UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE

**WYDZIAŁ NAUKI O ŻYWNOŚCI**

**Dyscyplina: technologia żywności i żywienia**

**Dziedzina: nauki rolnicze**

**mgr inż. Joanna Gajewska**

**Rozprawa doktorska**

# Antybiotykooporność oraz wirulencja szczepów *S. aureus* wyizolowanych z łańcucha produkcji polskich serów zagrodowych

# Antibiotic resistance and virulence of *S. aureus* strains isolated from the production chain of Polish artisanal cheeses

Praca wykonana w Katedrze Mikrobiologii Żywności, Technologii i Chemii Mięsa

Promotor: dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Wioleta Chajęcka- Wierzchowska

Olsztyn 2024

Olsztyn, 17.05.2024
(miejscowość, data)

Joanna Gajewska
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia żywności i żywienia
(dyscyplina naukowa)

**Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny**
**Technologia żywności i żywienia**
**Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**
**prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak**

**OŚWIADCZENIE**
**o samodzielnym napisaniu rozprawy doktorskiej**

Świadoma(-y) odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska pod tytułem **Antybiotykooporność oraz wirulencja szczepów *S. aureus* wyizolowanych z łańcucha produkcji polskich serów** została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie jest i nie była wcześniej podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Ponadto oświadczam, że treść rozprawy doktorskiej przedstawionej przez mnie do obrony, zawarta na przekazywanym nośniku elektronicznym, jest identyczna z jej wersją drukowaną.

W związku z powyższym oświadczam, że wyrażam zgodę na poddanie rozprawy doktorskiej procedurze antyplagiatowej.

Gajewska Joanna
.....
(podpis kandydata)

Olsztyn, 17.05.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
(stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko
promotora/~~promotora pomocniczego~~*)

**Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny**
**Technologia żywności i żywienia**
**Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**
**prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak**

**OŚWIADCZENIE**
**promotora/~~promotora pomocniczego~~* rozprawy doktorskiej**

Oświadczam, że rozprawa doktorska **mgr inż. Joanny Gajewskiej** pod tytułem **Antybiotykooporność oraz wirulencja szczepów *S. aureus* wyizolowanych z łańcucha produkcji polskich serów zagrodowych** została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Anna Zadernowska
.....
(podpis promotora)

* *niepotrzebne skreślić*

Olsztyn, 17.05.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
(stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko
~~promotora~~/promotora pomocniczego*)

**Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny**
**Technologia żywności i żywienia**
**Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**
**prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak**

**OŚWIADCZENIE**
**~~promotora~~/promotora pomocniczego* rozprawy doktorskiej**

Oświadczam, że rozprawa doktorska **mgr inż. Joanny Gajewskiej** pod tytułem **Antybiotykooporność oraz wirulencja szczepów *S. aureus* wyizolowanych z łańcucha produkcji polskich serów zagrodowych** została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
(podpis promotora)

* *niepotrzebne skreślić*

## FINANSOWANIE BADAŃ

Badania prowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostały sfinansowane ze środków przeznaczonych na działalność związaną z prowadzeniem badań naukowych oraz zadań z nimi związanych- dotacja MNiSzW na działania statutowe (nr tematu: 17.610.015-110)/

Współfinansowanie badań przez Narodowe Centrum Nauki w ramach realizacji projektu PRELUDIUM 20 „Odpowiedź na warunki stresowe u *Staphylococcus a*ureus: wpływ na enterotoksyczność i metycylinooporność w warunkach stresu istotnego dla rzemieślniczej produkcji sera.” (2021/41/N/NZ9/00918)

## WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Podstawę niniejszej pracy stanowi cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach wymienionych w wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych MEIN.

Pełne teksty wymienionych poniżej prac wraz z oświadczeniami współautorów publikacji stanowią załączniki do niniejszej pracy.

**P1. Gajewska, J.,** Zakrzewski, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Meta-analysis of the global occurrence of *S. aureus* in raw cattle milk and artisanal cheeses. *Food Control*, 147, 109603. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2023.109603

**[(1)]MEiN: 140, [(2)]IF: 6.6652; [(3)]WoS=4; [(4)]GS=12**

*Mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji polegał na: opracowaniu koncepcji, przeglądzie baz danych w poszukiwaniu odpowiednich danych, analizie statystycznej, interpretacji uzyskanych wyników, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).*

**P2. Gajewska, J.,** Chajęcka-Wierzchowska, W., & Zadernowska, A. (2022). Occurrence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* Strains along the Production Chain of Raw Milk Cheeses in Poland. *Molecules*, 27. https://doi.org/https://doi.org/10.3390

**[(1)]MEiN: 140, [(2)]IF: 4.6; [(3)]WoS=8; [(4)]GS=12**

*Mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji polegał na: u dziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, walidacji metod, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników (tabel rycin) i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny.*

**P3. Gajewska, J.,** Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Genomic characterisation of the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from the cheese chain production. *International Dairy Journal*, 105774. https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2023.105774

**[(1)]MEiN: 200, [(2)]IF: 3.1; [(3)]WoS=0; [(4)]GS=0**

*Mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji polegał na: u dziale w opracowaniu koncepcji*

*i metodologii badań, walidacji metod, przeprowadzeniu analiz bioinformatycznych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników (tabel i rycin) i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekcie artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).*

**P4**. **Gajewska J**, Zakrzewski AJ, Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A. (2023) Impact of the food-related stress conditions on the expression of enterotoxin genes among *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*, 12(7):954. https://doi.org/10.3390/pathogens12070954

**[(1)]MEiN: 100, [(2)]IF: 3.7; [(3)]WoS=1; GS[(4)] =2**

*Mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji polegał na: opracowaniu koncepcji, udziale w opracowaniu metodologii badań, walidacji metod, przeprowadzeniu większości analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników (tabel rycin) i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny)*

Sumaryczna liczba punktów MEiN – **580**.

Sumaryczny *Impact Factor* (IF) ww. publikacji – **18.065**

[(1)] Liczba punktów zgodnie z Komunikatami Ministra Edukacji I Nauki w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych zgodna z rokiem opublikowania.
[(2)] Impact Factor (IF) według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania
[(3)] Liczba cytowani bez autocytowań wg bazy Web of Science (WoS)
[(4)] Liczba cytowani bez autocytowań wg bazy Google Scholar (GS)

# Spis treści

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW** ..... **9**

**STRESZCZENIE** ..... **10**

**ABSTRACT** ..... **11**

**1. WSTĘP** ..... **12**
1.1. CHARAKTERYSTYKA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ..... 12
1.2. WYSTĘPOWANIE *S. AUREUS* W ŻYWNOŚCI I ŚRODOWISKU JEJ PRODUKCJI ..... 14
1.3. SERY ZAGRODOWE ..... 16
1.4. PRODUKCJA I UTRWALANIE ŻYWNOŚCI - ODPOWIEDŹ NA STRES U *S. AUREUS* ..... 17
**2. CEL BADAŃ** ..... **20**
**3. HIPOTEZY BADAWCZE** ..... **20**
**4. MATERIAŁ I METODY** ..... **21**
4.1. ORGANIZACJA I PLAN BADAŃ ..... 21
4.2. METAANALIZA DANYCH LITERATUROWYCH ..... 22
4.2.1. PRZEGLĄD SYSTEMATYCZNY DANYCH LITERATUROWYCH ..... 22
4.2.2. ANALIZA STATYSTYCZNA ..... 23
4.3. MATERIAŁ BADAWCZY ..... 24
4.4. IZOLACJA I IDENTYFIKACJA SZCZEPÓW ..... 24
4.5. CHARAKTERYSTYKA FENOTYPOWA I GENOTYPOWA SZCZEPÓW *S. AUREUS* ..... 24
4.5.1. OKREŚLENIE WRAŻLIWOŚCI IZOLATÓW NA ANTYBIOTYKI ..... 24
4.5.2. OKREŚLENIE ZDOLNOŚCI DO WYTWARZANIA BIOFILMU I WYDZIELANIA ŚLUZU ..... 25
4.5.3. WYKRYWANIE GENÓW KODUJĄCYCH OPORNOŚĆ NA ANTYBIOTYKI, GENÓW ENTEROTOKSYN I GENÓW ZWIĄZANYCH Z BIOFILMEM WŚRÓD IZOLATÓW ..... 26
4.6. ANALIZY WYKORZYSTUJĄCE SEKWENCJONOWANIE CAŁEGO GENOMU ..... 26
4.6.1. IZOLACJA DNA ..... 26
4.6.2. SEKWENCJONOWANIE TECHNIKĄ NGS ..... 26
4.6.3. ANALIZY BIOINFORMATYCZNE UZYSKANYCH GENOMÓW ..... 27
4.7. WPŁYW CZYNNIKÓW STRESOWYCH ZWIĄZANYCH Z PRZEMYSŁEM SPOŻYWCZYM NA *S. AUREUS* 27
4.7.1. ODDZIAŁYWANIE CZYNNIKÓW STRESOWYCH ..... 27
4.7.1.1. DZIAŁANIE STRESU OSMOTYCZNEGO ..... 28
4.7.1.2. DZIAŁANIE STRESU KWASOWEGO I ALKALICZNEGO ..... 28
4.7.2. ANALIZA PRZEŻYWALNOŚCI ..... 28
4.7.2.1. METODA CYTOMETRYCZNA ..... 28
4.7.2.2. METODA PŁYTKOWA ..... 29
4.7.3. ANALIZA EKSPRESJI GENÓW ENTEROTOKSYCZNOŚCI ..... 29
**5. REZULTATY PRZEPROWADZONYCH BADAŃ** ..... **31**
5.1. GLOBALNE WYSTĘPOWANIE *S. AUREUS* W MLEKU SUROWYM I SERACH Z MLEKA NIEPASTERYZOWANEGO ..... 31
5.2. WYSTĘPOWANIE *S. AUREUS* W ŁAŃCUCHU PRODUKCJI POLSKICH SERÓW ZAGRODOWYCH 32
5.3. ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ SZCZEPÓW *S. AUREUS* I ICH GENETYCZNE DETERMINANTY ..... 32
5.4. CZYNNIKI WIRULENCJI WŚRÓD BADANYCH IZOLATÓW ..... 33
5.4.2. PORÓWNANIE IZOLATÓW Z GLOBALNYMI IZOLATAMI ZWIĄZANYMI Z SFP ..... 35
**6. DYSKUSJA** ..... **37**
**7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI** ..... **45**
**8. LITERATURA** ..... **46**
**9. SPIS TABEL I RYCIN** ..... **54**
**10. POZOSTAŁA AKTYWNOŚĆ NAUKOWA** ..... **55**
**11. ZAŁĄCZNIKI** ..... **63**

# WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ALOP – odpowiedni poziom ochrony (ang. Appropriate Level of Protection)

AMR - Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe (ang. Antimicrobial resistance)

$a_w$ - aktywność wody

CC - kompleks klonalny (ang. clonal complex)

cgMLST – wielooogniskowe typowanie sekwencyjne na podstawie genomu rdzeniowego (ang. core genome multilocus sequence typing)

EFSA - Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. European Food Safety Authority)

GHP - Dobra Praktyka Higieniczna (ang. Good Hygienic Practice)

GMP - Dobra Praktyka Produkcyjna (ang. Good Manufacturing Practice)

jtk-jednostki tworzące kolonię

MALDI - Desorpcja/Jonizacja laserem wspomagana matrycą (ang. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)

MDR- wielolekooporność (ang. Multi drug resistance)

MIC - minimalne stężenie hamujące (ang. Minimum inhibitory concentration)

MLST – typowanie genów metabolizmu podstawowego (ang. multi-locus sequence typing)

MRSA - metycylinooporny *Stapjylococcus aureus* (ang. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)

MSSA - *Staphylococcus aureus* wrażliwy na metycylinę (ang. ang. methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*)

OD - gęstość optyczna (ang. Optical density)

PCR - łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. polymerase chain reaction))

RHD - rolniczy Handel Detaliczny

SEls - enterotoksyny podobne do toksyn (ang. Staphylococcal *enterotoxin-like toxins)*

SEs - enterotoksyny gronkowcowe (ang. Staphylococcal enterotoxins)

SFP - gronkowcowe zatrucie pokarmowe (ang. Staphylococcal foof poisoning)

ST - typ sekwencyjny (ang. Sequence types)

TBE - Tris-borate EDTA

VRSA- *Staphylococcus aureus* oporny na wankomycynę (ang. vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*)

# STRESZCZENIE

Bezpieczeństwo żywności to kwestia priorytetowa ze względu na nawracające zatrucia pokarmowe wywoływane przez patogeny w tym *Staphylococcus aureus*. Ze względu na swój potencjał zoonotyczny, kontrola *S. aureus* ma nie tylko ogromne znaczenie ekonomiczne w przemyśle mleczarskim, ale także stanowi istotny problem dla zdrowia publicznego.

Niniejsza praca miała na celu analizę antybiotykooporności oraz wirulencji szczepów *S. aureus* wyizolowanych z łańcucha produkcji polskich serów zagrodowych. Wyniki wykazały, że wysoki odsetek izolatów *S. aureus* wykazywał oporność na wiele antybiotyków, wykorzystywanych e leczeniu zakażeń bydła, w tym na tetracykliny, penicyliny i makrolidy, które są powszechnie stosowane w leczeniu zakażeń u bydła. Ponadto wykazano, że wiele izolatów *S. aureus* posiadało geny wirulencji, które mogą mieć wpływ na zdolność bakterii do powodowania infekcji u ludzi. Dodatkowo, stwierdzono, że czynniki stresowe związane z wytwarzaniem i utrwalaniem żywności, takie jak zmiana pH i stężenie NaCl, mogą wpływać na ekspresję genów enterotoksyn.

Przeprowadzone w niniejszej pracy doktorskiej badania podkreślają potrzebę stałego monitorowania szczepów *S. aureus* w łańcuchu produkcji żywności oraz implikują potrzebę zwiększenia świadomości producentów serów zagrodowych na temat zagrożeń związanych z tymi bakteriami oraz promowanie właściwych praktyk higienicznych w procesie produkcji, co w konsekwencji pozwoli na zwiększenie bezpieczeństwa zdrowotnego konsumentów.



**Słowa kluczowe:** *Staphylococcus aureus*, wirulencja, sery zagrodowe, antybiotykooporność, ekspresja genów,

## ABSTRACT

Food safety is a priority issue due to recurrent food poisoning caused by pathogens including *Staphylococcus aureus*. Due to its zoonotic potential, the control of *S. aureus* is not only of great economic importance in the dairy industry, but also a major public health concern.

The present study aimed to analyze the antibiotic resistance and virulence of *S. aureus* strains isolated from the production chain of Polish artisanal cheeses. The results showed that a high percentage of *S. aureus* isolates showed resistance to many antibiotics used to treat cattle infections, including tetracyclines, penicillins and macrolides, which are commonly used to treat infections in cattle. In addition, many *S. aureus* isolates were shown to possess virulence genes that may affect the bacteria's ability to cause infections in humans. In addition, it was found that stress factors associated with food production and fixation, such as pH change and NaCl concentration, could affect the expression of enterotoxin genes.

The research conducted in this dissertation underscores the need for continuous monitoring *of S. aureus* strains in the food production chain, and implies the need to increase awareness among homestead cheese producers of the risks associated with these bacteria and to promote proper hygienic practices in the production process, which will consequently increase consumer health safety.



**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, virulence, artisanal cheese, antibiotic resistance, gene expression

# 1. WSTĘP

## 1.1. CHARAKTERYSTYKA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus)* jest Gram-dodatnim, fakultatywnym patogenem względnie beztlenowym, który charakteryzuje się zdolnością wzrostu w umiarkowanych temperaturach, wykazuje osmotolerancyjność jak również zdolność do wzrostu w warunkach niskiej aktywności wody jak i niskim pH (Tabela 1). *S. aureus* jest patogenem zdolnym do wytwarzania szerokiej gamy enterotoksyn, w tym enterotoksyn gronkowcowych (SEs), enterotoksyn podobnych do toksyn (SEls), leukocydyn, eksfoliatyn i toksyny tsst-1, które wykazują odporność na wysokie temperatury i mogą stanowić czynnik etiologiczny zatruć pokarmowych (SFP), zespół wstrząsu toksycznego, jak również zapalenie skóry u ludzi (Sugrue i in., 2018).

Należy podkreślić, że gronkowcowe zatrucie pokarmowe (SFP), wywoływane głównie przez *S. aureus* i bardzo sporadycznie przez inne gatunki *Staphylococcus*, jest jedną z najczęstszych chorób przenoszonych przez żywność na całym świecie (Szczuka i in., 2022). Enterotoksyny klasyfikowane są jako superantygeny, tj. mają zdolność stymulowania dużych populacji limfocytów T, które powodują nieuregulowaną aktywację odpowiedzi immunologicznej. Jeśli ta stymulacja jest długotrwała, wytwarzane są ogromne ilości cytokin, co prowadzi do różnych objawów ostrego wstrząsu toksycznego. Objawy te występują w ciągu kilku godzin po spożyciu skażonej żywności, a konsumenci doświadczają wymiotów, biegunki i bólu brzucha. Choroba ma charakter samoograniczający się i zwykle ustępuje w ciągu 12-24 godzin (Pinchuk i in., 2010).

**Tabela 1.** Warunki wzrostu S. aureus.
Opracowanie własne na podstawie (Sugrue i in., 2018).

| | **Wzrost bakterii** | | **Produkcja enterotoksyn** | |
|---|---|---|---|---|
| **Czynnik** | Zakres | optimum | Zakres | Optimum |
| **temperatura** | 6-48°C | 35-41°C | 10-48 °C | 34-40°C |
| **$a_w$** | ≥0.83 | 0.99 | ≥0.86 | 0.99 |
| **stężenie NaCl** | 0-20% | 0% | 12% | 0% |
| **pH** | 4-10 | 6-7 | 5-9.6 | 7-8 |

*S. aureus* jest szeroko rozpowszechniony w środowisku naturalnym, glebie, wodzie, na błonach śluzowych ludzi i zwierząt. Jako patogen występujący w żywności stanowi potencjalne zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Jest często izolowany z różnych produktów spożywczych, w tym między innymi jaj, warzyw, surowego mleka i jego przetworów, mięsa i produktów mięsnych jak również z owoców morza (Liang i in., 2023). Mleko i produkty

mleczarskie (w tym sery z mleka niepasteryzowanego) są naturalnie podatne na kontaminacje bakteriami *S. aureus*, które mogą się namnażać i wytwarzać enterotoksyny (Szczuka i in., 2022). W związku z tym, istotne jest zapobieganie możliwości kontaminacji żywności przez *S. aureus*. Mimo, że w Unii Europejskiej liczba zgłaszanych przypadków SFP spada - w 2020 r. zgłoszono 43 ogniska, 402 przypadki i 32 hospitalizacje, podczas gdy w 2021 roku zgłoszono tylko 13 ognisk wywołanych przez toksyny gronkowcowe (EFSA, 2021). Warto podkreślić, że mimo że z gronkowcowymi zatruciami kojarzono wyłącznie enterotoksyny SEA-SEE, od dłuższego czasu wiadomo jednak, że również enterotoksyny SEG, SEH, SEI, SER, SES i SET mają właściwości wymiotne. Enterotoksyna SEH została zidentyfikowana jako czynnik zbiorowych gronkowcowych zatruć pokarmowych w Norwegii i Japonii. Badania przeprowadzone przez Omoe i in. (2013) wykazały, że również enterotoksyny SEK-SEP oraz SEQ po doustnym podaniu indukują wymioty u małp. W związku z powyższym ocena stanu mikrobiologicznego surowca jakim jest mleko niepoddane pasteryzacji jak również ocena jakości mikrobiologicznej serów zagrodowych jest istotna z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności. Nieliczne jak dotychczas badania wskazują, że zastosowanie subletalnych bardziej niż letalnych warunków obróbki żywności, może prowadzić do rozwoju lekooporności i wzrostu wirulencji patogenów. Badania Rosengren i in. (2013) sugerują, że wytwarzanie SEA zwiększa się pod wpływem łagodnego stresu związanego z kwasem mlekowym i octowym. Niezmiernie ważne jest więc, uzyskanie informacji na temat wpływu czynników stresowych na powstawanie enterotoksyn, aby zminimalizować ich powstawanie podczas produkcji żywności.

Wielu autorów donosi, że 15% do 80% *S. aureus* wyizolowanych z różnych źródeł jest w stanie wyprodukować enterotoksynę (SE) (Fooladi i in., 2010). W wielu krajach badacze przeprowadzali analizy związane z gronkowcowymi zatruciami pokarmowymi po spożyciu mleka niepasteryzowanego lub/i prób sera (Rola i in., 2016). W badaniach Simeão Do Carmo i n. (2002) wykazano, że spożycie sera Minas (produkowanego z mleka niepasteryzowanego) wywołało objawy gronkowcowego zatrucia pokarmowego u 378 osób. Dowiedziono, że zatrucie pokarmowe po spożyciu sera wywołała enterotoksyna SEE produkowana przez *S. aureus.*

Niezmiernie istotnym zagadnieniem pozostającym w centrum uwagi biotechnologów, lekarzy medycyny i weterynarii oraz naukowców jest oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe wśród bakterii patogennych w tym *S. aureus*. Zjawisko wzrastającej oporności na antybiotyki związane jest z bezkrytycznym ich stosowaniem w leczeniu ludzi i zwierząt. Zgodnie z ostatnim raportem Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA), około 700 000 osób umiera każdego roku na całym świecie w wyniku wzrostu liczby

bakterii opornych na antybiotyki (Mancuso i in., 2021). Za najbardziej niebezpieczne uznaje się szczepy gronkowców metycylino-opornych (MRSA), posiadających w swoim genomie gen *mec*A, charakteryzujące się niewrażliwością na wszystkie penicyliny, cefalosporyny i karbapenemy. W przypadkach MRSA antybiotykiem z wyboru przez długi czas była wankomycyna, jednak pojawiły się inne opcje, takie jak oksazolidynony, glicylocykliny i lipopeptydy (da Silva i in., 2020).

Ważnym czynnikiem wirulencji wśród szczepów *S. aureus* jest zdolność do tworzenia biofilmu. W branży mleczarskiej sektora spożywczego biofilm wytworzony przez szczepy *S. aureus* może być wytworzony na każdym etapie procesu produkcyjnego, co w konsekwencji może prowadzić do kontaminacji produktów gotowych. (Avila-Novoa i in., 2021).

Biofilmy mikrobiologiczne tworzące się na powierzchniach maszyn i urządzeń w zakładach przetwórstwa spożywczego wpływają nie tylko na bezpieczeństwo i jakość produktu końcowego, ale także na przebieg procesu technologicznego (Gajewska & Chajęcka-Wierzchowska, 2020). W zdolności tej pośredniczy wiele czynników genetycznych, w tym operon *ica*ADBC, który koduje syntezę cząsteczki polisacharydowej adhezyny międzykomórkowej (PIA), gen *agr* i geny określano jako MSCRAMM (ang. *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*).

## 1.2. WYSTĘPOWANIE *S. AUREUS* W ŻYWNOŚCI I ŚRODOWISKU JEJ PRODUKCJI

*S. aureus* jest często izolowany z różnych produktów spożywczych, takich jak jaja, warzywa, surowe mleko i produkty mleczne, mięso i produkty mięsne oraz owoce morza, stanowiąc tym samym zagrożenie dla zdrowia konsumentów (Liang i in., 2023).

Warto zauważyć, że wskaźnik wykrywalności *S. aureus* jest bardzo zróżnicowany w różnych regionach świata, co może być związane z liczbą badanych próbek, lokalnym klimatem, zwyczajami żywieniowymi, rodzajami żywności i metodami wykrywania tego patogenu. W związku z tym rozpowszechnienie *S. aureus* w żywności musi być monitorowane i kontrolowane na całym świecie.

W tabeli 2 przedstawiono częstość występowania szczepów *S. aureus* w latach 2012-2022 w zależności od kategorii produktu. Badania przeprowadzone przez Liang i in., (2023) wykazały, że *S. aureus* był obecny w 21.7% wszystkich prób żywności, w tym zarówno w produktach pochodzenia zwierzęcego i roślinnego.

Mięso i produkty mięsne mogą zostać zanieczyszczone *S. aureus* na różnych etapach produkcji, w tym z powodu niehigienicznego uboju jak i podczas przetwarzania mięsa. Warto podkreślić, że zanieczyszczenie mięsa *S. aureus* jest poważnym problemem w środowiskach

produkcji i przetwarzania żywności. Początkowe zanieczyszczenie surowego mięsa szczepami *S. aureus* może być istotną przyczyną zanieczyszczenia produktów mięsnych tym patogenem. Mimo, że w wodzie morskiej nie występuje *S. aureus*, jego wysoka częstość występowania w owocach morza może być spowodowana zanieczyszczeniem po połowach, w tym do kontaminacji może dojść przez ręce pracowników, niewłaściwe praktyki higieniczne, złe warunki sanitarne a także przez nieodpowiednie przechowywaniem (Sivaraman i in., 2022). W związku z tym należy podkreślić znaczenie wzmożonego monitorowania *S. aureus* w żywności pochodzenia morskiego w celu uniknięcia zagrożeń dla zdrowia konsumentów.

W latach 2012-2022 wykazano, że częstość występowania *S. aureus* w mleku i produktach mlecznych wynosiła 20,1%, w tym w mleku surowym, pasteryzowanym, jogurcie, maśle i serze. *S. aureus* może być wprowadzany na prawie każdym etapie procesu produkcyjnego w przemyśle mleczarskim (Kümmel i in., 2016). Należy zauważyć, że wymiona (kóz, krów, wielbłądów) oraz skóra strzyków zwierząt mlecznych, osób obsługujących jak i powierzchnia urządzeń mleczarskich mogą powodować zakażenie mleka tym patogenem. Aby zapobiec zanieczyszczeniu surowego mleka przez *S. aureus* z wymion krów przed udojem, wymagane są odpowiednie metody dezynfekcji zbiorników, rur transportowych i środowisk przetwórstwa mleka. Ponadto warto zauważyć, że największymi konsumentami mleka i produktów mlecznych są dzieci, dlatego należy zwrócić większą uwagę na wykrywanie *S. aureus* w produktach tej kategorii (Liang i in., 2023).

Zważając, że *S. aureus* jest szeroko rozpowszechniony w różnych rodzajach żywności oraz w środowisku jej produkcji istotne jest monitorowanie możliwych dróg wejścia tego patogenu do łańcucha produkcji żywności co również podkreśla potrzebę stosowania skutecznych strategii prewencyjnych w celu ochrony zdrowia konsumentów.

**Tabela 2.** Częstość występowania *S. aureus* w latach 2012-2022 w różnych rodzajach żywności. *Opracowanie własne na podstawie Liang i in., 2023.*

| Kategoria produktów | Liczba badanych prób | Liczba prób zanieczyszczonych *S. aureus* | % zanieczyszczonych prób |
|---|---|---|---|
| Jaja | 320 | 28 | 8.8% |
| Warzywa i owoce | 1039 | 89 | 8.6% |
| Mleko i przetwory mleczne | 9497 | 1912 | 20.1% |
| Mięso i produkty mięsne | 10989 | 2919 | 26.6% |
| Owoce morza | 959 | 245 | 25.5% |
| Produkty zbożowe | 246 | 95 | 38.6% |
| Inne | 1623 | 71 | 4.4% |
| **Razem** | **24673** | **5359** | **21.7%** |

## 1.3. SERY ZAGRODOWE

Sery zagrodowe produkowane z mleka niepasteryzowanego w tradycyjny sposób są źródłem wielu grup drobnoustrojów. Ryzykiem mikrobiologicznym jakie niesie konsumpcja serów z mleka surowego, jest obecność patogennych mikroorganizmów, w tym *S. aureus*. Niemniej jednak informacje na temat szczepów *S. aureus* wyizolowanych ze środowiska produkcji serów zagrodowych na małą skalę w Polsce są ograniczone. Około 10% serów produkowanych w Europie wytwarza się z mleka niepasteryzowanego co stanowi potencjalne zagrożenie dla zdrowia konsumentów (Pal, 2022).

Jednym z rodzajów serów produkowanych z mleka niepasteryzowanego są sery kwasowe. Produkcja takiego sera polega na naturalnym zakwaszeniu mleka przez mikroflorę surowca. Po etapie ukwaszania mleko jest podgrzewane do temperatury ok. 43°C, co powoduje jego zgęstnienie i oddzielenie się skrzepu. Po kilkuminutowym odcedzeniu nadmiaru serwatki, mieszanina jest odcedzana w celu usunięcia nadmiaru serwatki. Po schłodzeniu świeży ser jest gotowy do spożycia. Taki typ sera jest powszechnie produkowany przez małe gospodarstwa i sprzedawany na poziomie lokalnym przez producentów bezpośrednio klientom (Bórawski i in., 2021).

Drugi popularny ser produkowany również przez wiele gospodarstw na małą skalę to ser podpuszczkowy dojrzewający. Dodatek podpuszczki skraca czas ukwaszania mleka, powoduje wiązanie skrzepu i oddzielenie go od serwatki, ze względu na destabilizację miceli kazeinowych. Zestalony skrzep jest cięty na mniejsze kawałki, aby umożliwić dalsze wydalanie serwatki. Po oddzieleniu serwatki skrzep jest odcedzany od serwatki, po czym ser umieszcza się w formie. Po zakończeniu produkcji ser zanurza się w solance i pozostawia do dojrzewania na okres do czterech dni. (Stefanou i in., 2022)

W Polsce rzemieślnicza produkcja sera jest ważną lokalną działalnością gospodarczą, której produkcja wzrasta w ostatnich latach. Od 2017 roku obserwuje się dynamiczny wzrost liczby podmiotów działających w ramach Rolniczego Handlu Detalicznego (RHD), gdzie wśród produktów oferowanych w ramach RHD znaczną część stanowią sery wytwarzane z niepasteryzowanego mleka. Zjawisko to jest związane z obecnymi trendami konsumenckimi, ze względu na poszukiwanie przez nich alternatywy dla masowo produkowanych przemysłowych produktów mlecznych (Stefanou i in., 2022). Sery zagrodowe z mleka niepasteryzowanego mają unikalny smak i aromat, który wynika ze składu gatunkowegokultury bakteryjnej, jakości mleka i warunków produkcji. Nieprzetworzone mleko i naturalne procesy fermentacji mogą wpływać na rozwój różnych smaków i aromatów, takich jak orzechowy, owocowy, ziołowy czy pikantny.

Mimo unikalnych cech organoleptycznych warto zauważyć, że sery zagrodowe z mleka niepasteryzowanego mogą również wiązać się z pewnym ryzykiem mikrobiologicznym. Surowe mleko może zawierać patogeny, takie jak *Salmonella*, *E. coli* czy *S. aureus*. Warto podkreślić, że żywność produkowana lokalnie, często przy użyciu tradycyjnych metod, rzadko jest kontrolowana pod względem bezpieczeństwa, a samym rolnikom/producentom często brakuje wiedzy związanej z dobrymi praktykami higienicznymi i produkcyjnymi (Łobacz & Żulewska, 2021; Soroka & Wojciechowska-Solis, 2019). Mimo to, jakość mikrobiologiczna takich produktów nie została w Polsce poddana krytycznej ocenie w odniesieniu do wymagań określonych w rozporządzeniu (WE) nr 852/2004, rozporządzeniu (WE) nr 853/2004 i rozporządzeniu (WE) nr 2073/2005, które określają przepisy dotyczące higieny produkcji żywności pochodzenia zwierzęcego oraz kryteria bezpieczeństwa mikrobiologicznego wymagane do osiągnięcia ustalonego odpowiedniego poziomu ochrony (ALOP) dla konsumenta końcowego.

## 1.4. PRODUKCJA I UTRWALANIE ŻYWNOŚCI - ODPOWIEDŹ NA STRES U *S. AUREUS*

Metody utrwalania żywności mają na celu przedłużenie jej trwałości, zapobieganie rozwojowi mikroorganizmów, utrzymanie jakości sensorycznej oraz zapewnienie bezpieczeństwa produktów gotowych. Wśród metod utrwalania można wyróżnić: metody fizyczne oraz chemiczne. Do metod fizycznych należą: suszenie (odwodnienie), chłodzenie i zamrażanie, pakowanie próżniowe i w atmosferze modyfikowanej, obróbkę cieplną (w tym pasteryzacja i sterylizacja), jak również promieniowanie UV. Metody chemiczne polegają na dodawaniu substancji chemicznych takich jak: NaCl i kwasy organiczne. Szczepy *S. aureus* wykazują kilka mechanizmów reakcji na stres, aby przetrwać w różnych warunkach środowiskowych (Feng i in., 2022).

W produkcji i utrwalaniu żywności, najczęściej spotykanymi warunkami stresowymi są: stres osmotyczny oraz związany ze zmianą pH (stres kwasowy oraz alkaliczny).

*S. aureus* jest organizmem wysoce adaptacyjnym i nawet subtelne zmiany w warunkach środowiskowych mogą wpływać na fizjologię komórki. W szczególności, odporność szczepu na stres może wzrosnąć, gdy jest on narażony na stres subletalny (Cebrián i in., 2010). Narażenie na jeden rodzaj stresu może również zapewnić ochronę krzyżową przed innymi stresami. Szczepy należące do gatunku *S. aureus* wykazują wysoką osmotolerancyjność, są w stanie rosnąć w matrycach o $a_w$=0,86 (lub niższej). W produktach spożywczych aktywność

wody może być zmniejszona np. przez suszenie lub przez dodanie wysokich stężeń cukru lub soli. Efekt przeciwdrobnoustrojowy zmniejszenia aktywności wody opiera się na zapotrzebowaniu drobnoustrojów na utrzymanie wewnętrznego ciśnienia turgorowego. Wzrost zewnętrznego ciśnienia osmotycznego powoduje odpływ wody i kurczenie się objętości cytoplazmatycznej, co ostatecznie prowadzi do odwodnienia komórki.

Enterotoksyny gronkowcowe są bardzo stabilne i nie można ich inaktywować metodami takimi jak ogrzewanie, dlatego ważne jest zapobieganie wzrostowi *S. aureus* i produkcji enterotoksyn w żywności (Sihto i in., 2016). Warto jednak podkreślić, że każdy z elementów przetwarzania żywności może być czynnikiem stresowym dla komórki, który może indukować wzrost enterotoksyczności. Warunki stresowe (niska wartość pH, obniżona/zwiększona temperatura lub zmiana ciśnienia osmotycznego) powodują zmiany metaboliczne w komórkach bakteryjnych poprzez ekspresję określonych zestawów genów, w tym enterotoksyn. W tym przypadku ważne jest zbadanie ekspresji każdego genu enterotoksyny.

Dotychczas większość badań koncentrowała się na głównie na analizie ekspresji genów kodujących klasyczne enterotoksyny w warunkach stresowych występujących w środowiskach przetwarzania żywności, podczas gdy wiedza na temat ekspresji nowo opisanych genów enterotoksyn jest ograniczona. Dotychczasowe dane literaturowe wskazują, że produkcja enterotoksyny zmniejsza się pod wpływem stresu związanego z obecnością NaCl (Etter i in., 2022). Badacze wskazują również, że produkcja enterotoksyn przez szczepy *S. aureus* związana jest z $a_w$ , przy czym wskazuje się że produkcja enterotoksyny SEA przez szczepy *S. aureus* w mniejszym stopniu uzależniona jest od tej wartości, w porównaniu z produkcją enterotoksyny SEB czy SED.

W utrwalaniu żywności obniżenie pH do kwasowego jest wykorzystywane do ograniczania lub zahamowania wzrostu bakterii poprzez dodanie kwasów do żywności lub poprzez wzmocnienie naturalnej fermentacji w celu promowania zakwaszenia (Zapaśnik i in., 2022). Niemniej jednak hamujące działanie kwasów zależy od użytego kwasu, jego stężenia oraz czasu ekspozycji i zdolności buforowania żywności. W produkcji żywności powszechnie stosowane są słabe kwasy, do których należą: kwas octowy i mlekowy. Działanie przeciwdrobnoustrojowe kwasów związane jest z mechanizmami do których należą: wewnątrzkomórkowa akumulacja anionów kwasowych, hamowanie istotnych reakcji metabolicznych, redukcja siły napędowej protonów i denaturacja białek (Guan & Liu, 2020). Dane literaturowe wskazujące na wzrost ekspresji genów w odpowiedzi na stres kwasowy obejmują podjednostki ureazy A, B i C (*ure*ABC), *nuo*F kodujący dehydrogenazę NADH, a także geny zaangażowane w stres oksydacyjny (*kat*A, *sod*A) i mechanizmy naprawcze (*rex*AB, *pol*A) (Zhou i in., 2019). Dane

dotyczące wpływu łagodnego stresu kwasowego na ekspresję enterotoksyn są ograniczone. Na poziomie białka wykazano, że produkcja enterotoksyn jest najwyższa między pH 6-7 (Sihto i in., 2015).

# 2. CEL BADAŃ

Za główny cel niniejszej rozprawy doktorskiej przyjęto ocenę antybiotykooporności i wirulencji szczepów *S. aureus* wyizolowanych z łańcucha produkcji polskich serów zagrodowych.

Główny cel rozprawy został osiągnięty poprzez realizację celów szczegółowych, które obejmowały:

1. Izolację i identyfikację szczepów *S. aureus* z łańcuchu produkcji serów zagrodowych.
2. Genotypową i fenotypową ocenę antybiotykooporności izolatów oraz określenie czynników wirulencji wśród szczepów *S. aureus.*
3. Sekwencjonowanie wybranych izolatów i analizy bioinformatyczne.
4. Określenie wpływu czynników stresowych występujących podczas produkcji serów zagrodowych na ekspresję genów enterotoksyczności.

# 3. HIPOTEZY BADAWCZE

**H 1.** Łańcuch produkcji serów zagrodowych jest źródłem antybiotykoopornych (w tym MRSA), wirulentnych szczepów *S. aureus.*

**H 2.** Stresy środowiskowe występujące podczas produkcji serów zagrodowych wpływają na ekspresję genów enterotoksyczności u *S. aureus.*

# 4. MATERIAŁ I METODY

## 4.1. ORGANIZACJA I PLAN BADAŃ

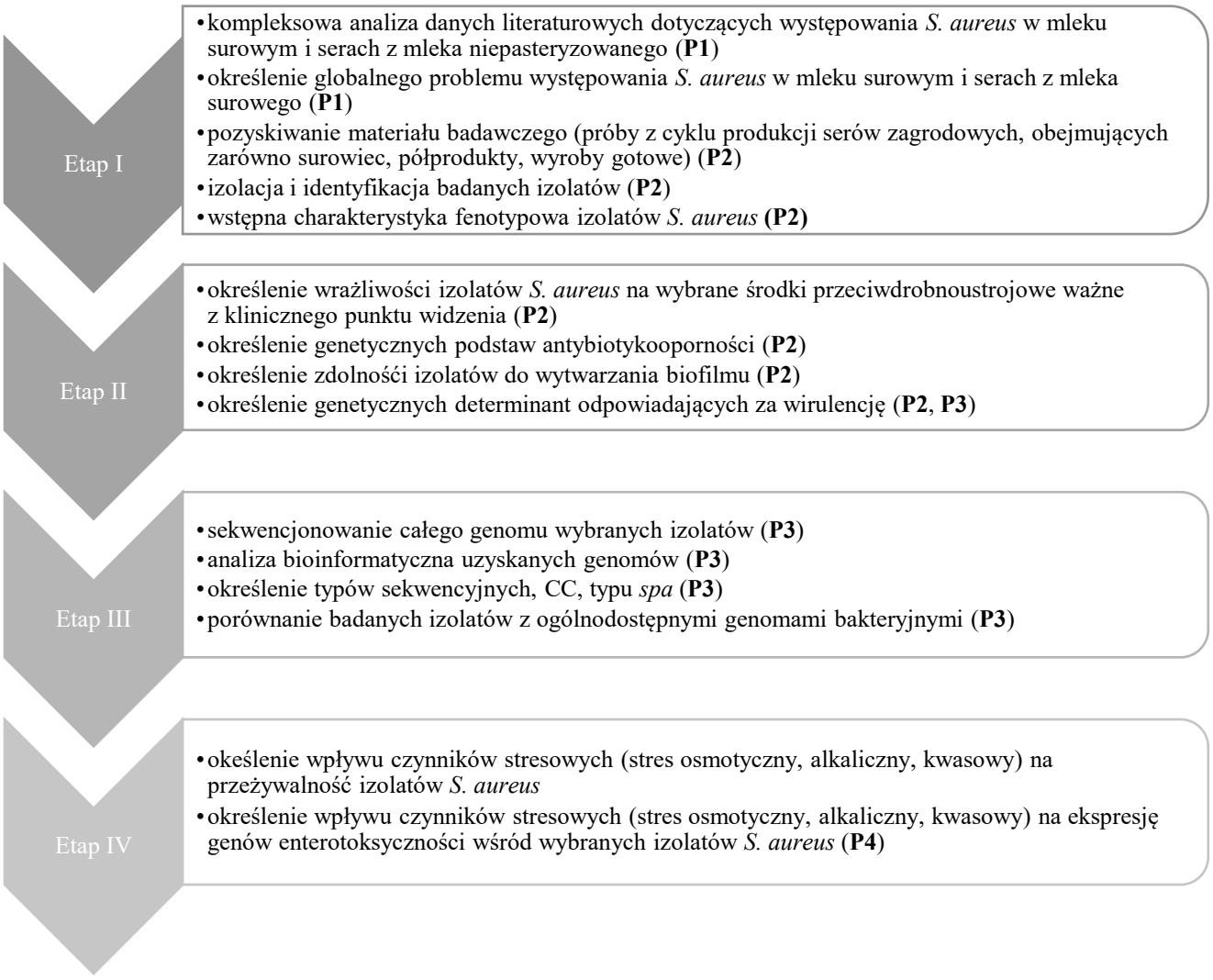
W celu weryfikacji postawionych hipotez zaplanowano następujące zadania badawcze (Rysunek 1).

**Etap I** – kompleksowa ocena globalnej częstotliwości występowania *S. aureus* w mleku surowym i serach z mleka niepasteryzowanego (przegląd systematyczny dostępnych światowych doniesień naukowych na temat występowania *S. aureus* w mleku surowych i jego produktach, analiza statystyczna).

**Etap II** – izolacja i identyfikacja szczepów *S. aureus* z łańcucha produkcji polskich serów zagrodowych oraz ich wstępna charakterystyka fenotypowa, celem stworzenia kolekcji szczepów do dalszych analiz.

**Etap III** – zbadanie antybiotykooporności metodą mikrorozcieńczeń w bulionie i określenie czynników wirulencji wśród badanych izolatów, analiza genetycznych czynników odpowiadających za wirulencję z wykorzystaniem metody łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), sekwencjonowanie wybranych izolatów metodą WGS (ang. whole genomic sequencing) wraz z analizą bioinformatyczną.

**Etap IV** - zbadanie wpływu czynników stresowych występujących podczas konserwacji i produkcji żywności (stres kwasowy, zasadowy, osmotyczny) na ekspresję genów enterotoksyczności wśród wybranych izolatów, metodą real-time PCR (PCR w czasie rzeczywistym).



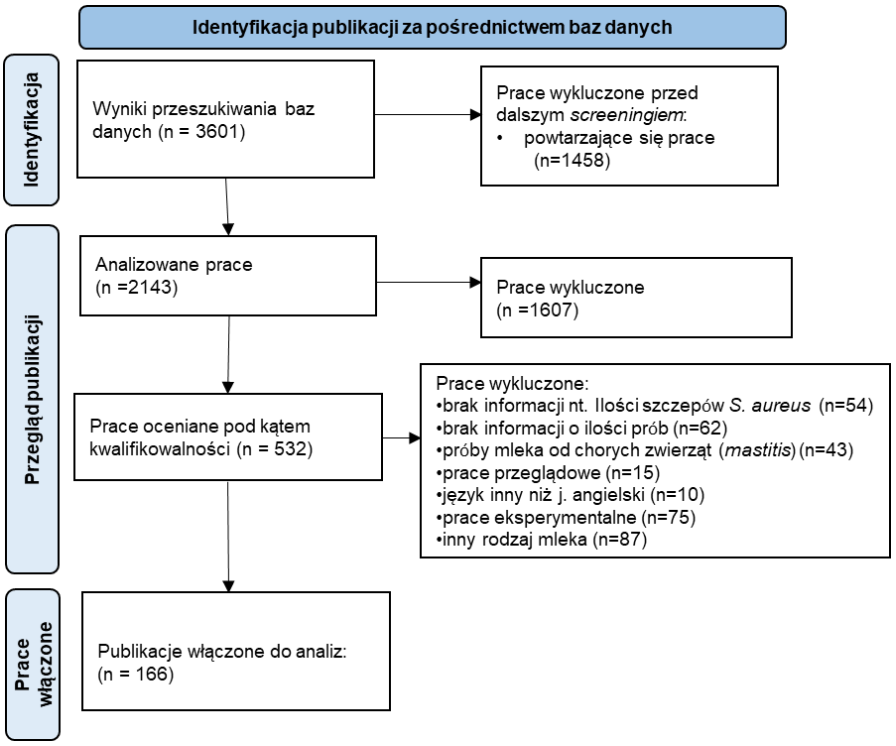

**Rysunek 1**. Etapy badań z uwzględnieniem powiązanego tematycznie cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

## 4.2. METAANALIZA DANYCH LITERATUROWYCH

### 4.2.1. PRZEGLĄD SYSTEMATYCZNY DANYCH LITERATUROWYCH

Przegląd systematyczny dotyczący występowania *S. aureus* w mleku surowym i serów z mleka niepasteryzowanego został przeprowadzony zgodnie z zaleceniami Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA). Wyszukiwanie zostało przeprowadzone w bazach PubMed, Scopus i Web of Science. Następujące słowa kluczowe użyto jako zapytania wyszukiwania w/w bazach: “milk” AND “cheeses” AND (“Staphylococcus aureus” OR “S. aureus” AND (“occurrence” OR “prevalence”) zarówno oddzielnie, jak i jednocześnie. Analizie poddano artykuły opublikowane w latach 2011-2021. Artykuły bez informacji dotyczącej wielkości populacji *S. aureus*, prace eksperymentalne, jak również dotyczące innego rodzaju mleka (ludzkie, wielbłądzie) zostały wykluczone z badania.

Tytuły i streszczenia wyszukanych artykułów były przeglądane niezależnie przez głównego autora, natomiast wszelkie rozbieżności dotyczące włączenia artykułu do analiz metaanalitycznych zostały konsultowane ze współautorami pracy. Schemat postępowania w przeglądzie przedstawiono poniżej (Schemat 2) (**P1**).




**Rysunek 2.** Schemat blokowy przedstawiający proces wyboru badania.

### 4.2.2. ANALIZA STATYSTYCZNA

Wszystkie analizy związane z analizą danych uzyskanych w przeglądzie literatury przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania statystycznego PQStat w wersji 1.4.8. Metaanalizę przeprowadzono przy użyciu modelu efektów losowych w celu oszacowania łącznej częstości występowania i odpowiadający 95% przedział ufności (CI). Heterogeniczność między oszacowaniami oceniono za pomocą metody $I^2$ Higgina i Q Cochrana, która opisuje procent zmienności nie wynikającej z błędu próbkowania między badaniami. Analizę wrażliwości zastosowano w celu ustalenia czy wykluczenie któregokolwiek badania miało znaczący wpływ na szacowaną łączną częstość występowania. Test ANNOVA został użyty do porównania istotności statystycznej między rodzajami mleka i położeniem geograficznym. Metaregresja dla klastrów *S. aureus* została wykorzystana do zbadania czy zmiany w występowaniu oporności na metycylinę można było zaobserwować na przestrzeni lat. Wyniki pokazują modele, dla których wartość Q modelu była statystycznie istotna $p < 0.05$. (**P1**).

## 4.3. MATERIAŁ BADAWCZY

Materiał badawczy stanowiły próby pochodząc z różnych etapów produkcji serów zagrodowych z mleka niepasteryzowanego pochodzących z gospodarstw z województwa warmińsko-mazurskiego, podlaskiego oraz mazowieckiego.

Łącznie pobrano 180 prób, pochodzących z 18 cykli produkcyjnych, które obejmowały:

- surowce i półprodukty: mleko surowe, mleko ogrzane, skrzep, solanka, serwatka
- wymazy z powierzchni mających kontakt z żywnością: tank na mleko, war, forma
- wymazy z powierzchni nie mających kontaktu z żywnością: zlewy
- wyrób gotowy.

Próbki płynne i stałe pobierano w objętości 100 ml lub 100 g do sterylnych plastikowych opakowań. Wymazy zostały pobrane za pomocą sterylnych wacików bawełnianych (Equimed, Kraków, Polska), uprzednio zwilżane w sterylnej wodzie peptonowej (0.01%) i umieszczone w probówkach z podłożem transportowym. Pobrane próby w warunkach chłodniczych były transportowane do laboratorium Katedry Mikrobiologii Żywności, Technologii i Chemii Mięsa, Wydziału Nauki o Żywności, UWM w Olsztynie. (**P2**).

## 4.4. IZOLACJA I IDENTYFIKACJA SZCZEPÓW

Do izolacji szczepów wykorzystano agar Baird-Parker (Merck, Darmstadt, Niemcy). Po 48 godzinach inkubacji w temperaturze 37 ± 1 °C, do dalszej identyfikacji wybrano jedną kolonię o morfologii typowej dla *S. aureus* (czarną i błyszczącą z cienką białą obwódką i otoczoną jasnym obszarem). Charakterystyczne kolonie bakteryjne poddano wstępnej charakterystyce z wykorzystaniem konwencjonalnych metod, które obejmowały: barwienie metodą Grama, test na katalazę oraz test koagulazy.

Kolejno przeprowadzono identyfikację za pomocą analizy MALDI-TOF MS (ang. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) z zastosowaniem urządzenia Vitek MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile) zgodnie z instrukcją producenta. Wyselekcjonowane, zidentyfikowane szczepy *S. aureus* (n=93) przechowywano w systemie Microbank w temperaturze - 80 ºC do dalszych analiz (**P2**).

## 4.5. CHARAKTERYSTYKA FENOTYPOWA I GENOTYPOWA SZCZEPÓW

### *S. AUREUS*

### 4.5.1. OKREŚLENIE WRAŻLIWOŚCI IZOLATÓW NA ANTYBIOTYKI

Profile wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe izolatów *S. aureus* określono

metodą mikrorozcieńczeń w bulionie zgodnie z normą ISO-20776-1 z wykorzystaniem 96-dołkowych płytek polistyrenowych. Do badań wykorzystano następujące antybiotyki: amikacynę, tobramycynę, klarytromycynę, wankomycynę (Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy), tigecyklinę, tetracyklinę, linezolid, nitrofurantoinę, oksacylinę, benzylopenicylinę, erytromycynę, gentamycynę, kanamycynę, cefoksytynę, azytromycynę, chinuprystynę/dalfoprystynę, trimetoprim, trimetoprim/sulfametoksazol, klindamycynę, rifampicynę, kwas fusydowy, moksyfloksacynę, chloramfenikol (TOKU-E; Bellingham, WA, USA). Roztwory podstawowe antybiotyków przygotowano przy użyciu zalecanych rozpuszczalników i rozcieńczalników zgodnie ze wspomnianą normą. Przygotowane stocki antybiotyków w każdym dniu badania rozcieńczano z zastosowaniem metody 1: 3: 7, opisaną we wspomnianej wcześniej normie ISO (Annex C: *Preparation of working dilutions of antimicrobial agents for use in broth dilution susceptibility tests*). Stężenie nanoszone na płytkę było dwukrotnie większe niż stężenie docelowe. Następnie przygotowywano zawiesinę badanego szczepu w 9 ml soli fizjologicznej. Gęstość zawiesiny doprowadzano do 0,5 w skali McFarlanda. Z tej zawiesiny przygotowywano inokulum w stężeniu $10^6$ jtk/ml, w pożywce CAMHB (Cation-adjusted Mueller Hinton Broth). Objętość inokulum, równą objętości antybiotyku, dodawano do każdego dołka płytki 96-dołkowej. Tym samym, zarówno stężenie antybiotyku jak i gęstość inokulum ulegało dwukrotnemu zmniejszeniu do gęstości $5\times10^5$jtk/ml. Zawiesina bakterii bez antybiotyku stanowiła kontrolę dodatnią natomiast czysta pożywka - kontrolę ujemną. Płytki inkubowane były w temperaturze 35±2°C w warunkach tlenowych przez 20 godzin. Po zakończeniu inkubacji dokonywano obserwacji zmętnienia pożywki. Najniższe stężenie, w którym nie zaobserwowano wzrostu bakterii (zmętnienia pożywki), stanowiło wartość MIC. Na podstawie wartości MIC badane szczepy kwalifikowano jako wrażliwe (S), wrażliwe przy zwiększonej ekspozycji (I), oraz oporne (R) (**P2**).

### 4.5.2. OKREŚLENIE ZDOLNOŚCI DO WYTWARZANIA BIOFILMU I WYDZIELANIA ŚLUZU

Zdolność do wytwarzania śluzu określano za pomocą testu agarowego z czerwienią Kongo, stosując metodę opisaną wcześniej przez Arciola i in. (2001). Szczepy hodowano na płytkach z agarem TSA (Merck, Darmstadt, Niemcy) z dodatkiem sacharozy (Sigma Aldrich, Steinheim, Niemcy) i czerwieni Kongo (Sigma Aldrich, Steinheim, Niemcy). Płytki inkubowano w temperaturze 35±2°C w warunkach tlenowych przez 20 godzin. Na podstawie wyglądu kolonii, szczepy zostały sklasyfikowane jako tworzące śluz (czarne kolonie) i nietworzące śluzu

(bordowe lub różowe kolonie).

Zdolność do wytwarzania biofilmu nadano z wykorzystaniem 96-dołkowych płytek polistyrenowych (Promed®) według metodyki zaproponowanej przez Stepanović i in. (2007).

Absorbancję mierzono przy długości fali 570 nm za pomocą spektrofotometrycznego czytnika płytek Varioscan LUX. Uzyskaną wartość porównywano z wartością OD odcięcia (ODc), którą definiowano jako trzy odchylenia standardowe powyżej średniej OD kontroli negatywnej (**P2**).

### 4.5.3. WYKRYWANIE GENÓW KODUJĄCYCH OPORNOŚĆ NA ANTYBIOTYKI, GENÓW ENTEROTOKSYN I GENÓW ZWIĄZANYCH Z BIOFILMEM WŚRÓD IZOLATÓW

Występowanie genów związanych z opornością na antybiotyki oceniano za pomocą testu PCR ze specyficznymi starterami i warunkami reakcji PCR: obecność genów odpowiedzialnych za oporność na cefoksytynę: *mec*A (Barski i in., 1996) i *mec*C (Małyszko i in., 2014), tetracykliny: *tet*M, *tet*K i *tet*L (Gevers i in., 2003; Roberts, 1994), makrolidy I linkozamidy: *msr(*A/B), *erm*A, *erm*B i *erm*C (Silva i in., 2022), β-laktamy: *bla*Z (Kaase i in., 2008) oraz aminoglikozydy: *aac(6')-Ie-aph(2")-Ia* (Padmasini i in., 2014) i *aph(2")-Ic* (Kobayashi i in., 2001). Determinanty genetyczne odpowiedzialne za zdolność do tworzenia biofilmu (*ica*ABCD, *eno*, *bap*, *agr*D, *sar*A i *sig*B) zostały zidentyfikowane zgodnie z wcześniej opisaną metodologią (Arciola i in., 2001b; Heilmann i in., 2003; B. R. Kim i in., 2016; Tristan i in., 2003). Kolejno, wśród wyizolowanych szczepów oceniono geny kodujące klasyczne enterotoksyny, toksyny enterotoksynopodobne, toksyny eksfoliatywne (*eta* i *etd*) oraz toksyny zespołu wstrząsu toksycznego (*tstt*-1) (Chajęcka-Wierzchowska i in., 2020) (**P2**).

## 4.6. ANALIZY WYKORZYSTUJĄCE SEKWENCJONOWANIE CAŁEGO GENOMU

### 4.6.1. IZOLACJA DNA

Wybrane izolaty *S. aureus* (n=16) poddano sekwencjonowaniu całego genomu techniką NGS (ang. Next-Generation Sequencing) celem dokładniejszej analizy molekularnej. DNA wykorzystane do sekwencjonowania wyizolowano z wykorzystaniem zestawu Genomic Mini AX Bacteria+ (A&A Biotechnology), według protokołu producenta (**P3**).

### 4.6.2. SEKWENCJONOWANIE TECHNIKĄ NGS

Próbki DNA, spełniające wymagania co do czystości i stężenia, mierzonego przy wykorzystaniu spektrofotometru DeNovix DS-11 (DeNovix Inc., USA) przekazywano do

sekwencjonowania do firmy zewnętrznej GENOMED (Warszawa). Biblioteki DNA zostały uzyskane z wykorzystaniem NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit (Illumina), a sekwencjonowanie przeprowadzone na platformie MiSeq Illumina®. Surowe sekwencje zostały złożone do formatu FASTA za pomocą programu SPADES. Uzyskane sekwencje wykorzystano do przeprowadzenia analizy filogenetycznej oraz określenia obecności genów powiązanych z wirulencją jak również opornością na antybiotyki i/lub chemioterapeutyki (**P3**).

### 4.6.3. ANALIZY BIOINFORMATYCZNE UZYSKANYCH GENOMÓW

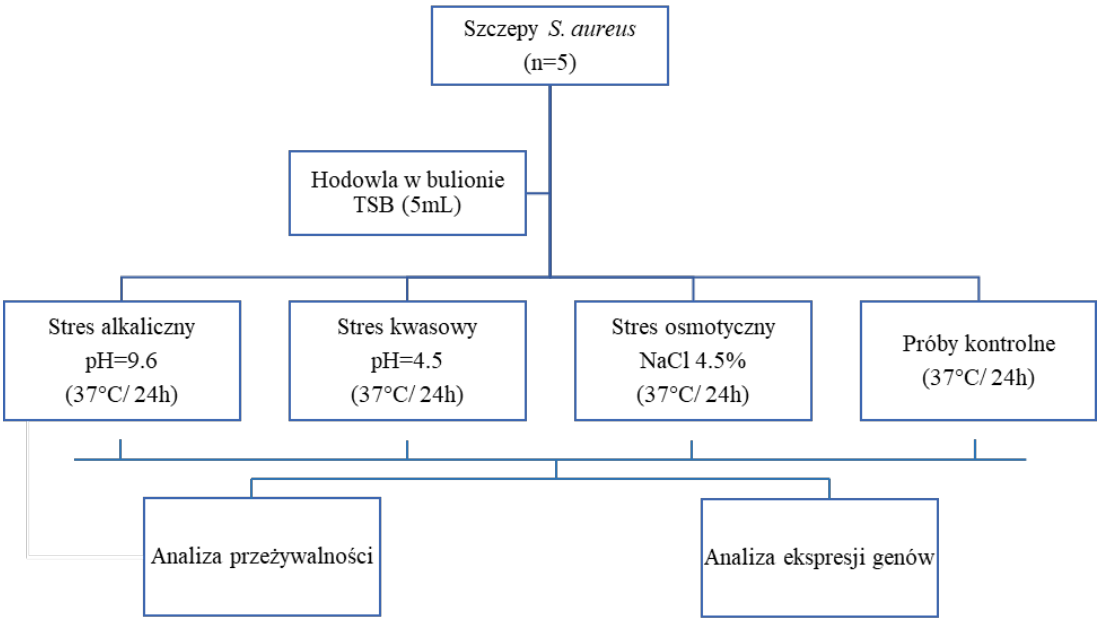
Do wykrywania genów wirulencji, typu *spa* i mobilnych elementów genetycznych wśród izolatów wykorzystano narzędzia dostępne online na stronie http://genomicepidemiology.org/, w tym VirulenceFinder 2.0 (Joensen i in., 2014), spaTyper 1.0 (Camacho i in., 2009), PlasmidFinder 2.1 (Carattoli i in., 2014) i MobileElementFinder 1.0.3 (Johansson i in., 2021). Zbiór danych Macori i in., (2020) został wykorzystany jako uzupełnienie programu VirulenceFinder. Określenie obecności genów kodujących oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe zostało zweryfikowane przy użyciu identyfikatora genu oporności (RGI) i ResFinder (Bortolaia i in., 2020). Wykrywanie profagów przeprowadzono za pomocą narzędzia PHAge Search Tool (PHAST) (Arndt i in., 2018).

Dodatkowo genomy uzyskane w badaniu porównano z publicznie dostępnymi genomami izolatów (baza danych PubMLST) związanych z przypadkami zatruć pokarmowych wywołanych przez *S. aureus* na całym świecie (**P3**).

## 4.7. WPŁYW CZYNNIKÓW STRESOWYCH ZWIĄZANYCH Z PRZEMYSŁEM SPOŻYWCZYM NA *S. AUREUS*

### 4.7.1. ODDZIAŁYWANIE CZYNNIKÓW STRESOWYCH

Na podstawie obecności co najmniej jednego genu kodującego enterotoksyny, wybrano szczepy *S. aureus* (n=5), które zostały poddane analizom określającym wpływ czynników stresowych, występujących podczas produkcji i utrwalania żywności. Stężenie NaCl i wartości pH użyte w badaniu zostały wybrane na podstawie literatury i wstępnie przeprowadzonych (Schemat 2) (**P4**).




**Rysunek 3.** Schemat blokowy opisujący projekt eksperymentu.

#### 4.7.1.1. DZIAŁANIE STRESU OSMOTYCZNEGO

Wpływ stresu osmotycznego został przetestowany przy użyciu świeżej kultury w 5 ml TSB (Merck, Darmstadt, Niemcy) dostosowanego do 4,5% NaCl. Stres ten stosowano przez 48 godzin (hodowla statyczna) w temperaturze 37°C. Jednocześnie jako kontrolę zastosowano inkubację w 5 ml TSB. Procedurę przeprowadzono w dwóch powtórzeniach (**P4**).

#### 4.7.1.2. DZIAŁANIE STRESU KWASOWEGO I ALKALICZNEGO

Wpływ różnych wartości pH (pH = 4,5 i pH = 9,6) analizowano przy użyciu hodowli w 5 ml TSB z dodatkiem 20% (v/v) NaOH i 2 M $H_3PO_4$ (do uzyskania określonego pH). Jako kontrolę wykorzystano szczepy *S. aureus* hodowane w bulionie. Eksperyment ten przeprowadzono w dwóch powtórzeniach (**P4**).

### 4.7.2. ANALIZA PRZEŻYWALNOŚCI

#### 4.7.2.1. METODA CYTOMETRYCZNA

Przygotowano roztwory podstawowe fluorochromów w proporcjach 1:1 SYTO®9 (5 mM) i PI (20 mM). Barwienie żywych (24-godzinna hodowla) i martwych (zabitych 70% izopropanolem) komórek przeprowadzono dodając 2 ml hodowli do 6 µl roztworów roboczych barwników. Dwa roztwory (LCS barwiony SYTO®9 i DCS barwiony PI) zostały użyte do

identyfikacji żywych i martwych komórek bakterii oraz do najbardziej odpowiednich parametrów cytometrycznych w celu uniknięcia zakłóceń z widm emisji. Zastosowano logarytmiczne wzmocnienie sygnału w połączeniu z rozpraszaniem do przodu, rozpraszaniem bocznym i fluorescencją. Analizy cytometryczne wykonano z zastosowywaniem cytometru przepływowego BD FASCLyric™ (Becton Sickinson, USA) (**P4**).

#### 4.7.2.2. METODA PŁYTKOWA

W celu określenia przeżywalności szczepów metodą płytkową, dla każdego szczepu wykonano serię dziesięciokrotnych rozcieńczeń przed i po ekspozycji na badane czynniki stresowe. Po inkubacji na agarze TSA w temperaturze 37°C przez 48 godzin, zliczano liczbę wyrosłych kolonii a następnie wyrażano je jako liczbę jednostek tworzących kolonie (jtk/mL) (**P4**).

### 4.7.3. ANALIZA EKSPRESJI GENÓW ENTEROTOKSYCZNOŚCI

Do izolacji całkowitego RNA wykorzystano zestaw Total RNA Mini Plus Kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). W kolejnym etapie do oczyszczenia i koncentracji uzyskanego RNA wykorzystano zestaw Clean-Up RNA Concentrator Kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Aby sprawdzić integralność RNA, przeprowadzano rozkład elektroforetyczny, nanosząc 10 µL na 1,2% żelu agarozowego w 0,5% buforze TBE i poddano działaniu napięcia 90 V przez 1 h. Integralność RNA określono poprzez wizualizację dwóch pasm (16S i 23S RNA) z wykorzystaniem systemu do dokumentacji i wizualizacji żeli G-BOX (Syngene, UK). Następnie wszystkie próbki RNA wykorzystano do syntezy pierwszorzędowego cDNA przy użyciu zestawu TranScriba Kit (A&A Biotechnology, Polska), stosując jako starter dN-heksamer.

Uzyskane cDNA był następnie przechowywany w temperaturze -20°C do dalszej analizy. Analizę ekspresji genów przeprowadzono przy użyciu RotorGene Q-System (Qiagen Inc., Montreal, ON, Kanada). Dla każdego badanego genu przeprowadzono trzy niezależne reakcje. Jako gen referencyjny wybrano gen 16S rRNA. Dla każdej pary starterów wydajność amplifikacji obliczono jako E = 10 (-1/slope). Ekspresję genów wśród badanych próbek analizowano za pomocą względnej kwantyfikacji, w której ekspresja odpowiedniego genu jest znormalizowana do genów porządkowych, przy użyciu modelu matematycznego zaproponowanego i zatwierdzonego przez Pfaffi (2001). Do analiz wykorzystano sekwencje primerów i warunki reakcji opisano uprzednio (He & Ahn, 2011; Leke i in., 2017; Mørk i in.,

2010; Şanlıbaba, 2022) (**P4**).

## 4.8. ANALIZA STATYSTYCZNA

Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism w wersji 8.0 (GRAPH PAD Software Inc, San Diego, CA, USA). Wyniki uznawano za statystycznie istotne przy $p < 0,05$. Do analizy na dużą skalę i wizualizacji danych wykorzystano platformę statystyczną R (https://www.r-project.org) oraz program RStudio (https://rstudio.com/). (**P2, P4**).

*Szczegółowy opis zastosowanych technik i metod badawczych przedstawiono w publikacjach będących podstawą niniejszej pracy.*

**4.2** w publikacji

**P1. Gajewska, J.,** Zakrzewski, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Meta-analysis of the global occurrence of *S. aureus* in raw cattle milk and artisanal cheeses. *Food Control*, 147, 109603. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2023.109603

**4.3-4.5** w publikacji

**P2. Gajewska, J.,** Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2022). Occurrence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* Strains along the Production Chain of Raw Milk Cheeses in Poland. *Molecules*, 27. https://doi.org/https://doi.org/10.3390

**4.6.** w publikacji

**P3. Gajewska, J.,** Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Genomic characterisation of the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from the cheese chain production. *International Dairy Journal*, 105774. https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2023.105774

**4.7.** w publikacji

**P4**. **Gajewska J**, Zakrzewski AJ, Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A. (2023) Impact of the food-related stress conditions on the expression of enterotoxin genes among *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*, 12(7):954. https://doi.org/10.3390/pathogens12070954

# 5. REZULTATY PRZEPROWADZONYCH BADAŃ

## 5.1. GLOBALNE WYSTĘPOWANIE *S. AUREUS* W MLEKU SUROWYM I SERACH Z MLEKA NIEPASTERYZOWANEGO

W wyniku analizy globalnych danych dotyczących występowania *S. aureus* w mleku surowym i serach z mleka niepasteryzowanego w latach 2011-2021 wykazano, że gronkowce *S. aureus* zostały wyizolowane z 29,07% próbek mleka i 42,81% próbek serów. Najczęstszą izolację zaobserwowano z surowego mleka krowiego 32,23% (95% CI: 29,53-34,92), a najrzadziej z mleka owczego: 18,78% (95% CI: 13,48-24,08). W przypadku prób serów szczepy *S. aureus* najczęściej izolowano z serów z mleka koziego, 68,33% (95% CI: 0-100). Ze względu na niewielką liczbę publikacji zawierających informacje na temat obecności MRSA w próbkach sera, nie dokonano rozróżnienia między rodzajami mleka, z którego je wyprodukowano. Na podstawie przeprowadzonych analiz ustalono, że szczepy MRSA były obecne w 1,69% (95% CI: 0-3,38) próbek sera ogółem. W próbkach mleka wykazano, że stosunkowo często szczepy MRSA izolowano z mleka bawolego, obecność tych szczepów stwierdzono w 4,03% próbek (95% CI: 2,04-6,75). Najrzadziej szczepy MRSA były izolowane z mleka owczego (1,24% (95% CI: 0,79-1,89) (**P1, Tabela 2**).

Analiza statystyczna wykazała, że różnice w obrębie grup są znaczące a wartość p wynosi < 0,000001, jednak różnice między grupami nie są istotne, a wartość p wynosi 0,09945. Wyniki łącznej częstości występowania *S. aureus* i MRSA w mleku i serach przedstawiono na wykresach forestplt **(P1. Wykres S1-S6).**

Wyniki badań uwzględnionych w metaanalizie charakteryzowały się wysoką heterogenicznością, a wartość $I^2$ wynosiła 92,54% dla próbek mleka i 54% dla próbek sera. Wartości dla testu Eagger wynosiły 0,026269 i < 0,000001 odpowiednio dla prób sera i mleka **(P1. Rysunek 2).**

Ze względu na największą liczbę publikacji określających obecność szczepów *S. aureus* i MRSA z próbek mleka krowiego, kolejne analizy przeprowadzono właśnie na tych danych. Częstość występowania MRSA i *S. aureus* wśród regionów geograficznych w analizie podgrup przedstawiono w **P1, Rysunek 3 i 4**. W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano, że częstość występowania *S. aureus* wynosiła 33,29% (95% CI 27,48-39,10) wśród 9583 próbek z mleka krowiego w Azji, 27,81% (95% CI 24,82-30,79) wśród 27 102 próbek w Europie, 35,04% (95% CI 10,37-59,70) wśród 5527 próbek w Ameryce Północnej, 27,89% (95% CI 2,90-52,87) wśród 1424 próbek w Ameryce Południowej i 32,62% (95% CI 17,62-47,61) wśród 7446 próbek w Afryce i 57,79% (95% CI 13,02-100) wśród 312 próbek w Oceanii.

Na podstawie analizy częstości występowania *S. aureus* i MRSA w krajach rozwiniętych i rozwijających się częstość występowania *S. aureus* w krajach rozwiniętych wynosiła 32,84% (95% CI 32,23-33,36), a w krajach rozwijających się 32,19% (95% CI 31,52-32,86). Częstość występowania MRSA w krajach rozwiniętych wynosiła 1,45% (95% CI 1,29-1,62), a w krajach rozwijających się wynosiła 4,13% (95% CI 3,69-4,62). Wykazano trend spadkowy w częstości występowania *S. aureus* w próbkach mleka krowiego, wartość współczynnika beta wynosiła -0,005913, jednak wartość p dla modelu wynosiła 0.232986. Odmienne wyniki uzyskano dla częstości występowania szczepów MRSA, gdzie zaobserwowano trend wzrostowy, który wyniósł 0,000934, choć tutaj również brak istotności statystycznej, a wartość p dla modelu wynosiła 0.432963.

## 5.2. WYSTĘPOWANIE *S. AUREUS* W ŁAŃCUCHU PRODUKCJI POLSKICH SERÓW ZAGRODOWYCH

W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano obecność szczepów *S. aureus* w 93/180 (51,7%) wszystkich analizowanych prób. Obecność tego patogenu wykazano na każdym etapie produkcji serów zagrodowych, w tym m.in. w próbach mleka surowego (10/18; 55.6%), mleka ogrzanego do temperatury 42±0,5°C (13/18; 72.2%) czy próbach serów gotowych do spożycia (10/18; 55.6%). *S. aureus* wykryto również na powierzchniach mających kontakt z żywnością – w tym zbiorniku do przechowywania mleka (8/18; 44.4%), naczyniu do produkcji serów (8/18; 44,4%) jak również niewielkim odsetku na powierzchniach nie mających kontaktu z żywnością: zlewy (2/18; 11,1%) (**P2, Tabela 1**).

## 5.3. ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ SZCZEPÓW *S. AUREUS* I ICH GENETYCZNE DETERMINANTY

Wśród wszystkich badanych izolatów *S. aureus* najczęściej stwierdzano oporność na benzypenicylinę (54/93 (58,1%)), a następnie na tobramycynę (32/93 (34,4%)). Izolaty były również oporne na antybiotyki z grupy makrolidów: azytromycynę, klarytromycynę i erytromycynę: odpowiednio 17/93 (18,3%), 15/93 (16,1%) i 21/93 (22,6%). Oporność na tetracyklinę i tigecyklinę należące do klasy tetracyklin wykazano odpowiednio wśród 19/93 (20,4%) i 22/93 (23,7%) izolatów. Wśród badanych izolatów wykazano również fenotypową oporność na oksacylinę (9/93 (9,7%)) i cefoksytynę (12/93 (12,9%). Oporność izolatów na inne badane antybiotyki wahała się od 1,1% do 16,1%, przy czym żaden z izolatów nie był oporny na gentamycynę, klindamycynę, rifampicynę, moksyfloksacynę czy chloramfenikol (**P2, Tabela 2**).

Wśród badanych izolatów *S. aureus*, 21/93 (22,6%) określono jako szczepy wielolekooporne (MDR), co oznacza oporność na co najmniej trzy antybiotyki z różnych klas.

Warto podkreślić, że wśród badanych izolatów 12/93 (12,9%) zostało zdefiniowanych jako MRSA na podstawie testu MIC cefoksytyny/oksacyliny oraz posiadały gen *mec*A. Ponadto na podstawie wyników wartości MIC ≥2mg/mL dla wankomycyny dwa szczepy 2/93 (2,2%) zostały sklasyfikowane jako wankomycynooporne VRSA.

Badania dotyczące genetycznych podstaw oporności na antybiotyki wykazały wysoką częstość występowania genu *blaZ* (89/93; 95,7%), kodującego penicylinazę. Wszystkie izolaty wykazujące fenotypową oporność na cefoksytynę posiadały gen *mec*A (12/93;12,9%). Mimo, że niewielki odsetek szczepów wykazywał fenotypową oporność na tetracyklinę, wyniki badań wykazały wysoki odsetek szczepów posiadających geny: *tet(*K) (59/93; 63,4%), *tet*(L) 16/93; 17,2%) i *tet*(M) (76/93; 81,7%). Wśród badanych izolatów stwierdzono również obecność genów związanych z opornością na antybiotyki z grupy aminoglikozydów: *aac*(6′)-Ie-*aph*(2″)-Ia (56/93; 60,2%) i *aph*(3′)IIIa (86/93; 92,5%) izolatów. Wykazano również obecność genów związanych z opornością na makrolidy: *erm*B (27/93;29,0%) (**P2, Tabela 3**).

## 5.4. CZYNNIKI WIRULENCJI WŚRÓD BADANYCH IZOLATÓW

Wszystkie analizowane szczepy posiadały zdolność do tworzenia biofilmu, przy czym, wykazywały różną intensywność w jego produkcji: słaby (33/93; 35,4%), umiarkowany: (2/93; 2,2%) i silny: (58/93; 62,4%) (**P2, Tabela 4**). Nie stwierdzono związku między produkcją śluzu a zdolnością do tworzenia biofilmu ($p < 0,05$). Pośród badanych genetycznych determinant związanych z wytwarzaniem biofilmu i właściwościami adhezyjnymi wykazano, że najczęściej występujący był gen *eno* (białko wiążące lamininę), który zaobserwowano wśród wszystkich izolatów. Ponadto, *bap* (białko związane z biofilmem) stwierdzono wśród 32/93; 34,4% wszystkich izolatów. Dodatkowo w materiale genetycznym badanych izolatów stwierdzono również obecność genów: *sig*B (42/93; 45,2%), *sar*A (74/93; 79,6%) i *agr*D (33/93; 35,5%).
Po przeanalizowaniu związku między genami wirulencji a tworzeniem biofilmu wykazano, że istniały istotne korelacje między występowaniem genu *agr*D a tworzeniem biofilmu. Wśród wszystkich izolatów stwierdzono dodatnią, ale nieistotną korelację między występowaniem genu *agr*D i *sar*A oraz *sig*B i *sar*A ($p < 0,05$) (**P2, Rysunek 1**).

Osiemdziesiąt dziewięć z 93 badanych izolatów *S. aureus* (95,7%) posiadało co najmniej jeden gen kodujący enterotoksynę. Zaobserwowano, że geny kodujące SEIs występowały częściej niż geny kodujące klasyczne enterotoksyny (SEs). Wśród genów kodujących SEI najczęściej rejestrowano obecność *selk* (61,3%), a następnie *selq* (58,1%), *seg*

(46,2%), *seln* (45,2%), *selu* (31,2%), *selm* (19,4%) i *selj* (28%). Warto zauważyć, że najwyższy odsetek obecności genów enterotoksyczności stwierdzono wśród szczepów wyizolowanych z produktów gotowych (**P2, Tabela 4**). Analiza statystyczna wykazała dodatnią korelację pomiędzy współwystępowaniem niektórych genów enterotoksyn, np. *selp* i *selk*, *selp* i *selu*, *selm* i *selk*, *selm* i *selo* oraz *selm* i *seg*.

Analiza statystyczna nie wykazała statystycznie istotnych różnic między źródłem izolacji *S. aureus* a zdolnością do wytwarzania śluzu ($p > 0,999$), opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe ($p = 0,4703$) czy występowaniem genów wirulencji ($p > 0,999$). Aby systematycznie wykazać wszystkie takie związki w sposób bezstronny, przeanalizowano również wszystkie potencjalne pary zmiennych (z wyjątkiem tych, które były całkowicie obecne lub całkowicie nieobecne wśród wszystkich (n=93) izolatów. Wśród zaobserwowanych korelacji znaleźliśmy dodatnie korelacje między zdolnością szczepów do tworzenia biofilmu a fenotypową opornością na wszystkie testowane antybiotyki. (**P2, Rysunek 1**).

### 5.4.1. OMÓWIENIE GENOMÓW *S. AUREUS*

Sekwencjonowanie wybranych genomów izolatów (n=16) wykazało, że należą one do różnych typów sekwencyjnych, przy czym większość z nich (6/16) należy do ST 109, kolejno izolaty zakwalifikowano do ST 130 (3/16) i ST 7 (3/16). Pojedyncze izolaty zakwalifikowano do ST 5, ST 97, ST 352 oraz ST398. Szczepy należące do ST 109 wykazywały typ *spa*: t693, a szczep ST 130 - t3218, ST 7 - t91. Pozostałe charakteryzowały się odmiennym typem *spa* w zależności od ST: ST5-t2, ST97-t1109, ST352-t359 oraz ST398-t571 (**P3, Tabela 2**). Powiązania filogenetyczne badanych izolatów na podstawie analizy cgMLST przedstawiono w **P3, Rysunek 1**.

Analiza całego genomu pozwoliła na dogłębne poznanie cech genetycznych izolatów, co może być istotne dla lepszego zrozumienia patogenezy, ewolucji i strategii zwalczania tego patogenu Wykazano, że wiele genów wirulencji było powiązanych z określonymi typem ST (**P3, Rysunek 2**). Gen *sea* kodujący klasyczną enterotoksynę SEA stwierdzono tylko u jednego izolatu należącego do ST5. Występowanie genów leukocydyn *luk*D i *luk*E stwierdzono u 9 szczepów należących do ST7 i ST109.

Dodatkowo analiza całego genomu pozwoliła na określenie mobilnych elementów genetycznych. Spośród wszystkich szczepów, plazmidy typu *rep* stwierdzono tylko u trzech izolatów. Wyspy patogenności gronkowców odnotowano wśród 13 (81,3%) badanych izolatów, przy czym najczęściej występowała ISSau3 (**P3, Tabela 3**).

### 5.4.2. PORÓWNANIE IZOLATÓW Z GLOBALNYMI IZOLATAMI ZWIĄZANYMI Z SFP

Zsekwencjonowane genomy bakteryjne (n=16) poddano analizie porównawczej z publicznie dostępnymi genomami (n=230) (baza danych PubMLST) wyizolowanymi z przypadków zatruć pokarmowych wywołanych przez *S. aureus* na całym świecie. Analiza cgMLST wykazała, że szczepy *S. aureus*, odpowiedzialne za zatrucia pokarmowe na całym świecie, w większości należały do CC8. Pomimo, że żaden z badanych izolatów nie należał do tego CC, wykazano, duże podobieństwo analizowanych szczepów z łańcucha produkcji serów zagrodowych w Polsce do izolatów należących do CC5, CC97 i CC1 (**P3, Rysunek 4**). Uzyskane wyniki sugerują, że badane szczepy mogą mieć potencjał do wywoływania infekcji u ludzi i zatruć pokarmowych.

## 5.5. OCENA WPŁYWU CZYNNIKÓW STRESOWYCH NA PRZEŻYWALNOŚĆ SZCZEPÓW *S. AUREUS*

Określenie przeżywalności *S. aureus* po ekspozycji na badane czynniki stresowe przedstawiono w **P4. Tabela 3**. Najwyższe wskaźniki przeżywalności (wartości średnie) *S. aureus* zaobserwowano po ekspozycji na pH = 9,6 (średnio 95,68%), podczas gdy najniższy wskaźnik przeżywalności zaobserwowano w odpowiedzi na pH = 4,5 (średnio 73,04%). W związku z tym największą redukcję komórek bakteryjnych zaobserwowano po traktowaniu pH = 4,5 (średnio 26,96%). Na podstawie analizy statystycznej nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między przeżywalnością szczepów uzyskanych metodą płytkową i metodą cytometrii przepływowej ($p > 0,05$).

## 5.6. EKSPRESJA GENÓW ENTEROTOKSYCZNOŚCI

Analizy dotyczące ekspresji genów enterotoksyczności wśród badanych izolatów wykazały, że większość badanych genów enterotoksyn, po ekspozycji na stres pH = 4,5, ma podobną ekspresję jak w warunkach optymalnych. Najwyższą ekspresję zaobserwowano dla genu *selu* (średnio 1,6). W przypadku genu *selp*, który występował w dwóch szczepach, nie zaobserwowano znaczącego spadku poziomu ekspresji (względne poziomy ekspresji genów <0,5). W szczepie 47 G odnotowano obniżenie ekspresji, której wartość wynosiła 0,52 **(P4, Rysunek 2).**

Pod wpływem stresu zasadowego (pH = 9,6) stwierdzono, że podobnie jak w przypadku stresu kwasowego, wśród większości testowanych genów enterotoksyn zaobserwowano

podobną ekspresję jak w warunkach optymalnych. Wyższy poziom ekspresji zaobserwowano dla genów *selu* i *selo*, które wynosiły średnio odpowiednio 1,67 i 1,32. Wyższy, znaczący spadek poziomu ekspresji zaobserwowano dla genu *sea*, który wynosił 0,21. **(P4, Rysunek 3).** Wyniki statystyczne wykazały znaczące różnice w ekspresji genów w obrębie szczepu ($p < 0,05$).

Analiza ekspresji genów w odpowiedzi na stres wywołany przez NaCl wykazała, że ekspresja *selp* spadła, ale spadek ten nie był znaczący (względny poziom ekspresji genów >0,5). W odpowiedzi na ten stres, dla genów *selu*, *selm* i *selo* zaobserwowano wzrost względnej ekspresji, ale nie został on określony jako znaczący (średnia odpowiednio 1,77; 1,42; 1,30). Zaobserwowano znaczny spadek ekspresji genu *sea* (<0,5) **(P4, Rysunek 4).**

*Szczegółowy opis uzyskanych wyników przedstawiono w publikacjach będących podstawą niniejszej pracy.*

**5.1** w publikacji

**P1. Gajewska, J.,** Zakrzewski, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., 2023. Meta-analysis of the global occurrence of *S. aureus* in raw cattle milk and artisanal cheeses. Food Control 147, 109603. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2023.109603

**5.3-5.4** w publikacji

**P2. Gajewska, J.,** Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2022). Occurrence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* Strains along the Production Chain of Raw Milk Cheeses in Poland. *Molecules*, 27. https://doi.org/https://doi.org/10.3390

**5.5-** w publikacji

**P3. Gajewska, J.,** Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Genomic characterisation of the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from the cheese chain production. *International Dairy Journal*, 105774. https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2023.105774

**5.6-5.7 w** publikacji

**P4**. **Gajewska J**, Zakrzewski AJ, Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A. (2023) Impact of the food-related stress conditions on the expression of enterotoxin genes among *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*, 12(7):954. https://doi.org/10.3390/pathogens12070954

# 6. DYSKUSJA

*S. aureus* jest oportunistycznym patogenem znanym z wywoływania poważnych infekcji u ludzi i zwierząt (Brahma i in., 2022). Ze względu na rosnącą na całym świecie tendencję do spożywania niepasteryzowanego (surowego) mleka i produktów mlecznych, takich jak sery z surowego mleka, ważne jest monitorowanie ryzyka mikrobiologicznego związanego ze spożywaniem tych produktów (Cardozo i in., 2021). Określenie częstości występowania *S. aureus* jest istotnym krokiem dla interwencji mających na celu kontrolę pojawiania się i przenoszenia tego patogenu. Pomimo istniejących na całym świecie kryteriów bezpieczeństwa żywności dla *S. aureus*, częstość występowania tego patogenu w surowym mleku i serach z surowego mleka jest wysoka. Mnogość ognisk chorób przenoszonych przez żywność związanych ze skażonymi produktami mleczarskim wskazuje na znaczenie *S. aureus* dla zdrowia publicznego. Doniesienia literaturowe wykazały, że zwierzęta mleczne są prawdopodobnie głównym źródłem zanieczyszczenia surowego mleka *S. aureus* (Gebremedhin i in., 2022)

Uzyskane w metaanalizie (**P1**) wyniki wykazały, że *S. aureus* został wyizolowany z 29,07% próbek surowego mleka na całym świecie w ciągu ostatnich 10 lat. W porównaniu z wcześniejszymi doniesieniami, zaobserwowano spadek częstości występowania *S. aureus* w próbkach surowego mleka krowiego w latach 2000-2016 (33,5%) %) (Ou i in., 2018) w porównaniu z wynikami uzyskanymi w **publikacji P1** w latach 2011-2021 (29,07%).

Pasteryzacja i obróbka cieplna jest ważnym procesem wpływającym na poprawę zdrowia konsumentów i przyczyniła się do spadku liczby zakażeń gronkowcami (James i in., 2021). Dlatego zanieczyszczone produkty spożywcze są możliwym źródłem infekcji u ludzi, ale wydają się stanowić niewielkie ryzyko (EFSA, 2022). Niemniej jednak, brak obróbki termicznej może stanowić wyzwanie dla zapewnienia bezpieczeństwa żywności. Wyniki uzyskane w publikacji **P1**, będącej częścią niniejszej rozprawy doktorskiej wykazały, że szczepy *S. aureus* występowały w 42,81% próbek sera z surowego mleka w ciągu ostatnich 10 lat.

Według raportu Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA, 2022) żywność, w tym mleko i przetwory mleczne, nie jest uznawana za potencjalne źródło szczepów MRSA, jednak niewiele krajów dobrowolnie raportuje szczepy MRSA izolowane z żywności. Ostatni raport dotyczący szczepów MRSA zawierał dane tylko z jednego kraju (Niemcy 2019), w którym częstość występowania tych szczepów wyizolowanych z surowego mleka osiągnęła 7,7%. W związku z tym przedstawiona metaanaliza dostarcza cennych informacji na temat

liczby izolatów MRSA w ciągu ostatniego dziesięciolecia. Częstość występowania szczepów MRSA była zróżnicowana na całym świecie i wynosiło 13,06% w Afryce, 4,99% w Azji i 1,08% w Europie, 1,89% w Ameryce Północnej. Przeprowadzona metaanaliza i uzyskane wyniki wykazały niską częstość występowania MRSA w surowym mleku pozyskanym od zdrowych zwierząt, niemniej jednak jego częstość występowania wzrosła w ciągu ostatnich 10 lat (0,000934; brak istotności statystycznej, wartość p dla modelu wynosiła 0,432963). Dane literaturowe wskazują, że częstość występowania szczepów MRSA u zwierząt mlecznych i produktów mlecznych jest niska w porównaniu z innymi gatunkami zwierząt i nie przekracza 5% (Schnitt & Tenhagen, 2021).

W Europie decyzja wykonawcza Komisji (UE) 2020/17292 nie zobowiązuje do monitorowania i zgłaszania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe u *S. aureus*. Warto jednak podkreślić, że uzyskane wyniki jak również doniesienia innych autorów, sugerują że częstość występowania MRSA może znacznie wzrosnąć na przestrzeni lat, przynajmniej w niektórych krajach (Fetsch i in., 2021; Song i in., 2016; Tenhagen i in., 2018). Dlatego też wzrost liczby MRSA stanowi poważny problem dla zdrowia publicznego i zasługuje na ciągłe monitorowanie oporności na metycylinę jak również monitorowanie wzorców wrażliwości na antybiotyki wśród tego patogenu.

Mając powyższe na uwadze, istotna stała się celowość przeprowadzonych badań, mających na celu oszacowanie częstości występowania i uwarunkowań genetycznych wśród szczepów *S. aureus* co może ułatwić wdrażanie racjonalnych strategii łagodzenia skutków i uniknąć rozprzestrzeniania się tego patogenu w łańcuchu pokarmowym.

Różne wyniki dotyczące częstości występowania *S. aureus* w różnych krajach mogą być związane z różnicami w produkcji sera na całym świecie. Zakłada się, że obecność *S. aureus* serach zagrodowych może wynikać z niskiej jakości surowca, wynikającej ze złych warunków higienicznych podczas produkcji i nieodpowiednich warunków przechowywania, nieczystych rąk pracowników i/lub nieprzestrzegania podstawowych zasad GMP i GHP.

Biorąc pod uwagę wiele czynników wpływających na jakość produktu końcowego niniejsza praca traktuje o różnorodności szczepów *S. aureus* wyizolowanych z łańcucha produkcji serów z mleka niepasteryzowanego w Polsce, pozwalając określić genetyczne determinanty odpowiedzialne za jego ewolucje i potencjał patogenny.

Nadrzędnym celem publikacji **P2** było określenie występowania, oporności na antybiotyki i czynników wirulencji wśród szczepów *S. aureus* wyizolowanych na różnych etapach produkcji serów z surowego mleka. Według mojej wiedzy aktualnie niewiele badań koncentruje się na ocenie całego łańcucha produkcji serów z niepasteryzowanego mleka.

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano, że wśród badanych szczepów *S. aureus* najczęściej występowała oporność na β-laktamy (w tym penicylinę). Obserwacje te są zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy w ostatnich latach donosili o ogólnoświatowym wzroście oporności *S. aureus* na antybiotyki β-laktamowe (Aragão i in., 2019; Kayili & Sanlibaba, 2020; Panchal i in., 2020; Şanlıbaba, 2022). Wysoki odsetek szczepów opornych na penicylinę może wynikać z częstości stosowania tego antybiotyku w leczeniu zakażeń bydła w Polsce (Rola i in., 2016). Tetracykliny są często używane do leczenia infekcji u bydła (Liu i in., 2017). W przeprowadzonym badaniu stwierdzono niższą częstość występowania oporności szczepów na tetracykliny (19/93 (20,4%)) w porównaniu do innych badań, które wykazały oporność na ten antybiotyk u szczepów *S. aureus* w zakresie od 19% do 100% (Alves i in., 2018; Massawe i in., 2019). Innym antybiotykiem, na który badane szczepy były oporne, była erytromycyna (21/93 (22,6%)), która jest antybiotykiem makrolidowym. Makrolidy są powszechnie stosowane w leczeniu mastitis u bydła. Erytromycyna jest również stosowana w leczeniu zakażeń gronkowcowych u pacjentów, którzy są uczuleni na penicylinę (Kayili & Sanlibaba, 2020). Istotne jest podkreślenie, że uzyskane w ramach realizacji niniejszej pracy wyniki oporności przeciwdrobnoustrojowej ściśle korelują z antybiotykami stosowanymi w leczeniu zakażeń bydła w Polsce. Według raportu Europejskiej Agencji Leków, w Polsce w 2020 r. tetracykliny, penicyliny i makrolidy stanowiły ponad 70% wszystkich sprzedanych weterynaryjnych środków przeciwdrobnoustrojowych (European Medicines Agency & Agency, 2019). Obserwacje te podkreślają istotność uświadamiania i racjonalnego stosowania antybiotyków w produkcji zwierzęcej. Alarmujące jest również wykazanie szczepów wielolekoopornych (22,6%).

Warto zauważyć, że wysoka częstość występowania *S. aureus* jako nosicieli genu *blaZ* oraz identyfikacja szczepów opornych na metycylinę wśród izolatów z serów stanowi zagrożenie dla zdrowia konsumentów takich produktów. Z punktu widzenia zdrowia publicznego ważne jest ciągłe monitorowanie *S. aureus* w mleku i produktach mlecznych oraz ich środowisku produkcyjnym. Ciągłe monitorowanie pozwoli na zapewnienie środków łagodzących zagrożenie dla zdrowia publicznego związane z tym opornym patogenem (Aliyu i in., 2022).

Zgodnie z uzyskanymi wynikami i ustaleniami Ammar i in., (2016), ważne jest, aby stosować kompleksowe środki kontroli podczas lokalnej produkcji serów, a rozsądne stosowanie antybiotyków powinno być stosowane w celu przezwyciężenia rozprzestrzeniania się AMR i zminimalizowania ryzyka infekcji u ludzi.

Kolejnym istotnym aspektem jest zdolność szczepów do wytwarzania biofilmu. Tworzenie biofilmu przez *Staphylococcus* spp. jest ewolucyjną przewagą tego mikroorganizmu, ponieważ

komórki bakteryjne są odporne na niekorzystne warunki środowiskowe, takie jak środki przeciwdrobnoustrojowe i dezynfekujące czy też promieniowanie UV (Castro i in., 2020). Uzyskane wyniki wykazały, że 59/93 (63,4%) izolatów było w stanie wytworzyć biofilm. Podobny odsetek szczepów zdolnych do tworzenia biofilmu wykazano w badaniu Castro i in. (2020), którzy sklasyfikowali 69,7% izolatów jako tworzące biofilm. Za główny czynnik odpowiedzialny za produkcję biofilmu wśród *S. aureus* uważa się PIA, który wraz z innymi polimerami, takimi jak kwasy teichojowe, białka i zewnątrzkomórkowe DNA (eDNA), stanowi główną część macierzy zewnątrzkomórkowej tworzącej biofilm przez *S. aureus*. Geny zawarte w operonie *ica* są odpowiedzialne za biosyntezę PIA i obejmują transferazę N-acetyloglukozaminy (*ica*A i *ica*D), deacetylazę PIA (i*ca*B) i eksporter PIA (*ica*C) (Sugimoto i in., 2018). Obecność tego operonu wykazano wśród 26,9% badanych izolatów. Zgodnie z literaturą, oprócz fenotypowej zdolności do wytwarzania biofilmu i obecności operonu *ica*, zjawisko to może być związane z obecnością innych białek (niezależnych od PIA), które są niezależne od operonu *ica* (Kirmusaoglu, 2016). W związku z tym konieczne jest określenie występowania innych genów odpowiedzialnych za tworzenie biofilmu i zastosowanie ich do badania tworzenia biofilmu na sprzęcie i naczyniach gospodarstwa mleczarskiego (Cai i in., 2021).

W przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badaniach stwierdzono, że większość badanych izolatów była nosicielami genów kodujących niektóre z badanych enterotoksyn. W literaturze autorzy wskazują na współwystępowanie genów *sed* i *selj* ze względu na wspólną lokalizację tych genów na tym samym plazmidzie (Rola i in., 2016; Zhang i in., 1998), co nie zostało potwierdzone wynikami niniejszego badania. Jednak Jørgensen i in., (2005) wykazali, że ponad 50% szczepów *S. aureus* izolowanych z mleka krowiego i 14,7% izolowanych z różnych etapów produkcji sera posiadało geny enterotoksyn, ale zidentyfikowano tylko markery *seg* i *sei*.

Dodatkowo, oprócz charakterystyki szczepów metodą PCR przedstawionej w publikacji **P2** dokonano kompleksowej analizy wirulomu wybranych szczepów z zastosowaniem technologii sekwencjonowania całego genomu (**P3**). Wykazana obecność różnych typów ST w łańcuchu produkcyjnym wskazuje na bioróżnorodność *S. aureus*. W niniejszym badaniu stwierdzono, że najbardziej rozpowszechnionymi typami wśród wszystkich szczepów były ST 109; CC1 i t693. Wiadomo, że CC1 obejmuje różne szczepy *S. aureus* oporne na metycylinę (CA-MRSA). Chociaż CC5 kojarzone są ze środowiskiem szpitalnym w kilku krajach, izolaty ST5/CC5 wykazano w wymazach w łańcuchu produkcji sera. Zgodnie z danymi literaturowymi, szczepy CC97 w większości pochodzą od zwierząt, obecność tego izolatu wśród badanych szczepów

może być wynikiem niehigienicznych praktyk. Jeden ze szczepów w poddanych sekwencjonowaniu należy do ST398, która jest linią opisaną jako kolonizująca zwierzęta gospodarskie, np. krowy, cielęta, konie i świnie (Silva, Alfarela, i in., 2022; Zhao i in., 2021). Izolaty ST398 pochodzące od zwierząt są w większości oporne na metycylinę (Price i in., 2012). W przeprowadzonym badaniu u szczepu ST398 nie wykryto genów kodujących oporność na metycylinę, niemniej jednak zgodnie z danymi literaturowymi występowanie tego klonu w łańcuchu pokarmowym nie powinno być ignorowane, ponieważ odnotowano infekcje u ludzi wywołane przez szczepy MSSA (methicillin-sensitive Staphylococcus aureus) ST398 (Li i in., 2015).

Określenie typów sekwencyjnych badanych izolatów i powiązanie ich z dostępnymi danymi literaturowymi sugeruje, że obecność *S. aureus* w badanych łańcuchach produkcji żywności jest wynikiem nieodpowiednich praktyk higienicznych w gospodarstwach. Niezwykle istotne, jest stwierdzenie obecność tych samych ST na różnych etapach produkcji co wskazuje na przeżywalność tego patogenu, która zależy od etapów produkcji podczas wytwarzania sera, właściwości fizyko-chemicznych sera (pH, zawartość soli, aktywność wody) oraz wymagań wzrostu mikroorganizmów (Kousta i in., 2010). Przewidywanie patogeniczności izolatów dla ludzi dało wysoki średni wynik prawdopodobieństwa (Pscore ~0,982). Podsumowując, wyniki badań przedstawione w publikacji **P3** potwierdzono potencjał patogenny szczepów *S. aureus.*

Aby zagwarantować bezpieczeństwo żywności, kluczowe jest ustanowienie norm mikrobiologicznych dla oznaczania liczby *S. aureus* i wykrywania enterotoksyn w produktach spożywczych. Pomimo ich powszechnego stosowania, normy te mają kilka ograniczeń. Jednym z nich jest to, że liczba komórek *S. aureus* nie zawsze jest wystarczającym wskaźnikiem obecności enterotoksyn w żywności. Jest to związane z faktem, że nie wszystkie szczepy *S. aureus* są enterotoksyczne i/lub wykazują ekspresję enterotoksyn. Warto zauważyć, że pomimo faktu, że większość komórek *S. aureus* może zostać zredukowana przy użyciu obróbki cieplnej, enterotoksyny gronkowcowe wykazując odporność na wysokie temperatury nadal mogą wykazywać aktywność biologiczną i być czynnikiem wywołującym zatrucia pokarmowe.

Zgodnie z przepisami, badanie enterotoksyny jest obowiązkowe tylko wtedy, gdy wartości komórek *S. aureus* przekraczają $10^5$ jtk/g. nawet w przypadkach, gdy liczba ta w produkcie gotowym jest niższa, obecność enterotoksyn może być nadal identyfikowana. Sugeruje się, że obecność enterotoksyn w gotowych produktach przy poziomie komórek $<10^5$ jtk/g może być związana z szybkością osiągnięcia odpowiedniego poziomu komórek i produkcji enterotoksyn w początkowych etapach produkcji, a następnie kolejne etapy, w tym np. ogrzewanie może wpłynąć na redukcję liczby komórek S. aureus, przy zachowaniu wytworzonej przez szczepy

enterotoksyny (Johler i in., 2015; Schwendimann i in., 2021).

Uzyskane w ramach realizacji niniejszej pracy badania wykazały, że testowane szczepy miały wysoką przeżywalność (73,04-95,68%) wobec czynników stresowych (stres osmotyczny, zasadowy i kwasowy) (**P4**). Wysoki wskaźnik przeżywalności w różnych warunkach środowiskowych potwierdził, że *S. aureus* może łatwo zanieczyszczać żywność i potencjalnie w niej rosnąć. Jednocześnie warto wspomnieć, że zależność ekspresji SE od wzrostu jest powiązana z elementami regulacyjnymi. Przykładowo, SarA jest aktywna podczas wykładniczej fazy wzrostu, podczas gdy Agr jest aktywna, gdy gęstość komórek wzrasta podczas przejścia do stacjonarnej fazy wzrostu. Aktywacja Agr prowadzi do obniżenia regulacji Rot, co prowadzi do zwiększonej ekspresji toksyn (Carfora i in., 2015; Pader i in., 2014).

Jak opisano wcześniej*, S. aureus* może posiadać jeden lub więcej genów enterotoksyn i enterotoksynopodobnych (SEs/SEls) (Schwendimann i in., 2021). Niemniej jednak warto podkreślić, że posiadanie genów enterotoksyn nie oznacza, że mają one zdolność do ich ekspresji, nawet w przypadku zapewnienia idealnych warunków wzrostu (Sihto i in., 2015). W związku z powyższym, niezmiernie ważne jest określenie wpływu stresu związanego z żywnością (np. zmiana pH, różne temperatury, obniżenie wartości $a_w$, a także dodatek konserwantów) na enterotoksyczność gronkowców (Etter, Ukowitz, i in., 2022).

Jedną z metod konserwacji żywności jest dodawanie soli. Niemniej jednak *S. aureus* może przetrwać w wysokich stężeniach NaCl, co powoduje zanieczyszczenie *S. aureus* w solonej żywności, którego nie można wyeliminować (Kim i in., 2017). W związku z powyższym ważne jest poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za produkcję enterotoksyn w obecności NaCl (Bronner i in., 2004).

Większość patogenów, w tym *S. aureus*, może być hamowana, gdy $a_w$ mieści się w zakresie 0,80-0,92. W tym celu stosuje się suszenie lub dodawanie wysokich stężeń soli lub cukru. Wybrany poziom NaCl zastosowany w przeprowadzonym badaniu naśladował warunki stresowe występujące podczas produkcji wielu produktów spożywczych (w tym produktów mlecznych i mięsnych).

Wiadomo, że *S. aureus* może rosnąć w wysokich stężeniach NaCl (3,5 M). Wykazano jednak, że warunki niskiej aktywności wody ($a_w$) (~0,86) skutecznie ograniczają produkcję SE (Lopes i in., 2021). W badaniu przeprowadzonym przez Etter i in. (2022) stwierdzono równe lub podwyższone poziomy mRNA *sec* po traktowaniu łagodnym stresem NaCl wśród wszystkich testowanych szczepów. Autorzy wykazali, że nawet niewielki wzrost w zakresie 1- 4,5% NaCl miał wpływ na ekspresję *sec* (Etter, Ukowitz, i in., 2022). W badaniach przeprowadzonych w ramach realizacji niniejszej pracy zaobserwowano wzrost względnej

ekspresji genów *selu*, *selm* i *selo* pod wpływem 4,5% NaCl. Dlatego też, zgodnie z uzyskanymi danymi i wcześniejszymi obserwacjami, można założyć, że zmieniające się poziomy stężenia NaCl wpływają na transkrypcyjną regulację genów enterotoksyn wśród gronkowców.

W przemyśle spożywczym dodatek kwasu jest stosowany w celu zmniejszenia lub zahamowania wzrostu bakterii. Osiąga się to poprzez dodanie środka zakwaszającego, a także poprzez proces fermentacji. Jednak hamujący wpływ kwasów zależy od wielu czynników, w tym między innymi od stężenia i rodzaju kwasu, czasu ekspozycji i zdolności buforowej żywności. Dane literaturowe wskazują, że na poziomie białka produkcja enterotoksyn jest najwyższa w zakresie pH między 6 a 7 (Genigeorgis i in., 1971). Co więcej, dane wykazały również, że ekspresja *sea* zachodziła pod wpływem kwasu octowego (pH = 6,0) w wyniku indukcji profagów (Susilo i in., 2017). Przeciwnie, Sihto i wsp. (2015) wykazali, że stres kwasu mlekowego (pH = 6,0) wpływał na ekspresję *sed*, ale stres ten nie prowadził do znaczących zmian (Sihto i in., 2015). W starszym badaniu wykazano, że łagodny stres kwasu octowego (pH 7-5,5) miał wpływ na indukcję profagów, a także zwiększał ekspresję *sea* wśród badanych izolatów. Autorzy wykazali również, że przy pH 4,5-5,0 nie wykryto żadnych lub bardzo niskie poziomy mRNA i SEA (Wallin-Carlquist i in., 2010). W niniejszym badaniu zaobserwowano, że większość badanych genów enterotoksyn, po ekspozycji na stres pH = 4,5 i pH = 9,6, miała podobną ekspresję jak w warunkach optymalnych.

Warto zauważyć, że *S. aureus* jest patogenem przenoszonym przez żywność, który wykazuje konkurencyjną przewagę wzrostu w żywności o wysokim stężeniu cukru lub soli lub niskim pH. Chociaż w ciągu ostatnich kilku lat wielu badaczy (Etter, Büchel, i in., 2022; Schelin i in., 2017; Sihto i in., 2015, 2016) próbowało rozszerzyć wpływ warunków stresowych związanych z żywnością na ekspresję SE, nadal istnieje ograniczona liczba danych wyjaśniających rolę stresu w ekspresji genów enterotoksyn.

Pomimo faktu, że podejmowane w ramach niniejszej pracy badanie koncentrowały się na ekspresji genów nowo opisanych enterotoksyn gronkowcowych, w oparciu o eksperymenty w pożywkach hodowlanych, uzyskane wyniki wykazały, że ekspresja genów enterotoksyn gronkowcowych może zmieniać się w odpowiedzi na czynniki stresowe występujące podczas produkcji i konserwacji żywności. Uzyskane wyniki implikują potrzebę dalszych badań ekspresji genów SEs w matrycy żywnościowej.

Uzyskane wyniki badań w ramach niniejszej pracy wypełniają istotną lukę na temat szczepów *S. aureus* izolowanych z łańcucha produkcji serów z mleka niepasteryzowanego w Polsce. Uzyskane wyniki sugerują potrzebę monitorowania i kontroli *S. aureus* w łańcuchu produkcji żywności, szczególnie w kontekście ryzyka związanego z opornością na antybiotyki

i potencjalnym zagrożeniem dla zdrowia publicznego. Badania te dostarczają istotnych informacji dla opracowywania skutecznych strategii zarządzania ryzykiem związanym z tym patogenem w środowisku spożywczym.

# 7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej potwierdziły postawione hipotezy badawcze, że łańcuch produkcji serów zagrodowych jest źródłem antybiotykoopornych (w tym MRSA), wirulentnych szczepów *S. aureus* a stresy środowiskowe występujące podczas produkcji serów zagrodowych wpływają na ekspresję genów enterotoksyczności.

Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Wykazanie obecności szczepów *S. aureus* na różnych etapach produkcji sugeruje potrzebę skupienia uwagi na procedurach higienicznych na etapach produkcji. W praktyce wymagane jest zwiększenie świadomości znaczenia praktyk higienicznych wśród polskich producentów serów zagrodowych.
2. Występowanie szczepów opornych na antybiotyki w łańcuchu przetwarzania żywności oznacza potrzebę monitorowania *S. aureus* w celu zidentyfikowania wzorców wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe, aby wyjaśnić drogi przenoszenia oporności na antybiotyki w łańcuchu żywnościowym.
3. Krytyczne czynniki stresowe związane z produkcją i utrwalaniem żywności (zmiana pH i stężenia NaCl) mają wpływ na ekspresję genów SEs u *S. aureus*. Obserwacja ta może być przydatna do oceny ryzyka związanego z występowaniem zatruć pokarmowych.
4. Stres związany z przetwarzaniem i utrwalaniem żywnością może wpływać na ekspresję enterotoksyn gronkowcowych, czego nie można przewidzieć wyłącznie na podstawie liczby żywych komórek.
5. Potencjał patogeniczności jak i zmiany poziomów ekspresji genów pod wpływem stresu są cechą szczepową.
6. Regularne monitorowanie serów z mleka niepasteryzowanego jest niezbędne dla zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego konsumentów.

Wyniki badań zaprezentowane w tematycznie powiązanym cyklu publikacji mają charakter poznawczy oraz dostarczają nowych informacji dotyczących fenotypowych i genotypowych determinant odpowiadających za ewolucję *S. aureus* w łańcuchu produkcji polskich serów zagrodowych z mleka niepasteryzowanego. Przeprowadzone badania pomagają lepiej zrozumieć mechanizmy, które wpływają na rozwój i rozprzestrzenianie się *S. aureus* w łańcuchu produkcji serów. Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań mogą mieć istotne implikacje dla producentów serów z mleka niepasteryzowanego, którzy mogą dostosować swoje praktyki produkcyjne w celu minimalizacji ryzyka związanych z obecnością *S. aureus* i poprawy jakości i bezpieczeństwa swoich produktów.

# 8. LITERATURA


Aliyu, Y., Reuben, R. C., Abdullahi, I. O., Olayinka, B. O., & Abdullahi, M. S. (2022). A systematic review on the prevalence of multidrug-resistant Staphylococcus aureus from milk and milk products in Nigeria . *PAMJ - One Health*, *7*(iDiv). https://doi.org/10.11604/pamj-oh.2022.7.15.29118

Alves, V. F., Niño-Arias, F. C., Pitondo-Silva, A., de Araújo Frazilio, D., de Oliveira Gonçalves, L., Chaul Toubas, L., Sapateiro Torres, I. M., Oxaran, V., Dittmann, K. K., & De Martinis, E. C. P. (2018). Molecular characterisation of Staphylococcus aureus from some artisanal Brazilian dairies. *International Dairy Journal*, *85*, 247–253. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.008

Ammar, A. M., Attia, A. M., Abd El-Hamid, M. I., El-Shorbagy, I. M., & Abd El-Kader, S. A. (2016). Genetic basis of resistance waves among methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates recovered from milk and meat products in Egypt. *Cellular and Molecular Biology*, *62*(10), 7–15. https://doi.org/10.14715/cmb/2016.62.10.2

Aragão, B. B., Trajano, S. C., Silva, J. G., Silva, B. P., Oliveira, R. P., Junior, J. W. P., Peixoto, R. M., & Mota, R. A. (2019). Short communication: High frequency of β-lactam-resistant Staphylococcus aureus in artisanal coalho cheese made from goat milk produced in northeastern Brazil. *Journal of Dairy Science*, *102*(8), 6923–6927. https://doi.org/10.3168/jds.2018-16162

Arciola, C. R., Baldassarri, L., & Montanaro, L. (2001a). Presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(6), 2151–2156. https://doi.org/10.1128/JCM.39.6.2151-2156.2001

Arciola, C. R., Baldassarri, L., & Montanaro, L. (2001b). Presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(6), 2151–2156. https://doi.org/10.1128/JCM.39.6.2151-2156.2001

Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., & Wishart, D. S. (2018). PHAST, PHASTER and PHASTEST: Tools for finding prophage in bacterial genomes. *Briefings in Bioinformatics*, *20*(4), 1560–1567. https://doi.org/10.1093/bib/bbx121

Avila-Novoa, M. G., González-Gómez, J. P., Guerrero-Medina, P. J., Cardona-López, M. A., Ibarra-Velazquez, L. M., Velazquez-Suarez, N. Y., Morales-del Río, J. A., & Gutiérrez-Lomelí, M. (2021). Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus (MRSA) strains isolated from dairy products: Relationship of ica-dependent/independent and components of biofilms produced in vitro. *International Dairy Journal*, *119*(March). https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105066

Barski, P., Piechowicz, L., Galiński, J., & Kur, J. (1996). Rapid assay for detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus using multiplex PCR. *Molecular and Cellular Probes*, *10*(6), 471–475. https://doi.org/10.1006/mcpr.1996.0066

Bórawski, P., Bórawski, M. B., Parzonko, A., Wicki, L., Rokicki, T., Perkowska, A., & Dunn, J. W. (2021). Development of organic milk production in Poland on the background of the EU. *Agriculture (Switzerland)*, *11*(4), 1–25. https://doi.org/10.3390/agriculture11040323

Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., … Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *75*(12), 3491–3500. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345

Brahma, U., Suresh, A., Murthy, S., Bhandari, V., & Sharma, P. (2022). Antibiotic Resistance

and Molecular Profiling of the Clinical Isolates of Staphylococcus aureus Causing Bovine Mastitis from India. *Microorganisms*, *10*(4). https://doi.org/10.3390/microorganisms10040833

Bronner, S., Monteil, H., & Prévost, G. (2004). Regulation of virulence determinants in Staphylococcus aureus: Complexity and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, *28*(2), 183–200. https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.003

Cai, H., Kou, X., Ji, H., Wang, X., Wang, H., Zhang, Y., Lu, S., Li, B., Dong, J., Wang, Q., Zhou, J., & Hu, D. (2021). Prevalence and characteristics of Staphylococcus aureus isolated from Kazak cheese in Xinjiang, China. *Food Control*, *123*(221), 107759. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107759

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, *10*, 1–9. https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421

Carattoli, A., Zankari, E., Garciá-Fernández, A., Larsen, M. V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F. M., & Hasman, H. (2014). In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(7), 3895–3903. https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14

Cardozo, M. V., Nespolo, N., Delfino, T. C., de ALMEIDA, C. C., Pizauro, L. J. L., Valmorbida, M. K., Pereira, N., & de ÁVILA, F. A. (2021). Raw milk cheese as a potential infection source of pathogenic and toxigenic food born pathogens. *Food Science and Technology (Brazil)*, *41*(2), 355–358. https://doi.org/10.1590/fst.37919

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. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.10.009

Castro, R. D., Pedroso, S. H. S. P., Sandes, S. H. C., Silva, G. O., Luiz, K. C. M., Dias, R. S., Filho, R. A. T., Figueiredo, H. C. P., Santos, S. G., Nunes, A. C., & Souza, M. R. (2020). Virulence factors and antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus isolated from the production process of Minas artisanal cheese from the region of Campo das Vertentes, Brazil. *Journal of Dairy Science*, *103*(3), 2098–2110. https://doi.org/10.3168/jds.2019-17138

Chajęcka-Wierzchowska, W., Gajewska, J., Wiśniewski, P., & Zadernowska, A. (2020). Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci from ready-to-eat food. *Pathogens*, *9*(9), 1–12. https://doi.org/10.3390/pathogens9090734

da Silva, A. C., Rodrigues, M. X., & Silva, N. C. C. (2020). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in food and the prevalence in Brazil: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, *51*(1), 347–356. https://doi.org/10.1007/s42770-019-00168-1

Etter, D., Büchel, R., Patt, T., Biggel, M., Tasara, T., Cernela, N., Stevens, M. J. A., & Johler, S. (2022). Nitrite stress increases staphylococcal enterotoxin C transcription and triggers the SigB regulon. *FEMS Microbiology Letters*, *369*(1), 1–8. https://doi.org/10.1093/femsle/fnac059

Etter, D., Ukowitz, C., Eicher, C., Tasara, T., & Johler, S. (2022). Mild NaCl Stress Influences Staphylococcal Enterotoxin C Transcription in a Time-Dependent Manner and Reduces Protein Expression. *Frontiers in Microbiology*, *13*(April). https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.820067

European Union. (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. W *EFSA Journal* (T. 19, Numer 12). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971

Feng, Y., Ming, T., Zhou, J., Lu, C., Wang, R., & Su, X. (2022). The Response and Survival Mechanisms of Staphylococcus aureus under High Salinity Stress in Salted Foods. *Foods*,

*11*(10). https://doi.org/10.3390/foods11101503

Fetsch, A., Etter, D., & Johler, S. (2021). Livestock-Associated Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus—Current Situation and Impact From a One Health Perspective. *Current Clinical Microbiology Reports*, *8*(3), 103–113. https://doi.org/10.1007/s40588-021-00170-y

Gajewska, J., & Chajęcka-Wierzchowska, W. (2020). Biofilm formation ability and presence of adhesion genes among coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolates from raw cow's milk. *Pathogens*, *9*(8), 1–12. https://doi.org/10.3390/pathogens9080654

Gebremedhin, E. Z., Ararso, A. B., Borana, B. M., Kelbesa, K. A., Tadese, N. D., Megersa Marami, L., & Sarba, E. J. (2022). *Isolation and Identification of Staphylococcus aureus from Milk and Milk Products, Associated Factors for Contamination, and Their Antibiogram in Holeta, Central Ethiopia*. https://doi.org/10.1155/2022/6544705

Genigeorgis, C., Foda, M. S., Mantis, A., & Sadler, W. W. (1971). Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production. *Applied microbiology*, *21*(5), 862–866. https://doi.org/10.1128/aem.21.5.862-866.1971

Gevers, D., Danielsen, M., Huys, G., & Swings, J. (2003). Molecular characterization of tet(M) genes in Lactobacillus isolates from different types of fermented dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(2), 1270–1275. https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1270-1275.2003

Guan, N., & Liu, L. (2020). Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(1), 51–65. https://doi.org/10.1007/s00253-019-10226-1

He, X., & Ahn, J. (2011). Differential gene expression in planktonic and biofilm cells of multiple antibiotic-resistant Salmonella Typhimurium and Staphylococcus aureus. *FEMS Microbiology Letters*, *325*(2), 180–188. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02429.x

Heilmann, C., Thumm, G., Chhatwal, G. S., Hartleib, J., Uekötter, A., & Peters, G. (2003). Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from Staphylococcus epidermidis. *Microbiology*, *149*(10), 2769–2778. https://doi.org/10.1099/mic.0.26527-0

Imani Fooladi, A., Tavakoli, H. R., & Naderi, A. (2010). Detection of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolates in domestic dairy products. *Iranian Journal of Microbiology*, *2*(3), 135–140.

James, C., Dixon, R., Talbot, L., James, S. J., Williams, N., & Onarinde, B. A. (2021). Assessing the Impact of Heat Treatment of Food on Antimicrobial Resistance Genes and Their Potential Uptake by Other Bacteria—A Critical Review. *Antibiotics*, *10*(12). https://doi.org/10.3390/antibiotics10121440

Joensen, K. G., Scheutz, F., Lund, O., Hasman, H., Kaas, R. S., Nielsen, E. M., & Aarestrup, F. M. (2014). Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic Escherichia coli. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(5), 1501–1510. https://doi.org/10.1128/JCM.03617-13

Johansson, M. H. K., Bortolaia, V., Tansirichaiya, S., Aarestrup, F. M., Roberts, A. P., & Petersen, T. N. (2021). *Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in Salmonella enterica using a newly developed web tool: MobileElementFinder*. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa390

Johler, S., Weder, D., Bridy, C., Huguenin, M. C., Robert, L., Hummerjohann, J., & Stephan, R. (2015). Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *Journal of Dairy Science*, *98*(5), 2944–2948. https://doi.org/10.3168/jds.2014-9123

Jørgensen, H. J., Mørk, T., & Rørvik, L. M. (2005). The occurrence of Staphylococcus aureus on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *Journal of Dairy Science*, *88*(11), 3810–3817. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73066-6

Kaase, M., Lenga, S., Friedrich, S., Szabados, F., Sakinc, T., Kleine, B., & Gatermann, S. G. (2008). Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in Staphylococcus aureus. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*(6), 614–616. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.01997.x

Kayili, E., & Sanlibaba, P. (2020). Prevalence, characterization and antibiotic resistance of Staphylococcus aureus isolated from traditional cheeses in Turkey. *International Journal of Food Properties*, *23*(1), 1441–1451. https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1814323

Kim, B. R., Bae, Y. M., & Lee, S. Y. (2016). Effect of Environmental Conditions on Biofilm Formation and Related Characteristics of Staphylococcus Aureus. *Journal of Food Safety*, *36*(3), 412–422. https://doi.org/10.1111/jfs.12263

Kim, N. H., Cho, T. J., & Rhee, M. S. (2017). Sodium Chloride Does Not Ensure Microbiological Safety of Foods: Cases and Solutions. *Advances in Applied Microbiology*, *101*, 1–47. https://doi.org/10.1016/BS.AAMBS.2017.05.001

Kirmusaoglu, S. (2016). Staphylococcal Biofilms: Pathogenicity, Mechanism and Regulation of Biofilm Formation by Quorum-Sensing System and Antibiotic Resistance Mechanisms of Biofilm-Embedded Microorganisms. *Microbial Biofilms - Importance and Applications*, *July*. https://doi.org/10.5772/62943

Kobayashi, N., Mahbub Alam, M., Nishimoto, Y., Urasawa, S., Uehara, N., & Watanabe, N. (2001). Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium and Enterococcus avium. *Epidemiology and Infection*, *126*(2), 197–204. https://doi.org/10.1017/S0950268801005271

Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., & Drosinos, E. H. (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*, *21*(6), 805–815. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.11.015

Kümmel, J., Stessl, B., Gonano, M., Walcher, G., Bereuter, O., Fricker, M., Grunert, T., Wagner, M., & Ehling-Schulz, M. (2016). Staphylococcus aureus entrance into the Dairy Chain: Tracking S. aureus from dairy cow to cheese. *Frontiers in Microbiology*, *7*(OCT), 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01603

Leke, A., Goudjil, S., Mullie, C., Grognet, S., & Biendo, M. (2017). PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes and exfoliative toxin genes in methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus strains from raw human breast milk. *Clinical Nutrition Experimental*, *14*, 26–35. https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2017.05.001

Li, G., Wu, C., Wang, X., & Meng, J. (2015). Prevalence and characterization of methicillin susceptible Staphylococcus aureus ST398 isolates from retail foods. *International Journal of Food Microbiology*, *196*(March 2014), 94–97. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.002

Liang, T., Liang, Z., Wu, S., Ding, Y., Wu, Q., & Gu, B. (2023). Global prevalence of Staphylococcus aureus in food products and its relationship with the occurrence and development of diabetes mellitus . *Medicine Advances*, *1*(1), 53–78. https://doi.org/10.1002/med4.6

Liu, H., Li, S., Meng, L., Dong, L., Zhao, S., Lan, X., & Wang, J. (2017). Prevalence , antimicrobial susceptibility , and molecular characterization of Staphylococcus aureus isolated from dairy herds in northern China. *The Lancet*, 1–8. https://doi.org/10.3168/jds.2017-13370

Lobacz, A., & Zulewska, J. (2021). Fate of salmonella spp. In the fresh soft raw milk cheese during storage at different temperatures. *Microorganisms*, *9*(5). https://doi.org/10.3390/microorganisms9050938

Lopes, G. V., Bastos, C. P., & da Silva, W. P. (2021). The effect of sodium chloride and temperature on the levels of transcriptional expression of staphylococcal enterotoxin genes in Staphylococcus aureus isolates from broiler carcasses. *Brazilian Journal of Microbiology*, *52*(4), 2343–2350. https://doi.org/10.1007/s42770-021-00544-w

Macori, G., Bellio, A., Bianchi, D. M., Chiesa, F., Gallina, S., Romano, A., Zuccon, F., Cabrera-Rubio, R., Cauquil, A., Merda, D., Auvray, F., & Decastelli, L. (2020). Genome-wide profiling of enterotoxigenic Staphylococcus aureus strains used for the production of naturally contaminated cheeses. *Genes*, *11*(1). https://doi.org/10.3390/genes11010033

Małyszko, I., Schwarz, S., & Hauschild, T. (2014). Detection of a new mecC allotype, mecC2, in methicillin-resistant Staphylococcus saprophyticus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*(7), 2003–2005. https://doi.org/10.1093/jac/dku043

Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens*, *10*(10), 1–14. https://doi.org/10.3390/pathogens10101310

Massawe, H. F., Mdegela, R. H., & Kurwijila, L. R. (2019). Antibiotic resistance of Staphylococcus aureus isolates from milk produced by smallholder dairy farmers in Mbeya Region, Tanzania. *International Journal of One Health*, *5*, 31–37. https://doi.org/10.14202/IJOH.2019.31-37

Mørk, T., Kvitle, B., Mathisen, T., & Jørgensen, H. J. (2010). Bacteriological and molecular investigations of Staphylococcus aureus in dairy goats. *Veterinary Microbiology*, *141*(1–2), 134–141. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.019

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. *Infection and Immunity*, *81*(10), 3627–3631. https://doi.org/10.1128/IAI.00550-13

Ou, Q., Zhou, J., Lin, D., Bai, C., Zhang, T., Lin, J., Zheng, H., Wang, X., Ye, J., Ye, X., & Yao, Z. (2018). A large meta-analysis of the global prevalence rates of S. aureus and MRSA contamination of milk. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *58*(13), 2213–2228. https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1308916

Pader, V., James, E. H., Painter, K. L., Wigneshweraraj, S., & Edwards, A. M. (2014). The agr quorum-sensing system regulates fibronectin binding but not hemolysis in the absence of a functional electron transport chain. *Infection and Immunity*, *82*(10), 4337–4347. https://doi.org/10.1128/IAI.02254-14

Padmasini, E., Padmaraj, R., & Ramesh, S. S. (2014). High level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistant genes among clinical isolates of Enterococcus species in Chennai, India. *The Scientific World Journal*, *2014*. https://doi.org/10.1155/2014/329157

Pal, M. (2022). Staphylococcus Aureus: A Major Pathogen of Food Poisoning. *Nutrition and Food Processing*, *5*(1), 01–03. https://doi.org/10.31579/2637-8914/074

Panchal, V. V., Griffiths, C., Mosaei, H., Bilyk, B., Sutton, J. A. F., Carnell, O. T., Hornby, D. P., Green, J., Hobbs, J. K., Kelley, W. L., Zenkin, N., & Foster, S. J. (2020). Evolving MRSA: High-level β-lactam resistance in Staphylococcus aureus is associated with RNA polymerase alterations and fine tuning of gene expression. *PLoS Pathogens*, *16*(7). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008672

Pfaffi Michael W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, *3*, 2069–2082. https://doi.org/10.1111/j.1365-2966.2012.21196.x

Pinchuk, I. V., Beswick, E. J., & Reyes, V. E. (2010). Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins*, *2*(8), 2177–2197. https://doi.org/10.3390/toxins2082177

Price, L. B., Stegger, M., Hasman, H., Aziz, M., Larsen, J., Andersen, P. S., Pearson, T., Waters,

A. E., Foster, J. T., Schupp, J., Gillece, J., Driebe, E., Liu, C. M., Springer, B., Zdovc, I., Battisti, A., Franco, A., Zmudzki, J., Schwarz, S., … Aarestrup, F. M. (2012). Staphylococcus aureus CC398: Host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. *mBio*, *3*(1), 1–6. https://doi.org/10.1128/mBio.00305-11

Roberts, M. C. (1994). Epidemiology of tetracycline-resistance determinants. *Trends in Microbiology*, *2*(10), 353–357. https://doi.org/10.1016/0966-842X(94)90610-6

Rola, J. G., Czubkowska, A., Korpysa-Dzirba, W., & Osek, J. (2016). Occurrence of Staphylococcus aureus on farms with small scale production of raw milk cheeses in poland. *Toxins*, *8*(3). https://doi.org/10.3390/toxins8030062

Rosengren, Å., Lindblad, M., & Lindqvist, R. (2013). The effect of undissociated lactic acid on Staphylococcus aureus growth and enterotoxin A production. *International Journal of Food Microbiology*, *162*(2), 159–166. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.006

Şanlıbaba, P. (2022). Prevalence, antibiotic resistance, and enterotoxin production of Staphylococcus aureus isolated from retail raw beef, sheep, and lamb meat in Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, *361*. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109461

Schelin, J., Susilo, Y. B., & Johler, S. (2017). Expression of staphylococcal enterotoxins under stress encountered during food production and preservation. *Toxins*, *9*(12). https://doi.org/10.3390/toxins9120401

Schnitt, A., & Tenhagen, B.-A. (b.d.). *Risk Factors for the Occurrence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Dairy Herds: An Update*. https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2638

Schwendimann, L., Merda, D., Berger, T., Denayer, S., Feraudet-Tarisse, C., Kläui, A. J., Messio, S., Mistou, M. Y., Nia, Y., Hennekinne, J. A., & Grabera, H. U. (2021). Staphylococcal Enterotoxin Gene Cluster: Prediction of Enterotoxin (SEG and SEI) Production and of the Source of Food Poisoning on the Basis of vSaβ Typing. *Applied and Environmental Microbiology*, *87*(5), 1–15. https://doi.org/10.1128/AEM.02662-20

Sihto, H. M., Tasara, T., Stephan, R., & Johler, S. (2015). Temporal expression of the staphylococcal enterotoxin D gene under NaCl stress conditions. *FEMS Microbiology Letters*, *362*(6). https://doi.org/10.1093/femsle/fnv024

Sihto, H. M., 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. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.008

Silva, V., Alfarela, C., Caniça, M., Manageiro, V., Nóvoa, M., Leiva, B., Kress, M., Capelo, J. L., Poeta, P., & Igrejas, G. (2022). A One Health Approach Molecular Analysis of Staphylococcus aureus Reveals Distinct Lineages in Isolates from Miranda Donkeys (Equus asinus) and Their Handlers. *Antibiotics*, *11*(3). https://doi.org/10.3390/antibiotics11030374

Silva, V., Caniça, M., Ferreira, E., Vieira-Pinto, M., Saraiva, C., Pereira, J. E., Capelo, J. L., Igrejas, G., & Poeta, P. (2022). *Multidrug-Resistant Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci in Healthy Poultry Slaughtered for Human Consumption*. *11*, 365. https://doi.org/10.3390/antibiotics11030365

Simeão Do Carmo, L., Dias, R. S., Linardi, V. R., José De Sena, M., Aparecida Dos Santos, D., Eduardo De Faria, M., Pena, E. C., Jett, M., & Heneine, L. G. (2002). Food poisoning due to enterotoxigenic strains of Staphylococcus present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, *19*(1), 9–14. https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0444

Sivaraman, G. K., Gupta, S. S., Visnuvinayagam, S., Muthulakshmi, T., Elangovan, R., Perumal, V., Balasubramanium, G., Lodha, T., & Yadav, A. (2022). Prevalence of S. aureus and/or MRSA from seafood products from Indian seafood products. *BMC Microbiology*, *22*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s12866-022-02640-9

Song, J. W., Yang, S. J., Shin, S., Seo, K. S., Ho Park, Y., Kun, A., & Park, T. (2016). Genotypic

and Phenotypic Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolated from Bovine Mastitic Milk in Korea. *Journal of Food Protection*, *79*(10), 1725–1732. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-067

Soroka, A., & Wojciechowska-Solis, J. (2019). Consumer awareness of the regional food market: The case of eastern European border regions. *Foods*, *8*(10), 1–11. https://doi.org/10.3390/foods8100467

Stefanou, C. R., Bartodziejska, B., Gajewska, M., & Szosland-Fałtyn, A. (2022). Microbiological Quality and Safety of Traditional Raw Milk Cheeses Manufactured on a Small Scale by Polish Dairy Farms. *Foods*, *11*(23). https://doi.org/10.3390/foods11233910

Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. Di, Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates. *Apmis*, *115*(8), 891–899.

Sugimoto, S., Sato, F., Miyakawa, R., Chiba, A., Onodera, S., Hori, S., & Mizunoe, Y. (2018). Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of Staphylococcus aureus. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-018-20485-z

Sugrue, I., Tobin, C., Ross, R. P., Stanton, C., & Hill, C. (2018). Foodborne pathogens and zoonotic diseases. W *Raw Milk: Balance Between Hazards and Benefits*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810530-6.00012-2

Susilo, Y. B., Sihto, H. M., Rådström, P., Stephan, R., Johler, S., & Schelin, J. (2017). Reduced enterotoxin D formation on boiled ham in staphylococcus aureus Δagr mutant. *Toxins*, *9*(9). https://doi.org/10.3390/toxins9090263

Szczuka, E., Porada, K., Wesołowska, M., & Łęska Bogusława. (2022). *Occurrence and Characteristics of Staphylococcus aureus*.

Tenhagen, B.-A., Alt, K., Pfefferkorn, B., Wiehle, L., Käsbohrer, A., & Fetsch, A. (2018). Short communication: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in conventional and organic dairy herds in Germany. *Journal of Dairy Science*, *101*, 3380–3386. https://doi.org/10.3168/jds.2017-12939

The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. (2022). *EFSA Journal*, *20*(3). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7209

Tristan, A., Ying, L., Bes, M., Etienne, J., Vandenesch, F., & Lina, G. (2003). Use of multiplex PCR to identify Staphylococcus aureus adhesins involved in human hematogenous infections. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(9), 4465–4467. https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4465-4467.2003

Wallin-Carlquist, N., Cao, R., Márta, D., Da Silva, A. S. ana, Schelin, J., & Rådström, P. (2010). Acetic acid increases the phage-encoded enterotoxin A expression in Staphylococcus aureus. *BMC Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-147

Zapaśnik, A., Sokołowska, B., & Bryła, M. (2022). Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Safety. *Foods*, *11*(9), 1–17. https://doi.org/10.3390/foods11091283

Zhang, S., Iandolo, J. J., & Stewart, G. C. (1998). The enterotoxin D plasmid of Staphylococcus aureus encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiology Letters*, *168*(2), 227–233. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00423-6

Zhao, X., Yuan, X., Hu, M., Zhang, Y., Li, L., Zhang, Q., Yuan, X., Wang, W., & Liu, Y. (2021). Prevalence and characterization of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from bulk tank milk in Shandong dairy farms. *Food Control*, *125*(December 2020), 107836. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107836

Zhou, C., Bhinderwala, F., Lehman, M. K., Thomas, V. C., Chaudhari, S. S., Yamada, K. J., Foster, K. W., Powers, R., Kielian, T., & Fey, P. D. (2019). Urease is an essential component of the acid response network of Staphylococcus aureus and is required for a

persistent murine kidney infection. *PLoS Pathogens*, *15*(1), 1–23. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007538

# 9. SPIS TABEL I RYCIN

**Tabela 1.** Warunki wzrostu S. aureus. ..... 12

**Tabela 2.** Częstość występowania S. aureus w latach 2012-2022 w różnych rodzajach żywności. ..... 15

**Rysunek 1**. Etapy badań z uwzględnieniem powiązanego tematycznie cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. ..... 22

**Rysunek 2.** Schemat blokowy przedstawiający proces wyboru badania. ..... 23

**Rysunek 3.** Schemat blokowy opisujący projekt eksperymentu. ..... 28

# 10. POZOSTAŁA AKTYWNOŚĆ NAUKOWA

Dane na dzień: 16.05.2024

### ARTYKUŁY OPUBLIKOWANE W RECENZOWANYCH CZASOPISMACH ZNAJDUJĄCYCH SIĘ W WYKAZIE MNISW/MEIN

1. Zimińska, A., Lipska, I., **Gajewska, J**., Draszanowska, A., Simões, M., Olszewska, M. A. (2024). Antibacterial and antibiofilm effects of photodynamic treatment with Curcuma L. and Trans-Cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes*. Molecules, 29(3), 685. https://doi.org/10.3390/molecules29030685 **(MEiN$_{2024}$=140, IF=4.6)**
2. Wiśniewski, P., **Gajewska, J**., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W.(2023). Identification of the enterotoxigenic potential of *Staphylococcus* spp. from raw ,milk and raw milk cheeses. *Toxins*, 16(1), 17. https://doi.org/10.3390/toxins16010017 **(MEiN$_{2023}$: 140, IF: 4,2)**
3. Zakrzewsk, A., **Gajewska, J.**, Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Insights into the genetic diversity of *Listeria monocytogenes* from bivalves. *Science of the Total Environment,* 168481. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168481 **(MEiN$_{2023}$: 200, IF: 9.8)**
4. Zakrzewski, A., **Gajewska, J**., Chajęcka-Wierzchowska, W., Załuski, D., Zadernowska, A. (2024). Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in fish, fish products and fish processing environment: A systematic review and meta-analysis. *Science of the Total Environment*, 907. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167912 **(MEiN$_{2023}$: 200, IF: 9.8)**
5. Zakrzewski, A., **Gajewska, J**., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Effect of sous-vide processing of fish on the virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes. NFS Journal*, 31, 155–161. https://doi.org/10.1016/j.nfs.2023.05.003 **(MEiN$_{2023}$: 140, IF: 0.663)**
6. **Gajewska, J.,** Chajęcka-Wierzchowska, W., Byczkowska-Rostkowska, Z., Saki, M. (2023). Biofilm formation capacity and presence of virulence determinants among *Enterococcus* species from milk and raw milk cheeses. *Life*, 13(2). https://doi.org/10.3390/life1302049 **(MEiN$_{2023}$: 70, IF: 3.2)**
7. Adamski, P., Byczkowska-Rostkowska, Z., **Gajewska, J.**, Zakrzewski, A. J., Kłębukowska, L. (2023). Prevalence and antibiotic resistance of *Bacillus* sp. isolated from raw milk. *Microorganisms*, *11*(4). https://doi.org/10.3390/microorganisms11041065 **(MEiN$_{2023}$: 40, IF: 4.5)**
8. Chajęcka-Wierzchowska, W., **Gajewska, J**., Zadernowska, A., Randazzo, C.L., Caggia, C. (2023). A comprehensive study on antibiotic resistance among coagulase-negative staphylococci (CoNS) strains isolated from ready-to-eat food served in bars and restaurants. *Foods*, 12, 514. https://doi.org/10.3390/foods12030514 **(MEiN$_{2023}$: 140, IF: 5.2)**
9. Chajęcka-Wierzchowska, W., **Gajewska, J.**, Zakrzewski, A. J., Caggia, C., Zadernowska, A. (2023). Molecular analysis of pathogenicity, adhesive matrixmolecules (MSCRAMMs) and biofilm genes of coagulase-negative staphylococci isolated from ready-to-eat food.

*International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(2). https://doi.org/10.3390/ijerph20021375 **(MEiN$_{2023}$: 20, IF: 4.6)**

10. **Gajewska, J.,** Chajęcka-Wierzchowska, W. (2020). Biofilm formation ability and presence of adhesion genes among coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolates from raw cow's milk. *Pathogens*, *9*(8), 1–12. https://doi.org/10.3390/pathogens9080654 **(MEiN$_{2020}$: 100, IF: 3.492)**
11. Chajęcka-Wierzchowska, W., **Gajewska, J**., Wiśniewski, P., Zadernowska, A. (2020). Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci from ready-to-eat food. *Pathogens*, *9*(9), 1–12. https://doi.org/10.3390/pathogens9090734 **(MEiN$_{2020}$: 100, IF: 3.492)**
12. Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Zarzecka, U., Zakrzewski, A., **Gajewska, J**. (2019). Enterococci from ready-to-eat food – horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes and genotypic characterization by PCR melting profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(3), 1172–1179. https://doi.org/10.1002/jsfa.9285 **(MEiN$_{2019}$: 35, IF: 2.422)**
13. Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., **Gajewska J**., (2019 *S. epidermidis* strains from artisanal cheese made from unpasteurized milk in Poland - genetic characterization of antimicrobial resistance and virulence determinants, *International Journal of Food Microbiology*, 294, 55-59 **(MEiN$_{2019}$= 100; IF = 4.187)**

**PUBLIKACJE NAUKOWE W CZASOPISMACH MIĘDZYNARODOWYCH LUB KRAJOWYCH INNYCH NIŻ ZNAJDUJĄCE SIĘ W WYKAZIE MNISW/MEIN**

1. **Gajewska J.,** Zakrzewski A. Jakość mikrobiologiczna mleka i produktów mlecznych, Przegląd Mleczarski, 1/2024, 29-34.
2. Byczkowska-Rostkowska Z., **Gajewska J.**, Chajęcka-Wierzchowska W. Antybiotyki i antybiotykooporność w przemyśle mleczarskim, Przegląd Mleczarski, 12/2022, 10-15.

**ROZDZIAŁY W MONOGRAFIACH POKONFERENCYJNYCH**

1. Byczkowska Z., **Gajewska J**., (2022) Wpływ sub-inhibicyjnych stężeń środków dezynfekujących na antybiotykooporność bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. Młodzi Liderzy Jakości 2022 Instytut Nauk o Jakości Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu Poznań 2022 ISBN: 978-83-960669-3-0, s.10-15.
2. **Gajewska J**., Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., (2020) Występowanie i charakterystyka molekularna *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z mleka surowego. W: Przyszłość w żywności – żywność w przyszłości, pod red. Anny M. Salejdy i Anny Kancelisty, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego We Wrocławiu, Wrocław, 27-35. ISSN 2083-5531 ISBN 978-83-7717-354-1
3. **Gajewska J**., Wiśniewski P., *2020), Jakość mikrobiologiczna niepasteryzowanych soków owocowych i warzywnych, W: Mogielnicka-Brzozowska M. Ekologia żywności, środowiska i zdrowia człowieka. Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych w Olsztynie. Tom 1, s. 292-302. Poznań, Wydawnictwo Naukowe FNCE, 2020. ISBN 78-83-66264-54-0
4. **Gajewska J**., (2019), Antybiotykooporność paciorkowców *Enterococcus* wyizolowanych z mleka surowego oraz z serów, W: Truszkowski W., Sosna P. R. (red.). Uwarunkowania

bezpieczeństwa i jakości żywności w Polsce, s. 155-163. Olsztyn, 2019. ISBN 978-83-943385-0-3

5. **Gajewska J**., (2018), Występowanie w żywności antybiotykoopornych szczepów gronkowców, Koła naukowe – szkołą twórczego działania. Tom 4. Nauki rolnicze i weterynaryjne pod redakcją Małgorzaty Tańskiej i Patrycji Sosna, strony: 174-184, Wydawnictwo ABADA, Olsztyn 2018, ISBN978-83-949066-3-4
6. Balicki D., **Gajewska J**., (2017), Wpływ bakterii fermentacji mlekowej na *Listeria monocytogenes* – kryterium bezpieczeństwa mikrobiologicznego środków spożywczych, Koła naukowe – szkołą twórczego działania. Nauki medyczne i biologiczne pod redakcją Izabeli Szatrawskiej, Krzysztofa Szatrawskiego i Magdaleny Gołębiewskiej, strony: 35-42, Wydawnictwo ABADA, Olsztyn, ISBN 978-83-940679-1-5

**DONIESIENIA NA KONFERENCJACH NAUKOWYCH**

1. **Gajewska J**, Różnorodność genomowa i potencjał patogenny *S. aureus* z żywności, XX Konferencja Naukowa Młodych Badaczy „Bezpieczeństwo i jakość żywności", 22.11.2023, Olsztyn
2. Chajęcka-Wierzchowska W., **Gajewska J**., Zakrzewski A., Zadernowska A. Pathogenicity of opportunistic bacteria from ready-to-eat- food, 37th EFFoST International Conference 6-8.11.2023, Walencja, Hiszpania
3. **Gajewska J.,** Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Resistance to quartery amomonium compound and heavy metal among staphylococci, Xth International Session of Young Scientific Staff „Food Science Development. Sustainable Future", 11-12.05.2023, Warszawa
4. Byczkowska-Rostkowska Z., **Gajewska J**., Muszak M., Oporność na IV-rzędowe sole amoniowe wśród szczepów z rodzaju *Staphylococcus*. Ogólnopolska Konferencja Naukowa Wiedza kluczem do sukcesu, 21.01.2023, online
5. Byczkowska-Rostkowska Z., **Gajewska J.,** Muszak M. Występowanie oporności na IV-rzędowe sole amoniowe oraz jony metali ciężkich u szczepów Staphylococcus izolowanych z żywności pochodzenia zwierzęcego, VIII Ogólnopolska Sesja Studenckich Kół Naukowych, 1-3.12.2022, online
6. **Gajewska J**, Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Charakterystyka szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych z żywności i środowiska jej produkcji, XIX Konferencja Naukowa Młodych Badaczy „Bezpieczeństwo i jakość żywności", 20.10.2022, Olsztyn
7. **Gajewska J.** Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A. Effects of environmental stress on expression of virulence factors among *Staphylococcus aureus* isolated from food of animal origin, 27th International ICFMH Conference (Food Micro 2022), 28-31.08.2022, Ateny, Grecja.
8. **Gajewska J.** Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A. *Staphylococcus aureus* from artisanal cheese chain production in Poland- biocide tolerance and antibiotic resistance. IXth International Session of Young Scientific Staff – Nowadays food – local vs. global? Traditional vs. innovative? 19-20.05.2022. Poznań

9. **Gajewska J**., Chajęcka-Wierzchowska W. Biofilm Formation and genetic background of adhesion ability among coagulase-negative and coagulase positive staphylococci isolates from raw cow's milk. World Microbe Forum 2021, 20-24.06.2021, online
10. **Gajewska J**., Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A. Występowanie i charakterystyka molekularna *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z mleka surowego. XXV Jubileuszowa Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ 20-21.05.2021, Wrocław
11. Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., **Gajewska J.,** Buta M. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from ready-to-eat food to form biofilms. The II Food Factor Conference Established, emerging and exploratory Food Science and Technology, 8-9.11.2018, Torremolinos, Hiszpania
12. Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Zarzecka U, **Gajewska J.,** Montowski G. Phenotypic and genotypic antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci from ready-to-eat food in Poland. BioMicroWorld 2018, VIII International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, 24-25.05.2018, Torremolinos, Hiszpania
13. **Gajewska J.,** Wiśniewski P. Jakość mikrobiologiczna niepasteryzowanych soków owocowych i warzywnych, 49. MSKN w Olsztynie, 24.09.2020, Olsztyn
14. **Gajewska J.** Antybiotykooporność paciorkowców Enterococcus wyizolowanych z mleka surowego I serów, 48 MSKN w Olsztynie, 11-12.04.2019, Olsztyn
15. Balicki D., **Gajewska J**. Wpływ bakterii fermentacji mlekowej na *Listeria monocytogenes* – kryterium bezpieczeństwa mikrobiologicznego środków spożywczych, 47. MSKN w Olsztynie, 26-27.04.2018, Olsztyn

**WYKŁADY NA ZAPROSZENIE, DZIAŁALNOŚĆ POPULARYZATORSKA**

- Współprowadzenie warsztatów pt. „Co skrywa pracownia mikrobiologiczna i inne pracownie badawcze" dla uczniów I LO im. Feliksa Nowowiejskiego w Braniewie, 19.03.2024, Olsztyn
- Przeprowadzenie wykładu „Mikroorganizmy w żywności- wrogowie czy przyjaciele" dla uczniów Zespołu Szkół Mechaniczno-Energetycznych im. Tadeusza Kościuszki w Olsztynie, 27.04.2023, Olsztyn
- III Dni Świadomości Żywieniowej „Mikroorganizmy w żywności – wrogowie czy przyjaciele?", 10-15.12.2021, Olsztyn
- II Dni Świadomości Żywieniowej, „Mikrobiologiczne zatrucia pokarmowe", 18-25.04.2021, Olsztyn
- Wywiady dla radia UWMfm, Wiadomości Uniwersyteckich

**UDZIAŁ W WYJAZDACH BADAWCZYCH I STAŻACH NAUKOWYCH**

1. **University Residential Centre** (Ce.U.B.) Via Aldruda Frangipane, Berinoro, Włochy Szkoła Letnia: SUSTAINABLE PRODUCTION and consumption of meat, poultry and seafood (23-27.10.2023)

2. **Escola Superior de Biotecnologia**, Rua Diogo de Botelho 1327, 4169-005 Porto, Portugalia w ramach projektu PROM – międzynarodowa wymiana doktorantów i kadry akademickiej. (10.02.2023-11.03.2023), opiekun stażu: prof. Célia M. Manaia
3. **University of Catania**, Department of Agriculture, Food and Environment (Di3A)- w ramach projektu POWR.03.05.00-00-Z310/17 pn. „Program Rozwojowy Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie", Zadanie 16. „Realizacja programów stażowych dla pracowników naukowo – dydaktycznych UWM w Olsztynie" (23.10-13.11.2022) opiekun stażu: prof. Cinzia Caggia
4. **Gdański Uniwersytet Medyczny**, Zakład Immunobiologii i Mikrobiologii Środowiska, Wydział Nauk o Zdrowiu z Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej (6-10.06.2022), opiekun stażu: dr Monika Kurpas

**UDZIAŁ W PROJEKTACH BADAWCZYCH**

1. Projekt*: Odpowiedź na warunki stresowe u Staphylococcus aureus: wpływ na entetotoksyczność i metycylinooporność w warunkach stresu istotnego dla rzemieślniczej produkcji sera.* **PRELUDIUM 20** (NCN) (2021/41/N/NZ9/00918). Okres realizacji: 2022-2024, pełniona funkcja: **kierownik projektu**
2. Projekt: *Sieć badawcza uczelni przyrodniczych na rzecz rozwoju polskiego sektora mleczarskiego – projekt badawczy,* MEiN (MEiN/2023/DPI/287). Okres realizacji:
    - 01.01.2024-31.12.2024 - **pracownik administracyjny wydziałowy**
    - 01.04.2024-30.09.2024 **- wykonawca zadania I.1**
3. Projekt: *Wpływ zabiegów fotodynamicznych opartych na naturalnych (sono) foto-uczulaczach na Listeria monocytogenes*, **OPUS 23** (NCN) (2022/45/B/NZ9/00299), kierownik projektu: dr hab. Magdalena Anna Olszewska, prof. UWM, okres realizacji: 05.2023-10.2023, 01.2024-06.2024- pełniona funkcja: **wykonawca**
4. Projekt „*Postbiotyki- naturalna alternatywa dla zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego serów zagrodowych.* Finansowany przez MNiE, konkurs **Studencie Koła Naukowe Tworzą Innowacje** (MEiN), nr projektu: SKN/SP/569724/2023), okres realizacji: 05.2023- 04.2024, pełniona funkcja: **współautor wniosku i główny wykonawca**
5. Projekt: pt. *Ilościowa ocena lekowrażliwości drobnoustrojów oraz wykrywanie mechanizmów oporności z zastosowaniem systemu BacterOMIC™ w odniesieniu do metody referencyjnej*" koordynator projektu z ramienia UWM: dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska, okres realizacji 06-09.2021, pełniona funkcja: **wykonawca**
6. Projekt pt. *Wpływ technologii płotków i obróbki sous-vide na ekspresję czynników wirulencji i genów oporności na antybiotyki u Listeria monocytogenes i Enterococcus sp*., **OPUS 15** (NCN) (2018/29/B/NZ9/00645) kierownik projektu dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM; okres realizacji: 06.2021-11.2021, pełniona funkcja: **wykonawca**
7. Projekt pt. „*Zjadliwość, enterotoksyczność i antybiotykooporność szczepów gronkowców koagulazo-ujemnych izolowanych z żywności z uwzględnieniem możliwości horyzontalnego transferu genów*, **SONATA 12** (NCN) (2016/23/D/NZ9/01404), kierownik projektu: dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska, okres realizacji: 11.2020-06.2021, pełniona funkcja: **wykonawca**

**UDZIAŁ W KOŁACH I TOWARZYSTWACH NAUKOWYCH**

- 2017- 2023- Naukowe Koło Mikrobiologii Żywności „Kocuria”
  * 2021-2023- Przewodnicząca Koła
  2018-2020 - sekretarz Koła
- 2021- obecnie - Polskie Towarzystwo Technologów Żywności - członek
- 2021- obecnie- Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
  * sekretarz Oddziału w Olsztynie na kadencję 2023-2026
- 2016-2019 Naukowe Koło Technologów Mleczarstwa – członek

**UDZIAŁ W SZKOLENIACH**

1. Szkolenie online: AMR Workshop, “Bioinformatics tools and methods for antimicrobial resistance”, Organised by PHA4GE, JPIAMR and CLIMB-BIG-DATA, 15.10.2021
2. Szkolenie online: „Jakość wody w badaniach analitycznych. Dlaczego woda może stanowić zagrożenie?”, 04.10.2021, Merck
3. Udział w webinarium z cyklu Vademecum Bezpieczeństwa Żywności pt. „Oznaczanie mykotoksyn i alergenów w żywności techniką ELISA”, ARGENTA
4. Szkolenie Molecular Techniques For Food and Feed Testing - Techniki molekularne do testowania żywności i pasz, 30.04.2021, ARGENTA
5. Szkolenie w zakresie obsługi aparatów sterylizacyjnych (autoklawów) z uwzględnieniem warunków BHP, Olsztyn, (14.10.2020)
6. Szkolenie z obsługi Vitek 2 Compact bioMerieux, Olsztyn (20-21.11.2019)
7. Szkolenie z obsługi MALDI-TOF vitek ms bioMerieux, Olsztyn (25-27 09.2019)

**NAGRODY I WYRÓŻNIENIA**

1. 2019 - **Nagroda Tetra Pak** dla najbardziej wyróżniającego się absolwenta Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
2. 2019 - Laureat nagrody firmy **ECOLAB** dla najlepszego Absolwenta Wydziału Nauki o Żywności – członka Studenckich Kół Naukowych
3. 2019 - Dyplom uznania Dziekana Wydziału Nauki o Żywności za ukończenie studiów II stopnia z wyróżnieniem
4. 2019 - II miejsce w V edycji Konkursu organizowanego przez Wydział Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie oraz Zentis Polska Sp. Z. o. o., „Nowatorska Przekąska mleczna dla pokolenia Z” Zespół: Dziurlikowska W., **Gajewska J.** za produkt Gouda Chips.
5. 2019 - III miejsce w V edycji Konkursu organizowanego przez Wydział Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie oraz Zentis Polska Sp. Z. o. o., „Nowatorska Przekąska mleczna dla pokolenia Z” Zespół: Dziurlikowska W., **Gajewska J.** za produkt Twarogella- twarogowy miks kulkowy
6. 2018 – I-miejsce za referat „Występowanie w żywności antybiotykoopornych szczepów gronkowców” w konkursie międzynarodowym na najlepszą pracę badawczą podczas XLVII Międzynarodowego Seminarium Kół Naukowych, Olsztyn
7. 2018 - Udział w XX European Dairy Sensory Contest, 15-18. 05.2018, miejsce: Leeuwarden, Holandia; Organizator: Van Hall Larenstein University Of Applied Sciences

we współpracy z EUROPEL (European Alliance of DairyTeachers; 4 miejsce dla zespołu: Dziurlikowska W., **Gajewska J**., Mederska H.

**WYKONANE RECENZJE NAUKOWYCH**

Wykonano recenzje antyków naukowych dla czasopism:

- *Antibiotics*, MDPI (3)
- *Antioxidants* (MDPI) (1)
- *Microorganisms* (MDPI) (2)
- *Toxins* (MDPI) (1)

**STYPENDIA NAUKOWE**

- Stypendium Rektora Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie dla najlepszych studentów w roku akademickim 2018/2019
- Stypendium Rektora Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie dla najlepszych studentów w roku akademickim 2016/2017
- Stypendium Rektora Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie dla najlepszych studentów w roku akademickim 2015/2016

**DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA I DODATKOWA**

- Redaktor gościnny wydania specjalnego (Guest Editor of Special Issue) wspólnie z dr inż. Wioletą Chajęcką- Wierzchowską oraz dr hab. inż. Anną Zadernowską, prof UWM, Special Issue czasopisma Microorganisms (ISSN: 2076-2607, IF: 4.926) Special Issue: *Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Bacteria Isolated from Food* (2022-2023)
- Przygotowanie prezentacji tematycznych Dni Otwartych UWM, Mikołajki z NoŻami
- Współudział w organizacji w XIX European Dairy Sensory Contest, 14-17.09.2017, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
- Udział w organizacji OGÓLNOPOLSKIEGO ŚWIĘTA SERA - Festiwal Serów i Twarogów Polskiego Mleczarstwa, Edycja 2017 i 2018
- 2016-2017- Wolontariusz fundacji Uniwersytet Dzieci

## CAŁKOWITE ZESTAWIENIE DOROBKU NAUKOWEGO

| **Publikacje naukowe** | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Całkowity liczba publikacji | | | 25 | |
| Publikacje stanowiące rozprawę doktorską | | | 4 | |
| Rozdziały w monografiach pokonferencyjnych | | | 6 | |
| **Autorstwo/współautorstwo w pracach naukowych** | | | | |
| **L.p.** | **Rok** | **Czasopismo** | **Punkty MNiSW/MEIN**[1] | **IF**[2] |
| 1 | 2019 | *Journal of the Science of Food and Agriculture* | 100 | 2.422 |
| 2 | 2019 | *International Journal of Food Microbiology* | 100 | 4.187 |
| 3 | 2020 | *Pathogens** | 100 | 3.492 |
| 4 | 2020 | *Pathogens* | 100 | 3.492 |
| 5 | 2022 | *Przegląd Mleczarski* | 5 | - |
| 6 | 2022 | *Molecules** | 140 | 4.6 |
| 7 | 2023 | *International Dairy Journal** | 200 | 3.1 |
| 8 | 2023 | *Pathogens** | 100 | 3.7 |
| 9 | 2023 | *Food Control** | 140 | 6.0 |
| 10 | 2023 | *NFS Journal* | 140 | 0.663 |
| 11 | 2023 | *International Journal of Environmental Research and Public Health* | 20 | 4.614 |
| 12 | 2023 | *Foods* | 140 | 5.2 |
| 13 | 2023 | *Life-Basel** | 70 | 3.2 |
| 14 | 2023 | *Microorganisms** | 40 | 4.5 |
| 15 | 2023 | *Science of The Total Environment* | 200 | 9.8 |
| 16 | 2024 | *Science of The Total Environment* | 200 | 9.8 |
| 17 | 2024 | *Toxins* | 140 | 4.2 |
| 18 | 2024 | *Przegląd Mleczarski* | - | - |
| 19 | 2024 | *Molecules* | 140 | 4.6 |
| Rozdziały w monografiach | | | 45 | |
| | | **SUMA** | **2120** | **77.52** |
| **Inne aktywności naukowe** | | | | |
| Doniesienia na konferencjach naukowych | | | 15 | |
| krajowe | | | 9 | |
| międzynarodowe | | | 6 | |
| Wyjazdy badawcze/staże naukowe | | | 3 | |
| Udział w kołach i towarzystwach naukowych | | | 4 | |
| Udział w projektach badawczych | | | 7 | |
| Wykonane recenzje artykułów | | | 7 | |
| **Wskaźnik oceny dorobku naukowego (Web of Science)** | | | | |
| H-index | | | 6 | |
| Liczba cytowań bez autocytowań | | | 101 | |

[1] Liczba punktów zgodnie z załącznikami do komunikatów MNiSZW oraz wykazem MEiN zgodna z rokiem opublikowania pracy

[2] Impact Factor (IF) według listy *Journal Citation Reports* (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania pracy, .dla prac których IF nie został obliczony liczono ostatni aktualny

* funkcja autora korespondencyjnego

# 11. ZAŁĄCZNIKI

Pełne teksty publikacji będące podstawą niniejszej rozprawy wraz z oświadczeniami współautorów.

**ZAŁĄCZNIK 1**

**Gajewska, J**., Zakrzewski, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Meta-analysis of the global occurrence of *S. aureu*s in raw cattle milk and artisanal cheeses. *Food Control* 147, 109603. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2023.109603

Food Control 147 (2023) 109603



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont





# Meta-analysis of the global occurrence of *S. aureus* in raw cattle milk and artisanal cheeses

Joanna Gajewska *, Arkadiusz Zakrzewski, Wioleta Chajęcka-Wierzchowska, Anna Zadernowska

*Department of Industrial and Food Microbiology, Faculty of Food Science, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Plac Cieszyński 1, 10-726, Olsztyn, Poland*

ARTICLE INFO

*Keywords:*
Meta-analysis
Milk
Artisanal cheeses
*Staphylococcus aureus*
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Due to the rich source of compounds, milk and dairy products are an excellent environment for the growth of many groups of microorganisms, including *Staphylococcus aureus*. The presence of pathogens in raw materials can threaten the dairy industry around the world.

The objective of this study was to evaluate the prevalence and diversity of *Staphylococcus aureus* and methicillin – resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates in raw milk (buffalo's, cow's, goat's, sheep's) and raw milk cheeses worldwide by using meta-analytical methods. For this purpose, the searched relevant articles published in PubMed, Scopus and Web of Science were searched for studies in the years 2011–2021 using related keywords. Results showed that the S. *aureus* were isolated from 29.07% of the milk samples and 42.81% of the cheese samples. The most frequent isolation was observed from raw cow's milk, 32.23% (95% CI: 29.53–34.92), and least frequent from sheep's milk, 18.78% (95% CI: 13.48–24.08). In cheeses, *S. aureus* was most often isolated from goat's milk cheeses, 68.33% (95% CI: 0–100) (Table 2).

The results showed a downward trend in *S. aureus* prevalence in cow's milk samples can be observed over the years. Obtained results of this meta-analysis improved understanding of the prevalence of *S. aureus* in different raw milk and raw milk cheeses and provided results that can be useful as input for quantitative microbiological risk evaluation modeling.

## 1. Introduction

Milk and dairy products, due to their rich source of chemical compounds, are an excellent environment for the growth of many groups of microorganisms, including *Staphylococcus aureus* (Haque et al., 2018). This pathogen is responsible for causing infectious, diseases as well as food poisoning (Fursova et al., 2020). The occurrence *of S. aureus* in dairy cattle is associated with subclinical or clinical mastitis (Srednik et al., 2018; Zaatout et al., 2019).

The presence of pathogenic strains in raw material may pose a threat to the dairy industry worldwide (Riva et al., 2015). Contamination of raw milk with *S. aureus* strains consequently may be a source of contamination of dairy products, especially from unpasteurized milk (Fitzgerald et al., 2001; Johler et al., 2018).

The criterion for the enumeration of coagulase-positive staphylococci and for the detection of staphylococcal enterotoxins is described in Commission Regulation (EC) No 2073/2005. Although literature data indicate the frequent presence of *S. aureus* strains in raw milk and milk products (Dittmann et al., 2017; Ou et al., 2018; Regasa et al., 2019; Rola et al., 2016), if the level of contamination does not exceed $10^5$ CFU/g, it is not considered hazardous.

*S. aureus* is thought to be one of the most common causes of foodborne outbreaks (Asiimwe et al., 2017; da Silva et al., 2020). The virulence of this pathogen is closely related to the toxins. Staphylococcal enterotoxins (SEs) and SE-like toxins (SEls) are involved in causing food poisoning, toxic shock syndrome, and staphylococcal infectious diseases in humans. Literature data report that several outbreaks of food poisoning caused by staphylococci have been associated with the consumption of raw milk cheeses (Filipello et al., 2020; Johler et al., 2018; Simeão Do Carmo et al., 2002). It is therefore important to continuously monitor *S. aureus* strains in the dairy production chain and develop strategies to prevent the spread of this pathogen.

Therefore, the aim of present research was performed to assess the global prevalence in last 10 years rate of *S. aureus* contamination in raw milk (raw cow's, sheep's, goat's, buffalo's milk) and cheeses made from raw, unpasteurized milk sampled from retail markets, farms and

* Corresponding author. Department of Industrial and Food Microbiology, Faculty of Food Science, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Plac Cieszyński 1, 10-726, Olsztyn, Poland.
*E-mail address:* joanna.gajewska@uwm.edu.pl (J. Gajewska).

https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109603
Received 24 August 2022; Received in revised form 30 December 2022; Accepted 1 January 2023
Available online 6 January 2023
0956-7135/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

processing companies.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Search strategy

Prepared systematic review was conducted following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines. We performed systematic searches in PubMed, Scopus and Web of Science. The keywords used as search queries in the databases were "milk" AND "cheeses" AND ("*Staphylococcus aureus*" OR "*S. aureus*" AND ("occurrence" OR "prevalence") in the present survey both separately and simultaneously in December 2021–March 2022. The search was limited to the publication dates from January 2011 to December 2021. Articles without a population size of *S. aureus*, experimental work, other types of milk (human, camel) were excluded from the study. Titles and abstracts of retrieved articles were reviewed independently by the author (JG) and any discrepancy was resolved through discussion with the second and last author (AJZ, WCh-W, AZ).

### 2.2. Eligibility criteria

The inclusion criteria were testing for the presence of *S. aureus* in raw milk or cheeses made from raw, non-pasteurized milk.

### 2.3. Data extraction

The data were collected based on the authors' last names, year of publication, type of milk, sample size, *S. aureus* isolate number and MRSA strains. Data were extracted by a reviewer (JG) and disagreements were resolved by consulting with AJZ, WCh-W, AZ.

### 2.4. Statistical analysis

To estimate the overall prevalence meta-analyses, PQStat version 1.4.8 statistical software was used. Meta-analysis was performed by using the random-effects model to estimate the pooled prevalence and corresponding 95% confidence interval (CI). Heterogeneity between estimates was assessed using the Higgin's $I^2$ and Cochran's Q method, which describes the percentage of variation not due to a sampling error across studies. An $I^2$ value above 75% indicates high heterogeneity. Sensitivity analysis was applied to determine if the exclusion of any

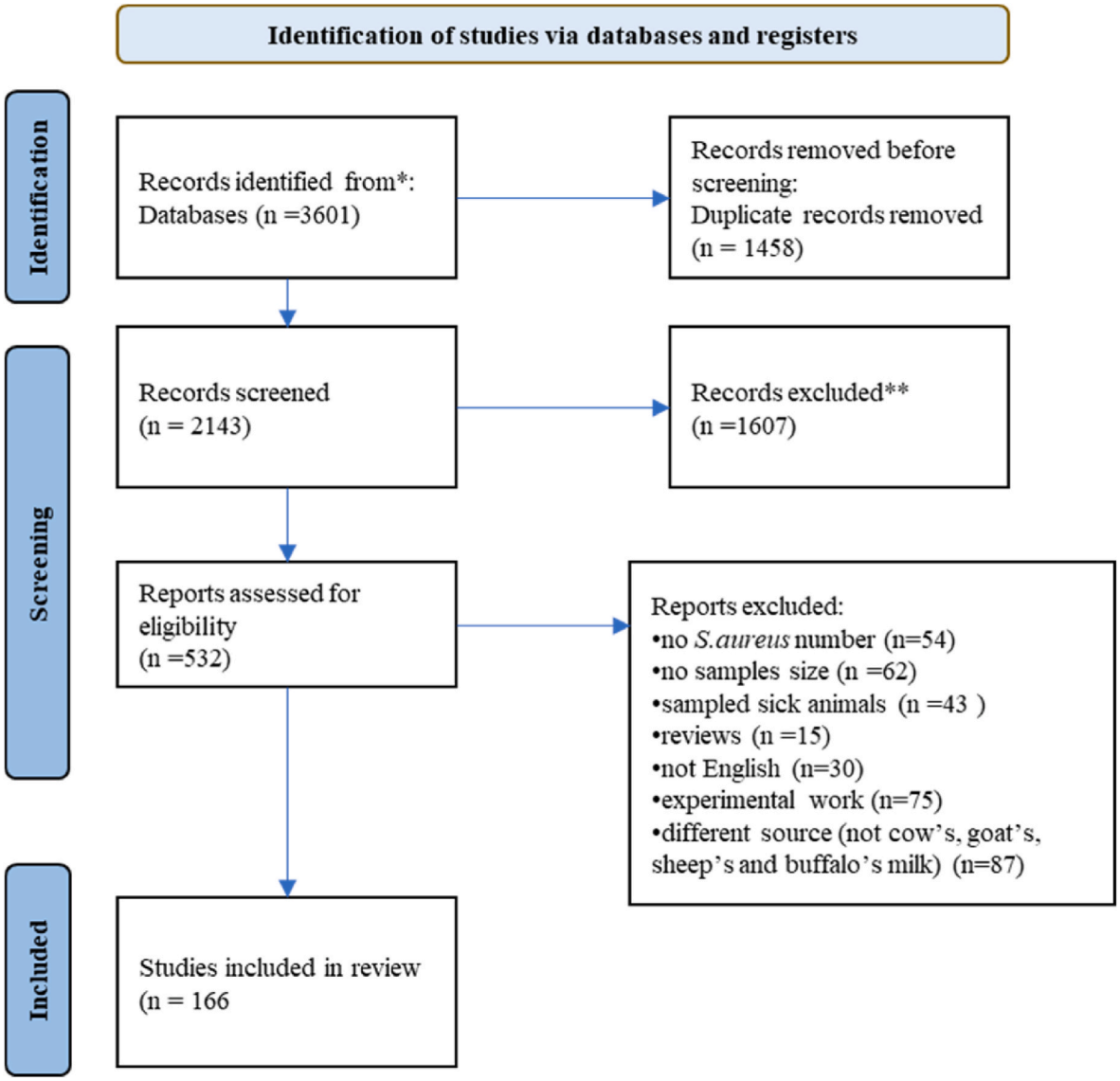



**Fig. 1.** Flow diagram showing the study selection process.

study had a significant effect on the estimated pooled prevalence while ignoring each one. ANNOVA test was used to compare a statistical significance among species and clusters. Meta-regression for *S. aureus* clusters was used to investigate whether changes in methicillin-resistance occurrence could be observed over the years. The results show models for which the Q value of the model was statistically significant $p < 0.05$.

## 3. Results

### 3.1. Study characteristics

During systematic research 3601 articles were obtained among with 532 were fully reviewed. Finally. 166 articles were included in the meta-analysis (Fig. 1). The characteristics of the articles are presented in Table 1.

In the studies included in the meta-analysis, a total of 62,267 samples were tested, including 58,795 samples of milk, including cow's, goat's sheep's and buffalo's milk as well as 3472 cheese samples made from cow's, goat's and mixed milks.

### 3.2. Pooled prevalence of S. aureus and MRSA

As a result of the analysis, it was shown that the *S. aureus* species were isolated from 29.07% of the milk samples and 42.81% of the cheese samples. Statistical analysis showed that differences within and between groups are significant and the p-value is < 0.000001 and 0.028591, respectively. The most frequent isolation was observed from raw cow's milk, 32.23% (95% CI: 29.53–34.92), and least frequent from sheep's milk, 18.78% (95% CI: 13.48–24.08). In cheeses, *S. aureus* was most often isolated from goat's milk cheeses, 68.33% (95% CI: 0–100). The studies in the group of cheese and milk were characterized by high heterogeneity and the $I^2$ coefficient was 99.24% and 99.45%, respectively. Based on the Eagger's test, it was determined that there was no bias in the studies and for both the p value was <0.000001 (Fig. 2).

Due to the small number of publications containing information on the presence of MRSA in cheese samples, no differentiation was made between the types of milk the cheese was made of. From the analyzes it was determined that MRSA strains were present in 1.69% (95% CI: 0–3.38) of the cheese samples overall. In milk samples it was shown that the most frequent MRSA strains were in milk, the origin of which was not specified, and it was 6.52% (95% CI: 4.69–8.82), relatively often MRSA strains were isolated from buffalo's milk, as they were found in 4.03% samples (95% CI: 2.04–6.75). The least frequently MRSA strains were isolated from sheep's milk (1.24% (95% CI: 0.79–1.89) (Table 2). Statistical analysis showed that differences within groups are significant and the p-value is < 0.000001, however the differences between groups are not significant and the p-value is 0.09945. The results of S. *aureus* and MRSA pooled prevalence in milk and cheeses are shown in forest plots (Figs. S1–S6. Supplementary materials).

The results of the studies included in the meta-analysis were also characterized by high heterogeneity and the $I^2$ value was 92.54% for the milk samples and 54% for the cheese samples. Eagger was 0.026269 and < 0.000001 corresponding to cheese and milk (Fig. 2).

### 3.3. Distribution of MRSA, among different countries based on meta-analysis of published original articles-subgroup analysis

Due to the largest number of publications specifying the presence of *S. aureus* strains and MRSA strains from cow's milk samples, subsequent analyzes focus on them. The prevalence of MRSA and *S. aureus* among geographic regions in the subgroup analysis, are shown in Figs. 3 and 4. The prevalence of *S. aureus* was 33.29% (95% CI 27.48–39.10) among 9583 cow's milk samples in Asia, 27.81% (95% CI 24.82–30.79) among 27,102 samples in Europe, 35.04% (95% CI 10.37–59.70) among 5527 samples in North America, 27.89% (95% CI 2.90–52.87) among 1424 samples in South America and 32.62 (95% CI 17.62–47.61) among 7446 samples in Africa and 57.79% (95% CI 13.02–100) among 312 samples in Oceania. The most frequent *S. aureus* prevalence was 53.33% (95% CI 50.50–56.16) in Turkey, followed by 50.17% (95% CI 48.62–51.72) in Norway and the least frequent was 13.88 (95% CI 9.66–18.76) in Indonesia, followed by 14.67% (95% CI 13.61–15.77) in South Africa. Statistical analysis showed that differences within groups are significant and the p-value is 0.000159, however the differences between groups are not significant and the p-value is 0.844251.

The analysis of the data from the publications on the occurrence of MRSA strains showed the occurrence at the 4.99% (95% CI 4.43–5.59) among 5637 cow's milk samples in Asia, 1.08% (95% CI 0.94–1.23) among 20,096 samples in Europe, 1.89% (95% CI 0.94–1.23) among 281 samples in North America and 13.06 (95% CI 10.69–15.72) among 728 samples in Africa. There was not enough data to analyze MRSA prevalence from Oceania and South America (Fig. 5). Statistical analysis showed that differences within and between groups are significant and the p-value is < 0.000001 and 0.000001, respectively.

The most frequent MRSA prevalence was 30.90% (95% CI 25.21–37.41) in Egypt, and the least frequent was 0.77 (95% CI 0.44–1.24) in Czech Republic, followed by 1.87% (95% CI 1.69–6.86) in China (Fig. 6).

Based on the analysis of the prevalence of *S. aureus* and MRSA in developed and developing countries, the prevalence of *S. aureus* in developed countries was 32.84% (95% CI 32.23–33.36) and in developing countries was 32.19% (95% CI 31.52–32.86). Statistical analysis showed that differences within groups are significant and the p-value is 0.000001, however the differences between groups are not significant and the p-value is 0.85608. The prevalence of MRSA in developed countries was 1.45% (95% CI 1.29–1.62) and in developing countries was 4.13% (95% CI 3.69–4.62). Statistical analysis showed that differences within and between groups are significant and the p-value is < 0.000001 and 0.000003, respectively.

A meta-regression analysis was performed for the study year as a categorical variable. The results of meta-regression are showed in supplementary materials (Figs. S7–S20). A downward trend in *S. aureus* prevalence in cow's milk samples can be observed, the value of beta coefficients is −0.005913, however the p value for a model was 0.232986. Different results were obtained for the occurrence of MRSA and an upward trend was observed, which was 0.000934, although here also no statistical significance, and the p value for a model was 0.432963.

## 4. Discussion

*S. aureus* is an opportunistic pathogen known to cause severe infections in humans and animals (Brahma et al., 2022). Due the increasing worldwide trend of consumption of unpasteurized (raw) milk and milk products such as raw milk cheese, it is important to monitor the microbiological risks associated with the consumption of these products (Cardozo et al., 2021). Determining the prevalence of *S. aureus* is a significant step for interventions to control the emergence and transmission of this pathogen. Despite food safety criteria for *S. aureus* that exist worldwide, the prevalence of this pathogen in raw milk and raw milk cheeses is high. The multiplicity of food-borne disease outbreaks linked to tainted dairy products demonstrates *S. aureus* public health importance. Literature reports showed that dairy animals are probably the main source of contamination of raw milk with *S. aureus* (Gebremedhin et al., 2022).

Our results showed that the *S. aureus* were isolated from 29.07% raw milk samples worldwide in the past 10 years. Compared to previous reports, we observed a decrease in the prevalence of *S. aureus* in raw cow's milk samples between the years 2000–2016 (33.5%) (Ou et al., 2018) and the results of the present study 2011–2021 (29.07%). This study showed the low prevalence of *S. aureus* rates in raw milk in Europe 27.81% (95% CI 24.82–30.79) and Asia 33.29% (95% CI 27.48–39.10)

**Table 1**
Main characteristics of included studies.

| Authors | Year | Country | Economic condition | Continent | Source | Milk Type | N samples[a] | N *S. aureus*[b] | N MRSA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Sasidharan et al. (2011) | 2011 | Malaysia | developing | Asia | milk | cow's | 12 | 4 | 1 |
| Kav et al. (2011) | 2011 | Turkey | developing | Asia | cheese | sheep's/ cow's | 127 | 53 | 3 |
| Tasci et al. (2011) | 2011 | Turkey | developing | Asia | cheese | not specified | 50 | 18 | – |
| Korpysa-Dzirba and Osek (2011) | 2011 | Poland | developed | Europe | milk | cow's | 237 | 77 | – |
| Addis et al. (2011) | 2011 | Ethiopia | developing | Africa | cheese | not specified | 200 | 10 | – |
| Arslan and Ozdemir (2011) | 2011 | Turkey | developing | Asia | cheese | not specified | 200 | 135 | – |
| Vyletělová et al. (2011) | 2011 | Czech Republic | developed | Europe | milk | cow's | 1427 | 506 | 23 |
| | | | | | milk | goat's | 76 | 21 | 21 |
| | | | | | milk | sheep's | 117 | 12 | 12 |
| Mirzaei (2011) | 2011 | Iran | developing | Asia | milk | cow's | 50 | 22 | 0 |
| Jakobsen et al. (2011) | 2011 | Norway | developed | Europe | milk | cow's | 73 | 34 | – |
| Aydin et al. (2011) | 2011 | Turkey | developing | Asia | milk | cow's | 303 | 64 | – |
| Persson and Olofsson (2011) | 2011 | Sweden | developed | Europe | milk | goat's | 222 | 9 | – |
| Fotou et al. (2011) | 2011 | Greece | developed | Europe | milk | sheep's | 240 | 58 | – |
| (Deresse Daka, 2012) | 2012 | Ethiopia | developing | Africa | milk | cow's | 160 | 78 | – |
| Alian et al. (2012) | 2012 | Iran | developing | Asia | milk | cow's | 190 | 34 | 0 |
| | | | | | milk | sheep's | 78 | 7 | 0 |
| | | | | | milk | goat's | 80 | 5 | 0 |
| Wang et al. (2012) | 2012 | China | developing | Asia | milk | cow's | 58 | 17 | – |
| Costa Sobrinho et al. (2012) | 2012 | Brazil | developing | America | milk | cow's | 154 | 145 | – |
| Linage et al. (2012) | 2012 | Spain | developed | Europe | milk | sheep's | 390 | 57 | 0 |
| Lee et al. (2012) | 2012 | Brazil | developing | America | milk | cow's | 340 | 38 | – |
| Desissa et al. (2012) | 2012 | Ethiopia | developing | Africa | milk | cow's | 195 | 92 | – |
| Can and çelik (2012) | 2012 | Turkey | developing | Asia | cheese | | 200 | 12 | 2 |
| Štástková et al. (2012) | 2012 | Czech Republic | developed | Europe | milk | cow's | 511 | 199 | – |
| (Gücükoğlu et al., 2012) | 2012 | Turkey | developing | Asia | milk | cow's | 297 | 235 | – |
| Hill et al. (2012) | 2012 | New Zealand | developed | Oceania | milk | cow's | 297 | 235 | – |
| Bingöl et al. (2012) | 2012 | Turkey | developing | Asia | cheese | | 150 | 40 | – |
| Haran et al. (2012) | 2012 | USA | developed | America | milk | cow's | 150 | 93 | 2 |
| Kreausukon et al. (2012) | 2012 | Germany | developed | Europe | milk | cow's | 635 | – | 28 |
| Mørk et al. (2012) | 2012 | Norway | developed | Europe | milk | cow's | 3982 | 166 | – |
| Kouamé-Sina et al. (2012) | 2012 | Côte d'Ivoire | developing | Africa | milk | cow's | 118 | 21 | – |
| Cicconi-Hogan et al. (2013) | 2013 | USA | developed | America | milk | cow's | 290 | 159 | – |
| Rahimi (2013) | 2013 | Iran | developing | Asia | cheese | sheep's/ cow's | 60 | 10 | 0 |
| Thaker et al. (2013) | 2013 | India | developing | Asia | milk | cow's | 100 | 6 | 0 |
| Dambrosio et al. (2013) | 2013 | Italy | developed | Europe | cheese | | 404 | 15 | |
| Hu et al. (2013) | 2013 | China | developing | Asia | milk | cow's | 40 | 12 | 0 |
| Kamal et al. (2013) | 2013 | Egypt | developing | Africa | milk | cow's | 35 | 33 | 3 |
| Spanu et al. (2013) | 2013 | Italy | developed | Europe | milk | goat's | 78 | 60 | 0 |
| de Garnica et al. (2013) | 2013 | Spain | developed | Europe | milk | sheep's | 752 | 199 | – |
| Lim et al. (2013) | 2013 | Korea | developed | Asia | milk | cow's | 559 | – | 35 |
| Cervinkova et al. (2013) | 2013 | Czech Republic | developed | Europe | milk | cow's | 669 | 60 | 0 |
| Rahimi and Alian (2013) | 2013 | Iran | developing | Asia | milk | cow's | 50 | 8 | – |
| | | | | | milk | goat's | 40 | 3 | – |
| | | | | | milk | sheep's | 40 | 4 | – |
| Mullen et al. (2013) | 2013 | USA | developed | America | milk | cow's | 4660 | 185 | – |
| He et al. (2013) | 2013 | China | developing | Asia | milk | cow's | 30 | 4 | 0 |
| (Wang et al., 2014a) | 2014 | China | developing | Asia | milk | cow's | 67 | 6 | – |
| Wang et al. (2014b) | 2014 | China | developing | Asia | milk | cow's | 295 | 43 | – |
| Fadaei (2014) | 2014 | Iran | developing | Asia | milk | cow's | 300 | 125 | – |
| Gargouri et al. (2014) | 2014 | Tunisia | | Africa | milk | cow's | 80 | 80 | – |
| Arefi et al. (2014) | 2014 | Iran | developing | Asia | cheese | | 50 | 18 | 6 |
| Gundogan and Avci (2014) | 2014 | Turkey | developing | Asia | milk | cow's | 50 | 28 | – |
| Chaalal et al. (2014) | 2014 | Algeria | developing | Asia | milk | cow's | 55 | 23 | 1 |
| McAuley et al. (2014) | 2014 | Australia | developed | Ocean | milk | cow's | 15 | 5 | – |
| Paterson et al. (2014) | 2014 | UK | developed | Europe | milk | cow's | 465 | 11 | 10 |
| Saadat et al. (2014) | 2014 | Iran | developing | Asia | milk | cow's | 100 | 9 | – |
| Walcher et al. (2014) | 2014 | Austria | developed | Europe | milk | cow's | 35 | 18 | – |
| Rall et al. (2014) | 2014 | Brazil | developing | America | milk | cow's | 280 | 1 | – |
| Kamana et al. (2014) | 2014 | Rwanda | developing | Africa | milk | cow's | 54 | 23 | – |
| Cicconi-Hogan et al. (2014) | 2014 | USA | developed | America | milk | cow's | 11 | – | 1 |
| Ngasala et al. (2015) | 2015 | Tanzania | developing | Africa | milk | cow's | 105 | 35 | – |
| Tigabu et al. (2015) | 2015 | Ethiopia | developing | Africa | milk | cow's | 477 | 120 | – |
| Li et al. (2015) | 2015 | China | developing | Asia | milk | cow's | 214 | 121 | 1 |
| Nusrat et al. (2015) | 2015 | Bangladesh | developing | Asia | milk | cow's | 40 | 9 | 5 |
| | | | | | cheese | | 40 | 8 | 4 |
| Song et al. (2015) | 2015 | China | developing | Asia | milk | cow's | 248 | 50 | 7 |
| Traversa et al. (2015) | 2015 | Italy | developed | Europe | milk | cow's | 453 | 46 | – |
| Riva et al. (2015) | 2015 | Italy | developed | Europe | milk | cow's | 282 | 30 | – |

(*continued on next page*)

**Table 1** (*continued*)

| Authors | Year | Country | Economic condition | Continent | Source | Milk Type | N samples[a] | N *S. aureus*[b] | N MRSA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Jamali et al. (2015) | 2015 | Iran | developing | Asia | milk | cow's | 1035 | 162 | 21 |
| | | | | | milk | sheep's | 895 | 86 | 11 |
| Sudhanthiramani et al. (2015) | 2015 | India | developed | Asia | milk | cow's | 110 | 43 | 6 |
| Mashouf et al. (2015) | 2015 | Iran | developed | Asia | milk | cow's | 271 | 29 | 3 |
| Rola et al. (2015) | 2015 | Poland | developed | Europe | milk | cow's | 115 | 69 | 0 |
| Antonios et al. (2015) | 2015 | Greece | developed | Europe | milk | sheep's | 342 | 79 | – |
| Sharma et al. (2015) | 2015 | India | developing | Asia | milk | cow's | 160 | 65 | 17 |
| Cortimiglia et al. (2015) | 2015 | Italy | developed | Europe | milk | goat's | 197 | 85 | 4 |
| Taherikalani et al (2015) | 2015 | Iran | developing | Asia | milk | cow's | 112 | 91 | – |
| Akindolire et al. (2015) | 2015 | South Africa | developing | Africa | milk | cow's | 895 | 86 | – |
| Zeinhom et al. (2015) | 2015 | Egypt | developing | Africa | milk | cow's | 100 | 12 | – |
| Oliveira et al. (2016) | 2016 | Brazil | developing | America | milk | cow's | 552 | 65 | 21 |
| Reta et al. (2016) | 2016 | Ethiopia | developing | Africa | milk | cow's | 120 | 29 | – |
| Tarekgne et al. (2016) | 2016 | Ethiopia | developing | Africa | milk | cow's | 297 | 100 | – |
| Ben Said et al. (2016) | 2016 | Tunisia | developing | Africa | milk | cow's | 162 | 43 | 0 |
| Mausam et al. (2016) | 2016 | India | developing | Asia | milk | cow's | 150 | 85 | 44 |
| Caruso et al. (2016) | 2016 | Italy | developed | Europe | milk | sheep's/ goat's | 162 | | 2 |
| Knight-Jones et al. (2016) | 2016 | Zambia | developing | Africa | milk | cow's | 86 | 19 | – |
| Bogdanovicova et. al (2016) | 2016 | Czech Republic | developed | Europe | milk | cow's | 175 | 47 | – |
| | | | | | milk | sheep's | 23 | 9 | – |
| | | | | | milk | goat's | 32 | 11 | – |
| Basanisi et al. (2016) | 2016 | Italy | developed | Europe | cheese | | 90 | 37 | 1 |
| Pexara et al. (2016) | 2016 | Greece | developed | Europe | milk | sheep's | 140 | 34 | 1 |
| Rola et al. (2016) | 2016 | Poland | developed | Europe | milk | cow's | 26 | 12 | – |
| | | | developed | | cheese | | 26 | 18 | – |
| Cortimiglia et al. (2016) | 2016 | Italy | developed | Europe | milk | cow's | 844 | 398 | 32 |
| (Mohammad Reza, Kazemian, Tabar, & Hosseini, 2016) | 2016 | Iran | developing | Asia | milk | cow's | 271 | 29 | – |
| Parisi et al. (2016) | 2016 | Italy | developed | Europe | milk | cow's | 486 | | 12 |
| Bao et. al. (2016) | 2016 | China | developing | Asia | milk | cow's | 121 | 52 | 5 |
| Al-Ashmawy et al. (2016) | 2016 | Egypt | developing | Africa | milk | cow's | 200 | – | 106 |
| Bi et al. (2016) | 2016 | China | developing | Asia | milk | cow's | 894 | 448 | – |
| (L. B. Da Costa et al., 2016) | 2016 | USA | developed | America | milk | cow's | 307 | 146 | – |
| Aqib et al. (2017) | 2017 | Pakistan | developing | Asia | milk | cow's | 450 | 135 | 20 |
| Berhilevych et al. (2017) | 2017 | Ukraine | developing | Europe | milk | cow's | 32 | 4 | – |
| Sharma et al. (2017) | 2017 | India | developing | Asia | milk | cow's | 368 | 73 | 15 |
| Mansour et al. (2017) | 2017 | Egypt | developing | Africa | milk | cow's | 33 | 3 | – |
| | | | | | milk | buffallo's | 58 | 5 | – |
| Pekana et al. (2017) | 2017 | South Africa | developing | Africa | milk | cow's | 384 | 63 | – |
| Taban et al. (2017) | 2017 | Turkey | developing | Asia | cheese | | 63 | 11 | – |
| Bulajic et al. (2017) | 2017 | Serbia | developing | Europe | cheese | | 71 | 36 | – |
| Lan et al. (2017) | 2017 | China | developing | Asia | milk | cow's | 160 | 84 | – |
| Can et al. (2017) | 2017 | Turkey | developing | Asia | milk | cow's | 20 | 25 | |
| | | | | | milk | goat's | 15 | | |
| | | | | | milk | sheep's | 15 | | |
| Nunes and Caldas (2017) | 2017 | Brazil | developing | America | cheese | | 350 | 65 | – |
| Beyene et al. (2017) | 2017 | Ethiopia | developing | Africa | milk | cow's | 48 | 10 | |
| Giacinti et al. (2017) | 2017 | Italy | developed | Europe | milk | sheep's | 286 | 153 | |
| Liu et al. (2017) | 2017 | China | developing | Asia | milk | cow's | 195 | 54 | 16 |
| Mehli et al. (2017) | 2017 | Norway | developed | Europe | milk | cow's | 15 | 15 | – |
| | | | | | cheese | Cow's | 12 | 6 | – |
| Resende et al. (2018) | 2018 | Brazil | developing | America | cheese | | 35 | 9 | – |
| Saka and Terzi Gulel (2018) | 2018 | Turkey | developing | Asia | milk | bufallo's | 100 | 30 | 4 |
| Serrano et al. (2018) | 2018 | Switzerland | developed | Europe | cheese | | 51 | 3 | – |
| Zulauf et al. (2018) | 2018 | Switzerland | developed | Europe | milk | cow's | 73 | 22 | – |
| Pereira et al. (2018) | 2018 | Brazil | developing | America | milk | cow's | 30 | 10 | – |
| | | | | | cheese | | 30 | 22 | – |
| Alves et al. (2018) | 2018 | Brazil | developing | America | cheese | | 17 | 14 | – |
| Mohammed et al. (2018) | 2018 | Tanzania | developing | Africa | milk | cow's | 117 | 46 | – |
| Hussain et al. (2018) | 2018 | Iraq | developing | Asia | cheese | | 120 | 30 | – |
| Gürbüz et al. (2018) | 2018 | Turkey | developing | Asia | cheese | | 106 | 25 | – |
| Papadopoulos et al. (2018) | 2018 | Greece | developed | Europe | milk | cow's | 10 | 4 | 1 |
| | | | | | milk | sheep's | 10 | 6 | 0 |
| | | | | | milk | goat's | 5 | 4 | 0 |
| Johler et al. (2018) | 2018 | Italy | developed | Europe | milk | cow's | 36 | 7 | – |
| | | | | | cheese | | 96 | 77 | – |
| Moura et al. (2018) | 2018 | USA | developed | America | milk | cow's | 120 | 9 | 4 |
| Omoshaba et al. (2018) | 2018 | Nigeria | developing | Africa | milk | goat's | 145 | 31 | 52 |
| | | | | | milk | sheep's | 290 | 41 | |
| Abdel-Hameid Ahmed et al. (2019) | 2019 | Egypt | developing | Africa | milk | cow's | 50 | 21 | – |
| Tyasningsih et al. (2019) | 2019 | Indonesia | developing | Asia | milk | cow's | 80 | 14 | 14 |
| Amenu et al. (2019) | 2019 | Ethiopia | developing | Africa | milk | cow's | 126 | 14 | – |
| | | | | | milk | goat's | 15 | 2 | – |
| Costa et al. (2019) | 2019 | Brazil | developing | America | milk | cow's | 30 | 7 | – |

(*continued on next page*)

**Table 1** (*continued*)

| Authors | Year | Country | Economic condition | Continent | Source | Milk Type | N samples[a] | N *S. aureus*[b] | N MRSA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Effendi et al. (2019) | 2019 | Indonesia | developing | Asia | milk | cow's | 160 | 20 | – |
| Maisano et al. (2019) | 2019 | Italy | developed | Europe | milk | cow's | 661 | 236 | – |
| Titouche et al. (2019) | 2019 | Algeria | developing | Africa | milk | cow's | 190 | 51 | 11 |
| Qian et al. (2019) | 2019 | China | developing | Asia | milk | cow's | 289 | 68 | – |
| Gharsa et al. (2019) | 2019 | Tunisia | developing | Africa | milk | cow's | 57 | 14 | – |
| | | | | | milk | goat's | 9 | 0 | – |
| Khemiri et al. (2019) | 2019 | Tunisia | developing | Africa | milk | cow's | 150 | 47 | – |
| | | | | | milk | goat's | 30 | 0 | – |
| | | | | | milk | sheep's | 100 | 9 | – |
| Alnakip et al. (2019) | 2019 | Spain | developed | Europe | milk | cow's | 100 | 5 | – |
| Korpysa-Dzirba and Osek (2019) | 2019 | Poland | developed | Europe | milk | cow's | 610 | 229 | – |
| Holko, Tančin, Tvarožková, et al. (2019) | 2019 | Slovakia | developed | Europe | milk | sheep's | 310 | 9 | |
| Kadlec et al. (2019) | 2019 | Germany | developed | Europe | milk | cow's | 14924 | 372 | 11 |
| Amandeep et. al. (2019) | 2019 | Pakistan | developing | Asia | milk | cow's | 204 | 32 | – |
| Holko, Tančin, Tvarožková, et al. (2019) | 2019 | Slovakia | developed | Europe | milk | cow's | 521 | 65 | 0 |
| Papadopoulos et al. (2019) | 2019 | Greece | developed | Europe | milk | bufallo's | 9 | 3 | 1 |
| | | | | | milk | sheep's | 7 | 4 | 1 |
| | | | | | milk | goat's | 2 | 0 | 0 |
| Anderson et al. (2019) | 2019 | USA | developed | America | milk | goat's | 497 | 6 | – |
| Abdeen et al. (2020) | 2020 | Egypt | developing | Africa | milk | cow's | 90 | 22 | – |
| Friker et al. (2020) | 2020 | Switzerland | developed | Europe | milk | goat's | 99 | 16 | – |
| | | | | | milk | sheep's | 24 | 2 | – |
| Gajewska and Chajęcka-Wierzchowska (2020) | 2020 | Poland | developed | Europe | milk | cow's | 30 | 12 | – |
| (de Oliveira et al., 2020) | 2020 | Brazil | developing | America | milk | goat's | 70 | 43 | – |
| | | | | America | cheese | | 70 | 70 | – |
| Issa and Aksu (2020) | 2020 | Turkey | developing | Asia | milk | cow's | 406 | 119 | 1 |
| Lourenco et al. (2020) | 2020 | Ireland | developed | Europe | milk | cow's | 57 | 38 | – |
| | | | | Europe | milk | goat's | 11 | 9 | – |
| | | | | Europe | cheese | cow's | 74 | 61 | – |
| | | | | Europe | cheese | goat's | 5 | 5 | – |
| da Silva et al. (2020) | 2020 | Brazil | developing | America | milk | cow's | 38 | 8 | – |
| Aklilu and Ying (2020) | 2020 | Malaysia | Malaysia | | milk | cow's | 63 | 28 | 13 |
| Agbortabot Bissong et al. (2020) | 2020 | South Africa | developing | Africa | milk | cow's | 39 | 19 | – |
| Rahi et al. (2020) | 2020 | Iran | developing | Asia | milk | cow's | 130 | 11 | 8 |
| | | | | | milk | sheep's | 120 | 9 | 7 |
| | | | | | milk | goat's | 120 | 6 | 4 |
| | | | | | milk | bufallos's | 110 | 10 | 8 |
| Mehramuz et al. (2020) | 2020 | Iran | developing | Asia | cheese | | 42 | 42 | – |
| Keyvan et al. (2020) | 2020 | Turkey | developing | Asia | milk | cow's | 142 | 120 | 40 |
| Hegab et al. (2020) | 2020 | Egypt | developing | Africa | cheese | | 150 | 40 | – |
| Mphahlele et al. (2020) | 2020 | South Africa | developing | Africa | milk | cow's | 2862 | 50 | – |
| Lauková et al. (2020) | 2020 | Slovakia | developed | Europe | cheese | | 54 | 5 | – |
| Bastam et al. (2021) | 2021 | Iran | developing | Asia | milk | cow's | 35 | 13 | – |
| | | | | Asia | cheese | | 30 | 21 | – |
| Lianou et al. (2021) | 2021 | Greece | developed | Europe | milk | sheep's | 325 | 54 | – |
| Tamendjari et al. (2021) | 2021 | Algeria | developing | Africa | milk | bufallos's | 87 | 29 | 2 |
| | | | | Africa | milk | goat's | 29 | 2 | 2 |
| Hasan et al. (2021) | 2021 | Bangladesh | developing | Asia | milk | cow's | 20 | 11 | – |
| Kasem et al. (2021) | 2021 | Egypt | developing | Africa | cheese | | 100 | 57 | – |
| Lika et al. (2021) | 2021 | Albania | developing | Europe | milk | cow's | 50 | 5 | – |
| | 2021 | Serbia | developing | Europe | milk | cow's | 50 | 7 | – |
| Silva Júnior et al. (2021) | 2021 | Brazil | developing | America | milk | goat's | 510 | 98 | 17 |
| Yahya Ahmed et al. (2021) | 2021 | Sudan | developing | Africa | milk | cow's | 100 | 63 | – |
| Shi et al. (2021) | 2021 | China | developing | Asia | milk | cow's | 750 | 276 | |
| Lemma et al. (2021) | 2021 | Ethiopia | developing | Africa | milk | cow's | 175 | 43 | |
| Cai et al. (2021) | 2021 | China | developing | Asia | cheese | | 399 | 56 | – |
| (Kou et al., 2021) | 2021 | China | developing | Asia | milk | cow's | 60 | 37 | – |
| Zhao et al. (2021) | 2021 | China | developing | Asia | milk | cow's | 418 | 121 | 3 |
| Tibebu et al. (2021) | 2021 | Ethiopia | developing | Africa | milk | cow's | 141 | 36 | 2 |
| Manovska et al. (2021) | 2021 | Macedonia | developing | Europe | milk | cow's | 153 | 108 | – |
| Lianou et al. (2021) | 2021 | Italy | developing | Europe | milk | goat's | 119 | 21 | – |

-: no information.

[a] Number of *S. aureus* positive samples.

[b] Number of methicillin -resistant *S. aureus* MRSA positive -samples.

compared to results obtained in other continents and indicates the high quality of European and Asian milk. Pasteurization and heat treatment is an important food process for public health and has contributed to decline in staphylococcal infections (James et al., 2021). Therefore, contaminated food products are a possible source of human infections but seem to be a minor risk (EFSA, 2022). Food safety could be an issue due to the consumption of contaminated raw milk and unpasteurized raw milk products. Our study showed, that *S. aureus* was occurred in 42.81% of the raw milk cheese samples in the past 10 years. Occurrence of this pathogen in farmhouse cheeses may be link to a low quality of milk, unhygienic process conditions and also possible source of contamination are people involved in cheese manufacturing, since *S. aureus* is frequently present on skin of cheese maker (Rola et al., 2016).

Our results showed that there are no differences of prevalence of *S. aureus* in raw milk between developed and developing countries

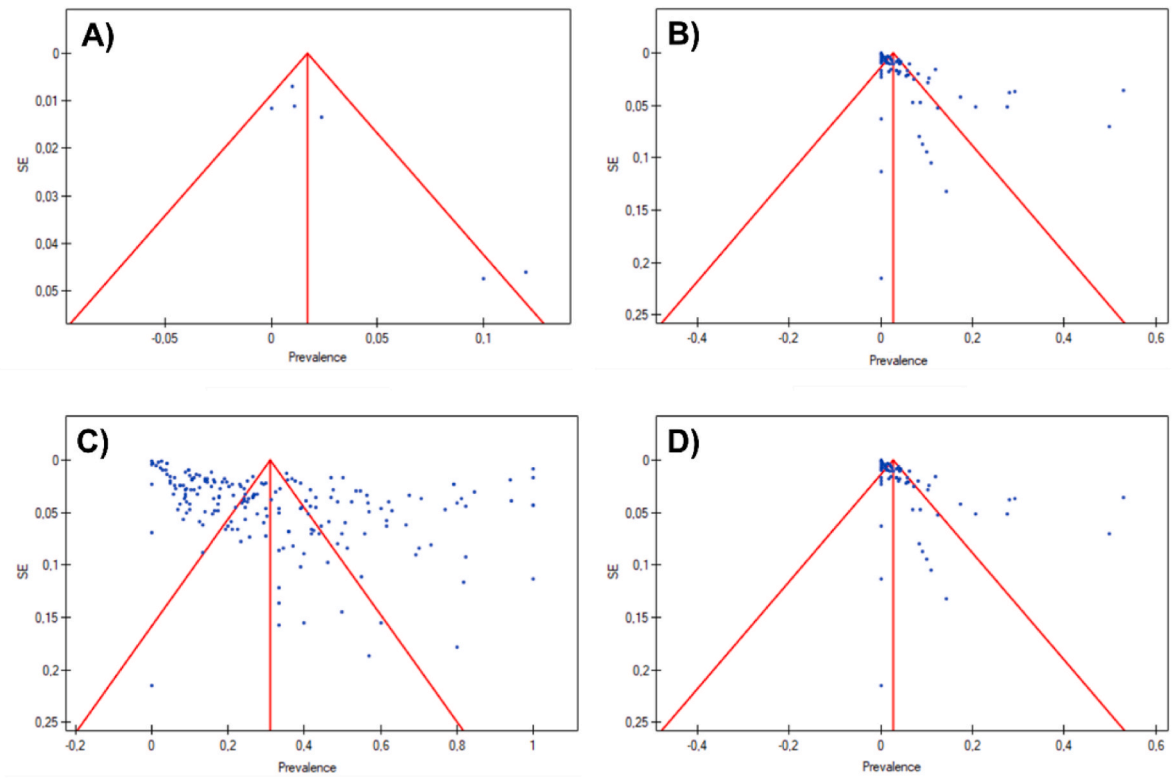



**Fig. 2.** Funnel plot of the meta-analysis on MRSA prevalence in cheese (A) and raw milk (B) and *S. aureus* prevalence in cheese (C) and raw milk (D) in included studies.

**Table 2**
Pooled prevalence of *S. aureus* and methicillin – resistance *S. aureus* (MRSA) isolates.

| Microorganism | Isolation source | | N | n | pooled prevalence [%] | SE | −95%CI | +95%CI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *S. aureus* | cheese | cow's | 9 | 740 | 59.46* | 0.114866 | 36.95 | 81.98 |
| | | goat's | 3 | 275 | 68.33* | 0.381422 | 0.00 | 100.00 |
| | | sheep's/cow's | 3 | 237 | 31.38* | 0.083733 | 14.97 | 47.79 |
| | | sheep's/goat's | 3 | 282 | 56.02* | 0.273131 | 2.49 | 100.00 |
| | | not specified | 14 | 1938 | 26.25* | 0.04689 | 17.06 | 35.44 |
| | | sum | 32 | 3472 | 42.81 | 0.061712 | 30.71 | 54.90 |
| | milk | buffalo's | 5 | 364 | 21.02* | 0.059359 | 9.39 | 32.66 |
| | | cow's | 119 | 51394 | 32.23* | 0.013754 | 29.53 | 34.92 |
| | | goat's | 21 | 2386 | 22.75* | 0.033984 | 16.09 | 29.41 |
| | | sheep's | 19 | 4489 | 18.78* | 0.027033 | 13.48 | 24.08 |
| | | sum | 164 | 58795 | 29.07* | 0.011361 | 28.70 | 29.44 |
| MRSA | cheese | sum | 6 | 567 | 1.69 | 0.008611 | 0.00 | 3.38 |
| | milk | buffalo's | 4 | 306 | 4.03 | 0.012009 | 2.04 | 6.75 |
| | | cow's | 45 | 27294 | 2.80* | 0.002742 | 2.61 | 3.01 |
| | | goat's | 9 | 1097 | 3.07* | 0.012178 | 2.16 | 4.30 |
| | | not specified | 2 | 597 | 6.52* | 0.053592 | 4.69 | 8.82 |
| | | sheep's | 8 | 1757 | 1.24* | 0.005996 | 0.79 | 1.89 |
| | | sum | 66 | 31051 | 2.62 | 0.002392 | 2.15 | 3.09 |

N: Number of articles, n: number of samples; 95% CI: 95% Confidence Interval; SE−standard error; *statistical coefficient.

(32.84% vs. 32.19% respectively). The result obtained in the study was similar to the previously study (Ou et al., 2018).

According to European Food Safety Authority (EFSA) report (EFSA 2022) food, including milk and milk products is not recognized as potential source of MRSA strains, however, few countries are reporting MRSA strains in food voluntarily. Last report about MRSA strains included only data from one country (Germany 2019), where prevalence reached 7.7% MRSA strains from raw cow's milk for manufactures. Therefore, our meta-analysis provides a valuable information about rates of MRSA isolates in recent ten years. The incidence rates of MRSA strains have diverse all over the world: the occurrence of MRSA was 13.06% in Africa, 4.99% in Asia and 1.08% in Europe, 1.89% in North America. The results of our meta-analysis suggest that there is a low prevalence of MRSA in raw milk recovered from healthy animals, but its prevalence increased in the past 10 years (0.000934; no statistical significance, p value for a model was 0.432963). We found that prevalence of MRSA among isolates differs between developed and developing countries (1.45% vs. 4.13%). Literature data report that the prevalence of MRSA in dairy animals and dairy products is low compared to other animal species, and does not exceed 5% (Schnitt & Tenhagen, 2021). In Europe, Commission Implementing Decision (EU) 2020/17292 does not oblige to monito and report of antimicrobial resistance in *S. aureus*. Nevertheless, as well as reports by other authors, it appears that the prevalence of MRSA may increase significantly over the years, at least in

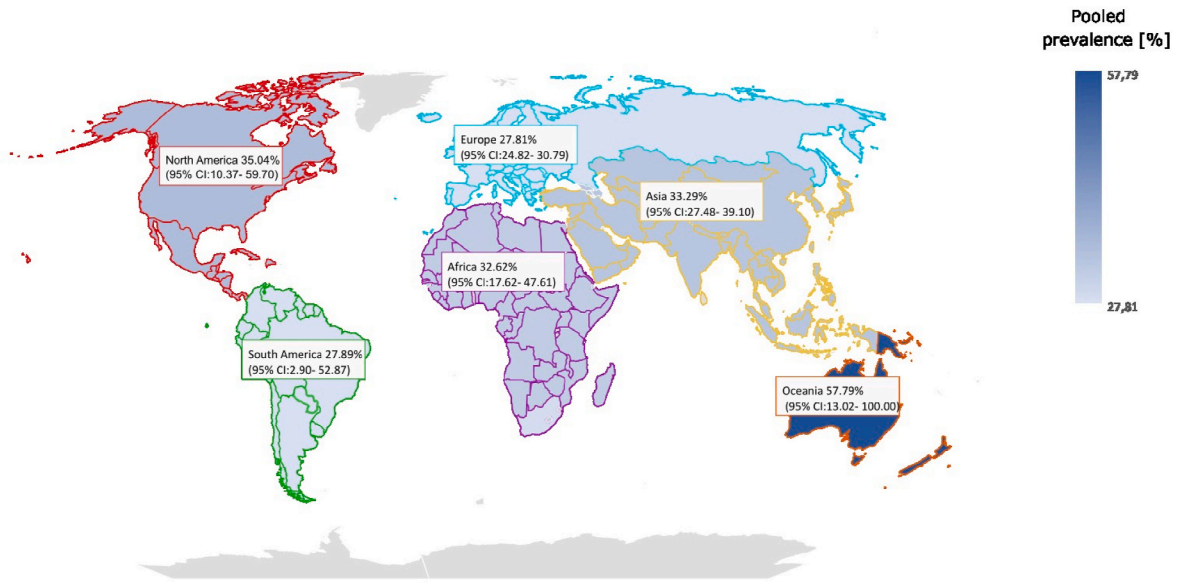



**Fig. 3.** World map showing the continental-wise prevalence of *S. aureus* based on subgroup meta-analysis.

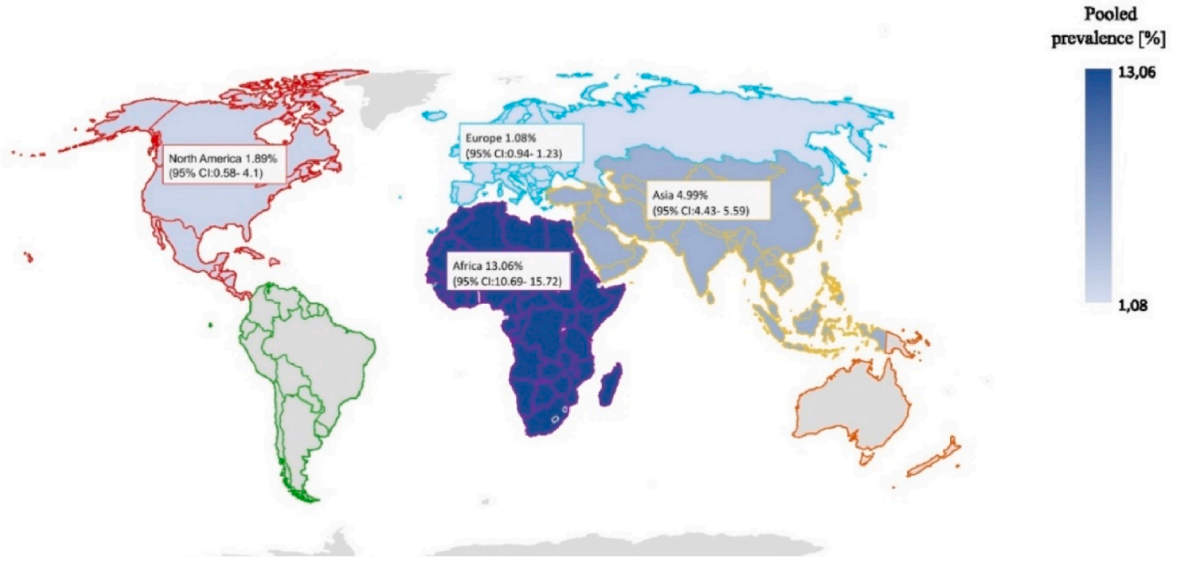



**Fig. 4.** World map showing the continental-wise prevalence of MRSA based on subgroup meta-analysis.

some countries (Fetsch et al., 2021; J. W. Song et al., 2016; Tenhagen et al., 2018). Therefore, with increase in the number of MRSA is a major public health problem and merit implicating the continuous surveillance and monitoring of antibiotic sensitivity patterns among this pathogen.

Our meta-analysis has a few limitations, which need to be addressed here. Among included articles there was no published data on prevalence on *S. aureus* and/or MRSA in many countries. In this case, national or regional registry of *S. aureus* isolates can provide better information to fill this gap in current knowledge. Nevertheless, it is worth noting that there is a significant publication bias in *S. aureus* frequency data since the studies with no contamination in food and food environment are more likely to be rejected by journals.

## 5. Conclusions

Presented meta-analysis provide a quite comprehensive overview of global occurrence of *S. aureus* and MRSA isolates from 2011 to 2021. The obtained results showed a downward trend in *S. aureus* prevalence in cow's milk samples over the years. The results of this study showed that there is a low prevalence of MRSA in raw milk, but its prevalence increased in the past 10 years, especially in developing countries. Nevertheless, the hygiene of raw milk and raw milk products should be taken into consideration in strategies for preventing and controlling the risk of contamination.

## Funding

This research was funded in whole by National Science Centre (Poland), Grant number: 2021/41/N/NZ9/00918.

## Data availability

No data was used for the research described in the article.

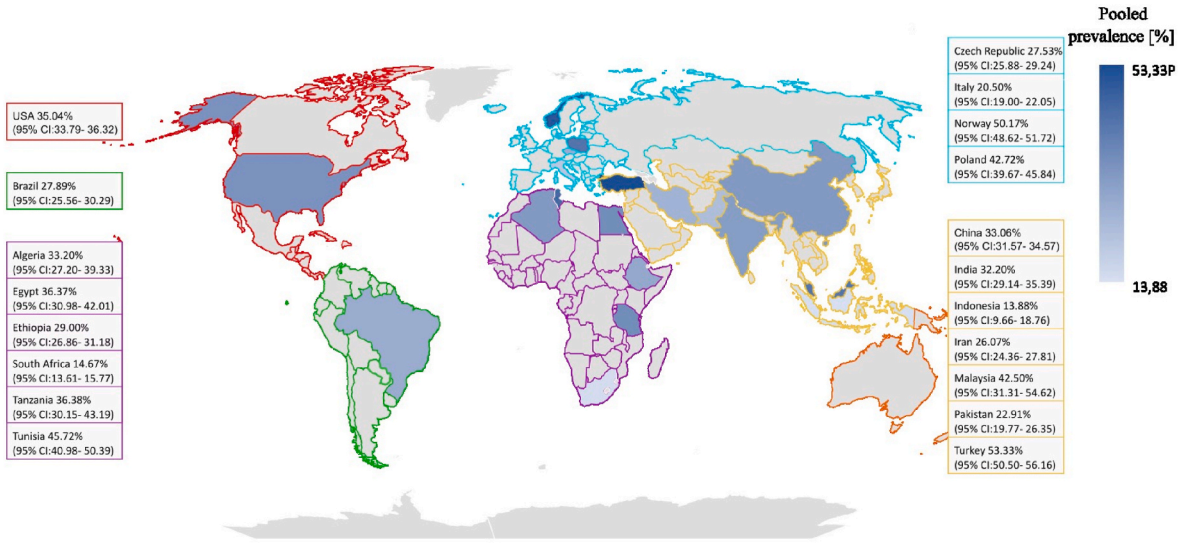



**Fig. 5.** World map showing the countries-wise prevalence of *S. aureus* based on subgroup meta-analysis.

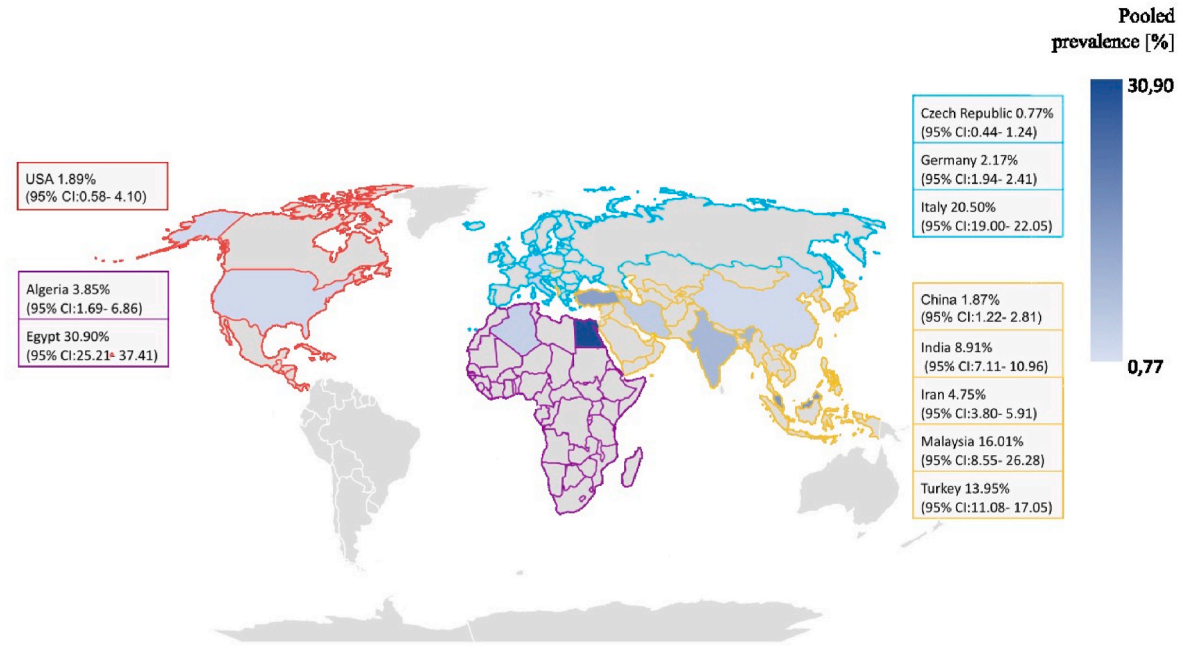



**Fig. 6.** World map showing the countries-wise prevalence of MRSA in cow's milk based on subgroup meta-analysis.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109603.

## References


Abdeen, E. E., Mousa, W. S., Abdel Salam, S. Y., Al-Maary, K. S., Mubarak, A. S., Moussa, I. M., Hemeg, H. A., Almuzaini, A. M., Alajaji, A. I., Alsubki, R. A., & Elbehiry, A. (2020). Antibiogram and phylogenetic diversity of enterotoxigenic Staphylococcus aureus strains from milk products and public health implications. *Saudi Journal of Biological Sciences, 27*(8), 1968–1974. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.06.028

Abdel-Hameid Ahmed, A., Saad Maharik, N. M., Valero, A., & Kamal, S. M. (2019). Incidence of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in milk and Egyptian artisanal dairy products. *Food Control, 104*(February), 20–27. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.04.017

Addis, M., Pal, M., & Kyule, M. N. (2011). Isolation and identification of Staphylococcus species from Ethiopian cottage cheese (Ayib) in Debre Zeit, Ethiopia. *Veterinary Research, 4*(1), 13–17. https://doi.org/10.3923/vr.2011.13.17

Agbortabot Bissong, M. E., Tahnteng, B. F., Ateba, C. N., & Kihla Akoachere, J. F. T. (2020). Pathogenic potential and antimicrobial resistance profile of Staphylococcus aureus in milk and beef from the northwest and southwest regions of Cameroon. *BioMed Research International*. https://doi.org/10.1155/2020/6015283, 2020.

Akindolire, M. A., Babalola, O. O., & Ateba, C. N. (2015). Detection of antibiotic resistant Staphylococcus aureus from milk: A public health implication. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 12*(9), 10254–10275. https://doi.org/10.3390/ijerph120910254

Aklilu, E., & Ying, C. H. (2020). First mecC and mecA positive livestock-associated methicillin resistant staphylococcus aureus (MecC MRSA/LA-MRSA) from dairy cattle in Malaysia. *Microorganisms, 8*(2). https://doi.org/10.3390/microorganisms8020147

Al-Ashmawy, M. A., Sallam, K. I., Abd-Elghany, S. M., Elhadidy, M., & Tamura, T. (2016). Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant staphylococcus aureus isolated from milk and dairy products. *Foodborne Pathogens and Disease, 13*(3), 156–162. https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2038

Alian, F., Rahimi, E., Shakerian, A., Momtaz, H., Riahi, M., & Momeni, M. (2012). Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus isolated from bovine, sheep and goat raw milk. *Global Veterinaria, 8*(2), 111–114.

Alnakip, M. E., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Caamaño-Antelo, S., Bayoumi, M. A., Kamal, R. M., Merwad, A. M., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J. (2019). Molecular characterisation and typing the methicillin resistance of Staphylococcus spp. isolated from raw milk and cheeses in northwest Spain: A mini survey. *International Dairy Journal, 89*, 68–76. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.09.006

Alves, V. F., Niño-Arias, F. C., Pitondo-Silva, A., de Araújo Frazilio, D., de Oliveira Gonçalves, L., Chaul Toubas, L., Sapateiro Torres, I. M., Oxaran, V., Dittmann, K. K., & De Martinis, E. C. P. (2018). Molecular characterisation of Staphylococcus aureus from some artisanal Brazilian dairies. *International Dairy Journal, 85*, 247–253. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.008

Amandeep, Singh, R., Kaur, S., & Gill, J. P. S. (2019). Panton-Valentine leukocidin (PVL) positive methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in raw milk in Punjab. *Indian Journal of Animal Sciences, 88*, 9–14.

Amenu, K., Grace, D., Nemo, S., & Wieland, B. (2019). Bacteriological quality and safety of ready-to-consume milk and naturally fermented milk in Borana pastoral area, southern Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production, 51*(7), 2079–2084. https://doi.org/10.1007/s11250-019-01872-8

Anderson, K. L., Kearns, R., Lyman, R., & Correa, M. T. (2019). Staphylococci in dairy goats and human milkers, and the relationship with herd management practices. *Small Ruminant Research, 171*, 13–22. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.11.021

Antonios, Z., Theofilos, P., Ioannis, M., Georgios, S., Georgios, V., Evridiki, B., Loukia, E., Kyriaki, M., Athanasios, A., & Vasiliki, L. (2015). Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of Staphylococcus aureus isolated from bulk tank milk from Greek traditional ovine farms. *Small Ruminant Research, 125* (January), 120–126. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.02.009

Aqib, A. I., Ijaz, M., Anjum, A. A., Malik, M. A. R., Mehmood, K., Farooqi, S. H., & Hussain, K. (2017). Antibiotic susceptibilities and prevalence of Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from bovine milk in Pakistan. *Acta Tropica, 176*, 168–172. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.08.008

Arefi, F., Mohsenzadeh, M., & Razmyar, J. (2014). Isolation, antimicrobial susceptibility and mecA gene analysis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Iranian white cheeses. *Iranian Journal of Veterinary Research, 15*(2), 127–131. https://doi.org/10.22099/ijvr.2014.2351

Arslan, S., & Ozdemir, F. (2011). Occurrence and antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus in homemade cheeses. *Milchwissenschaft-Milk Science International, 60*(3), 294–297.

Asiimwe, B. B., Baldan, R., Trovato, A., & Cirillo, D. M. (2017). Prevalence and molecular characteristics of Staphylococcus aureus, including methicillin resistant strains, isolated from bulk can milk and raw milk products in pastoral communities of South-West Uganda. *BMC Infectious Diseases, 17*(1), 1–8. https://doi.org/10.1186/s12879-017-2524-4

Aydin, A., Muratoglu, K., Sudagidan, M., Bostan, K., Okuklu, B., & Harsa, S. (2011). Prevalence and antibiotic resistance of foodborne staphylococcus aureus isolates in Turkey. *Foodborne Pathogens and Disease, 8*(1), 63–69. https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0613

Bao, H., Hui, Z., Yan, Z., & Lili, Z. R. W. (2016). Prevalence, enterotoxin gene and antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus from clinical healthy dairy cows. *Pakistan Veterinary Journal, 36*, 270–274.

Basanisi, M. G., Nobili, G., La Bella, G., Russo, R., Spano, G., Normanno, G., & La Salandra, G. (2016). Molecular characterization of Staphylococcus aureus isolated from sheep and goat cheeses in southern Italy. *Small Ruminant Research, 135*, 17–19. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.024

Bastam, M. M., Jalili, M., Pakzad, I., Maleki, A., & Ghafourian, S. (2021). Pathogenic bacteria in cheese, raw and pasteurised milk. *Veterinary Medicine and Science, 7*(6), 2445–2449. https://doi.org/10.1002/vms3.604

Ben Said, M., Abbassi, M. S., Bianchini, V., Sghaier, S., Cremonesi, P., Romanò, A., Gualdi, V., Hassen, A., & Luini, M. V. (2016). Genetic characterization and antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus isolated from bovine milk in Tunisia. *Letters in Applied Microbiology, 63*(6), 473–481. https://doi.org/10.1111/lam.12672

Berhilevych, O.M., Kasianchuk, V. V., Kukhtyn, M. D., Lotskin, I.M., Garkavenko, T. O., & Shubin, P. A. (2017). Characteristics of antibiotic sensitivity of Staphylococcus aureus isolated from dairy farms in Ukraine. *Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8* (4), 559–563. https://doi.org/10.15421/021786

Beyene, T., Hayishe, H., Gizaw, F., Beyi, A. F., Abunna, F., Mammo, B., Ayana, D., Waktole, H., & Abdi, R. D. (2017). Prevalence and antimicrobial resistance profile of Staphylococcus in dairy farms, abattoir and humans in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Research Notes, 10*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s13104-017-2487-y

Bingöl, E. B., Ççetin, Ö., Çolak, H., & Hampikyan, H. (2012). Presence of enterotoxin and verotoxin in Turkish cheeses sold in Istanbul. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 36*(4), 424–432. https://doi.org/10.3906/vet-1105-5

Bi, Y., Wang, Y. J., Qin, Y., Vallverdú, R. G., García, J. M., Sun, W., Li, S., & Cao, Z. C. (2016). Prevalence of bovine mastitis pathogens in bulk tank milk in China. *PLoS One, 11*(5), 1–13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155621

Bogdanovicova, K., Vyletelova-Klimesova, M., Babak, V., Kalhotka, L., Kolackova, I., & Karpiskova, R. (2016). Microbiological quality of raw milk in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Sciences, 34*(No. 3), 189–196. https://doi.org/10.17221/25/2016-cjfs

Brahma, U., Suresh, A., Murthy, S., Bhandari, V., & Sharma, P. (2022). Antibiotic resistance and molecular profiling of the clinical isolates of Staphylococcus aureus causing bovine mastitis from India. *Microorganisms, 10*(4). https://doi.org/10.3390/microorganisms10040833

Bulajic, S., Colovic, S., Misic, D., Djordjevic, J., Savic-Radovanovic, R., Asanin, J., & Ledina, T. (2017). Enterotoxin production and antimicrobial susceptibility in Staphylococci isolated from traditional raw milk cheeses in Serbia. *Journal of Environmental Science and Health - Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 52*(12), 864–870. https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1361764

Cai, H., Kou, X., Ji, H., Wang, X., Wang, H., Zhang, Y., Lu, S., Li, B., Dong, J., Wang, Q., Zhou, J., & Hu, D. (2021). Prevalence and characteristics of Staphylococcus aureus isolated from Kazak cheese in Xinjiang, China. *Food Control, 123*(221), Article 107759. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107759

Can, H. Y., & çelik, T. H. (2012). Detection of enterotoxigenic and antimicrobial resistant S. aureus in Turkish cheeses. *Food Control, 24*(1–2), 100–103. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.009

Can, H. Y., Elmali, M., & Karagöz, A. (2017). Molecular typing and antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus strains isolated from raw milk, cheese, minced meat, and chicken meat samples. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 37*(2), 175–180. https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.2.175

Cardozo, M. V., Nespolo, N., Delfino, T. C., de Almeida, C. C., Pizauro, L. J. L., Valmorbida, M. K., Pereira, N., & de Ávila, F. A. (2021). Raw milk cheese as a potential infection source of pathogenic and toxigenic food born pathogens. *Food Science and Technology, 41*(2), 355–358. https://doi.org/10.1590/fst.37919

Caruso, M., Latorre, L., Santagada, G., Fraccalvieri, R., Miccolupo, A., Sottili, R., Palazzo, L., & Parisi, A. (2016). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in sheep and goat bulk tank milk from Southern Italy. *Small Ruminant Research, 135*, 26–31. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.023

Cervinkova, D., Vlkova, H., Borodacova, I., Makovcova, J., Babak, V., Lorencova, A., Vrtkova, I., Marosevic, D., & Jaglic, Z. (2013). Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. *Veterinarni Medicina, 58*(11), 567–575. https://doi.org/10.17221/7138-VETMED

Chaalal, W., Aggad, H., Saidi, N., & Kihal, M. (2014). Prevalence and antimicrobial resistance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from raw meat and bovine milk in Algeria. *Advances in Environmental Biology, 8*(1), 1–5.

Cicconi-Hogan, K. M., Belomestnykh, N., Gamroth, M., Ruegg, P. L., Tikofsky, L., & Schukken, Y. H. (2014). Short communication: Prevalence of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci and Staphylococcus aureus isolated from bulk milk on organic and conventional dairy farms in the United States. *Journal of Dairy Science, 97*(5), 2959–2964. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7523

Cicconi-Hogan, K. M., Gamroth, M., Richert, R., Ruegg, P. L., Stiglbauer, K. E., & Schukken, Y. H. (2013). Risk factors associated with bulk tank standard plate count, bulk tank coliform count, and the presence of Staphylococcus aureus on organic and conventional dairy farms in the United States. *Journal of Dairy Science, 96*(12), 7578–7590. https://doi.org/10.3168/jds.2012-6505

Cortimiglia, C., Bianchini, V., Franco, A., Caprioli, A., Battisti, A., Colombo, L., Stradiotto, K., Vezzoli, F., & Luini, M. (2015). Short communication: Prevalence of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus in bulk tank milk from dairy goat farms in Northern Italy. *Journal of Dairy Science, 98*(4), 2307–2311. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8923

Cortimiglia, C., Luini, M., Bianchini, V., Marzagalli, L., Vezzoli, F., Avisani, D., Bertoletti, M., Ianzano, A., Franco, A., & Battisti, A. (2016). Short report prevalence of staphylococcus aureus and of methicillin-resistant s. Aureus clonal complexes in bulk tank milk from dairy cattle herds in lombardy region (Northern Italy). *Epidemiology and Infection, 144*(14), 3046–3051. https://doi.org/10.1017/S0950268816001576

Costa Sobrinho, P. D. S., Marçal De Faria, C. A., Silva Pinheiro, J., Gonçalves De Almeida, H., Vieira Pires, C., & Silva Santos, A. (2012). Bacteriological quality of raw milk used for production of a brazilian farmstead raw milk cheese. *Foodborne Pathogens and Disease, 9*(2), 138–144. https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1010

Costa, R. A., de Lira, J. V., & Aragão, M. F. (2019). Biofilm-formation by drug-resistant Staphylococcus aureus from cow milk. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit, 14*(1), 63–69. https://doi.org/10.1007/s00003-018-1186-5

Da Costa, L. B., Rajala-Schultz, P. J., & Schuenemann, G. M. (2016). Management practices associated with presence of Staphylococcus aureus in bulk tank milk from Ohio dairy herds. *Journal of Dairy Science, 99*(2), 1364–1373. https://doi.org/10.3168/jds.2015-9870

Daka, D. (2012). Antibiotic-resistance Staphylococcus aureus isolated from cow's milk in Hawassa area, South Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research, 6*(27), 1–6. https://doi.org/10.5897/ajmr11.1615

Dambrosio, A., Quaglia, N. C., Saracino, M., Malcangi, M., Montagna, C., Quinto, M., Lorusso, V., & Normanno, G. (2013). Microbiological quality of burrata cheese produced in puglia region: Southern Italy. *Journal of Food Protection, 76*(11), 1981–1984. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-067

Desissa, F., Makita, K., Teklu, A., & Grace, D. (2012). Contamination of informally marketed bovine milk with Staphylococcus aureus in urban and peri urban areas of Debre-Zeit, Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research, 6*(30), 5852–5856. https://doi.org/10.5897/ajmr12.15

Dittmann, K. K., Chaul, L. T., Lee, S. H. I., Corassin, C. H., de Oliveira, C. A. F., De Martinis, E. C. P., Alves, V. F., Gram, L., & Oxaran, V. (2017). Staphylococcus aureus in some Brazilian dairy industries: Changes of contamination and diversity. *Frontiers in Microbiology, 8*(OCT), 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02049

Effendi, M. H., Hisyam, M. A. M., Hastutiek, P., & Tyasningsih, W. (2019). Detection of coagulase gene in Staphylococcus aureus from several dairy farms in East Java, Indonesia, by polymerase chain reaction. *Veterinary World, 12*(1), 68–71. https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.68-71

Fadaei, A. (2014). Bacteriological quality of raw cow milk in Shahrekord, Iran. *Veterinary World, 7*(4), 240–243. https://doi.org/10.14202/vetworld.2014.240-243

Fetsch, A., Etter, D., & Johler, S. (2021). Livestock-associated meticillin-resistant Staphylococcus aureus—current situation and impact from a one health perspective. *Current Clinical Microbiology Reports, 8*(3), 103–113. https://doi.org/10.1007/s40588-021-00170-y

Filipello, V., Bonometti, E., Campagnani, M., Bertoletti, I., Romano, A., Zuccon, F., Campanella, C., Losio, M. N., & Finazzi, G. (2020). Investigation and follow-up of a staphylococcal food poisoning outbreak linked to the consumption of traditional hand-crafted alm cheese. *Pathogens, 9*(12), 1–6. https://doi.org/10.3390/pathogens9121064

Fitzgerald, J. R., Monday, S. R., Foster, T. J., Bohach, G. A., Hartigan, P. J., Meaney, W. J., & Smyth, C. J. (2001). Characterization of a putative pathogenicity island from bovine Staphylococcus aureus encoding multiple superantigens. *Journal of Bacteriology, 183*(1), 63–70. https://doi.org/10.1128/JB.183.1.63-70.2001

Fotou, K., Tzora, A., Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Avgeris, I., Bezirtzoglou, E., Akrida-Demertzi, K., & Demertzis, P. G. (2011). Isolation of microbial pathogens of subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epirus (Greece) and their role in its hygiene. *Anaerobe, 17*(6), 315–319. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.05.002

Friker, B., Morach, M., Püntener, S., Cernela, N., Horlbog, J., & Stephan, R. (2020). Assessing the microbiological quality of raw goats' and ewes' tank milk samples in Switzerland. *International Dairy Journal, 102*, Article 104609. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104609

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. *Frontiers in Veterinary Science, 7*(March), 1–10. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00135

Gajewska, J., & Chajęcka-Wierzchowska, W. (2020). Biofilm formation ability and presence of adhesion genes among coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolates from raw cow's milk. *Pathogens, 9*(8), 1–12. https://doi.org/10.3390/pathogens9080654

Gargouri, A., Hamed, H., Ben Ali, B., Elfeki, A., & Gdoura, R. (2014). Evaluation of Tunisian milk quality in dairy herds: Inter-relationship between chemical, physical and hygienic criteria. *Animal Science Journal, 85*(6), 714–721. https://doi.org/10.1111/asj.12180

de Garnica, M. L., Linage, B., Carriedo, J. A., Santos, J. A., & Gonzalo, C. (2013). Staphylococcus aureus and Escherichia coli prevalence in ovine bulk tank milk. *Small Ruminant Research, 115*(1–3), 108–112. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.09.001

Gebremedhin, E. Z., Ararso, A. B., Borana, B. M., Kelbesa, K. A., Tadese, N. D., Megersa Marami, L., & Sarba, E. J. (2022). *Isolation and identification of Staphylococcus aureus from milk and milk products, associated factors for contamination, and their antibiogram in Holeta, Central Ethiopia*. https://doi.org/10.1155/2022/6544705

Gharsa, H., Chairat, S., Chaouachi, M., Ben Yahia, H., Boudabous, A., & Ben Slama, K. (2019). High diversity of genetic lineages and virulence genes of Staphylococcus aureus isolated from dairy products in Tunisia. *Annals of Microbiology, 69*(1), 73–78. https://doi.org/10.1007/s13213-018-1417-0

Giacinti, G., Carfora, V., Caprioli, A., Sagrafoli, D., Marri, N., Giangolini, G., Amoruso, R., Iurescia, M., Stravino, F., Dottarelli, S., Feltrin, F., Franco, A., Amatiste, S., & Battisti, A. (2017). Prevalence and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying mecA or mecC and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus in dairy sheep farms in central Italy. *Journal of Dairy Science, 100*(10), 7857–7863. https://doi.org/10.3168/jds.2017-12940

Gücükoğlu, A., Onur Kevenk, T., Uyanik, T., Çadirci, Ö., Terzi, G., & Alişarli, M. (2012). Detection of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in raw milk and dairy products by multiplex PCR. *Journal of Food Science, 77*(11), 10–13. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02954.x

Gundogan, N., & Avci, E. (2014). Occurrence and antibiotic resistance of Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Bacillus cereus in raw milk and dairy products in Turkey. *International Journal of Dairy Technology, 67*(4), 562–569. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12149

Gürbüz, S., Keskin, O., Gürbilek, S. E., Tel, O. Y., Yigin, A., Demirci, M., Demir, C., & Hassan, H. (2018). Presence of staphylococcus aureus, staphylococcal enterotoxins and antimicrobial resistance in traditionally produced raw milk cheeses. *Journal of Food Safety and Food Quality, 69*(6), 171–176. https://doi.org/10.2376/0003-925X-69-171

Haque, Z. F., Sabuj, A. A. M., Mahmud, M. M., Pondit, A., Islam, M. A., & Saha, S. (2018). Characterization of Staphylococcus aureus from milk and dairy products sold in some local markets of mymensingh district of Bangladesh. *Journal of Nutrition & Food Sciences, 8*(6). https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000743

Haran, K. P., Godden, S. M., Boxrud, D., Jawahir, S., Bender, J. B., & Sreevatsan, S. (2012). Prevalence and characterization of Staphylococcus aureus, including methicillin-resistant Staphylococcus aureus, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. *Journal of Clinical Microbiology, 50*(3), 688–695. https://doi.org/10.1128/JCM.05214-11

Hasan, K. W., Tarannum, N., & Parveen, S. (2021). Antimicrobial drug resistance of escherichia coli and staphylococcus aureus isolated from milk and milk based beverages of Dhaka city, Bangladesh. *Journal of Pure and Applied Microbiology, 15*(3), 1472–1479. https://doi.org/10.22207/JPAM.15.3.41

Hegab, O. W., Abdel-Latif, E. F., & Moawad, A. A. (2020). Isolation of enterotoxigenic staphylococcus aureus harboring seb gene and enteropathogenic Escherichia coli (Serogroups O18, O114, and O125) from soft and hard artisanal cheeses in Egypt. *Open Veterinary Journal, 10*(3), 297–307. https://doi.org/10.4314/ovj.v10i3.8

He, W., Liu, Y., Qi, J., Chen, H., Zhao, C., Zhang, F., Li, H., & Wang, H. (2013). Food-animal related staphylococcus aureus multidrug-resistant ST9 strains with toxin genes. *Foodborne Pathogens and Disease, 10*(9), 782–788. https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1452

Hill, B., Smythe, B., Lindsay, D., & Shepherd, J. (2012). Microbiology of raw milk in New Zealand. *International Journal of Food Microbiology, 157*(2), 305–308. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.031

Holko, I., Tančin, V., Tvarožková, K., Supuka, P., Supuková, A., & Mačuhová, L. (2019). Occurrence and antimicrobial resistance of common udder pathogens isolated from sheep milk in Slovakia. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences, 13*(1), 258–261. https://doi.org/10.5219/1067

Holko, I., Tančin, V., Vršková, M., & Tvarožková, K. (2019). Prevalence and antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy cows in Slovakia. *Journal of Dairy Research, 86*(4), 436–439. https://doi.org/10.1017/S0022029919000694

Hu, S. kui, Liu, S. yun, Hu, W. fu, Zheng, T. li, & Xu, J. guo (2013). Molecular biological characteristics of Staphylococcus aureus isolated from food. *European Food Research and Technology, 236*(2), 285–291. https://doi.org/10.1007/s00217-012-1887-4

Hussain, A. O., Alrikaby, N. A., Al-Asadi, N. A. B., & Hussien, K. A. (2018). Occurrence and antibiotic resistance of salmonella spp. Escherichia coli and staphylococcus aureus isolated from soft white cheese from Thi-Qar, Iraq. *International Journal of Pharmaceutical Research, 10*(4), 498–504. https://doi.org/10.31838/ijpr/2018.10.04.081

Issa, G., & Aksu, H. (2020). Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in milk by PCR-based phenotyping and genotyping. *Acta Veterinaria Eurasia, 46*(3), 120–124. https://doi.org/10.5152/ACTAVET.2020.20011

Jakobsen, R. A., Heggebø, R., Sunde, E. B., & Skjervheim, M. (2011). Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes in Norwegian raw milk cheese production. *Food Microbiology, 28*(3), 492–496. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.017

Jamali, H., Paydar, M., Radmehr, B., Ismail, S., & Dadrasnia, A. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus isolated from raw milk and dairy products. *Food Control, 54*, 383–388. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.013

James, C., Dixon, R., Talbot, L., James, S. J., Williams, N., & Onarinde, B. A. (2021). Assessing the impact of heat treatment of food on antimicrobial resistance genes and their potential uptake by other bacteria—a critical review. *Antibiotics, 10*(12). https://doi.org/10.3390/antibiotics10121440

Johler, S., Macori, G., Bellio, A., Acutis, P. L., Gallina, S., & Decastelli, L. (2018). Short communication: Characterization of Staphylococcus aureus isolated along the raw milk cheese production process in artisan dairies in Italy. *Journal of Dairy Science, 101*(4), 2915–2920. https://doi.org/10.3168/jds.2017-13815

Kadlec, K., Entorf, M., & Peters, T. (2019). Occurrence and characteristics of livestock-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus in quarter milk samples from dairy cows in Germany. *Frontiers in Microbiology, 10*(JUN), 1–6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01295

Kamal, R. M., Bayoumi, M. A., & Abd El Aal, S. F. A. (2013). MRSA detection in raw milk, some dairy products and hands of dairy workers in Egypt, a mini-survey. *Food Control, 33*(1), 49–53. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.017

Kamana, O., Ceuppens, S., Jacxsens, L., Kimonyo, A., & Uyttendaele, M. (2014). Microbiological quality and safety assessment of the rwandan milk and dairy chain. *Journal of Food Protection, 77*(2), 299–307. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-230

Kasem, N. G., Al-Ashmawy, M., Elsherbini, M., & Abdelkhalek, A. (2021). Antimicrobial resistance and molecular genotyping of Escherichia coli and Staphylococcus aureus isolated from some Egyptian cheeses. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research, 8*(2), 246–255. https://doi.org/10.5455/javar.2021.h509

Kav, K., Col, R., & Ardic, M. (2011). Characterization of Staphylococcus aureus isolates from white-brined Urfa cheese. *Journal of Food Protection, 74*(11), 1788–1796. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-179

Keyvan, E., Yurdakul, O., Demirtas, A., Yalcin, H., & Bilgen, N. (2020). Identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in bulk tank milk. *Food Science and Technology, 40*(1), 150–156. https://doi.org/10.1590/fst.35818

Khemiri, M., Abbassi, M. S., 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. *Letters in Applied Microbiology, 68*(6), 573–579. https://doi.org/10.1111/lam.13152

Knight-Jones, T. J. D., Hang'ombe, M. B., Songe, M. M., Sinkala, Y., & Grace, D. (2016). Microbial contamination and hygiene of fresh cow's milk produced by smallholders in Western Zambia. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 13*(7), 1–13. https://doi.org/10.3390/ijerph13070737

Korpysa-Dzirba, W., & Osek, J. (2011). Identification of genes encoding classical staphylococcal enterotoxins in Staphylococcus aureus isolated from raw milk. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 55*(1), 55–58.

Korpysa-Dzirba, W., & Osek, J. (2019). Molecular characterization of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolated from raw cow milk in Poland. *Foodborne Pathogens and Disease, 16*(2), 114–118. https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2482

Kouamé-Sina, S. M., Makita, K., Costard, S., Grace, D., Dadié, A., Dje, M., & Bonfoh, B. (2012). Hazard identification and exposure assessment for bacterial risk assessment of informally marketed milk in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Food and Nutrition Bulletin, 33*(4), 223–234. https://doi.org/10.1177/156482651203300402

Kreausukon, K., Fetsch, A., Kraushaar, B., Alt, K., Müller, K., Krömker, V., Zessin, K. H., Käsbohrer, A., & Tenhagen, B. A. (2012). Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from bulk tank milk of dairy herds. *Journal of Dairy Science, 95*(8), 4382–4388. https://doi.org/10.3168/jds.2011-5198

Lan, X. Y., Zhao, S. G., Zheng, N., Li, S. L., Zhang, Y. D., Liu, H. M., McKillip, J., & Wang, J. Q. (2017). Short communication: Microbiological quality of raw cow milk and its association with herd management practices in Northern China. *Journal of Dairy Science, 100*(6), 4294–4299. https://doi.org/10.3168/jds.2016-11631

Lauková, A., Simonová, M. P., Focková, V., Kološta, M., Tomáška, M., Dvorožňáková, E., & Dvorožňáková, D. (2020). Susceptibility to bacteriocins in biofilm-forming, variable staphylococci isolated from local Slovak ewes' milk lump cheeses. *Foods, 9*, 1335. https://doi.org/10.3390/foods9091335

Lee, S. H. I., Camargo, C. H., Gonçalves, J. L., Cruz, A. G., Sartori, B. T., Machado, M. B., & 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. *Journal of Dairy Science, 95*(12), 7377–7383. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5733

Lemma, F., Alemayehu, H., Stringer, A., & Eguale, T. (2021). Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of Staphylococcus aureus in milk and traditionally processed dairy products in Addis Ababa, Ethiopia. *BioMed Research International*. https://doi.org/10.1155/2021/5576873, 2021.

Lianou, D. T., Petinaki, E., Cripps, P. J., Gougoulis, D. A., Michael, C. K., Tsilipounidaki, K., Skoulakis, A., Katsafadou, A. I., Vasileiou, N. G. C., Giannoulis, T., Katsarou, E. I., Voidarou, C., Mavrogianni, V. S., Caroprese, M., & Fthenakis, G. C. (2021). Antibiotics prevalence, patterns, association with biofilm formation. *Effects on Milk Quality and Risk Factors for Antibiotic Resistance of Staphylococci from Bulk-Tank Milk of Goat Herds*. https://doi.org/10.3390/antibiotics10101225

Lianou, D. T., Petinaki, E., Cripps, P. J., Gougoulis, D. A., Michael, C. K., Tsilipounidaki, K., Skoulakis, A., Katsafadou, A. I., Vasileiou, N. G. C., Giannoulis, T., Voidarou, C., Mavrogianni, V. S., Caroprese, M., & Fthenakis, G. C. (2021). Antibiotic resistance of staphylococci from bulk-tank milk of sheep flocks: Prevalence, patterns, association with biofilm formation, effects on milk quality, and risk factors. *Biology, 10*(10). https://doi.org/10.3390/biology10101016

Lika, E., Rosić, M., Cocoli, S., Puvača, N., Vuković, G., Kika, T. S., & Bursić, V. (2021). Antimicrobial resistance of staphylococcus aureus strains isolated from cow raw milk samples from Albania and Serbia. *Mljekarstvo, 71*(4), 248–256. https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2021.0404

Lim, S. K., Nam, H. M., Jang, G. C., Lee, H. S., Jung, S. C., & Kim, T. S. (2013). Transmission and persistence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in milk, environment, and workers in dairy cattle farms. *Foodborne Pathogens and Disease, 10*(8), 731–736. https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1436

Linage, B., Rodríguez-Calleja, J. M., Otero, A., García-López, M. L., & Santos, J. A. (2012). Characterization of coagulase-positive staphylococci isolated from tank and silo Ewe milk. *Journal of Dairy Science, 95*(4), 1639–1644. https://doi.org/10.3168/jds.2011-4734

Liu, H., Li, S., Meng, L., Dong, L., Zhao, S., Lan, X., Wang, J., & Zheng, N. (2017). Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of Staphylococcus aureus isolated from dairy herds in northern China. *Journal of Dairy Science, 100*(11), 8796–8803. https://doi.org/10.3168/jds.2017-13370

Li, L., Zhou, L., Wang, L., Xue, H., & Zhao, X. (2015). Characterization of methicillin-resistant and-susceptible staphylococcal isolates from bovine milk in northwestern China. *PLoS One, 10*(3), 1–8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116699

Lourenco, A., Fraga, M., De Colli, L., Moloney, M., Danaher, M., & Jordan, K. (2020). Determination of the presence of pathogens and anthelmintic drugs in raw milk and raw milk cheeses from small scale producers in Ireland. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 130*, Article 109347. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109347

Maisano, A. M., Luini, M., Lorenzi, V., Bolzoni, L., Romanò, A., Spelta, C., Angelucci, A., Fusi, F., Ferrara, G., Vezzoli, F., & Bertocchi, L. (2019). Diagnostic value of composite milk sample vs single quarter milk sample for the detection of Staphylococcus aureus intra-mammary infections in cattle. *Preventive Veterinary Medicine, 167*(September 2018), 80–84. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.03.026

Manovska, M. R., Prodanov, M., Angelovski, L., Jankuloski, D., & Sekulovski, P. (2021). Prevalence of the enterotoxigenic Staphylococcus aureus strains isolated from raw milk and cheese produced in NorthNorth Macedonia. *Macedonian Veterinary Review, 44*(1), 71–77. https://doi.org/10.2478/macvetrev-2021-0014

Mansour, A. S., Wagih, G. E. S., Morgan, S. D., Elhariri, M., El-Shabrawy, M. A., Abuelnaga, A. S. M., & Elgabry, E. A. (2017). Detection of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains in bovine raw milk by reversed passive latex agglutination and multiplex polymerase chain reaction. *Veterinary World, 10*(8), 843–847. https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.843-847

Mashouf, R. Y., Hosseini, S. M., Mousavi, S. M., & Arabestani, M. R. (2015). Prevalence of enterotoxin genes and antibacterial susceptibility pattern of Staphylococcus aureus strains isolated from animal originated foods in West of Iran. *Oman Medical Journal, 30*(4), 283–290. https://doi.org/10.5001/omj.2015.56

Mausam, Ray, P. K., Dey, A., Mohanty, S., Kaushik, P., Anjay, Sinha, M., & Gupta, S. K. (2016). Isolation, identification and antibiotic sensitivity profiling of methicillin resistant staphylococcus aureus from bovine milk in Bihar. *Journal of Pure and Applied Microbiology, 10*(4), 3183–3188. https://doi.org/10.22207/JPAM.10.4.95

McAuley, C. M., McMillan, K., Moore, S. C., Fegan, N., & Fox, E. M. (2014). Prevalence and characterization of foodborne pathogens from Australian dairy farm environments. *Journal of Dairy Science, 97*(12), 7402–7412. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8735

Mehli, L., Hoel, S., Thomassen, G. M. B., Jakobsen, A. N., & Karlsen, H. (2017). The prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance of Staphylococcus aureus in milk, whey, and cheese from artisan farm dairies. *International Dairy Journal, 65*, 20–27. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.10.006

Mehramuz, B., Taghizadeh, S., Kafil, H. S., Zonouzaq, G. Y., Khiabani, M. S., Sheikhsaran, E., Mokarram, R. R., & Dehghani, L. (2020). High rate of contamination with staphylococcus aureus in traditional koozeh cheeses. A molecular typing approach. *Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunita, 32*(2), 178–185. https://doi.org/10.7416/ai.2020.2341

Mirzaei, H. (2011). Presence and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in raw and pasteurized milk and ice cream in Tabriz by culture and PCR techniques. *African Journal of Microbiology Research, 6*(32), 6224–6229. https://doi.org/10.5897/ajmr12.1701

Mohammad Reza, A., Kazemian, H., Tabar, Z. K., & Hosseini, S. M. (2016). Prevalence of virulence genes, agr and antimicrobial resistance of staphylococcus aureus isolated from food and dairy products in Hamadan, Iran. *Der Pharmacia Lettre, 8*(8), 62–67.

Mohammed, J., Ziwa, M. H., Hounmanou, Y. M. G., Kisanga, A., & Tuntufye, H. N. (2018). Molecular typing and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from bovine milk in Tanzania. *International Journal of Microbiology*. https://doi.org/10.1155/2018/4287431, 2018.

Mørk, T., Jørgensen, H. J., Sunde, M., Kvitle, B., Sviland, S., Waage, S., & Tollersrud, T. (2012). Persistence of staphylococcal species and genotypes in the bovine udder. *Veterinary Microbiology, 159*(1–2), 171–180. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.034

Moura, G. S., Gebreyes, W. A., Marques, M. F. S., Stipp, D. T., Souza, F. N., Da Costa, L. B., & Oliveira, C. J. B. (2018). Short communication: Occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci in dairy goat herds in Ohio, United States. *Journal of Dairy Science, 101*(9), 7804–7807. https://doi.org/10.3168/jds.2017-13361

Mphahlele, M. P., Oguttu, J. W., Petzer, I. M., & Qekwana, D. N. (2020). Prevalence and antimicrobial drug resistance of Staphylococcus aureus isolated from cow milk samples. *Veterinary World, 13*(12), 2736–2742. https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2736-2742

Mullen, K. A. E., Sparks, L. G., Lyman, R. L., Washburn, S. P., & Anderson, K. L. (2013). Comparisons of milk quality on North Carolina organic and conventional dairies. *Journal of Dairy Science, 96*(10), 6753–6762. https://doi.org/10.3168/jds.2012-6519

Ngasala, J. uma B., Nonga, H. E., & Mtambo, M. M. A. (2015). Assessment of raw milk quality and stakeholders' awareness on milk-borne health risks in Arusha City and Meru District, Tanzania. *Tropical Animal Health and Production, 47*(5), 927–932. https://doi.org/10.1007/s11250-015-0810-y

Nunes, M. M., & Caldas, E. D. (2017). Preliminary quantitative microbial risk assessment for Staphylococcus enterotoxins in fresh minas cheese, a popular food in Brazil. *Food Control, 73*, 524–531. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.046

Nusrat, J., Ifra, T. N., & Mrityunjoy, A. (2015). Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus within raw milk and cheese samples. *International Food Research Journal, 22*(6), 2629–2633.

Oliveira, A. P. D. de, Costa, M. M. da, Nogueira, D. M., & Dias, F. S. (2020). Characterisation of Staphylococcus aureus strains from milk and goat cheese and evaluation of their inhibition by gallic acid, nisin and velame of the Brazilian caatinga. *International Journal of Dairy Technology, 73*(2), 345–356. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12673

Oliveira, C. J. B., Tiao, N., de Sousa, F. G. C., de Moura, J. F. P., Santos Filho, L., & Gebreyes, W. A. (2016). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus from Brazilian dairy farms and identification of novel sequence types. *Zoonoses and Public Health, 63*(2), 97–105. https://doi.org/10.1111/zph.12209

Omoshaba, E. O., Ojo, O. E., Sofela, O., & Onifade, O. I. (2018). Prevalence and antibiotic resistance patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw milk and soft cheese (wara) sold in Abeokuta, Nigeria. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences, 16*(1), 1. https://doi.org/10.4314/sokjvs.v16i1.1

Ou, Q., Zhou, J., Lin, D., Bai, C., Zhang, T., Lin, J., Zheng, H., Wang, X., Ye, J., Ye, X., & Yao, Z. (2018). A large meta-analysis of the global prevalence rates of S. aureus and MRSA contamination of milk. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 58*(13), 2213–2228. https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1308916

Papadopoulos, P., Papadopoulos, T., Angelidis, A. S., Boukouvala, E., Zdragas, A., Papa, A., Hadjichristodoulou, C., & Sergelidis, D. (2018). Prevalence of Staphylococcus aureus and of methicillin-resistant S. aureus (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece. *Food Microbiology, 69*, 43–50. https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.016

Papadopoulos, P., Papadopoulos, T., Angelidis, A. S., Kotzamanidis, C., Zdragas, A., Papa, A., Filioussis, G., & Sergelidis, D. (2019). Prevalence, antimicrobial susceptibility and characterization of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from dairy industries in north-central and north-eastern Greece. *International Journal of Food Microbiology, 291*, 35–41. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.007. October 2018.

Parisi, A., Caruso, M., Normanno, G., Latorre, L., Sottili, R., Miccolupo, A., Fraccalvieri, R., & Santagada, G. (2016). Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in bulk tank milk from southern Italy. *Food Microbiology, 58*, 36–42. https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.03.004

Paterson, G. K., Morgan, F. J. E., Harrison, E. M., Peacock, S. J., Parkhill, J., Zadoks, R. N., & Holmes, M. A. (2014). Prevalence and properties of mecc methicillin-resistant Staphylococcus aureus (mrsa) in bovine bulk tank milk in great britain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 69*(3), 598–602. https://doi.org/10.1093/jac/dkt417

Pekana, A., Nwodo, U. U., Okoh, A. I., & Green, E. (2017). Distribution and antibiotic susceptibility profiles of Staphylococcus spp isolated from unpasteurized cow milk locally consumed in Nkonkobe local municipality, South Africa. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine, 15*(2), 75–84.

Pereira, C. T. M., Oliveira, D. S. V., Veloso, V. S., Silva, S. D. S. P., Santos, L. S., Neto, A. F. L., Oliveira, F. A. D. A., De Melo, M. C. N., & Soares, M. J. D. S. (2018). Microbiology quality, detection of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of

Staphylococcus aureus isolated from milk and Coalho cheese. *Semina: Ciências Agrárias, 39*(5), 1957–1968. https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n5p1957
Persson, Y., & Olofsson, I. (2011). Direct and indirect measurement of somatic cell count as indicator of intramammary infection in dairy goats. *Acta Veterinaria Scandinavica, 53*(1), 1–5. https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-15
Pexara, A., Solomakos, N., Sergelidis, D., Angelidis, A. S., & Govaris, A. (2016). Occurrence and antibiotic resistance of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in raw ovine and caprine milk in Greece. *Dairy Science & Technology, 96*(3), 345–357. https://doi.org/10.1007/s13594-015-0272-z
Qian, W., Shen, L., Li, X., Wang, T., Liu, M., Wang, W., Fu, Y., & Zeng, Q. (2019). Epidemiological characteristics of Staphylococcus Aureus in raw goat milk in Shaanxi Province, China. *Antibiotics, 8*(3). https://doi.org/10.3390/antibiotics8030141
Rahi, A., Kazemeini, H., Jafariaskari, S., Seif, A., Hosseini, S., & Dehkordi, F. S. (2020). Genotypic and phenotypic-based assessment of antibiotic resistance and profile of staphylococcal cassette chromosome mec in the methicillin-resistant staphylococcus aureus recovered from raw milk. *Infection and Drug Resistance, 13*, 273–283. https://doi.org/10.2147/IDR.S229499
Rahimi, E. (2013). Enterotoxigenicity of staphylococcus aureus isolated from traditional and commercial dairy products marketed in Iran. *Brazilian Journal of Microbiology, 44*(2), 393–399. https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200008
Rahimi, E., & Alian, F. (2013). Presence of enterotoxigenic staphylococcus aureus in cow, camel, sheep, goat, and buffalo bulk tank milk. *Veterinarski Arhiv, 83*(1), 23–30.
Rall, V. L. M., Miranda, E. S., Castilho, I. G., Camargo, C. H., Langoni, H., Guimarães, F. F., Araújo Júnior, J. P., & Fernandes Júnior, A. (2014). Diversity of Staphylococcus species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science, 97*(2), 829–837. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7226
Regasa, S., Mengistu, S., & Abraha, A. (2019). *Milk safety assessment, isolation, and antimicrobial Susceptibility profile of Staphylococcus aureus in selected dairy farms of Mukaturi and Sululta Town, Oromia region, Ethiopia*. Veterinary Medicine International. https://doi.org/10.1155/2019/3063185, 2019.
Resende, J. A., Fontes, C. O., Ferreira-Machado, A. B., Nascimento, T. C., Silva, V. L., & Diniz, C. G. (2018). Antimicrobial-resistance genetic markers in potentially pathogenic gram positive cocci isolated from Brazilian soft cheese. *Journal of Food Science, 83*(2), 377–385. https://doi.org/10.1111/1750-3841.14019
Reta, M. A., Bereda, T. W., & Alemu, A. N. (2016). Bacterial contaminations of raw cow's milk consumed at Jigjiga city of Somali regional state, Eastern Ethiopia. *International Journal of Flow Control, 3*(1). https://doi.org/10.1186/s40550-016-0027-5
Riva, A., Borghi, E., Cirasola, D., Colmegna, S., Borgo, F., Amato, E., Pontello, M. M., & Morace, G. (2015). Methicillin-resistant staphylococcus aureus in raw milk: Prevalence, SCCmec typing, enterotoxin characterization, and antimicrobial resistance patterns. *Journal of Food Protection, 78*(6), 1142–1146. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-531
Rola, J. G., Czubkowska, A., Korpysa-Dzirba, W., & Osek, J. (2016). Occurrence of Staphylococcus aureus on farms with small scale production of raw milk cheeses in Poland. *Toxins, 8*(3). https://doi.org/10.3390/toxins8030062
Rola, J. G., Korpysa-Dzirba, W., Czubkowska, A., & Osek, J. (2015). Prevalence of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci recovered from raw cow milk. *Journal of Dairy Science, 98*(7), 4273–4278. https://doi.org/10.3168/jds.2014-9064
Saadat, Y. R., Fooladi, A. A. I., Shapouri, R., Hosseini, M. M., & Khiabani, Z. D. (2014). Prevalence of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in organic milk and cheese in Tabriz, Iran. *Iranian Journal of Microbiology, 6*(5), 345–349.
Saka, E., & Terzi Gulel, G. (2018). Detection of enterotoxin genes and methicillin-resistance in Staphylococcus aureus isolated from water buffalo milk and dairy products. *Journal of Food Science, 83*(6), 1716–1722. https://doi.org/10.1111/1750-3841.14172
Sasidharan, S., Prema, B., & Yoga Latha, L. (2011). Antimicrobial drug resistance of Staphylococcus aureus in dairy products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 1*(2), 130–132. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60010-5
Schnitt, A., & Tenhagen, B.-A. (n.d.). Risk Factors for the Occurrence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Dairy Herds: An Update. https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2638.
Serrano, N. S., Zweifel, C., Corti, S., & Stephan, R. (2018). Microbiological quality and presence of foodborne pathogens in raw milk cheeses and raw meat products marketed at farm level in Switzerland. *Italian Journal of Food Safety, 7*(2), 110–115. https://doi.org/10.4081/ijfs.2018.7337
Sharma, S., Khan, A., Dahiya, D. K., Jain, J., & Sharma, V. (2015). Prevalence, identification and drug resistance pattern of Staphylococcus aureus and Escherichia coli isolated from raw milk samples of Jaipur city of Rajasthan. *Journal of Pure and Applied Microbiology, 9*(1), 341–348.
Sharma, V., Sharma, S., Dahiya, D. K., Khan, A., Mathur, M., & Sharma, A. (2017). Coagulase gene polymorphism, enterotoxigenecity, biofilm production, and antibiotic resistance in Staphylococcus aureus isolated from bovine raw milk in North West India. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 16*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/s12941-017-0242-9
Shi, C., Yu, Z., Ho, H., Wang, J., Wu, W., Xing, M., Wang, Y., Rahman, S. M. E., & Han, R. (2021). Occurrence, antimicrobial resistance patterns, and genetic characterization of Staphylococcus aureus isolated from raw milk in the dairy farms over two seasons in China. *Microbial Drug Resistance, 27*(1), 99–110. https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0358
Silva Júnior, A. E., Vasconcelos, P. C., Saraiva, M. M. S., Filho, L. S., Silva, N. M. V., Givisiez, P. E. N., & Oliveira, C. J. B. (2021). Antimicrobial susceptibility profiles of Staphylococcus spp. contaminating raw goat milk. *Veterinary World, 14*(5), 1074–1079. https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1074-1079
da Silva, A. C., Rodrigues, M. X., & Silva, N. C. C. (2020). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in food and the prevalence in Brazil: A review. *Brazilian Journal of Microbiology, 51*(1), 347–356. https://doi.org/10.1007/s42770-019-00168-1
Simeão Do Carmo, L., Dias, R. S., Linardi, V. R., José De Sena, M., Aparecida Dos Santos, D., Eduardo De Faria, M., Pena, E. C., Jett, M., & Heneine, L. G. (2002). Food poisoning due to enterotoxigenic strains of Staphylococcus present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology, 19*(1), 9–14. https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0444
Song, M., Bai, Y., Xu, J., Carter, M. Q., Shi, C., & Shi, X. (2015). Genetic diversity and virulence potential of staphylococcus aureus isolates from raw and processed food commodities in Shanghai. *International Journal of Food Microbiology, 195*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.020. November 2018.
Song, J. W., Yang, S. J., Shin, S., Seo, K. S., Ho Park, Y., Kun, A., & Park, T. (2016). Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitic milk in Korea. *Journal of Food Protection, 79*(10), 1725–1732. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-067
Spanu, V., Scarano, C., Virdis, S., Melito, S., Spanu, C., & De Santis, E. P. L. (2013). Population structure of staphylococcus aureus isolated from bulk tank goat's milk. *Foodborne Pathogens and Disease, 10*(4), 310–315. https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1356
Srednik, M. E., Usongo, V., Lépine, S., Janvier, X., Archambault, M., & Gentilini, E. R. (2018). Characterisation of Staphylococcus aureus strains isolated from mastitis bovine milk in Argentina. *Journal of Dairy Research, 85*(1), 57–63. https://doi.org/10.1017/S0022029917000851
Štástková, Z., Karpíková, R., Gelbíčová, T., Vaňáč, V., Tůma, Š., & Světlíková, B. (2012). Detection of enterotoxigenic genes in Staphylococcus aureus isolated from bulk tank cow's milk samples in the Czech Republic. *Acta Alimentaria, 41*(3), 327–333. https://doi.org/10.1556/AAlim.41.2012.3.4
Sudhanthiramani, S., Swetha, C. S., & Bharathy, S. (2015). Prevalence of antibiotic resistant Staphylococcus aureus from raw milk samples collected from the local vendors in the region of Tirupathi, India. *Veterinary World, 8*(4), 478–481. https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.478-481
Taban, B. M., Akineden, O., Karimihachehsoo, S., Gross, M., & Usleber, E. (2017). Enterotoxigenic Staphylococcus aureus in brined cheese from weekly street markets in Ankara, Turkey. *Journal of Food Safety and Food Quality, 68*(5), 117–123. https://doi.org/10.2376/0003-925X-68-117
Taherikalani, M., Hemati, S., Heidarzadi, K., Mahdavi, Z., Ghanbari, F., Mohamadi, M., Ghafourian, S., Varzi, A. M., Azizi Jalilian, F., & Bogdanovic, L. S. K. (2015). Unexpectedly high occurrence of Escherichia coli and Staphylococcus aureus isolates from raw milk in Ilam, Western Iran. *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents, 29*(4), 859–863. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26753648/.
Tamendjari, S., Bouzebda, F. A., Chaib, L., Aggad, H., Ramdani, M. M., & Bouzebda, Z. (2021). Antibiotic resistance of Staphylococcus aureus isolated from raw cow and goat milk produced in the Tiaret and Souk Ahras areas of Algeria. *Veterinary World, 14*(7), 1929–1934. https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1929-1934
Tarekgne, E. K., Skjerdal, T., Skeie, S., Rudi, K., Porcellato, D., Félix, B., & Narvhus, J. A. (2016). Enterotoxin gene profile and molecular characterization of staphylococcus aureus isolates from bovine bulk milk and milk products of Tigray Region, Northern Ethiopia. *Journal of Food Protection, 79*(8), 1387–1395. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-003
Tasci, F., Sahindokuyucu, F., & Ozturk, D. (2011). Detection of Staphylococcus species and staphylococcal enterotoxins by ELISA in ice cream and cheese consumed in Burdur province. *African Journal of Agricultural Research, 6*(4), 937–942. https://doi.org/10.5897/AJAR10.489
Tenhagen, B.-A., Alt, K., Pfefferkorn, B., Wiehle, L., Käsbohrer, A., & Fetsch, A. (2018). Short communication: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in conventional and organic dairy herds in Germany. *Journal of Dairy Science, 101*, 3380–3386. https://doi.org/10.3168/jds.2017-12939
Thaker, H. C., Brahmbhatt, M. N., & Nayak, J. B. (2013). Isolation and identification of staphylococcus aureus from milk and milk products and their drug resistance patterns in anand, Gujarat. *Veterinary World, 6*(1), 10–13. https://doi.org/10.5455/vetworld.2013.10-13
Tibebu, L., 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. https://doi.org/10.2147/vmrr.s331968
Tigabu, E., Asrat, D., Kassa, T., Sinmegn, T., Molla, B., & Gebreyes, W. (2015). Assessment of risk factors in milk contamination with Staphylococcus aureus in urban and peri-urban small-holder dairy farming in Central Ethiopia. *Zoonoses and Public Health, 62*(8), 637–643. https://doi.org/10.1111/zph.12199
Titouche, Y., Hakem, A., Houali, K., Meheut, T., Vingadassalon, N., Ruiz-Ripa, L., Salmi, D., Chergui, A., Chenouf, N., Hennekinne, J. A., Torres, C., & Auvray, F. (2019). Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ST8 in raw milk and traditional dairy products in the Tizi Ouzou area of Algeria. *Journal of Dairy Science, 102*(8), 6876–6884. https://doi.org/10.3168/jds.2018-16208
Traversa, A., Gariano, G. R., Gallina, S., Bianchi, D. M., Orusa, R., Domenis, L., Cavallerio, P., Fossati, L., Serra, R., & Decastelli, L. (2015). Methicillin resistance in Staphylococcus aureus strains isolated from food and wild animal carcasses in Italy. *Food Microbiology, 52*, 154–158. https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.07.012
Tyasningsih, W., Effendi, M. H., Budiarto, B., & Syahputra, I. R. (2019). Antibiotic resistance to staphylococcus aureus and methicillin resistant staphylococcus aureus (MRSA) isolated from dairy farms in Surabaya, Indonesia. *Indian Veterinary Journal, 96*(11), 27–31.

Vyletělová, M., Vlková, H., & Manga, I. (2011). Occurrence and characteristics of methicillin resistant staphylococcus aureus and methicillin resistant coagulase-negative staphylococci in raw milk manufacturing. *Czech Journal of Food Sciences, 29*, S11–S16. https://doi.org/10.17221/4443-CJFS

Walcher, G., Gonano, M., Kümmel, J., Barker, G. C., Lebl, K., Bereuter, O., Ehling-Schulz, M., Wagner, M., & Stessl, B. (2014). Staphylococcus aureus reservoirs during traditional Austrian raw milk cheese production. *Journal of Dairy Research, 81*(4), 462–470. https://doi.org/10.1017/S0022029914000417

Wang, X., Li, G., Xia, X., Yang, B., Xi, M., & Meng, J. (2014). Antimicrobial susceptibility and molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in retail foods in Shaanxi, China. *Foodborne Pathogens and Disease, 11*(4), 281–286. https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1643

Wang, X., Meng, J., Zhou, T., Zhang, Y., Yang, B., Xi, M., Sheng, J., Zhi, S., & Xia, X. (2012). Antimicrobial susceptibility testing and genotypic characterization of staphylococcus aureus from food and food animals. *Foodborne Pathogens and Disease, 9*(2), 95–101. https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0987

Wang, X., Wang, X., Wang, Y., Guo, G., Usman, T., Hao, D., Tang, X., Zhang, Y., & Yu, Y. (2014). Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of Staphylococcus aureus strains from Holstein milk. *Letters in Applied Microbiology, 58*(6), 527–534. https://doi.org/10.1111/lam.12221

Yahya Ahmed, M., Abdalbagi Ali, H., Mohammed Taher Gorish, B., Omer Ali, S., Saif Aldein Abdalrhim, E., Hamza Mergani, M., Abass Abd Elgadir, A., Khalid Mohammed, S., Omer Ahmed, S., Alsaeid Musa, N., Saeed Ahmed, A., Mohammed Abdalla, W., Fadlallah Hamedelnil, Y., Ibrahim Hashim, A., & Altayb, H. N. (2021). Molecular detection of staphylococcal enterotoxins and mecA genes products in selected food samples collected from different areas in Khartoum state. *International Journal of Microbiology*. https://doi.org/10.1155/2021/5520573, 2021.

Zaatout, N., Ayachi, A., Kecha, M., & Kadlec, K. (2019). Identification of staphylococci causing mastitis in dairy cattle from Algeria and characterization of Staphylococcus aureus. *Journal of Applied Microbiology, 127*(5), 1305–1314. https://doi.org/10.1111/jam.14402

Zeinhom, M. M. A., Abdel-Latef, G. K., & Jordan, K. (2015). The use of multiplex pcr to determine the prevalence of enterotoxigenic staphylococcus aureus isolated from raw milk, feta cheese, and hand swabs. *Journal of Food Science, 80*(12), M2932–M2936. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13147

Zhao, X., Yuan, X., Hu, M., Zhang, Y., Li, L., Zhang, Q., Yuan, X., Wang, W., & Liu, Y. (2021). Prevalence and characterization of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from bulk tank milk in Shandong dairy farms. *Food Control, 125*(December 2020), Article 107836. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107836

Zulauf, M., Zweifel, C., & Stephan, R. (2018). Microbiological quality of raw milk sold directly from farms to consumers in Switzerland. *Journal of Food Safety and Food Quality, 69*(5), 140–144. https://doi.org/10.2376/0003-925X-69-140

Olsztyn, 17.05.2024
(miejscowość, data)

mgr inż. Joanna Gajewska
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia żywności i żywienia
(dyscyplina naukowa)

**Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny**
**Technologia żywności i żywienia**
**Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**
**prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak**

**OŚWIADCZENIE**
**autora rozprawy doktorskiej**

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Gajewska, J., Zakrzewski, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., 2023. *Meta-analysis of the global occurrence of S. aureus in raw cattle milk and artisanal cheeses.* Food Control 147, 109603. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2023.109603

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na:

udziale w opracowaniu koncepcji, przeglądzie baz danych w poszukiwaniu odpowiednich danych, analizie statystycznej, interpretacji uzyskanych wyników, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Gajewska Joanna
.....
(podpis kandydata)

Olsztyn, 15.05.2024
(miejscowość, data)

mgr inż. Arkadiusz Józef Zakrzewski
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

**Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny**
**Technologia żywności i żywienia**
**Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**
**prof. dr hab. Anna Iwaniak**

**OŚWIADCZENIE**
**współautora**

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Gajewska, J., Zakrzewski, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., 2023. *Meta-analysis of the global occurrence of S. aureus in raw cattle milk and artisanal cheeses.* Food Control 147, 109603. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2023.109603

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: współudziale w walidacji wyników, analizie statystycznej, prezentacji wyników (tabel i rycin) oraz korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Joannę Gajewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Joanny Gajewskiej polegający na" opracowaniu koncepcji, przeglądzie baz danych w poszukiwaniu odpowiednich danych, analizie statystycznej, interpretacji uzyskanych wyników, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (pełnienie funkcji autor korespondencyjny).

Zakrzewski Arkadiusz
podpis

Olsztyn, Olsztyn, 17.05.2024

dr hab. inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

**Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny**
**Technologia żywności i żywienia**
**Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**
**prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak**

**OŚWIADCZENIE**
**współautora**

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Gajewska, J., Zakrzewski, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., 2023. *Meta-analysis of the global occurrence of S. aureus in raw cattle milk and artisanal cheeses.* Food Control 147, 109603. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2023.109603

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji badań, współudziale w walidacji wyników, korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Joannę Gajewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Joanny Gajewskiej polegający na" opracowaniu koncepcji, przeglądzie baz danych w poszukiwaniu odpowiednich danych, analizie statystycznej, interpretacji uzyskanych wyników, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (pełnienie funkcji autor korespondencyjny).

Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
podpis

Olsztyn, 17.05.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

**Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny**
**Technologia żywności i żywienia**
**Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**
**prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak**

**OŚWIADCZENIE**
**współautora**

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Gajewska, J., Zakrzewski, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., 2023. *Meta-analysis of the global occurrence of S. aureus in raw cattle milk and artisanal cheeses.* Food Control 147, 109603. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2023.109603

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji badań, współudziale w walidacji wyników, korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Joannę Gajewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Joanny Gajewskiej polegający na" opracowaniu koncepcji, przeglądzie baz danych w poszukiwaniu odpowiednich danych, analizie statystycznej, interpretacji uzyskanych wyników, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (pełnienie funkcji autor korespondencyjny).

Anna Zadernowska
.....
podpis

**ZAŁĄCZNIK 2**

**Gajewska, J.,** Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2022) Occurrence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains along the production chain of raw milk cheeses in Poland. Molecules 27, 6569. https://doi.org/10.3390/molecules27196569

molecules

MDPI

*Article*

# Occurrence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* Strains along the Production Chain of Raw Milk Cheeses in Poland

**Joanna Gajewska *, Wioleta Chajęcka-Wierzchowska and Anna Zadernowska**

Department of Industrial and Food Microbiology, Faculty of Food Science, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Plac Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn, Poland
* Correspondence: joanna.gajewska@uwm.edu.pl

**Abstract:** Cheeses produced from unpasteurized milk by traditional production methods may contain many groups of microorganisms, including *Staphylococcus aureus*. The aim of this study was to determine the occurrence of *S. aureus* in the artisanal cheese production chain from unpasteurized milk. We investigated the prevalence of *S. aureus* strains isolated from various stages of artisanal cheese of unpasteurized milk production from farms in the northeastern and southern parts of Poland and characterized them. Characterization included antimicrobial susceptibility by microbroth dilution and biofilm formation by in vitro assay. Among all strains, the presence of enterotoxigenic genes and genes involved with biofilm formation and antibiotic resistance were screened by PCR-based methods. A total of 180 samples were examined. A high percentage of strains were resistant to penicillin (54/58.1%) and tobramycin (32/34.4%). Some tested isolates also showed resistance to the macrolide class of antibiotics: azithromycin, clarithromycin, and erythromycin at 17/18.3%, 15/16.1%, and 21/22.6%, respectively. Among tested isolates, we also found phenotypic resistance to oxacillin (9/9.7%) and cefoxitin (12/12.9%). The *bla*Z gene encoding penicillin resistance was the most common gene encoding antibiotic resistance among the tested strains. All isolates showing phenotypic resistance to cefoxitin possessed the *mec*A gene. The study also evaluated the prevalence of biofilm-associated genes, with *eno* the most frequently associated gene. Eighty-nine out of 93 *S. aureus* isolates (95.7%) possessed at least one enterotoxin-encoding gene. The results of this study showed that production of raw milk cheeses may be a source of antibiotic resistance and virulent *S. aureus*. Our results suggest that artisanal cheese producers should better control production hygiene.

**Keywords:** *S. aureus*; staphylococcal enterotoxins genes; antimicrobial resistance; virulence; raw milk cheese

check for updates

**Citation:** Gajewska, J.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. Occurrence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* Strains along the Production Chain of Raw Milk Cheeses in Poland. *Molecules* **2022**, *27*, 6569. https://doi.org/10.3390/molecules27196569

Academic Editors: Anetta Ziola-Frankowska and Marcin Frankowski

Received: 30 August 2022
Accepted: 30 September 2022
Published: 4 October 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## 1. Introduction

The consumption of milk and dairy products has a long tradition in human nutrition [1]. Milk production is one of the most important branches of the agricultural economy in Poland, and each year production increases. Milk and dairy products have been shown to have a positive impact on human health due to the abundance of nutrients present within them, such as calcium, potassium, proteins, fat and vitamins [2]. In recent years, traditional foods such as farmhouse artisanal cheese have become increasingly popular with consumers in Poland [3]; an upward trend in the consumption of raw milk and raw milk processed products purchased in local markets and/or farms has been observed.

Cheeses produced from unpasteurized milk by traditional production methods may contain very diverse microbiota, which impacts their unique organoleptic characteristics [4]. However, due to their rich source of chemical compounds, these cheeses are also an excellent environment for the development of many groups of microorganisms, including *S. aureus* [5].

The occurrence of *S. aureus* in an artisanal cheese production chain may be due to the fact that milk is subjected to low-temperature processing without the pasteurization process,

which creates the risk of the occurrence of *S. aureus* in finished products. Furthermore, artisanal production involves the risk of contamination of finished products at various stages of production [6] due to unhygienic practices. In addition to low milk quality, each further processing step facilitates the entrance of *S. aureus* in the dairy chain. One possible source of contamination of finished products is the people involved in cheese manufacturing, since *S. aureus* is frequently present on the skin of cheesemakers [4]. Along with this human-to-food contamination route, several other entrance points of *S. aureus* into the dairy chain have been described previously [7]. One factor allowing *S. aureus* to grow during cheese production is insufficient acidification by the starter cultures of the lactic acid bacteria. In addition, biofilm formation on dairy equipment allows niches to grow and contaminate the processing line [7,8].

*S. aureus* is one of the most important causative agents of food poisoning worldwide. *S. aureus* strains are known to be resistant to several types of antibiotics [9]. Overuse of antibiotics causes selective pressure in animals and humans to develop antibiotic resistance [10]. Nowadays, the most severe types of antibiotic-resistant *S. aureus* are methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) [11]. MRSA strains are of great importance in public health and can pose a zoonotic risk to humans. *S. aureus* can be transmitted by contaminated food and cause food-borne outbreaks, which are mostly caused by toxins. On the other hand, *S. aureus* can also lead to severe diseases, e.g., sepsis, endocarditis, and necrotizing pneumonia [12]. Methicillin resistance of *S. aureus*, important in farming and food-processing plants, stems from the possibility of zoonotic infection of consumers and workers involved in animal husbandry [13]. Global surveillance has shown that MRSA is a problem in some continents and countries where studies have been carried out, increasing mortality and the need to use expensive last-resource antibiotics [14–17]. MRSA strains are those that carry the *mec*A and/or *mec*C gene and are resistant to all penicillins, cephalosporins, and carbapenem [18]. Vancomycin is an important antibacterial agent used to treat serious infections caused by MRSA [19]. It is worth noting that, at present, the emergence and spread of VRSA strains remains a challenge to the global health crisis due to the lack of effective control and treatment efficacy [20].

Some *S. aureus* isolates are capable of producing enterotoxins, which are potent emetic agents. Staphylococcal food poisoning (SFP) is caused by the consumption of products containing enterotoxins known as superantigens (SAgs) [4]. Consumption of products containing enterotoxins may cause a diverse range of gastrointestinal symptoms, including nausea, violent vomiting, and abdominal cramping, with or without diarrhea [21]. The ability to form biofilm among *S. aureus* strains is also known. In the food industry, *S. aureus* biofilm may be distributed throughout the dairy food chain by the food raw products, raw milk tanks, and the food processing environment and equipment [22]. Microbial biofilms that form on the surfaces of machinery and equipment in food processing plants affect not only the safety and quality of the final product, but also the technological process flow [23]. This ability is mediated by many genetic determinants, including operon *ica*ADBC, which encodes the synthesis of the polysaccharide intercellular adhesin (PIA) molecule, the *agr* locus, and different genes recognized as microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) [22].

Nowadays, studies on the prevalence and characterization of *S. aureus* isolated from final dairy products available for consumers are very common, with examples from China, Norway, and Greece, among other countries [24–29]. In addition, numerous articles have been published on the prevalence and characterization of *S. aureus* in raw milk, especially in China, Iran, and Australia [30–34]. It is worth emphasizing that *S. aureus* may enter the food chain during processing and preparation of the products [35]. Despite this, few data are available on the prevalence and characteristics of *S. aureus* in the food production chain, especially in Poland [4,36].

Therefore, the aim of the study was to determine the occurrence of *S. aureus* in an artisanal cheese production chain from unpasteurized milk. Moreover, the antibiotic

resistance, enterotoxicity, and biofilm formation and slime production, as well as the frequency of virulence-related genes among *S. aureus* strains were investigated.

## 2. Results

### *2.1. Occurrence of S. aureus Strains along the Cheese Production Chain*

In the current study, the presence of *S. aureus* was found in 93/180 (51.7%) of all samples tested for *S. aureus* (Table 1). *S. aureus* was isolated from raw material, semi-products, and in the final product. *S. aureus* was also found on food contact surfaces—form (9/50.0%), tank (8/44.4%), and jar (8/44.4%)—and in a small percentage of non-food contact surfaces: sinks (2/11.1%).

**Table 1.** Contamination with *S. aureus* at different stages of cheese production chain.

| Source | No. of Samples | No. (%) of *S. aureus*-Positive Samples |
|---|---|---|
| **Sample** | | |
| Raw milk | 18 | 10 (55.6%) |
| Heated milk | 18 | 13 (72.2%) |
| Curd | 18 | 15 (83.3%) |
| Whey | 18 | 8 (44.4%) |
| Brine | 18 | 10 (55.6%) |
| Cheese | 18 | 10 (55.6%) |
| **Swab** | | |
| Tank | 18 | 8 (44.4%) |
| Jar | 18 | 8 (44.4%) |
| Form | 18 | 9 (50.0%) |
| Sink | 18 | 2 (11.1%) |
| **Total** | 180 | 93 (51.7%) |

### *2.2. Antibiotic Resistance Profiles among S. aureus Strains*

In this study, all the *S. aureus* (n = 93) isolates were evaluated for the phenotypic resistance to antibiotics and the presence antibiotic-resistant genes.

Resistance to benzypenicillin was the most common among the tested *S. aureus* strains (54/93 (58.1%)), followed by tobramycin (32/93 (34.4%)). Isolates were also resistant to macrolides: azithromycin, clarithromycin, and erythromycin: 17/93 (18.3%), 15/93 (16.1%), and 21/93 (22.6%), respectively. Resistance to tetracycline and tigecycline belonging to the tetracycline class was shown among 19/93 (20.4%) and 22/93 (23.7%) of isolates, respectively. Among tested isolates, phenotypic resistance to oxacillin (9/93 (9.7%)) and cefoxitin (12/93 (12.9%)) were also shown both in raw materials and in ready-to-eat cheeses. The isolates' resistance to the other tested antibiotics ranged from 1.1% to 16.1%, with none of the isolates being resistant to gentamycin, clindamycin, rifampicin, moxifloxacin, or chloramphenicol (Table 2). Multidrug-resistant (MDR) status of *S. aureus* isolates was tested against 15 classes of antimicrobials. Multi-drug resistance in this study was taken as resistant to at least three antibiotics from different chemical classes of antibiotic. Therefore, among all isolates of *S. aureus*, 21/93 (22.6%) were defined as multidrug-resistant. It was found that the multiple antibiotic resistance index (MAR) among isolates ranged from 0.04 to 0.43, with an overall mean of 0.12. In this study, 12/93 (12.9%) isolates were defined as MRSA by the cefoxitin/oxacillin MIC test and were positive for the *mec*A gene, and two strains 2/93 (2.2%) were classified as phenotypic VRSA based only on phenotypic results using microdilution assay.

**Table 2.** Antimicrobial resistance profiles of *S. aureus* against tested antimicrobial agents.

| | | Samples | | | | | Swabs | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Antimicrobial Class** | **Antimicrobial Agent** | **Raw Milk (n = 9)** | **Heated Milk (n = 14)** | **Curd (n = 15)** | **Whey (n = 8)** | **Brine (n = 10)** | **Cheese (n = 10)** | **Tank (n = 8)** | **Jar (n = 8)** | **Form (n = 9)** | **Sink (n = 2)** | **Total (n = 93)** |
| **Aminoglycosides** | **AK** | 0 | 4 (28.6%) | 6 (40.0%) | 4 (50.0%) | 0 | 3 (30.0%) | 3 (37.5%) | 1 (12.5%) | 2 (22.2%) | 0 | **23 (24.7%)** |
| | **TOB** | 4 (44.4%) | 6 (42.9%) | 5 (33.3%) | 2 (25.0%) | 2 (20.0%) | 4 (40.0%) | 3 (37.5%) | 3 (37.5%) | 2 (22.2%) | 1 (50.0%) | **32 (34.4%)** |
| | **K** | 1 (11.1%) | 0 | 1 (6.7%) | 0 | 1 (10.0%) | 1 (10.0%) | 1 (12.5%) | 0 | 0 | 1 (50.0%) | **6 (6.5%)** |
| **Cephalosporins** | **FOX** | 1 (11.1%) | 1 (7.1%) | 3 (20.0%) | 1 (12.5%) | 0 | 2 (20.0%) | 1 (12.5%) | 1 (12.5%) | 2 (22.2%) | 0 | **12 (12.9%)** |
| **Macrolides, lincosamides and streptogramins** | **AZM** | 0 | 3 (21.4%) | 3 (20.0%) | 2 (25.0%) | 0 | 3 (30.0%) | 1 (12.5%) | 3 (37.5%) | 2 (22.2%) | 0 | **17 (18.3%)** |
| | **CLM** | 2 (22.2%) | 3 (21.4%) | 2 (13.3%) | 2 (25.0%) | 0 | 3 (30.0%) | 0 | 0 | 3 (33.3%) | 0 | **15 (16.1%)** |
| | **E** | 2 (22.2%) | 5 (35.7%) | 2 (13.3%) | 2 (25.0%) | 0 | 3 (30.0%) | 2 (25.0%) | 3 (37.5%) | 2 (22.2%) | 0 | **21 (22.6%)** |
| **β-lactams** | **BP** | 5 (55.6%) | 8 (57.1%) | 11 (73.3%) | 7 (87.5%) | 5 (50.0%) | 6 (60.0%) | 4 (50.0%) | 4 (50.0%) | 4 (44.4%) | 0 | **54 (58.1%)** |
| | **OXA** | 0(0.0%) | 1 (7.1%) | 1 (6.7%) | 1 (10.0%) | 1 (10.0%) | 3 (30.0%) | 1(12.5%) | 0 | 1 (11.1%) | 0 | **9 (9.7%)** |
| **Oxazolidinones** | **LZD** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (10.0%) | 0 | 0 | 0 | 0 | **1 (1.1%)** |
| **Nitrofurantoins** | **FT** | 1 (11.1%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (10.0%) | 0 | 0 | 0 | 0 | **2 (2.2%)** |
| **Tetracyclines** | **TE** | 2 (22.2%) | 5 (35.7%) | 2 (13.3%) | 0 | 4 (40.0%) | 2 (20.0%) | 2 (25.0%) | 2(25.0%) | 0 | 0 | **19 (20.4%)** |
| | **TGC** | 2 (20.0%) | 3 (21.4%) | 4 (26.7%) | 2 (25.0%) | 1 (10.0%) | 3 (30.0%) | 2 (25.0%) | 3 (37.5%) | 2 (22.2%) | 0 | **22 (23.7%)** |
| **Sulfonamides** | **TMP** | 3 (33.3%) | 2 (14.3%) | 1 (6.7%) | 2 (25.0%) | 0 | 2 (20.0%) | 1 (12.5%) | 2 (25.0%) | 2 (22.2%) | 0 | **15 (16.1%)** |
| | **SXT** | 1 (11.1%) | 3 (21.4%) | 3 (20.0%) | 0 | 1 (10.0%) | 2 (20.0%) | 1 (12.5%) | 0 | 0 | 0 | **11 (11.8%)** |
| **Glycopeptides** | **VA** | 0 | 0 | 1 (6.7%) | 0 | 0 | 1 (10.0%) | 0 | 0 | 0 | 0 | **2 (2.2%)** |
| **Streptogramins** | **QD** | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (10.0%) | 0 | 0 | 0 | 1 (11.1%) | 0 | **2 (2.2%)** |
| **Steroidal** | **FD** | 1 (11.1%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (50.0%) | **2 (2.2%)** |

Abbreviations: n—number of *S. aureus* isolates; AK—amikacin; TOB—tobramycin; K—kanamycin; FOX—cefoxitin; AZM—azithromycin; CLM—clarithromycin; E—erythromycin; BP—benzylpenicillin; OXA—oxacillin; LZD—linezolid; FT—nitrofurantoin; TE—tetracycline; TGC—tigecycline; TMP—trimethoprim; SXT—trimethoprim/sulfamethoxazole; VA—vancomycin; QD—quinupristin/dalfopristin; FD—fusidic acid.

The presence of tested resistance genes ranged from 12/93 (12.9%) to 89/93 (95.7%) among all *S. aureus* isolates. The most prevalent gene encoding antibiotic resistance among the tested isolates was *bla*Z (89/93 (95.7%)), encoding penicillinase. All isolates showing phenotypic resistance to cefoxitin possessed the *mec*A gene (12/93 (12.9%)). Although a small percentage of strains showed phenotypic resistance to tetracycline, a high percentage of strains possessing the *tet*(K), *tet*(L), and *tet*(M) genes were found (59/93 (63.4%), 16/93 (17.2%), and 76/93 (81.7%), respectively). The presence of *aac(6′)-Ie-aph(2″)-Ia* and *aph(3′)IIIa* genes, which determine aminoglycoside resistance, was also found among the tested isolates, and were present among 56/93 (60.2%) and 86/93 (92.5%) of the isolates, respectively. The tested strains also harbored an *erm*B gene in 27/93 (29.0%) (Table 3).

**Table 3.** Occurrence of antimicrobial resistance genes against tested antimicrobial agents in *S. aureus*.

| | | Samples | | | | | | Swabs | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Antimicrobial Class** | **Antibiotic Resistance Gene** | **Raw Milk (n = 9)** | **Heated Milk (n = 14)** | **Curd (n = 15)** | **Whey (n = 8)** | **Brine (n = 10)** | **Cheese (n = 10)** | **tank (n = 8)** | **Jar (n = 8)** | **Form (n = 9)** | **Sink (n = 2)** | **Total (n = 93)** |
| **Oxacillin** | *mec*A | 1 (11.1%) | 1 (7.1%) | 3 (20.0%) | 1 (12.5%) | 0 | 2 (20.0%) | 1 (12.5%) | 1 (12.5%) | 2 (22.2%) | 0 | **12 (12.9%)** |
| **Penicillin** | *bla*Z | 9 (100%) | 13 (92.9%) | 15 (100.0%) | 8 (100.0%) | 8 (80.0%) | 10 (100.0%) | 8 (100.0%) | 8 (100.0%) | 9 (100.0%) | 1 (50.0%) | **89 (95.7%)** |
| **Tetracyclines** | *tet*K | 5 (55.6%) | 9 (64.3%) | 10 (66.7%) | 4 (50.0%) | 5 (50.0%) | 7 (70.0%) | 5 (62.5%) | 6 (75.0%) | 6 (66.7%) | 2 (100%) | **59 (63.4%)** |
| | *tet*M | 6 (66.7%) | 12 (85.7%) | 14 (93.3%) | 6 (75.0%) | 5 (50.0%) | 9 (90.0%) | 7 (87.5%) | 7 (87.5%) | 9 (100.0%) | 1 (50.0%) | **76 (81.7%)** |
| | *tet*L | 1 (11.1%) | 1 (7.1%) | 3 (20.0%) | 2 (25.0%) | 1 (10.0%) | 2 (20.0%) | 1 (12.5%) | 2 (25.0%) | 2 (22.2%) | 1 (50.0%) | **16 (17.2%)** |
| **Macrolides, lincosamides, and streptogramins** | *erm*B | 2 (22.2%) | 5 (35.7%) | 5 (33.3%) | 3 (37.5%) | 1 (10.0%) | 2 (20.0%) | 3 (37.5%) | 2 (25.0%) | 3 (33.3%) | 1 (50.0%) | **27 (29.0%)** |
| **Aminoglycosides** | *aac(6′)-Ie-aph(2″)-Ia* | 3 (33.3%) | 9 (64.3%) | 8 (53.3%) | 3 (37.5%) | 8 (80.0%) | 6 (60.0%) | 8 (100.0%) | 4 (50%) | 7 (77.8%) | 1 (50.0%) | **56 (60.2%)** |
| | *aph(3′)IIIa* | 9 (100.0%) | 12 (85.7%) | 12 (80.0%) | 8 (100.0%) | 10 (100.0%) | 9 (90.0%) | 8 (100.0%) | 7 (87.5%) | 9 (100.0%) | 2 (100%) | **86 (92.5%)** |

n—number of *S. aureus* isolates.

Statistical analysis showed a positive but not significant at $p < 0.05$ correlation between occurrence of the *erm*(B) gene and phenotypically resistant clarithromycin (r = 0.2348), azithromycin ($r = 0.4943$), and erythromycin ($r = 0.5041$) ($p < 0.05$). Further, we found positive correlation between *tet*(K) and phenotypic resistance to tetracycline ($r = 0.163$) and tigecycline ($r = 0.265$) ($p < 0.05$) and negative but not significant at $p < 0.05$ correlation between *tet*(L) and phenotypic resistance to tetracycline among isolates ($r = -0.090$).

### 2.3. Presence of Virulence Factors in S. aureus Isolates

Among all isolates, including those from raw materials and swabs from surfaces, the ability to form biofilm has been found. Biofilm formation by *S. aureus* included the following: weak formers 33 (35.4%), intermediate formers 2 (2.2%), and strong formers 58 (62.4%). Table 4 summarizes the biofilm-forming strength of tested *S. aureus* isolates at different stages of cheese production. There was no association between slime production and the ability to form biofilm at $p < 0.05$ ($p = 0.0981026$).

**Table 4.** Virulence characteristics among *S. aureus* isolates.

| | | Samples | | | | | Swabs | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Raw Milk (n = 9)** | **Heated Milk (n = 14)** | **Curd (n = 15)** | **Whey (n = 8)** | **Brine (n = 10)** | **Cheese (n = 10)** | **Tank (n = 8)** | **Jar (n = 8)** | **Form (n = 9)** | **Sink (n = 2)** | **Total (n = 93)** |
| **Biofilm MTP method** | strong | 5 (55.6%) | 9 (64.3%) | 12 (80.0%) | 4 (50.0%) | 7 (70.0%) | 9 (90.0%) | 3 (37.5%) | 3 (37.5%) | 4 (44.4%) | 2 (100%) | **58 (62.4%)** |
| | intermediate | 1 (11.1%) | 1 (7.1%) | - | - | - | - | - | - | - | - | **2 (2.2%)** |
| | weak | 3 (33.3%) | 4 (28.6%) | 3 (20.0%) | 4 (50.0%) | 3 (30.0%) | 1 (10.0%) | 5 (62.5%) | 5 (62.5%) | 5 (55.6%) | | **33 (35.4%)** |
| **Slime production** | | 4 (44.4%) | 7 (50.0%) | 9 (60.0%) | 4 (50.0%) | 4 (40.0%) | 7 (70.0%) | 3 (37.5%) | 5 (62.5%) | 3 (33.3%) | 2 (100%) | **48 (51.6%)** |
| **Biofilm-associated genes** | *ica*ADBC | 2 (22.2%) | 4 (28.6%) | 4 (26.7%) | 3 (37.5%) | 1 (10.0%) | 4 (40.0%) | 2 (25.0%) | 2 (25.0%) | 2 (22.2%) | 1 (50.0%) | **25 (26.9%)** |
| | *bap* | 3 (33.3%) | 7 (50.0%) | 8 (53.3%) | 2 (25.0%) | 1 (10.0%) | 5 (50.0%) | 2 (25.0%) | 1 (12.5%) | 3 (33.3%) | 0 | **32 (34.4%)** |
| | *eno* | 9 (100%) | 14 (100.0%) | 15 (100.0%) | 8 (100.0%) | 10 (100%) | 10 (100.0%) | 8 (100.0%) | 8 (100.0%) | 9 (100.0%) | 2 (100%) | **93 (100.0%)** |
| | *sig*B | 5 (55.6%) | 6 (42.9%) | 8 (53.3%) | 4 (50.0%) | 2 (20.0%) | 6 (60.0%) | 3 (37.5%) | 5 (62.5%) | 7 (77.8%) | 1 (50.0%) | **42 (45.2%)** |
| | *sar*A | 7 (77.8%) | 13 (92.9%) | 12 (80.0%) | 6 (75.0%) | 8 (80.0%) | 8 (80.0%) | 6 (75.0%) | 5 (62.5%) | 7 (77.8%) | 2 (100%) | **74 (79.6%)** |
| | *agr*D | 2 (22.2%) | 6 (42.9%) | 5 (33.3%) | 4 (50.0%) | 5 (50.0%) | 3 (30.0%) | 2 (25.0%) | 3 (37.5%) | 3 (33.3%) | - | **33 (35.5%)** |
| **Enterotoxigenic genes** | *sed* | - | 1 (7.1%) | - | - | 1 (10.0%) | 1 (10.0%) | - | - | - | - | **3 (3.2%)** |
| | *seg* | 4 (44.4%) | 9 (64.3%) | 8 (53.3%) | 7 (87.5%) | 5 (50.0%) | 6 (60.0%) | 5 (62.5%) | 4 (50.0%) | 5 (55.6%) | 1 (50.0%) | **54 (58.1%)** |
| | *sei* | 2 (22.2%) | 4 (28.6%) | 1 (6.7%) | 1 (12.5%) | - | - | 2 (25.0%) | 2 (25.0%) | 1 (11.1%) | - | **13 (14.0%)** |
| | *selj* | 1 (11.1%) | 3 (37.5%) | 4 (26.7%) | 3 (37.5%) | 2 (20.0%) | 4 (40.0%) | 2 (25.0%) | 2 (25.0%) | 3 (33.3%) | - | **26 (28.0%)** |
| | *selk* | 7 (77.8%) | 10 (71.4%) | 10 (66.7%) | 4 (50.0%) | 4 (40.0%) | 7 (70.0%) | 3 (37.5%) | 5 (62.5%) | 5 (55.6%) | 2 (100.0%) | **57 (61.3%)** |
| | *selm* | - | 2 (14.3%) | 3 (20.0%) | 2 (25.0%) | 3 (30.0%) | 3 (30.0%) | 3 (37.5%) | - | 1 (11.1%) | 1 (50.0%) | **18 (19.4%)** |
| | *seln* | 2 (22.2%) | 7 (50.0%) | 4 (26.7%) | 6 (75.0%) | 4 (40.0%) | 6 (60.0%) | 4 (40.0%) | 3 (37.5%) | 5 (55.6%) | 1 (50.0%) | **42 (45.2%)** |
| | *selo* | - | 1 (7.1%) | 3 (20.0%) | 1 (12.5%) | 2 (20.0%) | 3 (30.0%) | 3 (37.5%) | - | - | 1 (50.0%) | **14 (15.1%)** |
| | *selp* | 2 (22.2%) | - | 4 (26.7%) | 2 (25.0%) | 3 (30.0%) | 1 (10.0%) | - | 3 (37.5%) | 1 (11.1%) | - | **16 (17.2%)** |
| | *ser* | 1 (11.1%) | 4 (28.6%) | 3 (20.0%) | 1 (12.5%) | - | - | 2 (25.0%) | 1 (12.5%) | 1 (11.1%) | 1 (50.0%) | **14 (15.1%)** |
| | *selq* | 3 (33.3%) | 8 (57.1%) | 8 (53.3%) | 6 (75.0%) | 2 (20.0%) | 6 (60.0%) | 3 (37.5%) | 3 (37.5%) | 3 (33.3%) | 1 (50.0%) | **43 (46.2%)** |
| | *selu* | | 5 (35.7%) | 5 (33.3%) | 3 (37.5%) | 2 (20.0%) | 4 (40.0%) | 3 (37.5%) | 2 (25.0%) | 4 (44.4%) | - | **29 (31.2%)** |
| | *eta* | - | 1 (7.1%) | - | - | - | - | - | 1 (12.5%) | 1 (11.1%) | - | **3 (3.2%)** |
| | *etd* | - | - | - | - | 1 (10.0%) | 1 (10.0%) | - | - | - | - | **2 (2.2%)** |
| | *tst-1* | - | - | | | - | 1 (10.0%) | | 1 (12.5%) | 2 (22.2%) | - | **4 (4.3%)** |

(-) not detected. n—number of *S. aureus* isolates.

The study also evaluated the prevalence of biofilm-associated genes, and it was shown that the most frequent gene was *eno* (laminin-binding protein), which was observed among all isolates. Moreover, *bap* (biofilm-associated protein) was found among 32/34.4% of all isolates. The genes *sig*B, *sar*A, and *agr*D were found in 42/45.2%, 74/79.6%, and 33/35.5% of isolates, respectively. After analyzing the relationship between virulence genes and biofilm formation, it was shown that there were significant correlations between the occurrence of *agr*D gene and biofilm formation ($r = 0.3038$). Among all isolates, we found a positive but not significant correlation between the occurrence of *agr*D gene and *sar*A ($r = 0.0414$) and *sig*B and *sar*A ($r = 0.4055$) ($p < 0.05$).

Each strain was tested for the presence of staphylococcal enterotoxins genes. Eighty-nine out of 93 *S. aureus* isolates (95.7%) possessed at least one enterotoxin-encoding gene. It was observed that genes encoding SEI (enterotoxin-like toxin) were more frequent than genes encoding classical enterotoxins (SEs) among the isolates studied. Among the genes encoding SEI, the presence of *selk* (61.3%) was recorded most frequently, followed by *selg* (58.1%), *seg* (46.2%), *seln* (45.2%), *selu* (31.2%), *selm* (19.4%), and *selj* (28%). It is worth noting that the highest percentage of the presence of enterotoxigenic genes was found among strains isolated from finished products. Statistical analysis showed positive correlation between co-occurrence of some enterotoxins genes, e.g., *selp* and *selk* ($r = 0.0698$), *selp* and *selu* ($r = 0.1061$), *selm* and *selk* ($r = 0.1709$), *selm* and *selo* ($r = 0.8582$), and *selm* and *seg* ($r = 0.3676$).

Statistical analysis showed no statistically significant differences between the source of isolation of *S. aureus* and the ability to produce slime ($p > 0.999$), resistance to antimicrobial agents ($p = 0.4703$), or occurrence of virulence genes ($p > 0.999$).

To systematically detect all such associations in an unbiased way, we analyzed all potential pairs of variables (except those that were entirely present or completely absent among all (n = 93) isolates. Among the observed correlations, we found positive correlations between the ability of the strains to form biofilm and phenotypic resistance to all the antibiotics tested. Interestingly, we found negative correlations between slime production and phenotypic resistance to trimethoprim, kanamycin, and quinupristin/dalfopristin (Figure 1).

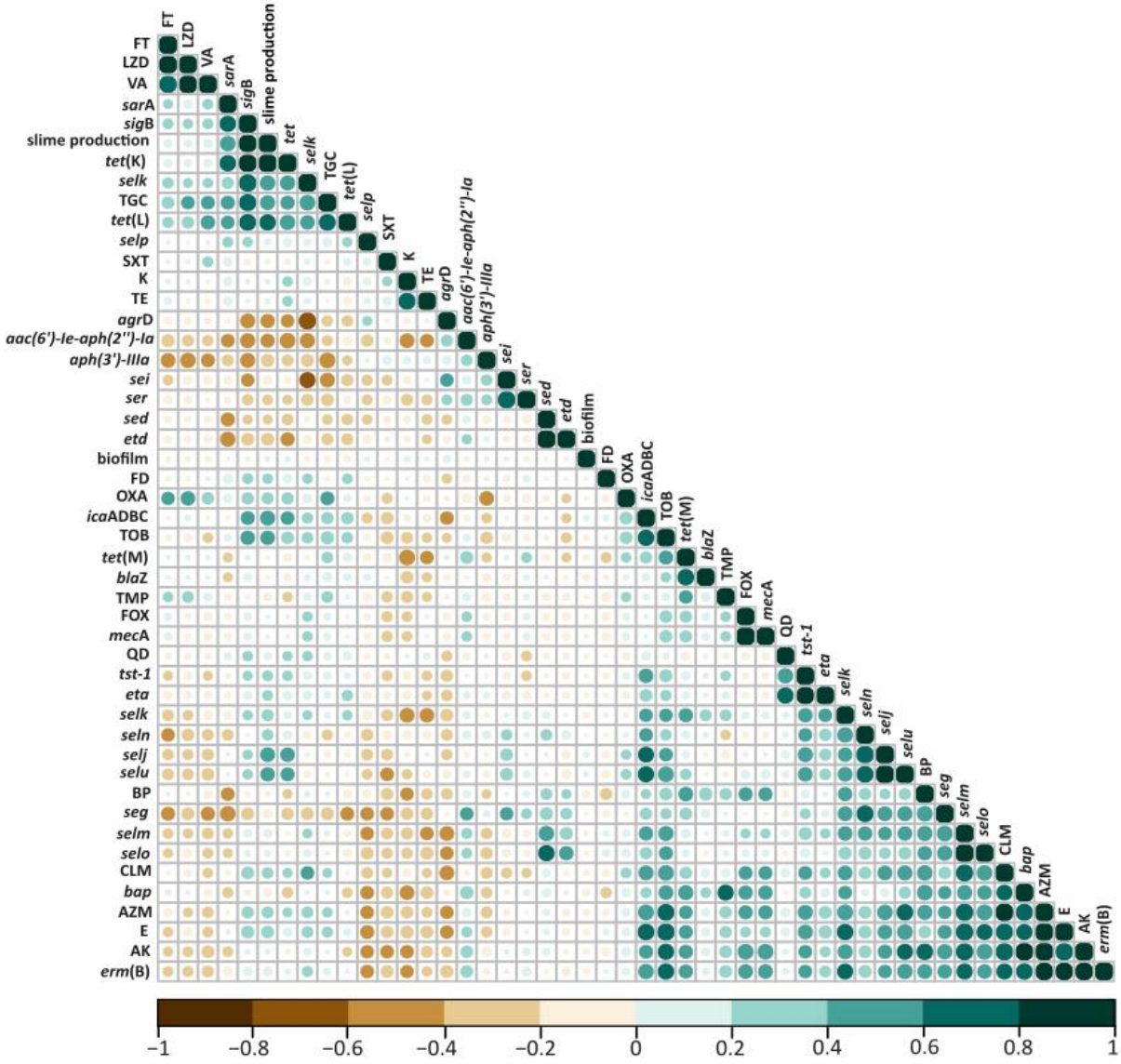



**Figure 1.** Correlation matrix indicating all correlations between pairs of genetic or phenotypic determinants (resistance phenotypes).

## 3. Discussion

In the current study, the occurrence, antibiotic resistance, and virulence of *S. aureus* isolated at different production stages of raw milk cheeses were tested. There are currently few studies focusing on assessing the whole production chain of cheeses from unpasteurized milk [4,37,38]. Most studies have focused on the evaluation of *S. aureus* strains isolated from raw milk from cows with clinical or subclinical mastitis or only in finished products [24,29,39–42]. Nevertheless, estimation of the prevalence and genetic determinants of *S. aureus* is always important to facilitate the implementation of rational mitigation strategies and to avoid the dissemination of this pathogen through the food chain [43].

Compared to the results obtained for the presence of *S. aureus* in unpasteurized milk cheeses (finished products), previous studies reported percentages of samples in which *S. aureus* was found as follows: 56.4% (44/78) in Mexico [44], 87.3% (62/71) in Serbia [45], and 45% (31/69) in Norway [46]. The different results regarding the prevalence of *S. aureus* in different countries may be related to differences in cheese production worldwide. It is assumed that the presence of *S. aureus* in farmstead cheeses may be due to the low quality of raw material, resulting from poor hygienic conditions during production and inadequate

storage conditions, unclean hands of workers, and/or failure to follow basic GMP and GHP principles.

In this study, we observed that among the tested *S. aureus* strains, resistance to β-lactams (which include penicillin) was the most frequent. These observations are in line with reports by other authors, who have reported in recent years on the worldwide increase in *S. aureus* resistance to β-lactam antibiotics [9,41,47,48]. The high percentage of penicillin-resistant strains may be due to the frequency of use of this antibiotic in the treatment of cattle infections in Poland [4].

Tetracyclines are also commonly used to treat infections in cattle [49]. In the present study, a lower incidence of tetracycline resistance was observed (19/93 (20.4%)) compared to studies by other authors, which showed resistance to this antibiotic in *S. aureus* strains ranging from 19–100% [50,51]. Another antibiotic against which the tested strains showed resistance was erythromycin (21/93 (22.6%)), which is a macrolide antibiotic. Macrolides are commonly used to treat mastitis in cattle. Erythromycin is also used to treat staphylococcal infections in patients allergic to penicillin [41].

Nevertheless, compared to the present results, studies by other authors have shown a higher percentage of strains resistant to this antibiotic (22.4% and 44%) [41,52]. The *erm* genes confer cross-resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins B [53]. Antimicrobial resistance results obtained in this study correlate with antibiotics that are used to treat cattle infections in Poland. According to a report by the European Medicines Agency, in Poland in 2020, tetracyclines, penicillins, and macrolides represented over 70% of total veterinary antimicrobial agents sold [54].

The study showed that a small percentage (21/93 (22.6%)) of the tested isolates were multidrug-resistant (resistant to at least three antibiotics from different chemical classes of antibiotic), with 19.4% of isolates having a MAR index of >0.20. Nevertheless, it is worth emphasizing the need for constant prevention of excessive use of antibiotics in animal treatment, and it is necessary to monitor the prevalence of antibiotic-resistant foodborne pathogens, including *S. aureus*. It is worth noting that the high prevalence of *S. aureus* as carriers of the *blaZ* gene and the identification of methicillin-resistant strains among isolates from cheese pose a threat to the health of consumers of such products. It is important from a public health perspective to continuously monitor *S. aureus* in milk and milk products and their production environment. Continuous monitoring will allow the provision of measures for mitigating the public health threat associated with this resistant pathogen [55]. According to obtained results and findings showed by Ammar et al. [56], it is important to have comprehensive control measures during processing of handmade cheeses, and judicious application of antibiotics should be adopted to overcome the spread of ARM and minimalize the risk of human infection.

The ability to form biofilm is one of the hazards encountered not only in healthcare facilities but also in the food industry. Pathogenic bacteria are able to form biofilms inside processing equipment, leading to food spoilage and subsequent health risks to consumers [57]. Biofilm formation by *Staphylococcus* spp. is an evolutionary advantage for this microorganism, as bacterial cells are resistant to adverse environmental conditions such as antimicrobial and sanitizing agents, desiccation, and UV radiation [58].

The obtained results showed that 59/93 (63.4%) of the isolates were able to produce biofilm. A similar percentage of strains capable of producing biofilm was shown in a study by Castro et al. (2020) [58], who classified 69.7% of isolates as biofilm-forming. The main factor responsible for biofilm production among *S. aureus* is considered to be PIA, which, together with other polymers such as teichoic acids, proteins, and extracellular DNA (eDNA), constitutes the main part of the extracellular matrix of biofilm-forming *S. aureus.* Genes contained in the *ica* locus are responsible for PIA biosynthesis and include N-acetylglucosamine transferase (*ica*A and *ica*D), PIA deacetylase (*ica*B), and PIA exporter (*ica*C) [59]. The presence of this operon was demonstrated among 26.9% of the tested isolates. According to the literature, in addition to the phenotypic ability to produce biofilm and the presence of the *ica* operon, this phenomenon may be related to the presence of

other proteins (PIA-independent) that are independent of the *ica* operon [60]. In this regard, it is necessary to determine the occurrence of other genes that were responsible for biofilm formation and apply them to the study of biofilm formation on dairy farm equipment and utensils [29].

The current study found that the majority of examined isolates carried genes encoding for some of the studied enterotoxins. In the literature, other authors point to the co-occurrence of *sed* and *selj* genes due to the common location of these genes on the same plasmid [4,61], which was not confirmed by the results of the present study. However, Jorgensen et al. [62] showed that more than 50% of *S. aureus* strains isolated from cow's milk and 14.7% isolated from different stages of cheese production possessed enterotoxin genes, but only *seg* and *sei* markers were identified.

## 4. Materials and Methods

### *4.1. Sample Collection*

A total of 180 samples from various stages of artisanal cheese production from unpasteurized milk were collected from farms in the northeastern and southern parts of Poland. The samples were collected along the cheese production chain and included: raw milk, semi-finished products (heated milk, curd, and formed cheese), final products, and swabs from the production environment (from food and non-food contact surfaces).

The following samples were collected from cheese production stages: 18 of raw milk, 72 of semi-finished products (heated milk, n = 18; curd, n = 18; whey, n = 18; brine, n = 18), 18 of final products, and 72 swabs from the production environment, i.e., swabs from: tank (n = 18), jar (n = 18), form (n = 18), and sink (n = 18). Fluid and solid samples were collected at volumes of 100 mL or 100 g in sterile plastic tubes. Swab samples were collected with sterile cotton swabs (Equimed, Cracow, Poland) that were moistened in sterile peptone water, rolled on the test surface, and placed in tubes with transport media. The samples were collected in sterile containers and transported immediately to the microbiological laboratory.

### *4.2. Isolation and Identification of S. aureus Isolates*

For isolation, Baird Parker agar (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) was used. After 48 h of incubation at 37 ± 1 °C, one colony with typical morphology for *S. aureus* (black and shiny with a thin white border and surrounded by a light area) was selected for further identification. Firstly, suspected bacterial colonies were subjected to conventional methods such as Gram-stain, catalase test, and coagulase test.

Next, identification was performed using MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) analysis with a Vitek MS instrument (bioMérieux, Marcy l'Etoile). Before the analysis, isolates were streaked on tryptic soy agar (TSA) (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at 37 ± 1 °C overnight. One colony was then applied to one spot of the test slide with an inoculating loop, covered with 1 µL of matrix solution (α-cyano-4-hydroxy- cinnamic acid) (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), and completely air-dried [63].

### *4.3. Antimicrobial Susceptibility Testing by Microdilution Broth Assay*

Antimicrobial susceptibility profiles for the *S. aureus* isolates were determined by microbroth dilution in accordance with ISO 20776-1 "Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of the performance of antimicrobial susceptibility test devices. Annex B: Solvents and diluents for making stock solutions of selected antimicrobial agents" [64] using 96-well bottom polystyrene plates.

The study used amikacin, tobramycin clarithromycin, vancomycin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany), tigecycline, tetracycline, linezolid, nitrofurantoin, oxacillin, benzylpenicillin, erythromycin, gentamycin, kanamycin, cefoxitin, azithromycin, quinupristin/dalfopristin, trimethoprim, trimethoprim/sulfamethoxazole, clindamycin, rifampicin, fusidic acid, and moxifloxacin, chloramphenicol (TOKU-E; Bellingham, WA,

USA). Stock antibiotic solutions were prepared using recommended solvents and diluents according to ISO 20776-1, Annex B: "Solvents and diluents for making stock solutions of selected antimicrobial agents" [1]. On each day of testing, stock antibiotic solutions were diluted according to ISO 20776-1, Annex C: "Preparation of working dilutions of antimicrobial agents for use in broth dilution susceptibility tests" [1] to appropriate starting concentrations for serial dilution in the Mueller–Hinton broth. The concentration applied to the plate was twice the target concentration. *S. aureus* isolates were plated on TSA (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated overnight. Next, single pure colonies from overnight culture were suspended in 0.9% saline solution to obtain turbidity equal to the McFarland 0.5 turbidity. Turbidity was checked using a McFarland densitometer DEN 1B, Bioscan (Bioscan, Riga, Latvia). Each 50 µL of antibiotic solutions and bacteria solutions was added to the well of each row. One set of wells was left blank as media controls and another as growth controls. The assay was performed in triplicate.

The 96-well plates (Promed®, Torreglia, Italy) were incubated at 35 ± 2 °C under aerobic conditions for 20 h. At the end of the incubation, the turbidity of the medium was observed. The lowest concentration at which no bacterial growth (medium turbidity) was observed is the MIC. Results were interpreted as susceptible, intermediate resistant, or resistant. Results were interpreted according to the criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines CLSI 2022 [65]. Results were read only when there was sufficient growth of the test organism (i.e., obvious button or definite turbidity in the positive growth control) and when there was no growth in the un-inoculated or negative growth control. The amount of growth in each well was compared with that in the positive growth control, and the MIC recorded was the lowest concentration of agent that completely inhibited visible growth. The antimicrobials, dilution ranges, and cut-off values used in the study are described in Table 5. *S. aureus* strain ATCC 25923 was used as a quality control.

The Multiple Antibiotic Resistance (MAR) index was calculated and interpreted as a/b, where "a" means the number of antibiotics to which the isolate was resistant, and "b" means the number of antibiotics for which the isolate was tested. The calculated formula is shown below [66]:

$$MAR_{index} = {}^{a}/_{b}$$

### *4.4. In Vitro Biofilm Production Analysis*

Biofilm production was tested using Congo red agar assay using the method described previously by Arciola [39]. The strains were cultured on TSA plates (Merck, Darmstadt, Germany) and supplemented with sucrose (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) and Congo red (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). Sucrose was added due to its characteristic of abundant exopolysaccharide synthesis among *Staphylococcus* spp. Based on colony appearance, strains were classified as slime-forming (black colonies) and non-slime-forming (bordeaux or pink colonies). Additionally, biofilm-producing ability was evaluating using the crystal violet assay method described previously by Kouidhi et al. [67].

### *4.5. Detection of Antibiotic Resistance, Enterotoxins, and Biofilm-Associated Genes among Isolates*

The occurrence of tested genes was evaluated using a PCR assay with the specific primers and PCR reaction conditions as described in Supplementary Table S1. For all isolates, we tested for the presence of the following antibiotic resistance genes responsible for resistance to cefoxitin: *mec*A [68], and *mec*C [69]; tetracyclines: *tet*M, *tet*K, and *tet*L [70,71]; macrolides and lincosamides: *msr*(A/B), *erm*A, *erm*B, and *erm*C [72]; β-lactams: *bla*Z [73]; and aminoglycosides: *aac(6′)-Ie-aph(2″)-Ia* [74] and *aph(2″)-Ic* [75].

**Table 5.** Antimicrobials, dilution ranges, and cut-off values used for minimum inhibitory concentration (MIC) determination in *S. aureus*.

| Antimicrobial Class | Antimicrobials Agent | Dilution Range (mg/L) | Cut-Off Values (mg/L); Resistant > R |
|---|---|---|---|
| **Aminoglycosides** | Amikacin (AK) | 0.25–128 | 16 |
| | Tobramycin (TOB) | 0.063–16 | 2 |
| | Gentamycin (CN) | 1–4 | 2 |
| | Kanamycin (K) | 0.25–128 | 16 |
| **Cephalosporins** | Cefoxitin (FOX) | 1–32 | 4 |
| **Macrolides** | Azithromycin (AZM) | 0.25–16 | 2 |
| | Clarithromycin (CLM) | 0.063–16 | 4 |
| | Erythromycin (E) | 0.125–16 | 1 |
| **β-lactams** | Benzylpenicillin (BP) | 0.063–8 | 0.125 |
| | Oxacillin (OXA) | 0.063–16 | 2 |
| **Oxazolidinones** | Linezolid (LZD) | 0.5–16 | 4 |
| **Nitrofurantoins** | Nitrofurantoin (FT) | 2–128 | 64 |
| **Tetracyclines** | Tetracycline (TE) | 0.063–32 | 2 |
| | Tigecycline (TGC) | 0.016–8 | 0.5 |
| **Sulfonamides** | Trimethoprim (TMP) | 0.125–32 | 2 |
| | Trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT) | 0.125:2.375–32:608 | 2 |
| **Glycopeptides** | Vancomycin (VA) | 0.25–64 | 2 |
| **Streptogramins** | Quinupristin/dalfopristin (QD) | 0.125–8 | 2 |
| **Lincosamides** | Clindamycin (DA) | 0.031–32 | 2 |
| **Rifamycins** | Rifampicin (RD) | 0.002–8 | 0.06 |
| **Steroidal** | Fusidic acid (FD) | 0.5–4 | 1 |
| **Fluoroquinolones** | Moxifloxacin (MXF) | 0.004–8 | 0.25 |
| **Phenicols** | Chloramphenicol (C) | 2–32 | 8 |

Genetic determinants responsible for the ability to form biofilm (*ica*ABCD, *eno*, *bap*, *agr*D, *sar*A, and *sig*B) were identified as described previously [76–79].

Among isolated strains, genes coding classical enterotoxins, enterotoxin-like toxins, exfoliative toxins (*eta* and *etd*), and shock syndrome toxins (*tstt-1*) were evaluated as described previously [80].

All PCR amplicons were electrophoresed on 1.5% (*w*/*v*) agarose (Agarose Basica LE) in 1× TBE (Tris-borate-EDTA) buffer stained with 0.5 µg/mL Midori green (ABO, Gdańsk, Poland) and visualized under ultraviolet light using the G-Box system (Syngene, Cambrige, UK).

### *4.6. Statistical Analyses*

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 8.0 (GRAPH PAD Software Inc, San Diego, CA, USA). To determine the relationship between phenotypic and genetic determinants, the chi-square Pearson test was used. All correlation analyses were calculated using Pearson correlation. The occurrence of genes was marked as "1" when the gene was present, and "0" when it was absent, in which case the results of the Pearson correlation are identical to the point–biserial correlation. Results were considered statistically significant at $p < 0.05$. The R statistical platform (https://www.r-project.org) (accessed on 13 September 2022) and RStudio program (https://rstudio.com/) (accessed on 13 September 2022) were used for large-scale analysis and data visualization.

## 5. Conclusions

In this study, it was found that artisanal cheese chain production might potentially lead to contamination of finished cheeses with multidrug-resistant and virulent *S. aureus*. The application of good manufacturing practices and standard sanitation operating procedures in the farmhouse industry must be stricter. Occurrence of antibiotic-resistant strains in the food processing chain implies the need to monitor *S. aureus* to identify patterns of antimicrobial susceptibility to elucidate antibiotic-resistance transmission routes through the food chain. In addition, the presence of enterotoxin genes among *S. aureus* may be a health concern for consumers of artisanal cheeses. Our results showed that it is necessary to follow up with hygienic measures to prevent or minimize the contamination of handmade products.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27196569/s1, Table S1. List of primer sequences used in PCR reactions. References [61,68,70–74,76–79,81,82] are cited in the Supplementary Materials.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.G. and W.C.-W.; methodology; J.G., W.C.-W. and A.Z.; validation, J.G.; investigation, J.G.; data curation, J.G. and W.C.-W.; writing—original draft preparation; J.G.; writing—review and editing, W.C.-W. and A.Z.; visualization, J.G.; supervision, W.C.-W. and A.Z.; project administration, J.G.; funding acquisition, J.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded in whole by the National Science Centre (Poland), grant number: 2021/41/N/NZ9/00918 (PRELUDIUM-20).

**Institutional Review Board Statement:** The samples used in the study were received in the laboratory from the cheese production farm owners for isolation and characterization of *S. aureus*. The sample collection procedure was not invasive; therefore, ethical permissions were not indicated. Verbal consent was obtained from the farms' owners for the samples under study.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The dataset used during this study is available from the author upon reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

**Sample Availability:** Not applicable.

## References

1. Jianqin, S.; Leiming, X.; Lu, X.; Yelland, G.W.; Ni, J.; Clarke, A.J. Effects of milk containing only A2 β casein versus milk containing both A1 and A2 β casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. *Nutr. J.* **2016**, *15*, 35. [CrossRef] [PubMed]
2. Bórawski, P.; Bórawski, M.B.; Parzonko, A.; Wicki, L.; Rokicki, T.; Perkowska, A.; Dunn, J.W. Development of organic milk production in Poland on the background of the EU. *Agriculture* **2021**, *11*, 323. [CrossRef]
3. Kawęcka, A.; Radkowska, I.; Sikora, J. Concentrations of selected bioactive components in traditional cheeses made from goat's, cow's and sheep's milk. *J. Elem.* **2020**, *25*, 431–442. [CrossRef]
4. Rola, J.G.; Czubkowska, A.; Korpysa-Dzirba, W.; Osek, J. Occurrence of Staphylococcus aureus on farms with small scale production of raw milk cheeses in poland. *Toxins* **2016**, *8*, 62. [CrossRef] [PubMed]
5. Haque, Z.F.; Sabuj, A.A.M.; Mahmud, M.M.; Pondit, A.; Islam, M.A.; Saha, S. Characterization of Staphylococcus aureus from Milk and Dairy Products Sold in Some Local Markets of Mymensingh District of Bangladesh. *J. Nutr. Food Sci.* **2018**, *8*, 1000743. [CrossRef]
6. Martínez-Vasallo, A.; Ribot-Enríquez, A.; Riverón-Alemán, Y.; Remón-Díaz, D.; Martínez-García, Y.A.; Jacsens, L.; Uyttendaele, M. Staphylococcus aureus in the production chain of artisan fresh cheese Staphylococcus aureus en la cadena de producción de queso. *Rev. Salud Anim.* **2019**, *41*, 1–9.
7. Stessl, B.; Hein, I.; Wagner, M.E.-S. Staphylococcus aureus in the Dairy Chain. In *Rapid Detection, Characterization, and Enumeration of Foodborne Pathogens*; Hoorfar, J., Ed.; Wiley: New York, NY, USA, 2011; pp. 291–305. [CrossRef]

8. Kümmel, J.; Stessl, B.; Gonano, M.; Walcher, G.; Bereuter, O.; Fricker, M.; Grunert, T.; Wagner, M.; Ehling-Schulz, M. Staphylococcus aureus entrance into the Dairy Chain: Tracking *S. aureus* from dairy cow to cheese. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1603. [CrossRef]
9. Şanlıbaba, P. Prevalence, antibiotic resistance, and enterotoxin production of Staphylococcus aureus isolated from retail raw beef, sheep, and lamb meat in Turkey. *Int. J. Food Microbiol.* **2022**, *361*, 109461. [CrossRef]
10. Urmi, M.R.; Ansari, W.K.; Islam, M.S.; Sobur, M.A.; Rahman, M.; Rahman, M.T. Antibiotic Resistance Patterns of Staphylococcus Spp. Isolated from Fast Foods Sold in Different Restaurants of Mymensingh, Bangladesh. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* **2021**, *8*, 274–281. [CrossRef]
11. Loomba, P.; Taneja, J.; Mishra, B. Methicillin and vancomycin resistant *S. aureus* in hospitalized patients. *J. Glob. Infect. Dis.* **2010**, *2*, 275. [CrossRef]
12. Fisher, E.A.; Paterson, G.K. Prevalence and characterisation of methicillin-resistant staphylococci from bovine bulk tank milk in England and Wales. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2020**, *22*, 139–144. [CrossRef] [PubMed]
13. Founou, L.L.; Founou, R.C.; Essack, S.Y.; Djoko, C.F. Mannitol-fermenting methicillin-resistant staphylococci (MRS) in pig abattoirs in Cameroon and South Africa: A serious food safety threat. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *285*, 50–60. [CrossRef] [PubMed]
14. Fetsch, A.; Etter, D.; Johler, S. Livestock-Associated Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus—Current Situation and Impact From a One Health Perspective. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* **2021**, *8*, 103–113. [CrossRef]
15. Song, J.W.; Yang, S.J.; Shin, S.; Seo, K.S.; Ho Park, Y.; Kun, A.; Park, T. Genotypic and Phenotypic Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolated from Bovine Mastitic Milk in Korea. *J. Food Prot.* **2016**, *79*, 1725–1732. [CrossRef]
16. Tenhagen, B.-A.; Alt, K.; Pfefferkorn, B.; Wiehle, L.; Käsbohrer, A.; Fetsch, A. Short communication: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in conventional and organic dairy herds in Germany. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 3380–3386. [CrossRef]
17. Ou, Q.; Zhou, J.; Lin, D.; Bai, C.; Zhang, T.; Lin, J.; Zheng, H.; Wang, X.; Ye, J.; Ye, X.; et al. A large meta-analysis of the global prevalence rates of *S. aureus* and MRSA contamination of milk. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58*, 2213–2228. [CrossRef]
18. De Oliveira, A.P.D.; da Costa, M.M.; Nogueira, D.M.; Dias, F.S. Characterisation of Staphylococcus aureus strains from milk and goat cheese and evaluation of their inhibition by gallic acid, nisin and velame of the Brazilian caatinga. *Int. J. Dairy Technol.* **2020**, *73*, 345–356. [CrossRef]
19. Abd El-Hamid, M.I.; Bendary, M.M.; Merwad, A.M.A.; Elsohaby, I.; Mohammad Ghaith, D.; Alshareef, W.A. What is behind phylogenetic analysis of hospital-, community- and livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus? *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**, *66*, 1506–1517. [CrossRef]
20. Abd El-Hamid, M.I.; Sewid, A.H.; Samir, M.; H Hegazy, W.A.; Bahnass, M.M.; Mosbah, R.A.; Ghaith, D.M.; Khalifa, E.; Ramadan, H.; Alshareef, W.A.; et al. Clonal Diversity and Epidemiological Characteristics of ST239-MRSA Strains. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 241. [CrossRef]
21. Da Silva Cândido, T.J.; da Silva, A.C.; de Matos, L.G.; da Silva do Nascimento, M.; Camargo, C.H.; Cobo Zanella, R.; Mores Rall, V.L.; Cirone Silva, N.C. Enterotoxigenic potential and molecular typing of Staphylococcus sp. isolated from organic and conventional fresh minas cheese in the state of São Paulo, Brazil. *Int. Dairy J.* **2020**, *102*, 104605. [CrossRef]
22. Avila-Novoa, M.G.; González-Gómez, J.P.; Guerrero-Medina, P.J.; Cardona-López, M.A.; Ibarra-Velazquez, L.M.; Velazquez-Suarez, N.Y.; Morales-del Río, J.A.; Gutiérrez-Lomelí, M. Staphylococcus aureus and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains isolated from dairy products: Relationship of ica-dependent/independent and components of biofilms produced in vitro. *Int. Dairy J.* **2021**, *119*, 105066. [CrossRef]
23. Gajewska, J.; Chajęcka-Wierzchowska, W. Biofilm formation ability and presence of adhesion genes among coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolates from raw cow's milk. *Pathogens* **2020**, *9*, 654. [CrossRef] [PubMed]
24. Alghizzi, M.; Shami, A. The prevalence of Staphylococcus aureus and methicillin resistant Staphylococcus aureus in milk and dairy products in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.* **2021**, *28*, 7098–7104. [CrossRef] [PubMed]
25. Papadopoulos, P.; Papadopoulos, T.; Angelidis, A.S.; Kotzamanidis, C.; Zdragas, A.; Papa, A.; Filioussis, G.; Sergelidis, D. Prevalence, antimicrobial susceptibility and characterization of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from dairy industries in north-central and north-eastern Greece. *Int. J. Food Microbiol.* **2019**, *291*, 35–41. [CrossRef] [PubMed]
26. Jakobsen, R.A.; Heggebø, R.; Sunde, E.B.; Skjervheim, M. Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes in Norwegian raw milk cheese production. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 492–496. [CrossRef] [PubMed]
27. Sri Prabakusuma, A.; Zhu, J.; Shi, Y.; Ma, Q.; Zhao, Q.; Yang, Z.; Xu, Y.; Huang, A. Prevalence and antimicrobial resistance profiling of Staphylococcus aureus isolated from traditional cheese in Yunnan, China. *3 Biotech* **2022**, *12*, 1. [CrossRef]
28. Dai, J.; Wu, S.; Huang, J.; Wu, Q.; Zhang, F.; Zhang, J.; Wang, J.; Ding, Y.; Zhang, S.; Yang, X.; et al. Prevalence and Characterization of Staphylococcus aureus Isolated from Pasteurized Milk in China. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 641. [CrossRef]
29. Cai, H.; Kou, X.; Ji, H.; Wang, X.; Wang, H.; Zhang, Y.; Lu, S.; Li, B.; Dong, J.; Wang, Q.; et al. Prevalence and characteristics of Staphylococcus aureus isolated from Kazak cheese in Xinjiang, China. *Food Control* **2021**, *123*, 107759. [CrossRef]
30. Wang, H.; Shen, J.; Zhu, C.; Ma, K.; Fang, M.; Li, B.; Wang, W.; Xue, T. Antibiotics Resistance and Virulence of Staphylococcus aureus Isolates Isolated from Raw Milk from Handmade Dairy Retail Stores in Hefei City, China. *Foods* **2022**, *11*, 2185. [CrossRef]
31. McMillan, K.; Moore, S.C.; McAuley, C.M.; Fegan, N.; Fox, E.M. Characterization of Staphylococcus aureus isolates from raw milk sources in Victoria, Australia. *BMC Microbiol.* **2016**, *16*, 169. [CrossRef]

32. Nhatsave, N.; Garrine, M.; Messa, A.; Massinga, A.J.; Cossa, A.; Vaz, R.; Ombi, A.; Zimba, T.F.; Alfredo, H.; Mandomando, I.; et al. Molecular characterization of staphylococcus aureus isolated from raw milk samples of dairy cows in manhiça district, southern mozambique. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1684. [CrossRef] [PubMed]
33. Kou, X.; Cai, H.; Huang, S.; Ni, Y.; Luo, B.; Qian, H.; Ji, H.; Wang, X. Prevalence and Characteristics of Staphylococcus aureus Isolated From Retail Raw Milk in Northern Xinjiang, China. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 705947. [CrossRef]
34. Hassani, S.; Moosavy, M.H.; Gharajalar, S.N.; Khatibi, S.A.; Hajibemani, A.; Barabadi, Z. High prevalence of antibiotic resistance in pathogenic foodborne bacteria isolated from bovine milk. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 3878. [CrossRef] [PubMed]
35. Rodriguez-Lazaro, D.; Lee, L.-H.; Stessl, B.; Ma, A.; Xu, J.; Wang, W.; Baloch, Z.; Jiang, T.; Zhang, C.; Peng, Z.; et al. Enterotoxigenicity and Antimicrobial Resistance of Staphylococcus aureus Isolated from Retail Food in China. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2256. [CrossRef]
36. Mroczkowska, A.; Żmudzki, J.; Marszałek, N.; Orczykowska-Kotyna, M.; Komorowska, I.; Nowak, A.; Grzesiak, A.; Czyżewska-Dors, E.; Dors, A.; Pejsak, Z.; et al. Livestock-associated Staphylococcus aureus on Polish pig farms. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170745. [CrossRef] [PubMed]
37. Johler, S.; Macori, G.; Bellio, A.; Acutis, P.L.; Gallina, S.; Decastelli, L. Short communication: Characterization of Staphylococcus aureus isolated along the raw milk cheese production process in artisan dairies in Italy. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 2915–2920. [CrossRef]
38. Papadopoulos, P.; Papadopoulos, T.; Angelidis, A.S.; Boukouvala, E.; Zdragas, A.; Papa, A.; Hadjichristodoulou, C.; Sergelidis, D. Prevalence of Staphylococcus aureus and of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece. *Food Microbiol.* **2018**, *69*, 43–50. [CrossRef]
39. Zaatout, N.; Ayachi, A.; Kecha, M.; Kadlec, K. Identification of staphylococci causing mastitis in dairy cattle from Algeria and characterization of Staphylococcus aureus. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *127*, 1305–1314. [CrossRef]
40. Brahma, U.; Suresh, A.; Murthy, S.; Bhandari, V.; Sharma, P. Antibiotic Resistance and Molecular Profiling of the Clinical Isolates of Staphylococcus aureus Causing Bovine Mastitis from India. *Microorganisms* **2022**, *10*, 833. [CrossRef]
41. Kayili, E.; Sanlibaba, P. Prevalence, characterization and antibiotic resistance of Staphylococcus aureus isolated from traditional cheeses in Turkey. *Int. J. Food Prop.* **2020**, *23*, 1441–1451. [CrossRef]
42. Wang, W.; Lin, X.; Jiang, T.; Peng, Z.; Xu, J.; Yi, L.; Li, F.; Fanning, S.; Baloch, Z. Prevalence and characterization of Staphylococcus aureus cultured from raw milk taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1123. [CrossRef] [PubMed]
43. Oliveira, R.; Pinho, E.; Almeida, G.; Azevedo, N.F.; Almeida, C. Prevalence and Diversity of Staphylococcus aureus and Staphylococcal Enterotoxins in Raw Milk From Northern Portugal. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 703. [CrossRef]
44. Adame-g, R.; Toribio-jimenez, J.; Vences-velazquez, A.; Rodr, E.; Cristina, M.; Dionisio, S.; Ramirez-peralta, A. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Artisanal Cheeses in México. *Int. J. Microbiol.* **2018**, *2018*, 8760357.
45. Bulajic, S.; Colovic, S.; Misic, D.; Djordjevic, J.; Savic-Radovanovic, R.; Asanin, J.; Ledina, T. Enterotoxin production and antimicrobial susceptibility in Staphylococci isolated from traditional raw milk cheeses in Serbia. *J. Environ. Sci. Health Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* **2017**, *52*, 864–870. [CrossRef] [PubMed]
46. Mehli, L.; Hoel, S.; Thomassen, G.M.B.; Jakobsen, A.N.; Karlsen, H. The prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance of Staphylococcus aureus in milk, whey, and cheese from artisan farm dairies. *Int. Dairy J.* **2017**, *65*, 20–27. [CrossRef]
47. Panchal, V.V.; Griffiths, C.; Mosaei, H.; Bilyk, B.; Sutton, J.A.F.; Carnell, O.T.; Hornby, D.P.; Green, J.; Hobbs, J.K.; Kelley, W.L.; et al. Evolving MRSA: High-level β-lactam resistance in Staphylococcus aureus is associated with RNA polymerase alterations and fine tuning of gene expression. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1008672. [CrossRef]
48. Aragão, B.B.; Trajano, S.C.; Silva, J.G.; Silva, B.P.; Oliveira, R.P.; Junior, J.W.P.; Peixoto, R.M.; Mota, R.A. Short communication: High frequency of β-lactam-resistant Staphylococcus aureus in artisanal coalho cheese made from goat milk produced in northeastern Brazil. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 6923–6927. [CrossRef]
49. Liu, H.; Li, S.; Meng, L.; Dong, L.; Zhao, S.; Lan, X.; Wang, J.; Zheng, N. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of Staphylococcus aureus isolated from dairy herds in northern China. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 8796–8803. [CrossRef]
50. Alves, V.F.; Niño-Arias, F.C.; Pitondo-Silva, A.; de Araújo Frazilio, D.; de Oliveira Gonçalves, L.; Chaul Toubas, L.; Sapateiro Torres, I.M.; Oxaran, V.; Dittmann, K.K.; De Martinis, E.C.P. Molecular characterisation of Staphylococcus aureus from some artisanal Brazilian dairies. *Int. Dairy J.* **2018**, *85*, 247–253. [CrossRef]
51. Massawe, H.F.; Mdegela, R.H.; Kurwijila, L.R. Antibiotic resistance of Staphylococcus aureus isolates from milk produced by smallholder dairy farmers in Mbeya Region, Tanzania. *Int. J. One Health* **2019**, *5*, 31–37. [CrossRef]
52. Arefi, F.; Mohsenzadeh, M.; Razmyar, J. Isolation, antimicrobial susceptibility and mecA gene analysis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Iranian white cheeses. *Iran. J. Vet. Res.* **2014**, *15*, 127–131. [CrossRef]
53. Silva, V.; Alfarela, C.; Caniça, M.; Manageiro, V.; Nóvoa, M.; Leiva, B.; Kress, M.; Capelo, J.L.; Poeta, P.; Igrejas, G. A One Health Approach Molecular Analysis of Staphylococcus aureus Reveals Distinct Lineages in Isolates from Miranda Donkeys (Equus asinus) and Their Handlers. *Antibiotics* **2022**, *11*, 374. [CrossRef] [PubMed]
54. *Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 31 European Countries in 2017 (EMA/294674/2019)*; European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2019; ISBN 9789291550685.

55. Aliyu, Y.; Reuben, R.C.; Abdullahi, I.O.; Olayinka, B.O.; Abdullahi, M.S. A systematic review on the prevalence of multidrug-resistant Staphylococcus aureus from milk and milk products in Nigeria. *PAMJ One Health* **2022**, *7*, 15. [CrossRef]
56. Ammar, A.M.; Attia, A.M.; Abd El-Hamid, M.I.; El-Shorbagy, I.M.; Abd El-Kader, S.A. Genetic basis of resistance waves among methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates recovered from milk and meat products in Egypt. *Cell. Mol. Biol.* **2016**, *62*, 7–15. [CrossRef]
57. Galié, S.; García-Gutiérrez, C.; Miguélez, E.M.; Villar, C.J.; Lombó, F. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 898. [CrossRef]
58. Castro, R.D.; Pedroso, S.H.S.P.; Sandes, S.H.C.; Silva, G.O.; Luiz, K.C.M.; Dias, R.S.; Filho, R.A.T.; Figueiredo, H.C.P.; Santos, S.G.; Nunes, A.C.; et al. Virulence factors and antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus isolated from the production process of Minas artisanal cheese from the region of Campo das Vertentes, Brazil. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 2098–2110. [CrossRef]
59. Sugimoto, S.; Sato, F.; Miyakawa, R.; Chiba, A.; Onodera, S.; Hori, S.; Mizunoe, Y. Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2254. [CrossRef]
60. Kirmusaoglu, S. Staphylococcal Biofilms: Pathogenicity, Mechanism and Regulation of Biofilm Formation by Quorum-Sensing System and Antibiotic Resistance Mechanisms of Biofilm-Embedded Microorganisms. In *Microbial Biofilms—Importance and Applications*; InTechOpen: London, UK, 2016; pp. 189–209. [CrossRef]
61. Zhang, S.; Iandolo, J.J.; Stewart, G.C. The enterotoxin D plasmid of Staphylococcus aureus encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *168*, 227–233. [CrossRef]
62. Jørgensen, H.J.; Mørk, T.; Rørvik, L.M. The occurrence of Staphylococcus aureus on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 3810–3817. [CrossRef]
63. Zakrzewski, A.J.; Zarzecka, U.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. A Comparison of Methods for Identifying Enterobacterales Isolates from Fish and Prawns. *Pathogens* **2022**, *11*, 410. [CrossRef]
64. *ISO 20776-2:2007*; Part 2: Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices. ISO: Geneva, Switzerland, 2007.
65. *CLSI M100-ED29: 2021 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 30th ed.; CLSI: Wayne, PA, USA, 2020; Volume 40, ISBN 9781684400324.
66. Adzitey, F.; Yussif, S.; Ayamga, R.; Zuberu, S.; Addy, F.; Adu-Bonsu, G.; Huda, N.; Kobun, R. Antimicrobial Susceptibility and Molecular Characterization of Escherichia coli Recovered from Milk and Related Samples. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1335. [CrossRef] [PubMed]
67. Kouidhi, B.; Zmantar, T.; Hentati, H.; Bakhrouf, A. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in Staphylococcus aureus associated to dental caries. *Microb. Pathog.* **2010**, *49*, 14–22. [CrossRef] [PubMed]
68. Barski, P.; Piechowicz, L.; Galiński, J.; Kur, J. Rapid assay for detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus using multiplex PCR. *Mol. Cell. Probes* **1996**, *10*, 471–475. [CrossRef]
69. Małyszko, I.; Schwarz, S.; Hauschild, T. Detection of a new mecC allotype, mecC2, in methicillin-resistant Staphylococcus saprophyticus. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 2003–2005. [CrossRef]
70. Roberts, M.C. Epidemiology of tetracycline-resistance determinants. *Trends Microbiol.* **1994**, *2*, 353–357. [CrossRef]
71. Gevers, D.; Danielsen, M.; Huys, G.; Swings, J. Molecular characterization of tet(M) genes in Lactobacillus isolates from different types of fermented dry sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 1270–1275. [CrossRef]
72. Silva, V.; Caniça, M.; Ferreira, E.; Vieira-Pinto, M.; Saraiva, C.; Pereira, J.E.; Capelo, J.L.; Igrejas, G.; Poeta, P. Multidrug-Resistant Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci in Healthy Poultry Slaughtered for Human Consumption. *Antibiotics* **2022**, *11*, 365. [CrossRef]
73. Kaase, M.; Lenga, S.; Friedrich, S.; Szabados, F.; Sakinc, T.; Kleine, B.; Gatermann, S.G. Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in Staphylococcus aureus. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14*, 614–616. [CrossRef]
74. Padmasini, E.; Padmaraj, R.; Ramesh, S.S. High level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistant genes among clinical isolates of Enterococcus species in Chennai, India. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 329157. [CrossRef]
75. Kobayashi, N.; Mahbub Alam, M.; Nishimoto, Y.; Urasawa, S.; Uehara, N.; Watanabe, N. Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium and Enterococcus avium. *Epidemiol. Infect.* **2001**, *126*, 197–204. [CrossRef]
76. Arciola, C.R.; Baldassarri, L.; Montanaro, L. Presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 2151–2156. [CrossRef] [PubMed]
77. Heilmann, C.; Thumm, G.; Chhatwal, G.S.; Hartleib, J.; Uekötter, A.; Peters, G. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from Staphylococcus epidermidis. *Microbiology* **2003**, *149*, 2769–2778. [CrossRef] [PubMed]
78. Tristan, A.; Ying, L.; Bes, M.; Etienne, J.; Vandenesch, F.; Lina, G. Use of multiplex PCR to identify Staphylococcus aureus adhesins involved in human hematogenous infections. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 4465–4467. [CrossRef] [PubMed]
79. Kim, B.R.; Bae, Y.M.; Lee, S.Y. Effect of Environmental Conditions on Biofilm Formation and Related Characteristics of Staphylococcus Aureus. *J. Food Saf.* **2016**, *36*, 412–422. [CrossRef]

80. Chajęcka-Wierzchowska, W.; Gajewska, J.; Wiśniewski, P.; Zadernowska, A. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci from ready-to-eat food. *Pathogens* **2020**, *9*, 734. [CrossRef]
81. Jarraud, S.; Mougel, C.; Thioulouse, J.; Lina, G.; Ne Meugnier, H.; Forey, F.; Nesme, X.; Etienne, J.; Vandenesch, F. Relationships between Staphylococcus aureus Genetic Background, Virulence Factors, agr Groups (Alleles), and Human Disease. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 631–641. [CrossRef]
82. Holtfreter, S.; Grumann, D.; Schmudde, M.; Nguyen, H.T.T.; Eichler, P.; Strommenger, B.; Kopron, K.; Kolata, J.; Giedrys-Kalemba, S.; Steinmetz, I.; et al. Clonal Distribution of Superantigen Genes in Clinical Staphylococcus aureus Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 2669–2680. [CrossRef]

Olsztyn, , 17.05.2024
(miejscowość, data)

mgr inż. Joanna Gajewska
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia żywności i żywienia
(dyscyplina naukowa)

**Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny**
**Technologia żywności i żywienia**
**Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**
**prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak**

**OŚWIADCZENIE**
**autora rozprawy doktorskiej**

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:
Gajewska J.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A., 2022, *Occurrence and Characteristics of Staphylococcus aureus Strains along the Production Chain of Raw Milk Cheeses in Poland*. Molecules, 27, 6569. https://doi.org/10.3390/molecules27196569

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, walidacji metod, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników (tabel rycin) i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny.

Gajewska Joanna
.....
(podpis kandydata)

Olsztyn, 17.05.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

**Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny**
**Technologia żywności i żywienia**
**Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**
**prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak**

**OŚWIADCZENIE**
**współautora**

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:
Gajewska J.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A., 2022, *Occurrence and Characteristics of Staphylococcus aureus Strains along the Production Chain of Raw Milk Cheeses in Poland*. Molecules, 27, 6569. https://doi.org/10.3390/molecules27196569
mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, współudziale w interpretacji wyników oraz korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Joannę Gajewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Joanny Gajewskiej polegający na: na udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, walidacji metod, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników (tabel rycin) i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (pełnienie funkcji autora korespondencyjnego).

Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
podpis

Olsztyn, 17.05.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

**Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny**
**Technologia żywności i żywienia**
**Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**
**prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak**

**OŚWIADCZENIE**
**współautora**

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:
Gajewska J.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A., 2022, *Occurrence and Characteristics of Staphylococcus aureus Strains along the Production Chain of Raw Milk Cheeses in Poland*. Molecules, 27, 6569. https://doi.org/10.3390/molecules27196569
mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w opracowaniu metodologii badań, korekcie manuskryptu, opiece merytorycznej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Joannę Gajewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Joanny Gajewskiej polegający na: na udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, walidacji metod, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników (tabel rycin) i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (pełnienie funkcji autora korespondencyjnego).

Anna Zadernowska
.....
podpis

**ZAŁĄCZNIK 3**

**Gajewska, J.,** Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Genomic characterization of the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from the cheese chain production. *International Dairy Journal*, 105774. https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2023.105774

International Dairy Journal 147 (2023) 105774



Contents lists available at ScienceDirect

International Dairy Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/idairyj



# Genomic characterisation of the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from the cheese chain production



Joanna Gajewska*, Wioleta Chajęcka-Wierzchowska, Anna Zadernowska

*Department of Industrial and Food Microbiology, Faculty of Food Science, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Plac Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn, Poland*

ARTICLE INFO

*Article history:*
Received 13 April 2023
Received in revised form
2 August 2023
Accepted 3 August 2023
Available online 13 August 2023

ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is one of the major foodborne pathogens contaminating milk and milk products. Isolates recovered from different stages in the cheese production chain and food processing environment (n = 16) in Poland were characterised using whole genome-sequencing and bioinformatic analyses. Most strains belonged to multi-locus sequence type (MLST) ST109 (6/37.5%) and ST130 (3/18.8%). *Spa*-typing of *S. aureus* isolates revealed six different spa types (t693, t91, t3218, t571, t359, t1109, t2). At least one gene belonging to the groups of adherence, exoenzymes, secretion machinery factors or toxin genes was detected among all strains. Also, some antimicrobial resistance genes (e.g., *nor*A, *nor*C, *bla*Z, *erm*A) were identified in tested strains. Molecular characterisation and comparison of isolates with strains responsible for food poisoning worldwide showed the potential pathogenicity of the tested *S. aureus* strains, suggesting that hygiene should be improved during food production practices to control the transmission of foodborne *S. aureus*.

© 2023 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## 1. Introduction

*Staphylococcus aureus* is a major food-poisoning pathogen that is a common contaminant in the dairy industry worldwide (Dittmann et al., 2017). According to literature data, raw milk and raw milk products are frequently contaminated with different types of *S. aureus* around the world (Dai et al., 2019). In addition, in the dairy industry, *S. aureus* can be introduced at almost every step of production (Dittmann et al., 2017). It is reported that food has been a vehicle for the spread of pathogens that cause foodborne illnesses due to contamination during the handling process from the farm to the table (Samutela et al., 2021).

*S. aureus* produces a variety of toxins and invasive enzymes, such as staphylococcal enterotoxins (SEs), haemolysins, leucocidin, toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), exfoliative A toxins (Spanu et al., 2013). It is suggested that each of the virulence factors may have an impact on contributing to enhanced virulence of isolates. It is worth noting that enterotoxin-producing strains are responsible for food poisoning, which is related to the consumption of food containing an appropriate amount of staphylococcal enterotoxins (Macori et al., 2020).

The pathogenicity of *S. aureus* largely depends on its ability to form a biofilm, which is determined by a number of genetic factors (Hait et al., 2021). *S. aureus* can express several cell-wall-associated adhesins specific for recognising matrix proteins; these adhesins are referred to as MSCRAMMs (microbial surface components recognising adhesive matrix molecules) (Pöhlmann et al., 2000).

Virulence factors among *S. aureus* were encoded in the mobile genetic elements (MGEs), which can be categorised into prophages, plasmids, transposons, insertion sequences and pathogenicity islands (Macori et al., 2020; Malachowa & Deleo, 2010; Partridge, Kwong, Firth, & Jensen, 2018). It is worth emphasising that the presence of virulence factors on mobile genetic elements is extremely important since horizontal gene transfer (HGT) is the most important mechanism in the food chain for the exchange of antimicrobial resistance and virulence determinants in bacterial populations (Neyaz, Rajagopal, Wells, & Fakhr, 2020).

Conventional methods of bacterial typing, including *spa* typing and multi-locus sequence typing (MLST), are limited by their low-resolution power and inability to discriminate closely related bacterial strains (Soliman et al., 2020). Nowadays, thanks to next-generation sequencing (NGS), it is possible to predict virulence factors and antimicrobial resistance (Yin, Kwoh, & Zheng, 2019).

* Corresponding author.
*E-mail address:* joanna.gajewska@uwm.edu.pl (J. Gajewska).

https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105774
0958-6946/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Thanks to whole genomic sequencing, it is possible to compare genomes of microorganisms associated with foodborne outbreaks and human diseases (Allard et al., 2018). The ability of *S. aureus* to spread worldwide and cause outbreaks in both hospitals and the community has fostered the study of its global epidemiology (Ravenni et al., 2018), which is important in understanding the pathogenesis of *S. aureus* infection (Dabul & Camargo, 2014).

Therefore, the aim of this study was the molecular characterisation of *S. aureus* isolated from different stages of the cheese production chain in Poland using NGS and bioinformatic analysis. The study also compared isolates with global data on food poisoning cases related to *S. aureus*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains

A total of 16 *S. aureus* were selected for the whole genome sequencing and genomic analyses. Strains were isolated from different stages of the cheese production chain, including ready-to-eat cheeses and the processing environment as described previously (Gajewska, Chajęcka-Wierzchowska, & Zadernowska, 2022) and presented in this work in Table 2.

### 2.2. DNA isolation

For genomic DNA extraction, bacterial strains were streaked on tryptic soy agar (Merck, Germany) and incubated at 35 ± 2 °C for 24 h. Genomic DNA extraction was provided using the Genomic Mini AX Bacteria+ (A&A Biotechnology, Poland), according to the manufacturer's instructions. The DNA concentration was measured in a DeNovix DS-11 spectrophotometer (DeNovix Inc., USA).

### 2.3. Library preparation and sequencing

The isolated DNA samples were sent to an external company Genomed S.A (Warsaw, Poland) for sequencing. Genomic DNA was fragmented mechanically using a Focused-ultrasonicator Covaris E220. The DNA library was prepared by the NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs, E7645L) according to the manufacturer's instructions. The DNA was sequenced on MiSeq Illumina® in PE 2 × 300 cycles using a MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle) MS-102-3003. Readings from MiSeq were filtered with Cutadapt version 3.0. Quality control of the results was performed using the FastQC program. Denovo folding was performed by Spades version 3.14.1. The quality and completeness of the genome assemblies were assessed by testing the contamination with ContEst16S (Lee et al., 2017) and CheckM tools, which is available from the homepage https://kbase.us.

### 2.4. MLST characterisation

The MLST analysis of all the strains was conducted with the following scheme, which comprises seven housekeeping genes: *arc*C, *aro*E, *glp*F, *gmk*, *pta*, *tpi*, and *yqi* (Ullah et al., 2021). The obtained result was compared with the PubMLST database, and each locus was converted into a single numerical value to determine the MLST sequence type (ST) of the strains. MLST and cgMLST profile comparisons were conducted using Bionumerics 7.6 software (Applied Maths, Belgium) with a single linkage algorithm, ignoring missing values in pairwise comparisons.

### 2.5. Identification of virulence genes and mobile genetic elements

To detect virulence genes, *spa* type and mobile genetic elements among isolates, online tools available from the homepage http://genomicepidemiology.org/VirulenceFinder 2.0 (Joensen et al., 2014), spaTyper 1.0 (Bartels et al., 2014), PlasmidFinder 2.1 (Carattoli et al., 2014) and MobileElementFinder 1.0.3 (Johansson et al., 2021) were used. The dataset by Macori et al. (2020) was used to complement the VirulenceFinder program. The presence of virulence genes was validated using BLAST+ (v.2.5.0), applying a cut-off value of >80% base identity and >95% coverage (Macori et al., 2020). Determination of the presence of genes encoding antimicrobial resistance was validated using the resistance gene identifier (RGI) and ResFinder (Bortolaia et al., 2020).

Prophage detection was performed by PHAge Search Tool (PHAST) (Arndt, Marcu, Liang, & Wishart, 2018). In this study, only prophage regions detected with a completeness score >90 were considered.

## 3. Results

### 3.1. Bacterial strains and genotypic characterisation

The bacterial strains used for the sequencing were isolated from different stages of artisanal cheese production in Poland, including raw material, semi-product, finished product and food environment swabs. Table 1 shows the summary of whole-genome assemblies.

Sequencing the genomes of these isolates showed that they belong to different multi-locus sequence types (ST). Most of the isolates (n = 6) belong to ST109 multi-locus sequence types. Three strains were identified as ST130 and 3 as ST7. The other isolates belong to ST5, ST97, ST352 and ST398.

The ST109 strains were t693, and the ST130 strain was t3218 *spa* sequence types. The ST7 strains shared the t91 *spa* type, although the other ST types revealed ST5-t2, ST97-t1109, ST352-t359, and ST398-t571 *spa* types (Table 2).

The sources of different ST isolates are shown in Table 2 and Fig. 1. ST109 was most common and originated from whey (n = 2), cheese (n = 2), heated milk (n = 1), swab (n = 1). ST5 (n = 1) isolate was isolated from a swab only. ST130 were isolated from raw milk (n = 1) and swabs (n = 2). ST 7 were isolated from curd (n = 2), and whey (n = 1), since ST 97 from swab (n = 1). ST398 and ST352 were isolated from heated milk (n = 1) and curd (n = 1).

### 3.2. Virulome analysis

The genomes were analysed for virulence, which was classified into categories: adherence, exoenzymes, secretion machinery factors and toxin genes.

Among all isolates, different genes were found according to different STs. Genes encoding aureolysin (*aur*) were detected in 15 (93.9%) *S. aureus* isolates. Genes encoding staphylococcus complement inhibitor (SCIN) and staphylokinases were detected at frequencies of 9 (56.3%) and 8 (50%) isolates, respectively. Gene *sea* encoding classical enterotoxin SEA was found only in one isolate belonging to ST5. Toxin-like enterotoxin genes were found more frequently than classical enterotoxin genes. Genes encoding enterotoxins like toxins: *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *sep*, *seo* and *seu* were detected in 7 (43.8%), 7 (43.8%), 7 (43.8%), 7 (43.8%), 2 (12.5%), 7 (43.8%), and 7 (43.8%) isolates, respectively. Exfoliative A gene (*eta*) was found among strains belonging to ST7, ST97 and ST109. Epidermal Cell Diff.

Inhibitor (*edin*B) was found only among strains belonging to ST5 and ST130. The prevalence of leucocidins *luk*D, *luk*E were found in 9

**Table 1**
Summary of characteristics of whole-genome and assembly properties of tested *S. aureus* isolates.[a]

| Isolate code | Number contigs | Total length (bp) | N50\(bp) | L50 | %GC | Contamination level values |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SA/JG/031 | 47 | 2,795,359 | 422,551 | 3 | 32.69 | 0.08 |
| SA/JG/032 | 47 | 2,795,359 | 422,551 | 3 | 32.69 | 0.08 |
| SA/JG/033 | 48 | 2,804,408 | 422,551 | 3 | 32.67 | 0.08 |
| SA/JG/034 | 49 | 2,800,667 | 422,551 | 3 | 32,69 | 0.08 |
| SA/JG/035 | 49 | 2,800,773 | 422,551 | 3 | 32.69 | 0.08 |
| SA/JG/036 | 38 | 2,780,570 | 707,629 | 3 | 32.73 | 0.08 |
| SA/JG/037 | 45 | 2,773,741 | 640,821 | 2 | 32.77 | 0.36 |
| SA/JG/038 | 56 | 2,794,924 | 300,095 | 4 | 32.88 | 0.08 |
| SA/JG/039 | 50 | 2,795,358 | 422,551 | 3 | 32.69 | 0.08 |
| SA/JG/040 | 35 | 2,774,794 | 640,821 | 2 | 32.77 | 0.36 |
| SA/JG/041 | 30 | 2,775,252 | 640,821 | 2 | 32.77 | 0.08 |
| SA/JG/042 | 35 | 2,741,960 | 442,644 | 3 | 32.74 | 0.08 |
| SA/JG/044 | 37 | 2,800,122 | 509,416 | 3 | 32.77 | 0.37 |
| SA/JG/045 | 50 | 2,805,712 | 319,588 | 3 | 32.79 | 0.08 |
| SA/JG/046 | 35 | 2,717,127 | 318,839 | 3 | 32.75 | 0.08 |
| SA/JG/047 | 46 | 2,777,192 | 447,808 | 3 | 32.72 | 0.08 |

[a] Coverage was 100× in all cases; completeness was 99.67% in all cases except SA/JG/038 and SA/JG/044 that were at 99.11% and 99.63%, respectively.

(56.3%) strains. The results showed a high frequency of haemolytic activity among *S. aureus*. γ-Haemolysins (*hlg*A, *hlg*B, *hlg*C) were identified in all the strains. α-Haemolysin gene (*hla*) and β-haemolysin gene (*hlb*) were also detected and were found among 15/93.8% and 13/81.3% isolates, respectively.

The genes coding for serine protease-like protein (*spl*A-F) occurrence among strains: *spl*A (8/50.0%), *spl*B (8/50.0%), *spl*E (7/43.8%), *spl*C (9/56.3%), *spl*D (8/50.0%) and *spl*F (10/62.5%).

Among all strains, genes related to adherence were also found. All strains possess autolysin gene (*atl*) and intercellular adhesion genes (*ica*AD, *ica*R, *ica*B, *ica*C). The prevalence of the other genes involved in biofilm production and adhesion was: *fnb*A (13/81.3%), *fnb*B (13/81.3%), *fib* (15/93.8%), *clf*A (15/93.8%), *clf*B (16/100%) and *ebp*S (14/87.5%) (Fig. 2, Supplementary material Table S1).

Many virulence genes were associated with specific STs. A hierarchically clustered coloured matrix (Fig. 2) shows correspondent virulence profiles between the genetically related *S. aureus* strains. Toxins constitute an important group of *S. aureus* virulence factors (with enterotoxins being important to food safety). A statistical analysis indicated that there is a relationship between the occurrence of *seu*, *seo*, *sep*, *sen*, *sem*, *sei*, *seg* and STs type ($p < 0.05$) and they were mostly detected in ST109 isolates. Most genes encoding antimicrobial resistance factor were found in strains belonging to ST 109. In all of the tested isolates the quinolone resistance genes (*nor*A) and its regulator (*mgr*A) was found, as well as the major facilitator superfamily MDR efflux pump in *S. aureus* (*Lmr*S), the multidrug efflux pump (*sdr*M). Among all genomes was also found the *mep*A gene that is a binding transcription regulator that represses expression of the *S. aureus* multidrug efflux pump and the *sep*A gene that confers resistance to disinfecting agents. Additionally, some strains possess genes associated with resistance to different drug classes, including the: aminoglycoside resistance gene (*ant(9)-Ia*) (6, 37.5%) and *kdp*D (16, 100%), gene coding resistance to erythromycin (*erm*A) (7, 43.8%) and penicillin resistance gene (*blaZ*) (7, 43.8%) (Fig. 3; Supplementary material Table S2).

**Table 2**
Characteristic and genotypic details of the *S. aureus* isolates investigated with whole-genome sequencing.

| Isolate code | Source | ST type | CC | *spa* type |
|---|---|---|---|---|
| SA/JG/031 | Whey | ST 109 | CC1 | t693 |
| SA/JG/032 | Cheese | ST 109 | CC1 | t693 |
| SA/JG/033 | Heated milk | ST 109 | CC1 | t693 |
| SA/JG/034 | Whey | ST 109 | CC1 | t693 |
| SA/JG/035 | Cheese | ST 109 | CC1 | t693 |
| SA/JG/036 | Curd | ST 7 | | t91 |
| SA/JG/037 | Raw milk | ST 130 | – | t3218 |
| SA/JG/038 | Heated milk | ST 398 | – | t571 |
| SA/JG/039 | Swab-form | ST 109 | CC1 | t693 |
| SA/JG/040 | Swab-jar | ST 130 | – | t3218 |
| SA/JG/041 | Swab-form | ST 130 | – | t3218 |
| SA/JG/042 | Curd | ST 352 | CC97 | t359 |
| SA/JG/044 | Swab-tank | ST 97 | CC97 | t1109 |
| SA/JG/045 | Curd | ST 7 | – | t91 |
| SA/JG/046 | Whey | ST 7 | – | t91 |
| SA/JG/047 | Swab | ST 5 | CC5 | t2 |

### 3.3. Mobile genetic elements among tested S. aureus isolates

Among all strains, *rep*-type plasmids were found only in three isolates. Strain SA/JG/036 isolated from curd had a $rep_{16}$ and $rep_{5b}$, SA/JG/047 had $rep_{19}$, $rep_{20}$, SA/JG/042 had $rep_{5c}$. Staphylococcal pathogenicity islands were detected among 13 (81.3%) of the tested isolates, with the most frequent occurrence of ISSau3. Regarding phages, different prophage types were found among different ST types. Among strains belonging to ST109, phage B166 was detected. Among other strains, inter alia phage SA1014ruMSSAST7 (n = 1), φ2958PVL (n = 3) were found (Table 3).

### 3.4. Comparison of isolates from cheese and the cheese production environment with food-poisoning related to S. aureus

The isolates in the current study were compared with publicly available (PubMLST database) isolates obtained from food poisoning cases worldwide (Fig. 4), which indicated that *S. aureus*, responsible for food poisoning worldwide, mostly belonged to CC8. Although none of the isolates in the current study belonged to this CC, it was found that strains in the study were similar to strains belonging to CC5, CC97 and CC1. This suggests that the studied strains may have the potential to cause human infection and food poisoning. Therefore, it is important to understand the prevalence and transmission of epidemical *S. aureus* strains, which are widely distributed in the environment, including in humans, animals and foods.

## 4. Discussion

The presented study provides insights into the virulome characteristics of *S. aureus* recovered from dairy farms with the small-scale production of raw milk cheeses in Poland. The contamination of dairy herds, raw milk and raw milk products by *S. aureus* remains an important problem in dairy food production (McMillan,

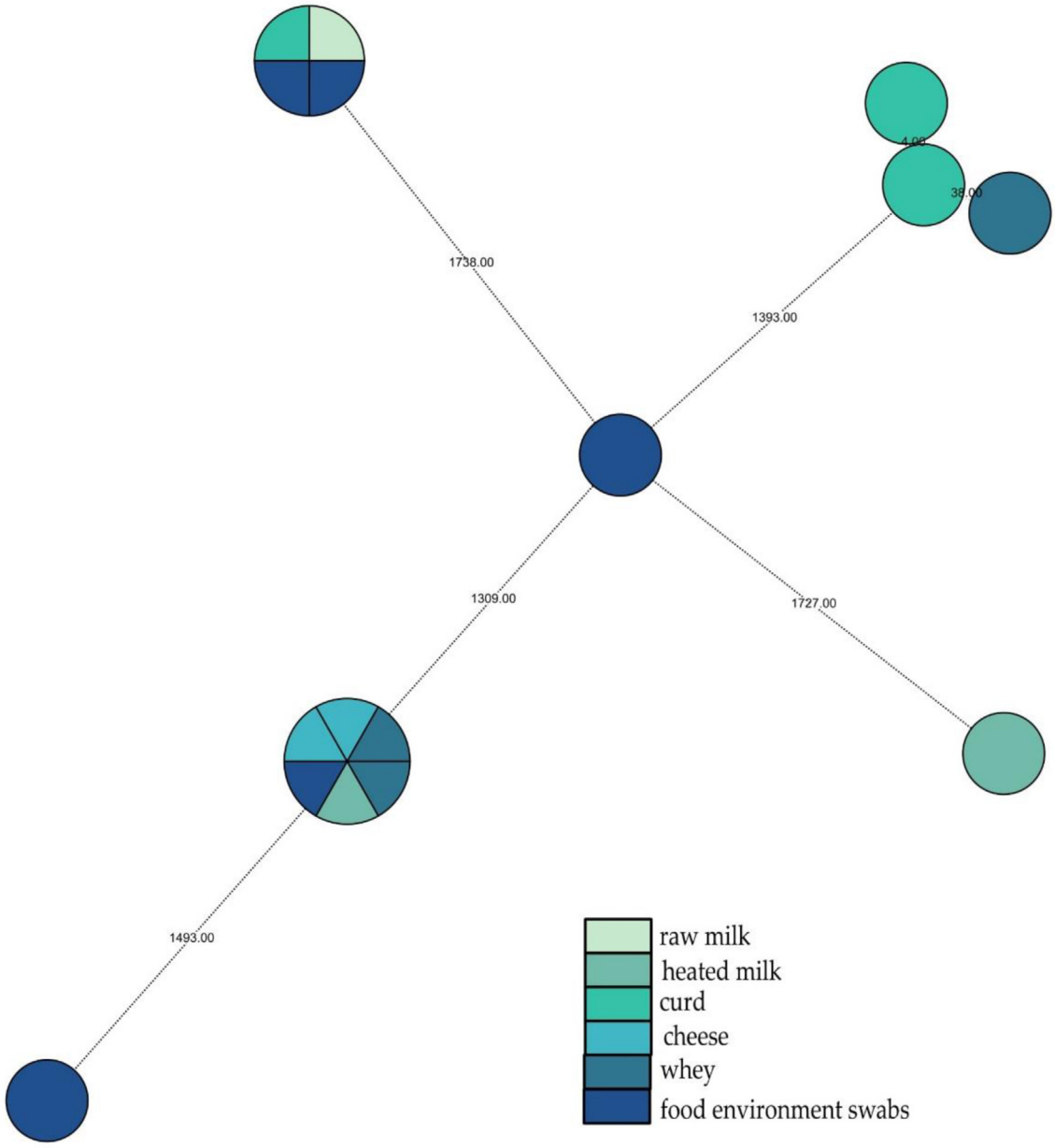



**Fig. 1.** A minimum-spanning tree based on the whole-genome cgMLST typing profiles of 16 *S. aureus* isolates. The minimum spanning tree graph (MST) was created with the BioNumerics v7.6 advanced cluster analysis tool. Branch labels represent the allelic distances shown on a logarithmic scale. The corresponding sources of isolates are indicated by different shades of colours.

Moore, McAuley, Fegan, & Fox, 2016). Thanks to sequencing technologies (e.g., NGS), it is possible to detect and characterise foodborne pathogens, including *S. aureus*.

The presence of different types of STs in the production chain indicates the biodiversity of *S. aureus*. In the current study, it was found that the most prevalent types among all strains were ST 109; CC1 and t693. CC1 is known to contain various community-associated methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA). Although CC5 has been spreading in hospitals in several countries, ST5/CC5 isolates were found from swabs in the cheese production chain.

According to literature data, since CC97 in most isolates of this lineage originates from animals, the presence of this isolate in the current study may be the result of unhygienic practices. One of the strains in the current study belongs to ST398, which is a lineage described as colonising livestock animals, e.g., cows, veal calves, horses and pigs (Silva et al., 2022; Zhao et al., 2021). ST398 isolates from animals are mostly methicillin-resistant (Price et al., 2012). In this study, in strain ST398 genes encoding resistance to methicillin were not detected, nevertheless according, to literature data occurrence this clone in food chain should not be ignored, because human infections caused by MSSA (methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*) ST398 have been reported (Li, Wu, Wang, & Meng, 2015). The presence in all tested genomes *nor*A (the most well-known efflux system among *S. aureus* and determine resistance to fluoroquinolones and some antiseptics and disinfectants) is coherent with previously data, which described that this gene as a part of the core genome of *S. aureus* (Costa et al., 2019; Fergestad et al., 2021).

The presence of the same STs at different stages of production indicates the survivability of this pathogen, which is dependent on

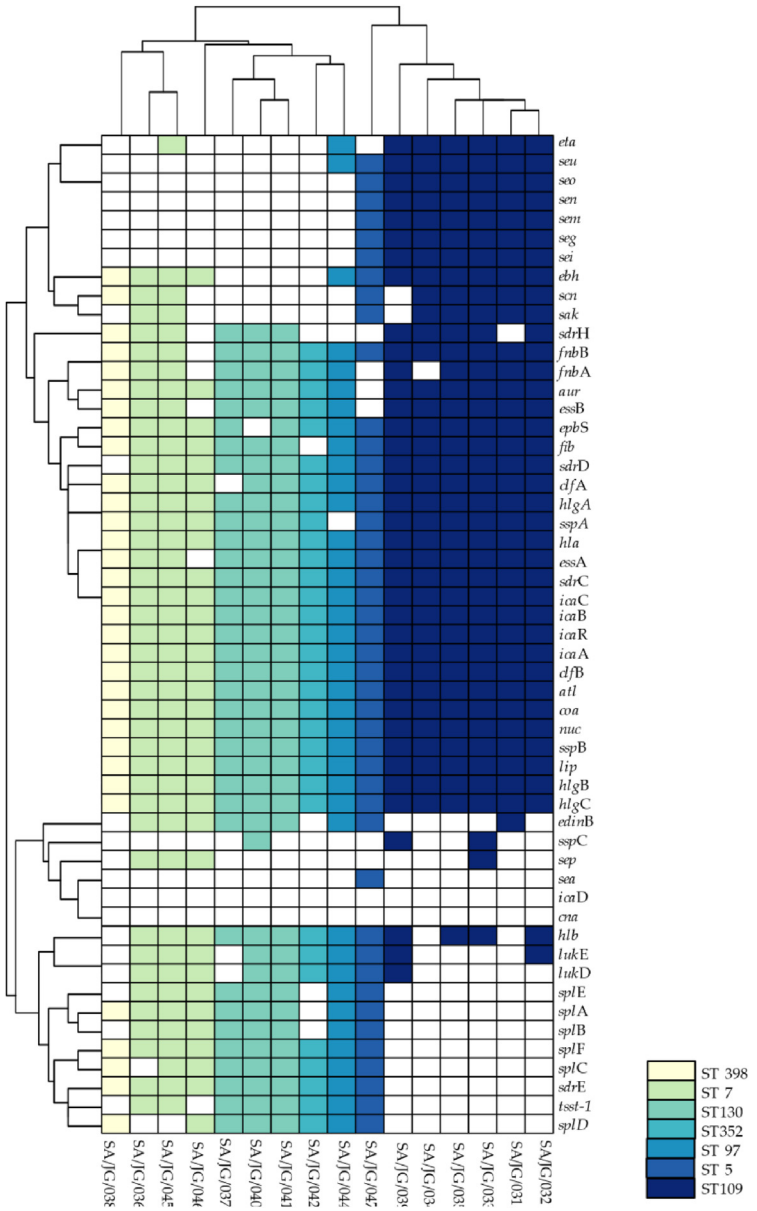



**Fig. 2.** Hierarchical clustering of the isolates against the combined pattern of virulence phenotype. Colour = presence of gene; white = gene absence. Similar sequence types are highlighted with similar shade. The figure highlights virulome genetic profiles as well as the unsupervised clustering of isolates that parallels their sequence type classification. The figure was generated in R by the heatmap package using default clustering settings.

the manufacturing steps during cheese making, the physicochemical characteristics of the cheese (pH, salt content, water activity), and the growth requirements of the microorganisms (Kousta, Mataragas, Skandamis, & Drosinos, 2010). Nevertheless, it is worth noting the demonstration of individual types of STs at each stage. As a result of these observations, it can be concluded that each stage of production can be a potential source of entry of *S. aureus* with varying characteristics of this pathogen into the production chain.

Regarding the pathogenicity of the isolates, the co-existence of multiple virulence groups was identified. Exotoxins produced by *S. aureus* can cause epidemics of staphylococcal food poisoning (SFP) from milk and dairy products intended for human consumption (Abril et al., 2020; Fergestad et al., 2021). SFP is one of the most common foodborne diseases, which results from the consumption of foods containing sufficient amounts of staphylococcal enterotoxins (SEs). According to literature data, it was shown that in SFP, *S. aureus* isolates did not possess the classical enterotoxin genes (*sea-see*), although they did possess SE-like toxin genes, and those could cause disease (Macori et al., 2020; Thwala et al., 2022). In the present study, *sep*, *seg*, *sem*, *sen*, *seo* and *seu* genes were detected more frequently among the studied isolates than classical enterotoxin genes, among which the *sea* gene was found in only one isolate (1/6.25%). It is noteworthy that enterotoxicity genes were possessed only by isolates belonging to ST109 and ST5. Our observations are consistent with previous findings, that *S. aureus* isolates which different sequence types may be able to produce the same enterotoxins (Qian, Castañeda-Gulla, Sattlegger, & Mutukumira, 2022). It was also found that 6/37.5% of strains possess a toxic shock syndrome gene (*tsst-1*). This gene is characteristic of *S. aureus* isolates and has been previously detected in bovine *S. aureus* (Fergestad et al., 2021; Vaughn, Abdi, Gillespie, &

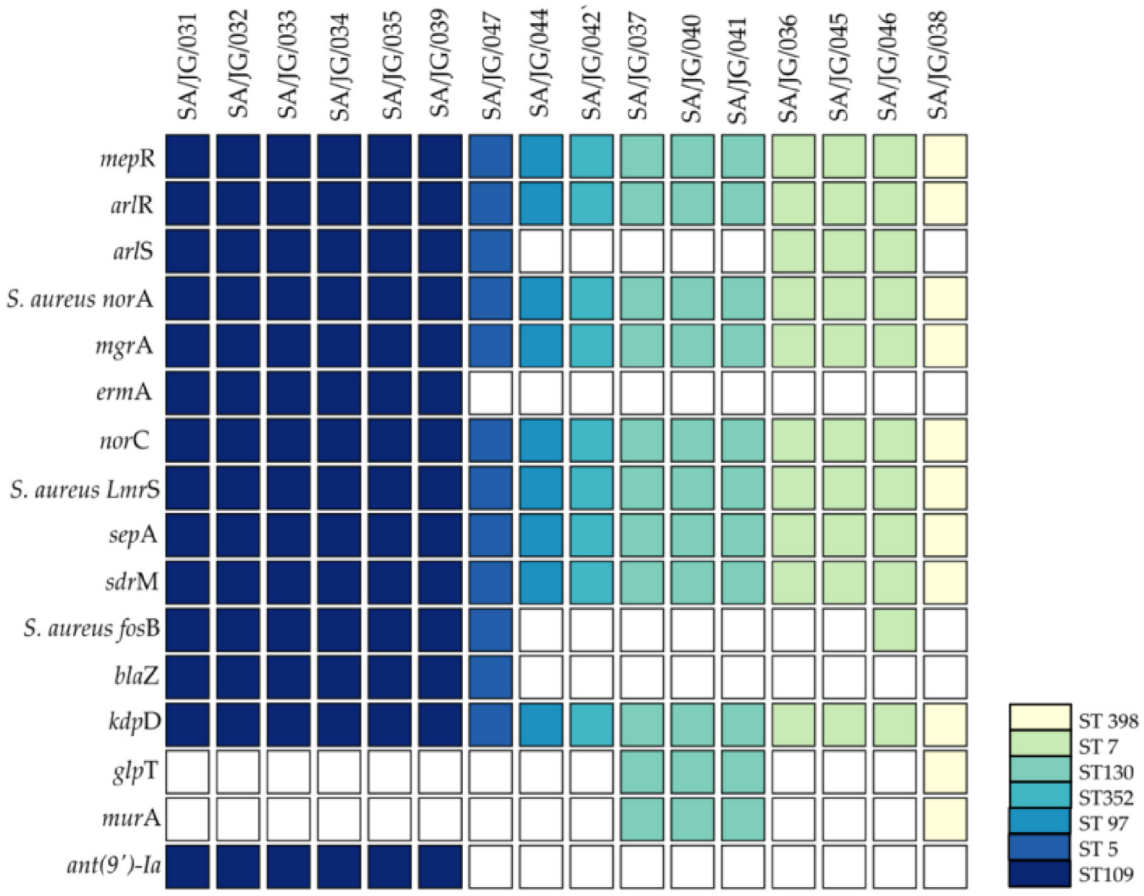



**Fig. 3.** Antimicrobial resistance genes of tested *S. aureus* isolates. Filled shapes, presence of antimicrobial resistance gene; outlined shape, absent genes. Figure was visualised using iTOL.

**Table 3**
Detection of mobile genetic elements among *S. aureus* isolates.[a]

| Isolate code | Plasmid *rep* family | MGEs (family) | Prophage | Pathogenicity score |
|---|---|---|---|---|
| SA/JG/031 | – | ISSau3, ISSau5 | phage B166 | 0.98 (569) |
| SA/JG/032 | – | Tn554, ISSau3, ISSau5 | phage B166 | 0.98 (569) |
| SA/JG/033 | – | Tn554, ISSau3, ISSau5 | phage B166 | 0.98 (570) |
| SA/JG/034 | – | ISSau3, ISSau5 | phage B166 | 0.98 (569) |
| SA/JG/035 | – | Tn554, ISSau3, ISSau5 | phage B166 | 0.98 (569) |
| SA/JG/036 | rep16, rep5b | ISSau3 | φJB<br>phage SA1014ruMSSAST7 | 0.98 (524) |
| SA/JG/037 | – | – | | 0.986 (308) |
| SA/JG/038 | – | ISSau8 | Phage StauST398_5<br>φ2958PVL | 0.975 (359) |
| SA/JG/039 | – | ISSau3, ISSau5 | – | 0.98 (569) |
| SA/JG/040 | – | – | φ 2958PVL | 0.986 (307) |
| SA/JG/041 | – | – | φ 2958PVL<br>P282 | 0.986 (308) |
| SA/JG/042 | rep5c | ISSau3, ISSau5 | φPV83 | 0.984 (476) |
| SA/JG/044 | – | ISSau3 | φ2958PVL | 0.983 (492) |
| SA/JG/045 | – | ISSau5,<br>CT: cn_26928_ISSau3 | phage 96 | 0.978 (537) |
| SA/JG/046 | – | ISSau3,<br>CT: cn_26928_ISSau3 | phage 53 | 0.984 (466) |
| SA/JG/047 | rep19, rep20 | – | φNM3 | 0.983 (910) |

[a] Abbreviations are: IS, insertion sequence; CT, composite transposon; MGEs, mobile genetic elements. Pathogenicity score (no. of pathogenic families): prediction of a bacteria's pathogenicity toward human hosts using PathogenFinder.

Kerro Dego, 2020). The current study also showed a high prevalence of leucocidins *luk*E/D, which are reported as one of the most important pore-forming toxin genes among *S. aureus* (Zhu et al., 2022).

One of the most important virulence factors among *S. aureus* is the ability to form biofilm and adherence to biotic and abiotic surfaces (Miao et al., 2017). The ability to form biofilm may contribute to the persistence of this pathogen in food processing

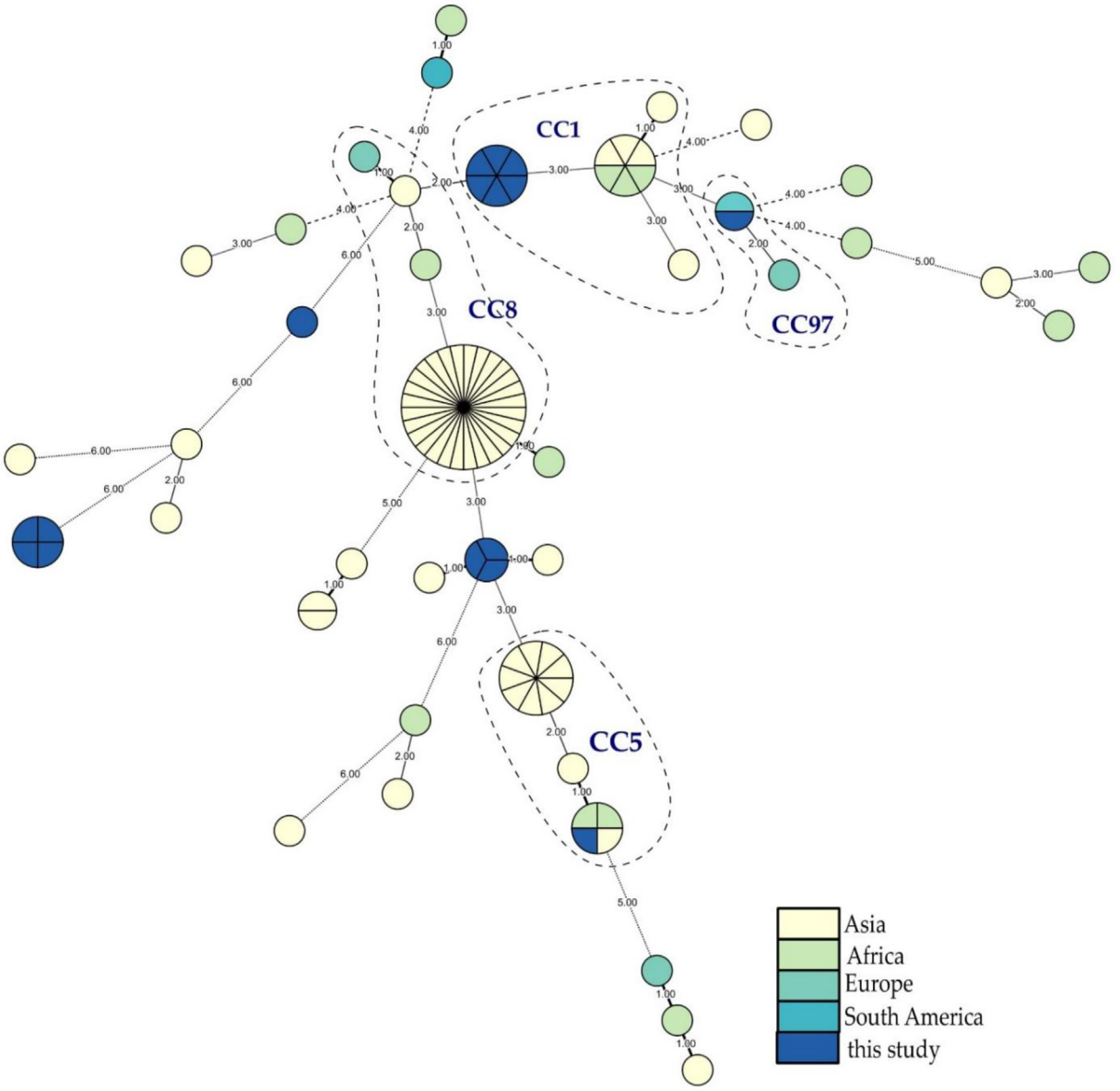



**Fig. 4.** A minimum-spanning tree (MST) representing the comparison of *S. aureus* isolated analysed in this study with the published genomes recovered from food-poisoning outbreaks worldwide. Analysis was made on the base MLST profiles using a single linkage method. Graph was created with the BioNumerics v7.6.

environments and, consequently, increase cross-contamination risks (Vázquez-Sánchez, Habimana, & Holck, 2013). Biofilm formation is determined by a number of genetic determinants, of which the most documented are the *ica*A and *ica*D (Azmi, Qrei, & Abdeen, 2019). The current study also presents the occurrence of other genes associated with adhesion, invasion, and evasion among genes of the *sdr* family (A–F), which were previously reported in clinical isolates (Askarian et al., 2016; Castro, Santos, Meireles, Silva, & Teixeira, 2016; Sharp et al., 2012). Our results showed, that most virulence factors depends of STs, with the most virulent being the strain belonging to ST5. The observed variations in occurrence virulence genes among different STs may represent evolution toward adaptation distinct niches or environments.

The current study also determined the prevalence of mobile genetic elements among *S. aureus*. Bacteriophage transduction, conjugation by plasmids, and natural transformation by extracellular DNA each allow genetic material to jump between strains and species (Lerminiaux & Cameron, 2019). This is important because the food chain is a good environment for horizontal gene transfer. The detected MGEs are important to consider horizontal gene transfer, potentially from *S. aureus* to different non-pathogenic species and genera, as a way for these bacteria to gain pathogenicity (Argemi et al., 2018).

Predicting the pathogenicity of isolates to human hosts yielded a high average probability score ($P_{score}$ ~0.982). A high pathogenicity score with the several virulence genes possessed by the studied isolates from food and food processing plants indicates their pathogenic potential (Asante et al., 2021).

Even though a limited number of *S. aureus* isolates were used in this study, it is worth emphasising that NGS sequencing provides

yielding information on the complete genomic profile and relations between strains. The population sampled in this study is not representative of the whole artisanal cheese chain production in Poland. Nevertheless, it is worth emphasising the need for constant monitoring and compliance with food safety and food quality standards: Good Manufacturing Practices (GMP) and Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP) systems in the food chain.

## 5. Conclusions

The presented studies demonstrate that the use of NGS sequencing provides a valuable characterisation of foodborne pathogens. The results of the study provide an understanding of the evolution of *S. aureus* and the genetic determinants which are responsible for the spread and survival of this pathogen. Furthermore, the current study revealed that *S. aureus* strains isolated from the food production chain carried toxin genes. This finding suggests that *S. aureus* from food is a potential human health threat, which necessitates improving hygiene practices to prevent the spread of this pathogen.

## CRediT authorship contribution statement

**Joanna Gajewska (J.G)**: Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Formal analysis, Data curation, Writing – original draft, Visualization, Project administration, Funding acquisition.

**Wioleta Chajęcka-Wierzchowska (W.ChW)**: Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision.

**Anna Zadernowska (A.Z)**: Writing – review & editing, Supervision.

## Data access

The data have been deposited as a BioProject PRJNA860798 in the National Center for Biotechnology Information. They are available at the following accession numbers: SRR20339832–SRR20339847 and PubMLST *S. aureus*.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

This research was funded in whole by the National Science Centre (Poland), grant number: 2021/41/N/NZ9/00918 (PRELUDIUM-20). The publication was written as a result of the author (JG) internship in the Department of Agriculture, Food and Environment (Di3A), University of Catania, Via San-ta Sofia 100, 95123 Catania, Italy, co-financed by the European Union under the European Social Fund (Operational Program Knowledge Education Development), carried out in the project Development Program at the University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland (POWR.03.05. 00-00-Z310/17).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105774.

## References

Abril, A. G., Villa, T. G., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., Sánchez-Pérez, A., Calo-Mata, P., et al. (2020). *Staphylococcus aureus* exotoxins and their detection in the dairy industry and mastitis. *Toxins, 12*, Article 0537.

Allard, M. W., Bell, R., Ferreira, C. M., Gonzalez-Escalona, N., Hoffmann, M., Muruvanda, T., et al. (2018). Genomics of foodborne pathogens for microbial food safety. *Current Opinion in Biotechnology, 49*, 224–229.

Argemi, X., Matelska, D., Ginalski, K., Riegel, P., Hansmann, Y., Bloom, J., et al. (2018). Comparative genomic analysis of *Staphylococcus lugdunensis* shows a closed pan-genome and multiple barriers to horizontal gene transfer. *BMC Genomics, 19*, Article 621.

Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., & Wishart, D. S. (2018). PHAST, PHASTER and PHASTEST: Tools for finding prophage in bacterial genomes. *Briefings in Bioinformatics, 20*, 1560–1567.

Asante, J., Hetsa, B. A., Amoako, D. G., Abia, A. L. K., Bester, L. A., & Essack, S. Y. (2021). Genomic analysis of antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates from clinical sources in the Kwazulu-Natal Province, South Africa. *Frontiers in Microbiology, 12*, Article 656306.

Askarian, F., Ajayi, C., Hanssen, A. M., Van Sorge, N. M., Pettersen, I., Diep, D. B., et al. (2016). The interaction between *Staphylococcus aureus* SdrD and desmoglein 1 is important for adhesion to host cells. *Scientific Reports, 6*, 22134.

Azmi, K., Qrei, W., & Abdeen, Z. (2019). Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm production in methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* isolated from Palestinian patients. *BMC Genomics, 20*, 578.

Bartels, M. D., Petersen, A., Worning, P., Nielsen, J. B., Larner-Svensson, H., Krogh Johansen, H., et al. (2014). Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology, 52*, Article 01979-14.

Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., et al. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 75*, 3491–3500.

Carattoli, A., Zankari, E., Garciá-Fernández, A., Larsen, M. V., Lund, O., Villa, L., et al. (2014). In silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58*, 3895–3903.

Castro, A., Santos, C., Meireles, H., Silva, J., & Teixeira, P. (2016). Food handlers as potential sources of dissemination of virulent strains of *Staphylococcus aureus* in the community. *Journal of Infection and Public Health, 9*, 153–160.

Costa, S. S., Sobkowiak, B., Parreira, R., Edgeworth, J. D., Viveiros, M., Clark, T. G., et al. (2019). Genetic diversity of *norA*, coding for a main efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Genetics, 10*, 710.

Dabul, A. N. G., & Camargo, I. L. B. C. (2014). Clonal complexes of *Staphylococcus aureus*: All mixed and together. *FEMS Microbiology Letters, 351*, 7–8.

Dai, J., Wu, S., Huang, J., Wu, Q., Zhang, F., Zhang, J., et al. (2019). Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from pasteurized milk in China. *Frontiers in Microbiology, 10*, 641.

Dittmann, K. K., Chaul, L. T., Lee, S. H. I., Corassin, C. H., de Oliveira, C. A. F., De Martinis, E. C. P., et al. (2017). *Staphylococcus aureus* in some Brazilian dairy industries: Changes of contamination and diversity. *Frontiers in Microbiology, 8*, Article 02049.

Fergestad, M. E., Touzain, F., De Vliegher, S., De Visscher, A., Thiry, D., Ngassam Tchamba, C., et al. (2021). Whole genome sequencing of staphylococci isolated from bovine milk samples. *Frontiers in Microbiology, 12*, Article 715851.

Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., & Zadernowska, A. (2022). Occurrence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains along the production chain of raw milk cheeses in Poland. *Molecules, 27*, 6569.

Hait, J. M., Cao, G., Kastanis, G., Yin, L., Pettengill, J. B., & Tallent, S. M. (2021). Evaluation of virulence determinants using whole-genome sequencing and phenotypic biofilm analysis of outbreak-linked *Staphylococcus aureus* isolates. *Frontiers in Microbiology, 12*, Article 687625.

Joensen, K. G., Scheutz, F., Lund, O., Hasman, H., Kaas, R. S., Nielsen, E. M., et al. (2014). Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology, 52*, 1501–1510.

Johansson, M. H. K., Bortolaia, V., Tansirichaiya, S., Aarestrup, F. M., Roberts, A. P., & Petersen, T. N. (2021). Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 76*, 101–109.

Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., & Drosinos, E. H. (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control, 21*, 805–815.

Lee, I., Chalita, M., Ha, S. M., Na, S. I., Yoon, S. H., & Chun, J. (2017). ContEst16S: An algorithm that identifies contaminated prokaryotic genomes using 16S RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 67*, 2053–2057.

Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology, 65*, 34–44.

Li, G., Wu, C., Wang, X., & Meng, J. (2015). Prevalence and characterization of methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from retail foods. *International Journal of Food Microbiology, 196*, 94–97.

Macori, G., Bellio, A., Bianchi, D. M., Chiesa, F., Gallina, S., Romano, A., et al. (2020). Genome-wide profiling of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains used for the production of naturally contaminated cheeses. *Genes, 11*, 33.

Malachowa, N., & Deleo, F. R. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences, 67*, 3057–3071.
McMillan, K., Moore, S. C., McAuley, C. M., Fegan, N., & Fox, E. M. (2016). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk sources in Victoria, Australia. *BMC Microbiology, 16*, 169.
Miao, J., Liang, Y., Chen, L., Wang, W., Wang, J., Li, B., et al. (2017). Formation and development of *Staphylococcus* biofilm: With focus on food safety. *Journal of Food Safety, 37*, 12358.
Neyaz, L., Rajagopal, N., Wells, H., & Fakhr, M. K. (2020). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* plasmids associated with strains isolated from various retail meats. *Frontiers in Microbiology, 11*, 223.
Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews, 31*, Article 00088-17.
Pöhlmann-Dietze, P., Ulrich, M., Kiser, K. B., Döring, G., Lee, J. C., Fournier, J. M., et al. (2000). Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: Influence of capsular polysaccharide, global regulator agr, and bacterial growth phase. *Infection and Immunity, 68*, 4865–4871.
Price, L. B., Stegger, M., Hasman, H., Aziz, M., Larsen, J., Andersen, P. S., et al. (2012). *Staphylococcus aureus* CC398: Host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. *mBio, 3*, 11.
Qian, C., Castañeda-Gulla, K., Sattlegger, E., & Mutukumira, A. N. (2022). Enterotoxigenicity and genetic relatedness of *Staphylococcus aureus* in a commercial poultry plant and poultry farm. *International Journal of Food Microbiology, 363*, Article 109454.
Ravenni, N., Rota-Stabelli, O., Venturini, E., Montagnani, C., Galli, L., Armanini, F., et al. (2018). Whole-genome epidemiology, characterisation, and phylogenetic reconstruction of *Staphylococcus aureus* strains in a paediatric hospital. *Genome Medicine, 10*, 82.
Samutela, M. T., Kwenda, G., Simulundu, E., Nkhoma, P., Higashi, H., Frey, A., et al. (2021). Pigs as a potential source of emerging livestock-associated *Staphylococcus aureus* in Africa: A systematic review. *International Journal of Infectious Diseases, 109*, 38–49.
Sharp, J. A., Echague, C. G., Hair, P. S., Ward, M. D., Nyalwidhe, J. O., Geoghegan, J. A., et al. (2012). *Staphylococcus aureus* surface protein SdrE binds complement regulator factor H as an immune evasion tactic. *PLoS One, 7*, 38407.
Silva, V., Alfarela, C., Caniça, M., Manageiro, V., Nóvoa, M., Leiva, B., et al. (2022). A one health approach molecular analysis of *Staphylococcus aureus* reveals distinct lineages in isolates from Miranda donkeys (*Equus asinus*) and their handlers. *Antibiotics, 11*, 374.
Soliman, M. S., Soliman, N. S., El-Manakhly, A. R., Elbanna, S. A., Aziz, R. K., & El-Kholy, A. A. (2020). Genomic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by high-throughput sequencing in a tertiary care hospital. *Genes, 11*, 1219.
Spanu, V., Scarano, C., Virdis, S., Melito, S., Spanu, C., & De Santis, E. P. L. (2013). Population structure of *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank goat's milk. *Foodborne Pathogens and Disease, 10*, 310–315.
Thwala, T., Madoroba, E., Maliehe, T. S., Magwedere, K., Basson, A. K., & Butaye, P. (2022). Antimicrobial resistance, enterotoxin and *mec* gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with beef-based protein sources from KwaZulu-Natal Province, South Africa. *Microorganisms, 10*, 1211.
Ullah, N., Arshad Dar, H., Naz, K., Andleeb, S., Rahman, A., Tariq Saeed, M., et al. (2021). Genomic investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST113 strains isolated from tertiary care hospitals in Pakistan. *Antibiotics, 10*, 1121.
Vaughn, J. M., Abdi, R. D., Gillespie, B. E., & Kerro Dego, O. (2020). Genetic diversity and virulence characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis. *Microbial Pathogenesis, 144*, Article 104171.
Vázquez-Sánchez, D., Habimana, O., & Holck, A. (2013). Impact of food-related environmental factors on the adherence and biofilm formation of natural *Staphylococcus aureus* isolates. *Current Microbiology, 66*, 110–121.
Yin, R., Kwoh, C. K., & Zheng, J. (2019). Whole genome sequencing analysis. In S. Ranganathan, K. Nakai, C. Schönbach, & M. Gribskov (Eds.), *Encyclopedia of bioinformatics and computational biology* (pp. 176–183). Oxford, UK: Elsevier.
Zhao, X., Yuan, X., Hu, M., Zhang, Y., Li, L., Zhang, Q., et al. (2021). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk in Shandong dairy farms. *Food Control, 125*, Article 107836.
Zhu, H., Luo, H., Zhong, Q., Cao, X., Gu, S., Peng, S., et al. (2022). Comparison of molecular characteristics between methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates by whole-genome sequencing. *Infection and Drug Resistance, 15*, 2949–2958.

Olsztyn, , 17.05.2024
(miejscowość, data)

mgr inż. Joanna Gajewska
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia żywności i żywienia
(dyscyplina naukowa)

**Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny**
**Technologia żywności i żywienia**
**Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**
**prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak**

**OŚWIADCZENIE**
**autora rozprawy doktorskiej**

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:
Gajewska J., Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A. 2023. *Genomic characterization of the pathogenicity of Staphylococcus aureus isolates recovered from the cheese chain production.* International Dairy Journal, 105774, https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105774

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, walidacji metod, przeprowadzeniu analiz bioinformatycznych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników (tabel i rycin) i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekcie artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Gajewska Joanna
.....
(podpis kandydata)

Olsztyn, 17.05.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

**Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny**
**Technologia żywności i żywienia**
**Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**
**prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak**

**OŚWIADCZENIE**
**współautora**

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:
Gajewska J., Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A. 2023. *Genomic characterization of the pathogenicity of Staphylococcus aureus isolates recovered from the cheese chain production.* International Dairy Journal, 105774, https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105774
mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji badań, korekcie pierwotnej wersji manuskryptu, opiece merytorycznej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Joannę Gajewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Joanny Gajewskiej polegający na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, walidacji metod, przeprowadzeniu analiz bioinformatycznych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników (tabel i rycin) i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekcie artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (pełnienie funkcji autora korespondencyjnego).

Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
podpis

Olsztyn, 17.05.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

**Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny**
**Technologia żywności i żywienia**
**Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**
**prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak**

**OŚWIADCZENIE**
**współautora**

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:
Gajewska J., Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A. 2023. *Genomic characterization of the pathogenicity of Staphylococcus aureus isolates recovered from the cheese chain production.* International Dairy Journal, 105774, https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105774
mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w korekcie pierwotnej wersji manuskryptu, opiece merytorycznej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Joannę Gajewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Joanny Gajewskiej polegający na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, walidacji metod, przeprowadzeniu analiz bioinformatycznych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników (tabel i rycin) i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekccie artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (pełnienie funkcji autora korespondencyjnego).

Anna Zadernowska
podpis

**ZAŁĄCZNIK 4**

**Gajewska, J.,** Zakrzewski, AJ., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Impact of the food-related stress conditions on the expression of enterotoxin genes among *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*; 12(7):954. https://doi.org/10.3390/pathogens12070954

*pathogens*

MDPI

*Article*

# Impact of the Food-Related Stress Conditions on the Expression of Enterotoxin Genes among *Staphylococcus aureus*

**Joanna Gajewska *, Arkadiusz Józef Zakrzewski, Wioleta Chajęcka-Wierzchowska and Anna Zadernowska**

Department of Industrial and Food Microbiology, Faculty of Food Science, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-726 Olsztyn, Poland; arkadiusz.zakrzewski@uwm.edu.pl (A.J.Z.); wioleta.chajecka@uwm.edu.pl (W.C.-W.); anna.zadernowska@uwm.edu.pl (A.Z.)

* Correspondence: joanna.gajewska@uwm.edu.pl

**Abstract:** *Staphylococcus aureus* is one of the most important foodborne pathogens. *S. aureus* has the capability to produce a variety of toxins, including staphylococcal enterotoxins (SEs). The aim of this study was to evaluate the survival rate of *S. aureus* cells and analyze enterotoxins gene expression after exposure to osmotic stress and acidic/alkaline stress. To determine survival rates, the traditional plate counting method and flow cytometry were used. The expression levels of the enterotoxin genes were performed by quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). Expression changes differed depending on the stressors chosen. The obtained results in this study showed the effect of critical food-related stress conditions on SE gene expression in *S. aureus*. The study showed different expression levels of the tested enterotoxins genes depending on the stress. The most tested enterotoxin genes (*seg*, *sei*, and *selo*) after exposure to pH = 4.5 stress have similar expression as in the optimal condition. After alkaline treatment (pH = 9.6), a similar expression gene value as for the optimal condition was observed. The analysis of gene expression in response to stress caused by NaCl, showed that the expression of *selp* decreased, whereas *selu*, *selm*, and *selo* genes increased. A significantly decreased expression of the *sea* gene was observed.

**Keywords:** *S. aureus*; gene expression; enterotoxin gene

check for updates

**Citation:** Gajewska, J.; Zakrzewski, A.J.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. Impact of the Food-Related Stress Conditions on the Expression of Enterotoxin Genes among *Staphylococcus aureus*. *Pathogens* **2023**, *12*, 954. https://doi.org/10.3390/pathogens12070954

Academic Editor: Catherine M. Bennett

Received: 20 June 2023
Revised: 14 July 2023
Accepted: 17 July 2023
Published: 19 July 2023

**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## 1. Introduction

Staphylococcal food poisoning (SFP) belongs to one of the most frequently occurring food poisonings globally, caused by eating food contaminated with staphylococci enterotoxin (SEs) secreted by *Staphylococcus aureus* [1]. In the European Union, the number of SFP cases is decreasing, with 43 outbreaks, 402 cases, and 32 hospitalizations reported in 2020, whereas in 2021 there were only 13 reported outbreaks caused by staphylococcal toxins [2,3].

The literature data report that foods of animal origin, such as milk and dairy products, are the cause of SFP. It is worth emphasizing that staphylococcal food poisoning is one of the most common foodborne illnesses worldwide [4]. Nowadays, over 20 different enterotoxins have been characterized [5]. These enterotoxins were subdivided into two groups. The first of these includes SEA-SEE, called classical enterotoxins (SEs) with demonstrated emetics activity, and the second one is staphylococcal enterotoxin-like proteins (SEls), which are potential emetics in a primate model or have yet to be tested [5–7]. Enterotoxins encoding genes can be located on various mobile genetic elements, such as transposons, plasmids, prophages, pathogenicity islands (SaPIs), and highly variable genomic regions (vSa). The role of SE genes as virulence determinants in *S. aureus* is thought to be regulated by the *agr* (accessory gene regulator) gene and *sar* (staphylococcal accessory regulator) gene, alternative sigma factor B ($\sigma^B$), and repressor of toxins (Rot). [8,9]. Enterotoxins have the capability to stimulate large populations of T cells, leading to unregulated immune system

activation [10]. The most common symptoms of SFP include acute gastroenteritis, diarrhea, and vomiting, which occur within 2 to 6 h after consumption of food containing SEs [1,11]. The SFP is a mild, self-limiting disease. Symptoms usually resolve within 12 to 24 h [10]. The most frequently identified enterotoxin genes in SPF have been documented to be *sea*, *seb*, and *sed*, although this pattern appears to be evolving over time. A study carried out by Omoe et al. (2013) [12] demonstrated that the SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, and SEQ enterotoxins, following oral administration, also induce vomiting in monkeys (*Macaca fascicularis*). The authors showed that a dose (of all enterotoxins) of 100 µg/kg caused a vomiting response in the tested monkeys. Nevertheless, it is worth emphasizing that the percentage (average 28%) of monkeys affected after consuming SEls was lower than the percentage (average 79%) affected after consuming SEA or SEB.

Although the emetic activity of SEG, SEI, SEM, SEN, and SEO in humans is not well understood. Baumgartner et al. (2014) [13] described two cases of staphylococcal food poisoning in which only isolates carrying the newly described enterotoxins genes (*seg*, *sei*, *selm*, *seln*, and *selo)* were detected. This fact indicates that a new type of SE with relatively mild vomiting activity can cause human food poisoning.

Staphylococcal enterotoxins are very stable and cannot be inactivated by methods such as heating, so it is important to prevent the growth of *S. aureus* and the production of enterotoxins in food [14]. However, it is worth emphasizing that each of the food processing elements may be a stress factor for a cell, which induces an increase in enterotoxicity. Stress conditions (a low pH value, decreased/increased temperature, or a change in osmotic pressure) result in metabolic changes in bacterial cells through the expression of specific gene sets, including enterotoxins. In this case, it is important to study the expression of each enterotoxin gene. Most studies have focused on the expression under stress conditions encountered in food processing environments of genes encoding classical enterotoxins, whereas knowledge about the expression of newer enterotoxins is limited.

Therefore, this study aimed to estimate the presence of genes coding enterotoxins in *S. aureus* by bioinformatic assay and determine the effect of the stress factors (osmotic, acidic, and alkaline stress) that occur in food and food processing environments on the expression of those genes among *S. aureus* strains. We intended to estimate whether food-related stressors have an impact on the enterotoxicity of *S. aureus*.

## 2. Materials and Methods

### *2.1. Strains*

In this study, five *S. aureus* strains isolated from cheese chain production were used. All strains belong to the collection of the Department of Industrial and Food Microbiology and have been described previously [15]. The strains were kept in Microbanks® (Biomaxima, Lublin, Poland) at −80 °C until the start of analysis. Strains were resuscitated by streaking the beads on TSA (Tryptic Soy Agar; Merck, Darmstadt, Germany) and incubated statically at 37 °C for 24 h (late stationary phase) for further investigation.

### *2.2. Gene Prediction and ANI Analysis*

Strains were chosen for whole genome sequencing and further analysis (Illumina HiSeq paired end). De novo assemblies of the *S. aureus* genomes were generated using MiSeq Illumina. The quality and completeness of the genome assemblies were assessed by testing for contamination with ContEst16S [16]. The genetic biodiversity among tested *S. aureus* strains was determined using the ANI calculator [17], which estimates the average nucleotide identity (ANI). The ANI calculator is a tool based on the alignment of genomic fragments. Online tools available from the homepage, http://genomicepidemiology.org (accessed on 20 May 2023), were used to characterize the strains.

### *2.3. Stress Determination*

The tested strains were subjected to conditions carried out under laboratory conditions related to the stress conditions that occur during food production and preservation. The

NaCl concentration and pH values used in the study were chosen based on the literature and preliminary studies.

#### 2.3.1. Osmotic Stress Treatment

The impact of osmotic stress was tested using the fresh culture in 5 mL of TSB (Merck, Darmstadt, Germany) adjusted to 4.5% NaCl. These conditions were chosen to mimic the NaCl concentration that occurs in the manufacture or preservation of food [18]. This stress was applied for 48 h (statically cultured) at 37 °C. Simultaneously, incubation in 5 mL of TSB was used as a control. The procedure was performed in duplicate.

#### 2.3.2. Acidic and Alkaline Stress Treatment

The effect of different pH values (pH = 4.5 and pH = 9.6) was analyzed using the culture in 5 mL of TSB with 20% ($v/v$) NaOH and 2 M $H_3PO_4$. TSB was mixed with NaOH or $H_3PO_4$ (sterilization was performed by filtering the additives on syringe filters (MF-Millipore™ Membrane Filter, 0.22 µm pore size) and adding them to a sterile medium under a laminar chamber) to obtain the appropriate pH value. The pH of the medium after the addition of NaOH or $H_3PO_4$ was confirmed with a pH meter (CP-501, Elmetron, Zabrze, Poland). *S. aureus* strains were grown in TSB broth as a control. This experiment was performed in duplicate to obtain two independent samples of each staphylococci strain grown under control conditions (TSB), and stress conditions (TSB adjusted pH = 4.5 and pH = 9.6). Strains were statically cultured at 37 °C for 24 h (late stationary phase).

### *2.4. Survival Analysis*

After stress treatments, the samples were divided into three equal volumes. Each sample constituted the material for conducting flow cytometry analysis, plate count method analysis, and RNA extraction (Figure 1).

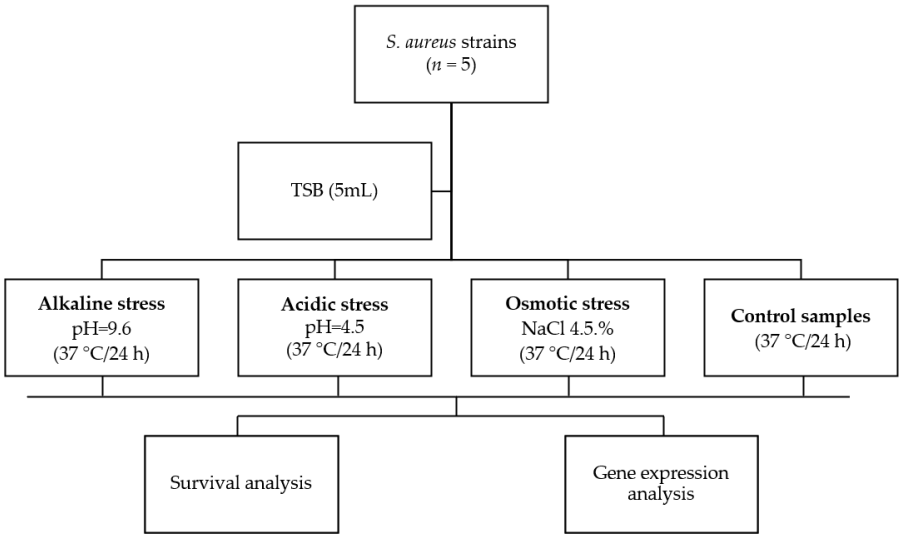



**Figure 1.** Flow chart describing the experiment's design.

#### 2.4.1. Flow Cytometer Adjustment

A flow cytometer was adjusted as described in previous work [19]. Shortly, fluorochrome stock solutions were prepared in proportions of 1:1 of SYTO®9 (5 mM) and PI (20 mM). Staining of live (24 h culture) and dead (killed with 70% isopropanol) cells was performed by adding 2 mL of culture to 6 µL of dye working solutions. Then, the solutions were kept for 15 min at room temperature (20 ± 2 °C) and analyzed with a flow cytometer (FACSlyric, Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). The flow cytometer's excitation laser had a wavelength of 488 nm, and the fluorescence emissions were collected in the red and green channels. Two solutions (SYTO®9-stained LCS and PI-stained DCS) were used

for the identification of live and dead bacteria cells and for the most appropriate cytometric parameters to avoid interference from emission spectra. Logarithmic signal amplification was employed in combination with forward scatter, side scatter, and fluorescence.

#### 2.4.2. Plate Count Method

To check the survival rate of staphylococci strains by the plate count method, a series of ten-fold dilutions was performed for each strain before and after exposure to the tested stressors. After incubation on TSA agar at 37 °C for 48 h, the number of colony forming units (CFU/mL) was counted.

### *2.5. RNA Extraction and Reverse Transcription*

The Total RNA Mini Plus Kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) was used to extract a total RNA from fresh 24 h culture (as a control) and from strains subjected to osmotic, alkaline, and acidic stress. In the next step, the Clean-Up RNA Concentrator Kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) was used for purification and concentration of the obtained RNA. To check the RNA integrity, 10 µL of RNA was loaded into a 1.2% agarose gel in 0.5% Tris/Borate/EDTA (TBE) buffer and run at 90 V for 1 h. The RNA integrity was determined by visualizing the two bands (16S and 23S RNA). RNA concentration was measured using a DeNovix DS-11 spectrophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, NC, USA).

After that, all RNA samples were used for first-strand cDNA synthesis using the TranScriba Kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland), using a dN-heksamer as primers. The obtained cDNA was then stored at –20 °C for further analysis.

### *2.6. Real-Time PCR Analysis of Gene Expression*

Gene expression analysis was carried out using a RotorGene Q-System (Qiagen Inc., Montreal, ON, Canada). Three independent reactions were performed for each tested gene. As the housekeeping gene, the 16S rRNA gene was chosen. For each primer pair, amplification efficiency was calculated as E = 10 (−1/slope) [20].

Gene expression among tested samples was analyzed using relative quantification, in which relevant gene expression is normalized to housekeeping genes, using the mathematical model proposed and validated by Pfaffi (2001) [20]. A threshold was defined using the software for real-time PCR reactions. The obtained results were interpreted as follows: values $\geq 2$ indicate a significant increase in gene expression, while values $\leq 0.5$ indicate a significant decrease in gene expression.

Primers sequences for housekeeping genes (16S RNA) and enterotoxin genes according to the data from the literature, are presented in Table 1. Gene expression analysis was performed three times. The qPCR reactions were performed in a volume of 10 µL, which contained 5 µL of PowerUp SYBR Green MasterMix (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA), 1 µL of each primer (800 nM), and 10 ng of template cDNA, filled up with $ddH_2O$ to a final volume. The relative gene expression (REG) detected for each gene and stress condition were considered significant ($p < 0.05$) based on a t-test utilizing the RGE of the control as the reference. The real-time cycling conditions were as follows: 50 °C for 2 min, initial denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and 60 s at temperature adjusted for primer set. The specificity of the real-time PCR product was determined by the construction of the melting curve by heating on a slow ramp between 60 and 95 °C in increments of 0.5 °C for 5 s.

### *2.7. Statistical Analysis*

Statistical analysis of the data obtained was carried out using the Student's t-test and/or the one-way ANOVA at a significance level of $\alpha = 0.05$ using Prism 9.4.1 (Prism, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

**Table 1.** Primers used in this study.

| Gene | Primer Sequences | Size (bp) | References |
|---|---|---|---|
| *sea* | F: TTGGAAACGGTTAAAACGAA<br>R: GAACCTTCCCATCAAAAACA | 120 | [21] |
| *seg* | F: TTACAAAGCAAGACACTGGCTCA<br>R: TCCAGATTCAAAYGCAGAACMAT | 73 | [22] |
| *sei* | F: GGTAYCAATGATTTGATCTCAGAAT<br>R: GTATTGTCCTGATAAAGTGGCC | 147 | |
| *selm* | F: TCATATCGCAACCGCTGATGATG<br>R: TCAGCWGTTACTGTCGAATTAT | 150 | |
| *seln* | F: GATGAAGAGARAGTTATAGGCGT<br>R: ATGTTACCGGTATCTTTATTGTAT | 167 | |
| *selo* | F: GTGTAAGAAGTCAAGTGTAGAC<br>R: CAGCAGATWTTCCATCTAACC | 163 | |
| *selu* | F: AAAATATGGAGTTGTTGGAATGAAGTT<br>R: TTCTCTTGGGCTTTAATGTTTGTTT | 201 | [23] |
| *selp* | F: ATTTACAAAAAAAGTCTGAATTGCAGG<br>R: TGGCGGTGTCTTTTGAACC | 201 | |
| 16S RNA | F: CCGCCTGGGGAGTACG<br>R: AAGGGTTGCGCTCGTTGC | 240 | [24] |

## 3. Results

### 3.1. Characterization of S. aureus Strains

All tested isolates harbored at least one SEs gene; however, only one strain possessed a *sea* gene. Other classical enterotoxins genes (*seb*, *sec*, *sed*, and *see*) were not detected. As a result of the conducted research, it was shown that the most dominant SE genes were *seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo*, and *selu*. The *selp* gene was detected in two isolates (Table 2). The genetic divergence of tested *S. aureus* strains was confirmed by ANI analysis (Supplementary Table S1).

**Table 2.** Characteristics of *S. aureus* strains analyzed in the study.

| Isolate Code | Source | ST Type | CC | *spa* Type | Enterotoxin Genes |
|---|---|---|---|---|---|
| 35 G | cheese | ST 109 | CC1 | t693 | *seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo*, *selu* |
| 36 G | curd | ST 7 | CC1 | t91 | *selp* |
| 39 G | swab-form | ST 109 | CC1 | t693 | *seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo*, *selu* |
| 45 G | curd | ST 7 | - | t91 | *selp* |
| 47 G | swab | ST 5 | CC5 | t2 | *sea*, *seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo*, *selu* |

### 3.2. Survival Analysis

Calculated *S. aureus* survival after exposure to tested stress factors is shown in Table 3. The highest survival rates (mean values) of *S. aureus* were observed after exposure to pH = 9.6 (average 95.68%), while the lowest survival rate was observed in response to pH = 4.5 (average 73.04%). Thus, the greatest reduction in bacterial cells was observed after treatment with pH = 4.5 (average 26.96%). Based on statistical analysis, there were no statistically significant differences between the survival of strains obtained by plate count and flow cytometry methods ($p > 0.05$).

**Table 3.** Results of the survival analysis among tested strains.

| | pH = 4.5 | | | pH = 9.6 | | | NaCl | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Isolate Code** | **L [%]** | **D [%]** | **CFU Reduction * [%]** | **L [%]** | **D [%]** | **CFU Reduction * [%]** | **L [%]** | **D [%]** | **CFU Reduction * [%]** |
| 35 G | 74.17 | 25.83 | 26.8 | 95.73 | 4.27 | 5.21 | 94.56 | 5.44 | 6.25 |
| 36 G | 68.46 | 31.54 | 32.81 | 96.2 | 3.8 | 4.85 | 95.4 | 4.6 | 3.96 |
| 39 G | 67.64 | 32.36 | 31.95 | 95.82 | 4.18 | 3.95 | 92.62 | 7.38 | 8.17 |
| 45 G | 83.63 | 16.37 | 17.37 | 94.92 | 5.08 | 6.48 | 95.33 | 4.67 | 5.14 |
| 47 G | 71.3 | 28.7 | 33.3 | 95.74 | 4.26 | 5.81 | 96.03 | 3.97 | 4.26 |

* plate count method L—live cells; D—dead cells.

### *3.3. Expression of Enterotoxins Gene*

In this study, the expression of enterotoxigenic genes among *S. aureus* strains was evaluated. The most tested enterotoxins gene, after exposure to pH = 4.5 stress, has similar expression as in the optimal condition. The highest expression was observed for the *selu* gene (average 1.6). For the *selp* gene, which occurred in two strains, no significant decrease in expression levels was observed (relative gene expression levels <0.5). In the 47 G strain, under expression was noted, the value of which was 0.52 (Figure 2).

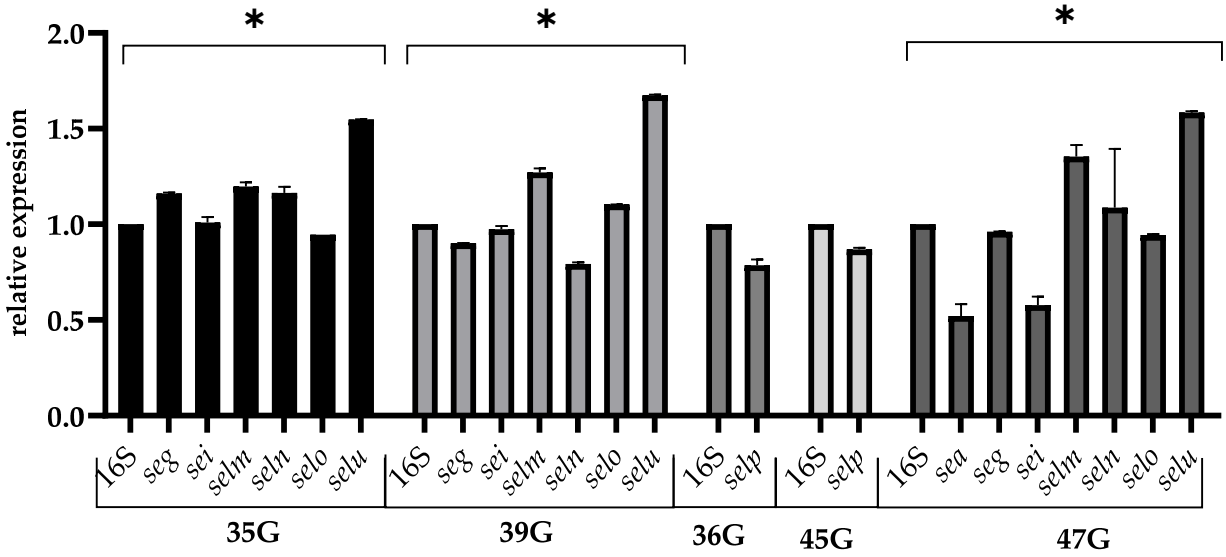



**Figure 2.** Relative expression of the enterotoxins gene among *S. aureus* strains cultured in TSB adjusted to pH = 4.5 for 24 h (late stationary phase). The data represent the mean and standard deviation of 3 independent experiments. Error bars represent SD. Asterisks denote a statistically significant difference ($p < 0.05$).

The relative expression of enterotoxin genes after alkaline treatment (pH = 9.6) among tested strains is shown in Figure 3. Similar to acid stress, among the most tested enterotoxins genes, a similar expression as for the optimal condition was observed. A higher expression level was observed for the *selu* and *selo* genes, which averaged 1.67 and 1.32, respectively. A higher, significant decrease in expression level was observed for the *sea* gene, which was 0.21. The statistical results showed significant differences in gene expression within a strain ($p < 0.05$).

The analysis of gene expression in response to stress caused by NaCl showed that the expression of *selp* decreased, but this decrease was not significant (relative gene expression level >0.5). In response to this stress, for *selu*, *selm*, and *selo* genes, an increase in relative expression was observed, but it was not defined as significant (average 1.77; 1.42; 1.30, respectively). Significantly decreased expression of the *sea* gene was observed (<0.5) (Figure 4).

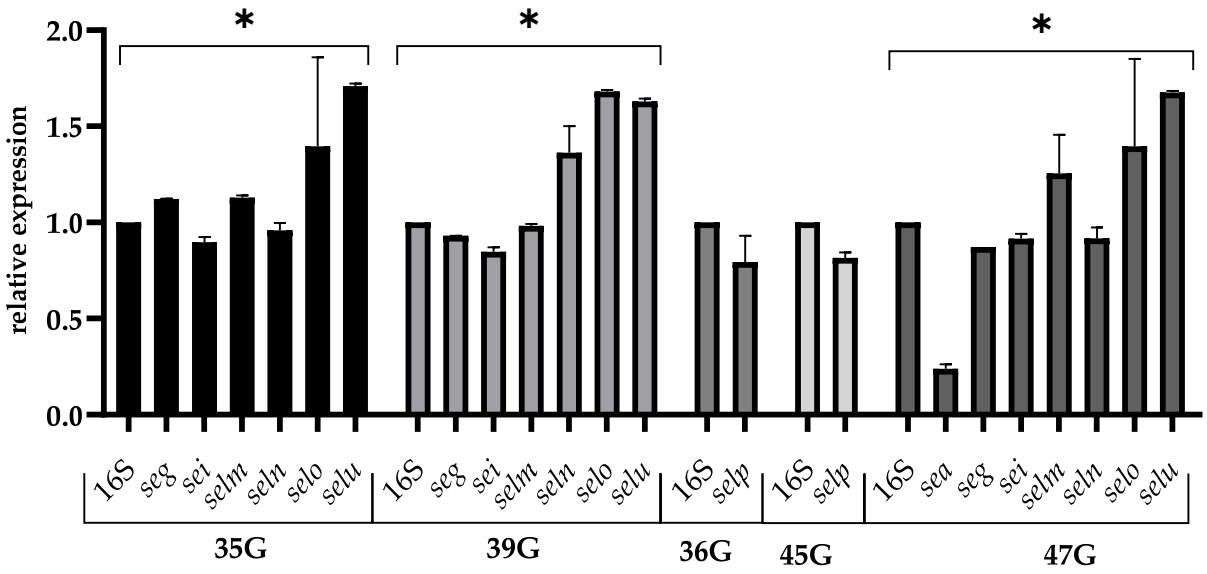



**Figure 3.** Relative expression of the enterotoxin gene among *S. aureus* strains in TSB adjusted to pH = 9.6 for 24 h (late stationary phase). The data represent the mean and standard deviation of 3 independent experiments. Error bars represent SD. Asterisks denote a statistically significant difference ($p < 0.05$).

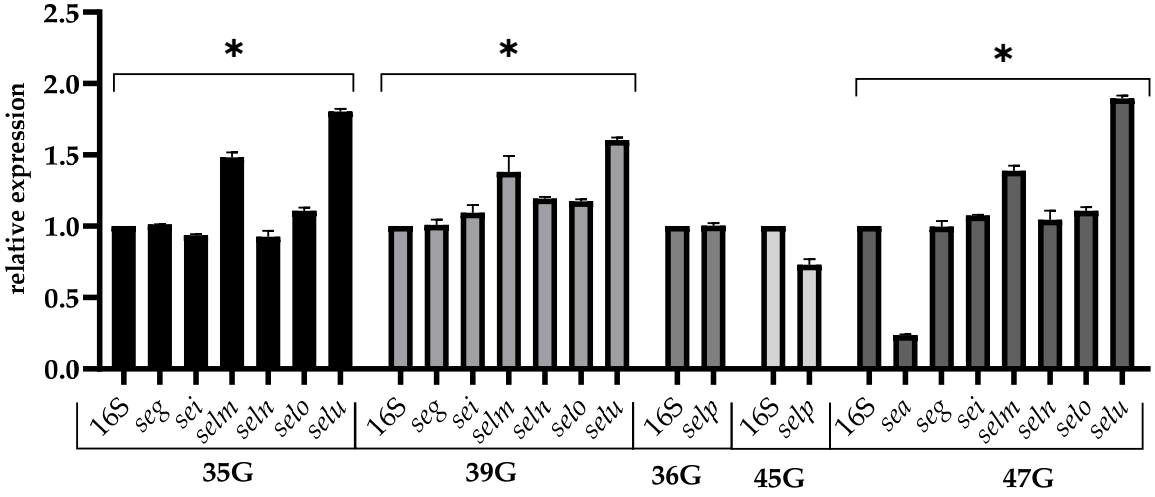



**Figure 4.** Relative expression of the enterotoxins gene among *S. aureus* strains cultured in TSB adjusted to 4.5% NaCl for 24 h (late stationary phase). The data represent the mean and standard deviation of 3 independent experiments. Error bars represent SD. Asterisks denote a statistically significant difference ($p < 0.05$).

Based on statistical analysis, statistically significant differences were observed for seg, sei, *selm*, *seln*, and *selo* gene expression after exposure to the tested stressors ($p < 0.05$; Table S3).

## 4. Discussion

Staphylococcal enterotoxins (SEs), produced by *S. aureus*, are often responsible for staphylococcal food poisoning (SFP) worldwide [25]. In the food industry, food safety is ensured through precautions tailored to the risks associated with a particular product. These measures are based on Good Hygiene Practices (GHP) principles and Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) systems [26].

The mentioned criteria define the maximum permitted levels of live cells of coagulase-positive staphylococci in food, and they apply during or at the end of the production

process, depending on the food category. For example, the acceptable level of live *S. aureus* cells in RTE (ready-to-eat) foods should be below $10^3$ CFU/g. These rules also define that SEs must not be found in 25 g of food in any of the sample units. To guarantee the safety of food, it is crucial to establish microbiological standards for the enumeration of *S. aureus* and the detection of enterotoxins in food products. Despite their widespread use, these standards have several limitations. As one of them, the number of *S. aureus* cells is not always a sufficient indicator of the presence of enterotoxins in food. This is related to the fact that not all *S. aureus* strains are enterotoxigenic and/or express enterotoxins. It is worth noting that despite the fact that most *S. aureus* cells have been reduced using, for example, heat treatment, staphylococcal enterotoxins show resistance to high temperatures and can still show biological activity and be a causative agent of food poisoning. As per the rules, the examination of an enterotoxin is mandatory only if the values of *S. aureus* cells exceed $10^5$ CFU/g. However, recent research indicates that even in cases where this number is lower, the presence of enterotoxins can still be identified [26,27].

The growth and survival of *S. aureus* are dependent on a number of environmental factors. The study showed that tested strains had high survival abilities against the stress factors (osmotic, alkaline, and acidic) used in this study (73.04–95.68%). The high survival rate under various environmental conditions confirmed that *S. aureus* can easily contaminate food and potentially grow in it. Therefore, it is isolated from various food products, including milk and dairy products, meat and meat products, poultry and egg products, and seafood [28]. At the same time, it is worth mentioning that the growth dependency of SE expression is linked to regulatory elements. For example, SarA is active during the exponential growth phase, whereas Agr is active when cell densities increase during the transition to the stationary growth phase. Activation of the Agr affects leads to down-regulation of Rot, which leads to increased toxins expression [29,30].

As described previously, *S. aureus* may possess one or more enterotoxin and enterotoxin-like genes (SEs/SEls) [26]. Nevertheless, it is worth emphasizing that the harboring of enterotoxin genes does not imply that they have the capability to express them, even when provided with ideal nourishment and developmental conditions [18,31]. The reason for this phenomenon may be the complexity of the genetic expression of enterotoxin genes, which consists of a network of regulatory systems that can act both independently and in coordination [32]. Therefore, it is important to determine the impact of food-related stresses (e.g., changing pH, different temperatures, lowering the $a_w$ value, as well as the addition of preservatives) on staphylococcal enterotoxicity [33].

One of the food preservation methods is the addition of salt. Nevertheless, *S. aureus* may survive in high NaCl concentrations, which results in the contamination of *S. aureus* in salted food that cannot be eradicated [34,35]. For all that, the concentration of NaCl might still act by affecting SE production. The presence and even growth of *S. aureus* in foods with a high content of NaCl can still be safe for consumers if enterotoxin production is sufficiently inhibited. Therefore, it is important to know the mechanisms responsible for the production of enterotoxins in the presence of NaCl [33].

Most pathogens, including *S. aureus,* can be inhibited when $a_w$ is in the range of 0.80–0.92. For this purpose, drying or the addition of high concentrations of salt or sugar are used. The selected NaCl level used in our study mimicked the stress conditions encountered during the production of many foodstuffs (including dairy and meat products). *S. aureus* is known to be able to grow in high concentrations of NaCl (3.5 M). However, low water activity ($a_w$) conditions (~0.86) have been shown to be effective in limiting SEs production [36]. Shito et al. (2015) [18] showed that 4.5% NaCl led to a decrease in *sed* expression (significant changes) among four strains, while an increase in expression of this gene was noted in only one strain. Moreover, a 30% sugar concentration caused a decreased *sed* expression, but only one strain showed significant changes [14]. In the study conducted by Etter et al. (2022) [33], equal or increased *sec* mRNA levels were found after treatment with mild NaCl stress for all tested strains. The authors showed that even a small increase in the range of 1–4.5% NaCl had an effect on *sec* expression [33]. In this study, an

increase in relative expression was observed for *selu*, *selm*, and *selo* genes under 4.5% NaCl. Therefore, according to the obtained data and previously observed observations, it can be assumed that changing levels of NaCl concentration affect the transcriptional regulation of enterotoxin genes among staphylococci.

In the food industry, acid addition is used to reduce or inhibit bacterial growth. This is achieved by adding an acidifying agent as well as by enhancing natural fermentation. However, the inhibitory effect of acids depends on a number of factors, including, but not limited to, the concentration and type of acid, exposure time, and the buffering capacity of the food. Data in the literature show that, on the protein level, enterotoxin production is at its highest in a pH range between 6 and 7 [37]. Moreover, data also showed that expression of *sea* occurred under the influence of acetic acid (pH = 6.0) as a result of prophage induction [38]. On the contrary, Sihto et al. (2015) showed that lactic acid stress (pH = 6.0) affected *sed* expression, but this stress did not lead to significant changes [18]. In an older study, it was shown that mild acetic acid stress (pH 7–5.5) had an influence on prophage induction and also increased *sea* expression among tested isolates. The authors also showed that no or very low levels of *sea* mRNA and SEA were detected at pH 4.5–5.0 [38]. In the present study, it was observed that the most tested enterotoxins gene, after exposure to pH = 4.5 and pH = 9.6 stress, had similar expression as in the optimal condition.

It is worth noting that *S. aureus* is a foodborne pathogen that exhibits a competitive growth advantage in foods with high sugar or salt concentrations or a low pH. Although over the past few years many different studies [14,18,25,33,39,40] have attempted to expand on the impact of food-related stress conditions on SEs expression, there is still limited data explaining the role of stress on enterotoxins gene expression.

Despite the fact that this study focused on the expression of genes of a newly described staphylococcal enterotoxin, based on experiments in culture media, the obtained results showed that the staphylococcal expression of enterotoxin genes may change in response to food-related stressors. Whereas the studies conducted took place under laboratory conditions using laboratory media, further studies should focus on studying the expression of SEs genes in the food matrix. Also, our study shows the expression of selected genes only in growth in the stationary phase; it is worth noting that the growth phase can also affect the expression of many virulence factors.

## 5. Conclusions

It was noted that critical food-related stressors (changing pH and NaCl concentration) had an influence on SE gene expression in *S. aureus*. This observation may be useful for risk assessment. The obtained results showed that food-related stress can influence staphylococcal enterotoxins expression, which cannot be predicted based exclusively on viable cell counts. Data about the relative expression of those genes, encoding Sels, provides information about changes in response to food and environmental stresses. It can be assumed that changes in gene expression levels under stress depend on the strain.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens12070954/s1, Table S1: ANI values among tested strains. Table S2; Statistical significance between expressions after exposure to tested stressor among each strains. Table S3: Statistical significance between expressions each genes after exposure to tested stressor.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.G.; methodology, J.G. and A.J.Z.; validation, J.G.; investigation, J.G. and A.J.Z.; data curation, J.G. and A.J.Z.; writing—original draft preparation, J.G.; writing—review and editing, A.J.Z., W.C.-W. and A.Z.; visualization, J.G. and A.J.Z.; supervision, W.C.-W. and A.Z.; project administration, J.G.; funding acquisition, J.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded in whole by the National Science Centre (Poland), grant number: 2021/41/N/NZ9/00918 (PRELUDIUM-20). The publication was written as a result of the author's internship in the Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, co-financed by the European Union under the European Social Fund (Operational Program Knowledge Education Development), carried out in the project Development Program at the University of Warmia and Mazury in Olsztyn (POWR.03.05. 00-00-Z310/17).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Homsombat, T.; Boonyayatra, S.; Awaiwanont, N.; Pichpol, D. Effect of temperature on the expression of classical enterotoxin genes among staphylococci associated with bovine mastitis. *Pathogens* **2021**, *10*, 975. [CrossRef]
2. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. *EFSA J.* **2022**, *20*. [CrossRef]
3. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2022**, *20*. [CrossRef]
4. Szczuka, E.; Porada, K.; Wesołowska, M.; Łęska, B. Occurrence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy products. *Molecules* **2022**, *27*, 4649. [CrossRef]
5. Johler, S.; Giannini, P.; Jermini, M.; Hummerjohann, J.; Baumgartner, A.; Stephan, R. Further evidence for staphylococcal food poisoning outbreaks caused by egc-Encoded enterotoxins. *Toxins* **2015**, *7*, 997–1004. [CrossRef]
6. Hennekinne, J.A.; De Buyser, M.L.; Dragacci, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36*, 815–836. [CrossRef]
7. Zhao, Y.; Zhu, A.; Tang, J.; Tang, C.; Chen, J.; Liu, J.; Zhao, Y.; Zhu, A. Identification and measurement of staphylococcal enterotoxin-like protein I (SEll) secretion from *Staphylococcus aureus* clinical isolate. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *121*, 539–546. [CrossRef] [PubMed]
8. Abdeen, E.E.; Mousa, W.S.; Abdel Salam, S.Y.; Al-Maary, K.S.; Mubarak, A.S.; Moussa, I.M.; Hemeg, H.A.; Almuzaini, A.M.; Alajaji, A.I.; Alsubki, R.A.; et al. Antibiogram and phylogenetic diversity of enterotoxigenic Staphylococcus aureus strains from milk products and public health implications. *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**, *27*, 1968–1974. [CrossRef]
9. Benkerroum, N. Staphylococcal enterotoxins and enterotoxin-like toxins with special reference to dairy products: An overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58*, 1943–1970. [CrossRef]
10. Pinchuk, I.V.; Beswick, E.J.; Reyes, V.E. Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins* **2010**, *2*, 2177–2197. [CrossRef] [PubMed]
11. Balaban, N.; Rasooly, A. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *61*, 1–10. [CrossRef]
12. Omoe, K.; Hu, D.L.; Ono, H.K.; Shimizu, S.; Takahashi-Omoe, H.; Nakane, A.; Uchiyama, T.; Shinagawa, K.; Imanishi, K. Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. *Infect. Immun.* **2013**, *81*, 3627–3631. [CrossRef]
13. Baumgartner, A.; Niederhauser, I.; Johler, S. Virulence and resistance gene profiles of staphylococcus aureus strains isolated from ready-to-eat foods. *J. Food Prot.* **2014**, *77*, 1232–1236. [CrossRef] [PubMed]
14. Sihto, H.M.; Tasara, T.; Stephan, R.; Johler, S. Growth behavior and temporal enterotoxin D expression of Staphylococcus aureus strains under glucose and lactic acid stress. *Food Control* **2016**, *62*, 69–73. [CrossRef]
15. Gajewska, J.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. Occurrence and Characteristics of Staphylococcus aureus Strains along the Production Chain of Raw Milk Cheeses in Poland. *Molecules* **2022**, *27*, 6569. [CrossRef]
16. Lee, I.; Chalita, M.; Ha, S.M.; Na, S.I.; Yoon, S.H.; Chun, J. ContEst16S: An algorithm that identifies contaminated prokaryotic genomes using 16S RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67*, 2053–2057. [CrossRef] [PubMed]
17. Goris, J.; Konstantinidis, K.T.; Klappenbach, J.A.; Coenye, T.; Vandamme, P.; Tiedje, J.M. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2007**, *57*, 81–91. [CrossRef] [PubMed]
18. Sihto, H.M.; Tasara, T.; Stephan, R.; Johler, S. Temporal expression of the staphylococcal enterotoxin D gene under NaCl stress conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **2015**, *362*, fnv024. [CrossRef]
19. Zakrzewski, A.J.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. Ceviche-Natural Preservative: Possibility of Microbiota Survival and Effect on L. monocytogenes. *Foods* **2022**, *11*, 860. [CrossRef] [PubMed]
20. Pfaffi Michael, W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2069–2082.
21. Leke, A.; Goudjil, S.; Mullie, C.; Grognet, S.; Biendo, M. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes and exfoliative toxin genes in methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus strains from raw human breast milk. *Clin. Nutr. Exp.* **2017**, *14*, 26–35. [CrossRef]

22. He, X.; Ahn, J. Differential gene expression in planktonic and biofilm cells of multiple antibiotic-resistant Salmonella Typhimurium and Staphylococcus aureus. *FEMS Microbiol. Lett.* **2011**, *325*, 180–188. [CrossRef]
23. Mørk, T.; Kvitle, B.; Mathisen, T.; Jørgensen, H.J. Bacteriological and molecular investigations of Staphylococcus aureus in dairy goats. *Vet. Microbiol.* **2010**, *141*, 134–141. [CrossRef]
24. Şanlıbaba, P. Prevalence, antibiotic resistance, and enterotoxin production of Staphylococcus aureus isolated from retail raw beef, sheep, and lamb meat in Turkey. *Int. J. Food Microbiol.* **2022**, *361*, 109461. [CrossRef]
25. Schelin, J.; Susilo, Y.B.; Johler, S. Expression of staphylococcal enterotoxins under stress encountered during food production and preservation. *Toxins* **2017**, *9*, 401. [CrossRef]
26. Schwendimann, L.; Merda, D.; Berger, T.; Denayer, S.; Feraudet-Tarisse, C.; Kläui, A.J.; Messio, S.; Mistou, M.Y.; Nia, Y.; Hennekinne, J.A.; et al. Staphylococcal Enterotoxin Gene Cluster: Prediction of Enterotoxin (SEG and SEI) Production and of the Source of Food Poisoning on the Basis of vSaβ Typing. *Appl. Environ. Microbiol.* **2021**, *87*, e02662-20. [CrossRef] [PubMed]
27. Johler, S.; Weder, D.; Bridy, C.; Huguenin, M.C.; Robert, L.; Hummerjohann, J.; Stephan, R. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *J. Dairy Sci.* **2015**, *98*, 2944–2948. [CrossRef] [PubMed]
28. Lim, K.L.; Khor, W.C.; Ong, K.H.; Timothy, L.; Aung, K.T. Occurrence and Patterns of Enterotoxin Genes, spa Types and Antimicrobial Resistance Patterns in Staphylococcus aureus in Food and Food Contact Surfaces in Singapore. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1785. [CrossRef]
29. Pader, V.; James, E.H.; Painter, K.L.; Wigneshweraraj, S.; Edwards, A.M. The agr quorum-sensing system regulates fibronectin binding but not hemolysis in the absence of a functional electron transport chain. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 4337–4347. [CrossRef]
30. Le, K.Y.; Otto, M. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1174. [CrossRef]
31. Carfora, V.; Caprioli, A.; Marri, N.; Sagrafoli, D.; Boselli, C.; Giacinti, G.; Giangolini, G.; Sorbara, L.; Dottarelli, S.; Battisti, A.; et al. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in Staphylococcus aureus isolated from milk and dairy products in Central Italy. *Int. Dairy J.* **2015**, *42*, 12–15. [CrossRef]
32. Bronner, S.; Monteil, H.; Prévost, G. Regulation of virulence determinants in Staphylococcus aureus: Complexity and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **2004**, *28*, 183–200. [CrossRef]
33. Etter, D.; Ukowitz, C.; Eicher, C.; Tasara, T.; Johler, S. Mild NaCl Stress Influences Staphylococcal Enterotoxin C Transcription in a Time-Dependent Manner and Reduces Protein Expression. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 820067. [CrossRef] [PubMed]
34. Kim, N.H.; Cho, T.J.; Rhee, M.S. Sodium Chloride Does Not Ensure Microbiological Safety of Foods: Cases and Solutions. *Adv. Appl. Microbiol.* **2017**, *101*, 1–47. [PubMed]
35. Feng, Y.; Ming, T.; Zhou, J.; Lu, C.; Wang, R.; Su, X. The Response and Survival Mechanisms of Staphylococcus aureus under High Salinity Stress in Salted Foods. *Foods* **2022**, *11*, 1503. [CrossRef] [PubMed]
36. Lopes, G.V.; Bastos, C.P.; da Silva, W.P. The effect of sodium chloride and temperature on the levels of transcriptional expression of staphylococcal enterotoxin genes in Staphylococcus aureus isolates from broiler carcasses. *Brazilian J. Microbiol.* **2021**, *52*, 2343–2350. [CrossRef]
37. Genigeorgis, C.; Foda, M.S.; Mantis, A.; Sadler, W.W. Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production. *Appl. Microbiol.* **1971**, *21*, 862–866. [CrossRef] [PubMed]
38. Wallin-Carlquist, N.; Cao, R.; Márta, D.; Da Silva, A.S.A.; Schelin, J.; Rådström, P. Acetic acid increases the phage-encoded enterotoxin A expression in Staphylococcus aureus. *BMC Microbiol.* **2010**, *10*, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
39. Susilo, Y.B.; Sihto, H.M.; Rådström, P.; Stephan, R.; Johler, S.; Schelin, J. Reduced enterotoxin D formation on boiled ham in staphylococcus aureus Δagr mutant. *Toxins* **2017**, *9*, 263. [CrossRef]
40. Etter, D.; Büchel, R.; Patt, T.; Biggel, M.; Tasara, T.; Cernela, N.; Stevens, M.J.A.; Johler, S. Nitrite stress increases staphylococcal enterotoxin C transcription and triggers the SigB regulon. *FEMS Microbiol. Lett.* **2022**, *369*, fnac059. [CrossRef]


**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Olsztyn, 17.05.2024
(miejscowość, data)

mgr inż. Joanna Gajewska
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia żywności i żywienia
(dyscyplina naukowa)

**Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny**
**Technologia żywności i żywienia**
**Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**
**prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak**

**OŚWIADCZENIE**
**autora rozprawy doktorskiej**

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Gajewska J, Zakrzewski AJ, Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A. 2023, *Impact of the Food-Related Stress Conditions on the Expression of Enterotoxin Genes among Staphylococcus aureus.* Pathogens 12(7):954. https://doi.org/10.3390/pathogens12070954

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowaniu koncepcji, udziale w opracowaniu metodologii badań, walidacji metod, przeprowadzeniu większości analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników (tabel rycin) i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny)

Gajewska Joanna
.....
(podpis kandydata)

Olsztyn, 15.05.2024
(miejscowość, data)

mgr inż. Arkadiusz Józef Zakrzewski
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

**Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny**
**Technologia żywności i żywienia**
**Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**
**prof. dr hab. Anna Iwaniak**

**OŚWIADCZENIE**
**współautora**

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:
Gajewska J, Zakrzewski AJ, Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A. *Impact of the Food-Related Stress Conditions on the Expression of Enterotoxin Genes among Staphylococcus aureus*. Pathogens. 2023; 12(7):954. https://doi.org/10.3390/pathogens12070954

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: współóludziale w opracowaniu metodologii, wykonaniu części analiz, udziale w wizualizacji uzyskanych wyników, korekcie pierwotnej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Joannę Gajewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Joanny Gajewskiej polegający na: udziale w opracowaniu metodologii badań, walidacji metod, przeprowadzeniu większości analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników (tabel rycin) i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (pełnienie funkcji autora korespondencyjnego).

Zakrzewski Arkadiusz

podpis

Olsztyn, 17.05.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

**Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny**
**Technologia żywności i żywienia**
**Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**
**prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak**

**OŚWIADCZENIE**
**współautora**

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Gajewska J, Zakrzewski AJ, Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A. 2023, *Impact of the Food-Related Stress Conditions on the Expression of Enterotoxin Genes among Staphylococcus aureus.* Pathogens 12(7):954. https://doi.org/10.3390/pathogens12070954

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na korekcie pierwotnej wersji manuskryptu, sformułowaniu krytycznych uwag, opiece merytorycznej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Joannę Gajewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Joanny Gajewskiej polegający na: opracowaniu koncepcji, udziale w opracowaniu metodologii badań, walidacji metod, przeprowadzeniu większości analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników (tabel rycin) i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (pełnienie funkcji autora korespondencyjnego).

Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
.....
Podpis

Olsztyn, 17.05.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

**Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny**
**Technologia żywności i żywienia**
**Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**
**prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak**

**OŚWIADCZENIE**
**współautora**

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Gajewska J, Zakrzewski AJ, Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A. 2023, *Impact of the Food-Related Stress Conditions on the Expression of Enterotoxin Genes among Staphylococcus aureus.* Pathogens 12(7):954. https://doi.org/10.3390/pathogens12070954

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na korekcie pierwotnej wersji manuskryptu, sformułowaniu krytycznych uwag, opiece merytorycznej. mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w korekcie pierwotnej wersji manuskryptu, opiece merytorycznej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Joannę Gajewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Joanny Gajewskiej polegający na: opracowaniu koncepcji, udziale w opracowaniu metodologii badań, walidacji metod, przeprowadzeniu większości analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników (tabel rycin) i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (pełnienie funkcji autora korespondencyjnego ).

Anna Zadernowska
.....
podpis