

***Staphylococcus aureus* törzsek összehasonlító elemzése molekuláris mikrobiológiai módszerekkel**

Peles Ferenc¹ – Martin Wagner² – Keresztúri Péter¹ – Béri Béla³ – Szabó András¹

Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum,
Mezőgazdaságtudományi Kar,

¹Élelmiszertudományi, Minőségbiztosítási és Mikrobiológiai
Intézet, Debrecen

³Állattenyésztéstudományi Intézet, Debrecen

²Bécsi Állatorvosi Egyetem, Tejhigiéniái, Tejtechnológiai és
Élelmiszertudományi Intézet, Bécs, Ausztria
pelesf@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A Staphylococcus aureus, a tejtermelő és feldolgozó üzemek számára nagy jelentőséggel bír. A szubklinikai tőgygyulladások jelentős részét ez a baktérium okozza, és a fejés során az elegytejbe is bekerülhet. Egyes típusai a hőstabil enterotoxin (SE) termelés eredményeként élelmiszermérgezést idézhetnek elő.

*A vizsgálat célja az volt, hogy meghatározzuk két tejtermelő gazdaság elegytejében a *S. aureus* szám alakulását, továbbá a különféle mintákból (elegytejből, tőgygyulladásban szenvedő állatok tőgygyedtejéből és a környezetből) izolált *S. aureus* törzsek enterotoxin termelő képességét, genetikai rokonságát (pulzotípus) és antibiotikum érzékenységét.*

*Az eredmények azt mutatták, hogy a két gazdaság elegytejének az átlag *S. aureus* száma szignifikánsan különbözött ($P < 0,05$) egymástól. Az epidemiológiai vizsgálatok elvégzéséhez tizennégy *S. aureus* izolátumot (elegytejből ötöt, tőgygyedtejből kilencet) választottunk ki. A környezeti minták vizsgálata során nem fordult elő *S. aureus* által szennyezett minta. Az enterotoxin termelő képesség meghatározása során azt tapasztaltuk, hogy a tizennégy izolátum közül három (21,4%) hordozott SE gént. Két izolátum egy gént (seb), egy izolátum pedig két gént is hordozott (seg és sei). A tizennégy izolátum, a genetikai rokonsági kapcsolat vizsgálata alapján, három pulzotípusba és két altípusba volt sorolható 86%-os azonossági szint esetén. Az elegytejékből származó izolátumokat ($n=5$) két pulzotípusba (A, C) és egy altípusba (C1) lehetett elkülöníteni. A beteg állatok tőgygyedtejéből származó izolátumok ($n=9$) három pulzotípusba (A, B, C) és két altípusba (A1, C1) tartoztak. Az előforduló pulzotípusok elemzése során azt tapasztaltuk, hogy genetikai kapcsolat van az elegytejben és a tőgygyedtejben talált *S. aureus* izolátumok között. Ez arra utal, hogy azokban a gazdaságokban, ahol nagyszámú szubklinikai tőgygyulladásban szenvedő állat fordul elő, az elegytej *S. aureus* baktériummal történő szennyeződésének fő forrásai a fertőzött tőgygyedek. Az antibiotikum rezisztencia vizsgálat során azt az eredményt kaptuk, hogy a vizsgálatokba bevont összes törzs érzékeny volt a methicillinre, cefoxitinre, lincomycinre, tetracyclinre, erythromycinre és sulfamethoxazole/trimethoprimre. A tizennégy törzs közül tizenhárom (A és C pulzotípus, A1 és C1 altípus) volt penicillin rezisztens és csak egy volt érzékeny (B pulzotípus) az összes antibiotikummal szemben.*

Kulcsszavak: *nyers tej, Staphylococcus aureus szám, enterotoxinok, pulzáló erőterű gélelektroforézis, antibiotikum rezisztencia*

SUMMARY

Staphylococcus aureus is a very important pathogen for dairy farms and milk processing plants. Subclinical mastitis is often caused by this species, and it can contaminate bulk tank milk when milking cows are suffering from mastitis. Additionally, thermostable enterotoxins (SE) produced by some types of this bacterium can cause food poisoning.

*The aim of our research was to examine the number of *S. aureus* in bulk tank milk in two dairy farms and the enterotoxin-producing ability, genetic relation (pulsotype) and antibiotic resistance of *S. aureus* strains from different sources (bulk tank milk, udder quarter milk and environment).*

*The results show that the mean number of *S. aureus* of bulk tank milk of two farms significantly differed ($P < 0,05$). Fourteen isolates were selected for further molecular genetic studies (five isolates were from bulk tank milk and nine isolates were from udder quarter milk). *S. aureus* was not recovered from the environmental samples. Three of the fourteen isolates (21.4%) tested by multiplex PCR were positive for SE genes. Two isolates carried one gene (seb) and one isolate carried two genes (seg and sei). The fourteen strains were classified into three pulsotypes and two subtypes at 86% similarity level. Isolates from bulk tank milk ($n=5$), were divided into 2 pulsotypes (A, C) and one subtype (C1). The isolates from udder quarter milk ($n=9$) belonged to three different pulsotypes (A, B, C) and two subtypes (A1, C1). The distribution of pulsotypes in the present study revealed genetic relationship between *S. aureus* isolated from udder quarter milk and bulk tank milk. This could be explained by the fact that in farms with a high number of infected cows, these cows could represent the main source of contamination. The results of the antibiotic resistance investigations show, that all strains were susceptible to methicillin, cefoxitin, lincomycin, tetracycline, erythromycin and sulfamethoxazole/trimethoprim. Thirteen out of fourteen strains were resistant to penicillin (A and C pulsotypes, A1 and C1 subtypes) and just one isolate was susceptible (B pulsotype) to all antibiotics tested.*

Keywords: *raw milk, Staphylococcus aureus count, enterotoxins, pulsed-field gel electrophoresis, antibiotic resistance*

BEVEZETÉS

A *Staphylococcus aureus*, a tejtermelő és feldolgozó üzemek számára nagy jelentőséggel bír. A szubklinikai tőgygyulladások jelentős részét ez a baktérium okozza, és a fejés során az elegytejbe is bekerülhet. Egyes típusai hőstabil enterotoxinokat (SE) termelnek, melynek eredményeként élelmiszermérgezést idézhetnek elő.

A staphylococcusok Gram-pozitív, gömb alakú baktériumok (kokkusok). Jól alkalmazkodó, igen elterjedt baktériumok, amit az is alátámaszt, hogy megtalálhatók az emberek és az állatok bőrén, a felső légutakban, a nemi szervek és a húgyutak nyálkahártyáján, az emésztőcsatornában, a levegőben, a porban, a szennyvízben, a természetes vizekben, a talajban, a tejben, a húspanban és más élelmiszerekben. Az emberek és az állatok az elsődleges hordozók. A staphylococcusok jelen vannak az orrüregben és a garatban, és az egészséges egyéneknél a hajon és a bőrfelületen is (Tuboly, 1998).

A nyers tej számos humán fertőzés forrása lehet. Számos olyan ételmérgezős megbetegedést írtak már le, amit mikroorganizmusokkal fertőzött nyers tej, pasztörizált tej vagy tejtermékek idéztek elő (MacDonald et al., 1985; Bryant et al., 1988; Maguire et al., 1992).

A *S. aureus* növekedési melléktermékként különféle hőstabil enterotoxinokat is termelhet (Orwin et al., 2001; Letertre et al., 2003), ami által ételmérgezést idézhet elő (Balaban és Rasooly, 2000; Dinges et al., 2000). Az ételmérgezés esetén a tünetek (hányinger, hányás, hasmenés) hamar jelentkeznek (Jablonski és Bohach, 1997).

A *S. aureus* világszerte nagyon gyakran okoz tőgygyulladást a tejelő marháknál (Cardoso et al., 1999; Akineden et al., 2001; Stephan et al., 2001), és az egyik fő szennyezője a nyers tejnek (Asperger, 1994). A szennyeződés lehet endogén eredetű, amikor a fertőzött állat tőgyéből fejés során kerül a tejbe (Bryan, 1983), illetve exogén eredetű, amely esetben fertőzött személyek vagy a környezet idézi elő (Brisabois et al., 1997). A tej bakteriális szennyeződésének forrása lehet a szubklinikai tőgygyulladásban szenvedő teheneken kívül a piszkos tőgy és a nem megfelelő tisztaságú fejőberendezés is (Thomas et al., 1966; Hogan et al., 1989).

Néhány eltérő méretű, valamint különféle tartás- és fejéstechnológiát alkalmazó Hajdú-Bihar megyei tejtermelő gazdaság elegytejében a *S. aureus* szám alakulását korábbi munkánk során már publikáltuk (Peles et al., 2006).

A vizsgálat célja az volt, hogy meghatározzuk két tejtermelő gazdaság elegytejében a *S. aureus* szám alakulását, továbbá a különféle mintákból (elegytejből, tőgygyulladásban szenvedő állatok tőgygyulladásából és a környezetből) izolált *S. aureus* törzsek enterotoxin termelő képességét, genetikai rokonságát (pulzotípus) és antibiotikum érzékenységét.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatokba bevont gazdaságok

A vizsgálatokba két (G1, G2) Hajdú-Bihar megyei tejtermelő gazdaságot vontunk be. A gazdaságok elegytejének a *S. aureus* számát 2005. június és 2006. augusztus között négy alkalommal határoztuk meg (2005. nyár, 2005. ősz, 2005-2006. tél, 2006. nyár). A gazdaságok kérésére a gazdaságok azonosítására szolgáló adatokat (név, cím, azonosító kód) nem publikáltuk. Mind a két gazdaságban kötetlen mélyalmos tartásmódot és fejőházi fejést alkalmaznak, az éves termelt tej mennyiség pedig egymillió liter felett van.

Bakteriológiai vizsgálatok

A gazdaságok elegytejéből, a tőgygyulladásban szenvedő állatok tőgygyulladásából, valamint a fejőberendezés különböző felületeiről is gyűjtöttünk mintákat. A bakteriológiai vizsgálatokat a Debreceni Egyetem ATC Mezőgazdasági Mikrobiológiai Laboratóriumában, az epidemiológiai vizsgálatokat pedig Bécsben az Állatorvosi Egyetem Tejhigiéniái, Tejtechnológiai és Élelmiszertudományi Intézetében végeztük.

Az elegytej mintákat a fejés befejezése után, kb. 10-15 perces keverés után vettük steril körülmények között (steril és zárható edénybe). Az elegytej *S. aureus* számának a meghatározásához az **MSZ EN ISO 6888 – 1:99** nemzetközi szabványt használtuk. A szabványt követve tojássárgája tellurit emulzióval kiegészített Baird Parker agart használtunk, a megerősítő vizsgálatokat pedig koaguláz próbával végeztük. Az elegytejek *S. aureus* számának az értékelése az **1/2003. (I. 8.) FVM-ESzCsM** együttes rendelete alapján történt.

A fejőberendezés és a tejjűjtő tartály fejés előtti tisztaságának a vizsgálata (mosás hatékonysága) céljából, steril mintavételi tamponnal közvetlenül a fejés megkezdése előtt mintákat gyűjtöttünk a tejjel érintkező felületekről (a fejőgumik, a tejjűjtő tartályok és a tartály kivezető csövek felülete), valamint a fejőház csempéjéről.

A beteg állatok tőgygyulladásából származó tejmintákban, valamint a felületekről gyűjtött tamponmintákban esetlegesen előforduló *S. aureus* meghatározásához Columbia véres agart és Baird Parker agart használtunk. A megerősítő vizsgálatokhoz koaguláz próbát alkalmaztunk.

Az epidemiológiai vizsgálatok elvégzéséhez elegytejből öt, tőgygyulladásból kilenc *S. aureus* izolátumot választottunk ki, melyeket a 2006. évi januári vizsgálatok során gyűjtöttünk.

Az adatok statisztikai elemzését GraphPad Prism 3.02 (Motulsky, 1999) programmal végeztük.

Staphylococcus enterotoxin (SE) gének meghatározása

Multiplex PCR vizsgálati módszer segítségével a *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *seg*, *see*, *sei*, *sej* *Staphylococcus enterotoxin (SE) gének* és a toxikus sokk toxin gén

(*tst*) előfordulását vizsgáltuk a *S. aureus* izolátumokban.

A DNS amplifikáció 30 ciklusban (95 °C-on 60 mp-ig, 55 °C-on 60 mp-ig és 72 °C-on 60 mp-ig) történt. Az utolsó ciklus után egy 72 °C-os 10 perces végső szakasz következett. Az amplifikáció kivitelezéséhez automata, programozható GeneAmp PCR System 9700 készüléket és Platinum Taq DNS polimerázt (Invitrogen) használtunk. A PCR termékeket 1,5%-os agaróz gélen történő elektroforézist követően, etidium bromiddal megfestettük és UV fény alatt fotóztuk.

Pulzáló erőterű gélelektroforézis

Az izolátumok kromoszomális DNS-ének a makrorestrikciós analízisét SmaI restrikciós enzim segítségével végeztük. A makrorestrikciós DNS fragmentumok elválasztásához 1%-os SeaKem Gold agaróz gélt és CHEF DR III készüléket használtunk. Futtatás után a gélt etidium bromiddal megfestettük, és UV fény alatt fotóztuk. Markerként XbaI-el emésztett *Salmonella braenderup* H9812 törzset alkalmaztunk.

Az izolátumok fragmentumainak az analízise és a dendrogram készítés Fingerprinting II v.3.0 szoftver segítségével történt. Az izolátumokat 100%-os azonosság szint esetén genetikailag azonosnak (azonos pulzotípus), 86-99%-os azonosság esetén közeli rokonoknak (altípus), 86% alatt pedig különböző pulzotípusnak tekintettük. A különböző pulzotípusokat nagy betűvel, az altípusokat pedig nagy betűvel és arab számmal jelöltük.

Antibiotikum rezisztencia vizsgálat

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatokat Mueller-Hinton agaron korongdiffúziós módszerrel végeztük.

Az alábbi antibiotikum korongokat használtuk: penicillin (P, 10 unit), methicillin (MET, 5µg), cefoxitin (FOX, 30µg), lincomycin (MY, 15µg), tetracycline (TE, 30µg), erythromycin (E, 15µg) és sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT, 25µg).

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A *S. aureus* szám alakulása az elegejében

A G1 gazdaság elegejében a *S. aureus* szám $4,1 \times 10^2$ és $2,1 \times 10^3$ Cfu ml⁻¹ között, a G2 gazdaság elegejében pedig $1,9 \times 10^2$ és $3,4 \times 10^2$ Cfu ml⁻¹ között alakult. Az egyes mintavételi időpontokban, a G2 gazdaságban kisebb volt az eredmények szórása, mint a G1 gazdaság esetén. Az elegej minták átlag *S. aureus* száma a G1 gazdaságban $1,4 \times 10^3$ Cfu ml⁻¹, a G2 gazdaságban pedig $2,6 \times 10^2$ Cfu ml⁻¹ volt (1. ábra). A két gazdaság elegejében az átlag *S. aureus* szám szignifikánsan különbözött ($P < 0,05$) egymástól.

1. ábra: A *S. aureus* szám alakulása a gazdaságok elegejében

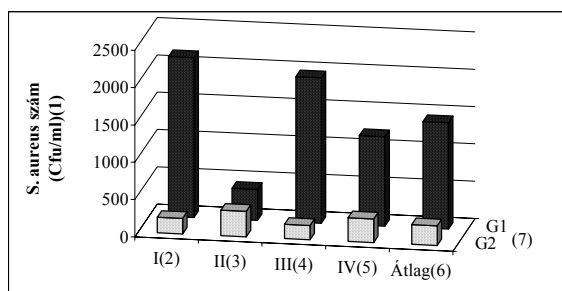


Figure 1: *S. aureus* counts in bulk tank milk of farms

S. aureus count(1), I:2005 summer(2), II:2005 autumn(3), III:2005-06 winter(4), IV:2006 summer(5), mean(6), farms(7)

Az epidemiológiai vizsgálatok elvégzéséhez tizennégy *S. aureus* izolátumot (elegejéből ötöt, tőgynevedtejből kilencet) választottunk ki. A felületekről gyűjtött minták vizsgálata során nem fordult elő *S. aureus* által szennyezett minta.

Enterotoxin gének előfordulása

A tizennégy izolátum közül három (21,4%) hordozott SE gént. Két izolátum csak egy gént (*seb*), egy izolátum pedig két gént is hordozott (*seg* és *sei*). Egyik törzs sem rendelkezett *sea*, *sec*, *sed*, *see*, *seh*, *sej* vagy *tst* génnel. A két gazdaság közül csak a G2 gazdaságban találtunk enterotoxin-termelő törzset. A *seb* gén két izolátumban, a *seg+sei* gének pedig egy izolátumban voltak jelen (1. táblázat).

Pulzáló erőterű gélelektroforézis

Az izolátum makrorestrikciós fragmentumainak az elemzése alapján, a vizsgált tizennégy izolátum három pulzotípusba és két altípusba volt sorolható 86%-os azonossági szint esetén, melyeket dendrogramon is ábrázoltuk (2. ábra). Az elegejéből származó izolátumokat (n=5) két pulzotípusba (A, C) és egy altípusba (C1) lehetett elkülöníteni. A beteg állatok tőgynevedtejből származó izolátumok (n=9) három pulzotípusba (A, B, C) és két altípusba (A1, C1) tartoztak. Az egyes gazdaságokban maximum két különféle pulzotípus fordult elő, ami az egyes farmokon belüli kismértékű genetikai különbségre utal (1. táblázat).

Az előforduló pulzotípusok elemzése során azt tapasztaltuk, hogy genetikai kapcsolat van az elegejében és a tőgynevedtejből talált *S. aureus* izolátumok között. Ez arra utal, hogy azokban a gazdaságokban, ahol nagyszámú szubklinikai tőgygyulladásban szenvedő állat fordul elő, az elegej *S. aureus* baktériummal történő szennyeződésének fő forrásai a fertőzött tőgynevedek. A szennyeződés elkerülése legfőképpen a tőgybeteg állatok tejének az elkülönítésével érhető el.

Az epidemiológiai vizsgálatok eredményei

Gazdaságok(1)	Izolátumok száma(2)	Izolátumok eredete(3)	Pulzotípusok(4)	Rezisztencia(5)	Enterotoxin(6)
G1	34	Elegytej(7)	A	Penicillinre rezisztens(9)	-
	35	Elegytej	A	Penicillinre rezisztens	-
	37	Tőgyegyedtej(8)	A	Penicillinre rezisztens	-
	38	Tőgyegyedtej	A	Penicillinre rezisztens	-
	41	Tőgyegyedtej	A1	Penicillinre rezisztens	-
	43	Tőgyegyedtej	A	Penicillinre rezisztens	-
	47	Tőgyegyedtej	A1	Penicillinre rezisztens	-
	48	Tőgyegyedtej	B	Érzékeny(10)	-
G2	21	Elegytej	C	Penicillinre rezisztens	-
	22	Elegytej	C1	Penicillinre rezisztens	seb
	23	Elegytej	C1	Penicillinre rezisztens	seb
	26	Tőgyegyedtej	C	Penicillinre rezisztens	seg+sei
	28	Tőgyegyedtej	C	Penicillinre rezisztens	-
	30	Tőgyegyedtej	A	Penicillinre rezisztens	-

Table 1: Results of the epidemiology investigations

Farms(1), number of isolates(2), origin of isolates(3), pulsotypes(4), resistance(5), enterotoxin(6), bulk tank milk(7), udder quarter milk(8), penicillin-resistant(9), susceptible(10)

2. ábra: A S. aureus izolátumok közötti azonossági szintet bemutató dendrogram

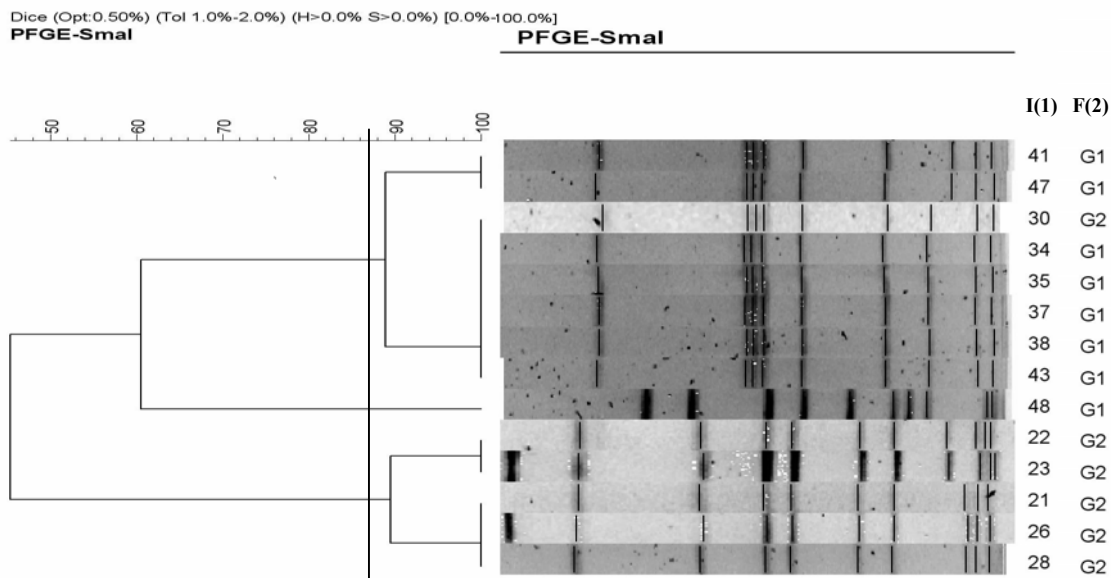


Figure 2: Dendrogram showing the level of similarity between the S. aureus isolates
 Isolates(1), farms(2)

Antibiotikum rezisztencia

A vizsgálatokba bevont összes törzs érzékeny volt a methicillinre, cefoxitinre, lincomycinre, tetracyclinre, erythromycinre és sulfamethoxazole/

trimethoprimre. A tizennégy törzs közül tizenhárom (A és C pulzotípus, A1 és C1 altípus) volt penicillin rezisztens és csak egy volt érzékeny (B pulzotípus) az összes antibiotikummal szemben (1. táblázat).

KÖVETKEZTETÉSEK

A két gazdaság elegytejében az átlag *S. aureus* szám annak ellenére, hogy mindkét gazdaságban hasonló volt az üzemméret, a tartásmód és a fejéstechnológia is, szignifikánsan különbözött ($P < 0,05$) egymástól. Az epidemiológiai vizsgálatok elvégzéséhez tizennégy *S. aureus* izolátumot (elegytejből ötöt, tőgynevedtejből kilencet) választottunk ki. A mosás után, de még a fejés megkezdése előtt vett felületi minták vizsgálata során nem fordult elő *S. aureus* által szennyezett minta, ami a megfelelő tisztításra vezethető vissza.

Az enterotoxin termelő képesség meghatározása során azt tapasztaltuk, hogy a tizennégy izolátum közül három (21,4%) hordozott SE gént. Két izolátum csak egy gént (*seb*), egy izolátum pedig két gént is hordozott (*seg* és *sei*).

A tizennégy izolátum, a genetikai rokonsági kapcsolat vizsgálata alapján, három pulzotípusba és két altípusba volt sorolható 86%-os azonossági szint esetén. Az elegytejeből származó izolátumokat ($n=5$) két pulzotípusba (A, C) és egy altípusba (C1) lehetett elkülöníteni. A beteg állatok tőgynevedtejből származó izolátumok ($n=9$) három pulzotípusba (A, B, C) és két altípusba (A1, C1) tartoztak. Az egyes gazdaságokban maximum két különféle pulzotípus fordult elő, ami az egyes farmokon belüli kismértékű genetikai különbségre

utal. Az előforduló pulzotípusok elemzése során azt tapasztaltuk, hogy genetikai kapcsolat van az elegytejben és a tőgynevedtejből talált *S. aureus* izolátumok között. Ez arra utal, hogy azokban a gazdaságokban, ahol nagyszámú szubklinikai tőgygyulladásban szenvedő állat fordul elő, az elegytej *S. aureus* baktériummal történő szennyeződésének fő forrásai a fertőzött tőgynevedek.

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálat során azt az eredményt kaptuk, hogy a tizennégy törzs közül tizenhárom volt penicillinre rezisztens, ami a gazdaságok nagymértékű antibiotikum használatával magyarázható.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A cikkben bemutatott saját eredmények az Osztrák-Magyar Akció Alapítvány és a Bécsi Állatorvosi Egyetem, Tejhigiéniái, Tejtechnológiai és Élelmiszertudományi Intézet támogatásával valósultak meg.

Köszönettel tartozok a két gazdaság vezetőinek és dolgozóinak a segítőkész közreműködésükért, továbbá Petra Riecknek és Klaus Gutsernek az epidemiológiai vizsgálatokban, Ingeborg Heinnak és Kardos Gábornak pedig a statisztikai elemzésekhez nyújtott szakmai segítségéért.

IRODALOM

- Akineden, O.-Annemuller, C.-Hassan, A.A.-Lammler, C.-Wolter, W.-Zschock, M. (2001): Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from milk cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 5. 959-964.
- Asperger, H. (1994): *Staphylococcus aureus*. In: Monograph on the significance of pathogenic microorganisms in raw milk by IDF group of experts A10/11 – bacteriological quality of raw milk, IDF, Brussels, Belgium, 24-42.
- Balaban, N.-Rasooly, A. (2000): Review: Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology.*, 61. 1-10.
- Brisabois, A.-Lafarge, V.-Brouillaud, A.-De Buyser, M.L.-Collette, C.-Garin-Bastuji, B.-Thorel, M.F. (1997): Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 16. 452-471.
- Bryan, F.L. (1983): Epidemiology of milk-borne diseases. *J. Food Prot.*, 46. 637-649.
- Bryant, R.G.-Jarvis, J.-Guibert, G. (1988): Selective enterotoxin production by a *Staphylococcus aureus* strain implicated in a foodborne outbreak. *J. Food Prot.*, 51. 130-131.
- Cardoso, H.F.T.-Silva, N.-Sena, M.J. (1999): Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Letters Appl. Microbiol.*, 29. 347-349.
- Dinges, M.M.-Orwin, P.-Schlievert, P.M. (2000): Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13. 16-34.
- Hogan, J.S.-Smith, K.L.-Hoblet, K.H.-Todhunter, D.A.-Schoenberger, P.S.-Hueston, W.D.-Pritchard, D.E.-Bowman, G.L.-Heider, L.E.-Brockett, B.L.-Conrad, H.R. (1989): Bacterial counts in bedding used on nine commercial dairies. *J. Dairy Sci.*, 72. 250-258.
- Jablonski, L.M.-Bohach, G.A. (1997): *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M.P.-Beuchat, L.P.-Montville, T.J. editors. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington, D.C: ASM Press., 353-375.
- Letertre, C.-Perelle, S.-Dilasser, F.-Fach, P. (2003): A strategy based on 5' nuclease multiplex PCR to detect enterotoxin genes *sea* to *sej* of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell. Probes*, 17. 227-235.
- MacDonald, K.L.-Eidson, H.I.-Strohmeyer, C.-Levy, M.E.-Wells, J.G.-Puhr, N.D.-Wachsmuth, K.-Hargrett, N.T.-Cohen, M.L. (1985): A multistate outbreak of gastrointestinal illness caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in imported semisoft cheese. *J. Infect. Dis.*, 151. 716-720.
- Maguire, H.-Cowden, J.-Jacob, M.-Rowe, B.-Roberts, D.-Bruce, J.-Mitchell, E. (1992): An outbreak of Salmonella dublin infection in England and Wales associated with a soft unpasteurised cows' milk cheese. *Epidemiol. Infect.* 109. 389-396.
- Motulsky, H.J. (1999): Analyzing Data with GraphPad Prism. GraphPad Software Inc., San Diego CA, www.graphpad.com.
- Orwin, P.M.-Leung, D.Y.-Donahue, H.L.-Novick, R.P.-Schlievert, P.M. (2001): Biochemical and biological properties of *Staphylococcal enterotoxin K*. *Infect. Immun.*, 69. 360-366.
- Peles, F.-Keresztúri, P.-Iglói, A.-Szabó, A. (2006): The effect of environmental factors on the microbiological quality of bulk tank milk. *Cereal Research Communications*, 34. 1. 755-758.
- Stephan, R.-Annemüller, C.-Hassan, A.-Lämmmler, Ch. (2001): Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in North East Switzerland. *Veterinary Microbiology*, 78. 4. 373-382.

Thomas, S.B.-Druce, R.G.-King, K.P. (1966): The microflora of poorly cleansed farm dairy equipment. *J. Appl. Bact.*, 29. 409–422.

Tuboly S. (1998): Állatorvosi járványtan I. (Állatorvosi mikrobiológia). Mezőgazda Kiadó, Budapest. 612.

FVM - ESZCSM együttes rendelete 1/2003. (I. 8.): Rendelet a nyers tej és a tejalapú termékek előállításának, forgalomba

hozatalának élelmiszer-higiéniai feltételeiről.- Magyar Közlöny. 2003/2. szám. 59-89.

MSZ EN ISO 6888-1:2000. Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer a koagulázpozitív staphylococcus-ok (*Staphylococcus aureus* és más fajok) számának meghatározására. 1. rész: Baird–Parker-agar táptalajt alkalmazó eljárás.