

Meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* kod krava s mastitisom, prisutnost *mecA* gena i gena za virulenciju

doi: 10.15567/mljekarstvo.2015.0406

Vesna Jaki Tkalec^{1*}, Darko Majnarić¹, Jadranka Jurmanović¹, Boris Habrun²,
Željko Cvetnić², Manuela Zadravec³, Branka Šeol Martinec⁴¹Hrvatski veterinarski institut, Veterinarski zavod Križevci,
Zakmardijeva 10, 48000 Križevci, Hrvatska²Hrvatski veterinarski institut, Odjel za bakteriologiju i parazitologiju,
Savska cesta 143, 10000 Zagreb, Hrvatska³Hrvatski veterinarski institut, Odjel za veterinarsko javno zdravstvo,
Savska cesta 143, 10000 Zagreb, Hrvatska⁴Veterinarski fakultet, Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom,
Heinzelova 55, 10000 Zagreb, HrvatskaPrispjelo - Received: 22.04.2015.
Prihvaćeno - Accepted: 23.10.2015.

Sažetak

Fiziološke osobine 47 sojeva bakterije *Staphylococcus aureus* istražene su određivanjem uzgojnih osobina, te s pomoću ID32 STAPH sustava. Osjetljivost na antimikrobne lijekove određena je disk difuzijskim postupkom. Geni *nuc*, *coa*, *hla*, *hnb*, *hld*, *hlg*, *hlg-2*, *tst*, *eta*, *etb*, *lukF-PV* i *lukS-PV* i *mecA* gen dokazani su lančanom reakcijom s polimerazom, a određen je i *spa* tip. Svi pretraženi sojevi imali su gen *nuc*, *coa*, *hla* i *hld*. Kod deset sojeva (21,3 %) dokazan je gen *tst*. Gen *hlg* imala su 37 soja (78,7 %), a gene *hnb* i *hlg-2* 35 sojeva (74,5 %). Svih 47 izolata bakterije *S. aureus* bili su rezistentni na penicilin (100 %), a na oksacilin 29 (61,7 %). Rezistencija na meticilin (oksacilin) potvrđena je postojanjem *mecA* gena što je ujedno prvi potvrđeni nalaz MRSA sojeva izoliranih iz mlijeka krava u Hrvatskoj. U istraživanih MRSA sojeva dokazana je pripadnost različitim *spa* tipovima, a najučestaliji su *spa* tip t005, t011 i t521, a dokazan je i novi *spa* tip t9498.

Ključne riječi: mastitis krava, *Staphylococcus aureus*, geni za virulenciju, *mecA* gen

Uvod

Najčešći uzročnici upale vimena su stafilokoki, a posebno značenje ima vrsta *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* koja se smatra najvažnijim uzročnikom mastitisa prisutnim na većini farma mliječnih krava u cijelom svijetu (Zschöck i sur., 2005). U gospodarskom i zdravstvenom smislu mastitis predstavlja najvažniju skupinu bolesti goveda zbog šteta koje se očituju smanjenom proizvodnjom mlijeka u mliječnoj žlijezdi, prijevremenim izdvajanjem krava iz uzgoja, troškovima liječenja te neupotrebljivošću mlijeka za

prehranu i industrijsku preradu (Sommerhauser i sur., 2003). Vrsta *S. aureus* uzrokuje mastitis perakutnog, akutnog, subakutnog ili kroničnog tijeka. Klinički znakovi infekcije ovom bakterijom posljedica su djelovanja toksina i ostalih čimbenika virulencije koje tvori ova bakterija. Najvažniji rezervoar ove bakterije je zaražena mliječna žlijezda, a uzročnik se najčešće prenosi s krave na kravu rukama mužača, priborom i aparatima za mužnju (Momtaz i sur., 2010).

*Dopisni autor/Corresponding autor: e-mail: jaki.vzk@veinst.hr

Bakterija *Staphylococcus aureus* vrlo često postaje rezistentna na meticilin (MRSA, meticilin rezistentni soj *S. aureus*), a genetska podloga rezistencije posredovana je *mecA* genom koji kodira proizvodnju promijenjenog proteina PBP2a koji veže penicilin pa se ni jedan antibiotik iz skupine beta-laktamskih antibiotika ne može vezati na odgovarajuće mjesto na bakterijskoj stanici i spriječiti sintezu stanične stijenke bakterija (Kalenić i sur., 2008; Li i sur., 2009; Feßler i sur., 2010). Godine 1972. Devriese i sur. opisuju prvo izoliranje MRSA sojeva podrijetlom iz mlijeka krava s mastitisom, a u posljednjem desetljeću mnogi autori širom svijeta izvješćuju o nalazu MRSA sojeva izoliranih iz sekreta mliječne žlijezde krava s mastitisom (Kwon i sur., 2005., Moon i sur., 2007; Turutoglu i sur., 2006; Vanderhaeghen i sur., 2010; Weese, 2010). Da bi mogli usporediti različite meticilin-rezistentne sojeve pri različitim epizootijama nužno ih je tipizirati. Za genetsku tipizaciju na raspolaganju je nekoliko metoda u koje se ubraja i *spa* tipizacija, postupak koji se zasniva na određivanju broja, vrste i rasporeda ponavljajućih sekvencija unutar promjenjivog X-područja gena *spa* (gen za protein A). Ova je tipizacija važna u epizootičkim (epidemiološkim) istraživanjima.

Bakterija *S. aureus* tvori specifične čimbenike virulencije koji joj omogućavaju prodor u organizam i uzrokovanje bolesti, a ujedno suprimiraju imunosni odgovor domaćina. Ova bakterija proizvodi veliki broj egzotoksina kao što su: hemolizini (-alfa, -beta, -gama, -delta), leukocidini, ekfolijacijski toksin, toksin koji uzrokuje sindrom šoka te enterotoksine. Premda je do sada identificiran različit broj virulentnih čimbenika uključen u patogenezu mastitisa uzrokovanog bakterijom *Staphylococcus aureus*, ekspresija njihovih gena još nije u potpunosti istražena (Momtaz i sur., 2010; Monecke i sur., 2007; Nawrotek i sur., 2005). Razvoj molekularnih dijagnostičkih postupaka omogućio je dokazivanje gena odgovornih za virulenciju i rezistenciju bakterija. Ti geni smješteni su na pokretnim genetskim elementima (MGEs, *mobile genes elements*) koji omogućavaju prilagodbu bakterija i prijenos genskih informacija između bakterijskih vrsta (Malachowa i DeLeo, 2010).

Enzim koagulaza je protein odgovoran za antigenost ove bakterije, a smješten je ispod bakterijske kapsule i oslobađa se izvan bakterijske stanice (ekstracelularno). U peptidoglikanskom sloju smješte-

na je vezana koagulaza koja se ne otpušta u okolinu stanice. Obje koagulaze prevođenjem fibrinogena u fibrin stvaraju zaštitni sloj fibrina oko stafilokokne stanice koji je tako štiti od opzonizacije i fagocitoze. Gen koji kodira za tvorbu stafilokokne koagulaze, *coa*, dokazan je u svim pretraženim sojevima vrste *S. aureus* (Karahan i sur., 2009).

Stanice vrste *S. aureus* proizvode ekstracelularnu termonukleazu (TNazu) čija enzimatska aktivnost ostaje djelatna i pri temperaturi od 100 °C tijekom jednog sata, a razgrađuje deoksiribonukleinsku kiselinu. Kodirana je genom *nuc*, koji je kopiran, sekvenciran i danas se koristi u *mecA/nuc* RT-PCR-u, za rutinsko dokazivanje MRSA i identifikaciji bakterije *S. aureus*. Postupkom višestruke lančane reakcije polimerazom (*multiplex PCR*) može se razlikovati sedam različitih vrsta koagulaza-pozitivnih stafilokoka. Sasaki i sur. (2010) analizirali su slijed nukleotida gena *nuc* trinaest različitih vrsta stafilokoka i razvili specifične početnice za sedam vrsta koagulaza pozitivnih stafilokoka: *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. schleiferi*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* i *S. delphini* skupine A i B. Veličina umnoženog odsječka razlikuje se među vrstama, a kreće se od 359 pb kod vrste *S. aureus* do 1135 pb kod skupine B vrste *S. delphini*. Bakterija *S. aureus* tvori hemolizine (-alfa, -beta, -gama, -delta) koji liziraju eritrocite. Alfa-hemolizin je najčešći hemolizin vrste *S. aureus*, toksičan je za većinu stanica sisavaca, posebice eritrocite, kožu i živčano tkivo kunića. Tvorbu alfa-hemolizina kodira gen *hla* koji su Gray i Kehoe (1984) klonirali i sekvencirali. Prisustvo gena *hla* u stanici bakterije *S. aureus* ne znači istodobno dokazivanje alfa-toksina. Tvorbu toksina kontrolira regulacijski gen (*agr*), a stvara se u vrijeme kasne ekspanzionalne faze rasta bakterijske stanice. Beta-hemolizin potpuno lizira ovčje eritrocite. Glenny i Stevens prvi su 1935. godine identificirali beta-hemolizin vrste *S. aureus* (Dinges i sur., 2000) i dokazali da se hemolitička aktivnost toksina pojačava pri temperaturama inkubacije nižim od 10 °C i višim od 37 °C. Sojevi vrste *S. aureus* životinjskog podrijetla najčešće tvore beta-hemolizin kodiran genom *hlyB*, smještenim na kromosomu na 4-kb *Clal* DNA fragmentu. Gama-hemolizin stvaraju sojevi bakterijske vrste *S. aureus*, ali aktivnost ovog toksina na krvnom agaru nije vidljiva. Toksin djeluje u makroorganizmu na neutrofile i makrofage, a lizira eritrocite različitih sisavaca. Geni *hlyA*, *hlyB* i *hlyC* koji kodiraju tvorbu gama-

hemolizina smješteni su na 4,5 kb ScaI-skraćenom kromosomskom fragmentu. Ekstrakt tog kopiranog fragmenta je hemolitičan i leukotoksičan. Geni *hlg* smješteni su vrlo blizu genu *lukR* koji kodira tvorbu leukocidina (Prevost i sur., 1995). Delta-hemolizin lizira eritrocite i oštećuje stanice sisavaca, a stvara ga 97 % sojeva bakterije *S. aureus*. Aplikacijom velikih količina ovog toksina na pokusnim životinjama očituje se njegovo dermonekrotično djelovanje, a nerijetko uzrokuje i smrt životinje. Gen *hld*, koji kodira tvorbu delta-hemolizina kontrolira regulacijski gen (*agr*) i do njegove ekspresije dolazi u vrijeme kasne ekspanzionalne faze (postekspanzionalne) rasta bakterijske stanice (Dinges i sur., 2000).

Sindrom toksičnog šoka (TSS, *toxic shock syndrome*), očituje se kao akutna bolest s visokom temperaturom, hipotenzijom, a zahvaćeni su brojni organski sustavi. Uzrokuje ga stafilokokni toksin (TSST, *toxic shock syndrome toxin*), snažni superantigen koji stimulira nespecifičnu proliferaciju T-limfocita i uzrokuje izlučivanje brojnih citokina (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-2 i IFN- γ). Kodiran je genom *tst* koji ima malu sekvencu istovjetnu onoj enterotoksina i pirogenog toksina (Sharma i sur., 2000). Smješten je na 15,2 kb mobilnom genskom elementu nazvanom stafilokokni "patogeni otok" (*pathogenicity island*), na bakterijskom kromosomu.

Eksofolijacijski toksin u inficiranom tkivu djeluje proteolitički, a kodiran je genima *eta* i *etb*. PVL (*Panton-Valentine leukocidin*) je toksin specifičan za vrstu *S. aureus*, stvara ga 2-3 % sojeva. Toksin ima leukotoksičnu, ali ne i hemolitičku aktivnost koja se očituje u kombinaciji s gama-hemolizinom. Postoji šest mogućih oblika gama-hemolizina i PV leukocidina.

Geni koji kodiraju tvorbu PVL su *lukS-PV* i *lukF-PV*, otprije poznati (klasični) i novije opisani *lukE-D* i *lukM-F/PV* iz sojeva bakterije *S. aureus* izoliranih iz mlijeka krava s mastitisom (Fueyo i sur., 2005). Karakteristika koja se često veže uz MRSA sojeve humanog podrijetla (CA-MRSA izvanbolničke, community-associated) je posjedovanje gena *lukS-PV* i *lukF-PV* pa ih znanstvenici u svojim istraživanjima često koriste kao markere za MRSA sojeve (Kalenić i sur., 2008).

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti prisustvo MRSA kod krava s mastitisom i prikazati rezultate dokaza *mecA* gena i faktora virulencije, *spa* tipizacije

i osjetljivosti na antimikrobne lijekove koji se koriste u Hrvatskoj za liječenje mastitisa.

Materijali i metode

U ovom istraživanju uzorke sekreta vimena krava sa znakovima mastitisa dostavljali su djelatnici veterinarskih ambulanata s područja sjeverozapadne Hrvatske u laboratorij Veterinarskog zavoda Križevci radi provođenja bakteriološke pretrage i određivanja osjetljivosti izoliranih bakterija na antimikrobne lijekove.

Za istraživanje je tijekom rutinske bakteriološke pretrage odabrano 47 izolata stafilokoka kravljeg podrijetla. Odabrani sojevi očitovali su dvostruku hemolizu na Columbia agaru s dodatkom 5 % defibrinirane ovčje krvi i rezistenciju na penicilin u disk difuzijskom postupku.

Sposobnost tvorbe katalaze određena je pomoću 3 %-tnog vodikovog peroksida, a sposobnost tvorbe oksidaze pomoću komercijalno dostupnog reagensa (Bactident Oxidase, Merck, Njemačka). Dehidrirana krvna plazma kunića (Merck, Njemačka) korištena je za određivanje sposobnosti tvorbe koagulaze. Za određivanje sposobnosti tvorbe deoksiribonukleaze korištena je podloga DNase agar (Bio Rad, Francuska). Kao pozitivna kontrola korišten je soj *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a kao negativna kontrola soj *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 koji ne tvori deoksiribonukleazu.

Za određivanje biokemijskih osobina i identifikaciju do vrste *S. aureus* korišten je sustav za biokemijsku identifikaciju bakterija ID32 STAPH (bioMerieux, Francuska). Konačna identifikacija obavljena je pomoću računalnog programa (apiweb, bioMerieux, Francuska) nakon unosa rezultata.

Osjetljivost sojeva na antimikrobne lijekove određena je disk difuzijskim postupkom prema preporukama *Clinical and Laboratory Standards Institute*, kao i kriterije za interpretaciju rezultata zone inhibicije (CLSI M31 A3, 2008). U postupku je korišten Müller-Hintonov agar (Merck, Njemačka). Popis oznaka diskova korištenih u postupku, nazivi i količine aktivnih tvari koje sadrže, naziv proizvođača te kriteriji za procjenu nalaze se u tablici 1.

Tablica 1. Diskovi korišteni u difuzijskom postupku i kriteriji za procjenu rezultata

Oznaka	Disk			Promjer zone inhibicije (mm)		
	Aktivna tvar	Količina (μg)	Proizvođač	R	I	S
P	penicilin	10 IU	Bio-Rad	≤ 28	-	≥ 29
AMC	amoksisilin + klavulanska kiselina	30	Bio-Rad	≤ 19	-	≥ 20
CEP	cefoperazon	30	Bio-Rad	≤ 21	-	≥ 25
L	linkomicin	15	Bio-Rad	≤ 25	-	≥ 29
N	neomicin	30 IU	Oxoid	≤ 12	13-16	≥ 17
Te	tetraciklin	30	Bio-Rad	≤ 14	15-18	≥ 19
OX	oksacilin	1	BD	≤ 10	11-12	≥ 13
SXT	sulfametaksazol/trimetoprim	23,75/1,25	Bio-Rad	≤ 10	11-15	≥ 16

Tablica 2. Početnice korištene za dokazivanje prisutnosti pojedinih gena

Gen	Ime početnice	Početnice	Veličina produkta umnažanja (parovi baza)
<i>nuc</i>	nuc-1	TCAGCAAATGCATCACAACAG	255
	nuc-2	CGTAAATGCACTTGCTTCAGG	
<i>mecA</i>	mecA-1	GGGATCATAGCGTCATTATTC	527
	mecA-2	AACGATTGTGACACGATAGCC	
<i>tst</i>	TST-1	TTCACTATTTGTAAGAGTGTGACACCCACT	180
	TST-2	TACTAATGAATTTTTTTATCGTAAGCCCTT	
<i>eta</i>	mpETA-1	ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT	190
	mpETA-2	TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTCATCAAC	
<i>etb</i>	mpETB-1	CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC	612
	mpETB-2	AGTGAACTTATCTTTCTATTGAAAAACACTC	
<i>lukS-lukF</i>	PVL-1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	433
	NPVL-2	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC	
<i>hla</i>	HLA-1	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG	209
	HLA-2	CTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT	
<i>hlb</i>	HLB-1	GTGCACTTACTGACAATAGTGC	309
	HLB-2	GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	
<i>hld</i>	HLD-1	AAGAATTTTTATCTTAATTAAGGAAGGAGTG	111
	HLD-2	TTAGTGAATTTGTTCACTGTGTCGA	
<i>hlg</i>	mpHLG-1	GTCAYAGAGTCCATAATGCATTTAA	535
	mpHLG-2	CACCAAATGTATAGCCTAAAGTG	
<i>hlg-2</i>	mpHLG2-1	GACATAGAGTCCATAATGCATTYGT	390
	mpHLG2-2	ATAGTCATTAGGATTAGGTTTCACAAAG	
<i>coa</i>	Coa-1	ATATTATTAGCCGTTACAGGTG	569
	Coa-2	AATGCGCGTTTATCTTGA	

Izoliranim sojevima izdvojena je DNK na način da je bakterijska kultura pomiješana sa 100 μL destilirane vode (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen, Škotska), te zagrijavana 20 minuta pri 95 °C u termobloku (Thermomixer comfort, Eppendorf, Njemačka). Potom je sadržaj epruvete centrifugiran na 14,000 g jednu minutu (Centrifuge 5417 C, Eppendorf, Njemačka). Supernatant je korišten kao DNK kalup u PCR (engl. PCR, *Polymerase Chain Reaction*) reakcijama. Početnice korištene u ovom radu za dokazivanje prisutnosti gena, prikazane su u tablici 2 (Ikawaty i sur., 2010; Jarraud i sur., 2002).

Reakcijska mješavina za svaki uzorak sadržavala je 10 μL HotStarTaq Master Mix-a (Qiagen, Njemačka), 6 μL "RNase-free Water" (Qiagen, Njemačka), 1 μL početnice 1 i 1 μL početnice 2. U ovu otopinu dodano je 2 μL ispitivane DNK. Konačna koncentracija svake početnice (Invitrogen, Velika Britanija) u reakcijskoj smjesi bila je 0,5 μM . Umnažanje gena provedeno je s pomoću uređaja Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD) prema programu: početna denaturacija pri 95 °C kroz 15 minuta, nakon koje je uslijedilo 35 ciklusa denaturacije, vezanja početnica i produljivanje lanaca pri temperaturama od 95 °C, 55 °C i 72 °C. Produkti umnažanja dokazani su pomoću uređaja za kapilarnu elektroforezu (QIAxcel analyzer, Qiagen, Njemačka) i analizirani kompjuterskim programom BioCalculator Software (QIAxcel DNA Handbook, QIAGEN, 2011).

PCR reakcijska smjesa za *spa* tipizaciju sadržavala je 10 μL mješavine HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Njemačka), 6 μL "RNase-free Water" (Qiagen, Njemačka), 1 μL početnice *spaAF1* (GAC GAT CCT TCG GTG AGC), 1 μL početnice *spaARI* (CAG CAG TAG TGC CGT TTG C) te 2 μL DNK (Crisóstomo i sur., 2001). Nakon umnažanja, dobiveni PCR produkti obrađeni su enzimom ExoSAP-IT (Affymetrix, SAD). Slijed nukleotida određen je u tvrtki Macrogen, Južna Koreja pomoću ABI PRISM Big Dye terminator kita (Applied Biosystems, SAD). Rezultati određivanja slijeda nukleotida obrađeni su s pomoću računalnog programa Ridom Spaserver website, dostupnog na www.spaserver.ridom.de.

Rezultati i rasprava

S obzirom na to da većina europskih država, SAD, Kanada, Kina, Koreja i Japan od početka pojave MRSA sojeva prate njihovo širenje i učestalost pojavljivanja, važno je bilo započeti s praćenjem njihove pojave i širenja u Hrvatskoj. Stoga su analizirane fenotipske i genotipske značajke rezistentnih sojeva *S. aureus* izoliranih u rutinskoj dijagnostici mastitisa krava. Ukupno su pretražena 47 soja bakterije *Staphylococcus aureus*. Kolonije svih pretraživanih sojeva na krvnom agaru bile su krem ili žućkasto zlatne boje, ispupčene, sjajne i glatke. Kod svih izolata očitovala se dvostruka hemoliza na Columbia agaru s dodatkom 5 % defibrinirane ovčje krvi (Merck, Njemačka) nakon inkubacije tijekom 24 h pri 37 °C u aerobnim uvjetima. Svi sojevi bili su gram-pozitivni koki u grozdastim nakupinama, katalaza-pozitivni i oksidaza-negativni i tvorili su vezanu koagulazu. Sposobnost koagulacije plazme kunića imaju svi sojevi vrste *S. aureus*, sojevi *S. intermedius* skupine koji tvore samo slobodnu koagulazu (Zubeir i sur., 2007) i jedan soj vrste *S. epidermidis* (Jurmanović i sur., 2003).

Svi pretraživani sojevi tvorili su deoksiribonukleazu na DNase agaru (Bio Rad, Francuska) što odgovara podacima iz literature. Koagulaza-pozitivni sojevi tvore deoksiribonukleazu za razliku od većine koagulaza-negativnih sojeva (82 %). Slabiju aktivnost deoksiribonukleaze iskazuju vrste *S. hyicus*, *S. chromogenes*, *S. lentus* i *S. carnosus* nakon 24 satne inkubacije, a nakon produžene inkubacije (48 sati) ona se pojačava. Sojevi vrsta *S. capitis*, *S. galinarum* i *S. simulans* imaju vrlo slabu izraženu aktivnost toga enzima (Quinn i sur., 2000).

ID32 STAPH sustavom svi sojevi identificirani su kao *Staphylococcus aureus*. Kontrolni referentni soj vrste *S. aureus* ATCC 29213 identificiran je identifikacijskim indeksom (Id) 99,8 %. Kod svih pretraženih sojeva statistička vjerojatnost ispravne identifikacije bila je 99,8 %. S obzirom na to da su u ovom radu istražene biokemijske osobine sojeva *S. aureus* kojima je dokazan gen *mecA* i onih kojima nije dokazan, može se zaključiti da između spomenutih sojeva nema fenotipskih razlika.

Lančanom reakcijom polimerazom dokazana je prisutnost gena *nuc* čime je istodobno potvrđena sposobnost tvorbe enzima deoksiribonukleaze i pripadnost vrsti *S. aureus*. Svih 47 sojeva posjeduje gen *coa* koji kodira tvorbu stafilokokne koagulaze. Da svi sojevi vrste *S. aureus* posjeduju gen *coa* dokazali su i Karahan i sur. (2009).

Tablica 3. Profil rezistencije, *spa* tipovi meticilin-rezistentnih sojeva *Staphylococcus aureus*, raspored ponavljajućih sekvencija i slijeda nukleotida (baza *spa* tipova, dostupno na www.spaserver.ridom.de)

Oznaka soja	MRSA	<i>Spa</i> tip	Raspored ponavljajućih sekvencija i slijeda nukleotida
60	P, AMC, CEP, OX, N, Te	t005	26-23-13-23-31-05-17-25-17-25-16-28 (Kreiswirth IDs: TJEJNCMOMOKR)
1563	P, AMC, CEP, OX, L, N, Te	t091	07-23-21-17-34-12-23-02-12-23 (Kreiswirth IDs: UJFMBGJAGJ)
9935	P, AMC, CEP, OX, L, N, Te	t011	08-16-02-25-34-24-25 (Kreiswirth IDs: XKAQBQO)
1924/1	P, AMC, CEP, OX, L, N, Te	t521	07-23-12-21-17-34-34-34-34-33-34 (Kreiswirth IDs: UJGFMBBBBBPB)
13088	P, OX	t4078	08-02-16-13-17-34-16-34 (Kreiswirth IDs: XAKEMBKB)
10040	P, AMC, CEP, OX, L, N, Te	t1236	26-23-12-21-17-34-34-34-33-34 (Kreiswirth IDs: TJGFMBBBBBPB)
6614/2	P, AMC, CEP, OX, L, N, Te	t073	08-16-02-16-13-17-34-16-34 (Kreiswirth IDs: XKAKEMBKB)
6138/5	P, AMC, CEP, OX, L, N, Te	t005	26-23-13-23-31-05-17-25-17-25-16-28 (Kreiswirth IDs: TJEJNCMOMOKR)
9984/2	P, OX, N, Te	9498	26-23-12-12-34-34-34-34-33-34 (Kreiswirth IDs: TJGGBBBBBPB)
1553/1	P, AMC, CEP, OX, N, Te	t4460	08-16-02-16-17-34-16-34 (Kreiswirth IDs: XKAKMBKB)
10609/2	P, AMC, CEP, OX, N, Te	t521	07-23-12-21-17-34-34-34-34-33-34 (Kreiswirth IDs: UJGFMBBBBBPB)
8427/3	P, AMC, CEP, OX, L, N, Te	t011	08-16-02-25-34-24-25 (Kreiswirth IDs: XKAQBQO)
9783	P, AMC, CEP, OX, L, N, Te	t015	08-16-02-16-34-13-17-34-16-34 (Kreiswirth IDs: XKAKBEMBKB)
8742/5	P, AMC, CEP, OX, L, N, Te	t527	07-23-12-21-17-34-34-34-34-34-33-34 (Kreiswirth IDs: UJGFMBBBBBPB)
1477/79	P, AMC, CEP, OX, Te	t728	08-16-34-16-34 (Kreiswirth IDs: XKBKB)
1637/62	P, AMC, OX, N	t091	07-23-21-17-34-12-23-02-12-23 (Kreiswirth IDs: UJFMBGJAGJ)
299	P, CEP, OX	t073	08-16-02-16-13-17-34-16-34 (Kreiswirth IDs: XKAKEMBKB)
2088/7	P, OX	t9417	15-17-34-34-34-34-33-34 (Kreiswirth IDs: WMBBBBBBPB)
283	P, AMC, OX	t005	26-23-13-23-31-05-17-25-17-25-16-28 (Kreiswirth IDs: TJEJNCMOMOKR)
6138/4	P, CEP, OX	t005	26-23-13-23-31-05-17-25-17-25-16-28 (Kreiswirth IDs: TJEJNCMOMOKR)
68	P, OX, Te	t164	07-06-17-21-34-34-22-34 (Kreiswirth IDs: UG2MFBBLB)
8218/4	P, OX, L, Te	t011	08-16-02-25-34-24-25 (Kreiswirth IDs: XKAQBQO)
1607/104	P, OX	t521	07-23-12-21-17-34-34-34-34-33-34 (Kreiswirth IDs: UJGFMBBBBBPB)

1760/5	P, OX	t337	07-16-23-23-02-12-23-02-34 (Kreiswirth IDs: UKJJAGJAB)
8885/23	P, OX, N, Te	t164	07-06-17-21-34-34-22-34 (Kreiswirth IDs: UG2MFBBLB)
1647/1	P, OX	t5618	08-13-17-23-18-17 (Kreiswirth Ids: XEMJH2M)
9934	P, OX	t011	08-16-02-25-34-24-25 (Kreiswirth Ids: XKAOBQO)
1173	P, OX	t005	26-23-13-23-31-05-17-25-17-25-16-28 (Kreiswirth Ids: TJEJNCMOMOKR)
1214	P, OX	t3124	26-23-12-21-17-34-34-34-34-34-33-34 (Kreiswirth IDs: TJGFMBBBBBBPB)

U ovom istraživanju svi pretraženi sojevi posjeduju gene *hla* i *hld*, dok je od 47 pretraženih izolata gen *hlg* imalo 37 (78,7 %) izolata, a gene *hnb* i *hlg-2* 35 izolata (74,5 %). Slične rezultate objavili su Haveri i sur. (2007) koji su dokazali da 76,7 % do 97,4 % sojeva bakterije *S. aureus* izoliranih iz sekreta mliječne žlijezde kod mastitisa ima gene *hla*, *hnb*, *hld*, *hlg* i *hlg-2* koji kodiraju tvorbu hemolizina. Monecke i sur. (2007) su pretražili 128 izolata sojeva *S. aureus* izoliranih iz mlijeka krava s mastitisom i dokazali gen *hnb* u 82 % sojeva, što je nešto viši postotak od onog koji je dobiven u ovom radu (74,5 %), ali je u ovom radu istražen manji broj izolata. Gen *tst* dokazan je kod 10 od ukupno 47 pretraženih izolata (21,3 %). Istraživanje provedeno u Turskoj na 92 MRSA izolata, izoliranih iz mlijeka krava sa subkliničkim mastitisom, gen *tst* dokazan je u 3,3 % izolata (Karahani i sur., 2009). Ikawaty i sur. (2010) gen *tst* dokazuju sporadično, dok gene *eta* i *etb* nisu dokazali kod izolata bakterije *S. aureus*, izoliranih iz mlijeka krava s mastitisom, što odgovara rezultatima ovog istraživanja. Kod niti jednog od 47 pretraženih izolata nisu dokazani geni *eta*, *etb*, *LukS-PV* i *lukF-PV*. Geni odgovorni za tvorbu leukocidina, novije opisani *lukE-D* i *lukM-F/PV* učestalije se javljaju u sojeva *S. aureus* izoliranih iz mlijeka krava s mastitisom (Fueyo i sur., 2005). Velika učestalost prisutnosti gena *lukE-D* dokazana je u Finskoj u 96,6 % od ukupno 161 izolata bakterije *S. aureus* iz mlijeka krava s mastitisom (Haveri i sur., 2007), dok su geni *lukS-PV* i *lukF-PV* iz sojeva *S. aureus* u krava dokazani u Koreji (Kwon i sur., 2005), Alžiru (Benhamed i Kihal, 2013) i Srbiji (Pajić i sur., 2014).

Gen *mecA* dokazan je kod 29 (61,7 %) od ukupno 47 pretraženih sojeva, a potvrđeno je da se radi o meticilin-rezistentnim sojevima.

O povezanosti meticilin-rezistentnih sojeva i čimbenika virulentncije bakterije *S. aureus* u životinjskih izolata ima malo literaturnih podataka. MRSA sojevi razlikuju se epidemiološki i klinički, a buduća istraživanja trebala bi potvrditi razlikuju li se i po učestalosti ekspresije čimbenika virulencije. Do sada je poznato da stafilokokna kromosomska kasetta *SCCmec* nosi gene koji kodiraju za rezistenciju na antibiotike, ali ne i gene koji kodiraju za čimbenike virulencije (Ito i sur., 2001).

Multirezistentnost je tipična osobina većine meticilin-rezistentnih sojeva *S. aureus* (tablica 3). To je potvrđeno i u ovom istraživanju. Svi pretraženi sojevi bili su rezistentni na penicilin (100 %). Od 29 meticilin-rezistentnih sojeva na amoksicilin s klavulanskom kiselinom bila su rezistentna 15 (51,7 %), a osjetljiva 14 sojeva (48,3 %). Podatak da su ti sojevi bili osjetljivi na amoksicilin s klavulanskom kiselinom ne isključuje rezistenciju na meticilin jer je poznato da MRSA sojevi mogu *in vitro* biti osjetljivi na taj antibiotik iako posjeduju gen *mecA*. Na cefoperazon, neomicin i tetraciklin rezistentno je bilo 15 sojeva (51,7 %), a na linkomicin 10 sojeva (34,5 %) MRSA. Svi meticilin-rezistentni sojevi bili su osjetljivi na sulfametaksazol/trimetoprim. Pretpostavka je da je razlog tome to što se taj lijek ne koristi često ili se uopće ne koristi u terapiji mastitisa u krava u Hrvatskoj.

Slične rezultate dobili su Huber i sur. (2010) u Švicarskoj, od 16 sojeva izoliranih iz mlijeka krava s mastitisom, svi su bili rezistentni na beta-laktamske antibiotike (penicilin, ampicilin, cefoksitin, oksacilin) i tetraciklin. Karakteristično za prvo dokazivanje *mecA* gena u Belgiji kod sojeva *S. aureus* izoliranih iz mlijeka krava s mastitisom je da su svi sojevi bili rezistentni na tetraciklin (Wanderhaeghen i sur., 2010).

Rezultati *spa* tipizacije pretraživanih 29 izolata (tablica 3) pokazali su da u Hrvatskoj *mecA* pozitivni sojevi *S. aureus* izoliranih iz mliječne žlijezde krava s mastitisom pripadaju *spa* tipu t005 u pet izolata, *spa* tipu t011 u četiri izolata, tri soja *spa* tipu t521, po dva soja *spa* tipu t091, t073 i t164, dok su ostali *spa* tipovi t4078, t1236, t4460, t015, t527, t728, t9417, t337, t3124 i t5618 dokazani pojedinačno. Jedan izolat nije pripadao ni jednom do sad poznatom *spa* tipu. Određen mu je raspored ponavljajućih sekvenci i dodijeljena oznaka *spa* tip t9498.

U istraživanjima MRSA sojeva izoliranih iz mliječne žlijezde krava s mastitisom provedenih u Njemačkoj dokazan je *spa* tip t011, u Turskoj *spa* tipovi t030 i t0190, u Belgiji *spa* t034 i 011, u Danskoj *spa* tipovi t518, t524 i t529 i u Mađarskoj *spa* tipovi t0567 i *spa* t127 (Hasman i sur., 2010; Huber i sur., 2010; Spohr i sur., 2011). U istraživanju provedenom u Mađarskoj od godine 2001. do 2004., u 135 MRSA izolata humanog podrijetla najučestaliji je bio *spa* tip t127 kojeg povezuju s onim izoliranih iz krava (Juhász-Kaszanyitzky i sur., 2007).

Rezultati *spa* tipizacije pojednostavljaju usporedbu rezultata između laboratorija pa je uočeno da je *spa* tip t011 kojem su pripadala četiri hrvatska izolata dokazan u Njemačkoj i Belgiji. Na taj način može se pratiti širenje MRSA sojeva u stadima mliječnih krava, drugih životinja i ljudi. Ne treba zanemariti činjenicu da su osobe koje skrbe o životinjama i veterinari nerijetko kliconoše MRSA sojeva i da mogu biti izvor infekcije za svoje pacijente. Kolonizacija MRSA sojevima predstavlja potencijalnu opasnost infekcije ostalih životinjskih vrsta i ljudi, a ujedno je "rezervoar" gena odgovornih za rezistenciju koji se vrlo lako i brzo mogu prenijeti na druge, nesrodne bakterijske vrste (Weese i sur., 2006).

Zaključci

Može se zaključiti da je širenje MRSA sojeva podrijetlom iz mlijeka krava prisutno i u Hrvatskoj. U istraživanih MRSA sojeva dokazana je pripadnost različitim *spa* tipovima, a najučestaliji su *spa* tip t005, t011 i t521. Posebno zabrinjava činjenica da je veliki broj MRSA sojeva u Hrvatskoj otporan na većinu antimikrobnih lijekova koji se koriste u liječenju mastitisa. Da bi spriječili daljnje širenje MRSA sojeva u mliječnih krava neophodno je kontinuirano pratiti

pojavu novih izolata i njihovu rezistenciju. Također, nužno je poučavati vlasnike životinja kao i sve one koji skrbe o kravama o važnosti opravdane i razumne uporabe antimikrobnih lijekova kako bi se spriječila pojava novih rezistentnih sojeva.

Iz svega navedenog nepobitno je da bakterija *Staphylococcus aureus*, zbog svojih fenotipskih i genotipskih osobina, ima veliko značenje u etiologiji upala mliječne žlijezde.

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in cows with mastitis, the presence of the mecA gene and the gene for virulence

Abstract

The physiological properties of 47 *Staphylococcus aureus* strains were investigated. The test strains were grown on bacteriological media and identified by the ID32 STAF system for biochemical identification of bacteria. Sensitivity to antimicrobial agents was performed by the disc diffusion method. The *nuc* gene and the virulence factors *coa*, *hla*, *hnb*, *hld*, *hlg*, *hlg-2*, *tst*, *eta*, *etb*, *lukF-PV* and *lukS-PV* and *mecA* gene were detected by the polymerase chain reaction. Furthermore, the *spa* type of the studied isolates was also set. According to the obtained results, all strains had the *nuc*, *coa*, *hla* and *hld* gene. Ten strains (21.3 %) had also the *tst* gene, while 37 strains (78.7 %) had the *hlg* gene and 35 strains (74.5 %) had the *hnb* and *hlg-2* genes. All of the investigated *S. aureus* isolates were penicillin resistant (100 %), with 29 strains which were also resistant to oxacillin (61.7 %). Methicillin (oxacillin) resistance was detected by the *mecA* gene detection, which is also the first MRSA result from the secretion samples of cows' mammary glands in Croatia. The researched MRSA strains proved to belong to different *spa* types, and the most common were *spa* types t005, t011 and t521, and a new *spa* type t9498 was detected.

Key words: mastitic cows, *Staphylococcus aureus*, virulence genes, *mecA* gene

Literatura

- Anonymous (2008): Performance standards for antimicrobial disc and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard-third edition, CLSI document M31-A3. Wayne, PA: Clinical and laboratory standards institute, 2008.
- Benhamed, N., Kihal, M. (2013): Biodiversity of molecular profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in West Algeria, *J. Bacteriol. Res.* 5, 41-45. doi: 10.5897/JBR2012.0079
- Crisóstomo, M.I., Westh, H., Tomasz, A., Chung, M., Oliveira D.C., De Lencastre, H. (2001): The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14, 9865-9870. doi: 10.1073/pnas.161272898
- Devriese, L.A., Van Damme, L.R., Fameree, L. (1972): Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases, *Zentralbl Veterinarmed. B.* 19, 598-605. doi: 10.1111/j.1439-0450.1972.tb00439.x
- Dinges, M.M., Orwin, M.P., Schlievert, P.M. (2000): Exotoxins of *Staphylococcus aureus*, *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 16-34. doi: 10.1128/CMR.13.1.16-34.2000
- Feßler, A., Scott, C., Kadlec, K., Ehricht, R., Monnecke, S., Schwarz, S. (2010): Characterization of *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis, *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 619-625. doi: 10.1093/jac/dkq021
- Fueyo, J.M., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R., Muniz, J., Alvarez, M.A., Martin, M.C. (2005): Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles, *J. Clin. Microbiol.* 43, 1278-1284. doi: 10.1128/JCM.43.3.1278-1284.2005
- Gray, G.S., Kehoe, M. (1984): Primary sequence of the a-toxin gene from *Staphylococcus aureus*, *Infect. Immun.* 46, 615-618.
- Hasman, H., Moodley, A., Guardabassi, L., Stegger, M., Skov, R.L., Aarestrup, F.M. (2010): spa type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry, *Vet. Microbiol.* 141, 326-331. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.025
- Haveri, M., Roslöf, A., Rantala, L., Pyörälä, S. (2007): Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics, *J. Appl. Microbiol.* 103, 993-1000. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03356.x
- Huber, H., Koller, S., Giezendanner, N., Stephan, R., Zweifel, C. (2010): Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009., *Euro Surveill.* 15 (16), pii=19542.
- Ikawaty, R., Brouwer, E.C., Van Duijkeren, E., Mevius, D., Verhoef, J., Fluit, A.C. (2010): Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates in The Netherlands, *Int. J. Dairy Sci.* 5, 60-70. doi: 10.3923/ijds.2010.60.70
- Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., Hiramatsu, K. (2001): Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1323-1336. doi: 10.1128/AAC.45.5.1323-1336.2001
- Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J., Vandenesch, F. (2002): Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease, *Infec. And Immun.* 70, 631-641. doi: 10.1128/IAI.70.2.631-641.2002
- Juhász-Kaszanyitzky, E., Jánosi, S., Somogy, P. (2007): MRSA transmission between cows and humans, *Emerg. Inf. Dis.* 13, 630-632. doi: 10.3201/eid1304.060833
- Jurmanović, J., Majnarić, D., Naglič, T., Jaki, V. (2003): Infekcije vimen a i broj somatskih stanica u stadima mliječnih krava na području sjeverozapadne Hrvatske, IV. Srednjoeuropski Bujatrički kongres, Lovran, Zbornik radova, 119-124.
- Kalenić, S., Payerl Pal, M., Vlahović Palčevski, V., Horvatić, J., Meštović, T., Baršić, B., Stamenić, V., Aleraj, B., Buljan, M., Gržalja, N., Burcar, I., Korušić, A., Vučić, M., Čivljak, R., Stančić, M., Budimir, A. (2008): Smjernice za prevenciju, kontrolu i liječenje infekcija koje uzrokuje meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Liječ. Vjesn.* 130, 7-32.
- Karahan, M., Açıık, Mn., Cetinkaya, B. (2009): Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey, *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 1029-1035. doi: 10.1089/fpd.2009.0304
- Kwon, N.H., Park, K.T., Moon, J.S. (2005): Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC*mec* subtype Ivg isolated from bovine milk in Korea, *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 624-632. doi: 10.1093/jac/dki306
- Li, J., Zhou, H., Yuan, L., He, T., Hu, S. (2009): Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang province, China, *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 10, 753-760. doi: 10.1631/jzus.B0920072
- Malchowa, N., DeLeo, F.R. (2010): Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*, *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3057-3071. doi: 10.1007/s00018-010-0389-4
- Momtaz, H., Rahimi, E., Tajbakhsh, E. (2010): Detection of some virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis in Iran, *Afr. J. Biotechnol.* 9, 3753-3758.

23. Monecke, S., Kuhnert, P., Hotzel, H., Slickers, P., Ehrlich, R. (2007): Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle, *Vet. Microbiol.* 125, 128-140. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.05.016
24. Moon, J.S., Lee, A.R., Kang, H.M., Lee, E.S., Kim, M.N., Paik, Y.H., Park, Y.H., Yoo, Y.S., Koo, H.C. (2007): Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea, *J. Dairy Sci* 90, 1176-1185. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(07)71604-1
25. Nawrotek, P., Borkowski, P., Boron-Kaczmarek, A., Furowicz, A.J. (2005): The characteristics of staphylococcal enterotoxins produced by strains isolated from mastitic cows, including epidemiological aspects, *Przegl. Epidemiol.* 59, 891-902.
26. Pajić, J.M., Rašić, B.Z., Velebit, M.B., Boboš, F.S., Mihajlović-Ukropina, M.M., Radinović, Ž.M., Galfi, L.A., Petković, M.J., Trojačanec, I.S. (2014): The prevalence of methicillin-resistance and Panton-Valentine leukocidin synthesis genes in *Staphylococcus aureus* isolates of bovine and human origin, *Vet. arhiv* 84, 205-214.
27. Prevost, G., Cribier, B., Couppie, P., Petiau, P., Supersac, G., Finck-Barbancon, V., Monteil, H., Piemont, Y. (1995): Panton-Valentine leucocidin and gamma hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities, *Infect. Immun.* 60, 4121-4129.
28. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R. (2000): *Clinical Veterinary Microbiology*, M. Wolfe, London.
29. Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtuska, M., Hirota, S., Kawakami, T., Fukata, T., Hiramatsu, K. (2010): Multiplex PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci, *J. Clin. Microbiol.* 48, 765-769. doi: 10.1128/JCM.01232-09
30. Sharma, N.K., Ress, C.E.D., Dodd, C.E.R. (2000): Development of a single-reaction multiplex-PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains, *Appl. Environ. Microb.* 66, 1347-1353. doi: 10.1128/AEM.66.4.1347-1353.2000
31. Sommerhauser, J., Kloppert, B., Wolter, W., Zschöck, M., Sobiraj, A., Failing, K. (2003): The epidemiology of *Staphylococcus aureus* from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme, *Vet. Microbiol.* 96, 91-102. doi: 10.1016/S0378-1135(03)00204-9
32. Spohr, M., Rau, J., Friedrich, A., Klittich, G., Fetsch, A., Guerra, B., Hammerl, J.A., Tenhagen, B.A. (2011): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in south west Germany, *Zoonoses Public Health* 58, 252-261. doi: 10.1111/j.1863-2378.2010.01344.x
33. Turutoglu, H., Ercelik, S., Ozturk, D. (2006): Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis, *Bull. Vet. Ins. Pulawy* 50, 41-45.
34. Vanderhaeghen, W., Cerpentier, T., Adriaensen, C., Vicca, J., Hermans, K., Butaye, P. (2010): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows, *Vet. Microbiol.* 144, 166-171. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.044
35. Weese, J.S., Dick, H., Willey, B., McGeer, A., Kreiswirth, B., Innis, B., Low, D. (2006): Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household, *Vet. Microbiol.* 115, 148-155. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.01.004
36. Weese, J.S. (2010): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Animals, *Ilar. J.* 51, 233-244. doi: 10.1093/ilar.51.3.233
37. Zschöck, M., Kloppert, B., Wolter, W., Hamann, H.P., Lämmler, C.H. (2005): Pattern of enterotoxin genes seg, seh, sei and sej positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis, *Vet. Microbiol.* 108, 243-249. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.02.012
38. Zubeir, I.E., Kanbar, T., Alber, J., Lämmler, C., Akineden, O., Weiss, R., Zschock, M. (2007): Phenotypic and genotypic characteristics of methicillin/oxacillin resistant *Staphylococcus intermedius* isolated from clinical specimens during routine veterinary microbiological examinations, *Vet. Microbiol.* 121, 170-176. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.11.014