, T.; Shinagawa, K.; Imanishi, K., 2013 Emetic Potentials of Newly Identified Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxins. *Infect. Immun.* 81, 3627–3631;
216. Ono, H.K.; Omoe, K.; Imanishi, K.; Iwakabe, Y.; Hu, D.L.; Kato, H.; Saito, N.; Nakane, A.; Uchiyama, T. and Shinagawa, K. 2008. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infect. Immun.* 76: 4999–5005;

217. Ono, H.K.; Nishizawa, M.; Yamamoto, Y.; Hu, D.L.; Nakane, A.; Shinagawa, K.; Omoe, K. 2012. Submucosal mast cells in the gastrointestinal tract are a target of staphylococcal enterotoxin type A. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 64, 392–402;
218. Ono, H.K., Sato'o, Y., Narita, K., Naito, I., Hirose, S., Hisatsune, J., et al., 2015. Identification and characterization of a novel staphylococcal emetic toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7034–7040;
219. Ono, H.K.; Hirose, S.; Narita, K.; Sugiyama, M.; Asano, K.; Hu, D.L.; Nakane, A. 2019. Histamine release from intestinal mast cells induced by staphylococcal enterotoxin a (SEA) evokes vomiting reflex in common marmoset. *PLoSPathog.* 15, 1–20;
220. Ortega, E.; Hikmate, A.; Lucas, R. and Gálvez A. 2010. Multiple Roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance Toxins. 2: 2117-2131;
221. Otto, M. 2008. Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 322, 207–228;
222. Otto, M. 2018. Staphylococcal Biofilms. *Microbiol. Spectr.*, 6;
223. Park JY, Fox LK, Seo KS, McGuire MA, Park YH, Rurangirwa FR, Sicho WM, Bohach GA. 2011; Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative *staphylococci* isolated from bovine intramammary infections. *Veterinary Microbiology.* 147:149–154;
224. Partida, A.; Espunes, T.; Marinez, J.B., 2010. Characterization and persistence of *Staphylococcus aureus* strains Isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a mexican community. *J. of Clin. Microbiol.* 48(5): 1701-1705;
225. Paterson, G.K.; Harrison, E.M.; Holmes, M.A. 2014. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2014, 22, 42–47.
226. Peles F, Wagner M, Varga L, Hein I, Rieck P, Gutser K, Kereszturi P, Kardos G, Turcs I, Beri B., 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *Int J Food Microbiol.* 118(2): 186–193;
227. Petersson-Wolfe, C. S., I. K. Mullarky, and G. M. Jones. 2010. *Staphylococcus aureus* mastitis: Cause, detection, and control. Virginia Cooperative Extension;
228. Pereira, V.; Lopes, C.; Castro, A.; Silva, J.; Gibbs, P. and Teixeira, P. 2009. Characterization for enterotoxin production. Virulence factors, and antibiotic susceptibility of staphylococcus aureus isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiol.* 26:278-282;

229. Periasamy, S.; Joo, H.-S.; Duong, A.C.; Bach, T.-H.L.; Tan, V.Y.; Chatterjee, S.S.; Cheung, G.Y.C.; Otto, M. 2012. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. PNAS, 109, 1281–1286;
230. Pesavento, G.; Ducci, B.; Comodo, N. and Nostro, A.L. 2007. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: a research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Food Control 18:196-200;
231. Pichon C. iFelden B., 2005. Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. The National Academy of Sciences, Proc Natl Acad Sci U S A. 102, 14249–14254;
232. Piessens, V., S. De Vliegher, B. Verbist, G. Braem, A. Van Nuffel, L. De Vuyst, M. Heyndrickx, and E. Van Coillie. 2012. Characterization of coagulase-negative staphylococcus species from cows' milk and environment based on bap, icaA, and mecA genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips. J. Dairy Sci. 95(12):7027-7038;
233. Piessens, V., E. Van Coillie, B. Verbist, K. Supre, G. Braem, A. Van Nuffel, L. De Vuyst, M. Heyndrickx, and S. De Vliegher. 2011. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. J. Dairy Sci. 94(6): 2933-2944;
234. Pinchuk, I.V.; Beswick, E.J.; Reyes, V.E. 2010. Staphylococcal enterotoxins. Toxins, 2, 2177–2197;
235. Pinto B., Chenolla E., Aznar R. 2005. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. Systematic and Applied Microbiology 28, 340–352;
236. Phillips, W. & Kloos, W. E. 1981. Identification of coagulase-positive *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus subsp. hyicus* isolates from veterinary clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology 14(6): 671-673;
237. Priscila Luiza Mello, Danilo Flávio Moraes Riboli, Luiza Pinheiro, Lisiane de Almeida Martins, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito and Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha. 2016 : Detection of Enterotoxigenic Potential and Determination of Clonal Profile in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bovine Subclinical Mastitis in Different Brazilian States, Toxins 8;
238. Proietti C.P., Coppola G., Bietta A., Marenzoni L.M., Hyatt R.D., Colleti M. and Passamonti F. 2010. Characterization of genes encoding virulence determinants and toxins in *Staphylococcus aureus* from bovine milk in Central Italy, J. Vet. Med. Sci. 72(11): 1443–1448,

239. Pyorala, S. and S. Taponen. 2009. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet. Microbiol.* 134(1-2):3-8;
240. Rabello R.F., Souza C.R.V.M., Duarte R.S.R., Lopes M.M., Teixeira L.M. & Castro A.C.D. 2005. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Dairy Sci.* 88(9):3211-3219;
241. Rajagopalan, G.; Sen, M.M.; Singh, M.; Murali, N.S.; Nath, K.A.; Iijima, K.; Kita, H.; Leontovich, A.A.; Gopinathan, U.; Patel, R.; David, C.S. 2006. Intranasal Exposure to Staphylococcal Enterotoxin B Elicits an Acute Systemic Inflammatory Response. *Shock*25, 647–656;
242. Rajkovic A. 2016. Staphylococcus: food poisoning. In: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F, editors. *Encyclopedia of Food and Health*. 1st ed. Oxford: Academic Press; 2016. pp. 133– 139;
243. Rall VLM, Vieira FP, Rall R, Vieitis RL, Fernandes Jr.A, CAndeias JMG, Cardoso KFG, Araújo Jr. JP. 2008. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Veterinary Microbiology.* 132:408–413;
244. Regassa LB, Betley MJ. 1993. High sodium chloride concentrations inhibit staphylococcal enterotoxin C gene (sec) expression at the level of sec mRNA. *Infect Immun.* 61(4): 1581–1585;
245. Rola, J.G., Czubkowska, A., Korpysa-Dzirva, W., Osek, J. 2016. Occurrence of *Staphylococcus aureus* on Farms with Small Scale Production of Raw Milk Cheeses in Poland, *Toxin*, 8(62): 1-9;
246. Rosenbach, F.J., 1884. *Mikro-organismen bei den wund-infections-krankheiten des menschen*. Wiesbaden J. F. Bergmann, Göttingen;
247. Rosengren Å, Fabricius A, Guss B, Sylvén S, Lindqvist R. 2010. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *International Journal of Food Microbiology.* 144:263–269;
248. Rosengren A, Lindblad M, Lindqvist R. 2013. The effect of undissociated lactic acid on *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production. *Int J Food Microbiol.* 162(2):159–166;
249. Roussel, S., Felix, B., Vingadassalon, N., Grout, J., Hennekinne, J.A., Guillier, L., 2015. Staphylococcus aureus strains associated with food poisoning outbreaks in France: comparison of different molecular typing methods, including MLVA. *Front. Microbiol.* 6, 882;
250. Pragman AA, Yarwood JM, Tripp TJ, Schlievert PM. 2004. Characterization of virulence factor regulation by SrrAB, a two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 186(8):2430–2438;

251. Prenafeta, A., M. Sitja, M. A. Holmes, and G. K. Paterson. 2014. Short communication: biofilm production characterization of *mecA* and *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Great Britain. *J. Dairy Sci.* 97(8):4838-4841;
252. Queiroga, M.C.; Andrade, N.; Laranjo, M., 2018. Antimicrobial action of propolis extracts against *Staphylococci*. In *Understanding Microbial Pathogens: Current knowledge and educational ideas on antimicrobial research*; Formatex Research Center: Badajoz, Spain: 28–35;
253. Sakoulas, G. and Moellering, R.C. 2008. Increasing antibiotic resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains . *Clin. Infect. Dis.* 46(5): 360-367;
254. Sampaio E, Nader-Filho A. 2000. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in cheese made in Brasil. *Rev Saúde Pública.* 34(6): 578–580;
255. Sato'o, Y., Hisatsune, J., Nagasako, Y., Ono, H.K., Omoe, K., Sugai, M., 2015. Positive Regulation of staphylococcal enterotoxin H by rot (repressor of toxin) protein and its importance in clonal complex 81 subtype 1 lineage-related food poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 7782–7790;
256. Savic Radovanovic Radoslava, Zdravkovic N., Velebit B., 2020. Occurrence and Characterization of enterotoxigenic staphylococci isolated from soft cheeses in Serbia, *Acta Veterinaria-Beograd*, 70 (2), 238-254;
257. Savijoki, K., A. Iivanainen, P. Siljamaki, P. K. Laine, L. Paulin, T. Karonen, S. Pyorala, M. Kankainen, T. A. Nyman, T. Salomaki, P. Koskinen, L. Holm, H. Simojoki, S. Taponen, A. Sukura, N. Kalkkinen, P. Auvinen, and P. Varmanen. 2014. Genomics and Proteomics Provide New Insight into the Commensal and Pathogenic Lifestyles of Bovine- and Human-Associated *Staphylococcus epidermidis* Strains. *J. Proteome Res.*
258. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. 2011. Foodborne illness acquired in the United States – Major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 17(1):7–15;
259. Shen M, Li Y, Zhang L, Dai S, Wang J, Li Y, Zhang L, Huang J. 2017. *Staphylococcus enterotoxin* profile of China isolates and the superantigenicity of some novel enterotoxins. *Arch Microbiol.* 199(5):723–736;
260. Schelin J, Wallin-Carlquist N, Cohn MT, Lindqvist R, Barker GC, Rådström P. 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence.* 2(6):580–592;

261. Shiun-Bi Su, Yu-Lan Wang, Shiu-Ing Chiu, Jing-Lai Tsai, Cheng-Ing Chou .2005. Establishing the use of Real-time PCR for staphylococcal enterotoxin, *Epidemiology Bulletin* vol. 21 (12);
262. Schleifer, K., Kloos, W. & Kocur, M. 1981. The genus *Micrococcus*. *The prokaryotes: A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*. Springer-Verlag, Berlin: 1539-1547;
263. Schleifer, K.H., Bell, J.A., Vos, P.D., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B. (Eds.), 2009. Family VIII. Staphylococcaceae fam. nov. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 3: The Firmicutes*. Springer: 392–426;
264. Schlievert, P.M.; Bohach, G.A.; Ohlendorf, D.H.; Stauffacher, C.V.; Leung, D.Y.M.; Murray, D.L.; Earhart, C.A.; Jablonski, L.M.; Hoffmann, M.L.; Chi, Y.I. 1995 Molecular structure of *Staphylococcus* and *Streptococcus* superantigens. *J. Clin. Immunol.* 15, 4–10;
265. Schmitt M, Schuler-Schmid U, Schmidt-Lorenz W. 1990. Temperatures limit of growth, Tnase, and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Int J Food Microbiol.* 11(1):1–19;
266. Sergeev, N., D. Volokhov, V. Chizhikov, and A. Rasooly. 2004. Simultaneous analysis of multiple staphylococcal enterotoxin genes by an oligonucleotide microarray assay. *J. Clin. Microbiol.* 42:2134–2143;
267. Singh, R., Ray, P., Das, A., Sharma, M., 2010. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1955–1958;
268. Sihto HM, Stephan R, Engl C, Chen J, Johler S. 2017. Effect of food-related stress conditions and loss of agr and sigB promoter activity in *S. aureus* *Italian J. of Animal Sc.* 689. *Food Microbiol.* 65: 205–212;
269. Sihto HM, Tasara T, Stephan R, Johler S. 2015. Temporal expression of the staphylococcal enterotoxin D gene under NaCl stress conditions. *FEMS Microbiol Lett.* 362: 1–7;
270. Sihto HM, Tasara T, Stephan R, Johler S. 2016. Growth behavior and temporal enterotoxin D expression of *Staphylococcus aureus* strains under glucose and lactic acid stress. *Food Control.* 62:69–73;
271. Sila, J.; Sauer, P.; Kolar, M. 2009. Comparison of the prevalence of genes coding for enterotoxins, exfoliatins, Panton-Valentine leukocidin and TSST-1 between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* at the University Hospital in Olomouc. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.* 153: 215–218;



272. Simon, S.S., Sanjeev, S., 2007. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. *Food Control* 18, 1565–1568;
273. Sidhu, M., H. Oppegaard, T. Devor, and H. Sorum. 2007. Persistence of multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in an animal veterinary teaching hospital clinic. *Microb. Drug Resist.* 13:271;
274. Smyth DS, Hartigan PJ, Meaney WJ, Fitzgerald JR, Deobald CF, Bohach GA, Smyth CJ. 2005. Superantigen genes encoded by the egc cluster and SaPIbor are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, sheep, rabbits and poultry. *Journal of Medical Microbiology.*;54:401–411;
275. Song M, Shi C, Xu X, Shi X. 2016. Molecular typing and virulence gene profiles of enterotoxin gene cluster (egc)-positive *Staphylococcus aureus* isolates obtained from various food and clinical specimens. *Foodborne Pathog Dis.* 13(11):592–601;
276. Soejima T, Nagao E, Yano Y, Yamagata H, Kagi H, Shinagawa K. 2007. Risk evaluation for staphylococcal food poisoning in processed milk produced with skim milk powder. *Int J Food Microbiol.* 115(1):29–34;
277. Spoor, L.E., Richardson, E., Richards, A.C., Wilson, G.J., Mendonca, C., Gupta, R.K., 2015. Recombination-mediated remodelling of host-pathogen interactions during *Staphylococcus aureus* niche adaptation. *Microb. Genom.* 1 (4);
278. Srinivasan, V.; Sawant, A.A.; Gillespie, B.E.; Headrick, S.J.; Ceasaris, L.; Oliver, S.P. 2006. Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. *Foodborne Pathog. Dis.*, 3, 274–283;
279. Stepanovic, S., Ježek, P., Vukovic, D., Dakic, I. & Petraš, P. 2003. Isolation of members of the *Staphylococcus sciuri* group from urine and their relationship to urinary tract infections. *Journal of Clinical Microbiology* 41(11): 5262-5264;
280. Su, Y.C. and Wong ,A.C., 1997. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. *Journal of Food Protection* 60, 195–202;
281. Sugiyama, H.; Hayama, T. 1965. Abdominal viscera as site of emetic action for staphylococcal enterotoxin in the monkey. *J. Infect. Dis.* 115, 330–336;
282. Sumbly P, Waldor MK. 2003. Transcription of the toxin genes present within the staphylococcal phage phiSa3ms is intimately linked with the phage's life cycle. *J Bacteriol.* 185(23):6841–6851;

283. Supre, K., F. Haesebrouck, R. N. Zadoks, M. Vaneechoutte, S. Piepers, and S. De Vliegher. 2011. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. *J. Dairy Sci.* 94(5):2329-2340;
284. Sutherland J.P. Bayliss A.J, Roberts T.A.1994. Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology.*21:217–236;
285. Suzuki, Y., Kubota, H., Sato'o, Y., Ono, H.K., Kato, R., Sadamasu, K., 2015. Identification and characterization of novel *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands encoding staphylococcal enterotoxins originating from staphylococcal food poisoning isolates. *J. Appl. Microbiol.* 118, 1507–1520;
286. Taponen, S.; Pyorala, S., 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet. Microbiol.*, 134, 29–36.
287. Tarekgne K.E. 2016 *Staphylococcus aureus* from milk and milk products in Ethiopia: Prevalence, enterotoxigenic potential, antibiotic resistance and *spa* types, Thesis number: 2016:48
288. Tatini S.R., Jezeski J.J., Morris H.A., Olson J.C., Casman E.P., 1971. Production of staphylococcal enterotoxin A in cheddar and Colby cheese. *J Dairy Sci* 54:815–825;
289. Thoendel, M.; Kavanaugh, J.S.; Flack, C.E. and Horswill, A.R. 2011. Peptide signaling in the staphylococci. *Chem Rev.* 111:117-51;
290. Thomas, D.Y., Jarraud, S., Lemercier, B., Cozon, G., Echasserieau, K., Etienne, J., 2006. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infect. Immun.* 74, 4724–4734;
291. TibebeL., Belete Y., Tigabu E., Tsegaye W. 2021. Prevalence of *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and potential risk factors in selected dairy farms at the interface of animal and human in Bishoftu, Ethiopia, *Veterinary Medicine: Research and Reports* 12 241–251.
292. Tirado C, Schmidt K 2001.WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. *J Infect* 43:80–84;
293. Tremblay, Y. D., D. Lamarche, P. Chever, D. Haine, S. Messier, and M. Jacques. 2013. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *J. Dairy Sci.* 96(1):234-246;

294. Tondo, E.C.; Guimaraes, M.C.; Henriques, J.A.; Ayub, M.A. 2000. Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. *Can. J. Microbiol.*, 46, 1108–1114;
295. Torres, G.; Vargas, K.; Sánchez-Jiménez, M.; Reyes-Velez, J.; Olivera-Angel, M. 2019. Genotypic and phenotypic characterization of biofilm production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections in Colombian dairy farms. *Heliyon* 2019, 5;
296. Tsutsuura S, Shimamura Y, Murata M. 2013. Temperature dependence of the production of staphylococcal enterotoxin A by *Staphylococcus aureus*. *BiosciBiotechnolBiochem.* 77(1):30–37;
297. Tuffs, S.W., Haeryfar, S.M.M., McCormick, J.K., 2018. Manipulation of innate and adaptive immunity by staphylococcal superantigens. *Pathogens* 7 (2);
298. Turchi, B.; Bertelloni, F.; Marzoli, F.; Cerri, D.; Tola, S.; Azara, E.; Longheu, C.M.; Tassi, R.; Schiavo, M.; Cilia, G.; 2020. Coagulase negative staphylococci from ovine milk: Genotypic and phenotypic characterization of susceptibility to antibiotics, disinfectants and biofilm production. *Small Rumin. Res.*, 183, 106030;
299. Türkyilmaz S., Kaya O., 2006. Determination of some Virulence Factors in *Staphylococcus spp.* isolated from various clinical samples. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 30, 127-132;
300. Umeda, K., Nakamura, H., Yamamoto, K., Nishina, N., Yasufuku, K., Hirai, Y., 2017. Molecular and epidemiological characterization of staphylococcal foodborne outbreak of *Staphylococcus aureus* harboring *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, and *sel* genes without production of classical enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 256, 30–35;
301. Valero A, Perez-Rodriguez F, Carrasco E, Fuentes-Alventosa JM, Garcia-Gimeno RM, Zurera G. 2009. Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: effect of temperature, pH and water activity. *Int J Food Microbiol.* 133(1–2):186–194;
302. Van Belkum, A. 2006. Staphylococcal colonization and infection: homeostasis versus disbalance of human (innate) immunity and bacterial virulence. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19:339-344;
303. Van-Houdt, R., Michiels, C.W., 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1117–1131;
304. Vasconcelos, N. G. and Cunha, M. L. R. S. 2010. Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods. *Journal of Public Health and Epidemiology.* 2(3): 29-42;

305. Vautor E., Magnone V., Rios G., Le Brigand K., Bergonier D., Lina G., Meugnier H., Barbry P., Thiéry R., Pépin M., 2009 Genetic differences among *Staphylococcus aureus* isolates from dairy ruminant species: A single-dye DNA microarray approach, *Vet. Microbiol*, 133, 1-2: 105-114;
306. Viana, D.; Blanco, J.; Tormo-Más, M.Á.; Selva, L.; Guinane, C.M.; Baselga, R.; Corpa, J.M.; Lasa, Í.; Novick, R.P.; Fitzgerald, J.R.; 2010. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. *Mol. Microbiol.*, 77, 1583–1594;
307. Vimercati, C., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Pisoni, G., Boettcher, P. J., Stella, A., Vicenzoni, G. and Moroni, P. 2006. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows, goats and sheep with intramammary infections on the basis of gene polymorphisms and toxins genes. *J. Vet. Med B. Infect. Dis. Vet. Public. Health*. 53: 423–428,
308. Veras, J.F.; Simeão, L.C.; Lawrence, C.T.; Jeffrey, W.S.; Christiano, C.; Santos, D.A.; Cerqueira, M.M.O.P.; Cantini, A.; Nicoli, J.R.; Jett, M. 2008. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int. J. Infect. Dis*. 12, 410–415;
309. Vernozy-Rozand, C., Mazuy C., Perrin G., Haond F., Bes M., Brun Y., Fleurette J. 1996. Identification *Micrococcaceae* isolated from goat's milk and cheese in the Poitou-Charentes region. *International Journal of Food Microbiology*, v. 30, n. 3: 373-378;
310. Vernozy-Rozand C, Meyrand A, Mazuy C, Delignette-Muller ML, Jaubert G, Perrin G, Lapeyre C, Richard Y, 1998. Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goats' milk lactic cheeses. *J Dairy Res* 65:273–281;
311. Vernozy-Rozand C., C. Mazuy-Chruchaudet, C. Bavai Y. Richard. 2004. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. *Letters in Applied Microbiology* 39, 490-495;
312. Vieira, T. R., 2017. Pesquisa de *Staphylococcus* spp. Coagulase negativa em queijo colonial inspecionado: identificação, perfil de genes de enterotoxinas clássicas e de resistência à penicilina e à meticilina. Dissertation. 85 f. Porto Alegre.
313. Vos, P.; Garrity, G.; Jones, D.; Krieg, N. R.; Ludwig, W.; Rainey, F.A.; Schleifer, K. H. and Whitman, W. B., 2009. The Firmicutes In: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 2nd ed. Volume 3. Springer, New York;

314. Yamada, K.; Namikawa, H.; Fujimoto, H.; Nakaie, K.; Takizawa, E.; Okada, Y.; Fujita, A.; Kawaguchi, H.; Nakamura, Y.; Abe, J.; 2017. Clinical Characteristics of Methicillin-resistant Coagulase-negative Staphylococcal Bacteremia in a Tertiary Hospital. *Intern. Med.*, 56, 781–785
315. Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, Orwin PM, Kapur V, Schlievert PM. 2002. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J Biol Chem.* 277(15):13138–13147;
316. Yarwood JM, Schlievert PM. 2003. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest.* 112(11): 1620–1625;
317. Yasmine Motarjemi, Gerald Moy and Ewen Todd, 2014. "Encyclopedia of Food Safety – 1<sup>st</sup> edition"- Elsevier, Inc.;
318. Yildirim T., Sadati F., Kocaman B., Siriken B., 2019. Staphylococcus aureus and Staphylococcal enterotoxin detection in raw milk and cheese origin coagulase positive isolates, *International Journal of Science Letters.*1(1): 30-41;
319. Xu, Z.; Shi, L.; Alam, M.J.; Li, L.; Yamasaki, 2008. S. Integron-bearing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in South China, 2001–2004. *FEMS Microbiol. Lett.*, 278, 223–230.
320. Xu, J.; Tan, X.; Zhang, X.; Xia, X.; Sun, H. 2015. The diversities of staphylococcal species, virulence and antibiotic resistance genes in the subclinical mastitis milk from a single Chinese cow herd. *Microb. Pathog.*, 88, 29–38;
321. Wells, U.; Ravenscroft, M.; Bhandari, P.; Andrews, P.L.R. 1993. Serotonin and serotonergic drugs in emesis. In *Serotonin: From Cell Biology to Pharmacology and Therapeutics*, pp. 179–186;
322. Werckenthin, C.; Cardoso, M.; Martel, J.L.; Schwarz, S. 2001. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus* and porcine *Staphylococcus hyicus* and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet. Res.*, 32, 341–362
323. Wilson, G.J., Seo, K.S., Cartwright, R.A., Connelley, T., Chuang-Smith, O.N., Merriman, J.A., 2011. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. *PLoSPathog.* 7 (10);
324. Wilson, G.J.; Tuffs, S.W.; Wee, B.A.; Seo, K.S.; Park, N.; Connelley, T.; Guinane, C.M.; Morrison, W.I.; Fitzgerald, J.R. 2018. Bovine *Staphylococcus aureus* superantigens stimulate the entire T cell repertoire of cattle. *Infect. Immun.*, 86, 1–16;

325. Widerstrom, M., Wistrom, J., Sjostedt, A. & Mønsen, T. 2012. Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology 31(1): 7-20;
326. Wright, A.; Andrews, P.L.R.; Titball, R.W. 2000, Induction of emetic, pyrexia, and behavioral effects of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in the ferret. Infect. Immun. 2000, 68, 2386–2389;
327. Zeaki N, Susilo YB, Pregiel A, Rådström P, Schelin J. 2015b. Prophage-encoded staphylococcal enterotoxin A: regulation of production in *Staphylococcus aureus* strains representing different sea regions. Toxins (Basel). 7(12): 5359–5376;
328. Zhang, S.; Iandolo, J.J.; Stewart, G.C., 1998. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). FEMS Microbiol. Lett., 168, 227–233.
329. Zhang S, Stewart GC. 2000. Characterization of the promoter elements for the staphylococcal enterotoxin D gene. J Bacteriol. 182(8):2321–2325;
330. Zhang YQ, Ren SX, Li YX., 2003. Genome-based analysis of virulence genes in a non biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC12228). Mol. Microbiol. 49, 1577–1593;
331. Zhang, Y., Agidi, S. & LeJeune, J. 2009. Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. Journal of applied microbiology 107(4): 1375-1383;
332. Zhang, D.F., Yang, X.Y., Zhang, J., Qin, X., Huang, X., Cui, Y., 2018. Identification and characterization of two novel superantigens among *Staphylococcus aureus* complex. Int J Med Microbiol 308, 438–446;
333. Zhao, Y., Zhu, A., Tang, J., Tang, C., Chen, J., 2017. Identification and measurement of staphylococcal enterotoxin M from *Staphylococcus aureus* isolate associated with staphylococcal food poisoning. Lett. Appl. Microbiol. 65, 27–34;
334. ISO 6888: 1999 – Микробиологија на храна и добиточна храна – Хоризонтален метод за детекција на коагулаза позитивни стафилококи (*Staphylococcus aureus* и други видови);
335. Правилник за посебни барања кои се однесуваат на микробиолошките критериуми за храната (Сл. В. на Р.М. 100/2013)