UNIWERSYTET PRZYRODNICZY w LUBLINIE

Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Dyscyplina naukowa Weterynaria

mgr inż. Agata Hahaj-Siembida

Rozprawa doktorska

Lekooporność i wirulencja koagulazododatnich bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, w aspekcie kontroli infekcji u zwierząt i zagrożenia zdrowia publicznego

Ph.D. thesis title

Drug resistance and virulence of coagulase-positive bacteria of the *Staphylococcus* genus in the context of infection control in animals and public health threats

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej

Promotor: prof. dr hab. Aneta Nowakiewicz

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Monika Greguła-Kania

Lublin, rok 2025

Rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii, Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Badania te zostały sfinansowane w ramach wewnętrznych projektów Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie: Grant nr SD/44/WET/2022 i Grant nr SD/78/WET/2023 finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

Składam serdeczne podziękowania
Pani prof. dr hab. Anecie Nowakiewicz
za poświęcony czas, a także nieocenioną pomoc
oraz cenne wskazówki w opracowaniu niniejszej pracy.

Składam serdeczne podziękowania
Pani dr hab. inż. Monice Greguła-Kania
za niezmierną życzliwość, bezcenne wskazówki i wszechstronną pomoc.

Moim najbliższym dziękuję za
okazane wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość.
Nainiejszą rozprawę dedykuje mojej wspaniłej rodzinie,
a w szegółności mojemu mężowi Adrianowi Siembida
oraz moim rodzicom Zofii i Wojciechowi Hahaj.

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 08.01.2026 Podpis promotora .....

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/Promotorów/Promotora pomocniczego* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD/pendrive wersją elektroniczną.

Data 08.01.2026 Podpis autora .....

* niepotrzebne skreślić

Spis treści

Streszczenie 9

Summary 13

1. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej 16

2. Wstęp 17

2.1. Charakterystyka wybranych gatunków koagulazododatniech Staphylococcus 18

2.1.1. Staphylococcus aureus 19

2.1.2. Staphylococcus pseudintermedius 22

2.2. Problematyka lekooporności wśród Staphylococcus izolowanych od zwierząt 23

2.2.1. Koncepcja „One health" (Jedno zdrowie), a medycyna weterynaryjna 25

2.3. Zwierzęta jako recerwuar *Staphylococcus* 26

2.3.1. Zwierzęta gospdarskie – owce, jako recerwuar *Staphylococcus* 26

2.3.2. Zwierzęta towarszyące – psy i koty, jako recerwuar *Staphylococcus* 29

2.3.3. Zwierzęta wolno żyjące - lisy, jako recerwuar *Staphylococcus* 30

3. Hipoteza i cel pracy 32

3.1. Hipoteza badawcza 32

3.2. Cel badań 33

4. Materiały i metody 34

4.1. Materiał biologiczny 34

5. Metodyka 41

5.1. Mikrobiologia 41

5.1.1. Izolacja i identyfikacja szczepów oraz izolacja materiału genetycznego 41

5.1.1.1. Zwierzęta gospodarskie 41

5.1.1.1.1. Mleko (owce) 41

5.1.1.1.2. Wymazy i mleko (owce) 43

5.1.1.2. Zwierzęta towarzyszące (psy i koty) 43

5.1.1.3. Zwierzęta wolno żyjące (lisy rude) 43
5.1.2. Ocena fenotypowej lekowrażliwości szczepów 43
5.1.2.1. Metoda dyfuzyjno- krążkowa 43
5.1.2.2. Minimalne stężenie hamujące (ang. minimum inhibitory concentration) - MIC 44
5.1.3. Ocena molekularnych mechanizmów oporności i wirulencji koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus.* 44
5.1.3.1. Geny oporności 44
5.1.3.2. Geny wirulencji 46
5.1.4. Typowanie molekularne 49
5.1.4.1. Typowanie molekularne w oparciu o metodę wielolokusowej analizy sekwencji genów (ang. mulitilocus sequence typing) - MLST 49
5.1.4.2. Amplifikacja fragmentów DNA otaczających rzadkie miejsca restrykcyjne (*ADSRRS*-fingerprinting) 51
5.2. Markery zapalne 53
5.2.1. Morfologia 53
5.2.2. Izolacja materiału genetycznego 53
5.2.3. Analiza ekspresji wybranych genów cytokin oraz białek ostrej fazy w leukocytach owiec: nosicieli *S. aureus* w porównaniu do kontrolnej grupy zwierząt 54
5.3. Analiza statystyczna 56
5.3.1. Zwierzęta gospodarskie 56
5.3.2. Zwierzęta towarzyszące 57
5.3.3. Zwierzęta wolno żyjące 57
6. Wyniki 58
6.1. Wyniki część mikrobiologiczna 58
6.1.1. Izolacja i identyfikacja *Staphylococcus* u różnych gatunków zwierząt 58
6.1.1.1. Zwierzęta gospodarskie 58
6.1.1.2. Zwierzęta towarzyszące 61

6.1.1.3. Zwierzęta wolno żyjące 63
6.1.1.4. Podsumowanie punktu izolacja i identyfikacja *Staphylococcus* spp. od różnych gatunków zwierząt 64
6.1.2. Fenotypowa oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe 66
6.1.2.1. Ocena oporności metodą dyfuzyjno-krążkową 66
6.1.2.1.1. Zwierzęta gospodarskie 66
6.1.2.1.2. Zwierzęta towarzyszące 71
6.1.2.1.3. Zwierzęta wolno żyjące 73
6.1.2.2. Ocena oporności metodą mikrorzcieńczeń, określenie MIC (Minimalne stężenie hamujące) 75
6.1.2.2.1. Zwierzęta gospodarskie 75
6.1.2.2.2. Zwierzęta towarzyszące 77
6.1.2.3. Podsumowanie punktu fenotypowa oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe 85
6.1.2.3.1. Metoda dyfuzyjno-krążkowa 85
6.1.2.3.2. Metoda mikrorozcieńczeń 86
6.1.3. Wyniki prewalencji genów oporności i wirulencji u szczepów *Staphylococcus* wyizolowanych od różnych gatunków zwierząt 87
6.1.3.1. Geny oporności 87
6.1.3.1.1. Zwierzęta gospodarskie 87
6.1.3.1.2. Zwierzęta towarzyszące 91
6.1.3.1.3. Zwierzęta wolno żyjące 92
6.1.3.1.4. Podsumowanie punktu występowanie genów oporności u szczepów *Staphylococcus* izolowanych od różnych gatunków zwierząt 96
6.1.3.2. Geny wirulencji 98
6.1.3.2.1. Zwierzeta gospodarskie 98
6.1.3.2.2. Zwierzęta towarzyszące 99
6.1.3.2.3. Zwierzęta wolno żyjące 100

6.1.3.2.4. Podsumowanie punktu występowanie genów wirulencji u *S. aureus* izolowanych od różnych gatunków zwierząt 101
6.1.4. Typowanie molekularne 102
6.1.4.1. Typowanie molekularne w oparciu o metodę wielolokusowej analizy sekwencji genów) 102
6.1.4.1.1. Zwierzęta gospodraskie 102
6.1.4.1.2. Zwierzęta towarzyszące 102
6.1.4.1.3. Typowanie molekularne w oparciu o metodę wielolokusowej analizy sekwencji genów 103
6.1.4.2. Typowanie metodą ADSRRS-Fingerprinting 105
6.1.4.2.1. Zwierzęta gospodarskie 105
6.1.4.2.2. Zwierzęta towarzyszące 108
6.2. Wyniki części immunologicznej 111
6.2.1. Morfologia małych przeżuwaczy 111
6.2.2. Ekspresja genów wybranych cytokin oraz białek ostrej fazy 111
7. Dyskusja 118
8. Wnioski 149
9. Bibliografia 151

Streszczenie

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* to liczna grupa mikroorganizmów, które z jednej strony są dobrze znanymi komensalami, a z drugiej mogą powodować różnego typu infekcje u zwierząt towarzyszących, gospodarskich i wolno żyjących, a także człowieka. Koagulazododatnie gatunki *Staphylococcus* (ang. coagulase-positive *Staphylococcus* CoPS), kolonizują skórę, błony śluzowe, szczególnie górny odcinek przewodu pokarmowego i dróg oddechowych oraz układ moczowo-płciowy.

Szerokie stosowanie substancji przeciwbakteryjnych, zarówno w terapii, metafilaktyce i produkcji zwierzęcej, znacznie zwiększyło ryzyko rozprzestrzeniania się drobnoustrojów lekoopornych, w tym bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. Dlatego w ostatnich latach jednym z największych problemów medycyny weterynaryjnej stała się narastająca lekooporność mikroorganizmów, w tym koagulazododatnich gatunków *Staphylococcus*. Obecnie szczególną uwagę poświęca się metycylioopornym izolatom *Staphylococcus*, u których jednocześnie często występuje także oporność wielolekowa, tj. oporność na co najmniej trzy antybiotyki należące do różnych klas środków przeciwdrobnoustrojowych.

Celem badań przeprowadzonych w niniejszej pracy była ocena występowania koagulazododatnich gronkowców u zróżnicowanych pod względem gatunku, zakresu terapii i statusu zdrowotnego gospodarzy-zwierząt, w aspekcie analizy porównawczej oraz oceny poziomu lekooporności tych drobnoustrojów, a także czynników wirulencji odpowiedzialnych za występowanie infekcji na tle *Staphylococcus*. Obok oceny zagrożenia dla zdrowia publicznego jakie mogą stanowić wielolekooporne i/lub metycylinooporne bakterie, posiadające dodatkowo szeroki panel czynników wirulencji, badania miały na celu określenie w jakim stopniu poszczególne, istotne z epidemiologicznego punktu widzenia klony bakterii, rozprzestrzeniają się pomiędzy różnymi gatunkami zwierząt. Koagulazododatnie bakterie z rodzaju *Staphylococcus* ze względu na powszechne występowanie u różnych gospodarzy jako komensale, a jednocześnie czynniki infekcyjne wielu chorób o zróżnicowanym obrazie klinicznym, stanowią niezwykle ciekawą i dynamiczną pod względem zmienności grupę drobnoustrojów, która pomimo licznych badań, nadal dostarcza nowych wyzwań. Dlatego również jednym z celów badań była próba wyjaśnienia interakcji między odpowiedzią immunologiczną organizmu gospodarza na obecność tych bakterii poprzez analizę ekspresji genów zaangażowanych w ten proces. W tym ostatnim przypadku docelową grupą badawczą były małe przeżuwacze, a celem

badań była analiza profilu ekspresji genów cytokin: *IL-1α*, *IL-1β*, *TNF-α*, *IL-6* oraz genów białek ostrej fazy *SAA*, *Hp* i *Cp* u dwóch grup zdrowych klinicznie owiec: zwierząt nosicieli CoPS z uwzględnieniem ich czynników wirulencji, oraz owiec, u których nie wykazano obecności CoPS.

Całościowa analiza profilu lekooporności wykazała, iż najwięcej szczepów CoPS było opornych na tetracyklinę (n=160), penicylinę (n=141), klindamycynę (n=128) oraz erytromycynę (n=117). Profil oporności fenotypowej na ogół korelował z obecnością genów, głównie *tet*M oraz *bla*Z.

Zaobserwowano również relatywnie wysoki odsetek oporności na oksacylinę i cefoksytynę, w zależności od gatunku CoPS, przede wszystkim u psów (n=4 *S. aureus* i n=17 *S. psudintermedius*) oraz owiec (n=5 *S. aureus*). W przypadku obu grup zwierząt szczepy izolowano z różnych miejsc, głównie błony śluzowej jamy ustnej. Ponadto trzy szczepy *S. aureus* oporne na metycylinę izolowane od owiec i psów dodatkowo wykazały oporność na wankomycynę.

Przeprowadzone badania wykazały również bogaty profil genów wirulencji. Jednakże, najwięcej szczepów *S. aureus* wyizolowanych od wszystkich grup zwierząt, w tym wolno żyjących, posiadało gen wirulencji *se*B, kodujący jedną z enterotoksyn (n=76) oraz *LukE-LukD,* kodujący leukotoksynę *LUKE/LUKD* (n=63). W przypadku gatunku *S. pseudintermedius* najwięcej szczepów pochodzących wyłącznie od zwierząt towarzyszących posiadało gen s*eL* (n=69) ale warto zauważyć, że geny takie jak *luk*S- *luk*F, kodujące komponenty leukocydyny, *ica*A, *ica*D, kodujące komponenty biofilmu, *siet,* kodujący toksynę eksfoliatywną oraz *Sec* $_{canine}$ odpowiedzialny za kodowanie jednej z eneterotoksyn, występowały niemalże równie często (po 68 szczepów posiadało wcześniej wspomiany gen wirulencji). Ponadto na postawie analizy MLST zidentyfikowano nowe ST (typy sekwencyjne) u trzech szczepów MRSA wyizolowanych od owiec (ST 9313, ST 9314 i ST 9315) oraz w dwóch izolatach MRSA od psów (ST9311, ST9312) i czterech izolatach *S. pseudintermedius*: ST 2739, ST 2740, ST 2741, ST 2742, również pochdzących od psów. Ponadto szczepy wyizolowane od zwierząt gospodarskich oraz szczepy wyizolowane od zwierząt towarzyszących zostało przeanalizowanych z wykorzystaniem metody *ADSRRS*-fingerprinting, w celu porównania ich profili genomowych. Metoda ta okazała się przydatna w przypadku szczepów izolowanych od owiec, wskazując na rozprzestrzenianie się szczepów o takim samym genotypie wśród zwierząt-gospodarzy należących do tego samego

stada. W przypadku małych przeżuwaczy przeprowadzono dodatkowe badania i porównano ekspresję czterech genów cytokin i trzech genów białek ostrej fazy w leukocytach owiec-nosicieli *S. aureus* i bez obecności *S. aureus* (kontrola): *IL-1α*, *IL-1β*, *IL-6*, *TNF-α*, *SAA*, *Hp* i *Cp*. Zaobserwowano statystycznie istotny wzrost zarówno IL-6, jak i Hp w czasie ciąży w leukocytach owiec rasy Uhruska, u których wykazano nosicielstwo *S. aureus*. Podobne tendencje zaobserwowano u owiec rasy Świniarka, ale różnice nie zostały potwierdzone statystycznie.

Podsumowując wyniki uzyskanych badań, wykazano, iż zwierzęta gospodarskie, towarzyszące oraz wolno żyjące są nadal ważnym rezerwuarem koagulazododatnich szczepów, tj. *S. pseudintermedius* i *S. aureus*. Przeprowadzone analizy wykazały również, iż bez względu na gatunek zwierzęcia, najbardziej predylekcyjnym miejscem występowania CoPS jest błona śluzowa jamy ustnej. Należy podkreślić, iż w wielu przypadkach ten sam gospodarz może być nosicielem kilku zróżnicowanych pod względem genomu, w tym profilu oporności i wirulencji oraz typu sekwencyjnego szczepów CoPS, należących do tego samego gatunku. Warto wskazać, iż zwierzęta wolno żyjące pomimo teoretycznie niskiej presji selekcyjnej ze względu na brak stosowania celowanej terapii, również stanowią źródło lekoopornych i wirulentnych szczepów CoPS. W przypadku zwierząt towarzyszących i gospodarskich na szczególną uwagę zasługuje obecność szczepów MRSA, MRSP, szczepów wankomycynoopornych oraz szczepów wielolekoopornych, a biorąc pod uwagę bliski kontakt z człowiekiem, rezerwuary te stanowią źródło szczepów stanowiących potencjalne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Ponadto bogaty profil genów wirulencji w przypadku obu gatunków, szczególnie manifestujący się obecnością genów kodujących enterotoksyny, toksyny eksfoliatywne i toksynę szoku toksycznego, mających właściwości superantygenów dodatkowo może sprzyjać rozwojowi infekcji o ciężkim przebiegu zarówno u samych gospodarzy jak i u człowieka. Wykazanie nowych typów sekwencyjnych (ST), szczególnie wśród szczepów MRSA i MRSP oraz narastająca dominacja ST, dotychczas mających niewielkie znaczenie epidemiologiczne, wskazuje na ciągłą ewolucję oraz rozwijanie nowych mechanizmów adaptacyjnych szczepów CoPS do nowych gospodarzy i nowych środowisk, co przy bogatym panelu czynników oporności i wirulencji, czyni tę grupę bakterii wciąż niepoznanym w pełni zagrożeniem dla zdrowia publicznego. Co więcej, pomimo potwierdzonego statusu komensala u zwierząt, obecność gatunków CoPS nawet bez generowania objawów klinicznych infekcji aktywuje układ odpornościowy gospodarza

o czym świadczą statystycznie istotnie wyższe poziomy IL-6 i Hp u nosicieli *S. aureus*, szczególnie u zwierząt w okresie ciąży.

Słowa klucze: koagulazododatnie *Staphylococcus*, lekooporność, wirulencja, Jedno Zdrowie, zwierzęta

Summary

Bacteria of the *Staphylococcus* genus are a large group of microorganisms that are well-known commensals and can cause various infections in companion animals, farm animals, and wildlife animals, as well as humans. Coagulase-positive *Staphylococcus* species (CoPS) colonize the skin, mucous membranes, particularly the upper gastrointestinal and respiratory tracts, and the genitourinary tract.

The widespread use of antibacterial substances, both in therapy, metaphylaxis, and prophylaxis in animal production, has significantly increased the risk of the spread of drug-resistant microorganisms, including bacteria of the *Staphylococcus* genus. Therefore, in recent years, the increasing drug resistance of microorganisms, including coagulase-positive *Staphylococcus* species, has become one of the greatest challenges in veterinary medicine. Currently, particular attention is being paid to methicillin-resistant *Staphylococcus* isolates, which often also exhibit multidrug resistance, i.e., resistance to at least three antibiotics from different antimicrobial classes.

The aim of the research conducted in this study was to assess the prevalence of coagulase-positive *Staphylococcus* in host animals varying in species, therapeutic range, and health status, with a view to comparative analysis and assessing the level of drug resistance of these microorganisms, as well as the virulence factors responsible for *Staphylococcus* related infections. In addition to assessing the public health threat posed by multidrug-resistant and/or methicillin-resistant bacteria possessing a broad spectrum of virulence factors, the study aimed to determine the extent to which individual, epidemiologically significant bacterial clones spread between different animal species. Due to their widespread occurrence in various hosts as commensals and, at the same time, infectious agents of numerous diseases with diverse clinical presentations, coagulase-positive *Staphylococcus* bacteria constitute an extremely interesting and dynamic group of microorganisms, which, despite numerous studies, continues to present new challenges. Therefore, one of the research goals was to attempt to explain the interaction between the host's immune response to the presence of these bacteria by analyzing the expression of genes involved in this process. In the latter case, the target research group were small ruminants, and the aim of the study was to analyze the expression profile of cytokine genes: *IL-1α*, *IL-1β*, *TNF-α*, *IL-6* and acute phase protein genes *SAA*, *Hp* and *Cp* in two groups of clinically healthy sheep: animals carrying CoPS,

taking into account their virulence factors, and sheep in which the presence of CoPS was not detected.

The overall analysis of the drug resistance profile showed that the majority of CoPS strains were resistant to tetracycline (n=160), penicillin (n=141), clindamycin (n=128), and erythromycin (n=117). The phenotypic resistance profile generally correlated with the presence of genes, primarily *tet*M and *bla*Z.

Relatively high rates of resistance to oxacillin and cefoxitin were also observed, depending on the CoPS species, primarily in dogs (n=4 *S. aureus* and n=17 *S. psudintermedius*) and sheep (n=5 *S. aureus*). In both groups of animals, strains were isolated from various sites, primarily the oral mucosa. Furthermore, three methicillin-resistant *S. aureus* strains isolated from sheep and dogs also demonstrated resistance to vancomycin.

The study also revealed a rich profile of virulence genes. However, the majority of *S. aureus* strains isolated from all animal groups, including wildlife animals, possessed the *se*B virulence gene, encoding one of the enterotoxins (n=76), and *Luk*E-*Luk*D, encoding the *LUKE/LUKD* leukotoxin (n=63). In the case of *S. pseudintermedius*, the majority of strains derived exclusively from companion animals possessed the *se*L gene (n=69). However, it is worth noting that genes such as *luk*S-*luk*F, encoding leukocidin components, *ica*A and *ica*D, encoding biofilm components, *siet*, encoding an exfoliative toxin, and *Sec canine*, responsible for encoding one of the enterotoxins, occurred almost equally frequently (68 strains each possessed the previously mentioned virulence gene). Furthermore, MLST analysis identified new STs (sequence types) in three MRSA strains isolated from sheep (ST 9313, ST 9314, and ST 9315), two MRSA isolates from dogs (ST 9311, ST 9312), and four *S. pseudintermedius* isolates (ST 2739, ST 2740, ST 2741, ST 2742), also from dogs. Furthermore, strains isolated from farm animals and strains isolated from companion animals were analyzed using *ADSRRS*-fingerprinting to compare their genomic profiles. This method proved useful for strains isolated from sheep, indicating the spread of strains with the same genotype among host animals belonging to the same flock. In small ruminants, additional studies were conducted comparing the expression of four cytokine genes and three acute-phase protein genes in leukocytes from sheep carrying *S. aureus* and those without *S. aureus* (control): *IL-1α*, *IL-1β*, *IL-6*, *TNF-α*, *SAA*, *Hp*, and *Cp*. A statistically significant increase in both IL-6 and Hp during pregnancy was observed in leukocytes from Uhruska

sheep carrying *S. aureus*. Similar trends were observed in Świniarka sheep, but the differences were not statistically confirmed.

Summarizing the results of the obtained studies, it was demonstrated that farm animals, companion animals, and wildlife animals remain an important reservoir of coagulase-positive strains, i.e., *S. pseudintermedius* and *S. aureus*. The analyses also showed that regardless of the animal species, the most predilection site for CoPS is the oral mucosa. It is important to emphasize that in many cases, the same host can harbor several CoPS strains belonging to the same species, differing in genome, including resistance and virulence profiles, as well as sequence type. It is worth noting that wildlife animals, despite theoretically low selection pressure due to the lack of targeted therapy, also constitute a source of drug-resistant and virulent CoPS strains. In the case of companion and farm animals, the presence of MRSA, MRSP, vancomycin-resistant strains, and multidrug-resistant strains is particularly noteworthy. Given their close contact with humans, these reservoirs represent a source of strains posing a potential threat to public health. Furthermore, the rich virulence gene profile in both species, particularly manifested by the presence of genes encoding enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock toxin, which possess superantigenic properties, may further promote the development of severe infections in both hosts and humans. The identification of new sequence types (STs), particularly among MRSA and MRSP strains, and the increasing dominance of STs, previously of little epidemiological significance, indicate the continuous evolution and development of new adaptive mechanisms by CoPS strains to new hosts and environments. This, coupled with the rich panel of resistance and virulence factors, makes this group of bacteria a still largely unknown threat to public health. Moreover, despite the confirmed commensal status in animals, the presence of CoPS species, even without generating clinical symptoms of infection, activates the host immune system, as evidenced by statistically significantly higher levels of IL-6 and Hp in *S. aureus* carriers, especially in pregnant animals.

Keywords: Coagulase-Positive *Staphylococcus*, Drug Resistance, Virulence, One Health, Animals

1. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Artykuły opublikowane:

Zwierzęta gospodarskie:

Hahaj-Siembida A, Nowakiewicz A, Greguła-Kania M, Bochniarz M, Trościańczyk A, Osińska M. Characteristics of drug-resistant staphylococci isolated from milk of lambed ewes during the perinatal period. J Vet Res. 2025 Mar 25;69(1):41-50. doi:10.2478/jvetres-2025-0014. PMID: 40144065; PMCID: PMC11936087 **(publikacja nr 1).**

Zwierzęta wolno żyjące:

Hahaj-Siembida A, Nowakiewicz A, Korzeniowska-Kowal A, Szecówka K, Trościańczyk A, Zięba P, Kania MG. Red foxes (Vulpes vulpes) as a specific and underappreciated reservoir of resistant and virulent coagulase-positive *Staphylococcus* spp. strains. Res Vet Sci. 2024 Jan;166:105111. doi: 10.1016/j.rvsc.2023.105111. Epub 2023 Dec 13. PMID: 38113638 **(publikacja nr 5).**

Artykuły w trakcie procesu recenzji (nieopublikowane):

Zwierzęta gospodarskie:

Perinatal occurrence and epidemiological significance of *Staphylococcus aureus* in local sheep breeds **(publikacja nr 2).**

The analysis of host's immune response in two local two breeds of sheep to the presence of *Staphylococcus aureus* during the perinatal period **(publikacja nr 3).**

Zwierzęta towarzyszące:

Companion animals as an increasingly important reservoir of methicillin-resistant and virulent strains of coagulase-positive *Staphylococcus* spp. **(publikacja nr 4).**

2. Wstęp

W ostatnich latach jednym z największych problemów stała się narastająca lekooporność mikroorganizmów. Oporność bakterii na substancje przeciwbakteryjne od wielu lat stanowi jeden z najważniejszych globalnych problemów, dotyczących zagrożenia zdrowia publicznego (Skarżyńska i in., 2020; Hahaj-Siembida i in., 2024; Hahaj-Siembida i in., 2025). Powszechne, nadmierne i niekontrolowane stosowanie substancji w medycynie weterynaryjnej, a także w rolnictwie i hodowli zwierząt, wielokrotnie bez laboratoryjnego potwierdzenia skuteczności stosowanej substancji czynnej, przyczynia się do selekcji opornych szczepów bakterii u zwierząt, a także do ich rozprzestrzeniania się w środowisku. Rosnąca oporność bakterii zarówno komesalicznych jak i chorobotwórczych, a także łatwość rozprzestrzeniania się oporności na drodze wymiany horyzontalnej pomiędzy drobnoustrojami o różnym statusie, przyczynia się również do poważnych powikłań zdrowotnych u człowieka i zwierząt, niezależnie od gatunku (Skarżyńska i in., 2020; Markiewicz i in., 2021). Problem lekooporności dotyczy wielu rodzajów bakterii, w tym bakterii *Staphylococcus*, a w szczególności tzw. koagulazododatnich gatunków *Staphylococcus,* których cechą wspólną jest zdolność do produkcji wolnej koagulazy, uznawanej za jeden z istotnych markerów wirulencji. Rodzaj *Staphylococcus* obejmuje obecnie co najmniej 84 gatunki i 30 podgatunków, które nie tylko stanowią składnik mikrobiomu ludzi i zwierząt, ale mogą również powodować u nich infekcje o zróżnicowanym nasileniu i przebiegu (Haag i in., 2019). Te oportunistyczne patogeny kolonizują głównie skórę i błony śluzowe górnego odcinka przewodu pokarmowego i dróg oddechowych oraz układu moczowo-płciowego (Werckenthin i in., 2001), przez co stanowią ogromne wyzwanie diagnostyczne i terapeutyczne zarówno dla medycyny człowieka, jak również medycyny weterynaryjnej. Bakterie te zostały odkryte przez szkockiego lekarza Alexandra Ogstona w 1880 roku, który nadał im nazwę *Staphylococcus*. Nzawa pochodzi z języka greckiego i oznacza σταφυλή, *staphylē*, czyli grona, i κόκκος, *kókkos*, czyli ziarenko. Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* to Gram-dodatnie ziarniaki, które w większości są fakultatywnymi beztlenowcami, co oznacza, że większość tych bakterii rośnie zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych (Galloway i in., 2011; Kmieciak i in., 2017; Pickering i in., 2021). W praktyce klinicznej oraz diagnostyce nadal funkcjonuje podział gatunków *Staphylococcus* na zdolne do wytwarzania enzymu koagulazy, tj. koagulazododatnie *Staphylococcus* (CPS/ COP/ CoPS) i koagulazoujemne *Staphylococcus* (CNS/ CON/ CoNS), które nie wytwarzają tego enzymu (Kmieciak i in.,

2017). Kryterium to należy odróżnić od szczepów wytwarzających tzw. koagulazę związaną (ang. clumping factor) - cecha ta jest charakterystyczna dla szczepów *S. aureus* i wykorzystywana jest w diagnostyce głównie tego gatunku. Do najważniejszych pod względem klinicznym koagulazododatnich gatunków *Staphylococcus* należą: *S. aureus* ssp. *aureus i S. pseudintermedius,* pozostałe to *S. aureus* ssp. *anaerobius, S. intermedius, S. delphini A i B, S. argenteus, S. lutrae, S. cornubiensis, S. schleiferi* subsp. *coagulans* i koagulazozmienne *S. hyicus* i *S. agnetis* (Kizerwetter-Świda i in., 2017, Pickering i in., 2021). Gatunki te dotychczas uznawane były jako główne czynniki infekcji, niemniej w ostatnich latach również gatunki koagulazoujemne takie jak: *S. epidermidis, S. xylosus, S. simulans, S. condimenti, S. warneri, S. haemolyticus, S. felis, S. saprophyticus, S. caprae, S. succinus, S. vitulinus, S. chromogenes* itp., które jednocześnie mogą stanowić naturalną mikrobiotę wielu gatunków zwierząt, są co raz częściej odpowiedzialne za wiele infekcji oportunistycznych (Podkowik i in., 2014; González-Martin i in., 2020; Kizerwetter-Świda i in., 2021). W 2020 roku w obrębie rodzaju *Staphylococcus* na podstawie analizy filogenetycznej wyodrębniono nowy rodzaj *Mammalicoccus* (Podkowik i in., 2014; González-Martin i in., 2020; Kizerwetter-Świda i in., 2021; Lienen i in. 2022), który obecnie obejmuje pięć gatunków, pierwotnie przyporządkowanych do rodzaju *Staphylococcus: M. sciuri*, *M. fleurettii*, *M. lentus*, *M. vitulinus*, *M. stepanovicii.* Gatunki te szczególnie *M. sciuri i M. lentus* stanowią istotne źródło genów oporności dla szczepów koagulazododatnich, w tym również różnych wariantów kasety genowej SCCmec (Lienen i in. 2022).

2.1. Charakterystyka wybranych gatunków koagulazododatniech *Staphylococcus*

Koagulazododatnie gatunki *Staphylococcus* mogą występować zarówno jako komensale, jak i patogeny zwierząt towarzyszących, gospodarskich, a nawet wolno żyjących. Drobnoustroje te mogą powodować ciężkie, a nawet śmiertelne infekcje zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Warto również zauważyć, że coraz częściej pojawiają się doniesienia potwierdzające możliwość transmisji tych bakterii między różnymi gatunkami zwierząt, a także wymiany tych mikroorganizmów między ludźmi a zwierzętami. Dotyczy to nie tylko zwierząt stanowiących źródło żywności zwierzęcego pochodzenia (zwierzęta gospodarskie), ale także zwierząt towarzyszących i wolno żyjących osiedlających się coraz bliżej ludzkich

siedlisk. Szczególną uwagę zwraca się na wielolekooporne bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, które oprócz szerokiej oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, mogą przenosić wiele czynników wirulencji, które umożliwiają im kolonizację organizmu kolejnego gopsodarza i zwiększają ich zdolność do wywoływania infekcji. W medycynie weterynaryjnej istotnym problemem stały się bakterie *S. aureus* oraz *S. pseudintermediu.* Ten ostatni gatunek jest szczególnie związany ze zwierzętami mięsożernymi, zarówno domowymi (psy) jak i wolno żyjącymi (lisy rude). *S. aureus* jest natomiast izolowany od zwierząt towarzyszących, gospodarskich i wolno żyjących. Warto również zwrócić uwagę na inne koagulazododatnie *Staphylococcus*, które odegrały i nadal odgrywają ważną rolę w weterynarii, a są to: *Staphylococcus intermedius, Staphylococcus delphini, Staphylococcus argenteus, Staphylococcus lutrae, Staphylococcus schleiferi subsp. Coagulans/Staphylococcus coagulans, Staphylococcus hyicus (COP), Staphylococcus agnetis* (Pickering i in., 2021).

2.1.1. Staphylococcus aureus

Gatunek *S. aureus* otrzymał swoją nazwę dzięki niemieckiemu lekarzowi Friedrichowi Rosenbach w 1884 roku. *S. aureus*, potocznie nazywany gronkowiec złocisty (nazwa odnosi się do złotego lub żółtego koloru pigmentu karotenoidowego, który niektóre szczepy wytwarzają). Dzięki dalszym badaniom, które wykazały, że niektóre szczepy tego gatunku rosną wyłącznie w warunkach beztlenowych, wyróżniono dwa podgatunki (*S. aureus subsp. aureus* i *S. aureus subsp. anaerobius*) (Kmieciak i in., 2017). Morfologicznie *S. aureus* jest Gram-dodatnią bakterią o kulistym kształcie. Kolonie są średniej wielkości (2-3 mm średnicy), nieprzezroczyste, białe lub żółte, lekko wypukłe i o gładkich brzegach, otoczone strefą hemolizy typu beta. Często w przypadku szczepów pochodzących od zwierząt dają podwójną strefę hemolizy na agarze z krwią, związaną z pełną hemolizą bezpośrednio wokół kolonii, przechodzącą w niepełną hemolizę związaną z aktywnością hemolizyny beta. Często efekt pełnej hemolizy nasila się po przetrzymywaniu szczepu w lodówce. Jest to tzw. efekt hot-cold hemolizy dotyczący hemolizyny beta i pojawia się często po sekwencyjnym umieszczeniu hodowli w temperaturze 4°C po inkubacji w 37°C. Jest to związane z aktywacją β-hemolizyny o aktywności sfingomielinazy, której efekt działania, tj. rozkład do ceramidów i fosforylocholiny nasila się w niższej temperaturze.

Zakażenia wywołane przez bakterie *S. aureus* stanowią poważny problem zarówno dla ludzi, jak i zwierząt, ponieważ są przyczyną zakażeń i stanów zapalnych skóry i tkanki podskórnej o łagodnym przebiegu oraz trudnych do leczenia powikłań ropnych, występujących głównie

po zabiegach chirurgicznych, a także powodują ropnie w narządach wewnętrznych, jak również infekcji ogólnoustrojowych. U zwierząt gospodarskich, tj. u przeżuwaczy takich jak owce, kozy i bydło może powodować zapalenie wymienia (mastitis) lub chorobę Morela (Miyazawa i in., 2022; Wang i in., 2022; Exel i in., 2023). *S. aureus* jako główna przyczyna zakażeń i chorób u wielu gatunków zwierząt wykorzystywanych do produkcji żywności (w szgeólności zwierząt gospodarskich), ma istotny wpływ na zdrowie publiczne (Peton i in., 2014; Kmieciak i in., 2017). Zakażenia *S. aureus* u zwierząt są również niebezpieczne dla innych zwierząt (tego samego gatunku lub innego gatunku) lub dla ludzi, szególnie osób z obniżoną odpornością. Oznacza to, że zwierzęta mogą stanowić rezerwuar *S. aureus* niebezpieczny dla ludzi, co może prowadzić do chorób zonatycznych (zoonoz). Należy zauważyć, że *S. aureus* został wyizolowany nie tylko od zwierząt domowych np. kotów i psów i zwierząt gospodarskich owiec, kóz, bydła, świń, ale także od zwierząt wolno żyjących, takich jak lisy, wiewiórki, niedźwiedzie, szopy, delfiny, foki pospolite, czarne nosorożce, dziki, małpy człekokształtne, zięby, kaczki krzyżówki, jelenie szlachetne, sępy płowe i koziorożce iberyjskie (Pandey i in., 1998; McBurney i in., 2000; Simpson i in., 2013; Kmieciak i in., 2017; Haag i in., 2019). Liczne badania wykazały również, że izolaty *S. aureus* pochodzące od różnych gatunków zwierząt wykazują zróżnicowane cechy fenotypowe. Czynniki wirulencji *S. aureus* obejmują liczne enzymy ułatwiające inwazję, takie jak: hialuronidaza, która depolimeryzuje kwas hialuronowy w przestrzeni komórkowej, lipaza, deoksyrybonukleaza, koagulaza, fibrynolizyna, która rozpuszcza fibrynę, oraz toksyny: α - hemolizyna, β - hemolizyna, γ - hemolizyna, λ - hemolizyna, leukotoksyna, leukocydyna Panton-Valentine (PVL), które wywołują efekt cytolityczny, a także prowadzą do martwicy tkanek (Kaneko i in., 2003; Kmieciak i in., 2017). Bardzo ważną rolę w patogenezie infekcji *S. aureus,* szczególnie u człowieka odgrywają superantygeny, do których należą enterotoksyny, eksfoliatyny oraz *TSST* (toksyna zespołu wstrząsu toksycznego - 1). Superantygeny wykazują zdolność stymulowania znaczącą wyższej liczby limfocytów (nawet do ¼ całkowitej puli) wywołując tzw. burzę cytokinową, cechującą się nadmiernie wyrażoną odpowiedzią immunologiczną, co może prowadzić do objawów wstrząsu, a nawet śmierci (Dinges i in., 2000; Omoe i in., 2005). Do czynników determinujących inwazyjność *S. aureus* zalicza się również białka powierzchniowe, które odgrywają bardzo ważną rolę w adhezji do komórek gospodarza oraz blokowaniu odpowiedzi immunologicznej (Silverman i in., 2004; Kmieciak i in., 2017; Jenul i in., 2018). Lekooporne szczepy *S. aureus* stanowią poważny problem weterynaryjnej diagnostyce i terapii. Szczególnie istotna jest oporność na metycylinę. Szczepy posiadające

tę właściwość określane są jako MRSA (*Methicillin- resistant Staphylococcus aureus*) (Truszczyński i in., 2009; Truszczyński i in., 2015; Kmieciak i in., 2017; Uchida-Fujii i in., 2022). Szczepy te charakteryzują się obecnością nabytej oporności na wszystkie antybiotyki β-laktamowe, kodowaną przez geny z grupy *mec* (*mec*A*, mec*B *i mec*C) zlokalizowane w kasecie chromosomowej (SCCmec) (Kasela i in., 2023). Zatem kluczowe znaczenie epidemiologiczne przypisuje się szczepom MRSA i/lub oporności wielolekowej (MDR), a także w ostatnich latach szczepom opornym na glikopeptydy jako leki ostatniej szansy, tj. wankomycynooporne (ang. vancomycin-resistant -VRS, przy MIC > 8 μg/mL) oraz obniżonej wrażliwości na wankomycynę (ang. vancomycin-intermediate – VIS, przy MIC = 4-8 μg/mL). Oporność ta związana jest z nabyciem genu *van* A, którego pierwotnym gospodarzem był *Enterococcus faecalis,* a co potwierdza, że po pewnym czasie nastąpił naturalny transfer genu *van*A z plazmidu *Enterococcus faecalis* do genomu *S. aureus* (Chang i in., 2003; Bierowiec i in., 2016; Kmieciak i in., 2017). Oporność na metycylinę, wankomycynę lub oporność wielolekowa u tych szczepów jest bardzo często związana z obecnością czynników wirulencji, np. PVL, enterotoksyn lub TSST-1, co sprawia, że bakterie te stają się „superbakteriami" stanowiącymi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego (Dong i in., 2021). W 2005 roku zostały po raz pierwszy opisane szczepy tzw. LA-MRSA (ang. Livestock associated MRSA), izolowane w głównej mierze od zwierząt hodowlanych, szczególnie świń. LA-MRSA należące do kompleksu klonalnego 398 (CC398), bardzo szybko rozprzesrzeniły się nie tylko wśród zwierzat ale stwarzają ryzyko transferu dla człowieka, szczególnie dla osób pracujących w bliskim kontakcie ze świniami, bydłem i drobiem, a odsetek kolonizacji u tej grupy osób sięga nawet 63%, przy czym stale obserwuje się wzrastające ryzyko infekcji skóry i tkanek miękkich szczepami LA-MRSA u osób nie mających kontaktu ze zwierzętami hodowlanymi (Nowakowicz-Dębek i in., 2016; Kmieciak i in., 2017). Warto zauważyć, że nie tylko zwierzęta gospodarskie mogą być źródłem *S. aureus*. Potencjalnymi rezerwuarami tego patogenu są również zwierzęta towarzyszące, takie jak psy czy koty, które podobnie jak ludzie, mogą być jego nosicielami. Warto również zwrócić uwagę na zwierzęta wolno żyjące, które coraz częściej zbliżają się do siedlisk ludzkich (np. lisy rude, dziki) mogą stać się zarówno rezerwuarem jak i wektorem lekoopornych szczepów *S. aureus* (Bierowiec i in., 2016; Kmieciak i Szewczyk, 2017).

2.1.2. Staphylococcus pseudintermedius

S. pseudintermedius to komensal skóry i błon śluzowych, często występująca u zwierząt towarzyszących (głównie psów i kotów), ale także u zwierząt wono żyjących, takich jak lisy i jenoty (Bannoehr i in., 2012; Zhu i in., 2020). Gatunek ten jest izolowany od 90% zdrowych zwierząt i najczęściej występuje na skórze i błonach śluzowych jamy ustnej. *S. pseudintermedius* może również powodować zakażenia skóry, zewnętrznego kanału słuchowego czy dróg moczowych w sprzyjających warunkach, tj. niedoborach immunologicznych, zaburzeniach metabolicznych, hormonalnych lub jako współtowarzyszący czynnik infekcji na tle *Malassezia pachydermatis* (Chrobak i in., 2011; Smith i in., 2015; Kizerwetter-Świda i in., 2017; Kmieciak i in., 2017; Bierowiec i in., 2021; Lynch i in., 2021). *S. pseudintermedius* jest Gram-dodatnią bakterią o kulistym kształcie należącą do rodzaju *Staphylococcus*, ale wraz z pięcioma innymi gatunkami zaliczany jest również do grupy SIG (*Staphylococcus Intermedius Group*). Jest podobnie jak inni przedstawiciele rodzaju *Staphylococcus*, bakterią nieruchliwą i nieprzetrwalnikującą oraz fakultatywnie beztlenową. Kolonie *S. pseudintermedius* są małe, okrągłe, szarobiałe, nieprzezroczyste (o średnicy 1-2 mm) z gładkim brzegiem. *S. pseudintermedius* ma zdolność ekspresji szeregu czynników zjadliwości, takich jak koagulaza, proteaza, białko A, enterotoksyny, toksyna eksfoliatywna SIET, a także cytolizyny (leukotoksyna Luk-I i hemolizyny (Gharsa i in., 2012; Smith i in., 2015; Kmieciak i in., 2017; Wang i in., 2022; Moses i in., 2022). W ostatnich latach poważnym problemem stały się także lekooporne szczepy *S. pseudintermedius*, w szczególności MRSP (methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*) i MDRSP (multi-drug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*). Szczepy MRSP podobnie jak MRSA są oporne na beta-laktamy, z wyjątkiem cefalosporyn piątej generacji, takich jak ceftarolina. Mechanizm oporności na metycylinę jest taki sam jak w przypadku MRSA. Izolaty MRSP są również często oporne na inne antybiotyki, tj. aminoglikozydy, makrolidy, linkozamidy, fluorochinolony, mupirocynę, trimetoprim-sulfametoksazol, tetracykliny i fenikole (Schwarz i in., 2014; Kmieciak i in., 2017; Hahaj-Siembida i in., 2023).

2.2. Problematyka lekooporności wśród *Staphylococcus* izolowanych od zwierząt

Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR) to zdolność mikroorganizmów do zwiększania oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe, na które były wcześniej wrażliwe (Ratia i in., 2022). Nadużywanie i niewłaściwe stosowanie środków przeciwdrobnoustrojowych w medycynie weterynaryjnej znacznie przyspieszyło pojawianie się i rozprzestrzenianie bakterii opornych na leki przeciwdrobnoustrojowe, w tym gronkowców. Warto zauważyć, że wiele leków stosowanych w medycynie weterynaryjnej jest również stosowanych w medycynie ludzkiej, generując nasilanie się oporności. Dlatego należy również pamiętać, że istnieje kilka klas antybiotyków przeznaczonych wyłącznie do stosowania w medycynie człowieka (takich jak np. karbapenemy czy glikopeptydy) i nie mozna ich stosować u zwierząt. Stosowanie tych antybiotyków u zwierząt może prowadzić do zmniejszenia ich skuteczności w medycynie człowieka ze względu na selekcję opornych bakterii, w tym bakterii z rodzaju *Staphylococcus* (Nowakiewicz i in., 2016; Nowakiewicz i in., 2021; Ratia i in., 2022).

Najważniejszym mechanizmem oporności wśród szczepów *Staphylococcus* jest oporność na metycylinę. Oporność na metycylinę stanowi ogromny problem i wyzwanie dla lekarzy weterynarii i medycyny, ponieważ oprócz oporności na antybiotyki β-laktamowe, większość tych bakterii jest również oporna na wiele innych leków. Gatunki *Staphylococcus* oporne na oksacylinę lub metycylinę, należy uznać za oporne na wszystkie inne β-laktamy, w tym cefalosporyny. Niestety, bakterie te często wykazują współoporność na wiele innych leków niebędących β-laktamami, w tym linkozamidy (klindamycynę i linkomycynę), fluorochinolony, makrolidy (erytromycynę), tetracykliny i trimetoprim-sulfonamidy. Oporność na fenikole, aminoglikozydy i ryfampicynę zdarza się rzadziej, niemniej są to leki, które należy rozważyć jako leki drugiego rzutu w przypadku infekcji gronkowcowych. Przykładowo ryfampicyna to antybiotyk stosowany w weterynarii ze względu na swoją aktywność przeciwko *Staphylococcus* opornych na metycylinę u małych zwierząt oraz w leczeniu zakażeń wywołanych przez *Rhodococcus equi* u koni. Niektóre szczepy *Staphylococcus* oporne na metycylinę są wrażliwe na tetracykliny, zatem sugeruje się leki, takie jak doksycyklina lub minocyklina. Na uwagę zasługują również aminoglikozydy (zwłaszcza gentamycyna), które wykazują wysoką aktywność *in vitro* przeciwko koagulazododatnim *Staphylococcus*, w tym szczepom metycylinoopornym

S. pseudintermedius lub *S. aureus* (Galloway i in., 2011; Nowakiewicz i in., 2016 Kmieciak i in., 2017).

W ostatnich latach wśród szczepów odzwierzęcych *Staphylococcus* pojawiła się również oporność na takie leki jak mupirocyna czy fusydany. Mupirocyna stosowanan była miejscowo, początkowo tylko w medycynie człowieka, obecnie również u zwierząt towarzyszących i ze względu na częste stosowanie szybko pojawiła się oporność, również wśród szczepów izolowanych od zwierząt. Znane są dwa rodzaje oporności na mupirocynę: oporność na wysokie i niskie stężenia, przy czym ta pierwsza związana jest z nabytym mechanizmem oporności plazmidowej i obecnością genu *mup* (Kizerwetter-Świda i in 2021). Fusydany stosuje się głównie u ludzi w leczeniu zakażeń wywoływanych przez szczepy MRSA. Oporność wśród szczepów izolowanych od zwierząt jest rzadko generowana, niemniej geny *fus* odpowiedzialne za oporność nabytą, co raz częściej pojawiają się również wśród tych szczepów (Roer i in 2025). W leczeniu zakażeń miejscowych w niektórych krajach stosuje się leki takie jak mupirocyna lub kwas fusydowy, które są dostępne w postaci maści do stosowania miejscowego dla pacjentów klinicznych (psów i kotów) i mogą być dobrym kierunkiem w medycynie weterynaryjnej (Nowakiewicz i in., 2016; Nowakiewicz i in., 2021).

Innym lekiem ostatniej szansy stosowanym wyłącznie w medycynie człowieka jest linezolid. Jest on obecnie stosowany u ludzi w leczeniu zakażeń wywołanych przez enterokoki i paciorkowce, gronkowce oporne na metycylinę oraz bakterie Gram-dodatnie oporne na wankomycynę. Zastosowanie kliniczne u zwierząt ze względu na niezwykle wysokie koszty oraz wyłączność stosowania tylko w medycynie człowieka ogranicza znacznie generowanie oporności na oksazolidynony u zwierząt w oparciu o geny nadające oporność tylko na oksazolidynony, tj. *optr*A i *poxt*A. Niemniej ze względu na mechanizm oporności krzyżowej genrowany przez obecność genu *cfr,* scenariusz rozwoju oporności na ten lek jest realny u zwierząt. Gen *cfr* został zidentyfikowany w genomie szczepów *Staphylococcus* spp. izolowanych od zwierząt i koduje on metylotransferazę, która modyfikuje podjednostkę 23S rRNA w pozycji A2503. Szczepy *S. aureus* posiadające gen *cfr* cechują się opornością na wiele różnych leków: fenikole, linkozamidy, oksazolidynony, pleuromutyliny i streptogramina A, a fenotyp taki nosi nazwę PhLOPSA (Long i in. 2006). Ponadto dwie nowe cefalosporyny piątej generacji ceftarolina i ceftobiprol wykazują aktywność przeciwko szczepom *Staphylococcus* opornym na metycylinę. Podobnie jak inne antybiotyki β-laktamowe, niszczą one ścianę komórkową poprzez wiązanie się z białkiem

wiążącym penicylinę, ale cechują się wysokim powinowactwem do PBP-2a, białka kodowanego przez gen *mec*A w szczepach metycylinoopornych. Niestety, ich zastosowanie w weterynarii nie zostało dotychczas udokumentowane (Turner i in., 2019; Howden i in., 2023). Większość szczepów *Staphylococcus* jest wrażliwych na nitrofurantoinę. Niestety, lek ten jest stosowany wyłącznie w leczeniu zakażeń dróg moczowych.

2.2.1. Koncepcja „One health" (Jedno zdrowie), a medycyna weterynaryjna

Koncepcja „Jednego zdrowia" wskazuje, że zdrowie człowieka jest w dużej mierze powiązane ze zdrowiem zwierząt i stanem środowiska. Koncepcja ta obejmuje kompleksowy i zintegrowany nadzór mikrobiologiczny u ludzi, zwierząt (w tym zwierząt towarzyszących, gospodarskich i wolno żyjących) oraz w środowisku, w celu lepszego zrozumienia problemu i ograniczenia oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR), a przede wszystkim opracowania skutecznych programów kontroli i zapobiegania (Nowakiewicz i in., 2021; Vercelli i in., 2022). Dlatego pojawienie się oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR) u bakterii izolowanych od zwierząt stanowi istotny problem nie tylko w medycynie weterynaryjnej, ale także dla zdrowia publicznego (Yudhanto i in., 2022; Vercelli i in., 2022). Należy podkreślić, że bezpośredni kontakt ludzi ze zwierzętami sprzyja przenoszeniu wielolekoopornych bakterii (ang multi-drug resistant, MDR), stanowiąc zagrożenie dla zdrowia ludzi, zwłaszcza dzieci i osób starszych oraz osób o obniżonej odporności (Yudhanto i in., 2022). Szczególny problem stanowią tzw. infekcje szpitalne, w których największy problem stanowi nie wirulencja danego szczepu a raczej oporność na większość dostępnych środków przeciwdrobnoustrojowych, co skutecznie ogranicza sukces terapeutyczny.

Warto zauważyć, że problem ten dotyczy nie tylko zwierząt domowych i gospodarskich, ale także zwierząt wolno żyjących. Należy pamiętać, że zwierzęta wolno żyjące coraz częściej zwiększają swój potencjal synantropijny, co może oznaczać wzmożony kontakt zarówno z ludźmi, jak i z innymi zwierzętami (towarzyszącymi lub gospodarskimi). Konsekwencją tego zjawiska może być przeniesienie różnych drobnoustrojów zarówno patogennych jak i komensalicznych na ludzi lub inne zwierzęta i rozwój infekcji lub dalsze rozprzestrzenianie się oporności. Innym przykładem mogą być zwierzęta stanowiące źródło żywności pochodzenia zwierzęcego, a zarazem nosiciele m. in. koagulazododatnich *Staphylococcus*,

co może determinować zagrożenie dla zdrowia konsumenta, nie tylko ze względu na panel toksyn produkowanych przez te bakterie, a odpowiedzialnych zazatrucia pokarmowe, ale również ze względu na powszechną lekooporność wśród tej grupy szczepów (Nowakiewicz i in., 2016). Oprócz znacznej oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, genom koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus* może zawierać wiele zróżnicowanych czynników wirulencji, które pozwalają bakteriom nie tylko łatwiej skolonizować gospodarza ale również zwiększają zdolność do wywoływania chorób. Dlatego tak istotna jest właściwa diagnostyka oraz terapia celowana pacjenta/pacjentów, co może mieć wpływ również na właściciela lub hodowcę zwierzęcia (Peton i in., 2014; Kizerwetter-Świda i in., 2017; Nowakiewicz i in., 2021; Yudhanto i in., 2022).

2.3. Zwierzęta jako recerwuar *Staphylococcus*

2.3.1. Zwierzęta gospdarskie – owce, jako recerwuar *Staphylococcus*

Zwierzeta gospodarskie takie jak owce zostały udomowione jako jedne z pierwszych zwierząt hodowlanych w południowo-zachodniej Azji około 10 000–8 000 p.n.e. Pierwotnym przodkiem owiec jest muflon azjatycki (*Ovis gmelini*), którego zasięg występowania rozciągał się od Turcji po wschodni Iran. Od samego początku ludzie pozyskiwali wełnę, futra, mięso i mleko z hodowli owiec, a zwierzęta te odgrywały również ważną rolę społeczną, zwłaszcza w Azji, a później w Europie. Ostatecznie owce domowe (*Ovis aries*) rozprzestrzeniły się na całym świecie. Populacja owiec na świecie wynosi obecnie 1,2 miliarda (Food and Agriculture Organization, 2020). Istnieją setki ras owiec domowych, a także wiele linii muflonów oraz pięć innych gatunków dzikich owiec (Zeder, 2008; Barbato i in., 2017; Kaptan i in., 2024; Daly i in., 2025; Ma i in., 2025). Hodowla owiec ma również długą tradycję w Polsce. Niestety, owce stanowią obecnie zaledwie 1% liczby zwierząt hodowanych w Polsce i są wykorzystywane głównie do produkcji mięsa i mleka (Kawęcka i in., 2022; Hahaj-Siembida i in., 2025). Istnieje 17 ras rodzimych owiec w jednostronnym, dwustronnym lub wielostronnym typie użytkowania, objętych jest Programem Ochrony Zasobów Genetycznych. Wśród nich znajdują się m.in. owce rasy Świniarka i Uhruska (Polska Owca Nizinna) (Kawęcka i in., 2022; Greguła-Kania i in., 2023; Hahaj-Siembida i in., 2025). Świniarka, czyli jedna z najstarszych ras owiec, jest odporna na liczne choroby i dobrze przystosowana do różnorodnych warunków środowiskowych. W porównaniu ze Świniarką, owca Uhruska jest rasą uszlachetnioną,

o masie ciała 55-60 kg, względnie dobrej jakości wełnie i wysokiej płodności. Jest to rodzima odmiana hodowana w regionie środkowo-wschodniej Polski. Owce tej rasy dobrze wykorzystują paszę i naturalne pastwiska (Kawęcka i in., 2022; Greguła-Kania i in., 2023; Kicińska-Jakubowska i in., 2024; Hahaj-Siembida i in., 2025).

Liczne gatunki należące do rodzaju *Staphylococcus* są również składnikami naturalnej bioty skóry i błon śluzowych zdrowych owiec (Vasileiou i in., 2019; Wesołowska i in., 2023). Jednakże są również najczęstszą przyczyną zakażeń u tych zwierząt, szczególnie klinicznej i subklinicznej postaci zapalenia wymienia (mastitis). *S. aureus* jest szczególnie częstym czynnikiem etiologicznym mastitis i odpowiada za ponad 70% przypadków, z kolei podobny odsetek gatunków koagulazoujemnych *Staphylococcus* (CoNS) jest izolowany z przypadków subklinicznego mastitis (Vasileiou i in., 2019). Zmiana statusu mikroorganizmu z komensalnego na czynnik wywołujący zakażenie zależy od wielu czynników, w tym sposobu utrzymania i karmienia zwierząt, poziomu higieny i bezpieczeństwa biologicznego, praktyk dojenia, a nawet zmian klimatu (Vasileiou i in., 2019). Rasa zwierzęcia ma również ogromne znaczenie ze względu na podatność na zakażenia, anatomiczny stan strzyków, liczbę i wielkość potomstwa, długość okresu laktacji i występowanie współistniejących problemów zdrowotnych, które różnią się w zależności od rasy (Michael i in., 2023). Ponadto wykazano, że owce różnych ras mają różne predyspozycje genetyczne do rozwoju klinicznego lub subklinicznego zapalenia wymion (Vasileiou i in., 2019).

Specyficzny status *S. aureus* jako komensala izolowanego również od klinicznie zdrowych zwierząt sprawia, że bakteria ta jest częstym źródłem oporności na antybiotyki. *S. aureus*, zwłaszcza szczepy oporne na metycylinę (MRSA), mogą rozprzestrzeniać się między zwierzętami hodowlanymi a ludźmi, stanowiąc zagrożenie dla zdrowia publicznego i zwiększając i tak już wysoki poziom szczepów bakterii opornych na wiele leków zarówno w szpitalach, jak i w środowisku (Smith, 2015; Moura i in., 2024; Muwonge i in., 2025). Obecność *S. aureus* u owiec, stanowi nie tylko ogromny problem związany z jego rolą sprawczą w chorobach zwierząt lub wysokim poziomem lekooporności ale stanowi również problem dla przemysłu spożywczego. Produkty, takie jak mleko czy mięso, zawierające bakterie, mogą stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Dzięki stosunkowo wysokiej odporności na niekorzystne warunki środowiskowe, *S. aureus* jest w stanie przetrwać poza organizmem gospodarza przez długi czas; dlatego jest jedną z najczęstszych

bakterii zanieczyszczających żywność pochodzenia zwierzęcego, w tym żywność, której źródłem są owce (Licitra i in., 2021; Michael i in., 2023; Bauer i in., 2025).

S. aureus jako drobnoustrój komensalny, permanentnie bytujący w organizmie gopsodarza, a jednocześnie czynnik infekcyjny może indukować odpowiedź immunologiczną na wiele sposobów, w zależności od statusu zdrowotnego gospodarza. Jednym z takich bardziej problematycznych okresów, w których zwierzęta są bardziej podatne na zakażenia, również w przypadku owiec, jest okres ciąży.

W czasie ciąży pojawiają się liczne zmiany anatomiczne, fizjologiczne, endokrynologiczne, metaboliczne i immunologiczne. Zachodzą zmiany w barierach fizycznych organizmu, takich jak skóra i błony śluzowe, które mogą ułatwiać kolonizację przez potencjalne patogeny lub proliferację bakterii oportunistycznych (Downs i in., 2018; Radocchia i in., 2024).

U owiec i kóz *S. aureus* jest również odpowiedzialny za problemy rozrodcze, takie jak poronienia i martwe urodzenia. Zakażenia mogą prowadzić do utraty ciąży, co ma bezpośredni wpływ na liczbę jagniąt i zdrowie stada. Z kolei zapalenie błony śluzowej macicy prowadzi do obniżenia płodności, zwiększenia liczby zabiegów inseminacyjnych potrzebnych do zapłodnienia. *S. aureus* posiada wiele czynników, które zakłócają odpowiedź immunologiczną gospodarza, a jego obecność aktywuje różnego rodzaju mechanizmy obronne. Bakterie te mają zdolność do inwazji i przetrwania wewnątrzkomórkowego w fagocytach, w tym neutrofilach i makrofagach, ale także w komórkach nabłonka gruczołu mlekowego. Mogą również tworzyć małe warianty kolonii i promować tworzenie biofilmu, co z kolei jest ściśle związane z niepowodzeniem terapii antybiotykowej. Co więcej, sukces zakażenia *S. aureus* można przypisać faktowi, że jego genom koduje zestaw białek i toksyn, które hamują odpowiedź układu odpornościowego gospodarza (Renna i in., 2019). Jedną z grup białek, które reagują na obecność *S. aureus* w organizmie gospodarza są cytokininy (Zhang i in., 2007; Kawecka-Grochocka i in., 2021).

Głównymi cytokinami prozapalnymi są interleukina (IL)-6, IL-1 i czynnik martwicy nowotworów (TNF)-*α*. Co więcej, IL-6 jest również uważana za jedną z najważniejszych cytokin zdolnych do indukowania syntezy białek ostrej fazy (APP). Stężenie krążących białek APP jest specyficzne dla gatunku i zależy od zaawansowania infekcji oraz stopnia uszkodzenia tkanek w organizmie. Ze względu na fakt, że poziom białek APP w surowicy może wzrastać (APP dodatni) lub spadać (APP ujemny), mogą one również dostarczać

informacji diagnostycznych i prognostycznych, stanowiąc tym samym dobre narzędzie w monitorowaniu owiec, szczególnie w okresie ciąży (Rahman i in., 2010), co zostało wykorzystane również w obecnych badaniach.

2.3.2. Zwierzęta towarszyące – psy i koty, jako recerwuar *Staphylococcus*

Zwierzęta towarzyszące, takie jak psy (*Canis familiaris*) i koty (*Felis catus*), od dawna są częścią ludzkiego życia. Pies domowy (*Canis familiaris*) to gatunek wywodzący się od wilka szarego (*Canis lupus*), który zamieszkiwał Europę Zachodnią i Syberię. Pies był pierwszym zwierzęciem udomowionym przez człowieka, ale dokładny czas udomowienia psa wciąż budzi kontrowersje wśród badaczy. Jednak dowody archeologiczne i genetyczne wskazują, że udomowienie było procesem wielofazowym, który rozpoczął się co najmniej 15 000 lat temu lub ponad 30 000 lat temu (Galeta i in., 2021; Burrows i in., 2024). Innym gatunkiem, który osiągnął globalny zasięg występowania, przystosował się do środowiska antropogenicznego i podobnie jak pies domowy, przeszedł tysiące lat zmian genetycznych, jest kot domowy (*Felis catus*). Kot domowy prawdopodobnie pochodzi bezpośrednio od kota dzikiego (*Felis silvestris lybica*). Chociaż niektórzy badacze często przypisują pierwsze udomowienie kotów Egipcjanom około 4000 lat temu, liczne odkrycia sugerują, że gatunek ten został w rzeczywistości udomowiony około 9500 lat temu na Cyprze lub w innych regionach Bliskiego Wschodu (Feuerstein i in., 2008; Hattori i in., 2022; Menchetti i in., 2024). Ta wielowiekowa tradycja sugeruje długotrwałą relację i bliski kontakt między tymi zwierzętami a ludźmi, dlatego nazywa się je zwierzętami towarzyszącymi. Niestety dzielenie przestrzeni życiowej oznacza również dzielenie naturalnej mikrobioty występującej u ludzi i zwierząt, przenoszenie tych samych mikroorganizmów i dzielenie się konsekwencjami narażenia na te same patogeny, a jednym z takich wspólnych mikroorganizmów jest rodzaj *Staphylococcus*.

W ciągle zmieniającym się społeczeństwie obserwuje się coraz silniejsze relacje między właścicielami a ich zwierzętami. Zwierzęta towarzyszące, zwłaszcza psy i koty, żyją w bliskim kontakcie ze swoimi właścicielami w ich domach, ale także dzielą wiele przestrzeni publicznych, gdzie stykają się z innymi zwierzętami lub osobami, które nie są ich właścicielami. W tym kontekście narasta kolejny problem, ponieważ wiele bakterii patogennych i komensalnych, zwłaszcza tych pochodzących od zwierząt, może się

rozprzestrzeniać i nabywać nowe typy oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe. W konsekwencji prowadzi to do pojawienia się oporności wielolekowej (MDR), która jest jednym z najważniejszych problemów zdrowia publicznego (Graham i in., 2019; Marco-Fuertes i in., 2022; Osińska i in., 2022; Marco-Fuertes i in., 2024).

Zwierzęta towarzyszące i ich właściciele są częstymi nosicielami *Staphylococcus* spp. Jak wiadomo, zarówno CoPS, jak i CoNS mogą być składnikiem naturalnej mikrobioty zwierząt towarzyszących. Zarówno przejściowe, jak i przewlekłe nosicielstwo *Staphylococcu* opisano u wielu gatunków, w tym u ludzi i zwierząt towarzyszących. U psów i kotów kolonizacja *Staphylococcus* występuje w wielu obszarach ciała, zwłaszcza na skórze i błonach śluzowych jamy ustnej (Carroll i in., 2021). W sprzyjających warunkach, podobnie jak w przypadku człowieka i innych grup zwierząt mogą one również odpowiadać za różnego rodzaju zakażenia, zakażenia górnych dróg oddechowych, zakażenia dróg moczowych i wiele innych miejsc jak rany lub urazy chirurgiczne (Miszczak i in., 2023; Moses i in., 2023; Marco-Fuertes i in., 2024).

Ze względu na powszechne występowanie, łatwość rozprzestrzeniania się oraz potencjalne zagrożenie dla zdrowia publicznego związane z wysokim poziomem oporności i bogatą gamą czynników wirulencji, szczególnie wśród szczepów koagulazododatnich *Staphylococcus*, bakterie te, pomimo szeroko zakrojonych badań, nadal wykazują znaczną zmienność wynikającą z ich plastyczności genomowej i wysokiej zdolności adaptacji do różnorodnych warunków i żywicieli. Dlatego gatunki zwierząt szczególnie blisko spokrewnione z ludźmi powinny być nadal monitorowane pod kątem występowania i charakterystyki tej grupy bakterii.

2.3.3. Zwierzęta wolno żyjące - lisy, jako recerwuar *Staphylococcus*

Lis rudy (*Vulpes vulpes*) jest przedstawicielem rodziny psowatych (*Canidae*). Gatunek ten występuje powszechnie w niektórych częściach Azji, Europy, Ameryki Północnej i Afryki. W Europie Środkowej jest najliczniejszym dzikim gatunkiem z rodziny psowatych (Karamon i in., 2014, 2018; Wodecka i in., 2022). W Polsce populację dzikiego lisa rudego szacuje się na 200–250 tysięcy osobników (Nowakiewicz i in., 2016; Wierzbicki i in., 2021). Ze względu na dużą zdolność adaptacji tego gatunku do środowisk mniej lub bardziej zurbanizowanych oraz oficjalne działania związane ze zwalczaniem chorób zagrażających populacji lisa rudego (obowiązkowe szczepienia przeciwko wściekliźnie), w Polsce między

końcem XX wieku a pierwszą dekadą XXI wieku zaobserwowano bardzo szybki wzrost liczebności tych zwierząt (Jackowiak i in., 2021). Zazwyczaj lisy rude zamieszkują lasy, pola i tereny rolnicze. Jednak ze względu na łatwy dostęp do pożywienia na obszarach miejskich i postępującą synantropizację tego gatunku zwierząt, coraz częściej można je spotkać blisko siedzib człowieka (Karamon i in., 2018; Jackowiak i in., 2021). W związku z tym mogą nabywać lub dzielić mikrobiotę (w tym patogeny) z różnymi gatunkami żywicieli. Dotychczas lis rudy został przeanalizowany jako rezerwuar patogenów odpowiedzialnych za typowe zoonozy diagnozowane w Polsce, tj. wściekliznę (Smreczak i in., 2023), bąblowicę (Karamon i in., 2014), *Trichinella* spp. (Cybulska i in., 2016) i świerzb (Kołodziej-Sobocińska i in., 2014), a także choroby transmisyjne (Wodecka i in., 2022). W Polsce dotychczas przeprowadzono jedynie pojedyncze badania mające na celu określenie lekooporności mikroorganizmów obecnych u tych zwierząt, w tym *Staphylococcus* spp. (Nowakiewicz i in., 2016; Skarżyńska i in., 2020; Osińska i in., 2022), a dostępne wyniki obejmują niewielką grupę zwierząt i nie mogą być uznane za reprezentatywne, również w przypadku kolonizacji lisa rudego bakteriami z rodzaju *Staphylococcus*. Ogólnoświatowe, dostępne wyniki badań koncentrują się z kolei głównie na szczepach opornych na metycylinę (MRSA) (Carson i in., 2012; Monecke i in., 2016). Natomiast jak podkreślają Nielsen i in. (2020), dane dotyczące kolonizacji lisa rudego przez *S. pseudintermedius* ograniczają się wyłącznie do pojedynczych badań.

Gatunek ten jest znacznie mniej poznany, a jego charakterystykę epidemiologiczną określono głównie w szczepach izolowanych od zdrowych lub chorych psów (Ruzauskas i in., 2019; Abdullahi i in., 2021; Carroll i in., 2021; Glajzner i in., 2023).

3. Hipoteza i cel pracy

3.1. Hipoteza badawcza

Hipoteza badawcza zakłada, że pomimo zróżnicowanego behawioru zwierząt, stopnia synantropizacji, stosowanej antybiotykoterapii czy grupy użytkowej, wybrane determinanty oporności i/lub wirulencji będą występowały u badanych izolatów niezależnie od źródła pochodzenia szczepu, co więcej u różnych gatunków zwierząt mogą również zostać wykazane określone klony szczepów istotnych również dla zdrowia człowieka. W związku z dwoistością charakteru występowania bakterii z rodzaju *Staphylococcus* u zwierząt (patogen lub komensal) oraz różnorodnością objawów klinicznych, prawdopodobnie zróżnicowana będzie również reakcja układu odpornościowego gospodarza na obecność drobnoustroju.

3.2. Cel badań

Celem badań jest ocena występowania koagulazododatnich gronkowców u zróżnicowanych pod względem gatunkui statusu zdrowotnego zwierząt w aspekcie analizy porównawczej oraz oceny poziomu lekooporności tych drobnoustrojów, a także czynników wirulencji odpowiedzialnych za występowanie infekcji na tle *Staphylococcus*.

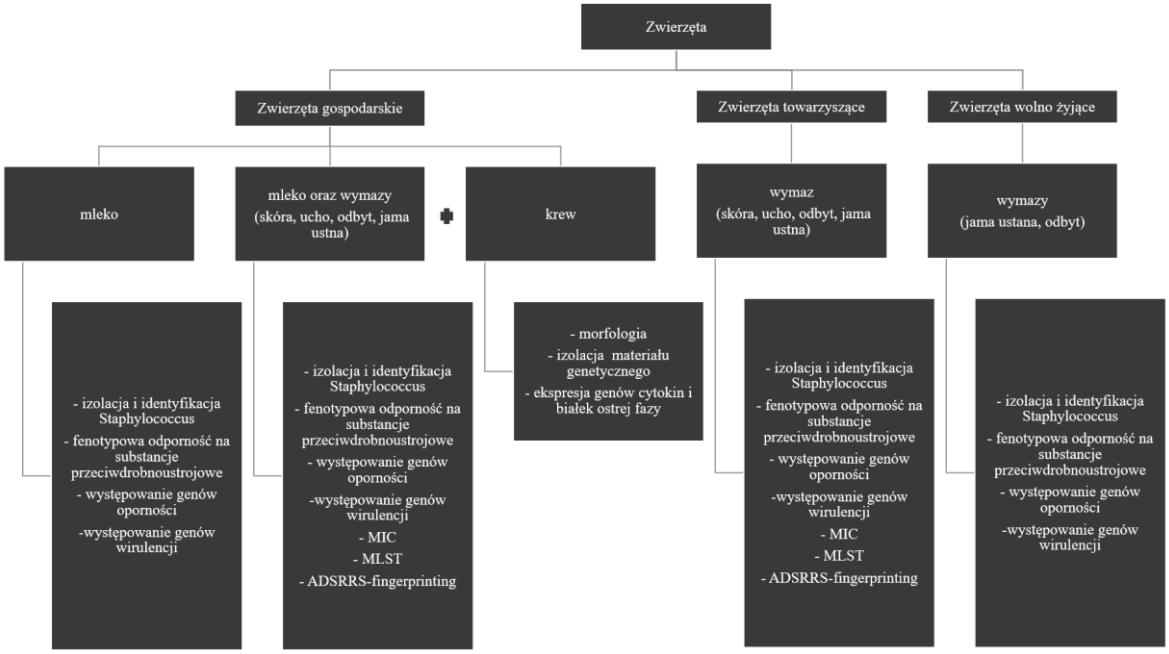
Obok oceny zagrożenia dla zdrowia publicznego jakie mogą stanowić wielolekooporne i/lub metycylinooporne bakterie, posiadające dodatkowo szeroki panel czynników wirulencji, badania mają na celu określenie w jakim stopniu poszczególne, istotne z epidemiologicznego punktu widzenia klony bakterii rozprzestrzeniają się pomiędzy różnymi gatunkami zwierząt. Koagulazododatnie bakterie z rodzaju *Staphylococcus* ze względu na powszechne występowanie u różnych gospodarzy jako komensale, a jednocześnie czynniki infekcyjne wielu chorób o zróżnicowanym obrazie klinicznym, stanowią niezwykle ciekawą i dynamiczną pod względem zmienności grupę drobnoustrojów, która pomimo licznych badań, nadal dostarcza nowych pytań. Dlatego również jednym z celów badań jest próba wyjaśnienia interakcji między odpowiedzią immunologiczną na obecność *S. aureus* w organizmie gospodarza poprzez analizę ekspresji genów zaangażowanych w ten proces w leukocytach krwi. W tym ostatnim przypadku docelową grupą badawczą będą małe przeżuwacze, a celem badań była analiza profilu ekspresji genów cytokin: *IL-1α*, *IL-1β*, *TNF-α*, *IL-6* oraz genów białek ostrej fazy *SAA*, *Hp* i *Cp* u dwóch grup zdrowych klinicznie owiec: zwierząt nosicieli CoPS z uwzględnieniem ich czynników wirulencji oraz owiec, u których nie wykazano obecności CoPS.

4. Materiały i metody

4.1. Materiał biologiczny

Materiał biologiczny (badawczy) został pobrany od różnych grup zwierząt: do dwóch odrębnych badań od zwierząt gospodarskich (owce rasy Uhruska i rasy Świniarka), jednorazowo od zwierząt towarzyszących (psy i koty) oraz jednorazowo od zwierząt wolno żyjących (lisy rude), następnie został poddany badaniom zgodnie z przdstawionym schematem (Rycina 1).

Rycina 1. Schemat przestawiający rodzaje pobranego materiału oraz procedury badawcze, którym został poddany

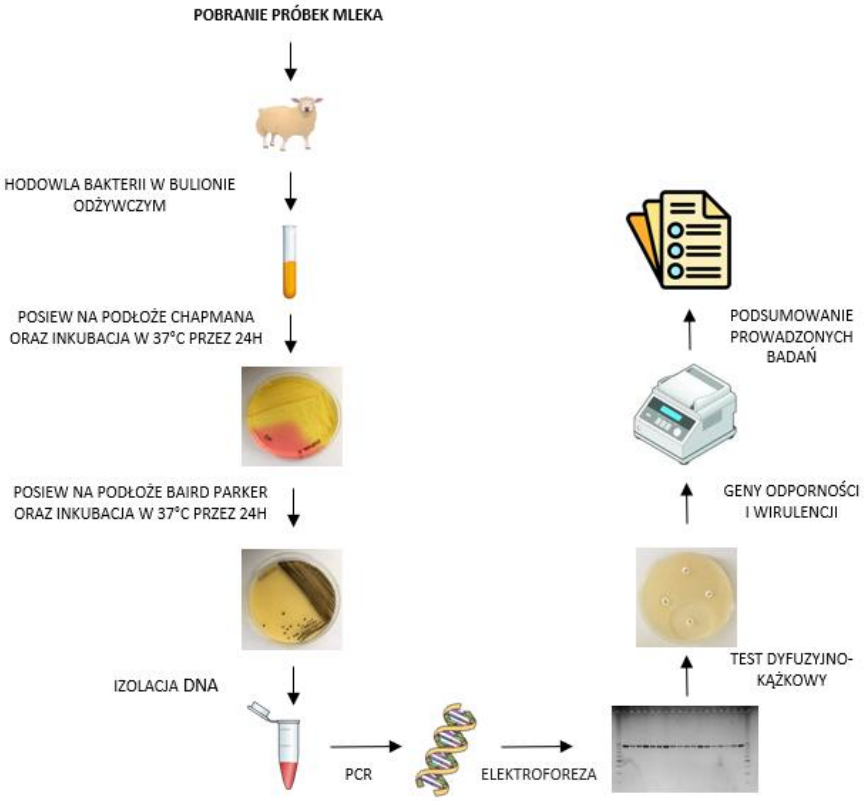


Materiał pochodzący od zwierząt gospodarskich, został pobrany od dwóch rodzimych polskich ras owiec: Świnarka oraz Uhruska (Polska Owca Nizinna PON) w Stacji Badawczej Małych Przeżuwaczy im. prof. Tadeusza Efnera w Bezku (51°11'60.00" N 23°15'60.00" E), położonej w południowo-wschodniej Polsce należącej do Katedry Hodowli Zwierząt i Doradztwa Rolniczego Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Rasa Świniarka jest powszechnie uważana za typ prymitywny, a rasa Uhruska (PON) charakteryzuje się wysoką płodnością i wydajnością mięsną. Stado podstawowe w tym okresie liczyło ponad 500 zwierząt, w tym około 200 matek Uhruska (Polskiej Owcy Nizinnej) i 50 owiec matek rasy Świniarka. Owce były żywione zgodnie z systemem żywienia francuskim Institut National

de la Recherche Agronomique (zgodnie z ich stanem fizjologicznym). Wszystkie zwierzęta w owczarni były karmione w ten sam sposób, wykorzystując paszę dostępną w gospodarstwie. Zwierzęta były przetrzymywane w tym samym budynku w jednolitych warunkach środowiskowych; jednak rasy były oddzielone wewnątrz budynku i podczas wypasu. Zwierzęta były przetrzymywane w systemie zamkniętym od września do połowy maja i w systemie otwartym z wypasem od połowy maja do początku września. Krycie trwało sześć tygodni, rozpoczynając się we wrześniu dla maciorek rasy Uhruska (Polska Owca Nizinna) oraz w październiku dla maciorek rasy Świniaka, a jagnienie (wykoty) trwało od połowy stycznia do lutego dla maciorek rasy Uhruska (Polskiej Owcy Nizinnej) i od lutego do marca dla maciorek rasy Świnarka. Badane zwierzęta były w tym samym wieku, tj. miały dwa lata. Próbki mleka pobrano podczas standardowego badania klinicznego przeprowadzonego przez lekarza weterynarii między marcem a kwietniem 2023 r. Aby pozyskać materiał do badań z każdej rasy wybrano 25 zwierząt, u których nie stwierdzono objawów klinicznych podczas podstawowego badania klinicznego wymienia (obserwacja, palpacja i porównanie obu gruczołów). Materiał badawczy w pierwszym badaniu (Publikacja nr 1) stanowiło mleko pobrane od obu wyżej wspomianych ras owiec. Łącznie pobrano 50 próbek mleka: 25 próbek od owiec rasy Uhruska (Polska Owca Nizinna) i 25 próbek od owiec rasy Świniarka. Przed pobraniem materiału, uzyskana została zgoda Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Lublinie o nr licencji 99/2018 (Rycina 2).

Pobór materiału dotyczy opublikowanego artykułu: Characteristics of drug-resistant *Staphylococci* isolated from milk of lambed ewes during the perinatal period. Agata Hahaj-Siembida, Aneta Nowakiewicz, Monika Greguła-Kania, Mariola Bochniarz, Aleksandra Trościańczyk, Marcelina Osińska J Vet Res. 2025 Mar 25;69(1):41-50. doi: 10.2478/jvetres-2025-0014 (Publikacja nr 1).

Rycina 2. Schemat ilustrujący metodykę do badania pierwszego (zwierzęta gospodarskie)



Materiał pochodzący od zwierząt gospodarskich za drugim razem również został pobrany od dwóch ras owiec (Świnarka oraz Uhruska (Polska Owca Nizinna)) w Stacji Badawczej Małych Przeżuwaczy im. prof. Tadeusza Efnera w Bezku należącej do Katedry Hodowli Zwierząt i Doradztwa Rolniczego Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Materiał pobrano w formie wymazów od zdrowych klinicznie osobników z czterech miejsc takich jak skóra, ucho, odbyt i jama ustna. Ponadto pobrane zostały próbki krwi obwodowej od zdrowych osobników, a także mleko od owiec matek. Do eksperymentu zostały wybrane wyłącznie zdrowe zwierzęta, na podstawie wyników ogólnego badania klinicznego przeprowadzonego przez lekarza weterynarii. Materiał pobrany został przez lekarza weterynarii czterokrotnie podczas rutynowego badania w następujących okresach: I – przed ciążą (A), II – na początku ciąży (B1), III – pod koniec ciąży (dwa tygodnie przed porodem) (B2), IV – po porodzie, w trakcie laktacji (tydzień po porodzie) (C), za każdym razem przebadanych zostało łącznie 50 dorosłych owiec (25 osobników z każdej rasy). Wymazy od tygodniowych jagniąt (łącznie 50) pobrano tylko raz (po porodzie). Owce matki były w tym samym wieku (2-3 lata), a jagnięta miały tydzień w trakcie poboru prób. Wybor

osobników (owiec) oraz włączenie do eksperymentu wyłącznie zdrowych owiec opierało się na wynikach ogólnego badania klinicznego przeprowadzonego przez lekarza weterynarii.

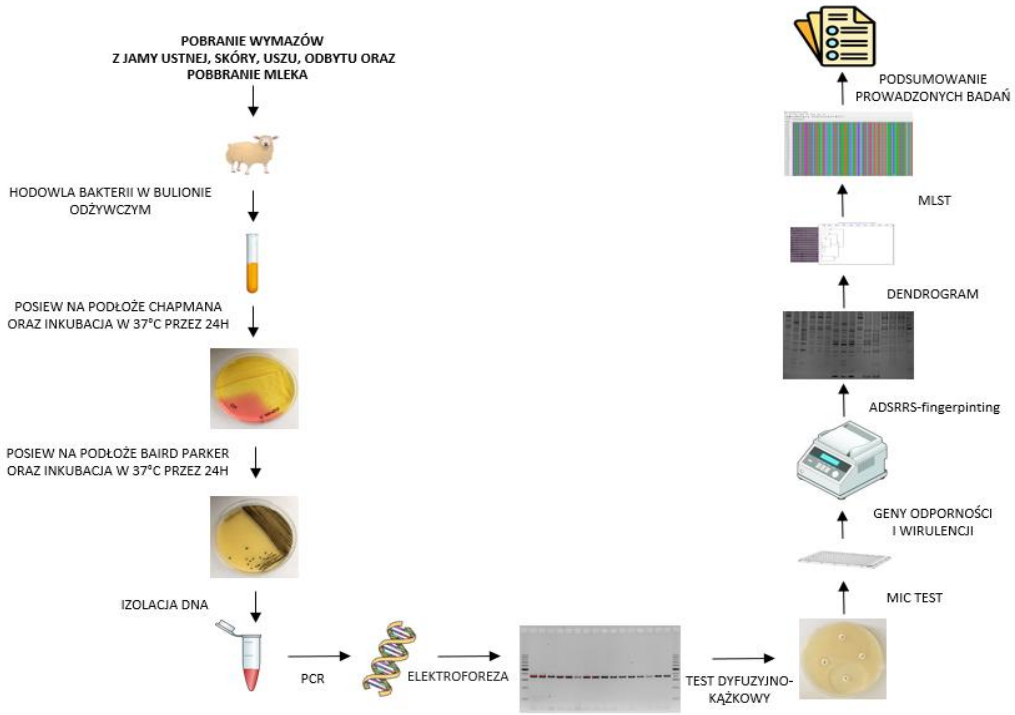
Wymaz z jamy ustnej pobrano z podniebienia twardego/języka, a wymaz ze skóry z prawej łopatki po uprzednim odwinięciu wełny owczej. Wymazy z zewnętrznego przewodu słuchowego i odbytu pobrano za pomocą sterylnej wymazówki. Łącznie pobrano 850 wymazów (800 od dorosłych i 50 od jagniąt). Dodatkowo pobrano również materiał w postaci prób mleka od maciorek, tych samych dwóch ras. Próbki mleka zostały pobrane po porodzie (po 25 próbek z każdej rasy, łącznie 50 próbek) (Rycina 3). Przed pobraniem materiału, uzyskana została zgoda Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Lublinie o nr licencji 99/2018.

Pobór materiału dotyczy artykułów znajdujących się na etapie recenzji:

Perinatal occurrence and epidemiological significance of *Staphylococcus aureus* in local sheep breeds (Publikacja nr 2).

The analysis of host's immune response in two local two breeds of sheep to the presence of *Staphylococcus aureus* during the perinatal period (publikacja nr 3).

Rycina 3. Schemat ilustrujący metodykę do badania drugiego- mikrobiologiczne (zwierzęta gospodarskie)

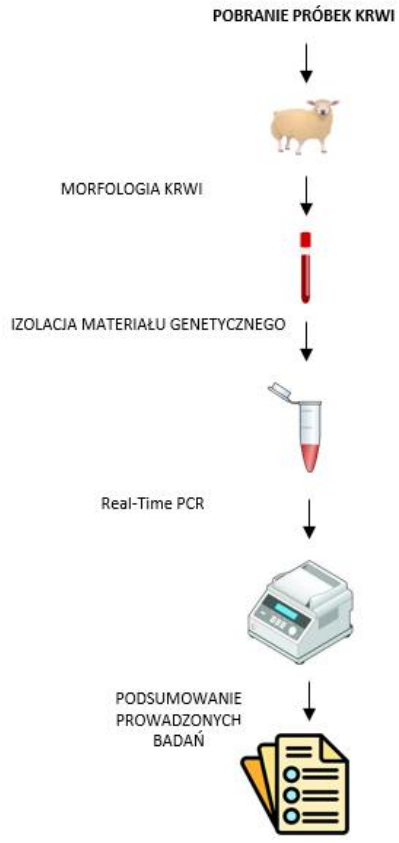


Próbki krwi pobrano przez nakłucie żyły szyjnej do sterylnych probówek próżniowych przez lekarza weterynarii podczas rutynowego badania w tych samych czterech okresach, co pobieranie wymazów. Próbki transportowano do laboratorium w warunkach chłodniczych na maksymalnie trzy godziny i przechowywano w temperaturze −80°C do czasu dalszych analiz. Przebadanych zostało łącznie 200 próbek krwi (pobrano po 25 próbek od każdej rasy jednocześnie).

Pobór materiału dotyczy artykułu: The analysis of host's immune response in two local two breeds of sheep to the presence of Staphylococcus aureus during the perinatal period (publikacja nr 3).

Podsumowując łącznie zostało pobranych 1100 prób, co jest sumą wszytych prób mleka oraz wyamazów ze wszytcho okresów pobrań od osobników dorsłych oraz wymazów od jagniąt, a także wszytkich próbek kwi pobranych w każdym terminie (Rycina 4).

Rycina 4. Schemat ilustrujący metodykę do badania drugiego- markery układu immunologicznego (zwierzęta gospodarskie)

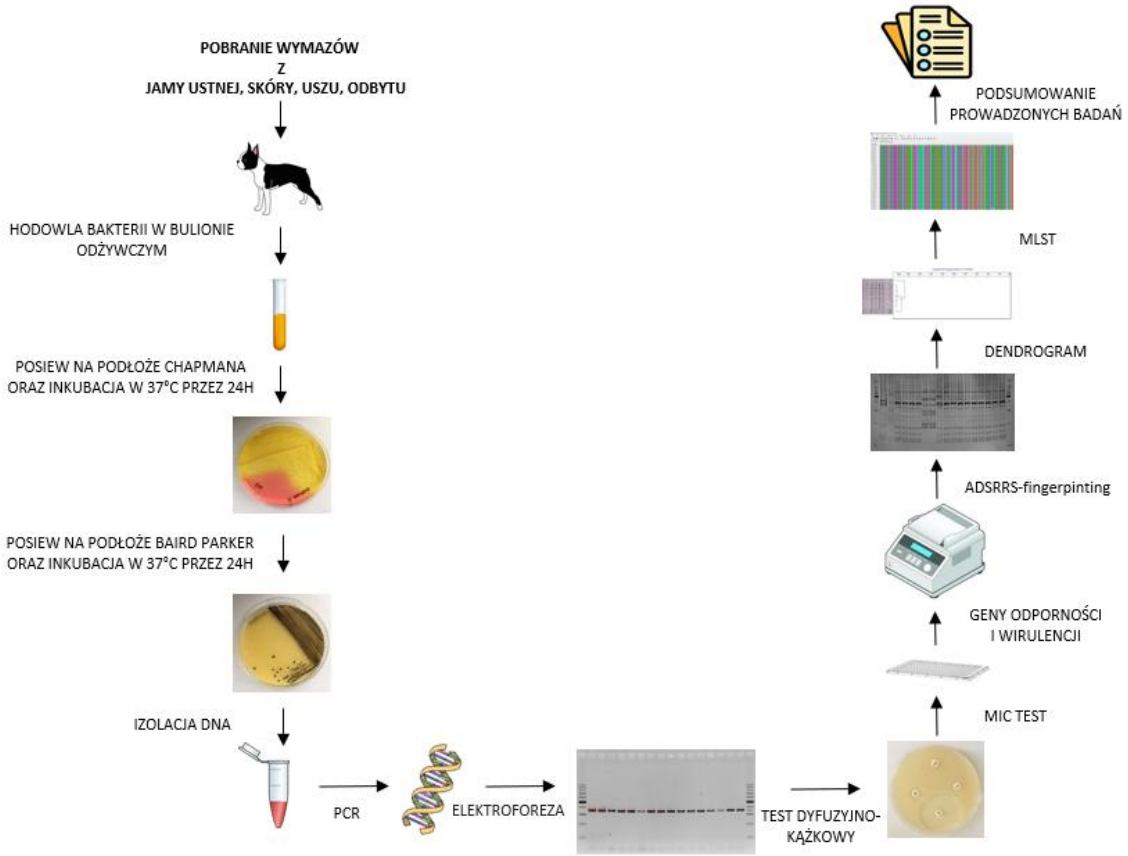


Materiał pochodzący od zwierząt towarzyszących (psy i koty), został pobrany od pacjentów kliniki weterynaryjnej (Lubelskie Centrum Małych Zwierząt) w trakcie rutynowego badania prowadzonego przez lekarza weterynarii. Materiał pobrano w formie wymazów z czterech miejsc: skóra, zewnętrzny kanał słuchowy, odbyt oraz jama ustna. Wymazy pobrano od zwierząt zdrowych klinicznie. Materiał badawczy pobrano w postaci wymazów od 151 zwierząt towarzyszących (90 psów i 61 kotów) ze wspominanych wyżej czterech różnych miejsc. Łącznie pobrano 604 wymazy od zwierząt (Rycina 5).

Pobór materiału dotyczy artykułu znajdującego się na etapie recenzji:

Companion animals as an increasingly important reservoir of methicillin-resistant and virulent strains of coagulase-positive *Staphylococcus* spp. (Publikacja nr 4).

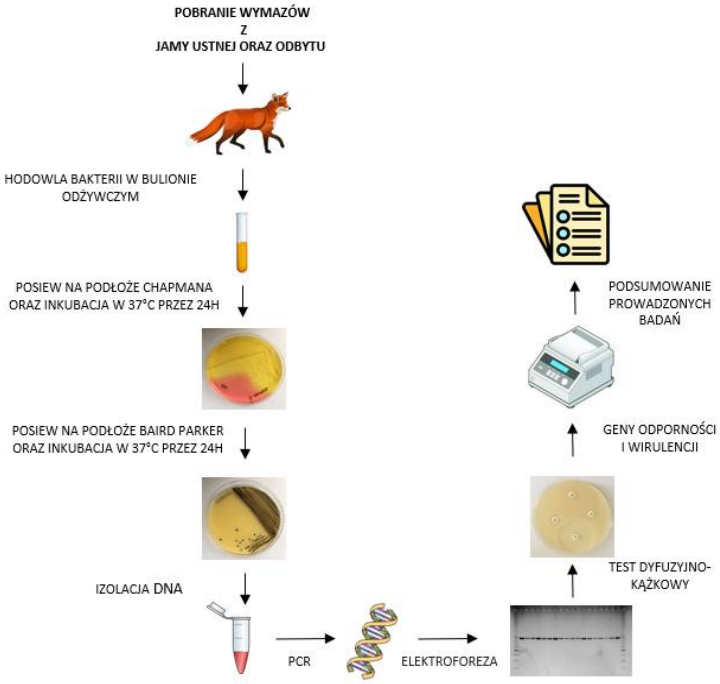
Rycina 5. Schemat ilustrujący metodykę badań materiału od zwierząt towarzyszących



Materiał pochodzący od zwierząt wolno żyjących (lisy rude *Vulpes vulpes*), został uzyskany dzięki współpracy badawczej z Zakładem Higieny Weterynaryjnej (ZHW) w Lublinie. Materiał pobrano *post mortem* od lisów w formie wymazów przez lekarza weterynarii z dwóch różnych miejsc: odbyt oraz jama ustna. Materiał do badań pobrano od 209 lisów rudych odstrzelonych w regionie południowo-wschodniej Polski. Łącznie pobrano 415 próbek (206 wymazów z odbytu i 209 wymazów z jamy ustnej). Ponieważ Polska nadal nie jest krajem wolnym od wścieklizny, monitoring tej choroby u lisów rudych przeprowadzany jest corocznie obligatoryjnie (kontrolowany odstrzał zwierząt) zgodnie z obowiązującym prawem (Dyrektywa Komisji Europejskiej, 2021). Materiał do momentu uzyskania wyniku ujemnego od danego zwierzęcia w kierunku ścieklizny, przechowywano w temperaturze −80°C w ZHW, przez maksymalnie 30 dni, a dopiero później przekazany do dalszych badań do Zakładu Mikrobiologii UP w Lublinie (Rycina 6).

Pobór materiału dotyczy opublikowanego artykułu: Red foxes (*Vulpes vulpes*) as a specific and underappreciated reservoir of resistant and virulent coagulase-positive *Staphylococcus* spp. strains: Agata Hahaj-Siembida, Aneta Nowakiewicz, Agnieszka Korzeniowska-Kowal, Kamila Szecówka, Aleksandra Trościańczyk, Przemysław Zięba, Monika Greguła Kania. Res Vet Sci. 2024:166:105111. doi: 10.1016/j.rvsc.2023.105111 (Publikacja nr 5).

Rycina 6. Schemat ilustrujący metodykę badań materiału od lisów rudych (zwierzęta wolno żyjące)



5. Metodyka

5.1. Mikrobiologia

5.1.1. Izolacja i identyfikacja szczepów oraz izolacja materiału genetycznego

5.1.1.1. Zwierzęta gospodarskie

5.1.1.1.1. Mleko (owce)

Próbki mleka pobrano podczas standardowego badania klinicznego przeprowadzonego przez lekarza weterynarii między marcem a kwietniem 2023 r. Z każdej rasy wybrano 25 zwierząt, u których nie stwierdzono objawów klinicznych podczas podstawowego badania klinicznego wymienia (obserwacja, palpacja i porównanie obu gruczołów). Łącznie pobrano 50 próbek mleka: 25 próbek mleka od owiec rasy Uhruska (Polska Owca Nizinna) i 25 próbek mleka od owiec rasy Świniarka. Próbki mleka o objętości 5 ml pobrano aseptycznie z połowy wymienia od każdego zwierzęcia, średnio siedem dni po porodzie, zgodnie z procedurą opisaną wcześniej (National Mastitis Council (U.S.), 2004. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality). Próbki mleka w warunkach chłodniczych przetransportowano do laboratorium w ciągu dwóch godzin, a następnie 1 ml każdej próbki hodowano w bulionie odżywczym supelementowanym 6,5% NaCl (Biomaxima, Lublin, Polska) przez 24 h w temperaturze 37°C. Następnie zastosowano podłoża dedykowane dla wybiórczego wzrostu bakterii *Staphylococcus* spp*:* Mannitol Salt LAB Agar (podłoże Chapmana) i Baird Parker LAB Agar (Biomaxima). Inokulaty o objętości 100 µl posiewano na płytki i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 h. Do dalszych analiz wybrano jedną typową kolonię uzyskaną z danego podłoża. Następnie wykonano barwienie metodą Grama (Gram Staining Kit, Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy), test na katalazę (3% roztwór nadtlenku wodoru) oraz test na koagulazę wolną (BBL Coagulase Plasma, Rabbit, with EDTA, BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Wszystkie ziarniaki katalazododatnie i Gram-dodatnie analizowano przy użyciu spektrometrii masowej z desorpcją/jonizacją laserową wspomaganą matrycą i pomiarem czasu przelotu (MALDI TOF-MS).

Białka rybosomalne ekstrahowano z każdego izolatu metodą ekstrakcji etanolem/kwasem mrówkowym, aby uzyskać wysokiej jakości widma masowe. Do ekstrakcji zebrano od jednej do pięciu kolonii świeżo wyhodowanych kultur inkubowanych na agarze odżywczym

w temperaturze 37°C przez 24 godziny i zawieszono w 300 µl wody podwójnie destylowanej. Następnie dodano 900 µl absolutnego etanolu. Próbki mieszano za pomocą mieszadła wirowego przez 30 s, a następnie wirowano przez 2 min przy 13000 × g. Supernatant usunięto, a osad wysuszono w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 25 µl 70% roztworu kwasu mrówkowego i próbkę dokładnie wymieszano. Następnie dodano 25 µl acetonitrylu i ponownie wymieszano próbkę. Próbki wirowano przez 2 minuty przy 13000 × g. Supernatant (1 µl) przeniesiono na płytkę BC z polerowanej stali MSP 96 i pozostawiono na 15 minut w temperaturze pokojowej do wyschnięcia. Następnie na suche próbki nałożono taką samą ilość matrycy HCCA (kwas α-cyjano-4-hydroksycynamonowy) i ponownie płytkę pozostawiono na 15 minut w temperaturze pokojowej. Płytkę docelową wprowadzono do spektrometru mas MALDI Biotyper Sirius (Bruker, częstotliwość lasera: 200 Hz), a widma masowe wyekstrahowanych białek rybosomalnych uzyskano za pomocą oprogramowania flexControl w wersji 3.4. Każde z widm masowych bakterii uzyskano poprzez uśrednienie 1500 wiązek laserowych z trzech pozycji. Widma kalibrowano zewnętrznie przy użyciu standardu *E. coli* DH5-alfa (Bruker). Kalibrator składał się z sześciu białek rybosomalnych *E. coli* z dodatkiem RNAzy A i mioglobiny, aby pokryć zakres 3637,8–16 952,3 Da. Do identyfikacji widm masowych wykorzystano oprogramowanie MBT Compass 4.1, MALDI Biotyper Compass Explorer 4.1 oraz bazę danych MBT Compass Library Revision H (2022) (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG) zawierającą 3893 gatunki/wpisy. Zgodnie z instrukcją producenta, wyniki identyfikacji są klasyfikowane w następujący sposób:

2.300–3.000: Bardzo prawdopodobna identyfikacja gatunku

2,000–2,299: Pewna identyfikacja rodzaju, prawdopodobna identyfikacja gatunku

1,700–1,999: Prawdopodobna identyfikacja rodzaju

0,000–1,699: Brak wiarygodnej identyfikacji

Szczepy koagulazododatnie o wyniku identyfikacji w zakresie od 3,000 do 1,700 log potwierdzono dodatkowo metodą molekularną opartą na analizie polimorfizmu genu *nuc* według Sasaki i in. (2010).

DNA izolowano z 24-godzinnych czystych kolonii bakteryjnych przy użyciu komercyjnego zestawu (Gram Plus and Yeast Genomic DNA Purification Kit; EURx, Gdańsk, Polska) zgodnie z instrukcją producenta. Amplifikację przeprowadzono zgodnie z warunkami

opisanymi w publikacji Hahaj Siembida i in. (2025) i z użyciem mieszaniny Silver Taq Mix (Syngen Biotech, Teipei, Tajwan) oraz odpowiednio dobranych starterów (Genomed, Warszawa, Polska).

5.1.1.1.2. Wymazy i mleko (owce)

Wymazy oraz mleko pobrane od dwóch ras owiec, owiec rasy uszlachetnionej – rasy Uhruska (Polska Owca Nizinna) oraz rasy pierotnej – rasy Świniarka, poddano badaniom mikrobiologicznym. Izolację i identyfikację szczepów *Staphyloccoccus* spp. przeprowadzono zgodnie z opisem powyżej (5.1.1.1.1).

5.1.1.2. Zwierzęta towarzyszące (psy i koty)

Materiał badawczy pobrano w postaci wymazów od 151 zwierząt towarzyszących (90 psów i 61 kotów). Izolację i identyfikację szczepów *Staphyloccoccus* spp. przeprowadzono zgodnie z opisem powyżej (5.1.1.1.1).

5.1.1.3. Zwierzęta wolno żyjące (lisy rude)

Łącznie pobrano 415 próbek (206 wymazów z odbytu i 209 wymazów z jamy ustnej). Izolację i identyfikację szczepów *Staphyloccoccus* spp. przeprowadzono zgodnie z opisem powyżej (5.1.1.1.1).

5.1.2. Ocena fenotypowej lekowrażliwości szczepów

5.1.2.1. Metoda dyfuzyjno- krążkowa

Oporność na substacje przeciwdrobnoustrojowe szczepów *Staphylococcus* spp. wyizolowanych od zwierząt, oceniano metodą dyfuzyjno-krążkową (test Kirby'ego–Bauera) na podłożu Mueller Hilton (Biomaxima, Lublin, Polska). Wytypowano czternaście substancji przeciwdrobnoustrojowych, a następnie przeprowadzono badanie metodą dyfuzyjno-krążkową zgodnie ze standardem CLSI, wykorzystując krążki nasączone następującymi substancjami: erytromycyna 15 µg, oksacylina 1 µg lub cefoksytyna 30 µg, gentamycyna 10 µg, ryfampicyna 5 µg, chinuprystyna/dalfoprystyna 15 µg, klindamycyna 2 µg (indywidualnie i w testach wykrywających indukowaną oporność na klindamycynę u *Staphylococcus* spp. zgodnie ze standardem CLSI), penicylina G 10 U, sulfametoksazol/trimetoprim 25 µg, tetracyklina 30 µg, nitrofurantoina 300 µg, linezolid 30

µg, cyprofloksacyna 5 µg i chloramfenikol 30 µg (Thermo Scientific™ Oxoid™). Do interpretacji wyników wykorzystano ze standardy Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI VET 01 S, 2024; CLSI M100-ED35, 2025). Jako kontrolę jakości zastosowano *S. aureus* ATCC25923. Oporność wielolekową szczepów sklasyfikowano zgodnie z kryteriami opisanymi przez Magiorakos i in. (2012) (Hahaj-Siembida i in., 2024; Hahaj-Siembida i in., 2025).

5.1.2.2. Minimalne stężenie hamujące (ang. minimum inhibitory concentration) - MIC

Wrażliwość izolowanych koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus* opornych na metycylinę (MRSA) oceniano dodatkowo metodą mikrorozcieńczeń zgodnie z wymogami Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI VET 01 S, 2024; CLSI M100-ED35, 2025). Określono minimalne stężenia hamujące (MIC) dla następujących leków przeciwdrobnoustrojowych: erytromycyny, oksacyliny, gentamycyny, ryfampicyny, klindamycyny, penicyliny, tetracykliny, nitrofurantoiny, cyprofloksacyny, chloramfenikolu i wankomycyny (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Niemcy). W przypadku wszystkich testowanych substancji zastosowano zakres stężeń 0,25–128 µg/ml Jako kontrolę jakości zastosowano *S. aureus* ATCC29213.

5.1.3. Ocena molekularnych mechanizmów oporności i wirulencji koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus.*

5.1.3.1. Geny oporności

Szczepy *Staphylococcous* spp. przebadano pod kątem obecności genów kodujących wybrane mechanizmy lekooporności. Do badania wybrano następujące geny oporności: *mec*A, *bla*Z (oporność na β-laktamy), *erm*A, *erm*B, *erm*C, *msr*A (oporność na makrolidy), *cat* (pC223), *cat* (pC221), *cat* (pC194) (oporność na fenikole), *tet*K, *tet*M, *tet*L (oporność na tetracykliny), *aac*(6′)-Ie-*aph*(2″)), *aph*(3)-IIIa (oporność na aminoglikozydy), *fus*B, *fus*C, *fus*D (oporność na kwas fusydowy), *ile*S (oporność na mupirocynę), *smr*, *qac* A/B (oporność na biocydy) (Hauschild i in., 2007; Martineau i in., 2000; Oliveira i de Lencastre, 2002; Strommenger i in., 2003). Amplifikację DNA przeprowadzono w warunkach opisanych wcześniej (García-Álvarez i in., 2011; Hauschild i in., 2007; Martineau i in., 2000; Oliveira i de Lencastre, 2002; Strommenger i in., 2003; Hritcu et al., 2020; Hahaj-Siembida i in., 2024; Hahaj-Siembida i in., 2025), z użyciem mieszaniny Silver Taq Mix (Syngen Biotech,

Wrocław, Polska) i odpowiednio dobranych starterów (Genomed, Warszawa, Polska) (Tabela 1).

Tabela 1.Startery do detekcji genów oporności

Gen	**Sekwencje startera (5’ do 3’)**	**Wielkość produktu (pz)**	**Literatura**
*mec*A	F: TCCAGATTACAACTTCACCAGG R: CCACTTCATATCTTGTAACG	162	Oliveira i in., 2002
*mec*C	F: TCACCAGGTTCAACYCAAAA R: CCTGAATCWGCTAATAATATTTC	356	Garcia-Alvarez i in., 2011
*bla*Z	F: ACTTCAACACCTGCTGCTTTC R: TGACCACTTTTATCAGCAACC	173	Martineau i in., 2000
*erm*A	F: AAGCGGTAAACCCCTCTGA R: TTCGCAAATCCCTTCTCAAC	190	Strommenger i in., 2003
*erm*B	F: CTA TCT GAT TGT TGA AGA AGG ATT R:GTT TAC TCT TGG TTT AGG ATG AAA	142	Martineau i in., 2000
*erm*C	F: AATCGTCAATTCCTGCATGT R: TAATCGTGGAATACGGGTTTG	299	Strommenger i in., 2003
*msr*A	F: TCCAATCATTGCACAAAATC R: AATTCCCTCTATTTGGTGGT	163	Martineau i in., 2000
*tet*K	F: TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC R: GCAAACTCATTCCAGAAGCA	647	Aarestrup i in., 2000
*tet*L	F: GTTGCGCGCTATATTCCAAA R: TTAAGCAAACTCATTCCAGC	456	Aarestrup i in., 2000
*tet*M	F: GTTAAATAGTGTTCTTGGAG R: CTAAGATATGGCTCTAACAA	718	Aarestrup i in., 2000
cat (pC221)	F: ATTTATGCAATTATGGAAGTTG R: TGAAGCATGGTAACCATCAC	435	Schnellmann i in., 2006
cat (pC194)	F: CGACTTTTAGTATAACCACAGA R: GCCAGTCATTAGGCCTAT	570	Schnellmann i in., 2006
cat (pC223)	F: GAATCAAATGCTAGTTTTAACTC R: ACATGGTAACCATCACATAC	284	Schnellmann i in., 2006
aac(6’)-Ie-aph(2”)-Ia	F: CCAAGAGCAATAAGGGCATA R: CACTATCATACCACTACCG	220	van de Klundert i in., 1993
aph(3’)-IIIa	F: GCCGATGTGGATTGCGAAAA R: GCTTGATCCCCAGTAAGTCA	292	van de Klundert i in., 1993
*ile*S	F: TATATTATGCGATGGA AGGTTGG R: AATAAAATCAGCTGGAA AGTGTTG	458	Hritcu i in., 2020
*fus*B	F: CCGTCAAAGTTAT TCAATCG R: ACAATGAATGCTATCTC GACA	492	Hritcu i in., 2020
*fus*C	F: GGACTTTATTACATC GATTGAC R: CTGTCATAACAAATGTA ATCTCC	411	Hritcu i in., 2020
*fus*D	F: AATTCGGT CAACGATCCC R: GCCATCATTGCCA GTACG	465	Hritcu i in., 2020
smr	F: ATAAGTACTGAAGTTATTGGAAGT R: TTCCGAAAATGTTTAACGAAACTA	285	Hritcu i in., 2020
qac A/B	F: GCTGCATTTATGACAATGTTTG R: AATCCCACCTACTAAAGCAG	628	Hritcu i in., 2020

5.1.3.2. Geny wirulencji

Szczepy koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus* (*S. aureus* i *S. pseudintermedius*) wyizolowane od zwierząt oceniono pod kątem występowania specyficznych gatunkowo genów wirulencji. W przypadku izolatów *S. aureus* wybrano następujące geny wirulencji: *seA, seB, seC, seD, seE* (kodujące enterotoksyny SEA-E), *tsst* (kodujące toksynę zespołu wstrząsu toksycznego-1 (TSST-1), *et*A, *et*B (kodujące toksyny eksfoliatywne ETA i ETB), *PVL* (kodujące składniki leukocydyny Panton–Valentine) oraz *Luk*E-*Luk*D (kodujące leukotoksynę LUKE/LUKD) (Jarraud i in., 2002; Hahaj-Siembida i in., 2023) (Tabela 2). Natomiast *S. pseudintermedius* oceniono pod kątem obecności innych genów wirulencji: *ebp*S (kodujący białka wiążące elastynę), *sps*E, *bap* (kodujący białka adhezyjne), *lip* (kodujący lipazę), *hlg*A, *hlg*B (kodujące hemolizyny), *luk*F, *luk*S (kodujące składniki leukocydyny), *ica*A, *ica*D (kodujące składniki biofilmu), *siet, exp*A, *exp*B (kodujące toksyny eksfoliatywne), *tsst* (kodujące toksynę zespołu wstrząsu toksycznego), *PVL* (kodujące leukocydynę), *se*L, *se*M, *se*Q, *seCcanine* (kodujące enterotoksyny) (Hritcu i in., 2020; Moses i in., 2022; Wang i in., 2022; Breyer i in., 2023) (Tabela 3).

Tabela 2. Startery do detekcji genów wirulencji *S. aureus*

Gen	**Sekwencje startera (5' do 3')**	**Wielkość produktu (pz)**	**Literatura**
*se*A	F: GCGAAACACACAATGCTTGC R: GGAGGAATATAACCACGCGC	127	Becker i in., 1998
*se*B	F: GTGGCTGGCGGTGAGTCACG R: GAGTGAAGGTAGCCGTGGC	477	Becker i in., 1998
*se*C	F: GGCGGCAATATTGGCGCTCG R: TTACTGTCAATGCTCTGACC	271	Becker i in., 1998
*se*D	F: GGCCCGATATCTGAACCCGGAGGG R: GGCTCGTCGACCAGCATTAGCAAT	319	Becker i in., 1998
*se*E	F: ATGAAGAATAAGGCTGAT R: CAGAGCCTGCATCAACTGCG	178	Becker i in., 1998
tst	F: CACCGTCCTCGAGGGCTGTG R: TCAGTTTCCCGAAAACGCCC	445	Becker i in., 1998
*et*A	F: CTAGTGCATTTGTTATTCAAGACG R: TGCATTGACACCATAGTACTTATTC	119	Becker i in., 1998
*et*B	F: ACGGCTATATACATTCAATTCAATG R: AAAGTTATTCATTTAATGCACTGTCTC	262	Becker i in., 1998
PVL	F: ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA R: GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC	433	Jarraud i in., 2002
*Luk*E-*Luk*D	F: TGAAAAAGGTTCAAAGTTGATACGAG R: TGTATTCGATAGCAAAAGCAGTGCA	269	Jung i in., 2022

Tabela 3. Startery do detekcji genów wirulencji *S. pseudintermedius*

Gen	**Sekwencje startera (5' do 3')**	**Wielkość produktu (pz)**	**Literatura**
*ebp*S	F: AGACGCCACAGAAAAAGA R: GCAGATTGACCTTGTTGA	1040	Wang i in., 2022
*sps*E	F: TTTCTCGTTTCTGGGCGT R: GCGTCTTCTGGTTATCGT	1600	Wang i in., 2022
lip	F: GGAAAAGCAGCAGAAAGAA R: GGGTGCTGTAGAAATA	1601	Wang i in., 2022
*hlg*A	F: CTTCTTCCACTTATTACACC R: CACTTGTATCGTTTATC	718	Wang i in., 2022
*hlg*B	F: GGGGGGCTAAGTAAGTAATGT R: GCGCCATTTGGTTTATGT	475	Wang i in., 2022
*luk*F	F: CCTGTCTATGCCGCTAATCCA R: AGGTCATGGAAGCTATCTCGA	572	Hritcu i in., 2020
*luk*S	F: TGTAAGCAGCAGAAAATGGGG R: GCCCGATAGGACTTCTTACAA	503	Hritcu i in., 2020
*ica*A	F: ACTGTTTCGGGGACAAGCAT R: ATTGAGGCTGTAGGGCGTTG	134	Wang i in., 2022
*ica*D	F: CGTTAATGCCTTCTTTCTTATTGCG R: ATTAGCGCACATTCGGTGTT	166	Wang i in., 2022
siet	F: ATGGAAAATTTAGCGGCATCTGG R: CCATTACTTTTCGCTTGTTGTGC	359	Hritcu i in., 2020
tsst	F: GCTTGCGACAACTGCTACAG R: TGGATCCGTCATTCATTGTTAT	559	Wang i in., 2022
PVL	F: ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA R: GCATCAATGTATTGGATAGCAAAAGC	432	Wang i in., 2022
*se*L	F: TAACGGCGATGTAGGTCCAGG R: CATCTATTTCTTGTGCGGTAAC	382	Breyer i in., 2023
*se*M	F: GGATAATTCGACAGTAACAG R: TCCTGCATTAAATCCAGAAC	379	Breyer i in., 2023
*se*Q	F: AATCTCTGGGTCAATGGTAAGC R: TTGTATTCGTTTTGTAGGTATTTTCG	122	Breyer i in., 2023
Sec canine	F: GTCAGACCCAACACCAGACC R: CGGCATCAAGTCATACCAGA	598	Moses i in., 2022
*exp*A	F: GCGCGTCCTTCTGA TCCAGAACT R: AACGTCCCCCTTTAC CTACGTGAAT	574	Hritcu i in., 2020
*exp*B	F: GGGCATGCACATATGATGAAGCC R: CCAGATCTATCTTCTGATTCAGC	843	Hritcu i in., 2020
bap	F: CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG R: GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	971	Hritcu i in., 2020

5.1.4. Typowanie molekularne

5.1.4.1. Typowanie molekularne w oparciu o metodę wielolokusowej analizy sekwencji genów (ang. mulitilocus sequence typing) - MLST

Analizę szczepów metycylinoopornych *S. aureus* i *S. pseudintermedius* przeprowadzono w oparciu o MLST szczepów koagulazododatnich *Staphylococcus* opornych na metycylinę. Analiza MLST przeprowadzona dla szczepów *S. aureus* opierała się na siedmiu genach metabolizmu podstawowego: *arcC, aroE, glp, gmk, pta, tpi* i *yqiL* (Tabela 4). Specyficzne warunki multipleksowej reakcji PCR przeprowadzono zgodnie z opisanym protokołem (Enright i in. 2000). Analiza MLST przeprowadzona dla szczepów *S. pseudintermedius* opierała się również na siedmiu ale odmiennych od *S. aureus*, genach metabolizmu podstawowego: *ack, cpn60, fdh, pta, purA, sar, tuf* (Tabela 5). W tym przypadku również, specyficzne warunki multipleksowej reakcji PCR prowadzone były zgodnie z opisanym protokołem (Enright i in. 2000). Dla obu gatunków *Staphylococcus* reakcje przeprowadzono w objętości 25 µl z użyciem Silver Taq MIX (Syngen Biotech, Wrocław, Polska) w termocyklerze T100 (Bio-Rad, Hercules, USA). Następnie do oczyszczenia produktów PCR wykorzystano zestaw Clean-up (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Sekwencjonowanie DNA przeprowadzono metodą Sangera firmy Genomed S.A. (Warszawa, Polska). Uzyskane sekwencje nukleotydowe porównano z allelami w bazie PubMLST (https://pubmlst.org/). Następnie, na podstawie kombinacji alleli, przypisano sekwencje ST i kompleksy klonalne. Sekwencje nukleotydowe genów zdeponowano w bazie GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Tabela 4. Startery do detekcji genów metabolizmu podstawowego dla *S. aureus*

Gen	**Sekwencje startera (5' do 3')**	**Wielkość produktu (pz)**	**Literatura**
arcC	F:TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC R:AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	456	Enright i in., 2000
aroE	F:ATCGGAAATCCTATTTCACATTC R:GGTGTTGTATTAATAACGATATC	456	Enright i in., 2000
glpF	F:CTAGGAACTGCAATCTTAATCC R:TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	465	Enright i in., 2000
gmk	F:ATCGTTTTATCGGGACCATC R:TCATTAACTACAACGTAATCGTA	429	Enright i in., 2000
pta	F:GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG R:GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	474	Enright i in., 2000
tpi	F:TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA R:TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	402	Enright i in., 2000
yqiL	F:CAGCATACAGGACACCTATTGGC R:CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	516	Enright i in., 2000

Tabela 5. Startery do detekcji genów metabolizmu podstawowego dla *S. pseudintermedius*

Gen	**Sekwencje startera (5' do 3')**	**Wielkość produktu (pz)**	**Literatura**
tuf	F:CAATGCCACAAACTCG R:GCTTCAGCGTAGTCTA	500	Solyman i in., 2012
cpn60	F:GCGACTGTACTTGCACAAGCA R:AACTGCAACCGCTGTAAATG	552	Solyman i in., 2012
pta	F:GTGCGTATCGTATTACCAGAAGG R:GCAGAACCTTTTGTTGAGAAGC	570	Solyman i in., 2012
purA	F:GATTACTTCCAAGGTATGTTT R:TCGATAGAGTTAATAGATAAGTC	490	Solyman i in., 2012
fdh	F:TGCGATAACAGGATGTGCTT R:CTTCTCATGATTCACCGGC	408	Solyman i in., 2012
ack	F:CACCACTTCACAACCCAGCAAACT R:AACCTTCTAATACACGCGCACGCA	680	Solyman i in., 2012
sar	F:GGATTTAGTCCAGTTCAAAATTT R:GAACCATTCGCCCCATGAA	521	Solyman i in., 2012

5.1.4.2. Amplifikacja fragmentów DNA otaczających rzadkie miejsca restrykcyjne (*ADSRRS*-fingerprinting)

Izolaty koagulazododatnich *Staphylococcus* genotypowano metodą *ADSRRS*-fingerprinting (ang. amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites, *ADSRRS*-fingerprinting) zgodnie z protokołem opisanym przez Krawczyk i in. (2003) z dodatkowymi modyfikacjami (Nowakiewicz i in., 2016; Trościańczyk i in., 2023). Najpierw trawieniu poddano genomowe DNA dwoma enzymami restrykcyjnymi, często i rzadko tnącym: XbaI (10U) i BglII (5U) (Thermo Scientific, Waltham, USA) w temperaturze 37°C przez 1 godzinę. W kolejnym kroku było przeprowadzenie reakcji ligacji z użyciem ligazy DNA T4 (Thermo Scientific, Waltham, USA) i odpowiednich adapterów (25°C przez 1 godzinę). Następnie, po inaktywacji termicznej w temperaturze 70°C przez 5 min, przeprowadzono reakcje PCR w objętości 25 µl zawierającej 1 µl mieszanki ligacyjnej, Silver Taq MIX (Syngen Biotech, Wrocław, Polska) i 50 pmol każdego startera (Genomed S.A., Warszawa, Polska). PCR przeprowadzono w termocyklerze T100 (Bio-Rad, Hercules, USA) przy użyciu spersonalizowanego profilu termicznego (94°C—5 min, 72°C—5 min, 94°C—5 min, 22 cykle (94°C—30 s, 60°C—30 s i 72°C—90 s) i 72°C—7 min). Elektroforezę produktów PCR przeprowadzono w 6% żelu poliakrylamidowym i barwiono bromkiem etydyny. Żel wizualizowano i dokumentowano w oprogramowaniu GelDoc Go System (Bio-Rad, Hercules, USA). Następnie przeprowadzono analizę podobieństwa profili elektroforetycznych metodą UPGMA z wykorzystaniem oprogramowania BIO-1D++ 11.9 (Vilber, Lourmat, Francja) w oparciu o współczynnik korelacji Jaccarda (tolerancja i optymalizacja 1%) (Krawczyk i in., 2003; Nowakiewicz i in., 2016; Trościańczyk i in., 2023) (Tabela 6-7).

Tabela 6. Sekwencje adapterów

Adapter	**Sekwencja nukleotydowa (5’ do 3’)**	**Literatura**
adaptor krótki *XbaI*	5’ CTAGGTCGACGTT 3’	Krawczyk i in., 2003
adaptor długi *BglII*	5’ GATCCGTCGACAACGGCGTTCCTTCGTCTACCATCC 3’	Krawczyk i in., 2003

Tabela 7. Sekwencje oligonukleotydów użytych w reakcji ampifikacji

Nazwa startera	**Sekwencja nukleotydowa (5’ do 3’)**	**Literatura**
ADSRRS1 (S1)	5’ CCTTCATCCACCAACGTCGAC 3’	Krawczyk i in., 2003
ADSRRS2 (S2)	5’ GGATGGTAGACGAAGGAACGC 3’	Krawczyk i in., 2003

5.2. Markery zapalne

Materiał badawczy stanowiły próbki krwi pobrane od dwóch ras owiec (Uhruskiej oraz Świnarki). Próbki krwi pobrano przez nakłucie żyły szyjnej do sterylnych probówek próżniowych przez lekarza weterynarii podczas rutynowego badania w tych samych okresach, co pobierane wymazy przed ciążą (I), ciąża (II, III) oraz po porodzie/w okresie laktacji (tydzień po porodzie)(IV).

5.2.1. Morfologia

Próbki krwi owiec zostały po dostarczeniu do laboratorium poddane w pierwszym etapie analize morfologcznej. Do oceny morfologii krwi wykorzystano analizator hematologiczny Abacus Junior Vet (Diatron) z automatycznym pomiarem metodą impedancyjną. Każda próbka została oszacowana w sposób duplikatowy (średnia z każdego duplikatu została wprowadzona do analizy statystycznej). Podczas badania przeanalizowane zostały następujące elementy morfotyczne krwi: białe krwinki (WBC), limfocyty (LYM), granulocyty (GR), liczba czerwonych krwinek (RBC), hemoglobina (HGB), średnia objętość krwinki czerwonej (MCV), hematokryt (HCT), średnia zawartość hemoglobiny w krwince (MCH).

5.2.2. Izolacja materiału genetycznego

Po potwierdzeniu lub wykluczeniu obecności *S. aureus* w próbkach mikrobiologicznych u badanych zwierząt dokonano podziału na dwie grupy: grupę, w której *S. aureus* został wyizolowany z co najmniej jednej próbki wymazu/mleka oraz grupę kontrolną zwierząt (bez obecności *S. aureus*). Izolację całkowitego RNA z leukocytów krwi przeprowadzono przy użyciu zestawu Hybrid-RTM Blood RNA (GeneAll General Biotechnology Co, Ltd) zgodnie z protokołem producenta. Uzyskany całkowity RNA zawieszono w 30 µl wody wolnej od RNaz i przechowywano w temperaturze -80ºC. Wyizolowane próbki RNA analizowano pod kątem ilości i jakości przy użyciu urządzenia NanoDrop 2000 (NanoDrop, USA). Parametry próbek mierzono przy długościach fali 260/280 nm i 260/230 nm. Próbki uznawano za dobrej jakości, gdy stosunek długości fali 260/280 nm wynosił ~2,0. Zestaw iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad) został użyty do syntezy cDNA na matrycy DNA zgodnie z protokołem producenta. Reakcję przeprowadzono początkowo w termocyklerze PTC-220 DNA Engine (MJ Research). Zsyntetyzowane cDNA przechowywano w temperaturze -20°C.

5.2.3. Analiza ekspresji wybranych genów cytokin oraz białek ostrej fazy w leukocytach owiec: nosicieli *S. aureus* w porównaniu do kontrolnej grupy zwierząt

Poziom transkryptów badanych genów określono metodą Real-Time PCR z użyciem aparatu CFX96 (BioRad). Reakcję przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta komercyjnego zestawu iTaq TM Universal SYBR Green Supermix (BioRad). Do przygotowania mieszaniny reakcyjnej użyto 100 ng cDNA, 300 nM każdej pary starterów oraz 10 µl iTaq Universal Sybr Green Supermix, a następnie dodano wodę do 20 µl. Materiał przygotowano na przezroczystej płytce 96-dołkowej, na której umieszczono również kontrolę negatywną (mieszaninę reakcyjną bez cDNA), aby zapewnić czystość odczynników i wykluczyć zanieczyszczenie. Przygotowano również serię rozcieńczeń matrycowego cDNA (1, 1/2, 1/4, 1/16, 1/64) w celu określenia wydajności reakcji i wyznaczenia krzywej standardowej. Sekwencje genów wybranych cytokin sporządzono na podstawie danych literaturowych: *IL-1α, IL-1β, TNF-α* (Bonnefont i in., 2012), *IL-6* (Hadfield i in., 2018). Natomiast sekwencje genów białek ostrej fazy zaprojektowano przy użyciu oprogramowania Primer-Blast Software (NCBI, RockvillePike, USA) (Tabela 8). Amplifikację przeprowadzono w temperaturze wybranej dla genów w 40 cyklach, zgodnie z protokołem producenta. Temperaturę hybrydyzacji starterów sprawdzono we wstępnych badaniach przeprowadzonych na mieszaninach cDNA z krwi owczej obu ras, wykorzystując reakcję PCR z gradientem temperatury. Wykorzystane geny referencyjne: *ACTB, GAPDH* i *RPL19* (Mauffré i in., 2016) wybrano na podstawie wcześniejszych badań przeprowadzonych przez zespół (Greguła-Kania i in., 2018). Względny poziom ekspresji mRNA tych genów oszacowano na podstawie wzoru Pfaffela (2001).

Tabela 8. Sekwencje genów cytokin i białek ostrej fazy oraz genów referencyjnych

	Gen	Sekwencje startera (5’ do 3’)
cytokiny	*IL-1α*	F: GATGACCTGGAAGCCATTGC
		R: ATGTGCTGATCTGGGCTTGAT
	IL-1β	F: TGAAGAGCTGCACCCAACAC
		R: GAGAAATCTGCAGCTGGATGTTT
	TNF-α	F: GAGCACCAAAAGCATGATCC
		R: GGCGATGATCCCAAAGTAGA
	IL-6	F: TAACCACTCCAGCCACACAC
		R: GATAACCTTTGCGTTCTTTACCC
białka ostrej fazy	*SAA*	F: AAGAGGACACATCCCCACAG
		R: TCCCTGGTCATACCCTTGAG
	Hp	F: CTCCCTGAATGTGAGGCAGT
		R: TGAGGTTATGGTGGGAGACC
	Cp	F: GGAAGGATGTTTGGGAACCT
		R: TGGTATGTCCCAGGGAAGAG
referencje	*ACTB*	F: AGCGTGGCTACAGCTTCACC
		R: GGCCATCTCCTGCTCGAAGT
	GAPDH	F: GCTGACGCTCCCATGTTTGT
		R: TCATAAGTCCCTCCACGATGC
	RPL19	F: CCCCAATGAGACCAATGAAATC
		R: CAGCCCATCTTTGATCAGCTT

5.3. Analiza statystyczna

5.3.1. Zwierzęta gospodarskie

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu Statistica 13.1 (Dell Technologies, Round Rock, TX, USA). Do określenia statystycznie istotnych różnic między *S. aureus* a CoNS w zakresie poziomu oporności fenotypowej i występowania genów oporności oraz porównania oporności fenotypowej i występowania genów oporności między szczepami wyizolowanymi od obu ras owiec zastosowano test U Manna-Whitneya (wartość $p < 0,05$).

Analiza statystyczna dotyczny danych zawartych w Publikacji nr 1.

Analizę statystyczną danych przeprowadzono z wykorzystaniem pakietu Statistica w wersji 13.1. Ze względu na analizę danych kategorycznych i małą liczebność grup, do oceny statystycznie istotnych różnic między szczepami izolowanymi od dwóch ras (Uhruska i Świniarka) zastosowano test Fishera (wartość $p < 0,05$) w celu porównania fenotypowej oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz występowania genów oporności i wirulencji.

Analiza statystyczna dotyczny danych zawartych w Publikacji nr 2 (na etapie recenzji).

Analizę statystyczną danych przeprowadzono przy użyciu pakietu programowego Statistica w wersji 13.1. Ze względu na analizę danych kategorycznych i małą liczebność grup, do oceny statystycznie istotnych różnic między szczepami wyizolowanymi od dwóch ras (Uhruska i Świniarka) zastosowano test Fishera (wartość $p < 0,05$). Do oceny wpływu czasu pobierania próbek, rasy i ich interakcji na ekspresję genów w leukocytach zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla powtarzanych pomiarów. Do określenia jednorodności wariancji zastosowano test Levene'a. Gdy wpływ czynników był istotny ($p < 0,05$), wykonano test post-hoc Tukeya w celu określenia specyficznych różnic między średnimi.

Analiza statystyczna dotyczny danych zawartych w Publikacji nr 3 (na etapie recenzji).

5.3.2. Zwierzęta towarzyszące

Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania Statistica 13.1 (StatSoft, Kraków, Polska). Do analizy statystycznie istotnych różnic między *S. aureus* i *S. pseudintermedius* pod względem miejsca izolacji, lekooporności oraz występowania genów oporności na leki przeciwbakteryjne i MDR wykorzystano test U Manna-Whitneya ($p<0,05$).

Analiza statystyczna dotyczny danych zawartych w Publikacji nr 4 (na etapie recenzji).

5.3.3. Zwierzęta wolno żyjące

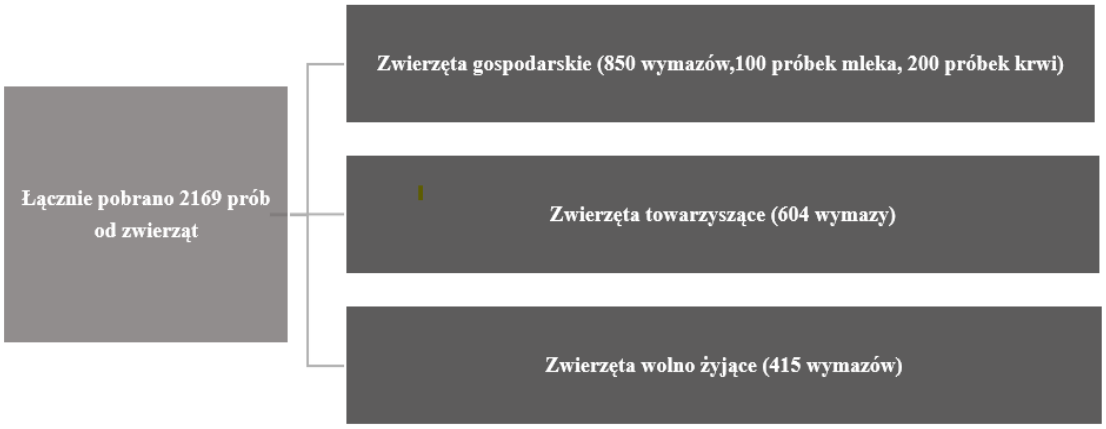
Test U Manna-Whitneya wykonano przy użyciu oprogramowania STATISTICA 13.1 (StatSoft, Kraków, Polska); za istotne statystycznie przyjęto $p < 0,05$. Test wykorzystano do porównania częstości izolacji *Staphylococcus* spp. z jamy ustnej i odbytu oraz występowania oporności na substancje przeciwbakteryjne między izolatami *S. aureus* i *S. pseudintermedius.*

Analiza statystyczna dotyczny danych zawartych w Publikacji nr 5.

6. Wyniki

Łącznie pobrano 2169 prób od zwierząt z czego od zwierzat gospodarskich 850 wymazów i 100 prób mleka, a także 200 próbek krwi żylnej, od zwierzat towarzyszących 604 wymazy oraz od zwierząt wolno żyjących 415 wymazów (Rycina 7).

Rycina 7. Schemat ilustrujący łączną liczbę pobranych prób od wierząt



6.1. Wyniki część mikrobiologiczna

6.1.1. Izolacja i identyfikacja *Staphylococcus* u różnych gatunków zwierząt

6.1.1.1. Zwierzęta gospodarskie

Przeprowadzona została izolacja i identyfikacja *Staphylococcus* spp. wyizolowanych z mleka owczego od dwóch ras owiec (Uhruska oraz Świniarka) w dwóch odrębnych publikacjach. W obu pracach wykorzystano tę samą metodę izolacji i identyfikacji, tj. MALDI TOF-MS i amplifikację genu *nuc* w przypadku koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus*. W pierwszej publikacji analiza metodą MALDI TOF-MS potwierdziła, że 35 izolatów uzyskanych z 50 badanych próbek mleka owczego należało do rodzaju *Staphylococcus*. Spośród nich, 20 szczepów (57% wszystkich badanych próbek) sklasyfikowano jako koagulazododatnie gatunki *Staphylococcus* i wszystkie zidentyfikowano do gatunku *S. aureus*, co dodatkowo potwierdziły wyniki amplifikacji genu *nuc*. Pozostałe 15 szczepów *Staphylococcus* (które stanowiły 30% badanych próbek mleka) przypisano do czterech różnych koagulazoujemnych gatunków *Staphylococcus* (*S. xylosus,*

S. simulans, S. condimenti i *S. lentus*) (Tabela 9). W przypadku obu ras zwierząt zaobserwowano porównywalny odsetek pozytywnych wyników izolacji *Staphylococcus* z próbek, przy niewielkiej przewadze w przypadku rasy Świniarka (odpowiednio 54% i 46% próbek było pozytywnych).

Tabela 9. Występowanie gatunków *Staphylococcus* w mleku owczym w zależności od rasy

	Staphylococcus (n=35)				
Rasa	*S. aureus*	*S. xylosus*	*S.simulans*	*S. lentus*	*S. condimenti*
UHR (n=16)	10	1	4		1
SW (n=19)	10	7	1	1	
Razem	20	8	5	1	1
%*	57,2	22,8	14,3	2,85	2,85

* odsetek szczepów w stosunku do całkowitej liczby izolatów (n=35)

SW – rasa Świniarka, UHR – rasa Uhruska (Polska Owca Nizonna)

W Publikacji nr 2 również została przeprowadzona izolacja i identyfikacja *Staphylococcus* spp. wyizolowanych z mleka owczego ale także z pobranych wymazów (skóra, zewnętrzny przewód słuchowy, odbyt, jama ustna) od dwóch ras owiec (Uhruska oraz Świniarka), przy czym badanie zostało ukierunkowane wyłącznie na izolację gatunku *S. aureus*. Łącznie wyizolowano 103 szczepy *S. aureus* od dwóch ras owiec, w tym 66 izolatów od rasy Uhruska i 37 izolatów od rasy Świniarka z różnych miejsc pobrania oraz w czterech różnych okresach pobrania. Najwięcej szczepów, niezależnie od rasy, wyizolowano z jamy ustnej i stanowiły one aż 59,2% wszystkich wyizolowanych szczepów *S. aureus*. Pozostałe szczepy *S. aureus* wyizolowano z błony śluzowej odbytu (14,6%) i skóry (9,7%), a najmniej izolatów, stanowiących zaledwie 6,8%, uzyskano z zewnętrznego przewodu słuchowego. Ponadto, w tym badaniu tylko 9,7% izolatów *S. aureus* pochodziło z mleka owczego (Tabela 10).

Tabela 10. Występowanie *S. aureus* według rasy owiec i miejsca pobrania

Rasa owiec	Źródło izolacji/Miejsce izolacji				
	Skóra	zew. kanał słuchowy	Odbyt	Błona śluzowa jamy ustnej**	Mleko
Uhruska (n=66)	6	4	7	40	9
Świniarka (n=37)	4	3	8	21	1
Razem n=103/%*	10/9,7	7/6,8	15/14,6	61/59,2	10/9,7

*odsetek szczepów w stosunku do całkowitej liczby izolatów

**izolaty od owiec matek i jagniąt

W zależności od okresu pobierania próbek, liczba izolatów, w których wykryto *S. aureus*, była zróżnicowana (Tabela 11). Przed ciążą *S. aureus* wyizolowano tylko u owiec rasy Uhruska. Z kolei na początku ciąży wykryto 29 izolatów u obu ras, z czego 14 izolatów od owiec rasy Uhruska i 15 izolatów od owiec rasy Świniarka. W próbkach pobranych pod koniec ciąży wykryto 35 izolatów *S. aureus*, w tym 18 izolatów u rasy Uhruska i 17 izolatów u rasy Świniarka. Natomiast po porodzie w wymazach (w trakcie laktacji), wykryto łącznie 16 izolatów *S. aureus* (12 izolatów u rasy Uhruska i 4 izolaty u rasy Świniarka). Ponadto wykazano pięć izolatów u jagniąt (wyłącznie rasy Uhruska) oraz łącznie 10 izolatów w mleku maciorek (9 szczepów wyizolowanych z rasy Uhruska i jeden szczep od owcy Świniarka). Podsumowując, wyniki wykazały, że łącznie od 32 zwierząt (w tym 19 owiec rasy Uhruska i 13 rasy Świniarka) wyizolowaliśmy więcej niż jeden szczep *S. aureus* albo z różnych miejsc albo w różnych okresach pobrania.

Tabela 11. Występowanie *S. aureus* według rasy owiec matek i czasu pobrania

Rasa owiec	Okres pobrania*			
	I	II	III	IV
Uhruska (n=52)	8	14	18	12
Świniarka (n=36)		15	17	4
Razem n= 88/%	8/9,1	29/32,9	35/39,8	16/18,2

*I, II, III, IV – okres okołoporodowy pobrania próbki: I – przed ciążą, II – na początku ciąży, III – pod koniec ciąży, IV – po porodzie/w okresie laktacji

6.1.1.2. Zwierzęta towarzyszące

Szczepy zidentyfikowane jako *Staphylococcus* spp. wyizolowano w sumie od 79 zwierząt towarzyszących (52,3%), przy czym głównymi nosicielami były psy, ponieważ tylko 32 z nich (35,5%) nie wykazało obecności tych bakterii (Publikacja nr 4). Z kolei w przypadku kotów tylko 34,4% (n=21) zwierząt było nosicielami bakterii *Staphylococcus*, a większość wyizolowanych szczepów należała do CoNS (Tabela 12), które zostały wyizolowane od 18 z 21 *Staphylococcus*-pozytywnych kotów, w tym trzy przypadki z CoPS. Szczepy CoNS wykryto również u 18 psów, ale tylko w jednym przypadku były obecne w połączeniu z CoPS. W przypadku 39 psów wykazano obecność jednego szczepu lub szczepów należących do CoPS. Biorąc jednak pod uwagę cztery różne miejsca izolacji, uzyskano w sumie 145 szczepów (117 od psów i 28 od kotów). Spośród wszystkich izolatów *Staphylococcus*, 101 (69,9%) szczepów zidentyfikowano jako koagulazododatnie gatunki (CoPS), a 44 (30,4%) jako koagulazoujemne (CoNS) (Tabela 12). W grupie CoPS zidentyfikowano tylko dwa gatunki: większość stanowiły szczepy należące do *S. pseudintermedius* (n=79; 78,2%), a tylko 22 szczepy (21,8%) zidentyfikowano jako *S. aureus* (Tabela 12). Różnorodność gatunkowa szczepów CoNS była znacznie większa, ponieważ wykazano obecność aż 10 różnych gatunków, w tym dwóch należących do rodzaju *Mammaliicoccus* (*M. sciuri* i *M. lentus* stanowiły 25% wszystkich wyizolowanych CoNS). Pozostałe gatunki sklasyfikowano jako *Staphylococcus*, wśród których dominowały: *S. xylosus, S. warneri, S. haemolyticus* i *S. simulans* (Tabela 12).

Biorąc pod uwagę miejsce izolacji, najwyższy odsetek szczepów *Staphylococcus* pochodził ze skóry (n=53; 36,5%), porównywalny odsetek z błony śluzowej jamy ustnej (n=47; 32,4%). Najniższy odsetek stwierdzono w wymazach z błony śluzowej odbytu (n=17; 11,7%). Nie stwierdzono jednak statystycznie istotnych różnic w występowaniu między grupami CoPS i CoNS ani między *S. aureus* i *S. pseudintermedius* na poziomie istotności $p < 0,05$ (Tabela 13).

Tabela 12. Występowanie *Staphylococcus* spp. u psów i kotów

Gospodarz	Potwierdzone gatunki *Staphylococcus/Mammalicoccus* (n = 145)											
	Koagulazododatnie (n=101; 69,6%)		Koagulazoujemne (n=44; 30,4%)									
	S.aureus (n==22; 21,8%)	*S.pseudintermedius (=79; 78,2%)*	*M..sciuri (n=9; 20,5%)*	*S.xylosus* (n=5; 11,4%)	*S.warneri (n=6; 13,6%)*	*S.haemolyticus* (n=9; 20,5%)	*S.simulans* (n=8; 18,1%)	*S.felis* (n=1; 2,3%)	*M. lentus* (n=2,; 4,5%)	*S.epidermidis (n=1; 2,3%)*	*S.saprophyticus (n=2; 4,5%)*	*S. caprae(n=1; 2,3%)*
Psy (n=117; 80,7%)	17 *(6S, 3E, 1R, 7M)	77 (26S, 15E, 14R, 22M)	7 (3S, 4M)	2 (1S, 1E)	3 (3S)	5 (2S, 3M)	2 (1S, 1M)		1 (1E)	1 (1E)	2 (1R, 1M)	
Koty (n=28; 19,3%)	5 (2S, 1E , 2M)	2 (1E, 1M)	2 (1S, 1E)	3 (1E, 2M)	3 (2S, 1E)	4 (3S, 1M)	6 (2S, 2E, 1R, 1M)	1 (1E)	1 (1M)			1 (1E)

*S – skóra okolicy pachwiny, E – zewnętrzny kanał słuchowy, R – odbyt, M – błona śluzowa jamy ustnej

Tabela 13. Występowanie *Staphylococcus* spp. według miejsca pobrania

	Źródło izolacji			
	Skóra	Zewnętrzny kanał słuchowy (ucho)	Odbyt	Błona śluzowa jamy ustnej
Gatunek CoPS n=101/%	35/34,7	18/17,8	15/14,9	33/32,7
S. aureus (n=22)	8/36,4	4/18,2	1/4,5	9/40,9
S. pseudintermedus (n=79)	27/34,2	14/17,7	14/17,7	24/30,4
Gatunek CoNS n=44/%	18/40,9	10/22,7	2/4,5	14/31,8
Razem n=145/%	53/36,5	28/19,3	17/11,7	47/32,4

6.1.1.3. Zwierzęta wolno żyjące

Łącznie wyizolowano 157 szczepów z błony śluzowej jamy ustnej i odbytu, które zostały zaklasyfikowane jako *Staphylococcus* (60 szczepów z błony śluzowej odbytu oraz 97 szczepów z błony sluzowej jamy ustnej) (Publikacja nr 5). Istotnie wyższy odsetek w tej grupie stanowiły szczepy koagulazododatnie (83,4% -n = 131) (Tabela 14). Jednocześnie wykazano statystycznie istotnie wyższy odsetek izolatów *Staphylococcus* pochodzących z jamy ustnej niż z odbytnicy ($p < 0,05$). Niezależnie od miejsca izolacji, w grupie CoPS zidentyfikowano tylko dwa gatunki: *S. aureus* i *S. pseudintermedius*, z przewagą tego drugiego gatunku (n = 104; 79,4% wszystkich izolatów CoPS, z istotnością statystyczną). Częstość izolacji *S. aureus* z jamy ustnej była statystycznie istotnie wyższa niż z odbytnicy. Niewielka różnica zaobserwowana została w przypadku *S. pseudintermedius* lecz nie była statystycznie istotna (Tabela 14). Gatunki koagulazoujemne *Staphylococcus* były statystycznie istotnie mniej liczne (n = 26) i bardziej zróżnicowane niż CoPS. Reprezentowały je *M. sciuri, S. succinus, S. xylosus, S. warneri, S. vitulinus, S. haemolyticus* i *S. chromogenes* (Tabela 14). Co więcej, większość szczepów CoNS to również izolaty pochodzące z jamy ustnej (69,2% wszystkich izolatów CoNS).

Tabela 14. Występowanie gatunków *Staphylococcus/Mammalicoccus* u lisa rudego w zależności od miejsca izolacji szczepu

	Potwierdzony gatunek *Staphylococcus/Mammalicoccus* (n=157)								
	Koagulazododatni (131) 83.4*		Koagulazoujemny (26) 16.6						
Miejsce izolacji	*S. aureus*	*S. pseudintermedius*	*M. sciuri*	*S. succinus*	*S. xylosus*	*S. warneri*	*S. vitulinus*	*S. haemolyticus*	*S. chromogenes*
J. ustna	22	57	6	3	4		1	3	1
Odbyt	5	47	1	1	4	1	1		
Razem	27	104	7	4	8	1	2	3	1
%	17.2	66.2	4.5	2.54	5.1	0.64	1.27	1.9	0.64

* odsetek szczepów w stosunku do całkowitej liczby izolatów (n=157)

Powyższy fragment dotyczył artuykłu: Red foxes (Vulpes vulpes) as a specific and underappreciated reservoir of resistant and virulent *coagulase-positive Staphylococcus spp.* strains.

6.1.1.4. Podsumowanie punktu izolacja i identyfikacja *Staphylococcus* spp. od różnych gatunków zwierząt

Łącznie wyizolowanych zostało 440 izolatów *Staphylococcus/Mammalicoccus*, a wśród nich 355 izolatów stanowiły gatunki koagulazododatnie, a 85 gatunki koagulazoujemne. Od zwierząt gospodarskich wyizolowano łącznie 138 szczepów, a w tym 123 izolaty *S. aureus* (89%). Nastomiast od zwierząt towarzyszących wyizolowano 145 izolatow, a wsród nich 101 szczepów (69%) stanowiły koagulazododatnie izolaty (w tym 22 izolaty *S. aureus* oraz 79 izolatów *S. pseudintermedius*). Ponadto 157 zidentyfikowanych izolatów pochodziło od zwierzat wolno żyjących, a w tym 131 (83%) stanowiły izolaty koagulazododatnie z przewagą *S. pseudintermedius* (n=104) i zaledwie 27 izolatów *S. aureus* (Tabela 15). Ze względu na izolację więcej niż jednego szczepu od danego osobnika nie określono prewalencji. Najniższe zróżnicowanie wśród gatunków CoNS zaobserwowano wśród obu

gatunków owiec (zwierzęta gospodarskie), bo wkazano obecnośc zaledwie trzech różnych gatunków. W przypadku zwierząt mięsożernych (domowych i wolno żyjących), zróżnicowanie gatunkowe było znacznie większe i obejmowało aż 12 różnych gatunków zarówno *Mammalicoccus* jak i *Staphylococcus.* U zwierząt mięsożernych dominował *M. sciuri, S. warneri* i *S. haemolyticus*, natomiast *S. xylosus* izolowano od wszystkich grup zwierząt i gatunek ten był najliczniejszy spośród CoNS (Tabela 15).

Tabela 15. Występowanie *Staphylococcus/Mammalicoccus* u różnych gatunków zwierząt

	Potwierdzone gatunki	Zwierzęta gospodarskie (n= 138)	Zwierzęta towarzyszące (n=145)	Zwierzęta wolno żyjące (n=157)	Razem (n=440)
CoPS (n=355)	*S. aureus*	123	22	27	172
	S. pseudintermedius		79	104	183
CoNS (n=85)	*S. xylosus*	8	5	8	21
	S. simulans	5	8		13
	S. condimenti	1			1
	*M. sciuri (S. sciuri)**		9	7	16
	S. warneri		6	1	7
	S. haemolyticus		9	3	12
	S. felis		1		1
	*M. lentus (S. lentus)**	1	2		2
	S. epidermidis		1		1
	S. saprophyticus		2		2
	S. caprae		1		1
	S. succinus			4	4
	S. vitulinus			2	2
	S. chromogenes			1	1

W kontekście miejsca izolacji, najwięcej szczepów *Staphylococcus* izolowano z błony śluzowej jamy ustnej (n=205 , 46%) oraz z odbytu (n=92, 20%). Jednakże, należy zauważyć, że wymazy od zwierząt wolno żyjących były pobierane wyłącznie z tych dwóch miejsc (jama ustna oraz odbyt), a próby mleka zostały pobrane wyłącznie od owiec (Tabela 16). Co więcej w przypadku badań u owiec w jednej z prac analizowano występowanie *Staphylococcus* w czterech różnych okresach pobrania, zatem wyniki prewalencji uzyskane łącznie należy interpretować ostrożnie.

Tabela 16. Występowanie *Staphylococcus* spp. według miejsca pobrania/ źródła pobrania

		Zwierzęta gospodarskie *COP/CON/COP +CON**	**Zwierzęta towarzyszące** *COP/CON/COP +CON**	**Zwierzęta wolno żyjące** *COP/CON/COP +CON**	**Razem** (n=440*) *COP/CON/COP +CON**
Źródło pobrania	Skóra	10/0/10*	35/18/53*		45/18/63*
	Zewnetrzny kanał słuchowy	7/0/7*	18/10/28*		25/10/35*
	Błona śluzowa odbytu	15/0/15*	15/2/17*	52/8/60*	82/10/92*
	Błona śluzowa jamy ustnej	61/0/61*	33/14/47*	79/18/97*	173/32/205*
	Mleko	30/15/45*			30/15/45*

6.1.2. Fenotypowa oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe

6.1.2.1. Ocena oporności metodą dyfuzyjno-krążkową

6.1.2.1.1. Zwierzęta gospodarskie

Oporność na co najmniej jeden środek przeciwdrobnoustrojowy zaobserwowano u większości szczepów *Staphylococcus* wyizolowanych z mleka owczego (Publikacja 1). Tylko cztery (11,4%) szczepy *S. aureus*, pochodzące od owiec rasy Świniarka, były wrażliwe na wszystkie testowane środki przeciwdrobnoustrojowe, a w przypadku żadnego ze szczepów nie zaobserwowano oporności na linezolid, nitrofurantoinę i trimetoprim/sulfametoksazol (Tabela 17). Najwyższy odsetek oporności wśród szczepów *S. aureus* odnotowano na tetracyklinę i erytromycynę (po 35%) oraz na chloramfenikol, penicylinę i klindamycynę (po 30%). Oporność konstytutywną odnotowano dla wszystkich szczepów opornych na klindamycynę. Biorąc pod uwagę rasę owiec, większość przypadków lekoopornych izolatów *S. aureus* pochodziło od owiec rasy Uhruska, co również korelowało z wyższym odsetkiem szczepów *S. aureus* MDR tej rasy: pięć izolowano od owiec rasy Uhruska i tylko jeden od owcy rasy Świniarka. W profilu szczepów CoNS dominowała oporność na penicylinę, cefoksytynę i tetracyklinę (odpowiednio 86,6%, 73,3% i 46,6% takich szczepów) (Tabela 18), co sklasyfikowało 1/3 (n = 5) szczepów CoNS jako MDR (Tabela 18).

Tabela 17. Oporność fenotypowa szczepów *Staphylococcus* spp

Środki przeciwdrobnoustrojowe	*Staphylococcus* spp. n=35/%		
	S. aureus n=20	CoNS n=15	Razem
FOX 30*	1/5	11/73,3	12/34,3
C 30*	6/30		6/17,1
CIP 5	1/5		1/6,6
DA 2	6/30	3/20	9/25,7
E15	7/35	4/26,6	11/31,4
CN10	2/10	1/6,6	3/8,5
P10*	6/30	13/86,6	19/54,3
RD 5		2/13,3	2/5,7
QD 15	1/5		1/6,6
TE 30	7/35	7/46,6	14/40

E15 – erytromycyna 15 mg, FOX 30 – cefoksytyna 30 mg, CN10 – gentamycyna 10 mg, RD5 – ryfampicyna 5 mg, QD15 – chinuprystyna/dalfoprystyna 15 mg, DA2 – klindamycyna 2 mg, P10 – penicylina 10 IU, TE30 – tetracyklina 30 mg, CIP5 – cyprofloksacyna 5 mg, C30 – chloramfenikol 30 mg

*różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$)

Tabela 18. Charakterystyka szczepów *Staphylococcus* spp. wyizolowanych z mleka od owiec rasy Uhruska (n=16) i Świniarka (n=19)

Rasa	Gatunek	Liczba izolatów	MDR	Profile oporności fenotypowej*	Profile genów oporności i wirulencji†
UHR	*S. aureus*	1		R: P10	
		1		R: DA2	
		1		I: TE30, C30	*cat* (pC221), *tet*L
		1	5	R: P10, TE30, C30 I: E15,	*cat* (pC194)
		1		I: E15	*mrs*A
		1	3	R:P10 I: QD15, DA2	
		1	3	I: TE30, CIP5, C30	*cat* (pC221), *tet*L, *tet*K
		1	4	I: E15, CN10, TE30, C30	cat (pC221), cat(pC194), *tet*L, *aph(3)-IIIa*, seB
		1		R: E15 I: TE30, DA2,	*tet*L, *erm*A, *erm*B
		1	4	R: FOX30, P10 I: CN10, TE30, C30	*cat (pC221)*, *cat (pC194*), *tet*L, *mec*C, *aph(3)-IIIa*, *acc(6')-Ie-*
	S.xylosus	1		R: FOX 30, P10	
	S. condimenti	1		R: P10	
	S. simulans	1		R:, TE30	*tet*K, *tet*L, *aph(3)-IIIa*
		1	3	R: FOX 30, P10, TE30 I: DA2	*tet*K
		1	4	R: FOX 30, P10, E15, TE30 I: DA2	*mec*C, *erm*B, *cat* (pC194), *tet*K, *tet*L, *aph(3)-IIIa*, *bla*Z
		1		R: , TE30	*cat (pC194)*
SW	*S. aureus*	4		susceptible	
		2		I: DA2	
		1		R: P10	
		1		R: P10 I: E15	
		1		I: E15	

		1	4	I:E15, DA2, TE30, C30	*cat (pC221), tet*L
	S.xylosus	3		R: FOX30, P10	
		1		R: P10	*tet*M, *aph(3)-IIIa*, *bla*Z
		1		R: FOX30, P10	*tet*M, *mec*C, *aph(3)-IIIa*, *acc(6')-Ie-*
		1	4	R: FOX30, P10,TE30 I: E15, RD5	*tet*M ,*tet*K, *mecC, aph(3)-IIIa*, *msr*A
		1		R: FOX 30, P10, TE30	*tet*M, *tet*L, *aph(3)-IIIa*
	S. lentus	1	5	R: FOX 30, P10, E15, CN10, TE30 I: DA2	
	S. simulans	1	3	R: FOX30, P10, E15 I: RD5	

*R – oporny; I – średnio wrażliwy

† – przetestowane środki przeciwdrobnoustrojowe: P10 – penicylina, E15 – erytromycyna, DA2 – klindamycyna, TE30 – tetracyklina, RD5 – ryfampicyna, QD15 – streptogramina, C30 – chloramfenikol, FOX30 – cefoksytyna, CN10 – gentamycyna, CIP5 – cyprofloksacyna

W publikacji nr 2 przebadano wszystkie 103 szczepy *S. aureus* wyizolowane od owiec matek z różnych miejsc ciała, jagniąt oraz z prób mleka. Wykazano oporność na wszystkie testowane leki przeciwdrobnoustrojowe u szczepów wyizolowanych od owiec rasy Uhruska oraz na osiem z trzynastu badanych leków przeciwdrobnoustrojowych u szczepów wyizolowanych od owiec rasy Świniarka (Tabela 19). Najwyższy odsetek oporności fenotypowej wśród szczepów wyizolowanych od obu ras odnotowano w przypadku tetracykliny (46,6%), klindamycyny (45,6%), erytromycyny (39,8%), penicyliny (31,1%) i gentamycyny (24,3%). Fenotypowa analiza lekowrażliwości szczepów wykazała również oporność na cefoksytynę u pięciu izolatów: dwóch pochodzących od owcy mateki (maciorki) i jagnięcia rasy Uhruska oraz trzech od owiec rasy Świniarka. Wszystkie izolaty MRSA pochodziły od różnych osobników.

Analiza statystyczna wykazała istotne różnice w fenotypowej oporności na chloramfenikol (oporność na ten antybiotyk wykazanojedynie u szczepów pochodzących od rasy Uhruska). Izolaty pochodzące od tej samej rasy wykazywały również istotnie wyższy odsetek szczepów opornych na gentamycynę. Natomiast odwrotną tendencję zaobserwowano w przypadku oporności na erytromycynę, której poziom był istotnie statystycznie wyższy u szczepów pochodzących od rasy Świniarka (Tabela 19).

Tabela 19. Fenotypowa oporność szczepów *S. aureus* w zależności od rasy owiec

Środki przeciwdrobnoustrojowe	Rasa		Razem* n=103/%
	Uhruska n=66/%	Świniarka n=37/%	
Cefoksytyna	2/3	3/8,1	5/4,9
Chloramfenikol **	7/10,6		7/6,8
Cyprofloksacyna	5/7,6	2/5,4	7/6,8
Klindamycyna	30/45,5	17/45,9	47/45,6
Erytromycyna **	22/33,3	19/51,4	41/39,8
Gentamycyna**	20/30,3	5/13,5	25/24,3
Linezolid	5/7,6	2/5,4	7/6,8
Ryfampicyna	1/1,5		1/1
Nitrofurantoina	2/3		2/1,9
Penicylina	23/34,8	9/24,3	32/31,1
Chinuprystyna/ dalfoprystyna	5/7,6		5/4,9
Sulfametoksazol/ trimetoprim	1/1,5		1/1
Tetracyklina	31/47	17/45,9	48/46,6

*Oporność fenotypowa obejmuje również szczepy izolowane od jagniąt i z mleka

**istotna statystycznie różnica (P <0,05) w oporności na antybiotyki między izolatami *S. aureus* pochodzącymi od owiec rasy Uhruska i Świniarka

Oporność wielolekową (MDR) wykazano łącznie u 48 szczepów (46,6%), z czego 70,8% pochodziło od rasy Uhruska. W grupie MDR najczęściej obserwowano oporność na trzy leki przeciwdrobnoustrojowe (n=24, 50%), 12 szczepów było opornych na cztery leki

przeciwdrobnoustrojowe (25%), natomiast osiem i cztery szczepy (16,6% i 8,3%) były oporne odpowiednio na 5 i 6 leków przeciwdrobnoustrojowych. Wrażliwość na wszystkie testowane leki przeciwdrobnoustrojowe stwierdzono u 23 ze wszystkich przebadanych szczepów (22,3%), podczas gdy oporność na jeden lub dwa leki przeciwdrobnoustrojowe zaobserwowano u 32 (31,1%) szczepów.

6.1.2.1.2. Zwierzęta towarzyszące

Wyizolowane szczepy CoPS były oporne na wszystkie testowane leki przeciwdrobnoustrojowe (Tabela 20) (Publikacja nr 4). Większość szczepów w tej grupie była oporna na penicylinę (n=81; 80,2%). Podobnie wysoki wskaźnik oporności, wynoszący 56,4%–64,4%, obserwowano w przypadku tetracykliny, klindamycyny, erytromycyny i cefoksytyny/oksacyliny (Tabela 20). W przypadku pozostałych antybiotyków, takich jak sulfametoksazol/trimetoprim, cyprofloksacyna i gentamycyna, odsetek oporności był niższy o co najmniej połowę (31,7%–44,6%), a jedynie pojedyncze szczepy wykazywały fenotypową oporność na linezolid, nitrofurantoinę, ryfampicynę i chinuprystyna/dalfoprystyna (Tabela 20). Statystycznie istotne różnice lekworażliwości między *S. aureus* i *S. pseudintermedius* ($p < 0,05$) zaobserwowano jedynie w przypadku sulfametoksazolu/trimetoprimu (Tabela 20).

Tabela 20. Fenotypowa lekooporność koagulazododatnich *Staphylococcus* izolowanych od psów

Środki przeciwdrobnoustrojowe	koagulazododatnie *Staphylococcus*		
	S. aureus *N=22/%*	*S. pseudintermedius* *N=79/%*	Razem N=101/%
Cefoksytyna/Oksacylina	15/68,2	42/53,2	57/56,4
Chloramfenikol	3/13,6	16/20,3	19/18,8
Cyprofloksacyna	12/54,5	33/41,8	45/44,6
Klindamycyna	11/50	52/65,8	63/62,4
Erytromycyna	9/40,9	51/64,6	60/59,4
Gentamycyna	3/13,6	29/36,7	32/31,7
Linezolid	2/9,1	2/2,5	4/3,9
Nitrofurantoina	1/4,5		1/0,99
Penicylina	16/72,7	65/82,3	81/80,2
Chinuprystyna/dalfoprystyna	2/9,1	2/2,5	4/3,9
Rifampicyna		3/3,8	3/2,9
*Sulfametoksazol/trimetoprim	1/4,5	32/40,5	33/32,7
Tetracyklina	11/50	54/68,4	65/64,4

* statystycznie istotne różnice pomiędzy *S. aureus* i *S. pseudintermedius* (p<0,05)

Z uwagi na wysoki odsetek oporności na większość testowanych antybiotyków, wśród badanych szczepów zaobserwowano również wysoki odsetek szczepów wielolekoopornych (MDR), wynoszący 30,7%. Nie zaobserwowano jednak statystycznie istotnej różnicy między gatunkami *S. aureus* i *S. pseudintermedius*. Wartość ta była statystycznie istotnie wyższa dla *S. pseudintermedius* jedynie w przypadku oporności na osiem różnych antybiotyków (Tabela 21).

Tabela 21. Rozkład oporności wielolekowej wśród szczepów koagulazododatnich *Staphylococcus*

Liczba antybiotyków, na które szczepy były oporne	koagulazododatnie *Staphylococcus*		
	S. aureus *N=22/%*	*S. pseudintermedius* *N=79/%*	Razem N=101/%
0	2/9,1	8/10,1	10/9,9
1	4/18,2	5/6,3	9/8,9
2	2/9,1	10/12,7	12/11,9
Razem non-MDR (n=31)	8/36,4	23/29,1	31/30,7
3	1/4,5	7/8,9	8/7,9
4	4/18,2	5/6,3	9/8,9
5	3/13,6	7/8,9	10/9,9
6	3/13,6	4/5,1	7/6,9
7	1/4,5	9/11,4	10/9,9
*8	1/4,5	23/29,1	24/23,8
9		1/1,3	1/0,99
10	1/4,5		1/0,99
Razem MDR (n=70)	14/63,6	56/70,9	70/69,3

* statystycznie istotne różnice pomiędzy *S. aureus* i *S. pseudintermedius* (p<0,05)

6.1.2.1.3. Zwierzęta wolno żyjące

Badane szczepy wykazały się opornością na 10 z 14 badanych środków przeciwdrobnoustrojowych. Aż 50% szczepów *S. pseudintermedius* (n = 52) i tylko 22,2% (n = 6) izolatów *S. aureus* było wrażliwych na wszystkie leki przeciwdrobnoustrojowe (Publikacja nr 5). Żaden szczep nie wykazał oporności na chloramfenikol, cyprofloksacynę, linezolid i oksacylinę lub cefoksytynę. Cztery z badanych szczepów (3%) wykazywały oporność wielolekową związaną z niewrażliwością na trzy lub cztery leki przeciwdrobnoustrojowe. Ponadto stwierdzono jednoczesną oporność na ryfampicynę i streptograminy u jednego szczepu (*S. aureus*) i innego szczepu o pośredniej oporności na nitrofurantoinę (Tabela 22). Tylko trzy szczepy *S. pseudintermedius* wykazywały fenotypową oporność na sulfametoksazol/trimetoprim, a trzy (2,3%) inne szczepy wykazywały oporność na gentamycynę. Większość szczepów była oporna na tetracyklinę (n = 40) i penicylinę (n = 22) (odpowiednio 30,5% i 16,8%), przy czym dominującą (statystycznie istotną) oporność na penicylinę zaobserwowano u *S. aureus* (18 z 22 szczepów opornych na penicylinę) i oporność na tetracyklinę u *S. pseudintermedius* (39 z 40 szczepów opornych na tetracyklinę) (Tabela 22). Oporność na klindamycynę (oporności indukowanej nie zaobserwowano u żadnego ze szczepów) wykazywało 9,2% (n = 12) wszystkich szczepów CoPS, a oporność na erytromycynę stwierdzono jedynie u 6,9% szczepów (n = 9). (Tabela 22).

Tabela 22. Oporność fenotypowa szczepów koagulazododatnich *Staphylococcus* spp. izolowanych od lisów rudych

Środki przeciwdrobnoustrojowe	*Staphylococcus* n=131/%		
	S. aureus n=27	*S. pseudintermedius* n=104	Razem
Erytromycyna	2/17.4	7/6.7	9/6.9
Gentamycyna		2/1.9	2/1.5
Rifampicyna	1/3.7		1/0.76
Streptogramina	1/3.7		1/0.76
Klindamycyna	3/11.1	9/8.6	12/9.2
Penicylina*	18/75	4/3.8	22/16.8
Sulfametoksazol/ trimetoprim		3/2.9	3/2.3
Tetracyklina*	1/3.7	39/37.5	40/30.5
Nitrofurantoina	1/3.7		1/0.76

* statystycznie istotne różnice pomiędzy *S. aureus* i *S. pseudintermedius* (test U Manna-Whitneya; $p < 0,05$)

6.1.2.2. Ocena oporności metodą mikrorzcieńczeń, określenie MIC (Minimalne stężenie hamujące)

Analizę lekowrażliwości za pomocą metody mikrorozcieńczeń przeprowadzono tylko dla szczepów izolowanych od owiec oraz psów. Kryterium kwalifikacji do badania w obu grupach była obecność genu *mec*A i/lub *mec*C u badanego szczepu klasyfikującego go jako metycylinooporny.

6.1.2.2.1. Zwierzęta gospodarskie

Scharakteryzowano łącznie pięć szczepów MRSA, w tym dwa pochodziły od rasy Świniarka i trzy szczepy od rasy Uhruska (Tabela 23). Wszystkie szczepy MRSA wykazywały profil oporności na penicylinę z wartościami MIC wynoszącymi 64 µg/ml (dwa szczepy) i 128 µg/ml (trzy szczepy). Trzy szczepy MRSA wykazywały profil oporności na wankomycynę z wartościami MIC wynoszącymi 32 µg/ml (dwa szczepy) i 64 µg/ml (jeden szczep). Ponadto dwa szczepy MRSA wykazywały profil oporności na tetracyklinę z wartością MIC wynoszącą 128 µg/ml. Podobnie, dwa szczepy MRSA również wykazały oporność na chloramfenikol z wartością MIC 32 µg/ml. Tylko dwa szczepy wykazały fenotypową oporność na oksacylinę z wartością MIC 8 µg/ml, pomimo obecności genu *mec*A lub *mec*C. Trzy szczepy *S. aureus* były fenotypowo wrażliwe na oksacylinę z wartością MIC= 2 µg/ml. Ponadto jeden izolat wykazał oporność na erytromycynę, a jeden na gentamycynę z wartościami MIC odpowiednio 8 µg/ml i 16 µg/ml (Tabela 23). Wszystkie przebadane szczepy MRSA były wrażliwe na cyprofloksacynę, ryfampicynę i nitrofurantoinę.

Tabela 23. Charakterystyka szczepów metycylinoopornych *S. aureus* izolowanych od owiec rasy Świniarka (Ś) i rasy Uhruska (UHR)

Nr izolatu/ rasa/okres izolacji/ profil ADSSR	Źródło izolacji	Wyniki testu dyfuzyjno-krążkowego	Wyniki metody mikrorocieńczeń (MIC) (µg/ml)	Geny oporności i wirulencji	Typy sekwencyjny (ST)
55 UHR/3/R	J. ustna	R:E15,P10,SXT25,TE30, C30 I: DA2	R:VA(32),PEN(64),TE(128),C(32), E(8) I: DA(2)	*mecA, mecC, cat(pC194), tetK, seB, seC*	**9313*
78 UHR/4/Y lamb	J. ustna	R: FOX30,P10,TE30 I: CN10,DA2	R: VA (32), PEN(64), TE(128), OX(8) I: DA(2),CN(8)	*mecA, mecC, tetM, tetK, aph(3)-IIIa, tetL, msrA, seB, seC, Luk E-D*	*1660*
92 Ś/4/b	J. ustna	R: P10 I: CN10,DA2,TE30	R: PEN(128) I: DA(1),VA(8),CN(8),TE(8)	*mecC, blaZ, acc(6')Ie, seB, seC, Luk E-D*	**9314*
93 Ś/4/d	J. ustna	R: P10 I: E15,CN10,DA2,TE30	R: VA(64),PEN(128) I: DA(2),CN(8),TE(8),E(4)	*mecC, blaZ, acc(6')Ie, seB, seC, Luk E-D*	*8420*
103 UHR/4/J	Mleko	R: FOX30,P10 I: CN10,TE30,C30	R: CN(16),PEN(128),C(32),OX(8) I: VA (8)	*mecC, tetK ,aph(3)IIIa ,tetL, acc(6')-Ie, seB, seC*	**9315*

*nowe typy sekwencji

6.1.2.2.2. Zwierzęta towarzyszące

Jako szczepy oporne na metycylinę zaklasyfikowano siedem szczepów *S. aureus* i 32 szczepy *S. pseudintermedius*. Szczepy MRSA wyizolowano od czterech zwierząt, a szczepy MRSP uzyskano od 17 zwierząt. W przypadku kilku zwierząt wyizolowano więcej niż jeden szczep MRSA lub MRSP ale szczepy należące do tego samego gatunku *Staphylococcus* wyizolowane od tego samego zwierzęcia różniły się zarówno pod względem fenotypowych profili oporności, jak i panelu genów kodujących oporność i wirulencję (Tabela 24). Minimalne stężenia hamujące określono dla tych szczepów w odniesieniu do 11 leków przeciwdrobnoustrojowych, w tym wankomycyny.

W zdecydowanej większości przypadków wyniki klasyfikacji szczepów jako opornych, średnio wrażliwych i wrażliwych metodą mikrorozcieńczeń były zgodne z wynikami metody dyfuzyjno-krążkowej. Wartości MIC dla oksacyliny uzyskane dla badanych szczepów we wszystkich przypadkach były na poziomie klasyfikującym szczepy jako oporne (MIC = 8–128 μg/ml). Jednak w przypadku wrażliwości na wankomycynę nowe wyniki wskazały na średnią wrażliwość na ten antybiotyk (MIC = 8 μg/ml) dla dwóch szczepów *S. aureus* i 10 szczepów *S. pseudintermedius*, a także czterech szczepów *S. aureus* opornych na wankomycynę (MIC = 64–128 μg/ml) i dwóch szczepów *S. pseudintermedius* (Tabela 24).

Tabela 24. Szczepy metycylinooporne wyizolowane od zwierzat towarzyszących

Gatunek	Liczba izolatów	Miejsce izolacji	Test dyfuzyjno-krążkowy	Wyniki minimalnych stężeń hamujących (µg/ml)	Geny oporności i wirulencji	Typy sekwencyjny (ST)
S. aureus	*6*	*J. ustna*	*R: FOX30 ,DA2, P10, TE30* *I: CIP5*	*R:PEN(32), OX(8), TE(32), DA(1)* *I:VA(8),CIP(2)*	*mecA, tetK seB*	*398*
S. aureus	*10*	*J. ustna*	*R:FOX30, DA2, P10, TE30, CIP5* *I: E15*	*R:PEN(32),OX(8),VA(64), TE(12), CIP(64),DA(4)* *I: E(4)*	*mecA, tetK*	**9311*
S. aureus	*10*	*Skóra*	*R:FOX30, DA2, P10, TE30, CIP5*	*R:PEN(32),OX(8),VA(128), TE(128), CIP(128),DA(32)*	*mecA, seB*	*7649*
S. aureus	*10*	*Uszy*	*R:FOX30, DA2, P10, TE30, CIP5* *I:E15*	*R:PEN(32),OX(8),TE(32), CIP(128),DA(4)* *I: E(1)*	*mecA,tetM, tetK, seB, LukE-LukD*	*398*
S. aureus	*136*	*Uszy*	*R: FOX30,DA2, P10,TE30, CIP5,C30* *I:QD15*	*R:PEN(64)OX(128),VA(128), TE(32),CIP(128),DA(4),C(128)*	*mecA, blaZ, tetK, cat (pC194),cat (pC221) pVL seB*	*398*

S. aureus	*136*	*J. ustna*	*R:FOX30,DA2,P10,TE30 , F300, LZD30, CIP5,C30* *I:E15,QD15*	*R: PEN(32),OX(128),TE(64),* *CIP(128),F(128),DA(64),C(12 8)* *I:VA(8),E(4)*	*mecA,blaZ,tetK,cat (p194),cat (p221)* *pVL, seB*	**9312*
S. aureus	*137*	*Skóra*	*R: FOX30,P10,TE30,CIP5* *I:E15,DA2*	*R:PEN(32),OX(64),VA(128),T E(128,CIP(128),DA(128)* *I:E(4)*	*mecA, blaZ, tetK, tetM, cat (pC194)* *pVL, seB*	*398*
S. pseudinter medius	*3*	*J. ustna*	*R: E15, OX1, DA2, P10, SXT25, TE30, CIP5*	*R:OX(64),DA(8),E(8),TE(128), PEN(128),CIP(128)*	*mecA, msrA, aac(6')-Ie-aph(2"))* *LukS ,icaA, seL, siet, icaD,* seCcan	*551*
S. pseudinter medius	*3*	*Skóra*	*R:E15,OX1,CN10,DA2,P 10SXT25,TE30,CIP5*	*R:OX(128),DA(8),E(8),TE(128), PEN(128),CN(16),CIP(64)*	*mecA, tetM, tetK, msrA, aac(6')-Ie-aph(2"))* *ebp, spsE ,LukS, icaA, seL, siet, icaD, seCcan*	*551*
S. pseudinter medius	*3*	*Skóra*	*R:E15, OX1, CN10, DA2, P10, SXT25, TE30, CIP5*	*R:OX(64),DA(64),E(128),TE(32), PEN(128),CN(128)* *I: VA(8)*	*mecA,tetM,tetK,msrA* *ebp, spsE, LukS, icaA, seL, siet, icaD, seCcan*	*551*
S. pseudinter medius	*3*	*Skóra*	*R:E15,OX1,CN10,DA2,P10 ,SXT25,TE30,CIP5*	*R:OX(128),DA(128),E(128),TE(3 2), PEN(128),CN(128),CIP(128)* *I: VA(8)*	*mecA, tetM, tetK, msrA, aac(6')-Ie-aph(2"))* *ebp, spsE, hlgA, hlgB, LukF, LukS, icaA, seL, siet, icaD, seCcan*	*551*

S. pseudintermedius	*3*	*Skóra*	*R:E15,OX1,CN10,DA2,P10,SXT25TE30,CIP5*	*R: OX(128),DA(128),E(8),TE(128), PEN(128),CN(64),CIP(128)*	*mecA , tetM, tetK, msrA, aac(6')-Ie-aph(2")) hlgA, hlgB, LukF, LukS, icaA, seL, siet, icaD, seCcan*	*551*
S. pseudintermedius	*3*	*Skóra*	*R:E15,OX1,CN10,DA2,P10,SXT25,TE30CIP5*	*R:OX(128),DA(128),E(8),TE(128),PEN(128),CN(64),CIP(64)*	*mecA, tetM, tetK, msrA, aac(6')-Ie-aph(2")) hlgA, hlgB, LukF, LukS, icaA, seL, siet, icaD, seCcan*	*551*
S. pseudintermedius	*4*	*J. ustna*	*R:E15,DA2,P10,C30*	*R:OX(128),C(32),DA(128),E(128), PEN(128)*	*mecA, msrA ebp, spsE, hlgA, hlgB, LukF, LukS, icaA, seL, siet, icaD, seCcan*	**2739*
S. pseudintermedius	*4*	*J. ustna*	*R: OX1,DA2,P10,TE30, CIP5*	*R:OX(64),DA(16),TE(32), PEN(128),CIP(128)*	*mecA, tetM, tetK tsst*	*551*
S. pseudintermedius	*8*	*Skóra*	*R:E15,OX1,CN10,DA2,P10,SXT25,TE30,CIP5*	*R:OX(128),DA(128),E(128),TE(128), PEN(64),CN(128) I: VA(8)*	*mecA, tetM, tetK, msrA, aac(6')-Ie-aph(2")) ebp, spsE, LukS, icaA, seL, siet, icaD, seCcan*	*551*
S. pseudintermedius	*8*	*Skóra*	*R:E15,OX1,CN10,DA2,P10,SXT25,TE30,CIP5*	*R:OX(8),DA(128),E(128),TE(128), PEN(32),CN(128),CIP(128) I: VA(8)*	*mecA, tetM, tetK, msrA, aac(6')-Ie-aph(2")) ebp, spsE, hlgA, hlgB, LukF, LukS, icaA, seL, siet, icaD, seCcan*	*551*
S. pseudintermedius	*8*	*J. ustna*	*R:E15,OX1,CN10,DA2,P10,SXT25,TE30,CIP5*	*R:OX(16),DA(64),E(16),TE(64), PEN(128),CN(32),CIP(64)*	*mecA, tetM, tetK, msrA LukS, icaA, seL, siet, icaD, seCcan*	*551*

S. pseudintermedius	*9*	*J. ustna*	*R:E15,OX1,DA2,P10,SXT25,TE30,CIP5*	*R: OX(128), DA(128), E(128), TE(128), PEN(128), CIP(128)*	*mecA, tetM, msrA, aac(6')-Ie-aph(2")) ebp, spsE, hlgA, hlgB, LukF, LukS, icaA, seL, siet, icaD, seCcan*	**2740*
S. pseudintermedius	*10*	*Uszy*	*R:E15,OX1,CN10,DA2,P10,SXT25,TE30,CIP5*	*R:OX(32),DA(64),E(8),TE(32), PEN(128),CN(16),CIP(64)*	*mecA, tetM, tetK ebp, spsE, hlgA, hlgB, LukF, LukS, icaA, seL, siet, icaD, seCcan*	*551*
S. pseudintermedius	*10*	*Skóra*	*R:E15,OX1,DA2,P10,SXT25,TE30,CIP5 I: CN10*	*R:OX(8),DA(32),E(128),TE(128), PEN(64),CIP(128) I: CN(8)*	*mecA, tetM, tetK, msrA, aac(6')-Ie-aph(2")) hlgA, hlgB, LukF, LukS, icaA, seL, siet, icaD, seCcan*	*551*
S. pseudintermedius	*10*	*Uszy*	*R: E15,OX1,DA2,P10,SXT25, TE30,CIP5*	*R:OX(128), DA(128), VA(128) E(128), TE(32), PEN(64), CIP(128)*	*mecA, tetM, tetK, msrA, aac(6')-Ie-aph(2")) ebp, spsE, hlgA, hlgB, LukF, LukS, icaA, seL, siet, icaD, seCcan*	*551*
S. pseudintermedius	*10*	*J. ustna*	*R:E15,OX1,CN10,DA2,P10,SXT25,TE30,CIP5*	*R:OX(8),DA(128),E(128),TE(128), PEN(64),CN(128),CIP(128) I: VA(8)*	*mecA, tetM, tetK, msrA, aac(6')-Ie-aph(2")) ebp, spsE, hlgA, hlgB, LukF, LukS, icaA, seL, siet, icaD, seCcan*	*551*
S. pseudintermedius	*10*	*J. ustna*	*R: OX1,DA2,P10,TE30,CIP5*	*R:OX(128),DA(128),TE(128),PEN(128),CIP(128)*	*mecA, tsst*	*551*
S. pseudintermedius	*22*	*Skóra*	*R:E15,OX1,CN10,RD5,DA2,P10,SXT25,CIP5*	*R:OX(128), RD(8), DA(128), E(128), TE(128), PEN(128), CN(128), CIP(128) I: VA(8)*	*mecA, msrA,aac(6')-Ie-aph(2")) ebp, spsE, hlgA, hlgB, LukF, LukS, icaA, seL, siet, icaD, seCcan*	*71*

S. pseudintermedius	*24*	*Uszy*	*R: E15,OX1,CN10,RD5,DA2,P10,SXT25,CIP5*	*R:OX(64),VA(32),RD(4),DA(128), E(8),PEN(64),CN(128),CIP(64)*	*mecA, ermC, cat (pC221), ermB, aph(3)-IIIa, blaZ, aac(6')-Ie-aph(2")) hlgA, hlgB, lukF,seL, icaA, LukS, icaD, siet, tsst, seCcan*	*71*
S. pseudintermedius	*84*	*J. ustna*	*R:E15,OX1,CN19,DA2,P10,SXT25,TE30,CIP5*	*R:OX(128),DA(4),E(8),TE(128), PEN(128),CN(128),CIP(128)*	*mecA, tetM, tetK, msrA, aac(6')-Ie-aph(2")) ebp, spsE, hlgA, hlgB, LukF, LukS, icaA, seL, siet, icaD, seCcan*	*551*
S. pseudintermedius	*122*	*J. ustna*	*R: E15,OX1,CN10,DA2,P10,SXT25,TE30,CIP5*	*R:OX(64),C(128),DA(128),E(8), TE(128),PEN(128),CN(128),CIP(32)*	*mecA, tetM, ermB, tetK, aph(3)-IIIa, blaZ, aac(6')-Ie-aph(2")) ebp, spsE, hlgA, hlgB, lukF, seL, icaA, LukS, icaD, siet, tsst, seCcan*	*551*
S. pseudintermedius	*129*	*J. ustna*	*R:E15,OX1,CN10,DA2,P10, SXT25,TE30,CIP5,C30*	*R:OX(128),DA(128),E(128),TE(32),PEN(64),CN(128),CIP(64) I: VA(8)*	*mecA,, tetM, ermB, tetK, aph(3)-IIIa, blaZ, aac(6')-Ie-aph(2")) ebp, seL, icaA, LukS, spsE, hlgA, hlgB, lukF, icaD, siet, tsst, seCcan*	*551*
S. pseudintermedius	*130*	*J. ustna*	*R: E15,OX1,CN10,DA2,P10,SXT25,TE30,CIP5*	*R:OX(64),DA(128),E(128),TE(128), PEN(128),CN(128),CIP(128) I: VA(8)*	*mecA, tetM, ermB, tetK, aph(3)-IIIa, blaZ, aac(6')-Ie-aph(2")) ebp, spsE, hlgA, hlgB, lukF, seL, icaA, LukS, icaD, siet, tsst, seCcan, expB*	*551*
S. pseudintermedius	*130*	*Odbyt*	*R:E15,OX1,CN10,DA2,P10,TE30,CIP5,C30*	*R:OX(128),C(32),E(128),DA(4), TE(64), PEN(128),CN(128),CIP(128)*	*mecA, tetM, ermB, aph(3)-IIIa, blaZ, acc(6')-Ie ebp, spsE, hlgA, hlgB, lukF, seL, icaA, LukS, icaD, siet, tsst, seCcan, expB*	*45*

S. pseudintermedius	*130*	*Uszy*	*R:E15,OX1,CN10,DA2,P10 ,SXT25, TE30,CIP5*	*R:OX(128),DA(64),E(8),TE(32), PEN(128),CN(128),CIP(64)*	*mecA , tetM, fusB, ermB, tetK, aph(3)-IIIa, blaZ, aac(6')-Ie-aph(2") ebp, spsE,hlgA, hlgB, lukF, seL, icaA, LukS, icaD, siet, tsst, seCcan, expB,*	*551*
S. pseudintermedius	*132*	*Uszy*	*R:E15,OX1,CN10,DA2,P10 ,TE30,CIP5,C30*	*R:OX(128),C(128),DA(128),E(32), TE(32),PEN(64),CN(64),CIP(12 8)*	*mecA, tetM, ermB, aph(3)-IIIa, blaZ, aac(6')-Ie-aph(2")) ebp, spsE, hlgA, hlgB, lukF, seL, icaA, LukS, icaD, siet, tsst, seCcan*	*45*
S. pseudintermedius	*133*	*Odbyt*	*R:E15,OX1,CN10,P10,TE3 0,CIP5,C30 I: DA2*	*R:OX(128),DA(128),E(128), TE(32), PEN(64),CN(128),CIP(64) I: VA(8)*	*mecA, tetM, ermB, tetK, aph(3)-IIIa, blaZ, aac(6')-Ie-aph(2")) ebp, seL, icaA, LukS, spsE, hlgA, hlgB, lukF ,icaD, siet, tsst, seCcan*	*45*
S. pseudintermedius	*134*	*Uszy*	*R: E15,OX1,CN10,DA2,P1 0,SXT25,TE30*	*R:OX(32),DA(16),E(8),TE(16),P EN(128),CN(128)*	*mecA, tetM, ermB, aph(3)-IIIa, blaZ, aac(6')-Ie-aph(2")) ebp, spsE, hlgA, hlgB, lukF, seL, icaA, LukS, icaD, siet, tsst, seCcan, expB*	**2741*
S. pseudintermedius	*135*	*J. ustna*	*R: E15,OX1,CN10,DA2,P1 0,SXT25,TE30,CIP5*	*R:OX(128), DA(128), E(16), TE(128), PEN(128), CN(128), CIP(64)*	*mecA,tetM,ermB,tetK,aph(3)-IIIa,blaZ,aac(6')-Ie-aph(2")), hlgA, hlgB, lukF, SEL, icaA, LukS, icaD, siet, tsst, seCcan*	*551*
S. pseudintermedius	*140*	*Uszy*	*R: E15,OX1,CN10,DA2,P1 0,SXT25,TE30,CIP5*	*R:OX(128),DA(64),E(8),TE(32), PEN(128),CN(128),CIP(64)*	*mecA,tetM,ermB,tetK,aph(3)-IIIa,blaZ,aac(6')-Ie-aph(2")),fusB ebp, SEL, icaA, LukS, spsE, hlgA, hlgB, lukF, icaD, siet, tsst, expB, seCcan,*	*551*

S. pseudintermedius	*140*	*Odbyt*	*R: E15,OX1,CN10,DA2,P10,SXT25,TE30,CIP5*	*R:OX(64),DA(128),E(128),TE(128), PEN(128),CN(128),CIP(128)* *I: VA(8)*	*mecA, tetM, ermB, tetK, aph(3)-IIIa, blaZ, aac(6')-Ie-aph(2''))* *ebp, spsE, hlgA, hlgB, lukF, seL, icaA, LukS, icaD, siet, tsst, seCcan, expB*	*551*
S. pseudintermedius	*150*	*Odbyt*	*R:OX1,P10* *I: DA2*	*R: OX(16),PEN(128)* *I: DA(2)*	*mecA, blaZ, fusB* *ebp, spsE, hlgA, hlgB, lukF, seL, icaA, LukS, expB, icaD, siet, tsst, pVL, seQ, seCcan*	**2742*

*nowe typy sekwencji

6.1.2.3. Podsumowanie punktu fenotypowa oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe

6.1.2.3.1. Metoda dyfuzyjno-krążkowa

Najwięcej szczepów *Staphylococcus* koagulazododatnich pochodzących od badanych zwierząt było opornych na tetracyklinę (n=160, 45,1%), penicylinę (n=141, 39,7%), klindamycynę (n=128, 36,1%) oraz erytromycynę (n=117, 32,9%). Ten typ oporności występował u wszystkich grup zwierząt na kikunastodziecioprocentowym poziomie, jedynie u lisów rudych opornośc na klindamycynę i erytromycynę nie przekroczyła 10%. Oporność na gentamycynę plasowała się na poziomie 17,2%, przy czym w przypadku owiec i zwierząt towarzyszących była na porównywalnym wysokim poziomie, natomiast w przypadku lisów wynosiła zaledwie 1,5%. Podobną sytuację zaobserowano w przypadku szczepów metycylinoopornych na poziomie 17,2%, niemniej nie zanotowano ich obecności u lisów rudych, a u owiec odsetek ten był poniżej 5%. Porównywalny poziom oporności zaobserwowano również dla fluorochinolonów (14,9%), przy czym oporności tego typu nie zaobserwowano u szczepów pochodzących od lisów rudych, a u szczepów od owiec, poziom ten był bardzo niski, wynosząc zaledwie 6,5%. Warto wskazać, iż pomimo że ogólny poziom oporności na fenikole był dość niski (9%), to wartość ta wynikała z prawie 20% odsetka oporności na ten antybiotych wśród szczepów izolowanych od zwierząt towarzyszących (18,8%) i prawie o połowe niższego u szczepów pochodzących od owiec (10,6%), u szczepów pochdzących od lisów nie zaobserwowano oporności na tę grupę leków (Tabela 25). W przypadku pozostałych leków, tj. linezolidu, nitrofutantoiny, ryfampicyny i streptogramin, notowano jedynie pojedyncze przypadki oporności wśród badanych szczepów, głównie izolowanych od owiec i psów. Uzyskane wyniki przełożyły się również na liczbę wielolekoopornych szczepów, których najmniej zaobserwowano wśród lisów rudych (n=4; 3%) i prównywalny odsetek u psów (n=70, 53%) i owiec (n=51, 41,5%).

Tabela 25. Fenotypowa lekooporność szczepów koagulazododatnich gatunków *Staphylococcus* u różnych gatunków zwierząt

Środki przeciwdrobnoustrojowe	**Zwierzęta gospodarskie (owce) (n=123)**	**Zwierzęta towarzyszące (psy i koty) (n=101)**	**Zwierzęta wolno żyjące (lisy rude) (n=131)**	**Razem (n=355)**
Erytromycyna	48(39)	60(59,4)	9(6,8)	**117(32,9)**
Cefoksytyna/oksacylina*	6(4,9)	15/42*(56,4)		63(17,7)
Gentamycyna	27(21,9)	32(31,7)	2(1,5)	61(17,2)
Ryfampicina	1(0,8)	3(2,9)	1(0,8)	5(1,4)
Chinupristina/dalfopristina	6(4,9)	4(3,9)	1(0.8)	11(3,1)
Klindamycyna	53(43,1)	63(62,4)	12(9,2)	**128(36,1)**
Penicilina	38(30,9)	81(80,2)	22(16,8)	**141(39,7)**
Sulfametoksazol/trimetoprim	1(0,8)	33(32,7)	3(2,3)	37(10,4)
Tetracyklina	55(44,7)	65(64,4)	40(30,5)	**160(45,1)**
Nitrofurantoina	2(1,6)	1(0,99)	1(0,8)	4(1,1)
Linezolid	7(5,7)	4(3,9)		11(3,1)
Cyprofloksacyna	8(6,5)	45(44,5)		53(14,9)
Chloramfenikol	13(10,6)	19(18,8)		32(9)

*dotyczy szczepów *S. pseudintermedius*

6.1.2.3.2. Metoda mikrorozcieńczeń

Do grupy szczepów metycylinoopornych zaklasyfikowano łącznie pięć szczepów *S. aureus* u owiec oraz siedem szczepów MRSA i 32 szczepy MRSP pochodzących od zwierząt towarzyszących. Łącznie badaniem objęto 44 szczepy. W zdecydowanej większości przypadków wyniki klasyfikacji szczepów jako opornych, średnio wrażliwych i wrażliwych metodą mikrorozcieńczeń były zgodne z wynikami metody dyfuzyjno-krążkowej dla badanych szczepów, również w przypadku wartości MIC odpowiadały one kryterium oporności lub średniej wrażliwości w przypadku szczepów posiadających gen *mec*A i pochodzących od psów. W przypadku izolatów pochodzących od owiec w trzech przypadkach na pięć, wartości MIC mimo obecności genów *mec*A i/lub *mec*C nie odpowiadały fenotypowemu kryterium oporności lub średniej wrażliwości szczepu. Wśród szczepów posiadających geny oporności na oksacylinę lub cefoksytynę określono również minimalne stężenie hamujące dla wankomycyny (metoda dyfuzyjno krążkowa w przypadku badania lekowrażliwości na ten lek nie jest rekomendowana). Badania mają pewne ograniczenia, pomimo, iż wykazały występowanie oporności na glikopeptydy ale zostały przeprowadzone tylko w obrębie szczepów metycylinoopornych, oraz wyniki nie zostały

potwierdzone obecnością genów *van* (badanie takie nie zostało przeprowadzone). Dlatego uzyskane wyniki należy traktować jako wstęp do dalszych analiz (Tabele 23 i 24).

6.1.3. Wyniki prewalencji genów oporności i wirulencji u szczepów *Staphylococcus* wyizolowanych od różnych gatunków zwierząt

6.1.3.1. Geny oporności

6.1.3.1.1. Zwierzęta gospodarskie

Fenotypowa oporność badanych szczepów *Staphylococcus* wyizolowanych z owczego mleka potwierdzona została obecnością genów oporności. Jednak aż u 48,4% (n = 15) szczepów wykazujących fenotypową oporność na co najmniej jeden badany lek przeciwdrobnoustrojowy (n = 31) nie stwierdzono obecności żadnych badanych genów oporności (Publikacja nr 1). Oporność na cefoksytynę potwierdzona została obecnością genu *mec*C u czterech szczepów opornych na cefoksytynę (*S. aureus, S. xylosus* i dwa szczepy *S. simulans*) pochodzących zarówno od owiec rasy Uhruska (UHR), jak i owiec rasy Świniarka (SW). Z kolei nie wykryto obecności genu *mec*A. Chociaż ponad 54% szczepów wykazało fenotypową oporność na penicylinę, obecność genu *bla*Z wykryto jedynie u dwóch z nich (*S. xylosus* i *S. simulans*), a w jednym dodatkowym szczepie CoNS opornym na penicylinę wykryto jedynie gen *mec*C (Tabela 26).

Tabela 26. Występowanie genów oporności u *Staphylococcus* spp. izolowanych z mleka owiec

Geny opornosci	*Staphylococcus* spp. n=35/%		
	S. aureus n=20	CoNS n=15	Razem
acc(6')-Ie-	1/5	1/6,6	2/5,7
*aph(3)-IIIa**	2/10	6/40	8/22,8
*bla*Z		2/13,3	2/5,7
cat (pC194)	3/15	2/13,3	5/14,2
cat (pC221)*	5/25		5/14,2
*erm*A	1/5		1/6,6
*erm*B	1/5	1/6,6	2/5,7
*mec*C	1/5	3/20	4/11,4
*msr*A	1/5	1/6,6	2/5,7
*tet*K	1/5	4/26,6	5/14,2
*tet*L	6/30	3/20	9/25,7
*tet*M*		4/26,6	4/11,4

*różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$)

W przypadku szczepów opornych na tetracyklinę, oporność fenotypowa była statystycznie istotnie częstsza wśród szczepów izolowanych od owiec rasy Uhruska (UHR) i została potwierdzona obecnością co najmniej jednego genu *tet* u większości szczepów (85,7%). Co ciekawe, gen *tet*L dominował w szczepach *S. aureus* opornych na tetracyklinę (6 z 7 izolatów) i występował statystycznie istotnie częściej wśród szczepów izolowanych od owiec rasy Uhruska (UHR) (Tabela 26 i 27). W przypadku szczepów CoNS gen *tet*M był obecny z dwoma innymi genami *tet* na podobnym poziomie, ale obecność tego genu wykryto tylko w tej grupie *Staphylococcus* (Tabela 26). Tylko dwa szczepy oporne na tetracyklinę nie miały żadnego z analizowanych genów, podczas gdy dwa kolejne szczepy o fenotypie wrażliwości na tetracyklinę wykazały obecność genu *tet*M, oba wyizolowane zostały od owiec rasy Świniarka (SW) (Tabela 27).

Tabela 27. Występowanie genów oporności u *Staphylococcus* spp. w zależności od rasy owiec

Geny oporności	*Staphylococcus* spp. n=35/%		
	UHR n=16	SW n=19	Razem
acc(6')-Ie-	1/6,3	1/5,3	2/5,7
aph(3)-IIIa	4/25	4/21	8/22,8
*bla*Z	1/6,3	1/5,3	2/5,7
cat (pC194)*	5/31,3		5/14,2
cat (pC221)	4/25	1/5,3	5/14,2
*erm*A	1/6,3		1/6,6
*erm*B	2/12,5		2/5,7
*mec*C	2/12,5	2/10,5	4/11,4
*msr*A	1/6,3	1/5,3	2/5,7
*tet*K	4/25	1/5,3	5/14,2
*tet*L*	7/43,7	2/10,5	9/25,7
*tet*M		4/21	4/11,4

*różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$)

We wszystkich przypadkach oporność fenotypową na chloramfenikol potwierdzono obecnością genu(ów) *cat* (p221) i/lub *cat* (p194). Co ciekawe, pomimo braku fenotypowo zidentyfikowanej oporności na chloramfenikol, obecność genu *cat* (p194) wykryto w dwóch szczepach CoNS (szczepy *S. simulans* wyizolowane od owiec rasy Uhruska(UHR)). Ten ostatni gen dominował statystycznie istotnie wśród szczepów wyizolowanych z UHR (Tabela 27).

Pomimo analizy stosunkowo szerokiego panelu genów odpowiedzialnych za fenotyp oporności na makrolidy lub makrolid-linkozamid-streptograminę B (MLS_B), duży odsetek szczepów z fenotypową opornością na makrolidy/linkozamidy lub streptograminy (n = 15) nie wykazał obecności żadnego z badanych genów (n = 11, 73,3%) (Tabela 26). Gen *msr*A (kodujący pompę efluksową dla makrolidów) został wykryty tylko w dwóch szczepach opornych na erytromycynę, natomiast geny *erm*A i *erm*B (odpowiedzialne za MLS_B) były obecne tylko w dwóch izolatach opornych na erytromycynę/klindamycynę, z których jednym był *S. aureus*. U tego szczepu oba te geny były obecne jednocześnie.

Chociaż nie badano oporności na kanamycynę i neomycynę, gen *aph*(3)-IIIa wykryto aż w ośmiu (22,9%) szczepach, z których większość (n = 6) należała do grupy CoNS (*S. xylosus* n = 4 i *S. simulans* n = 2) (wartość $p < 0,05$). Z kolei gen acc(6')-Ie-aph(2"), kodujący dwufunkcyjny enzym aminoglikozydo-6'-N acetylotransferazę/2"-O fosforylotransferazę odpowiedzialny za oporność na gentamycynę/tobramycynę/kanamycynę, wykazazany został tylko w jednym fenotypowo opornym na gentamycynę szczepie *S. aureus* i w jednym wrażliwym na gentamycynę szczepie *S. xylosus*.

W publikacji nr 2 również analizowano podobny profil genów oporności. W tym przypadku, dominującym genem determinującym oporność na tetracyklinę był *tet*L, który był obecny u 27,2% (n=28) szczepów. Co ciekawe, gen *tet*K był często związany z opornością u szczepów opornych na tetracyklinę, izolowanych głównie u owiec rasy Uhruska (18 z 21 szczepów posiadających gen *tet*K). Oporność fenotypowa na penicylinę towarzyszyła genowi *bla*Z u 11,7% opornych szczepów (n=12). Pozostałe geny wykryto jedynie u pojedynczych szczepów (Tabela 28). W pięciu testowanych szczepach wykryto geny *mec*C, którym w dwóch przypadkach towarzyszyła obecność genów *mec*A. Ich obecności towarzyszyła oporność fenotypowa tylko w przypadku dwóch szczepów (Tabela 23). Co ciekawe, geny *mec*A, *tet*M, *msr*A i *erm*B były obecne wyłącznie u szczepów izolowanych od rasy Uhruska. Jednakże statystycznie istotne różnice w poziomie genów oporności w szczepach izolowanych z obu ras odnotowano dla *tet*K i *erm*B, które częściej występowały u szczepów izolowanych od rasy Świniarka.

Tabela 28. Występowanie genów oporności w szczepach *S. aureus* według rasy owiec

Geny oporności	Rasa owiec		Razem* n=103/%
	Uhruska n=66/%	Świniarka n=37/%	
mecA	2/3		2/1,9
mecC	3/4,5	2/5,4	5/4,9
msrA	3/4,5		3/2,9
cat (pC194)	2/3	1/2,7	3/2,9
*tetK***	18/48,6	3/4,5	21/20,4
tetM	2/3		2/1,9
tetL	15/40,5	13/19,7	28/27,2
blaZ	8/21,6	4/10,8	12/11,7
acc(6')-Ie-	4/10,8	3/4,5	7/6,8
*ermB***	6/16,2		6/5,8

*Występowanie genów oporności, w tym szczepów izolowanych od jagniąt i z mleka

**Statystycznie istotna różnica (P <0,05) w występowaniu genów oporności pomiędzy *S. aureus* izolowanym od owiec rasy Uhruska i Świniarka

Powyższy fragment dotyczył artuykłu: Perinatal occurrence and epidemiological significance of *Staphylococcus aureus* in local sheep breeds.

6.1.3.1.2. Zwierzęta towarzyszące

W przypadku zwierząt towarzyszących (Publikacja nr 4) przeanalizowano szerszy panel genów oporności, w tym na fusydany, mupirocynę i biocydy. Ale żaden z testowanych szczepów nie wykazał genów oporności na mupirocynę ani genów oporności na biocydy. W przypadku pozostałych genów, reprezentatywna obecność genów oporności została wykazana w każdej testowanej grupie antybiotyków, a najwyższy odsetek genów oporności w danej grupie antybiotyków korelował ze statystycznie istotnie wyższymi poziomami występowania tych genów, szczególnie u gatunku *S. pseudintermedius* (Tabela 29). Gen *blaZ* był przede wszystkim odpowiedzialny za oporność na β-laktamy. Porównywalnie wysoki odsetek genu *mec*A zaobserwowano u obu gatunków CoPS (odpowiednio 31,8%

i 40,5% w *S. aureus* i *S. pseudintermedius*). Z kolei gen *msr*A był przede wszystkim odpowiedzialny za oporność na makrolidy, oporność na tetracyklinę była głównie determinowana obecnością genu *tet*M, a oporność na szerokie spektrum aminoglikozydów odzwierciedlała obecność genu *aac*(6′)-Ie-*aph*(2″)) (Tabela 29). Generalnie, w przypadku *S. pseudintermedius* zaobserwowano bogatszy panel genów oporności, ponieważ tylko u tego gatunku wykryto obecność genów *erm*B, *erm*C, *msr*A, *tet*M, *aac*(6′)-Ie-*aph*(2″)), *aph*(3)-IIIa i *fus*B (Tabela 29).

Tabela 29. Występowanie genów oporności u koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus* izolowanych od psów

Grupa środków przeciwdrobnoustrojowych	Geny oporności	koagulazododatni *Staphylococcus*		
		S. aureus N=22/%	*S. pseudintermedius* N=79/%	Razem N=101/ %
B-laktamy	*mecA*	7/31,8	32/40,5	39/38,6
	**blaZ*	3/13,6	33/41,8	36/35,6
makrolidy	*ermA*	2/9,1		2/2
	ermB		19/24,1	19/18,8
	ermC		1/1,3	1/0,99
	**msrA*		25/31,6	25/24,8
fenikole	*cat (pC221)*	2/9,1	2/2,5	4/3,9
	cat (pC194)	2/9,1		2/2
tetracykliny	*tetK*	9/40,9	21/26,6	30/29,7
	**tetM*		48/60,8	48/47,5
	tetL	5/22,7	2/2,5	7/6,9
aminoglikozydy	* *aac(6')-Ie-aph(2"))*		30/38	30/29,7
	aph(3)-IIIa		19/24,1	19/18,8
fusydany	*fusB*		3/3,8	3/2,9

* statystycznie istotne różnice pomiędzy *S. aureus* i *S. pseudintermedius* ($p<0,05$)

6.1.3.1.3. Zwierzęta wolno żyjące

Profil genów oporności szczepów koagulazododatnich izolowanych od lisów rudych okazał się uboższy w porównaniu do szczepów izolowanych od gospodarzy poddawanych celowanej terapii (owce, psy) (Publikacja nr 5). U 15 (55,5%) wszystkich przebadanych szczepów *S. aureus* wykryto obecność genu *blaZ*, co potwierdziło oporność na penicylinę u 93% szczepów opornych na penicylinę (Tabela 30) ale tylko jeden szczep *S. pseudintermedius* posiadał ten gen, a wykryte zostały tylko cztery szczepy oporne na penicylinę tego gatunku.

Odwrotne wyniki uzyskano w przypadku genów kodujących oporność na tetracyklinę, ponieważ 71,8% (n = 28) szczepów *S. pseudintermedius* opornych na ten antybiotyk wykazywało obecność genu *tet*M, a trzy spośród *tet*M-dodatnich szczepów posiadało jednocześnie gen *tet*K. Co ciekawe, w, żadnym ze szczepów z fenotypową opornością na erytromycynę nie stwierdzono genu/genów kodujących oporność na makrolidy. Gen *msr*A wykryto jedynie w szczepie wykazującym fenotypową wrażliwość na makrolidy. Analiza oporności na gentamycynę przyniosła podobne wyniki: pomimo fenotypowej oporności na ten lek wykrytej w dwóch szczepach, obecność genu *acc*(6′)-Ie- wykazano w dwóch innych fenotypowych szczepach *S. pseudintermedius* fenotypowo wrażliwych na gentamycynę. Ponadto jeden szczep *S. aureus* charakteryzował się obecnością genu kodującego oporność na kanamycynę (*aph*(3)-IIIa) (Tabela 30, 31 i 32). Pozostałe geny alizowane w tym badaniu nie zostały wykazane w żadnym szczepie charakteryzującym się opornością lub wrażliwością na testowane środki przeciwdrobnoustrojowe (Tabela 30-31).

Tabela 30. Występowanie genów oporności u koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus* izolowanych od lisów rudych

Gen oporności	*Staphylococcus* n=131/%		
	S. aureus n=27	*S. pseudintermedius* n=104	Razem
*msr*A		1/0.96	1/0.76
*tet*K		3/2.9	3/2.3
*tet*M		28/26.9	28/21.4
*bla*Z	15/55.5	1/0.96	16/12.2
acc(6')-Ie-		2/1.9	2/1.5
aph(3)-IIIa	1/3.7		1/0.76

Tabela 31. Charakterystyka szczepów *Staphylococcus aureus* wizolowanych z jamy ustnej (n=22) i odbytu (n=5) lisów rudych

Źródło próbki	Liczba izolatów	Profil oporności fenotypowej*	Profil genu oporności	Profil genów wirulencji
J.ustna	4	R: P10†	*bla*Z	*Luk*E-*Luk*D, *se*B
	1	R: P10		*Luk*E-*Luk*D, *se*B
	1	R: P10		*Luk*E-*Luk*D, *se*B, *se*C
	1	R: P10	*bla*Z	*se*B, *se*C, *PVL*
	1	R: P10	*bla*Z	*Luk*E-*Luk*D, *se*B, *et*A, *et*B
	1			*se*B
	1			*Luk*E-*Luk*D, *se*B
	1	I:E15		*Luk*E-*Luk*D, *se*B, *se*C
	1	R:DA2 I: TE30	*aph(3)-IIIa*	*Luk*E-*Luk*D, *se*B, *PVL*
	1	R: P10 I:E15	*bla*Z	*Luk*E-*Luk*D, *se*B
	1			*Luk*E-*Luk*D, *se*B, *se*C, *et*A, *et*B
	1	R: P10	*bla*Z	*se*B, *se*C, *tst*
	6	R: P10	*bla*Z	*Luk*E-*Luk*D
	1	R: P10 I:DA2, F300	*bla*Z	*Luk*E-*Luk*D
Odbyt	1	R: RD5, QD15, DA2,		*Luk*E-*Luk*D, *se*B
	1	P10		*Luk*E-*Luk*D, *se*B
	1			*Luk*E-*Luk*D
	1			*Luk*E-*Luk*D, *se*B, *se*C
	1			*Luk*E-*Luk*D, *se*B

*R- oporne; I- średniowrażliwe

†- testowane środki przeciwdrobnoustrojowe: P10- penicylina, E15- erytromycyna, DA2- klindamycyna, TE30- tetracyklina, F300- nitrofurantoina, RD5- ryfampicyna, QD15- streptogramina

Tabela 32. Charakterystyka szczepów *Staphylococcus pseudintermedius* izolowanych z jamy ustnej (n=28) i odbytu (n=24) lisów rudych

Źródło próbki	Liczba izolatów	Profil oporności fenotypowej*	Profil genu oporności
J.ustna	10	R:TE30†	*tet*M
	3	R:TE30	*tet*M, *tet*K
	6	R:TE30	
	3	R:ERY15	
	1	R:P10, TE30	*tet*M *bla*Z
	1	R:TE30 I:DA2	*tet*M
	1	R: P10, TE30	*tet*M
	3	I: DA2	
Odbyt	3	R:TE30	
	7	R:TE30	*tet*M
	2	R: P10	
	2	I: DA2	
	1	R:TE30	*acc(6')-Ie*
	1	R: SXT 25	
	2	R: E15	
	1	R;CN10, TE30 I: DA2	
	2	R: E15, TE30	*tet*M
	1	R: SXT25, TE30	*acc(6')-Ie-, msr*A, *tet*M
	1	I; DA2, TE30	*tet*M
	1	R: CN10, SXT25, TE30 I: DA2	*tet*M

*R- oporne; I- średniowrażliwe

†- testowane środki przeciwdrobnoustrojowe: P10- penicylina, E15- erytromycyna, DA2- klindamycyna, TE30- tetracyklina, F300- nitrofurantoina, RD5- ryfampicyna, QD15- streptogramina

6.1.3.1.4. Podsumowanie punktu występowanie genów oporności u szczepów *Staphylococcus* izolowanych od różnych gatunków zwierząt

Profil genów oporności szczepów izolowanych od wszystkich grup zwierząt był dość zbliżony, a liczebność korelowała pozytywnie z profilem oporności fenotypowej. Wśród szczepów koagulazododatnich, izolowanych od wszystkich badanych gatunków zwierząt dominowały te same geny kodujące oporność na antybiotyki należące do określonych grup: w przypadku β- laktamów genem dominującycm był *bla*Z, odpowiedzialny za kodowanie produkcji β- laktamazy oraz gen *mec*A, występujący u 11,5% badanach szczepów ale tylko izolowanych od owiec i psów. Oporność na tetracykliny we wszystkich grupach szczepów była kodowana głównie przez gen *tet*M, natomiast *tet*K dominował wśród szczepów izolowanych od psów, a *tet*L wśród szczepów izolowanych od owiec. Pomimo relatywnie wysokiego odsetka oporności na makrolidy we wszystkich grupach szczepów, odsetek genów, które najczęściej odpowiadają za ten typ oporności był niewielki z dominacją genu *msr*A, który występował u szczepów izolowanych od wszystkich grup zwierząt oraz genu *erm*B, który był genem dominującym wśród szczepów izolowanych od psów (Tabela 33). Oporność na aminoglikozydy również została potwierdzona obecnością dwóch testowanych genów u szczepów izolowanych od wszystkich badanych grup zwierząt, przy czym proporcjonalnie nawiększy odsetek tych genów wykazano u szczepów izolowanych od psów, a najmniejszy u lisów rudych. Oporność molekularna na fenikole została powtierdzona zaledwie u kilku szczepów izolowanych od owiec i psów obecnością dwóch rodzajów genów zlokalizowanych na plazmidach pC221 i pC194, kodujących acetylotransferazy (Tabela 33).

Tabela 33. Występowanie genów oporności u koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus* izolowanych od poszczególnych gatunków zwierząt

Grupa środków przeciwbakteryjnych	**Geny oporności**	**Zwierzęta gospodarskie (n=123)**	**Zwierzęta towarzyszące (n=101)**	**Zwierzęta wolno żyjące (n=131)**	**Razem (n=355)**
β- laktamy	*mecA*	2(1,6)	39(38,6)		41(11,5)
	mecC	5(4,1)			5(1,4)
	blaZ	12(9,7)	36(35,6)	16(12,2)	**64(18)**
makrolidy	*ermA*	1(0,8)	2(1,9)		3(0,8)
	ermB	7(5,7)	19(18,8)		**26(7,3)**
	ermC	1(0,8)	1(0,99)		2(0,6)
	msrA	4(3,2)	25(24,7)	1(0,8)	**30(8,4)**
fenikole	*cat (pC223)*				
	cat (pC221)	5(4,1)	4(3,9)		9(2,5)
	cat (pC194)	6(4,9)	2(1,9)		8(2,3)
tetracykliny	*tetK*	22(17,8)	30(29,7)	3(2,3)	55(15,5)
	tetM	2(1,6)	48(47,5)	28(21,4)	**78(21,9)**
	tetL	34(27,6)	7(6,9)		41(11,5)
aminoglikozydy	*aac(6')-Ie-aph(2'')*	8(6,5)	30(29,7)	2(1,5)	**40(11,3)**
	aph(3)-IIIa	2(1,6)	19(18,8)	1(0,8)	22(6,2)
mupirocynę	*ileS*				
fusydany	*fusB*	NT*	3(2,9)	NT*	3(0,8)
	fusC	NT*		NT*	
	fusD	NT*		NT*	
biocydy	*smr*	NT*		NT*	
	qac A/B	NT*		NT*	

6.1.3.2. Geny wirulencji

6.1.3.2.1. Zwierzeta gospodarskie

W publikacji nr 1, tylko jeden szczep *S. aureus* pochodzący od owcy rasy Uhruska (UHR) wykazał obecność genu wirulencji, kodującego enterotoksynę B gronkowcową (SEB) (Tabela 18). W przypadku pozostałych szczepów nie wykryto żadnego z badanych determinantów wirulencji.

W publikacji nr 2 profil genów wirulencji był zdecydowanie bogatszy. W tym przypadku dominowała obecność trzech genów: dwóch genów kodujących enterotoksyny, *se*B i *se*C, (odpowiednio 44,7%, n=46 i 32%, n=33) oraz genów kodujących leukotoksynę *Luk*E-*Luk*D (30%, n=31). Jednakże tylko szczepy *S. aureus* izolowane od rasy Uhruska posiadały dodatkowe geny, tj. gen kodujący enterotoksynę SEA (*se*A) i gen kodujący lekocydynę Panton Valentina (*pvL)*. Z drugiej strony, tylko pojedyncze szczepy *S. aureus* izolowane z rasy Świniarka miały geny kodujące inne enterotoksyny, tj. SED i SEE (*se*D, s*e*E) oraz toksynę szoku toksycznego *tst* (Tabela 34). Nie stwierdzono jednak statystycznie istotnych różnic w obecności genów wirulencji u szczepów pochodzących od owiec z rasy Uhruska i Świniarka.

Tabela 34. Występowanie genów wirulencji w szczepach S. aureus według rasy owiec

Geny wirulencji	Rasa		Razem* n=103/%
	Uhruska n=66/%	Świniarka n=37/%	
seA	2/3		2/1,9
seB	28/42,4	18/48,6	46/44,7
seC	18/27,3	15/40,5	33/32
seD		1/2,7	1/1
seE		1/2,7	1/1
tst		1/2,7	1/1
pvL	2/3		2/1,9
LukE-LukD	21/31,8	10/27	31/30

*Występowanie genów wirulencji, w tym szczepów wyizolowanych z jagniąt i mleka

6.1.3.2.2. Zwierzęta towarzyszące

Pomimo specyficzności gatunkowej *S. aureus* i *S. pseudintermedius*, zjawisko występowania wysokiego odsetka genów kodujących enterotoksyny zaobserwowano u obu gatunków, przy czym w przypadku *S. aureus* podobnie jak u szczepów izolowanych od owiec dominował gen *se*B, a w przypadku *S. pseudintermedius*, genami dominującymi był specyficzny gatunkowo seC $_{canine}$ (Publikacja nr 4). W przypadku *S. aureus* wykazano dodatkowo geny kodujące leukotoksynę *Luk*E-D (36,4%) i leukocydynę Panton Valentine (13,6%). Szczepy *S. pseudintermedius* prezentowały znacznie szerszy zakres genów kodujących czynniki wirulencji przy znacznie wyższym odsetku występowania (Tabela 35). W przypadku toksyn najwyższy odsetek zaobserwowano dla dwuskładnikowych genów leukocydyny (*luk*F i *luk*S, odpowiednio 77,2% i 86,1%). Gen kodujący toksyny eksfoliatywne był reprezentowany głównie przez gen *siet*, występujący u 86,1% szczepów. Geny kodujące hemolizyny *hlg*A i *hlg*B również wykryto stężeniach wysokim odsetku (odpowiednio 75,9% i 77,2%), podobnie jak geny odpowiedzialne za tworzenie biofilmu, *ica*A i *ica*D (86,1%) (Tabela 35).

Tabela 35. Występowanie genów wirulencji u koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus* izolowanych od psów

Grupa genów	Geny wirulencji	*S. pseudintermedius* *N=79/%*	*S. aureus* *N=22/%*
toksyny	*pVL*	2/2,5	3/13,6
	lukF	61/77,2	
	lukS	68/86,1	
	lukED		8/36,4
	tsst	43/54,4	
enterotoksyny	*seL*	69/87,3	
	seQ	2/2,5	
	seB		10/45,5
	seE		1/4,5
	sec_{can}	68/86,1	
toksyny eksfoliatywne	*expA*	3/3,8	
	expB	20/25,3	
	siet	68/86,1	
enzymy	*lip*	2/2,5	
składniki biofilmu	*icaA*	68/86,1	
	icaD	68/86,1	
hemolizyny	*hlgA*	60/75,9	
	hlgB	61/77,2	
białka adhezyjne	*epb*	55/69,6	
	spsE	47/59,5	

6.1.3.2.3. Zwierzęta wolno żyjące

W przypadku izolatów pochdzących od lisów rudych (Publikacja nr 5) występowanie genów wirulencji analizowano jedynie u szczepów *S. aureus*. Większość szczepów (n = 24) charakteryzowała się obecnością genu *Luk*E-*Luk*D kodującego leukotoksynę. Był to jedyny gen wirulencji wykryty w ośmiu szczepach, a w pozostałych przypadkach towarzyszyły mu inne geny wirulencji, najczęściej gen *se*B kodujący enterotoksynę (70,4% szczepów) lub gen *se*C (22,2% szczepów). Nie wykryto jednak żadnych innych genów kodujących enterotoksyny. U jednego szczepu stwierdzono obecność genu kodującego toksynę zespołu wstrząsu toksycznego 1 (TSST-1), a w dwóch pozostałych geny kodujące toksyny eksfoliatywne (*et*A, *et*B). Dwa inne szczepy *S. aureus* również wykazały potencjał do produkcji leukocydyny Panton Valentine (Tabela 36).

Tabela 36. Profile wirulencji szczepów *S. aureus* izolowanych od zwierząt wolno żyjących (lisów rudych)

Liczba szczepów *S. aureus* /%	Profil wirulencji	Źródło próbki	
		odbyt	j.ustna
8/29.6	*Luk*E-*Luk*D	1	7
10/37	*Luk*E-*Luk*D, *se*B	3	7
3/11.1	*Luk*E-*Luk*D, *se*B, *se*C	1	2
1/3.7	*se*B, *se*C, *tst*		1
1/3.7	*Luk*E-*Luk*D, *se*B, *PVL*		1
1/3.7	*se*B, *se*C, *PVL*		1
1/3.7	*Luk*E-*Luk*D, *se*B, *se*C, *et*A, *et*B		1
1/3.7	*Luk*E-*Luk*D, *se*B, *et*A, *et*B		1
1/3.7	*se*B		1
n=27	Razem	5/18.6	22/81.4

6.1.3.2.4. Podsumowanie punktu występowanie genów wirulencji *u S. aureus* izolowanych od różnych gatunków zwierząt

Ze względu na fakt, iż analiza występowania genów wirulencji u *S. pseudintermedius* została przeprowadzona wyłącznie u szczepów izolowanych od zwierząt towarzyszących, nie możliwości przeprowadzenia analizy porównawczej dla tego gatunku (Tabela 35). W przypadku *S. aureus*, najwięcej szczepów niezależnie od gatunku gopodarza, posiadało gen wirulencji, kodujący enterotoksynę SEB (n=76, 21,4%) oraz gen kodujący lekotoksynę *Luk*E-*Luk*D (n=63, 17,7%), przy czym dominację obydwu genów zaobserwowano wśród szczepów izolowanych od owiec (odpowiednio 38,2% i 25,2% wszystkich szczepów izolowanych od owiec). Również wśród szczepów izolowanych od tej grupy zwierząt zaobserwowano współwystępowanie wysokiego odsetka genu kodującego enterotoksynę SEC. Co ciekawe, u szczepów *S. aureus* izolowanych od wszystkich gatunków zwierząt, zanotowano występowanie genu kodującego leukocydynę Panton Valentina, chociaż był to niewielki odsetek szczepów. Na podobnie niskim poziomie wykazano gen odpowiedzialny za produkcję toksyny szoku toksycznego ale tylko u szczepów izolowanych od owiec i lisów rudych. Z kolei obecność genów kodujących toksyny eksfoliatywne zaobserwowano jedynie u szczepów izolowanych od lisów rudych (Tabela 37).

Tabela 37. Występowanie genów wirulencji *S. aureus* u różnych gatunków zwierząt

Geny wirulencji	**Zwierzęta gospodarskie (n=123)**	**Zwierzęta towarzyszące (n=101)**	**Zwierzęta wolno żyjące (n=131)**	**Razem (n=355)**
Geny wirulencji *S. aureus*				
seA	2(1,6)			2(0,6)
seB	47(38,2)	10(9,9)	19(14,5)	76(21,4)
seC	33(26,8)	1(0,99)	6(4,6)	40(11,3)
seD	1(0,8)			1(0,3)
seE	1(0,8)			1(0,3)
tst	1(0,8)		1(0,8)	2(0,6)
pvL	2(1,6)	3(2,9)	2(1,5)	7(1,9)
LukE-LukD	31(25,2)	8(7,9)	24(18,3)	63(17,7)
etA			2(1,5)	2(0,6)
etB			2(1,5)	2(0,6)

6.1.4. Typowanie molekularne

6.1.4.1. Typowanie molekularne w oparciu o metodę wielolokusowej analizy sekwencji genów)

6.1.4.1.1. Zwierzęta gospodraskie

Do analizy MLST zakwalifikowano wyłącznie szczepy metycylinoopornym *S. aureus* (MRSA) wyizolowane od owiec i opisane w publikacji nr 2. Na podstawie analizy, izolaty sklasyfikowano do pięciu różnych typów sekwencyjnych, w tym trzech nowych, które nie zostały wcześniej zgłoszone i nadano im następujące numery: ST 9313, ST 9314 i ST 9315. Dwa pozostałe szczepy MRSA posiadały już znane wcześniej ST, tj. ST 1660 (n=1) i ST 8420 (n=1) (Tabela 23). Sekwencje nukleotydowe zdeponowano w GenBank pod numerami akcesyjnymi: *tpi: PQ130080.1–PQ130076.1, aroE: PQ119410.1–PQ119406.1, arcC: PQ119398.1–PQ119394.1, glpF: PQ119422.1–PQ119418.1, gmk: PQ130056.1–PQ130052.1, pta: PQ130068.1–PQ130064.1 i ygiL: PQ130092.1–PQ130088.1.*

6.1.4.1.2. Zwierzęta towarzyszące

W publikacji nr 4 na podstawie analizy MLST, izolaty MRSA i MRSP sklasyfikowano do 11 różnych typów sekwencyjnych (ST), w tym sześciu nowych, które nie zostały wcześniej zgłoszone. Nowe ST zidentyfikowano dla dwóch izolatów *S. aureus*: ST9311, ST9312 i czterech izolatów *S. pseudintermedius*: ST 2739, ST 2740, ST 2741, ST 2742. Wykazano również inne, znane typy sekwencji dla *S. aureus*, takie jak ST 398 (n=4) i ST 7649 (n=1). Należy jednak wskazać, że u tego samego osobnika wykazano szczepy należące do tego samego gatunku ale o różnych typach sekwencyjnych, tj. szczepy *S. aureus* ST 9311, 7649 i 398 wyizolowano od psa nr. 10, a ST398 i 9312 wykryto w szczepach wyizolowanych od psa nr 136. Natomiast w przypadku szczepów *S. pseudintermedius*, poza nowymi typami sekwencyjnymi, dominującym typem ST był 551 (n=23), a odpowiednio trzy i dwa szczepy przypisano do ST 45 i ST 71. Sekwencje typu ST 45 i 71 wyizolowano od różnych zwierząt, ale w przypadku szczepów należących do typu sekwencyjnego ST551, w przypadku kilku zwierząt zanotowano więcej niż jeden szczep *S. pseudintermedius* u tego samego psa ale szczepy te różniły się istotnie między sobą zarówno pod względem profilu oporności, jak i wirulencji (Tabela 24). Sekwencje nukleotydowe zdeponowano w GenBank pod następującymi numerami akcesyjnymi dla *S. pseudintermedius*: *ack: PQ394212.1–PQ394181.1, cpn60: PQ381165.1–PQ381134.1, fdh: PQ394276.1–PQ394245.1, pta:*

PQ136690.1 –PQ136660.1, purA: PQ136723.1–PQ136691.1, sar: PQ394244.1–PQ394213, i tuf: PQ394180.1–PQ394149.1, a dla *S. aureus: tpi: PQ130075.1–PQ130069.1, aroE: PQ119405.1–PQ119399.1, arcC: PQ119393.1–PQ119387.1, glpF: PQ119417.1–PQ119411.1, gmk: PQ130051.1–PQ130045.1, pta: PQ130063.1–PQ130057.1 i ygiL: PQ130087.1–PQ130081.1.*

6.1.4.1.3. Typowanie molekularne w oparciu o metodę wielolokusowej analizy sekwencji genów

Przeprowadzono analizę MLST szczepów MRSA i MRSP izolowanych od owiec i psów. Ze względu na brak obecności szczepów opornych na metycylinę u lisów rudych analiza MLST nie została przeprowadzona w Publikacji nr 5. Łącznie wykazano dziewięć szczepów MRSA lub MRSP posiadających nowy typ sekwencyjny pochodzących u zwierząt Wszystkie nowe typy sekwencyjne zdeponowano w GenBank (Tabela 38).

Tabela 38. Nowe typy sekwencyjne koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus,* izolowanych od zwierzat

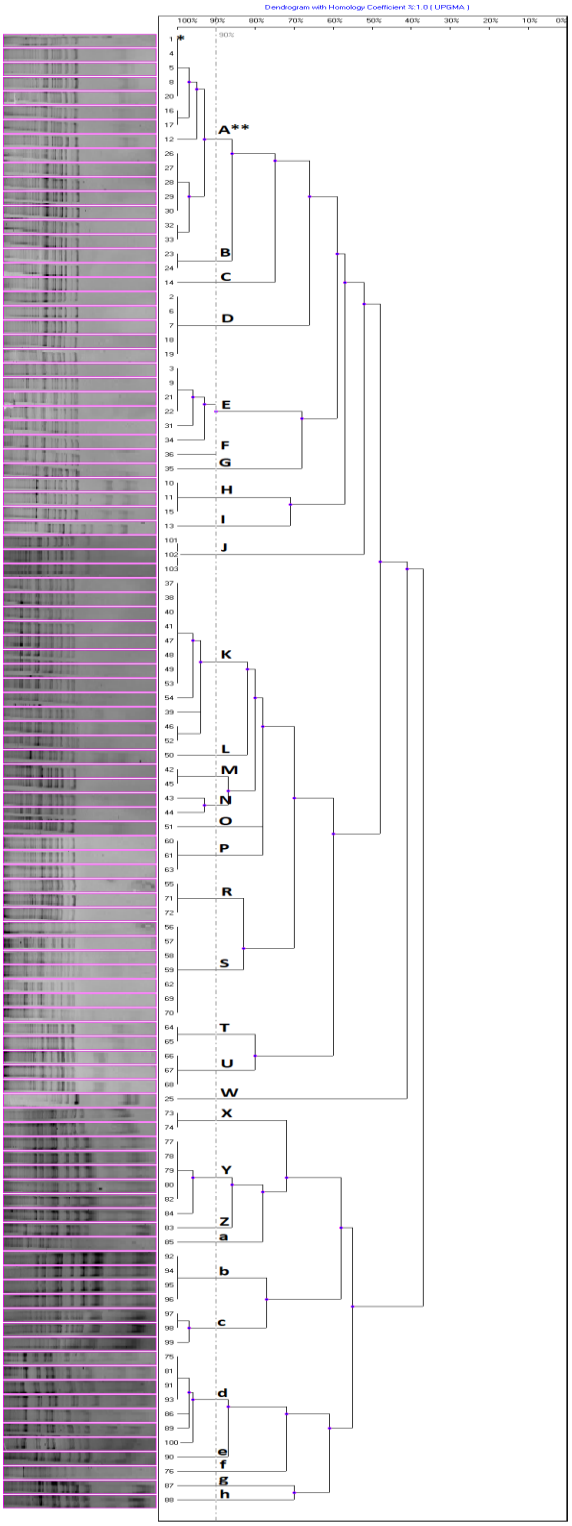
ST (typ sekwencyjny)	***Gatunek Staphylococcus***	***Gatunek Zwierzęcia***	***Miejsce izolacji***
ST 9313	*S. aureus (MRSA)*	*Owca domowa (Ovis aries)*	*jama ustna*
ST 9314	*S. aureus (MRSA)*	*Owca domowa (Ovis aries)*	*jama ustna*
ST 9315	*S. aureus (MRSA)*	*Owca domowa (Ovis aries)*	*mleko*
ST 9311	*S. aureus (MRSA)*	*Pies domowy (Canis familiaris)*	*jama ustna*
ST 9312	*S. aureus (MRSA)*	*Pies domowy (Canis familiaris)*	*jama ustna*
ST 2739	*S. pseudintermedius (MRSP)*	*Pies domowy (Canis familiaris)*	*jama ustna*
ST 2740	*S. pseudintermedius (MRSP)*	*Pies domowy (Canis familiaris)*	*jama ustna*
ST 2741	*S. pseudintermedius (MRSP)*	*Pies domowy (Canis familiaris)*	*zewnętrzny przewód słuchowy*
ST 2742	*S. pseudintermedius (MRSP)*	*Pies domowy (Canis familiaris)*	*odbyt*

6.1.4.2. Typowanie metodą *ADSRRS*-fingerprinting

6.1.4.2.1. Zwierzęta gospodarskie

Analiza metodą *ADSRRS*-fingerprinting objęła szczepy *S. aureus* izolowane od owiec (Publikacja nr 2). Na podstawie uzyskanych wyników wygenerowano dendrogram podobieństwa (Rycina 8), który pozwolił na wyróżnienie trzydzieści dwóch różnych profili, które różniły się pomiędzy sobą w co najmniej 10%. Analiza wykazała, że 14 profili grupowało trzy lub więcej szczepów, a profile D, H, J, P, X i c grupowały szczepy wyłącznie izolowane od rasy Uhruska. W przypadku profili grupujących po dwa szczepy wykazano, że profile B, M i N grupowały tylko szczepy rasy Świniarka, podczas gdy profile T i X grupowały tylko szczepy rasy Uhruska. Siedem i sześć profili było specyficznych tylko dla pojedynczych szczepów uzyskanych odpowiednio z rasy Uhruska i owiec rasy Świniarka. Wśród szczepów izolowanych od rasy Uhruska, w czterech przypadkach wykazano podobieństwo przekraczające 90% między dwoma, a nawet trzema szczepami wyizolowanymi od tych samych zwierząt z różnych miejsc ciała lub z tych samych miejsc, ale wyizolowanymi w różnym czasie (szczepy od owiec nr II, V, VI i XX). Ponadto, w przypadku jagniąt pochodzących od tej samej matki (rasa Uhruska, IV), dwa szczepy przypisano do tego samego profilu genomowego Y, ale miały one różne profile zarówno oporności, jak i wirulencji. W przypadku szczepów wyizolowanych od rasy Świniarka, podobną sytuację zaobserwowano również w trzech grupach szczepów (szczepy od owiec nr IX, XV i XXIV): w dwóch przypadkach wyizolowano bardzo podobne szczepy ze skóry i jamy ustnej lub ze skóry i przewodu słuchowego zewnętrznego. W trzecim przypadku szczepy wyizolowano w tym samym czasie z jamy ustnej tego samego zwierzęcia, ale pomimo wysokiego podobieństwa przekraczającego 90% i identycznego profilu wykrytych genów, różniły się one fenotypowym profilem oporności. W przypadku niektórych szczepów wyizolowanych od tych samych zwierząt (rasy Świniarka owce nr I i IV), ich profile (M i N) również były podobne, choć na poziomie nieco niższym niż 90% (87%). Podobną sytuację zaobserwowaliśmy w przypadku dwóch innych szczepów od zwierzęcia nr IV (rasy Uhruska), które zaklasyfikowano do dwóch sąsiednich profili (T i U), a poziom podobieństwa wyniósł 85%. Zgodnie z oczekiwaniami, szczepy MRSA nie wykazywały podobieństwa między sobą; szczepy zaklasyfikowano do różnych profili: J, R, Y, b i d (Tabela 39).

Rycina 8. Dendrogram podobieństwa badanych szczepów *S. aureus* u owiec (*ADSRRS*-fingerprinting)



*Numery szczepów podano w kolejności ich izolacji.

**Oznaczenia profili *ADSRRS*-fingerprinting

Tabela 39. Wyniki analizy *ADSRRS*-fingerprinting: rozkład profili genomowych według rasy owiec i liczby zwierząt

	Profile grupujące trzy lub więcej szczepów														Profile grupujące dwa szczepy					Profile z pojedynczymi szczepami
Profil	A	D	E	H	J	K	P	R	S	U	Y	b	c	d	B	M	N	T	X	
Uhruska	**V (2)**, VI, X, XVI, **XX (2),** XXIV, XX,	VII, XX, XXI, XXII, XXIII	II, VIII, XII, XXIV, XXV,	III, IV, XIV	XI X, XIII, XXV	I, IV, XIII, XX, XXII, XXIV,	**II(2),** XI	XXIV	**VI(3),** XIII, XV	IV	**IV(2),** V, VII, XV, XVII	VI, XVII	III, VIII, VIII	IV, IX, XVI, XVII, XXIV,				IV, XVIII	IV, VIII	C-XII, I-VII, Z-VII, a- IX, f-IV, g-XI, h-XIX
Świniarka	VII, **IX(2),** XI, XII, XVI		XXV			I, VII, VIII, IX, XXI, XXV		**XV (2)**	**XXIV(2)**	XIX, XXII		II, V		II, XIV,	IV, V	I,IV	I,IV			F-XXI G-XXIV L-XIV O-XVI W-VI, e- VIII

Ciekawym zjawiskiem było wykazanie typowych profili tzw. „szczepów mlecznych", czyli szczepów wyizolowanych wyłącznie z mleka różnych osobników ale należących do tej samej rasy (profil J i c), a nawet od zwierząt należących do obu ras (profil b, obejmujący dwa szczepy izolowane od rasy Uhruska i dwa szczepy izolowane od rasy Świniarka). Ponadto 16 izolatów wykazało różnice w cechach związanych z genami oporności, genami wirulencji lub fenotypową opornością na daną substancję przeciwbakteryjną, w porównaniu z próbkami pobranymi z tego samego miejsca i okresu pobrania. Natomiast cztery izolaty wykazały różnice tylko w genach wirulencji. Ponadto, w jednym przypadku (owca rasy Świniarka), próbki pobrane w tym samym dniu (data 1-I - przed ciążą (A)), ale z różnych miejsc (zewnętrzny kanał słuchowy, odbyt, jama ustna) wykazały, że badane izolaty posiadały te same geny oporności i wirulencji, wskazując na wysokie podobieństwo genomów. Niemniej szczepy te różniły się w profilu oporności fenotypowej bo dwa z trzech szczepów były oporne na linezolid, a tylko jeden na cefoksytynę.

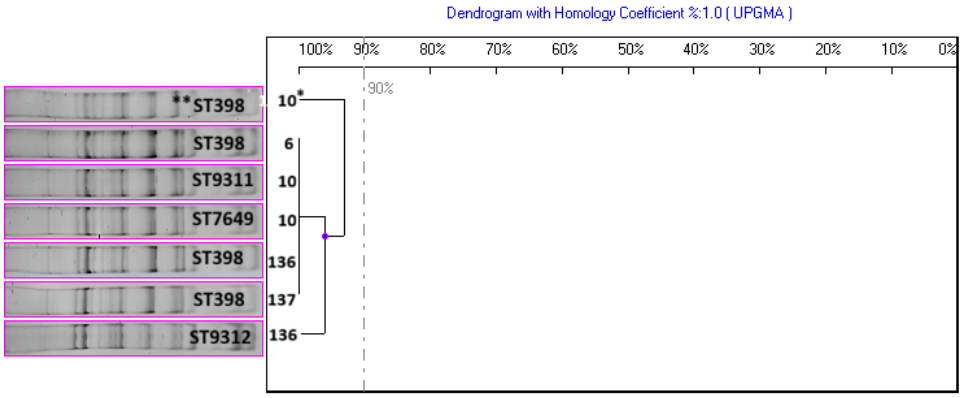
Niektóre szczepy wykazywały istotne podobieństwo do innych szczepów pochodzących z tego samego miejsca pobrania lub pobranych w tym samym okresie, a ich podobieństwo polegało na obecności tych samych genów oporności lub wirulencji albo profilu fenotypowego oporności. Jednak zdecydowana większość szczepów pochodzących od jednego osobnika wykazywała istotne różnice w puli testowanych genów oporności i/lub wirulencji albo profilach fenotypowych oporności w porównaniu z izolatami pochodzącymi z tego samego miejsca, ale z różnych lokalizacji, a nawet z tego samego miejsca.

6.1.4.2.2. Zwierzęta towarzyszące

Wygenerowane dendrogramy podobieństwa opierały się wyłącznie na izolatach MRSA i MRSP pochodzących wyłącznie od psów, ponieważ szczepy oporne na metycylinę wykryto tylko u tego gatunku zwierząt (Publikacja nr 4). Ze względu na niewielką liczbę porównywanych szczepów *S. aureus* wykazano bardzo niski stopień zróżnicowania. Na podstawie współczynnika podobieństwa na poziomie 90%, profile genomowe nie zostałyby zidentyfikowane (Rycina 9), co dodatkowo potwierdzają bardzo podobne wzory profili elektroforetycznych testowanych szczepów (Rycina 9), niezależnie od źródła szczepu i ich typów ST. W przypadku szczepów *S. pseudintermedius* zróżnicowanie było nieco większe ale na podstawie współczynnika podobieństwa na poziomie 90%, zidentyfikowano zaledwie dziewięć profili genomowych, które były do siebie podobne w różnym stopniu, od

zaledwie 12% do nawet 82%. Poszczególne profile obejmowały od jednego do nawet 15 szczepów (Rycina 10), które różniły się źródłem pochodzenia, typem sekwencji ST oraz profilami oporności i wirulencji, niemniej w przypadku szczepów MRSA i MRSP izolowanych od psów, nie stwierdzono między nimi żadnej korelacji.

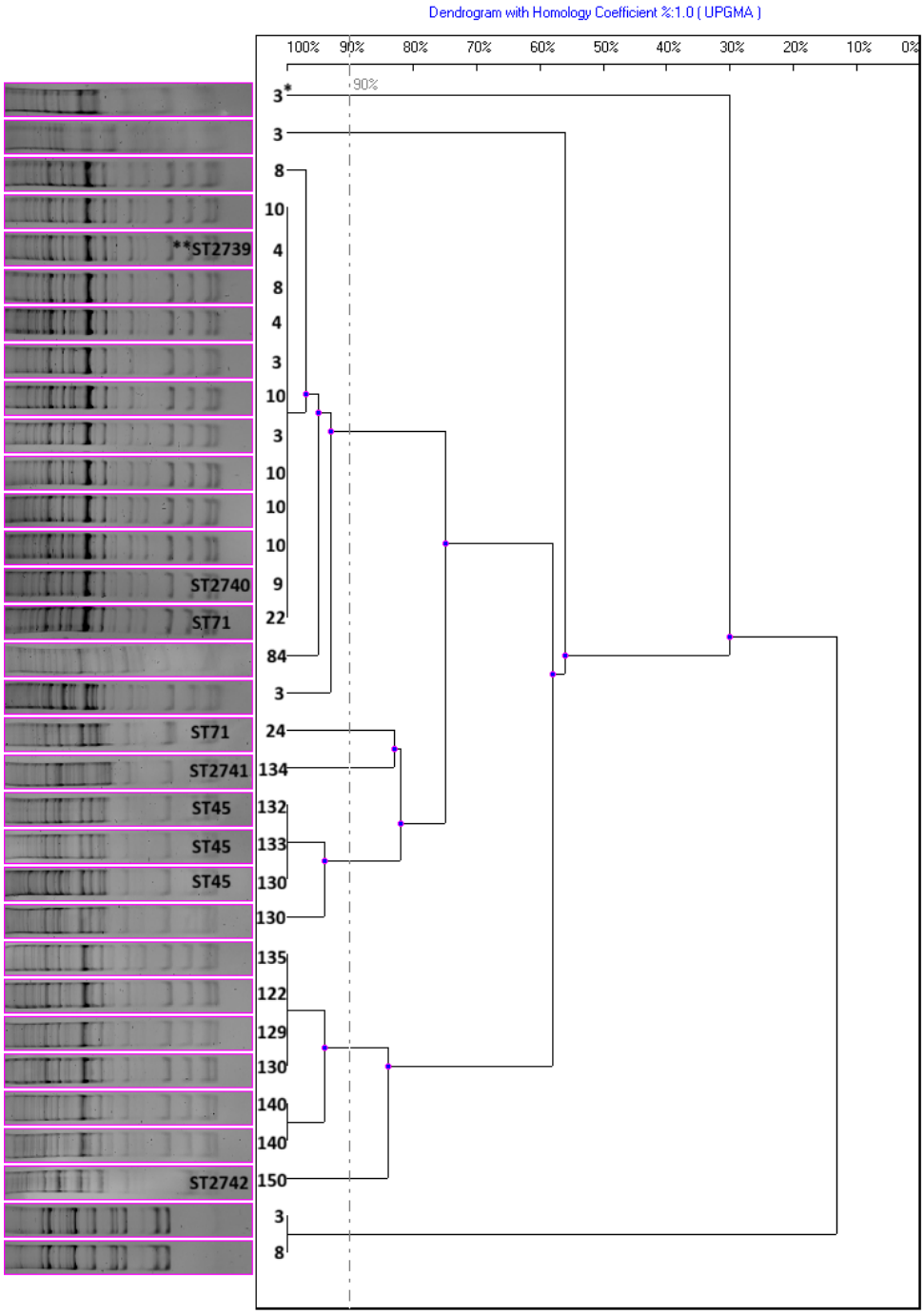
Rycina 9. Dendrogram podobieństwa badanych szczepów MRSA izolowanych od psów (metoda *ADSRRS*-fingerprinting)



* numer psa

** typy sekwencyjne (ST)

Rycina 10. Dendrogram podobieństwa badanych szczepów MRSP izolowanych od psów (metoda *ADSRRS*-fingerprinting)



* numer psa

** typy sekwencji inne niż ST551

6.2. Wyniki części immunologicznej

Wyniki opisane w tym podrozdziale dotyczą wyłącznie zwierząt gospodarskich (owiec), opisanych w Publikacji nr 3.

6.2.1. Morfologia małych przeżuwaczy

Wartości wszystkich parametrów hematologicznych krwi badanych owiec mieściły się w zakresie wartości fizjologicznych (Latimer, 2011) (Tabela 40). Nie stwierdzono również różnic istotnych statystycznie między rasami.

Tabela 40. Parametry hematologiczne osocza krwi maciorek (SWI- Świniarka, UHR- Uhruska (Polska Owca Nizinna)

Parametry krwi	Rasa	Grupa kontrolna	Staphylococus (grupa)	p-value
WBC (10^3/μL)	UHR	6.6±1.8	5,8±2.3	0.4
	SWI	7.7±1.6	8.7±2.2	0.3
LYM (10^3/μL)	UHR	3.7±0.9	3.2±1.2	0.3
	SWI	4.2±0.7	3.8±1.6	0.6
GR (10^3/μL)	UHR	2.8±1.0	2.6±1.3	0.4
	SWI	3.4±1.2	4.7±1.9	0.1
RBC (10^6/μL)	UHR	9.9±0.6	9.7±1.5	0.7
	SWI	8.2±0.5	8.0±1.2	0.8
HGB (g/dL)	UHR	12.3±0.8	12.3±2.0	0.9
	SWI	10.5±1.0	10.6±1.3	0.8
HCT (%)	UHR	29.4±0.7	29.9±1.6	0.7
	SWI	27.9±2.1	27.3±1.7	0.2
MCV (fl)	UHR	29.7±1.3	29.8±1.1	0.6
	SWI	32.2±0.9	31.3±3.7	0.5
MCH (pg)	UHR	10.4±0.5	10.6±0.4	0.4
	SWI	11.0±0.4	11.5±0.7	0.2

Wartości oznaczają średnią ± błąd standardowy; średnie w każdym wierszu oznaczone * różnią się istotnie ($p < 0,05$). Skróty: WBC – białe krwinki; LYM – limfocyty; GR – granulocyty; RBC – liczba czerwonych krwinek; HGB – hemoglobina; MCV – średnia objętość krwinki czerwonej; HCT – hematokryt; MCH – średnia zawartość hemoglobiny w krwince

6.2.2. Ekspresja genów wybranych cytokin oraz białek ostrej fazy

W badaniu wykryto ekspresję czterech genów cytokin i trzech genów białek ostrej fazy w leukocytach w grupie owiec- nosicieli *S. aureus* i bez obecności *S. aureus* (grupa kontrolna): *IL-1α*, *IL-1β*, *IL-6*, *TNF-α*, *SAA*, *Hp* i *Cp*. Zaobserwowano statystycznie istotny

wzrost zarówno IL-6, jak i Hp w czasie ciąży w leukocytach owiec-nosicieli *S. aureus*, rasy Uhruska. Statystycznie istotne różnice zaobserwowano również w czasie ciąży między obiema grupami badawczymi w przypadku IL-6 i Hp. Podobne tendencje zaobserwowano u owiec rasy Świniarka, ale różnice nie zostały potwierdzone statystycznie (Tabela 41).

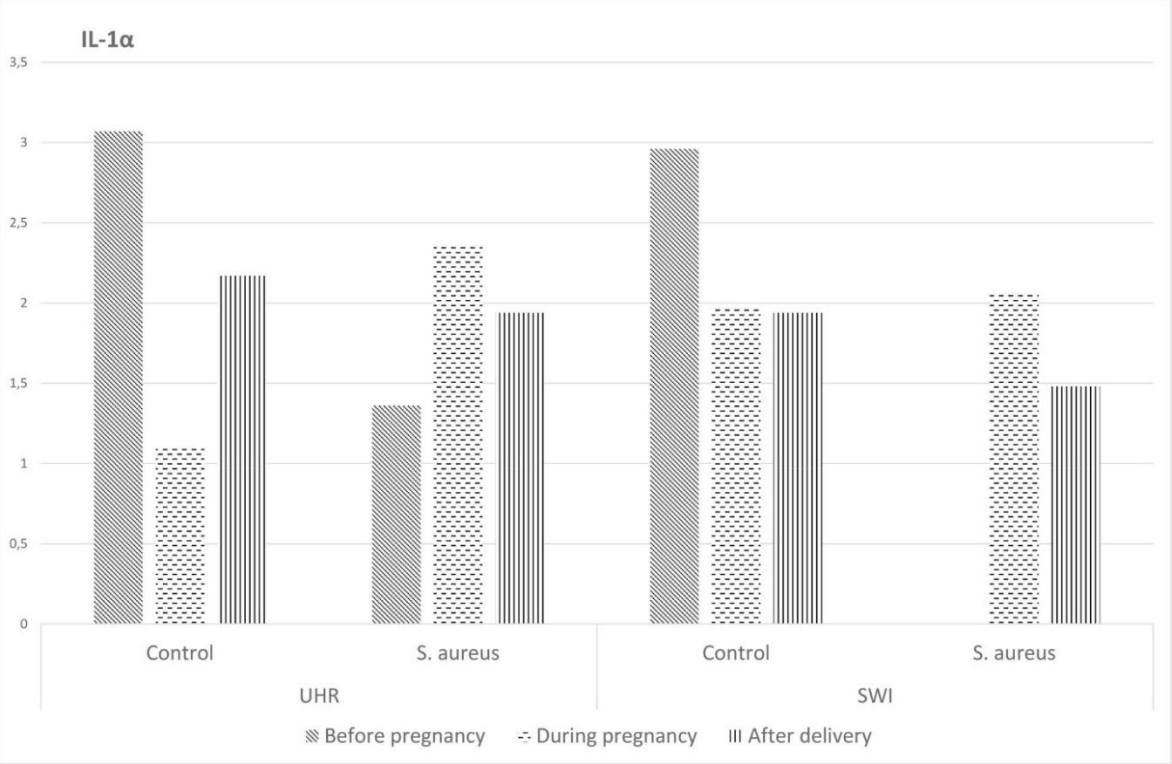
Tabela 41. Ekspresja wybranych genów cytokin i wybranych genów białek ostrej fazy u owiec- nosicieli *S. aureus* i wolnych od *S. aureus*

Cytokina / Białko ostrej fazy		*Rasa*	*Grupa*	*Przed ciążą*	*SD*	*W czasie ciąży*	*SD*	*Po porodzie, w okresie laktacji*	*SD*
Cytokina	*IL-1α*	*UHR*	*Kontrola*	*3,07*	*±2,3*	*1,09*	*±0,23*	*2,17*	*±1,5*
			S. aureus	*1,36*	*±0,55*	*2,36*	*±1,05*	*1,94*	*±1,2*
		SWI	*Kontrola*	*2,96*	*±2,3*	*1,98*	*±1,4*	*1,94*	*±0,7*
			S. aureus	*—*	*—*	*2,07*	*±1,2*	*1,48*	*±0,8*
	IL-1β	*UHR*	*Kontrola*	*1,14*	*±0,33*	*1,06*	*±0,4*	*2,13*	*±1,3*
			S. aureus	*1,38*	*±0,55*	*1,16*	*±0,62*	*3,20*	*±2,2*
		SWI	*Kontrola*	*1,02*	*±0,2*	*1,17*	*±0,35*	*1,33*	*±1,05*
			S. aureus	*—*	*—*	*1,17*	*±0,35*	*7,51*	*±5,3*
	IL-6	*UHR*	*Kontrola*	*1,15*	*±0,33*	*1,34*	*±0,72*	*0,38**	*±0,26*
			S. aureus	*1,70a*	*±0,72*	*4,46b*	*±2,3*	*1,51a**	*±0,7*
		SWI	*Kontrola*	*1,33*	*±0,71*	*1,37*	*±0,5*	*1,51*	*±0,65*
			S. aureus	*—*	*—*	*2,18*	*±1,2*	*0,41*	*±0,24*
	TNF-α	*UHR*	*Kontrola*	*1,54*	*±0,6*	*1,22*	*±0,42*	*3,58*	*±2,1*
			S. aureus	*1,11*	*±0,3*	*1,61*	*±0,50*	*1,16*	*±0,4*
		SWI	*Kontrola*	*1,11*	*±0,25*	*1,29*	*±0,45*	*2,80*	*±1,35*
			S. aureus	*—*	*—*	*1,77*	*±0,8*	*0,45*	*±0,29*
Białko ostrej fazy	*SAA*	*UHR*	*Kontrola*	*1,62*	*±1,2*	*1,39*	*±0,9*	*0,90*	*±0,7*
			S. aureus	*1,20*	*±0,35*	*1,25*	*±0,9*	*1,24*	*±0,4*
		SWI	*Kontrola*	*2,21*	*±1,7*	*1,87*	*±1,2*	*2,01*	*±0,8*
			S. aureus	*—*	*—*	*1,09*	*±0,7*	*0,55*	*±0,3*
	Hp	*UHR*	*Kontrola*	*1,05*	*±0,35*	*1,17**	*±0,35*	*0,39*	*±0,20*
			S. aureus	*1,08a*	*±0,25*	*4,7b**	*±2,2*	*1,22a*	*±0,45*
		SWI	*Kontrola*	*1,57*	*±0,55*	*1,79*	*±0,9*	*1,79*	*±0,9*
			S. aureus	*—*	*—*	*2,30*	*±0,9*	*0,54*	*±0,32*
	Cp	*UHR*	*Kontrola*	*1,57*	*±0,9*	*1,48*	*±0,6*	*4,51*	*±4,2*
			S. aureus	*1,31*	*±0,4*	*6,11*	*±3,5*	*1,50*	*±0,42*
		SWI	*Kontrola*	*1,55*	*±0,6*	*1,39*	*±0,45*	*3,65*	*±2,1*
			S. aureus	*—*	*—*	*3,61*	*±2,4*	*3,52*	*±3,3*

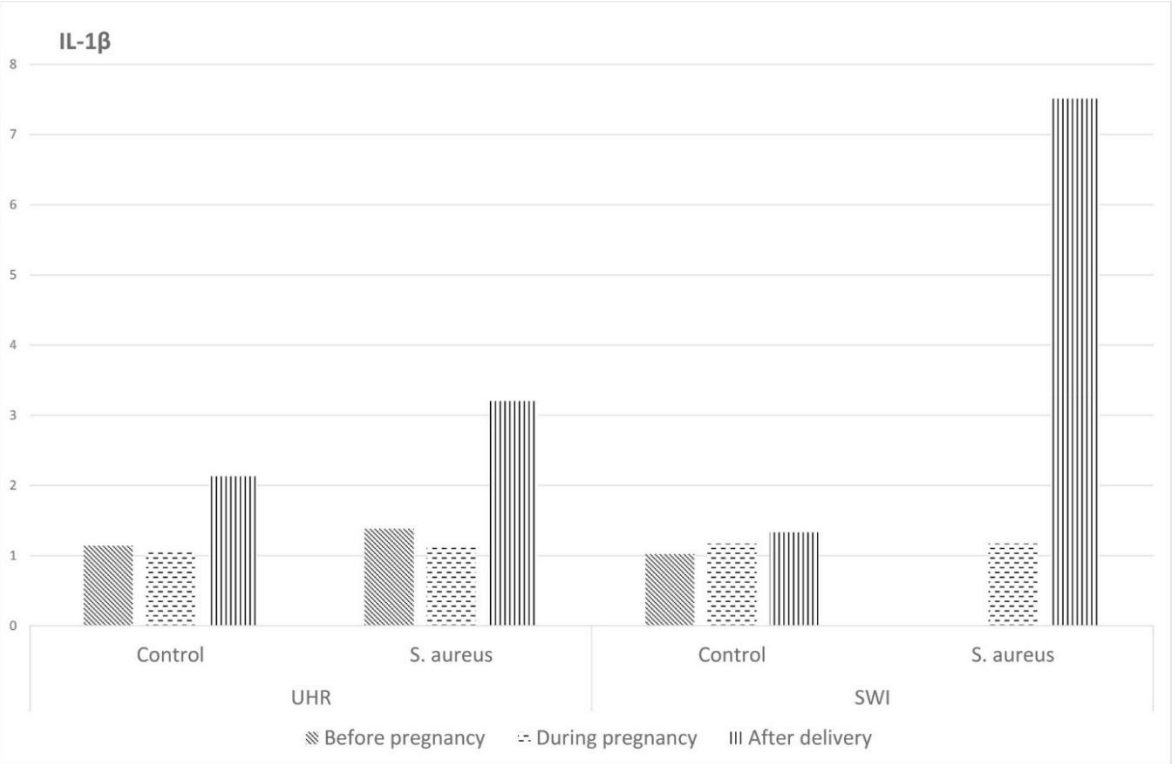
Wartości przedstawiają średnią ± odchylenie standardowe (SD). Średnie w obrębie każdej linii oznaczone różnymi literami (a, b,) różnią się istotnie ($p < 0,05$). Średnie w obrębie grup (bez *S. aureus* (kontrola)/*S. aureus*) oznaczone * różnią się istotnie ($p < 0,05$); UHR – rasa Uhruska (Polska Owca Nizinna); SWI – rasa Świniarka

Poniższe ryciny prezentują graficzny wykres poziomu cytokin u owiec rasy Świniaka oraz owiec rasy Uhruska w badanych terminach (schemat pobrania został przedstawiony w punkcie 4.1.).

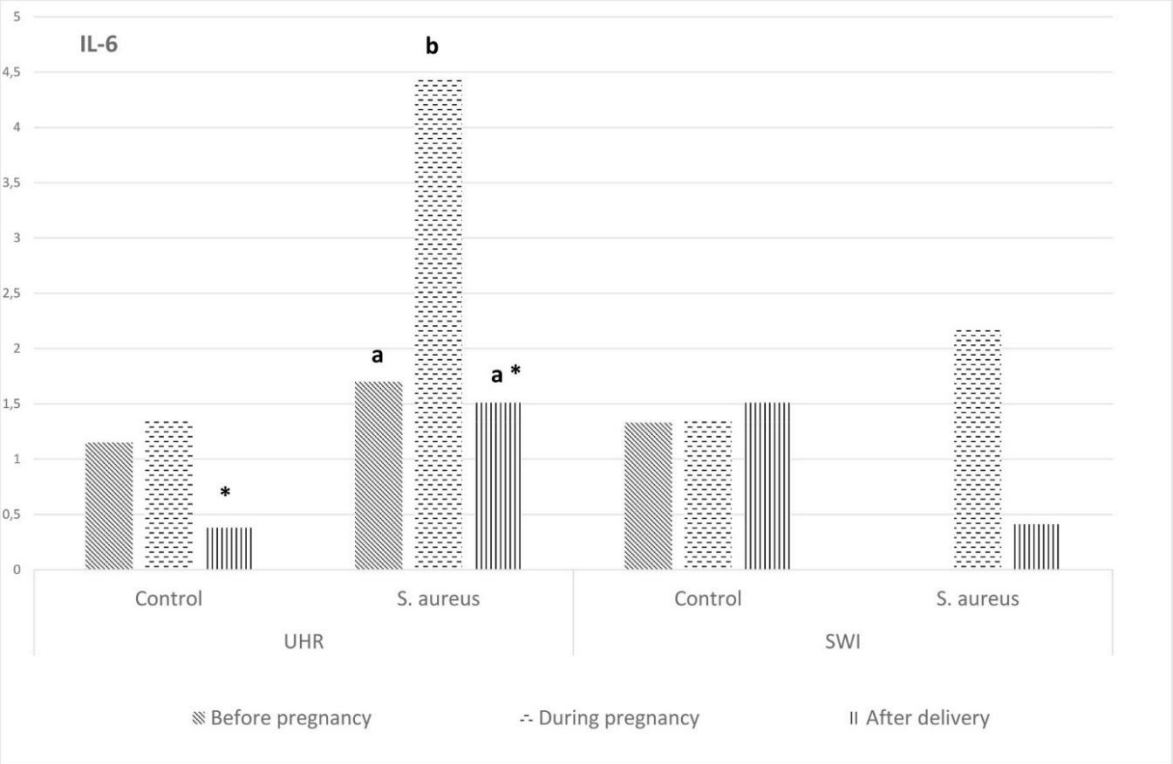
Rycina 11. Ekspersja genu *IL-1α* u dwóch ras owiec (Uhruska oraz Świniarka) w badanych terminach



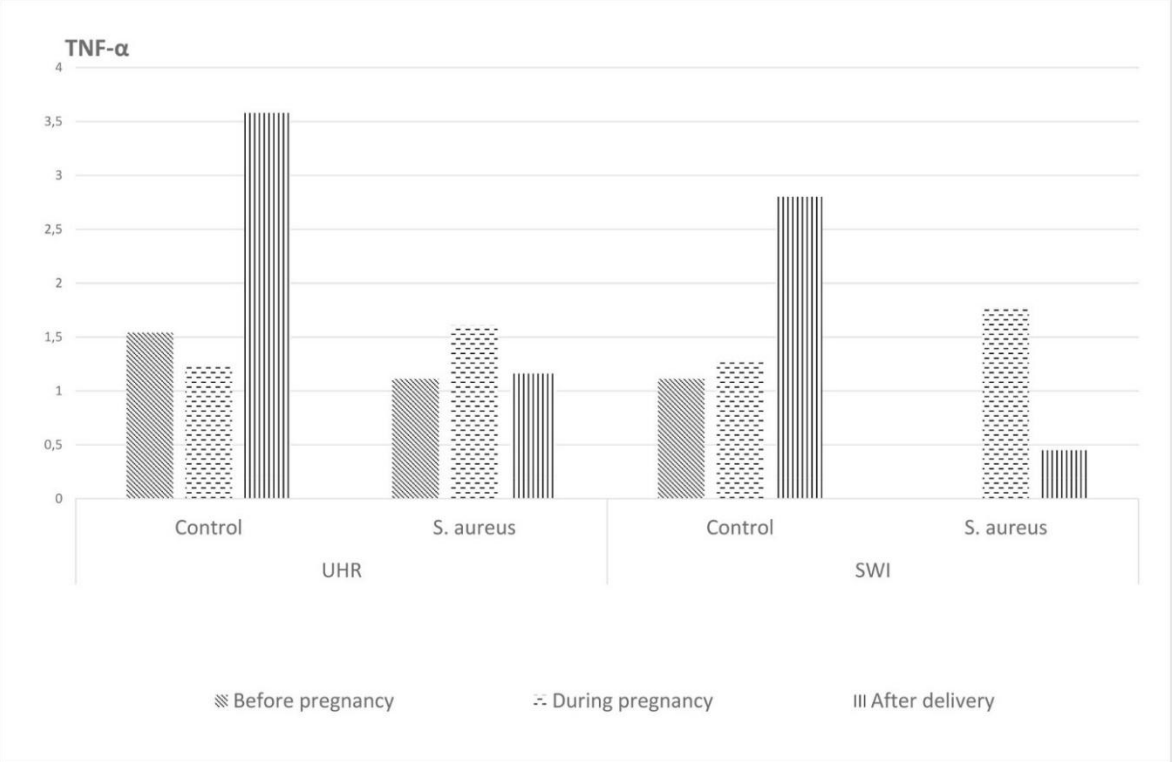
Rycina 12. Ekspersja genu *IL-1β* u dwóch ras owiec (Uhruska oraz Świniarka) w badanych terminach



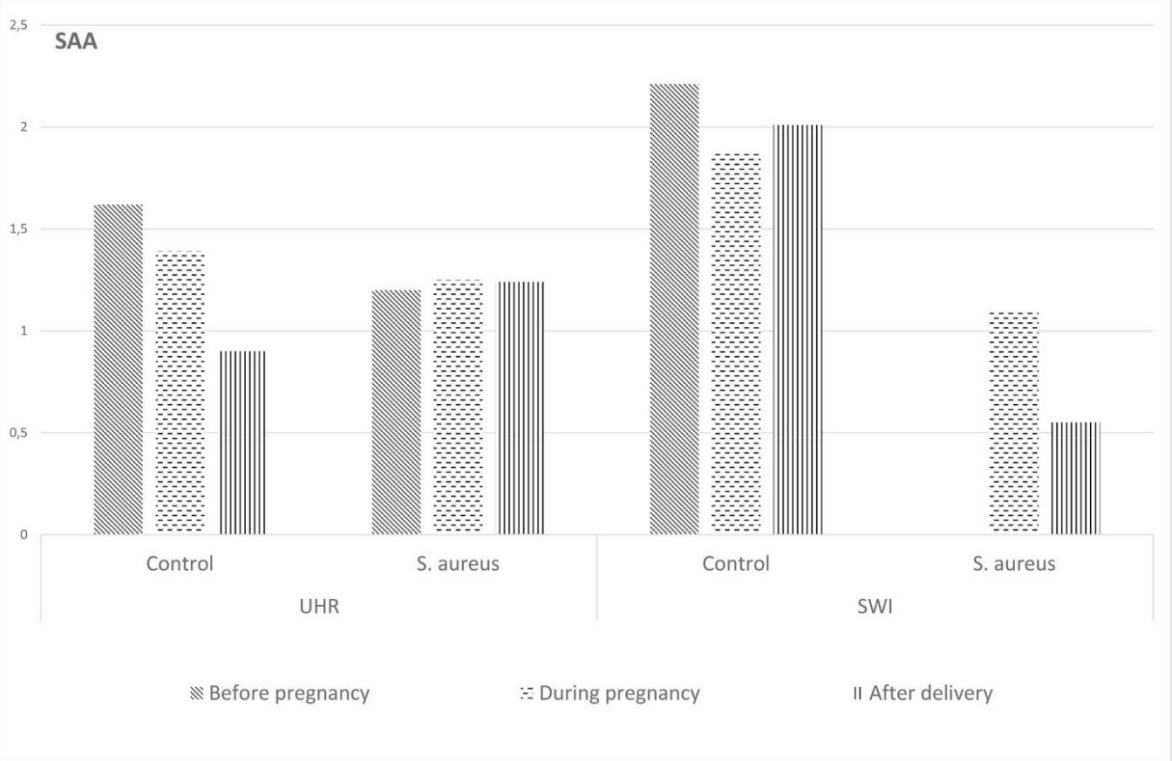
Rycina 13. Ekspersja genu *IL-6* u dwóch ras owiec (Uhruska oraz Świniarka) w badanych terminach



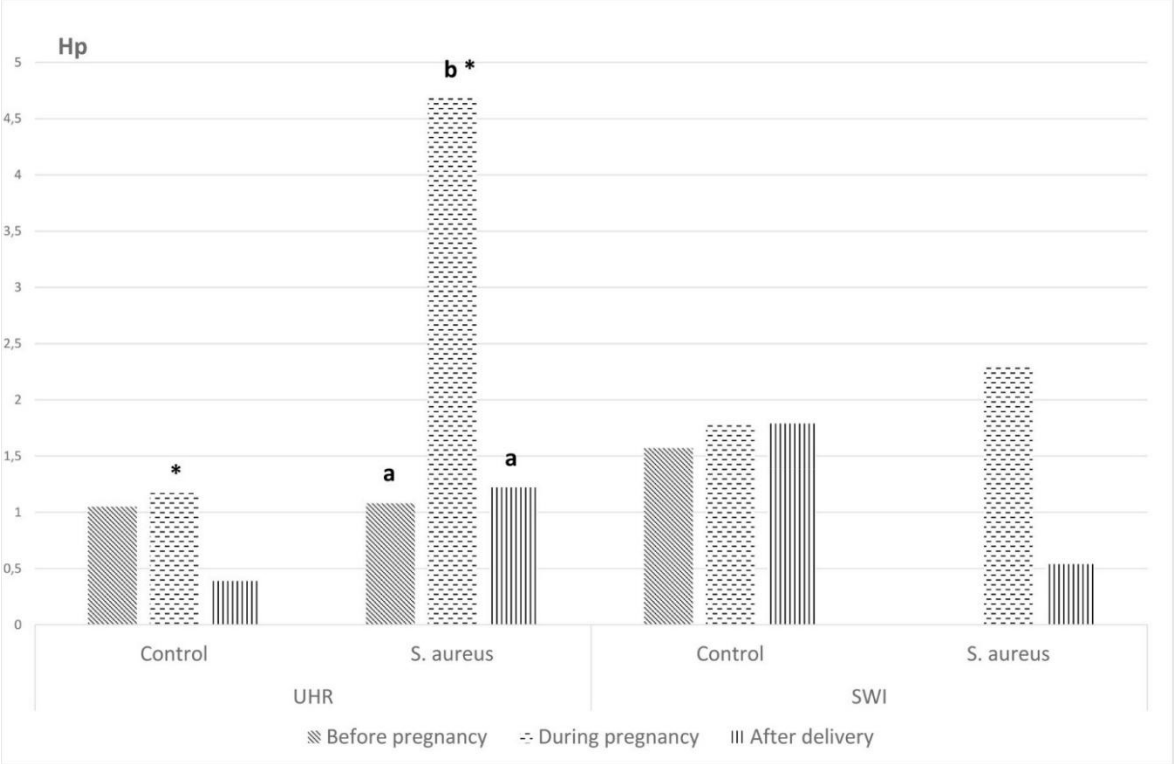
Rycina 14. Ekspersja genu *TNF-α* u dwóch ras owiec (Uhruska oraz Świniarka) w badanych terminach



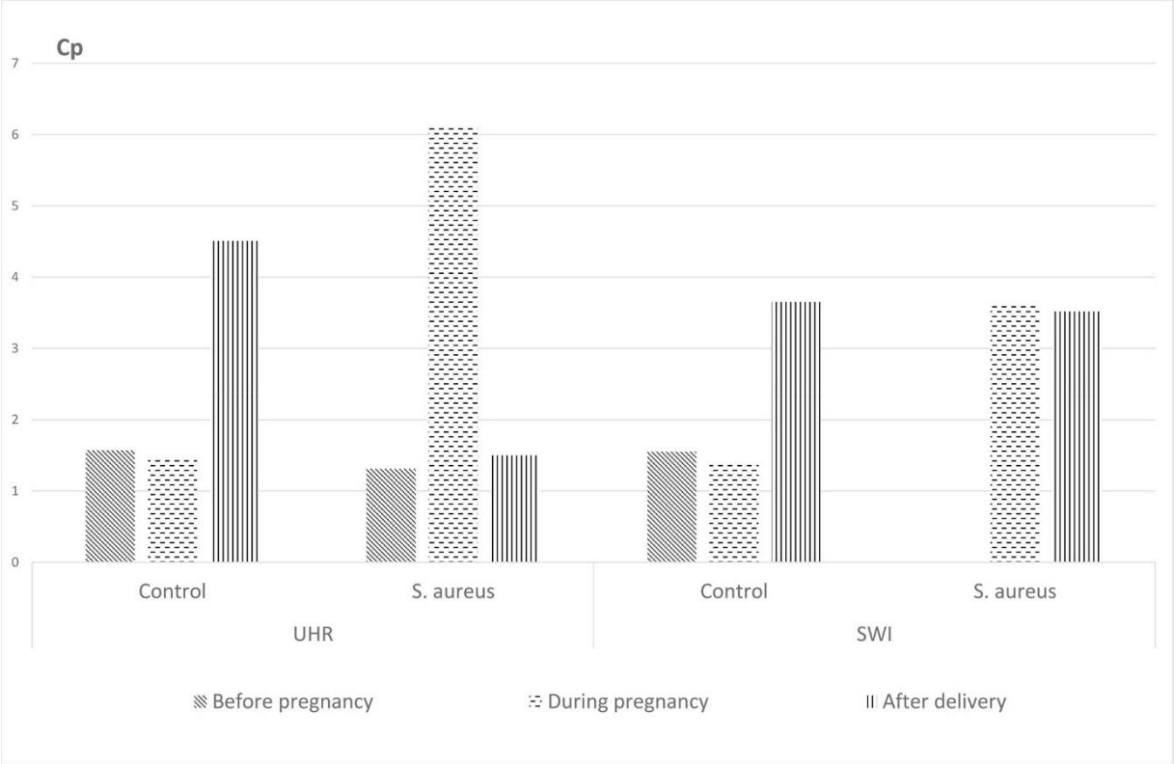
Rycina 15. Ekspersja genu *SAA* u dwóch ras owiec (Uhruska oraz Świniarka) w badanych terminach



Rycina 16. Ekspersja genu *Hp* u dwóch ras owiec (Uhruska oraz Świniarka) w badanych terminach



Rycina 17. Ekspersja genu *Cp* u dwóch ras owiec (Uhruska oraz Świniarka) w badanych terminach



7. Dyskusja

Obecnie całkowita liczba wszystkich gatunków bakterii, zarówno patogenów, jak i komensali, we wszystkich siedliskach na świecie może przekraczać milion (Jeżak i in., 2021). Wiele z tych gatunków to mikroorganizmy występujące zarówno u zwierząt, jak i w ich siedliskach. Do najliczniejszych rodzajów w tej grupie należą *Staphylococcus* spp.*; Salmonella* spp.*; Campylobacter* spp.*; Listeria* spp.*; Enterococcus* spp. i bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* (Woolhouse i in., 2015; Jeżak i in., 2021; Wesołowska i in., 2023). Niektóre z tych gatunków mogą również stanowić potencjalne zagrożenie dla zdrowia publicznego, w tym bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, ze szczególnym uwzględnieniem *S. aureus* i innych tzw. koagulazododatnich gatunków. Należy wskazać, iż środowisko naturalne jest jednym z trzech głównych elementów powszechnie znanej koncepcji One Health, która zakłada, że zdrowie człowieka jest nierozerwalnie związane ze zdrowiem zwierząt i środowiskiem naturalnym (Aslam i in., 2021). Z jednej strony różne gatunki zwierząt wolno żyjących można uznać za integralną część środowiska naturalnego; z drugiej strony mogą one stanowić potencjalne i nieznane rezerwuary różnorodnych mikroorganizmów stanowiących zagrożenie dla zdrowia publicznego. Z drugiej zaś strony prócz zwierząt wolno żyjących bytujących w środowisku naturalnym lub nieopodal siedlisk ludzkich, na co dzień człowiek ma bezpośredni kontakt z innymi gatunkami zwierząt, takimi jak zwierzęta towarzyszące oraz zwierzęta gospodarskie. Zwierzęta takie jak psy i koty towarzyszą ludziom od setek lat, utrzymując z nimi bliski kontakt, a nawet traktowane są jak członkowie rodziny. Z kolei zwierzęta gospodarskie stanowią źródło żywności zwierzęcego pochodzenia, co również niesie ze sobą ryzyko przenoszenia mikroorganizmów o różnym stopniu wirulencji, w tym mikroorganizmów wielolekoopornych.

Podążając zatem za koncepcją „Jednego zdrowia" w niniejszej pracy podjęto się oceny przedstawicieli gatunkowych wszystkich wymienionych grup zwierząt w aspekcie ich znaczenia jako rezerwuarów drobnoustrojów należących do rodzaju *Staphylococcus,* potencjalnie stanowiących zagrożenie dla zdrowia publicznego. Postawiono hipotezę, iż bez względu na gatunek zwierzęcia, jego status jako domowego lub wolno żyjącego i poziom stosowanej antybiotykoterapii, będzie on stanowić rezerwuar bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, przy czym najczęściej notowane determinanty oporności i/lub wirulencji będą występowały u badanych izolatów, podobnie jak w przypadku szczepów pochodzących od człowieka, a być może zostaną również wykazane określone klony szczepów, istotnych

epidemiologicznie. W związku z dwoistością charakteru występowania bakterii z rodzaju *Staphylococcus* u zwierząt i człowieka (patogen lub komensal) oraz niezwykłą plastycznością ich genomów, drobnoustrój ten wymaga dalszych badań.

Prewalencja oraz miejsca predylekcyjne izolacji bakterii *Staphylococcus* u zwierząt

Zwierzęta gospodarskie (owce)

Małe przeżuwacze, takie jak owce, są dość istotnym rezerwuarem bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, co potwierdziły również niniejsze badania (Publikacja nr 1 i 2). Specyficzny podwójny status tego gatunku (jako komensala lub patogenu odpowiedzialnego za szeroki zakres zakażeń i zatruć pokarmowych) jest częstym celem badań jako przyczyna chorób, ale rzadziej celem badań przesiewowych zarówno u ludzi, jak i u różnych gatunków zwierząt. W przypadku owiec i kóz wyniki badań zazwyczaj koncentrują się na analizie tego mikroorganizmu jako patogenu odpowiedzialnego za mastitis, infekcje dróg oddechowych lub posocznicę u jagniąt (Merz i in., 2016; Vasileiou i in., 2019; Sezzi i in., 2024), natomiast badania monitorujące odnośnie występowania i charakterystyki tych szczepów, izolowanych od zdrowych klinicznie zwierząt są przeprowadzane znacznie rzadziej u tych gatunków zwierząt. Niemniej dostępne badania potwierdziły, że niezależnie od rasy, *S. aureus* jest powszechnie obecny u zdrowych owiec, chociaż w bardzo zróżnicowanym odsetku w zależności od rasy i miejsca pobrania próbki. Saad i in. (2024) wykazali 80% poziom nosicielstwa izolatów *S. aureus* u kóz i owiec, podczas gdy Vautor i in. (2005) potwierdzili występowanie *S. aureus* na błonie śluzowej jamy nosowej tylko u 29% zdrowych owiec. Z kolei Agabou i in. (2017) wykazali 44% nosicielstwo *S. aureus* również w materiale pobranym z tego samego miejsca. Dlatego badania zastosowane w Publikacji nr 2 zostały oparte o nieco inną strategię pobierania materiału; uwzględniającą aż cztery różne miejsca pobrania i cztery różne okresy związane z fizjologicznym cyklem ciążowym u dwóch ras owiec, w tym jednej, która jest niemal natywna (rasa Świniarka), a zatem teoretycznie bardziej odporna na kolonizację przez mikroorganizmy. Błona śluzowa jamy ustnej okazała się być najczęściej kolonizowana przez *S. aureus* (60% wszystkich szczepów *S. aureus* pochodziło z tego miejsca). Co więcej, aż dwie trzecie tych izolatów uzyskano od owiec rasy Uhruska. Podobnie w przypadku izolatów z mleka, dziewięć na dziesięć szczepów pochodziło z mleka owiec tej samej rasy. W przypadku pozostałych miejsc izolacji

odsetek ten pozostał stosunkowo niski, wahając się od 14,6% z błony suzowej odbytu do zaledwie 6,8% z zewnętrznego przewodu słuchowego, a poziom izolacji był porównywalny dla obu ras. Uzyskane wyniki wskazują na stosunkowo wysoki wskaźnik kolonizacji *S. aureus* błony śluzowej jamy ustnej klinicznie zdrowych owiec i sugerują, że błona śluzowa jamy ustnej powinna być brana pod uwagę przede wszystkim przy wyborze najbardziej reprezentatywnego miejsca pobrania próbek, szczególnie w przypadku badań przesiewowych, ponieważ w przypadku pobierania materiału z innych okolic ciała, wyniki dotyczące kolonizacji bakteriami z rodzaju *Staphylococcus* mogą być znacząco niedoszacowane. Przeprowadzona analiza wykazała również dwukrotnie wyższy poziom odsetka kolonizacji *S. aureus* u rasy Uhruska w porównaniu z owcami rasy Świniarka, co może wskazywać na istotnie wyższy poziom mechanizmów obronnych związanych z kolonizacją u klinicznie zdrowych zwierząt rasy bardziej prymitywnej. Najczęstszymi miejscami pobierania próbek u owiec są skóra wymienia lub strzyku oraz jama nosowa lub błona śluzowa odbytu, w przeciwieństwie do jamy ustnej (Haag i in., 2019), która, co wykazano również w niniejszych badaniach, jest głównym miejscem kolonizacji przez *S. aureus*. Obecność *S. aureus* w jamie ustnej u dorosłych zwierząt prawdopodobnie sprzyja także pionowej transmisji tego mikroorganizmu między matką a nowonarodzonym jagnięciem, ponieważ lizanie jest częścią naturalnego zachowania związanego z nawiązywaniem zdrowej więzi matka-jagnię, uczeniem się zapachu i zachęcaniem do pobierania siary. Lizanie przez matkę jest również niezbędne dla higieny i rozpoznawania potomstwa w stadzie. Badanie przeprowadzone przez Campos i in. (2023) na klinicznie zdrowych ochotnikach wykazało, że podobnie jak u owiec, jama ustna człowieka jest również bardzo często skolonizowana przez szczepy *S. aureus*. Co więcej jama nosowa i ustna mogą być niezależnie kolonizowane przez różne szczepy należące do gatunku *S. aureus*, na przykład o różnych profilach oporności, co jest niezwykle istotne z epidemiologicznego punktu widzenia. Przeprowadzone w publikacji nr 2 badania wykazały również obecność zróżnicowanych szczepów *S. aureus* występujących u tego samego osobnika (owcy), ale izolowanych z różnych miejsc, co potwierdza, że izolacja tylko jednego potencjalnie reprezentatywnego szczepu nie odzwierciedla pełnego poziomu oporności i/lub wirulencji szczepów *S. aureus* występujących u danego gospodarza. Potwierdzono również, że poziom kolonizacji *S. aureus* u owiec nie jest wartością stałą i zmienia się nie tylko w zależności od rasy i miejsca pobrania, ale zależy także od stanu fizjologicznego, np. związanego z ciążą. Wykazano, że w czasie okresu ciąży, niezależnie od jej etapu (początkowego lub końcowego), poziom kolonizacji *S. aureus* istotnie wzrasta

(trzykrotnie) w porównaniu z okresem przedciążowym i spada dwukrotnie po porodzie, w porównaniu z ostatnim okresem ciąży, co było szczególnie widoczne u rasy Świniarka. Jest to prawdopodobnie związane z faktem, iż w czasie ciąży obserwuje się zmiany w składzie i rozmieszczeniu komórek układu odpornościowego oraz wahania stężenia cytokin. Jest to niezbędne dla utrzymania płodu w tym okresie, ale zjawisko to może osłabiać poziom odpowiedzi przeciwdrobnoustrojowej (Downs i in., 2018; Greguła-Kania i in., 2020) i wskazywać na zmniejszone zaangażowanie mechanizmów obronnych matki w okresie fizjologicznej ciąży. Przekłada się to z kolei na wyższy odsetek kolonizacji mikroorganizmami komensalnymi, takimi jak *S. aureus*, lub zmianę ich statusu na patogen i większą zdolność do wywoływania zakażeń, w porównaniu z okresem przed ciążą. Warto również zauważyć, że brak izolacji *S. aureus* od owiec rasy Świniarka przed ciążą może wynikać z faktu, że ta prymitywna rasa jest bardziej odporna na kolonizację (Hahaj-Siembida i in., 2025). W publikacji nr 1 z kolei potwierdzono wysoki odsetek występowania bakterii z rodzaju *Staphylococcus* (70%) w mleku owiec będących w laktacji. Zjawisko to może być wynikiem różnych procesów, również związanych z występowaniem stanu patologicznego. W zależności od zastosowanych kryteriów, obecność tzw. głównych patogenów (do których zalicza się *E. coli, S. agalactiae* i *S. aureus*) determinuje klasyfikację danego przypadku jako klinicznego lub subklinicznego mastitis (Loncaric i in., 2019). Co ciekawe, w niniejszym badaniu u owiec nie stwierdzono żadnych zmian klinicznych w wymieniu mimo obecności *S. aureus* w mleku, co potencjalnie mogłoby kwalifikować przypadki *S. aureus*-dodatnie jako subkliniczne mastitis. Niestety ze względu na krótki okres po porodzie ocena liczby komórek somatycznych u badanych zwierząt nie byłaby wiarygodna (Albenzio i in., 2019). Z kolei w przypadku izolacji CoNS istnieje duże prawdopodobieństwo, że przy braku objawów klinicznych u zwierząt może to być infekcja subkliniczna, zazwyczaj o podłożu środowiskowym, lub po prostu nosicielstwo. Vassielieou in. (2019) wykazali, że nosicielstwo koagulazoujemnych gatunków *Staphylococcus* w gruczołach mlekowych u owiec wynosi około 6,5%, podczas gdy odsetek izolacji szczepów CoNS w niniejszych badaniach wyniósł aż 30%; stąd trudno byłoby uznać wszystkie przypadki za nosicielstwo. Jak wykazali Fragkou i in. (2007) oraz Chajęcka-Wierzchowska i in. (2023), status bakterii jako komensala, w sprzyjających warunkach (np. obniżona odporność u zwierząt) może zmienić się w patogen, prowadząc do mastitis. Proces ten najczęściej pojawia się w momencie odsadzenia (Vasileiou i in., 2019). W przeprowadzonej analizie niektóre gatunki CoNS, takie jak *S. xylosus* lub *S. simulans*, powtarzały się znacznie częściej w wynikach bo zostały wyizolowane odpowiednio u ponad

22% i 14% zwierząt, przy czym należy wskazać, że profil gatunkowy CoNS w tym przypadku może być odmienny lub bardziej zróżnicowany. Wśród gatunków CoNS, w zależności od położenia geograficznego i dominującego gatunku środowiskowego, różne gatunki mogą być izolowane z różną częstotliwością (Vasileiou i in., 2019), przykładowo *S. xylosus* i *S. simulans* były najczęściej izolowanymi gatunkami w niniejszych badaniach, podczas gdy inni badacze wykryli je odpowiednio na poziomie zaledwie 17% i 9%, a nawet w znacznie niższym odsetku, na poziomie pojedynczych przedstawicieli tych gatunków (Achek i in., 2019). Bakterie CoNS stanowią również dominującą mikrobiotę skóry owiec (Wesołowska i in., 2023), dlatego ich obecność może mieć nie tylko pochodzenie środowiskowe ale zakażenia wymienia mogą mieć źródło endogenne. Niestety ze względu na niewielką liczbę izolatów CoNS w przeprowadzonych badaniach, nie wykazano korelacji między gatunkiem CoNS a rasą zwierząt. W przypadku izolatów *S. aureus* poziom izolacji u obu ras był zbliżony; dlatego trudno było wskazać specyficzność związaną z rasą gospodarza (Uhruska vs Świniarka). Jednakże, wyższy niż w przypadku badań innych autorów odsetek izolacji *S. aureus* (40%) i CoNS (30%) u zwierząt może być związany z faktem, że owce pochodziły z jednej fermy i mogło dojść do bezpośredniej transmisji szczepów lub gatunków ze względu na bliski kontakt zwierząt. Jedną z przyczyn może być również stała obecność określonego szczepu *S. aureus* na fermie, którego głównym źródłem niekoniecznie są zwierzęta, a raczej mogą to być hodowcy lub osoby zajmujące się na co dzień zwierzętami. Przykładowo, badania Leroy i in. (2019) wykazały, niski wskaźnik nosicielstwa *S. aureus* u owiec (9-14%), podczas gdy wskaźnik nosicielstwa u hodowców był dość wysoki, sięgając nawet 60%. Stały kontakt między zwierzętami i obecność ssących jagniąt może być również jednym z czynników predysponujących do tak wysokiego odsetka *S. aureus* w mleku owczym (Vasileiou i in., 2019b). Jest to związane z potencjalnym krzyżowym ssaniem innych matek i rozprzestrzenianiem się patogenu wśród zwierząt tą drogą.

Analiza ekspresji genów wybranych markerów procesu zapalnego w odniesieniu do występowania *S. aureus* u zwierząt w różnych okresach fizjologicznych

Istotną obserwacją poczynioną w badaniach własnych jest fakt, iż *S. aureus* pojawia się u owiec rasy Świniarka (rasa natywna) jedynie w okresie ciąży, co może wynikać z fizjologicznego efektu immunosupresji w tym czasie. W poprzednim badaniu przeprowadzonym przez Greguła-Kania i in. (2020) obserwowano zmiany parametrów

białych krwinek (liczba leukocytów i odsetek limfocytów zmniejszał się, a liczba granulocytów wzrastała), co miało wpływ na utrzymanie płodu i efekt immunosupresji. Z drugiej strony organizm gospodarza byłby bardziej podatny na kolonizację przez bakterie, m. in. *S. aureus*. Dlatego w badaniach własnych dokonano analizy porównawczej dwóch grup zwierząt (zdrowych klinicznie nosicieli *S. aureus* oraz zwierząt u których nie wykazano obecności *S. aureus*) w odniesieniu do poziomu ekspresji wybranych genów cytokin i białek ostrej fazy. Zakażenie bakteryjne, a nawet nosicielstwo bakterii u przeżuwaczy może prowadzić do ogólnoustrojowej odpowiedzi immunologicznej, objawiającej się zwiększoną ekspresją cytokin we krwi. Zmiany te odzwierciedlają aktywację układu odpornościowego (Kaminska i in., 2024). W badaniach własnych przeprowadzono analizę ekspresji genów cytokin *IL-6*, *TNF-α*, *IL-1α* i *IL-1β*. Ich funkcje obejmują regulację procesu zapalnego i odpowiedzi na zakażenie. IL-6 jest wydzielana przez makrofagi i komórki śródbłonka; stymulując produkcję białek ostrej fazy w wątrobie i wspomagając różnicowanie limfocytów B i T, w tym komórek Th17. Oś Th17/IL-17 stanowi główną obronę przed patogenami zewnątrzkomórkowymi, takimi jak *S. aureus* u ludzi i zwierząt, ponieważ odpowiada za mobilizację neutrofili w miejscu zakażenia, wzmacnianie bariery nabłonkowej i indukowanie aktywności peptydów przeciwdrobnoustrojowych w skórze i błonach śluzowych (Bröker i in. 2016; Mills i in. 2022).

Warto podkreślić, że w badaniach własnych zaobserwowano różnice istotne statystycznie między grupami badawczymi w przypadku ekspresji genów *IL-6* i *Hp*, ale tylko w okresie ciąży. Co więcej, poziom aktywności wybranych mechanizmów odpornościowych może być skorelowany z rasą zwierząt, ponieważ zaobserwowano istotny wzrost ekspresji zarówno genu *IL-6*, jak i *Hp* w okresie ciąży w leukocytach owiec rasy Uhruska u nosicieli *S. aureus* w porównaniu ze zwierzętami, u których nie stwierdzono obecności *S. aureus*. Podobne tendencje zaobserwowano u owiec rasy Świniarka, jednak różnice te nie zostały potwierdzone statystycznie. Haptoglobina jest syntetyzowana w odpowiedzi na prozapalną cytokinę IL-6, której ekspresja genu była również zwiększona w leukocytach owiec, u których został wykazany *S. aureus*. U bydła ekspresja mRNA haptoglobiny wzrasta zarówno w wątrobie, jak i gruczole mlekowym po zakażeniu *S. aureus*, a wzrost ten jest zauważalny już 48 godzin po zakażeniu (Abdelmegid i in., 2017). Należy podkreślić, iż większość dotychczasowych badań nad odpowiedzią immunologiczną przeżuwaczy opierała się na analizie komórek somatycznych mleka lub komórek śródbłonka wymienia. W badaniach własnych analizy przeprowadzono w leukocytach krwi. Należy również

podkreślić, iż haptoglobina silnie hamuje wiązanie hemu przez receptor IsdH *S. aureus* kompleksu Hp–Hb. Hp zapobiega pobieraniu żelaza z hemoglobiny przez patogeny, co z kolei ogranicza ich wzrost (Mikkelsen i in., 2020). Zakażenie *S. aureus* może stymulować odpowiedź immunologiczną gospodarza w różnym stopniu, co z kolei determinuje intensywność procesu zapalnego. Również badanie przeprowadzone przez Gilberta i in. (2013) wykazało iż podczas zakażenia wywołanego przez *S. aureus* aktywowane są głównie szlaki AP-1 i IL-17A, co wskazuje na tendencję do przewlekłego i subklinicznego przebiegu infekcji. Słaba aktywacja odpowiedzi immunologicznej przez *S. aureus* może pozwolić bakteriom uniknąć eliminacji przez układ odpornościowy gospodarza. Pomimo, iż przeprowadzono wiele badań mających na celu wyjaśnienie złożonych procesów fizjologicznych i komórkowych zachodzących w odpowiedzi na patogeny, mechanizmy ochronne wciąż nie są do końca jasne. Warto również zauważyć, że badania nad ekspresją genów układu odpornościowego u owiec, w porównaniu z innymi gatunkami (bydło, świnie) są bardzo skąpe, a potencjalne mechanizmy korelacji między aktywacją procesów zapalnych a obecnością *S. aureus* wciąż nie są w pełni poznane (Vautor i in., 2009; Renna i in., 2019).

Zwierzęta towarzyszące (psy i koty)

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* występują zarówno u ludzi, jak i u zwierząt towarzyszących, dlatego dwukierunkowy transfer tej grupy bakterii jest możliwy i częsty, szczególnie w przypadku koagulazododatnich *Staphylococcus* (Cuny i in. 2022). Badania przedstawione w publikacji nr 5, wykazały stosunkowo wysoką częstość występowania *Staphylococcus* spp. u zwierząt towarzyszących, szczególnie u psów, u których wykryto te mikroorganizmy aż u 52,3% badanych zwierząt. Wśród kotów odsetek występowania *Staphylococcus* spp. wykazano zaledwie na poziomie 34,4%, przy czym wśród zidentyfikowanych gatunków przeważały szczepy koagulazoujemne, ponieważ tylko 25% wszystkich szczepów wyizolowanych od kotów przypisano do dwóch koagulazododatnich gatunków: *S. aureus* i *S. pseudintermedius*. Uzyskane wyniki są nieco odmienne w porównaniu z wynikami prewalencji, uzyskanymi przez innych autorów, również w Polsce. Należy jednak zauważyć, że odsetek izolacji i skład gatunkowy *Staphylococcus* spp. zależą w dużej mierze od stanu klinicznego gospodarza, miejsca izolacji i poziomu kontaktu z ludźmi. Badania przesiewowe przeprowadzone przez Miszczak i in. (2022) na klinicznie zdrowych psach i kotach i z objawami infekcji, wykazały wyższą częstość

występowania *Staphylococcus* spp. u kotów w porównaniu z psami oraz przewagę gatunków takich jak *S. felis* i *S. epidermidis*, a przykładowo w niniejszym badaniu odsetek izolacji u któw był na niskim poziomie, a *S. felis*, gatunek blisko związany z kotem jako gospoarzem, został wyizolowany tylko od jednego kota. Z kolei w badaniu przeprowadzonym przez Bierowiec i in. (2021) wykazano, że trzymanie kotów razem z psami determinuje zmienność profilu gatunkowego *Staphylococcus* i sprzyja wyższej częstości występowania *S. pseudintermedius*, gatunku związanego głównie z psem jako gospodarzem. Podobnie większy kontakt zwierząt z ludźmi może prowadzić do wyższej częstości występowania *S. aureus* u tych pierwszych (Bierowiec i in. 2016). Badany region jest również czynnikiem modulującym profil gatunkowy *Staphylococcus* u zwierząt towarzyszących, a nawet ich właścicieli. Gatunek zwierząt towarzyszących i poziom kontaktu między ludźmi a tymi zwierzętami w dużej mierze zależą od różnic kulturowych i tradycji panujących w danym regionie lub kraju. Na przykład w badaniu przeprowadzonym przez Abdullahi i in. (2024) w Hiszpanii u zdrowych klinicznie psów i ich właścicieli, *S. epidermidis* i *S. hominis* dominowały u obu gatunków, co może wskazywać na bliski kontakt i prawdopodobieństwo wzajemnej wymiany tcyh mikroorganizmów. Ponadto Cuny i in. (2022) wykazali, że *S. aureus* jest przenoszony częściej między ludźmi i zwierzętami niż *S. pseudintermedius* między psami i ich właścicielami. Jednak, podobnie jak w badaniach innych autorów (Kasprowicz i in. 2011, Nocera i in. 2025), najwyższy odsetek izolatów *Staphylococcus* uzyskano ze skóry i błony śluzowej jamy ustnej badanych zwierząt, co potwierdza, że obszary te są miejscami predylekcyjnymi do pobierania materiału do badań przesiewowych. Pobieranie kału lub wymazów z odbytu do badań przesiewowych w kierunku izolacji i analizy *Staphylococcus* może dawać wyniki fałszywie ujemne. Niski odsetek gatunków *Staphylococcus* w mikrobiomie jelitowym u psów potwierdzają również badania oparte na sekwencjonowaniu genomu mitochondrialnego (Thomsen i in. 2023).

Zwierzęta wolno żyjące (lisy rude)

Lis rudy (*Vulpes vulpes*), czyli jeden z najpospolitszych gatunków w Polsce i innych krajach europejskich (Jackowiak i in., 2021; Delcourt i in., 2022), jest doskonałym przykładem gatunku, który może być biomarkerem rzeczywistego zanieczyszczenia środowiska. Charakteryzuje się on stosunkowo wysokim potencjałem migracyjnym, co jest szczególnie istotne w przypadku szczepów analizowanych w niniejszym badaniu. Kolejnym elementem

wskazującym na przydatność lisa rudego jako gatunku wskaźnikowego jest jego wysoki potencjał synantropizacji i bardzo zróżnicowana dieta. Dość powszechna obecność lisów rudych w miastach i w pobliżu gospodarstw hodowlanych, wiąże się z łatwym dostępem do źródeł pożywienia (np. śmietników) (Jackowiak i in., 2021). Z drugiej strony, wszystkożerność tej grupy zwierząt zwiększa możliwość kumulacji różnego rodzaju patogenów i szczepów wielolekoopornych, w tym gatunków komensalnych czy tzw. bakterii wskaźnikowych, które mogą łatwo przenosić geny oporności, a nawet wirulencji, na gatunki ściśle patogenne poprzez horyzontalny transfer genów (HGT) (Nowakiewicz i in., 2020a). Bogaty panel czynników wirulencji w połączeniu z licznymi mechanizmami nabywania lekooporności poprzez HGT stwierdzono również u bakterii *Staphylococcus* (Cheung i in., 2021; Howden i in., 2023). W pierwszym etapie badań przeprowadzonych w publikacji nr 5, analizowano występowanie i zakres gatunków *Staphylococcus* w próbkach pobranych z dwóch obszarów ciała lisów rudych, tj. jamy ustnej i błony śluzowej odbytu. Większość pozytywnych izolacji (46,4%), pochodziła z próbek błony śluzowej jamy ustnej; a zaledwie 29% próbek pobranych z odbytu było dodatkich pod kątem obecności *Staphylococcus*. Prawie trzy czwarte tych szczepów (81,4%) należało do CoPS (wynik istotnie statystyczny). Dlatego też niniejsze badania potwierdziły również u lisów rudych, że w badaniach przesiewowych dotyczących izolacji *Staphylococcus* znacznie bardziej wskazane jest pobieranie próbek z jamy ustnej niż z odbytu. Wyniki badań potwierdziły również dominujący profil gatunkowy *Staphylococcus* u lisów rudych. Badania Nowakiewicz i in., 2016 również wykazały, że 60% tych zwierząt było skolonizowanych przez *S. pseudintermedius*. Z drugiej strony, obecne wyniki nie wskazują na statystycznie istotne różnice w częstości izolacji *S. pseudintermedius* między próbkami pobranymi z jamy ustnej i odbytu. Podobnie, dane przedstawione przez Paula i in. (2012) oraz Rubina i Chirino-Trejo (2011) w badaniach na psach wskazywały na porównywalny stopień kolonizacji gardła i odbytnicy przez *S. pseudintermedius*. Należy podkreślić, iż pomimo, że gatunek ten dominuje u psowatych, jest coraz częściej izolowany również od ludzi (Carroll i in., 2021). Jednakże bakterie te są izolowane tylko od pacjentów z obniżoną odpornością i współistniejącymi chorobami metabolicznymi (Yarbrough i in., 2018), podczas gdy zdrowi ludzie, którzy mają codzienny kontakt z psami (właściciele, lekarze weterynarii, hodowcy i inny personel weterynaryjny) są zazwyczaj kolonizowani przez ten gatunek jedynie tymczasowo (Carroll i in., 2021). *S. aureus* został wykazany jako drugi co do liczebności wśród gatunków *Staphylococcus,* kolonizujących lisa rudego. Jest on obecny u wielu gatunków zwierząt i istnieje wiele doniesień literaturowych na temat występowania

i znaczenia epidemiologicznego tego gatunku również u zwierząt wolno żyjących (Abdullahi i in., 2021; Heaton i in., 2020; Martínez-Seijas i in., 2023). W zależności od gatunku zwierzęcia i protokołu izolacji, częstość występowania *S. aureus* waha się od 0% do nawet ponad 90% (Feßler i in., 2018; Heaton i in., 2020; Martínez-Seijas i in., 2023; Monecke i in., 2016). Jednak w przypadku lisa rudego liczba publikacji na temat występowania i charakterystyki *S. aureus* jest ograniczona (Heaton i in., 2020; Monecke i in., 2016; Nowakiewicz i in., 2016; O'Hagan i in., 2021) dlatego uzyskane dane stanowią cenne uzupełnienie dotychczasowych informacji w zakresie prewalencji i zróżnicowania profili gatunkowych *Staphylococcus* występujących u lisa rudego.

Profile lekowrażliwości szczepów *Staphylococcus* izolowanych od różnych gatunków zwierząt

Zwierzęta gospodarskie (owce)

U zwierząt gospodarskich (owiec) zostały przeprowadzone dwa typy analiz porównawczych w odniesieniud do dwóch ras tych zwierząt (Uhruska i Świniarka). W publikacji nr 2 badania były skoncentrowane przede wszystkim na analizie profili lekowrażliwości *S. aureus* izolowanych z różnych miejsc i w różnych okresie przed i poporodowym, natomiast w publikacji nr 1 analizowano lekowrażliwość szczepów *Staphylococcus* spp. izolowanych wyłącznie z mleka. Jak wskazano wcześniej, rodzaj *Staphylococcus* jest izolowany w 70% przypadkach klinicznego mastitis owiec (przy czym najczęściej zgłaszanym gatunkiem jest *S. aureus*) ale jednocześnie stanowi jeden z głównych składników mikrobioty skóry i błon śluzowych tych zwierząt (Vasileiou i in., 2019). Połączenie wysokiego poziomu oporności na antybiotyki i bogatego zestawu czynników wirulencji sprawia, że *S. aureus* oraz inne gatunki izolowane od owiec i ich mleka stanowi zagrożenie dla zdrowia publicznego. Badania wykazały stosunkowo wysoki poziom lekooporności wśród wyizolowanych szczepów, z najwyższym poziomem oporności na klindamycynę, erytromycynę, tetracyklinę i penicylinę, co było zgodne z profilem oporności opisywanym przez innych autorów (Roșu i in., 2025; Papadopoulos i in., 2019). W przypadku szczepów *S. aureus* izolowanych z różnych miejsc, 46,6% z nich spełniało kryteria oporności wielolekowej. Z kolei oporność fenotypową na co najmniej jeden środek przeciwdrobnoustrojowy odnotowano aż u 88,6% wyizolowanych szczepów z mleka (publikacja nr 1). Spośród

wszystkich izolatów, tylko cztery szczepy *S. aureus* (wyizolowane od owiec rasy Świniarka) były wrażliwe na wszystkie badane środki przeciwdrobnoustrojowe, również u owiec tej rasy zaobserwowano tylko jeden szczep MDR. Natomiast izolaty pochodzące z mleka od owiec rasy Uhruska były oporne i aż siedem z nich (43% wszystkich izolatów UHR) zarówno z grupy CoNS, jak i należących do *S. aureus* zostało zaliczonych do grupy szczepów MDR. Z jednej strony, wysoki ogólny poziom lekooporności może być związany z częstym stosowaniem penicylin, tetracyklin i aminoglikozydów w stadach owiec podczas leczenia zapalenia wymion, zapalenia płuc lub biegunki u jagniąt, co sprzyja rozwojowi presji selekcyjnej (Lianou i in., 2022). Z drugiej zaś zaobserwowano pewne zróżnicowanie w zależności od ras owiec. W przypadku oporności na tetracyklinę i chloramfenikol zaobserwowano statystycznie istotnie wyższą oporność u izolatów pochodzących od owiec rasy UHR w porównaniu ze zwierzętami rasy Świniarka. Podobną zależność odnotowano również w przypadku genów oporności na te antybiotyki, tj. odpowiednio *cat* (pC194) i *tet*L występowały statystycznie istotnie częściej u izolatów od owiec UHR w porównaniu ze zwierzętami rasy Świniarka. Wyniki te pozwalają sformowanie hipotezy, że bardziej prymitywna rasa (SW) owiec może być bardziej odporna na kolonizację wymienia przez *Staphylococcus*. Ze względu na niższą częstość występowania chorób rzadziej wymaga ona terapii celowanej, co wiąże się ze znacznie niższym odsetkiem szczepów opornych i wielolekoopornych zasiedlających gruczoł mlekowy tych zwierząt. Jednakże odsetek dodatnich izolatów *Staphylococcus* u obu ras zwierząt był podobny (SW 55% vs. UHR 45%). Analiza profili lekooporności szczepów *S. aureus* izolowanych od owiec wykazała również wysoki odsetek szczepów opornych na gentamycynę, przekraczający 20%, co może z kolei wynikać ze stosowania kanamycyny u zwierząt, która może indukować oporność krzyżową na inne aminoglikozydy poza streptomycyną. Obecność genu *acc*(6')-Ie-, kodującego dwufunkcyjny enzym, który inaktywuje gentamycynę, kanamycynę, tobramycynę, netilmycynę i amikacynę poprzez fosforylację i/lub acetylację (Brdová i in., 2024), potwierdzono w siedmiu z 25 izolatów opornych na gentamycynę. Wysoki poziom oporności fenotypowej na erytromycynę i klindamycynę jest bardzo powszechny, podobnie jak w niniejszych badaniach, i zazwyczaj wiąże się z obecnością enzymów, które nadają oporność indukowaną lub konstytutywną na antybiotyki MLS_B (makrolidy, linkozamidy, sptreptograminy B) (Prabhu i in., 2011). Jednak w niniejszym badaniu tylko sześć szczepów wykazało obecność genu *erm*B, co wskazuje na konstytutywną oporność na antybiotyki MLS_B, a trzy szczepy wykazywały inny mechanizm: obecność genu *msr*A kodującego mechanizm aktywnego usuwania makrolidów, również powszechny u szczepów

Staphylococcus (Ojo i in., 2006). W przypadku szczepów izolowanych z mleka owczego również został przeanalizowany identyczny panel genów, niemniej jednak, pomimo wysokiego odsetka szczepów opornych na erytromycynę i linkomycynę (odpowiednio 31,4% i 25,7%), tylko dwa szczepy wykazały obecność genów *erm*, co można wytłumaczyć obecnością licznych innych mechanizmów kodujących ten typ oporności. Pomimo, że oporność MLS*B* jest najczęstszym mechanizmem oporności raportowanym u bakterii z rodzaju *Staphylococcus*; jednak może być związana z obecnością ponad 90 różnych genów (Loncaric i in., 2019). Jednocześnie tylko jeden szczep oporny na erytromycynę izolowany z mleka, wykazał obecność genu *msr*A kodującego oporność typu MS_B. Fenotypowa oporność na tetracyklinę wśród izolatów pochodzących z mleka owiec była dość wysoka, tj. na poziomie 40%, podobnie jak w badaniach innych autorów (Fragkou i in., 2007). Podobnie wysoki odsetek oporności na ten antybiotyk (ponad 46%) zaobserwowano również wśród szczepów *S. aureus* izolowanych z różnych miejsc (publikacja nr 2) Tetracyklina jest antybiotykiem o szerokim spektrum działania, stosowanym od ponad 80 lat; dlatego oporność na nią jest powszechna u różnych gatunków mikroorganizmów, w tym *Staphylococcus* izolowanych od zwierząt domowych, gospodarskich i wolno żyjących (Gharsa i in., 2012). U szczepów izolowanych z mleka, dominującym genem odpowiedzialnym za oporność na tetracyklinę był *tet*L, obecny zarówno w szczepach *S. aureus*, jak i CoNS u 25,7%. Z kolei u szczepów *S. aureus* izolowanych z różnych miejsc to gen *tet*K przenoszony przez plazmid jest najczęściej występującym genem oporności na tetracyklinę. Geny *tet*K i *tet*L kodują pompę efluksową, natomiast gen *tet*M, rzadziej występujący wśród *S. aureus*, koduje inny mechanizm oporności związany z blokowaniem możliwości wiązania antybiotyku do rybosomów (Jung i in., 2022) i, w przeciwieństwie do pozostałych genów wymienionych powyżej, odpowiada również za oporność na minocyklinę i doksycyklinę (Trzcinski i in., 2000). W badaniu, w którym zostały przeanalizowane wyłącznie szczepy wyizolowane z mleka owczego, gen *tet*M występował tylko w szczepach CoNS. Gen *tet*M, jak wskazują inni autorzy, jest związany głównie z gatunkiem *S. xylosus* (Jung i in., 2022), co również potwierdziły również wyniki badań własnych. Ze względu na swoją mobilność, rozprzestrzenia się dość łatwo między szczepami nawet bez presji selekcyjnej, determinując wysoki poziom oporności na tetracyklinę, również wśród innych poza *Stahylococcus* rodzajów bakterii Gram-dodatnich, jak np. *Enterococcus.* Należy również wskazać, że możliwe jest jednoczesne występowanie co najmniej dwóch różnych genów *tet* u tego samego szczepu. Jeśli kodują one dwa różne mechanizmy oporności, mogą potencjalnie dawać efekt synergistyczny związany ze

zmniejszeniem strefy zahamowania lub wzrostem wartości MIC (Trzcinski i in., 2000). Dość interesujący wydaje się fakt, że fenotypową oporność na fenikole zaobserwowano u ponad 17% izolatów pochodzących z mleka, ale tylko u gatunków *S. aureus*. Co więcej, wykazano obecność jednego lub dwóch genów oporności na chloramfenikol w dwóch szczepach CoNS, podczas gdy ich ekspresji nie zaobserwowano. Oporność na chloramfenikol jest zjawiskiem nieoczekiwanym, ponieważ lek ten nie jest zatwierdzony do stosowania u zwierząt i ludzi ze względu na swoją toksyczność; dlatego niektórzy badacze albo w ogóle nie analizują tego typu oporności (Leroy i in., 2019), albo nie wykazują jej ekspresji (Wesołowska i in., 2023). Oba geny kodują produkcję acetylotransferaz typu A i są zlokalizowane na plazmidach (*p221* i *p194*), co gwarantuje ich szybkie rozprzestrzenianie się. Mogą występować pojedynczo na plazmidach, ale często współwystępują z innymi genami kodującymi oporność na streptomycynę lub makrolidy lub stanowią część plazmidu wieloopornościowego, co może częściowo wyjaśniać fenotypową i genetyczną oporność na chloramfenikol obserwowaną w niniejszych badaniach, mimo że lek ten nie był stosowany u zwierząt. Z kolei w przypadku szczepów *S. aureus* izolowanych z różnych miejsc oporność na fenikole była zdecydowanie niższa i tylko u trzech z siedmiu szczepów opornych na chloramfenikol wykazano obecność genu *cat* kodującego acetylotransferazę. Pomimo zakazu stosowania niefluorowanych fenikoli u zwierząt, geny kodujące acetylotransferazę są dość powszechne wśród szczepów *Staphylococcus* i *Enterococcus* u zwierząt hodowlanych i wolno żyjących ze względu na ich łatwość rozprzestrzeniania się (Nowakiewicz i in., 2016; Mascaro i in., 2019). W przypadku oporności na penicylinę, tylko połowa, a nawet mniejsza część szczepów opornych fenotypowo na penicylinę posiadała gen *blaZ*, najczęściej odpowiedzialny za oporność i za produkcję penicylinazy. Wykazano jednak, że obecnie istnieje szereg innych mechanizmów związanych z opornością na β-laktamy (Brdová i in., 2024), w związku z tym korelacja między występowaniem najczęściej występujących genów a opornością fenotypową na tę grupę antybiotyków może być niska. Chociaż gatunki CoNS były przez długi czas uważane za mniej wirulentne, wielu badaczy uważa je za naturalny rezerwuar różnych mechanizmów oporności przekazywanych drogą wymiany poziomej (Abdullahi i in., 2024). W przypadku izolatów pochodzących z mleka badanych owiec potwierdzono tę obserwację, poprzez wykazanie obecności licznych genów oporności na: tetracykliny, aminoglikozydy, makrolidy i chloramfenikol w wielu szczepach CoNS. Co ciekawe, gen kodujący *aph*(3')-IIIa (kodowaną na plazmidzie fosfotransferazę aminoglikozydową) i odpowiedzialny za oporność na kanamycynę i neomycynę (Giacinti i in., 2017) był również dominujący u szczepów CoNS. Chociaż dominacja ta nie była

statystycznie istotna, wyniki te mogą potwierdzać istotną rolę szczepów CoNS jako rezerwuarów genów oporności przekazywanych horyzontalnie. Ponieważ nie określono fenotypowej oporności na kanamycynę i neomycynę, nie wiadomo, czy obecność genu *aph*(3)-IIIa koreluje z fenotypową ekspresją oporności na te leki przeciwdrobnoustrojowe, zwłaszcza w szczepach CoNS, ponieważ cztery szczepy należące do tej grupy wykazywały również obecność innych genów oporności odpowiedzialnych za niewrażliwość na tetracyklinę, chloramfenikol i aminoglikozydy, w tym gentamycynę (*tet*L, *tet*M, *cat* (pC194), *acc*(6')-Ie-), ale bez ich fenotypowej ekspresji. Zjawiska tego nie zaobserwowano w żadnym ze szczepów *S. aureus.*

Zwierzęta towarzyszące (psy i koty)

Ponieważ koagulazododatnie gatunki *Staphylococcus* u zwierząt towarzyszących mają największe znaczenie epidemiologiczne, dalsza analiza została ograniczona do gatunków *S. aureus* i *S. pseudintermedius*. W przypadku badań przeprowadzonych w publikacji nr 4, większość koagulazododatnich szczepów pochodziła od psów, zatem wszystkie oporne izolaty pochodziły od tego gatunku zwierząt. Zaobserwowano bardzo wysoki odsetek oporności fenotypowej na powszechnie stosowane antybiotyki i podobnie jak w przypadku szczepów izolowanych od owiec były to β-laktamy, tetracyklinę, klindamycynę i erytromycynę. Odsetek oporności wahał się od 80 do 60% w zależności od antybiotyku, co jest związane z powszechnym stosowaniem tych grup antybiotyków u psów, zwłaszcza β-laktamów (Caneschi i in. 2023). Dla większości klas antybiotyków nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w poziomie oporności między *S. aureus* a *S. pseudintermedius*; jedynie oporność u *S. pseudintermedius* była istotnie wyższa niż u *S. aureus* w przypadku sulfametoksazolu/trimetoprimu. Wysoki poziom oporności na poszczególne antybiotyki przełożył się również na odsetek oporności wielolekowej, który u obu gatunków wynosił 60-70%, chociaż ponownie nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic między nimi. Wynik ten nie jest zaskakujący, ponieważ szczepy obu gatunków pochodziły od tych samych zwierząt i były poddane tej samej presji selekcyjnej. Należy również zauważyć, że oporność fenotypowa często zbiegała się z obecnością najpowszechniej notowanych u *Staphylococcus* genów oporności. Wśród szczepów *S. pseudintermedius* został wykazany znacznie bogatszy panel genów (statystycznie istotnie wyższy poziom), w tym *bla*Z, *msr*A, *erm*B, *tet*M i *aac*(6′)-Ie-aph(2″)), które, z wyjątkiem

*bla*Z, były obecne tylko u *S. pseudintermedius*. Obecność *erm*B, *erm*C, *aph*(3)-IIIa i *fus*B również zaobserwowano tylko u tego gatunku. Podobne wyniki uzyskali Miszczak i in. 2025, chociaż w tym badaniu nie określono istotności statystycznej różnic między opornością *S. aureus* i *S. pseudintermedius*. Warto podkreślić, że gen *fus*B zależny od plazmidu, warunkujący oporność na fusydany, został wykryty u trzech szczepów *S. pseudintermedius*. Ze względu na bardzo wąskie spektrum działania, fusydany są stosowane głównie u ludzi w leczeniu zakażeń metycylinoopornymi szczepami *S. aureus*. Generalnie, nawet wśród szczepów MRSA izolowanych od ludzi, oporność na fusydany jest dość niska i nie przekracza kilku procent (Zhao i in., 2021), podczas gdy w badaniach własnych aż dwa szczepy *fus*B-dodatnie należały do MRSP, co wydaje się być zjawiskiem dość niepokojącym. Kolejnym godnym uwagi faktem jest obecność genu *aac*(6′)-Ie-aph(2″)), kodującego enzym modyfikujący aminoglikozydy, na poziomie aż 24% wśród szczepów *S. pseudintermedius*. Gen ten odpowiada za inaktywację bardzo szerokiej gamy aminoglikozydów, w tym gentamycyny, kanamycyny, tobramycyny, netilmycyny i amikacyny. Są one szeroko stosowane zarówno w medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej, a oporność na te antybiotyki znacząco ogranicza możliwości terapeutyczne, w tym zniesienie efektu synergistycznego w przypadku stosowania w skojarzeniu z β-laktamami i wieloma innymi lekami (Wang i in. 2022).

Zwierzęta wolno żyjące (lisy rude)

Ponieważ zwierzęta wolno żyjące nie są poddawane celowanej terapii, zjawiskiem spodziewanym był znacznie niższy odsetek izolatów lekoopornych w porównaniu do zwierząt towarzyszących i gospodarskich. Jednak pomimo zastosowania standardowej metody selekcji szczepów do dalszej analizy (losowo wybrany szczep z każdej dodatniej próbki o typowej morfologii uzyskanej na podłożu odżywczym bez suplementacji antybiotyków), tylko połowa koagulazododatnich izolatów *Staphylococcus* wykazywała fenotypową wrażliwość na wszystkie testowane leki przeciwdrobnoustrojowe. Jednocześnie wykazano tylko cztery szczepy spełniające kryterium lekooporności zaproponowane przez Magiorakos i in. (2012). Niemniej jednak wyniki uzyskane w niniejszym badaniu potwierdziły, że oporność na penicylinę, tetracyklinę, makrolidy i klindamycynę jest to najczęstsze typy oporności wśród szczepów izolowanych od lisów rudych. Co więcej, ogólnoświatowe raporty dotyczące lekooporności (Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa

Żywności, Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób, 2022; Nielsen i in., 2020) potwierdzają ten sam profil dla szczepów izolowanych również od człowieka, innych gatunków zwierząt i ze środowiska. Z drugiej zaś strony badania własne nie wykazały oporności na fluorochinolony, fenikole, oksazolidynony metycylinę u żadnego z badanych szczepów, a jedynie pojedyncze izolaty wykazywały oporność lub średnią wrażliwość na ryfampicynę, streptograminy i nitrofurantoinę. Wyniki te są porównywalne z wynikami innych autorów dotyczącymi zwierząt wolno żyjących, ponieważ odnotowano jedynie pojedyncze przypadki oporności *S. aureus* na te środki przeciwdrobnoustrojowe u szczurów i innych gryzoni, jeży, dzików i niektórych naczelnych innych niż człowiek (Himsworth i in., 2014; Monecke i in., 2016; Sousa i in., 2017; Roberts i in., 2018). Koagulazododatnie gatunki *Staphylococcus*, izolowane od lisów rudych w badaniach własnych, charakteryzowały się natomiast się dość specyficznym profilem oporności wskazującym na pewną korelację między tymże profilem a gatunkiem szczepu. Wykazano, iż oporność na penicylinę była dominującym typem oporności fenotypowej szczepów *S. aureus*, co w większości przypadków zostało potwierdzone również obecnością genu *bla*Z, podczas gdy oporność na tetracyklinę dominowała zarówno fenotypowo, jak i genotypowo wśród izolatów *S. pseudintermedius*. Oporność na tetracyklinę została potwierdzona dominującą obecnością genu *tet*M, ale w trzech przypadkach wykazano również obecność genu *tet*K, który odpowiada za oporność na tetracyklinę, ale jak wskazano powyżej, działa poprzez inny mechanizm (Grossman, 2016). Co ciekawe, w badaniach własnych oraz innych autorów wykazano, iż u szczepów izolowanych od zwierząt towarzyszących (głównie *S. pseudintermedius*), oporność na penicylinę generalnie przeważała, a oporność na tetracyklinę była zazwyczaj znacznie mniej rozpowszechniona (Ruzauskas i in., 2016; Bierowiec i in., 2021; Glajzner i in., 2023). Tak wysoki poziom oporności na tetracyklinę wśród szczepów izolowanych od lisów rudych może być związany z faktem, że w Polsce nadal prowadzi się doustne szczepienia przeciwko wściekliźnie, a skuteczność szczepionki ocenia się u zwierząt wolno żyjących (w tym lisów rudych) poprzez monitorowanie odkładania się tetracykliny w kościach zwierząt (ponieważ szczepionka jest znakowana tetracykliną). Fluorescencja obserwowana w wycinkach kości zwierząt poddanych obowiązkowemu monitoringowi dowodzi, że szczepionka została skutecznie podana. Ponieważ wiele zwierząt wolno żyjących jest narażonych na bezpośrednią ekspozycję na tetracyklinę, odsetek szczepów *S. pseudintermedius* opornych na tetracyklinę był w tym badaniu również wysoki. Aby jednak wyjaśnić dokładny mechanizm genezy tego zjawiska, zaobserwowanego tylko w przypadku *S. pseudintermedius* kolonizującego lisy, należałoby

przeprowadzić dalsze badania porównawcze i przeanalizować więcej niż jeden izolat *Staphylococcus* pochodzący od danego zwierzęcia pod kątem obecności tetracykliny w wycinkach jego kości. Dodatkową obserwacją wartą odnotowania w badaniach własnych jest obecność niektórych genów oporności (kodujących oporność na aminoglikozydy i makrolidy) w szczepach, które nie wykazywały ekspresji fenotypowej, np. genu *msr*A, który odpowiada za kodowanie mechanizmu pompy efflux (makrolidy i streptograminy) i genu *aac*(6′)-Ie/aph (2″), który z kolei jest odpowiedzialny za produkcję enzymów dotyczących oporności na większość aminoglikozydów z wyjątkiem streptomycyny (Hauschild i in., 2007). Jest bardzo prawdopodobnym, że szczepy te charakteryzują się zmniejszoną wrażliwością, niewykrywalną metodą dyfuzjno-krążkową, którą zastosowano w badaniach własnych lub z powodu mutacji (np. przesunięcia ramki odczytu), geny te nie uległy ekspresji funkcjonalnej (Hauschild i in., 2007). Z drugiej strony, brak genetycznego potwierdzenia fenotypowej oporności na makrolidy i/lub klindamycynę, a także gentamycynę u innych szczepów, może być związany z występowaniem innych, rzadszych mechanizmów oporności (Miklasińska-Majdanik i in., 2021).

Oporność na metycylinę

Zwierzęta gospodarskie (owce)

Jako szczepy metycylinooporne uznano te, które cechowała obecność genu lub genów *mec* ale niekoniecznie towarzyszyła im ekspresja tych genów w postaci fenotypowej oporność na oksacylinę. W przypadku szczepów *Staphylococcus* izolowanych z mleka owczego, pomimo, iż 12 szczepów prezentowało fenotypową oporność na oksacylinę wykazano tylko cztery szczepy, cechujące się obecnością genów *mec*C, w tym tylko jeden z nich należał do gatunku *S. aureus*, natomiast pozostałe należały do grupy CoNS. Z kolei w przypadku szczepów *S. aureus* izolowanych z różnych miejsc (publikacja nr 2) zaobserwowano bardziej złożoną sytuację, ponieważ spośród pięciu szczepów fenotypowo opornych na oksacylinę, obecność genów *mec*A i/lub *mec*C wykazano tylko u dwóch. Natomiast trzy inne szczepy wykazujące fenotypową oporność jedynie na penicylinę, a nie cefoksytynę, cechowała obecność genu/genów *mec*, klasyfikując je jako MRSA, pomimo braku ekspresji tychże genów.

Obecnie szczepy MRSA stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego, a odsetek ich występowania u zwierząt gospodarskich znacznie wzrósł w ostatnich latach, stanowiąc źródło zakażenia dla ludzi (Aubry i in., 2020). Szczepy MRSA, będąc przyczyną subklinicznej postaci mastitis, są wydalane z mlekiem i stanowią potencjalne źródło zakażenia dla konsumentów surowego mleka lub produktów mlecznych wytwarzanych z mleka nieprzetworzonego (Aubry i in., 2020). W badaniach własnych częstość występowania szczepów MRSA w badanej grupie zwierząt wyniosła 4,9% w przypadku *S. aureus* izolowanych z różnych miejsc (publikacja nr 2), natomiast w przypadku izolatów z mleka, obejmujących zarówno CoPS jak i CoNS wartość ta wyniosła 11,4%, przy czym szczep MRSA był tylko jeden. Częstość występowania szczepów MRSA jest dość zróżnicowana; zazwyczaj są one najczęściej odnotowywane w przypadkach mastitis (Rahbarnia i in., 2023), nawet na poziomach przekraczających 40%. Z drugiej strony, mogą one w ogóle nie występować w zakażeniach klinicznych (Kotzamanidis i in., 2021) lub stanowić bardzo niski odsetek wynoszący zaledwie 1,2% (Aubry i in., 2020) lub 0,44% (Ariza-Miguel i in., 2014). Co ciekawe, chociaż gen *mec*A jest dominującym genem determinującym MRSA, badania coraz częściej wskazują na obecność obu genów w tym samym szczepie (Idrees i in., 2023). Gen *mec*C został po raz pierwszy wykazany w 2011 roku, pojawiając się w szczepach MRSA zarówno u ludzi (Idrees i in., 2023), jak i u zwierząt, zwłaszcza u bydła (Ariza-Miguel i in., 2014). Wydaje się jednak, że występowanie lub dominacja genu *mec*C lub *mec*A w określonym stadzie, a nawet na danym obszarze, jest związana z rozprzestrzenianiem się określonego typu genu lub szczepu o określonym genotypie wśród zwierząt pozostających w bliskim kontakcie ze sobą (Abdullahi i in., 2024). Chociaż występowanie genów *mec*C w szczepach CoNS jest rzadkie, Loncariac i in. (2019) oraz Karakulska i in. (2022) również wykazali ten typ genu u niektórych gatunków *Staphylococcus* (w tym *S. xylosus*, *S. sciuri* i *S. warneri*), których źródłem były zarówno zwierzęta hodowlane, jak i wolo żyjące, co wskazuje na jego szerokie rozprzestrzenienie (Abdullahi i in., 2024). Ponadto udowodniono, że elementy genetyczne odpowiedzialne za oporność na metycylinę mogą być przenoszone między CoNS i CoPS (w tym *S. aureus*); w związku z tym CoNS może stanowić ważny rezerwuar oporności na β-laktamy (Karakulska i in., 2022). Jednak niezależnie od źródła szczepów CoNS, zwykle charakteryzują się one wysokim odsetkiem fenotypowej oporności na cefoksytynę (Parisi i in., 2016), na co wskazują również badania własne.

Badania własne pokazały również, że obecność obu genów, tj *mec*A i *mec*C u tego samego izolatu, nie wykazała efektu kumulacyjnego, ponieważ jeden szczep nie wykazywał fenotypowej oporności na oksacylinę, a u drugiego wartość MIC była równa 8 µg/ml; dlatego epidemiologiczne znaczenie zjawiska występowania obu genów wymaga dalszego wyjaśnienia.

Zwierzęta towarzyszące (psy)

W przypadku zwierząt towarzyszących, wszystkie izolaty zaklasyfikowane wstępnie jako MRSA lub MRSP, na podstawie oporności na cefoksytyne lub oksacylinę pochodziły od psów. W badanej puli 145 izolatów szczepy te stanowiły aż 27%, chociaż należy zaznaczyć, że izolaty te pochodziły łącznie od 20 psów, co stanowiło 25% badanej populacji zwierząt. Obecność genu obecności genu *mec*A nie została jednak potwierdzona u 18 szczepów z tej grupy, zatem ostatecznie jako szczepy metycylinooporne zaklasyfikowano siedem szczepów MRSA i 32 szczepy MRSP. Należy jednak ponownie podkreślić, iż istnieje wiele innych mechanizmów molekularnych, związanych z obniżoną wrażliwością na metycylinę, niezależnych od obecności genu *mec*A, szczególnie wśród szczepów *S. aureus.* Należą do nich tzw. borderline oxacillin-resistant *S. aureus*, zmodyfikowaną opornością lub z nadprodukcją lub nadekspresją genów kodujących β-lakamazy (Brdová i in. 2024). Mechanizmów tych nie analizowano w badaniach własnych. Kolonizacja na poziomie co najmniej jednej czwartej populacji zwierząt szczepami MRS (ang. methicillin resistant *Staphylococcus*) nie jest obecnie zaskakująca w świetle wyników opublikowanych przez innych autorów, którzy wykazali podobny (24%) (Viegas i in. 2022), a nawet 48% odsetek nosicielstwa szczepów MRS wśród psów i kotów (Sfaciotte i in. 2025). Odsetek ten wydaje się znacząco rosnąć w ostatnich latach w porównaniu z danymi z lat ubiegłych, notowanych w Niemczech i w Polsce (Feuer, 2025; Miszczak i in., 2025), co wyraźnie potwierdzają również badania przeprowadzone przez Sobkowich (2024) w latach 2021-2022, ilustrujące wyraźnie rosnący trend występowania MRSA i MRSP wśród zwierząt towarzyszących.

Zwierzęta wolno żyjące (lisy rude)

Z epidemiologicznego punktu widzenia obecność szczepów MRS u zwierząt wolno żyjących jest jednym z najczęściej opisywanych typów oporności (Abdullahi i in., 2021; Martínez-Seijas i in., 2023; Monecke i in., 2016). Jednak w badaniach własnych pomimo zastosowania typowych podłoży chromogennych do wykrywania szczepów opornych na metycylinę, nie wykazano takiego fenotypu. Niemniej jednak należy podkreślić, że badanie miało pewne ograniczenia związane z zastosowaniem podłoża chromogennego, które jest dedykowane wykrywaniu MRSA, a nie MRSP.

Oporność na wankomycynę

Oporność na wankomycynę analizowano z zastosowaniem metody mikrorozcieńczeń tylko u szczepów opornych na metycylinę, zatem badaniem objęto tylko szczepy pochodzące od owiec i psów. W przypadku szczepów MRSA izolowanych od owiec wykazano fenotypową oporność na wankomycynę, której poziom klasyfikował badane szczepy jako VIS (ang. vancomycin-intermediate *S. aureus*, MIC 4-8 µg/ml) lub VRS (ang. vancomycin-resistant *S. aureus*, MIC >8 µg/ml). Obecność szczepów opornych na glikopeptydy stanowi istotne wyzwanie terapeutyczne. Szczepy VRS odnotowano już u zwierząt gospodarskich, głównie w przypadkach mastitis u bydła, nawet w odsetku przekraczającym 10%, co wskazuje na postępujące rozprzestrzenianie się oporności na tę grupę leków wśród *S. aureus*, pomimo zaprzestania stosowania awoparcyny jako stymulatora wzrostu u zwierząt gospodarskich w krajach Unii Europejskiej już kilkadziesiąt lat temu (Muzammil i in., 2023; Elshebrawy i in., 2025). Ze względu na fakt, iż glikopeptydy stanowią leki ostatniej szansy wykorzystywane w terapii wysoce opornych infekcji powodowanych m. in. przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, również w przypadku szczepów opornych na metycylinę, izolowanych od psów, poszerzono panel analizy lekowrażliwości o ocenę MIC dla wankomycyny. Analiza wykazała, że 11 psów było nosicielami szczepów opornych na wankomycynę (VRS) (MIC > 8 µg/ml) lub szczepów średnio wrażliwych na wankomycynę (VIS) (MIC = 4–8 µg/ml). Niektóre zwierzęta były nosicielami więcej niż jednego szczepu o takim fenotypie, przykładowo pies nr 10 był nosicielem aż czterech szczepów VRS i VIS, należących do obu gatunków *Staphylococcus*, co może wskazywać na obecność genów odpowiedzialnych za oporność na glikopeptydy, które łatwo rozprzestrzeniają się poprzez

wymianę horyzontalną, niestety jednym z ograniczeń badań własnych był brak analizy mechanizmów genetycznych, potencjalnie odpowiedzialnych za ten fenotyp oporności. Do najczęściej występujących genów oporności na glikopeptydy, kodowanych na plazmidach, zatem łatwo przenoszonych na drodze wymiany horyzontalnej, należą geny *van*A i *van*B, dotychczas najczęściej wykazywane u bakterii z rodzaju *Enterococcus* spp. W analizie prewalencji oporności na glikopeptydy przeprowadzonej przez Miszczak i wsp. (2025) wśród szczepów *Staphylococcus* izolowanych od psów i kotów, autorzy wykazali stosunkowo wysoką częstość występowania tych genów, ze znaczną przewagą genu *van*A zarówno wśród szczepów *S. aureus* jak i *S. pseudintermedius*. Wyniki te mogą wskazywać, iż występowanie szczepów VRS i VIS u zwierząt towarzyszących stanowi realne zagrożenie dla zdrowia publicznego, szczególnie w kontekście oporności tych szczepów na metycylinę. Podczas rutynowych badań diagnostycznych w kierunku lekowrażliwości *Staphylococcus* (w szczególności *S. aureus*) u zwierząt towarzyszących, antybiotyk ten powinien być zatem uwzględniony w badanym profilu. Jedynym problemem w ocenie oporności na wankomycynę jest konieczność zastosowania metody mikrorozcieńczeń, która nie jest rutynowo stosowaną metodą do oznaczania profilu lekowrażliwości w weterynaryjnych laboratoriach diagnostycznych.

Profil genów wirulencji koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus*, izolowanych od różnych gatunków zwierząt.

Zwierzęta gospodarskie (owce)

Lekooporność koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus* izolowanych od zwierząt nie jest jedynym potencjalnym zagrożeniem dla zdrowia publicznego. O ile w przypadku izolatów pochodzących z mleka owczego tylko jeden szczep *S. aureus* wykazał obecność genu kodującego enterotoksynę SEB, pomimo stosunkowo szerokiej puli analizowanych genów wirulencji, zwłaszcza tych o charakterze superantygenów, o tyle szczepy *S. aureus* pochodzące z różnych miejsc izolacji u owiec, tj. skóry, zewnętrznego przewodu słuchowego, błon śluzowych jamy ustnej lub odbytu (Publikacja nr 2) wykazały obecność licznych genów wirulencji, choć profil tych genów był zbliżony do profilu szczepów *S. aureus* izolowanych od owiec i opisanych przez innych autorów (Sezzi i in., 2024).

U większości szczepów w badaniach własnych, dominującym genem kodującym enterotoksyny był gen *se*B, często występujący w połączeniu z *se*C lub innymi genami, w zależności od regionu geograficznego (Ünal i in., 2012; Azara i in., 2017; Achek i in., 2020; Kotzamanidis i in., 2021). Obecność szczepów enterotoksynopozytywnych, zwłaszcza w mleku owczym, ze względu na wysoką termooporność enterotoksyn, stanowi zagrożenie dla zdrowia publicznego (Sezzi i in., 2024). Co więcej, wszystkie białka kodowane przez geny *se* biorą udział w odpowiedzi immunologicznej, działając jako superantygeny i nadmiernie aktywując limfocyty T, co prowadzi do masywnego uwalniania cytokin. Gen kodujący leukotoksynę LukE-LukD był również obecny w ponad 30 przebadanych szczepów. *Luk*E-D, toksyna białkowa, która tworzy pory w błonach komórek układu odpornościowego (neutrofile, monocyty), odgrywa z kolei rolę w unikaniu odpowiedzi immunologicznej gospodarza. W przypadku szczepów *S. aureus* izolowanych od małych przeżuwaczy, podobnie jak w badaniach własnych, zazwyczaj wykrywane są tylko pojedyncze szczepy posiadające gen kodujący toksynę Panton Valentina i/lub toksynę zespołu wstrząsu toksycznego (Parco i in., 2021). Toksyna TSST, podobnie jak enterotoksyny, ma właściwości genrowania tzw. burzy cytokinowej, które leżą u podstaw procesu wywoływania zespołu wstrząsu toksycznego (Touaitia i in., 2025). Szczepy *S. aureus*, tzw. „producenci" toksyny Panton Valentine (leukocydyny) są zwykle przyczyną zakażeń tkanek miękkich, a także zakażeń zagrażających życiu i zdrowiu człowieka. Jednak w przypadku leukocydyny obserwuje się specyficzność gatunkową (efekt zabijania neutrofili przez leukocydynę dotyczy konkretnego gatunku gospodarza) (Monecke i in., 2021). Z drugiej zaś strony należy podkreślić, iż potwierdzono przypadki transmisji odzwierzęcych szczepów *S. aureus* na człowieka pprodukujących toksynę PVL (Bethe i in., 2024; Monecke i in., 2025). Ponadto, w zakażeniach szpitalnych toksyny te często stanowią tzw. markery patogenności szczepu i są powiązane głównie ze szczepami MRSA, głównie pozaszpitalnymi (ang. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, CA-MRSA) (Klein i in., 2020); dlatego w przypadku odzwierzęcych szczepów PVL-dodatnich epidemiologiczne znaczenie tych toksyn powinno zostać dokładniej zbadane.

Zatem podsumowując, w przypadku szczepów izolowanych od owiec zaobserwowano bardzo zróżnicowane profile genów wirulencji. W przypadku szczepów izolowanych z mleka, pomimo wysokiego potencjału związanego z występowaniem szerokiego panelu lekooporności, genom badanych szczepów, nie wskazywał, aby szczepy *Staphylococcus*

posiadały status patogenów przenoszonych drogą pokarmową. Podobne wyniki uzyskali Gharsa i wsp. (2011). Z kolei w niektórych badaniach, zwłaszcza dotyczących *S. aureus* izolowanego z mleka krowiego, zakres i poziom występowania genów kodujących eneterotoksyny lub toksynę wstrząsu toksycznego, a nawet toksynę Pantona Valentina, był istotnie wyższy (Greguła-Kania i in., 2023).

Zwierzęta towarzyszące (psy)

Profil genów wirulencji wśród badanych szczepów był również bogaty, podobnie jak w przypadku szczepów *S. aureus* izolowanych od owiec. Podobnie jak w przypadku izolatów pochodzących od owiec, badane szczepy *S. aureus* wykazywały wysoki odsetek genów kodujących enterotoksyny, które mogą wykazywać aktywność superantygenową i w przypadku zakażenia ogólnoustrojowego, powodować burzę cytokinową, prowadzącą do objawów wstrząsu toksycznego, w tym śmierci gospodarza (Zhang i in. 2024). Również u szczepów tych wykazano obecność genów kodujących toksynę Panton Valentin w trzech szczepach *S. aureus*. Jak wspomniano wcześniej, leukocydyna ta wykazuje powinowactwo wyłącznie do ludzkich leukocytów, dlatego szczepy PVL-dodatnie są często związane z przypadkami martwiczego zapalenia płuc oraz przewlekłymi lub nawracającymi zakażeniami tkanek miękkich i skóry (SSTI) u ludzi (Müller i in. 2025). Odpowiednikiem leukocydyny u *S. pseudintermedius* jest dwuskładnikowa toksyna *Luk* I-S i *Luk* I-F, która również cechuje się specyfiką gatunkową ale w stosunku do komórek psich, mając zdolność zabijania komórek polimorfonuklearnych poprzez tworzenie porów i lizę (Abouelkhair i in., 2018). Leukocydyna jest dość powszechna wśród szczepów *S. pseudintermedius*, zwłaszcza tych izolowanych z przypadków zakażeń (Glajzner i in. 2023, Breyer i in. 2023). Podobnie jak w badaniach opisanych przez innych autorów, szczepy *S. pseudintermedius* posiadały geny kodujące enterotoksyny SEL i SEQ (Breyer i in. 2023) oraz wariant enterotoksyny SEC, również specyficzny gatunkowo (*seC*$_{canine}$), która wraz z toksyną eksfoliatywną, kodowaną przez gen *siet* może zaostrzać objawy atopowego zapalenia skóry u psów (Yoon i in. 2010). U znacznego odsetka psów stwierdzono również obecność genu *exp*B (zwanego również *exi*B), który koduje toksynę odpowiedzialną za degradację psiej desmogleiny (Glajzner i in. 2023), powodując w ten sposób pękanie warstwy podrogowej naskórka i aktywnie uczestnicząc w patogenezie liszajca u psów (Iyori i in. 2011). W badaniach własnych wykazano również, że większość badanych szczepów *S. pseudintermedius* ma

potencjał do produkcji biofilmu (Andrade i in. 2022), ze względu na obecność genów operonu ica u ponad 80% izolatów. Podobnie, wysoki odsetek genów *epb* i *sps*E, kodujących białka zaangażowane w adhezję, tj. białko wiążące elastynę *Ebp*S, białko wiążące fibrynogen/fibronektynę *Sps*E oraz składniki A i B γ-hemolizyny (Kmieciak i Szewczyk 2017), oznacza, że szczepy *S. pseudintermedius* izolowane w badaniach własnych mimo statusu komensali, mają bardzo wysoki potencjał inwazyjny, a czynniki te mogą znacząco ułatwiać adhezję i inwazję w rozwoju potencjalnego zakażenia (Wang i in. 2022).

Zwierzęta wolno żyjące (lisy rude)

Podobnie jak w przypadku szczepów *S. aureus* pochodzących od owiec i psów, analiza obecności genów wirulencji wykazała dość bogaty profil, obejmujący geny kodujące tzw. superantygeny (SAg) odpowiedzialne za ostre i gwałtowne zakażenia u ludzi, związane, jak wspomniano wcześniej z tzw. burzą cytokinową (Tuffs i in., 2022). Ale ze względu na brak możliwości monitorowania występowania tego typu zakażeń u zwierząt, zwłaszcza wolno żyjących, nie jest do końca jasne, czy szczepy z genami kodującymi enterotoksyny (SE), leukocydynę PVL lub toksynę TSST-1 mogą powodować podobne zakażenia u zwierząt. Niemniej jednak obecność tych genów w izolatach lisa rudego może wskazywać na ten gatunek zwierząt jako potencjalny rezerwuar szczepów patogennych dla ludzi. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką przeżywalność szczepów *Staphylococcus* (w tym *S. aureus*) w środowisku i ich wysoką odporność na niekorzystne warunki, szczepy o potencjalnie wysokim potencjale zoonotycznym mogą być dość powszechne w środowisku naturalnym. Obecność co najmniej jednego genu kodującego SE zaobserwowano u >70% wszystkich *S. aureus*, podobnie jak we wcześniejszych badaniach tego samego gatunku izolowanego od lisów i innych drapieżnych gatunków wolno żyjących (Nowakiewicz i in., 2016). Jednak profil genowy uzyskany w tym badaniu różni się znacząco, ponieważ dominującemu genowi *se*B towarzyszył gen *se*C w 18,5% szczepów. Po enterotoksynie SEA, enterotoksyny SEB, SEC i SED są najczęstszymi przyczynami zatruć pokarmowych na świecie (Argudín i in., 2010; Fisher i in., 2018). Co więcej, toksyny SEB i SEC są termostabilne, a ich odporność na temperaturę lub niskie pH jest znacznie większa niż innych enterotoksyn (Rajkovic, 2016). Jak wskazano wcześniej leukocydyna Panton-Valentine jest produkowana przez bardzo niewielki odsetek szczepów *S. aureus*, a jej obecność jest uważana za marker szczepów odpowiedzialnych za choroby wysoce inwazyjne, występujące u ludzi (Shallcross

i in., 2013). Co więcej, gen kodujący PVL może zostać przeniesiony ze szczepu *S. aureus* PVL-dodatniego do szczepu *S. aureus* PVL-ujemnego poprzez konwersję fagową. Ponieważ występowanie materiału genetycznego łagodnych bakteriofagów w genomie *S. aureus* jest dość powszechne, istnieje wysokie prawdopodobieństwo indukcji profagów i możliwość dalszego rozprzestrzeniania się genów kodujących toksyny, w tym PVL (Kelly i in., 2009). Toksyny eksfoliatywne (ETA, ETB, ETD), których geny wykazano jedynie w genomie szczepów *S. aureus* pochodzących od lisów rudych, biorą udział w patogenezie zakażeń skóry u ludzi wywołanych przez *S. aureus*, takich jak gronkowcowy zespół oparzonej skóry (choroba Rittera), liszajec pęcherzowy, czyraki i ropnie (Bukowski i in., 2010).

Z pewnością ekspresja genów kodujących wskazane powyżej toksyny, zależy od wielu czynników związanych zarówno z bakteriami, jak i środowiskiem; jednak obecność szczepów z genami kodującymi SAg u zwierząt wolo żyjących może stanowić realne zagrożenie zdrowia publicznego.

Analiza molekularna w aspekcie znaczenia epidemiologicznego koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus*, izolowanych od zwierząt gospodarskich i towarzyszących

Wielolokusowa analiza sekwencji genów metabolizmu podstawowego

Zwierzęta gospodarskie (owce)

Analiza MLST zastosowana w badaniach własnych do typowania szczepów MRSA izolowanych od owiec, pozwoliła na identyfikację trzech nowych typów sekwencji (ST 9313, ST 9314, ST 9315), co wskazuje na ciągłą ewolucję w obrębie gatunku *S. aureus*. Jednocześnie w badaniach własnych wykazano obecność znanego już typu sekwencyjnego, tj. ST 1660 (n=1), który do tej pory wykazano jedynie u szczepów *S. aureus* izolowanych od koni w różnych krajach: Danii (Islam i in., 2017), Hiszpanii (Ruiz-Ripa i in., 2021) i Niemiec (Scholtzek i in., 2019; Cuny i in., 2015). Drugi, co prawda już notowany typ sekwencyjny 8420 (n=1), ale dotychczas bardzo sporadycznie występujący, ponieważ został wykryty wyłącznie w izolatach z mleka krowiego w Nowej Zelandii, (jak podano na stronie internetowej MLST https://pubmlst.org/multilocus-sequence-typing). Dotychczas typ

sekwencyjny 1660 został wykazany zarówno dla szczepów MRSA, jak i MSSA, ale źródłem tych szczepów zawsze były konie. Co ciekawe, zwierzęta objęte badaniami własnymi nie miały kontaktu z tym gatunkiem zwierząt, co potwierdza, że typowo „koński" typ sekwencji może adaptować się również do innych gatunków zwierząt lub ludzi. Należy jednak zaznaczyć, że mogła to być jedynie przejściowa kolonizacja, ponieważ szczep został wyizolowany od młodego zwierzęcia, jagnięcia o nieustabilizowanym jeszcze mikrobiomie (Huuki i in., 2024).

Zwierzęta towarzyszące (psy)

Podobnie jak w przypadku szczepów izolowanych od owiec, również w przypadku izolatów pochodzących od psów wykazano zupełnie nowe typy sekwencyjne. Należy zauważyć, że nowo zidentyfikowane szczepy ST zarówno u *S. aureus*, jak i *S. pseudintermedius* mogą świadczyć o trwającej ewolucji i wysokiej plastyczności genomów u tych gatunków, a uzyskane dane są tym cenniejsze, że obejmują szczepy oporne na metycylinę.

Wśród znanych już wcześniej, a wykazanych w badaniach własnych typów sekwencyjnych, ST398 był dominującym typem w przypadku pozostałych pięciu szczepów MRSA; wcześniej odnotowywano go wśród szczepów MRSA raczej jako kolonizującego zwierzęta gospodarskie i sporadycznie powodującego zakażenia u tych zwierząt oraz zwierząt towarzyszących (Kashif i in. 2019). Wykazano jednak również jego potencjał zoonotyczny jako czynnika etiologicznego zakażeń ogólnoustrojowych u ludzi (Aung i in. 2025). Należy również podkreślić, że dwa szczepy ST398 były dodatnie pod względem obecności genu kodującego PVL, co znacząco zwiększa ich potencjał zakaźny (Koyama i in. 2015). Z kolei ST551 wyraźnie dominował wśród szczepów *S. pseudintermedius*. Wyjątkowo wielolekooporny szczep MRSP o tym samym typie sekwencji został wykryty u psa z zapaleniem ucha zewnętrznego (Vitali i in. 2021). Wydaje się jednak, że szczepy MRSP o tym typie sekwencyjnym są szeroko rozpowszechnione w Polsce i, jak przewidywali Kizerwetter-Świda i in. (2017), ten typ sekwencyjny wyparł stopniowo dotychczas dominujący ST71 u psów, co potwierdzają również badania własne. Należy zauważyć, że szczepy ST551 posiadały bardzo bogaty panel czynników wirulencji, które mogą sprzyjać ich rozprzestrzenianiu się i kolonizacji nowych gospodarzy. Wysoki potencjał adaptacyjny tego typu sekwencyjnego potwierdza również jego powszechne występowanie nie tylko

w Europie, ale także w Afryce Południowej i USA (Robb i in. 2024). Należy podkreślić, że pozostałe dwa typy sekwencyjne zidentyfikowane w badaniach własnych, tj. ST 71 i ST45, są również alarmującymi i szeroko rozpowszechnionymi patogenami charakteryzującymi się wysoką lekoopornością i potencjałem zoonotycznym (Phophi i in. 2023).

Typowanie metodą *ADSRRS*-fingerprinting

Na wstępie należy wskazać, iż zastosowana metoda *ADSSRS*-fingerprinting jest metodą opartą o analizę całkowitego genomowego DNA, zatem zdecydowanie w swoich założeniach odbiega od wykorzystanej również metody MLST. Zastosowanie metody *ADSRRS*-fingerprinting miało na celu przede wszystkim próbę zróżnicowania szczepów potencjalnie blisko ze sobą spokrewnionych, a jednocześnie wykazanie różnic, które pojawiają się w wyniku nieustannego procesu horyzontalnej wymiany materiału genetycznego lub mutacji. Tak wysoki potencjał dyskryminacyjny metody zwykle niezbędny jest w przypadku szczepów bakteryjnych należących do tego samego gatunku i ich gospodarzy, pozostających ze sobą w bliskim kontakcie, który umożliwia ich nieustającą transmisję, tak jak obserwuje się to wprzypadku zakażeń szpitalnych. Warunki te zostały jednak również spełnione w przypadku szczepów izolowanych od owiec (zwierzęta utrzymywane w stadach), dlatego też zastosowano w badaniach niniejszą metodę celem wykazania możliwości transferu szczepów pomiędzy gospodarzami. Metodę zastosowano również do analizy epidemiologicznej koagulazododatnich i metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus*, izolowanych od psów.

Zwierzęta gospodarskie (owce)

Badania wykazały znaczną różnorodność genetyczną szczepów owczych ale przede wszystkim wykazano, że to samo zwierzę nawet bez objawów klinicznych infekcji może być skolonizowane przez kilka genetycznie zróżnicowanych szczepów *S. aureus* (np. owca nr IV rasy Uhruska została skolonizowana przez szczepy należące do siedmiu różnych profili genomowych K, U, Y, d, T, X i f), co potwierdza że odmienne od siebie szczepy należące do tego samego gatunku, mogą kolonizować nie tylko różne miejsca zwierzęcia, takie jak jama ustna, skóra czy błona śluzowa odbytu, ale nawet to samo miejsce, np. jamę

ustną. W przypadku szczepów izolowanych od owiec, w badaniach własnych potwierdzono to zjawisko nie tylko poprzez zróżnicowanie w profilach *ADSRRS*, ale także poprzez zróżnicowanie fenotypowych i genotypowych profile oporności i wirulencji szczepów pochodzących od tego samego osobnika. Ponadto, wykazano również obecność szczepów o poziomie podobieństwa co najmniej 90% u różnych osobników, co wskazuje na rozległą kolonizację krzyżową szczepami *S. aureus* między różnymi zwierzętami, ale należącymi do tego samego stada. Z drugiej strony, tylko izolaty *S. aureus* pochodzące od owiec rasy Świniarka lub tylko izolaty *S. aureus* pochodzące od owiec rasy Uhruska wykazywały ten sam profil, co potwierdza rozprzestrzenianie się szczepów *S. aureus* między różnymi osobnikami, ale tylko tej samej rasy owiec. Nie wyklucza to jednak transmisji szczepów między innymi gatunkami. Nie wykluczono również, iż ze względu na charakter i funkcję obiektu hodowli zwierząt, pełniącego funkcje badawcze i edukacyjne, badane szczepy, w tym MRSA, prawdopodobnie mogły lub mogą zostać przeniesione ze zwierzęcia na człowieka (prawdopodobnie przez personel pomocniczy) lub odwrotnie.

Zwierzęta towarzyszące (psy)

Z kolei w przypadku szczepów MRSA i MRSP izolowanych od psów, pomimo wykazania niewielkiego zróżnicowania i zidentyfikowania dziewięciu profili genotypowych z wykorzystaniem *ADSRRS*-fingerprinting w tej ostatniej grupie, nie zaobserwowano żadnej korelacji między przynależnością profilu, typem sekwencji ani profilem genów oporności lub wirulencji. Co ciekawe, wcześniejsze badania przeprowadzone dla szczepów *S. aureus* i *S. pseudintermedius* w oparciu o tę sama metodykę (Nowakiewicz i in. 2016) wykazały zróżnicowane profile elektroforetyczne; jednak ze względu na bardzo zróżnicowane źródła izolacji szczepów (zwierzęta wolno żyjące) i niewielką liczbę wykrytych genów oporności, nie analizowano takiej korelacji. W tym przypadku wytypowanie do badania jedynie szczepów MRSA i MRSP mogło spowodować, że metoda nie wykazała się oczekiwanym potencjałem różnicującym. Inną przyczyną mogło być zastosowanie innego, rzadko tnącego enzymu restrykcyjnego (BglI) niż w badaniach pierwotnych, (Krawczyk i in. 2007). Badacze wykorzystali inny enzym restrykcyjny, BamHI, co również mogło zmniejszyć zdolność do różnicowania szczepów. Wynik ten stanowi ograniczenie badania i wskazuje na potrzebę modyfikacji metody analizy szczepów MRSA lub MRSP, zwłaszcza szczepów izolowanych od tych samych zwierząt.

Jednak zróżnicowane panele genów oporności i wirulencji, wyniki badań oporności fenotypowej oraz różne typy sekwencji szczepów izolowanych od tych samych zwierząt jednoznacznie wskazują, że jeden gospodarz, w tym przypadku pies, może być źródłem szczepów różniących się pod względem oporności i wirulencji, nie tylko należących do tego samego gatunku, ale także charakteryzujących się opornością na metycylinę. Należy wskazać, że badania własne mają również pewne ograniczenia związane ze stosunkowo wąskim panelem analizowanych mechanizmów oporności, ponieważ uwzględnione zostały jedynie najczęstsze mechanizmy (geny kodujące) przekazywane drogą horyzontalnego transferu genów.

Podsumowanie

Uzyskane wyniki badań wskazują jednoznacznie na fakt, iż bez względu na gatunek gospodarza, koagulazododatnie gatunki *Staphylococcus* stanowią jeden z najistotniejszych składników mikrobioty zdrowych klinicznie zwierząt. O ile w przypadku gatunku *S. pseudintermedius* istnieje pewna specyfika gatunkowa odnośnie gospodarza, dotycząca rodziny psowatych (częstsze występowanie u psów i lisów rudych), o tyle *S. aureus* wydaje się nie podlegać żadnym ograniczeniom i jest izolowany praktycznie od każdego gatunku zwierząt i człowieka, chociaż należy zaznaczyć, że na różnym poziomie. Tak duża łatwość dostosowywania się do różnych gospodarzy niesie za sobą ogromne ryzyko transferu tych drobnoustrojów, szczególnie w przypadku tych cechujących się szerokim profilem oporności na substancje przeciwbakteryjne oraz bogatym panelem czynników wirulencji, umożliwiających szybką i skuteczną kolonizację nowych gospodarzy, a w sprzyjających warunkach również rozwój infekcji. W przypadku wspomnianego wcześniej gatunku *S. pseudintermedius,* co prawda na dzień dzisiejszy jest on bardziej wybrednym pod względem gatunku gospodarza drobnoustrojem, niemniej liczne doniesienia potwierdzające zdolność do kolonizacji a nawet wywoływania infekcji również u innych gatunków zwierząt i człowieka pozwala prognozować rozwój szybkiej adaptacji również tego gatunku *Staphylococcus* nie tylko do kolejnych gatunków gospodarzy ale także do występowania środowiskowego. Dlatego koagulazododatnie gatunki *Staphylococcus* wyposażone w niezwykle bogaty arsenał czynników adaptacyjnych oraz podlegające nieustannej ewolucji, mimo rozlicznych analiz, nadal stanowią bardzo interesujący obiekt badawczy. W badaniach własnych analizowano występowanie oraz charakterystykę

koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus* pochodzących od różnych gospodarzy zwierzęcych, począwszy od zwierząt stanowiących źródło żywności zwierzęcego pochodzenia (owce), poprzez zwierzęta towarzyszące, a skończywszy na zwierzętach wolno żyjących (lisach rudych). U wszystkich gatunków zwierząt zaobserwowano podobną predylekcję do kolonizacji błony śluzowej jamy ustnej. Jest to miejsce najczęstszego występowania tych gatunków, z którego w przypadku badań przesiewowych materiał powinien być pobierany w pierwszej kolejności. Co więcej, wykazano również iż zarówno szczepy *S. aureus* jak i *S. pseudintermedius* izolowane od tego samego osobnika mogą znacząco się od siebie różnić, zarówno pod względem metabolizmu podstawowego (zróżnicowane profile ST) jak i przystosowań do kolonizacji lub zdolności do wywoływania infekcji (zróżnicowane profile oporności i wirulencji), dlatego istotne jest aby w przypadku analiz przesiewowych pobierać do badań więcej niż jeden szczep należący do danego gatunku, ponieważ strategia taka pomoże uzyskać bardziej całościowy obraz i przekrojową charakterystykę szczepów kolonizujących dane zwierzę lub odpowiedzialnych za infekcje, szczególnie o charakterze chronicznym lub nawracającym. Ponadto tak poszerzona analiza dostarcza znacznie więcej danych, które służą do przewidywania tendencji rozwoju oporności lub opracowywania nowych strategii leczenia. Należy podkreślić, iż nawet u klinicznie zdrowych zwierząt poziom występowania koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus* jest relatywnie wysoki, co jest szczególnie istotne w przypadku próbek mleka. Wykazanie obecności wielolekoopornych szczepów lub szczepów MRSA w próbkach od zdrowych klinicznie zwierząt może wskazywać nie tylko na większe prawdopodobieństwo wywołania mastitis przy pojawieniu się czynników sprzyjających infekcji (np. obniżona aktywność układu immunologicznego gospodarza) ale również stanowić zagrożenie dla zdrowia człowieka, szczególnie w przypadku szczepów mających zdolność do produkcji enterotoksyn lub innych toksyn o działaniu tzw. superantygenów. Jak wykazały wyniki badań własnych, zdolność do produkcji enterotoksyn, toksyn eksfoliatywnych, toksyny szoku toksycznego lub leukocydyny Panton Valentina dotyczy szczepów izolowanych od wszystkich badanych gatunków zwierząt, co w połączeniu z dużym prawdopodobieństwem transferu takich szczepów na człowieka, w wyniku kontaktu bezpośredniego lub drogą pokarmową, może stanowić zagrożenie zdrowia publicznego. Ale nie tylko bogaty panel genów wirulencji determinuje to ryzyko. Jak wskazują wieloletnie badania nad różnymi gatunkami drobnoustrojów, to nie zdolność do produkcji różnego rodzaju toksyn, enzymów czy adhezyn czyni z nich tzw. superbakterie, ale posiadanie różnego rodzaju mechanizmów związanych z niewrażliwością na antybiotyki,

które umożliwiają im przeżycie mimo stosowania terapeutycznych stężeń tych leków. Według Światowej Organizacji Zdrowia to właśnie lekooporność, a właściwie wielolekooporność bakterii obejmująca również leki tzw. ostatniej szansy stanowi największe zagrożenie zdrowia publicznego. Niestety charakterystyka profili lekowrażliwości koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus*, przeprowadzona w badaniach własnych nie pozostawia wątpliwości, iż bez względu na gatunek gospodarza, poziom lekooporności, w tym również wielolekooporności już jest wysoki, nawet w przypadku szczepów izolowanych od gospodarzy, którzy nie są poddawani terapii celowanej, zatem w ich przypadku teoretycznie nie powinna istnieć presja selekcyjna determinująca lekooporność. Co więcej, w przypadku szczepów, pochodzących od wszystkich badanych gatunków zwierząt, bez względu na poziom synantropizacji i prawdopodobieństwo stosowania wcześniejszej antybiotykoterapii, mechanizmy determinujące lekooporność były takie same jak te, które najczęściej odpowiadają za lekooporność wśród *Staphylococcus* izolowanych od człowieka lub w przypadku infekcji szpitalnych. Należy również podkreślić, iż występowanie szczepów opornych na metycylinę oraz glikopeptydy u zwierząt staje się co raz częstszym zjawiskiem, co potwierdziły również wyniki badań własnych. Wskazane typy oporności w połączeniu z wielolekoopornością na inne antybiotyki o szerokim spektrum działania takie jak aminoglikozydy czy fluorochinolony są odpowiedzialne za znaczne obniżenie prawdopodobieństwa sukcesu terapeutycznego i realne zagrożenie powrotu do ery przedantybiotykowej. Zatem biorąc pod uwagę wysoki potencjał zmienności, łatwości rozprzestrzeniania się i plastyczności genomu *S. aureus* i *S. pseudintermedius*, na co wskazuje również zmieniający się profil dominujących typów sekwencyjnych, oznacza, że zarówno zwierzęta gospodarskie, towarzyszące jak i wolno żyjące stanowią rezerwuar szczepów o znaczeniu epidemiologicznym porównywalnym ze szczepami występującymi u ludzi i bez względu na gatunek gospodarza mogą stanowić istotne ogniwa w łańcuchu rozprzestrzeniania się oporności.

8. Wnioski

1. U wszystkich badanych gatunków zwierząt, wśród koagulazododatnich gatunków *Staphylococcus S. aureus* stanowi jeden z głównych składników mikrobioty jamy ustnej zdrowych klinicznie zwierząt, przy czym w przypadku zwierząt z rodziny Canidae (psów i lisów rudych), gatunkiem dominującym jest *S. pseudintermedius.*
2. Poziom kolonizacji (*S. aureus*) wzrasta w czasie ciąży u owiec i jest on dodatnio skorelowany z aktywnością układu odpornościowego, o czym świadczą statystycznie istotnie wyższe poziomy ekspresji IL-6 i Hp u nosicieli *S. aureus*.
3. Ten sam gospodarz, bez względu na gatunek i rasę może być nosicielem kilku odmiennych pod względem oporności i wirulencji szczepów tego samego gatunku *Staphylococcus*, tj. *S.aureus* lub *S. pseudintermedius.*
4. Profile genów wirulencji i mechanizmy oporności występujące wśród szczepów *S. aureus* izolowanych od różnych gatunków gospodarzy są bardzo zbliżone lub takie same jak w przypadku szczepów izolowanych od człowieka.
5. Powtarzający się, fenotypowy profil lekooporności koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus* izolowanych od wszystkich badanych gatunków gospodarzy jest taki sam i obejmuje przede wszystkim oporność na penicyliny, makrolidy, linkozamidy i tetracykliny, co znajduje również potwierdzenie w podobnym profilu genów najczęściej odpowiedzialnych za tę oporność, tj. *bla*Z, *erm*B, *msr*A i *tet*K.
6. Wielolekooporność i oporność na metycylinę oraz wankomycynę staje się zjawiskiem powszechnym wśród szczepów *S. aureus* izolowanych od zwierząt towarzyszących i gospodarskich, co może stanowić potencjalne zagrożenie zdrowia publicznego.
7. Wykazanie zupełnie nowych typów sekwencyjnych oraz zmian w profilu do niedawna dominujących ST u *S. aureus* i *S.pseudintermedius*, potwierdza dużą dynamikę zmienności tych bakterii i wysoką zdolność do przystosowywania się do nowych gatunków gospodarzy.
8. Istnieje uzasadniona potrzeba pełnego monitoringu i opracowania bardzo restrykcyjnych protokołów dotyczących stosowania określonych grup środków przeciwdrobnoustrojowych w medycynie weterynaryjnej nie tylko w przypadku

zwierząt stanowiących źródło żywności zwierzęcego pochodzenia, ale także zwierząt towarzyszących i wolno żyjących.

9. Bibliografia

1.Abdelmegid S, Murugaiyan J, Abo-Ismail M, Caswell JL, Kelton D, Kirby GM. Identification of Host Defense-Related Proteins Using Label-Free Quantitative Proteomic Analysis of Milk Whey from Cows with Staphylococcus aureus Subclinical Mastitis. Int J Mol Sci. 2017 Dec 28;19(1):78. doi: 10.3390/ijms19010078. PMID: 29283389; PMCID: PMC5796028.

2.Abdullahi IN, Latorre-Fernández J, Reuben RC, Trabelsi I, González-Azcona C, Arfaoui A, Usman Y, Lozano C, Zarazaga M, Torres C. Beyond the Wild MRSA: Genetic Features and Phylogenomic Review of *mecC*-Mediated Methicillin Resistance in Non-*aureus* Staphylococci and Mammaliicocci. Microorganisms. 2023 Dec 29;12(1):66. doi: 10.3390/microorganisms12010066. PMID: 38257893; PMCID: PMC10818522.

3.Abdullahi IN, Lozano C, González-Azcona C, Zarazaga M, Torres C. Genetic Diversification and Resistome of Coagulase-Negative Staphylococci from Nostrils of Healthy Dogs and Dog-Owners in La Rioja, Spain. Pathogens. 2024 Mar 5;13(3):229. doi: 10.3390/pathogens13030229. PMID: 38535572; PMCID: PMC10974962.

4.Abdullahi IN, Fernández-Fernández R, Juárez-Fernández G, Martínez-Álvarez S, Eguizábal P, Zarazaga M, Lozano C, Torres C. Wild Animals Are Reservoirs and Sentinels of *Staphylococcus aureus* and MRSA Clones: A Problem with "One Health" Concern. Antibiotics (Basel). 2021 Dec 20;10(12):1556. doi: 10.3390/antibiotics10121556. PMID: 34943768; PMCID: PMC8698730.

*5.*Abdullahi, I.N., Zarazaga, M., Campańa-Burguet, A., Eguizábal, P., Lozano, C., Torres, C., 2022. Nasal *Staphylococcus aureus* and *S. pseudintermedius* carriage in healthy dogs and cats: a systematic review of their antibiotic resistance, virulence and genetic lineages of zoonotic relevance. J. Appl. Microbiol. 133, 3368–3390. doi: 10.1111/jam.15803.

6.Aubry T, Bloch G, Brcic V, Saad A, Magwood O, Abdalla T, Alkhateeb Q, Xie E, Mathew C, Hannigan T, Costello C, Thavorn K, Stergiopoulos V, Tugwell P, Pottie K. Effectiveness of permanent supportive housing and income assistance interventions for homeless individuals in high-income countries: a systematic review. Lancet Public Health. 2020 Jun;5(6):e342-e360. doi: 10.1016/S2468-2667(20)30055-4. PMID: 32504587.

7. Abouelkhair MA, Bemis DA, Giannone RJ, Frank LA, Kania SA. Characterization of a leukocidin identified in Staphylococcus pseudintermedius. PLoS One. 2018 Sep 27;13(9):e0204450. doi: 10.1371/journal.pone.0204450. PMID: 30261001; PMCID: PMC6160070.

8. Achek R, El-Adawy H, Hotzel H, Tomaso H, Ehricht R, Hamdi TM, Azzi O, Monecke S. Short communication: Diversity of staphylococci isolated from sheep mastitis in northern Algeria. J Dairy Sci. 2020 Jan;103(1):890-897. doi: 10.3168/jds.2019-16583. Epub 2019 Nov 14. PMID: 31733855.

9. Agabou A, Ouchenane Z, Ngba Essebe C, Khemissi S, Chehboub MTE, Chehboub IB, Sotto A, Dunyach-Remy C, Lavigne JP. Emergence of Nasal Carriage of ST80 and ST152 PVL+ Staphylococcus aureus Isolates from Livestock in Algeria. Toxins (Basel). 2017 Sep 25;9(10):303. doi: 10.3390/toxins9100303. PMID: 28946704; PMCID: PMC5666350.

10. Albenzio M, Figliola L, Caroprese M, Marino R, Sevi A, Santillo A. Somatic cell count in sheep milk. Small Ruminant Res. 2019; 176, 24–30. doi:10.1016/j.smallrumres.2019.05.013

11. Andrade M, Oliveira K, Morais C, Abrantes P, Pomba C, Rosato AE, Couto I, Costa SS. Virulence Potential of Biofilm-Producing *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus coagulans* Causing Skin Infections in Companion Animals. Antibiotics (Basel). 2022 Sep 30;11(10):1339. doi: 10.3390/antibiotics11101339. PMID: 36289997; PMCID: PMC9598800.

12. Argudín MÁ, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. Toxins (Basel). 2010 Jul;2(7):1751-73. doi: 10.3390/toxins2071751. Epub 2010 Jul 5. PMID: 22069659; PMCID: PMC3153270.

13. Ariza-Miguel J, Hernández M, Fernández-Natal I, Rodríguez-Lázaro D. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus harboring mecC in livestock in Spain. J Clin Microbiol. 2014 Nov;52(11):4067-9. doi: 10.1128/JCM.01815-14. Epub 2014 Sep 3. PMID: 25187631; PMCID: PMC4313255.

14. Aslam B, Khurshid M, Arshad MI, Muzammil S, Rasool M, Yasmeen N, Shah T, Chaudhry TH, Rasool MH, Shahid A, Xueshan X, Baloch Z. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. Front Cell Infect Microbiol. 2021 Nov 25;11:771510. doi: 10.3389/fcimb.2021.771510. Erratum in: Front Cell Infect

Microbiol. 2024 Sep 25;14:1488430. doi: 10.3389/fcimb.2024.1488430. PMID: 34900756; PMCID: PMC8656695.

15. Aung MS, Osada M, Urushibara N, Kawaguchiya M, Ohashi N, Hirose M, Ito M, Yamada K, Tada K, Kobayashi N. Molecular characterization of methicillin-susceptible/resistant Staphylococcus aureus from bloodstream infections in northern Japan: The dominance of CC1-MRSA-IV, the emergence of human-associated ST398 and livestock-associated CC20 and CC97 MSSA. J Glob Antimicrob Resist. 2025 Mar;41:77-87. doi: 10.1016/j.jgar.2024.12.010. Epub 2024 Dec 24. PMID: 39725318.

16. Azara E, Longheu C, Sanna G, Tola S. Biofilm formation and virulence factor analysis of Staphylococcus aureus isolates collected from ovine mastitis. J Appl Microbiol. 2017 Aug;123(2):372-379. doi: 10.1111/jam.13502. Epub 2017 Jul 13. PMID: 28561911.

17. Bannoehr J, Guardabassi L. Staphylococcus pseudintermedius in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. Vet Dermatol. 2012 Aug;23(4):253-66, e51-2. doi: 10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x. Epub 2012 Apr 19. PMID: 22515504.

18. Barbato M, Hailer F, Orozco-terWengel P, Kijas J, Mereu P, Cabras P, Mazza R, Pirastru M, Bruford MW. Genomic signatures of adaptive introgression from European mouflon into domestic sheep. Sci Rep. 2017 Aug 8;7(1):7623. doi: 10.1038/s41598-017-07382-7. PMID: 28790322; PMCID: PMC5548776.

19. Bauer BU, Ambros C, Boll K, Hilke J, Riehm JM, Szaluś-Jordanow O, Schneider C, Sodoma E, Bauz T, Ganter M, Maurischat S. Presence and genetic variability of Staphylococcus aureus subsp. anaerobius isolated from small ruminants in Central Europe. Sci Rep. 2025 Apr 18;15(1):13493. doi: 10.1038/s41598-025-97300-z. PMID: 40251270; PMCID: PMC12008273.

20. Bethe A, Schink AK, Brombach J, Epping L, Semmler T, Reinhardt S, Molitor E, Müller S, Balks J, Köck R, Schwarz S, Walther B, Lübke-Becker A. Panton-Valentine Leukocidin-Positive Staphylococcus aureus in Family and Pet Cat. Emerg Infect Dis. 2024 Aug;30(8):1724-1726. doi: 10.3201/eid3008.231255. PMID: 39043433; PMCID: PMC11286049.

21. Bierowiec K, Miszczak M, Korzeniowska-Kowal A, Wzorek A, Płókarz D, Gamian A. Epidemiology of Staphylococcus pseudintermedius in cats in Poland. Sci Rep.

2021 Sep 23;11(1):18898. doi: 10.1038/s41598-021-97976-z. PMID: 34556720; PMCID: PMC8460698.

22. Bierowiec K, Płoneczka-Janeczko K, Rypuła K. Is the Colonisation of Staphylococcus aureus in Pets Associated with Their Close Contact with Owners? PLoS One. 2016 May 26;11(5):e0156052. doi: 10.1371/journal.pone.0156052. PMID: 27227897; PMCID: PMC4882014.

23. Bierowiec K, Korzeniowska-Kowal A, Wzorek A, Rypuła K, Gamian A. Prevalence of Staphylococcus Species Colonization in Healthy and Sick Cats. Biomed Res Int. 2019 Jan 20;2019:4360525. doi: 10.1155/2019/4360525. PMID: 30800668; PMCID: PMC6360576.

24. Bonnefont CM, Rainard P, Cunha P, Gilbert FB, Toufeer M, Aurel MR, Rupp R, Foucras G. Genetic susceptibility to S. aureus mastitis in sheep: differential expression of mammary epithelial cells in response to live bacteria or supernatant. Physiol Genomics. 2012 Apr 2;44(7):403-16. doi: 10.1152/physiolgenomics.00155.2011. Epub 2012 Feb 14. PMID: 22337903.

25. Börjesson S, Gómez-Sanz E, Ekström K, Torres C, Grönlund U. Staphylococcus pseudintermedius can be misdiagnosed as Staphylococcus aureus in humans with dog bite wounds. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015 Apr;34(4):839-44. doi: 10.1007/s10096-014-2300-y. Epub 2014 Dec 23. PMID: 25532507.

26. Brdová D, Ruml T, Viktorová J. Mechanism of staphylococcal resistance to clinically relevant antibiotics. Drug Resist Updat. 2024 Nov;77:101147. doi: 10.1016/j.drup.2024.101147. Epub 2024 Aug 31. PMID: 39236354.

27. Breyer GM, Saggin BF, de Carli S, da Silva MERJ, da Costa MM, Brenig B, Azevedo VAC, Cardoso MRI, Siqueira FM. Virulent potential of methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus pseudintermedius in dogs. Acta Trop. 2023 Jun;242:106911. doi: 10.1016/j.actatropica.2023.106911. Epub 2023 Mar 23. PMID: 36965612.

28. Bröker BM, Mrochen D, Péton V. The T Cell Response to Staphylococcus aureus. Pathogens. 2016 Mar 17;5(1):31. doi: 10.3390/pathogens5010031. PMID: 26999219; PMCID: PMC4810152.

29. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of Staphylococcus aureus. Toxins (Basel). 2010 May;2(5):1148-65. doi: 10.3390/toxins2051148. Epub 2010 May 25. PMID: 22069631; PMCID: PMC3153237.

*30.*Burrows AM, Smith LW, Downing SE, Omstead KM, Smith TD. Evolutionary divergence of facial muscle physiology between domestic dogs and wolves. Anat Rec (Hoboken). 2025 May;308(5):1369-1377. doi: 10.1002/ar.25580. Epub 2024 Oct 3. PMID: 39360643; PMCID: PMC11967504.

*31.*Campos J, Pires MF, Sousa M, Campos C, da Costa CFFA, Sampaio-Maia B. Unveiling the Relevance of the Oral Cavity as a *Staphylococcus aureus* Colonization Site and Potential Source of Antimicrobial Resistance. Pathogens. 2023 May 26;12(6):765. doi: 10.3390/pathogens12060765. PMID: 37375455; PMCID: PMC10304336.

*32.*Caneschi A, Bardhi A, Barbarossa A, Zaghini A. The Use of Antibiotics and Antimicrobial Resistance in Veterinary Medicine, a Complex Phenomenon: A Narrative Review. Antibiotics (Basel). 2023 Mar 1;12(3):487. doi: 10.3390/antibiotics12030487. PMID: 36978354; PMCID: PMC10044628.

*33.*Carroll KC, Burnham CD, Westblade LF. From canines to humans: Clinical importance of Staphylococcus pseudintermedius. PLoS Pathog. 2021 Dec 2;17(12):e1009961. doi: 10.1371/journal.ppat.1009961. PMID: 34855921; PMCID: PMC8638991.

*34.*Carson M, Meredith AL, Shaw DJ, Giotis ES, Lloyd DH, Loeffler A. Foxes as a potential wildlife reservoir for mecA-positive Staphylococci. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012 Jul;12(7):583-7. doi: 10.1089/vbz.2011.0825. Epub 2012 Mar 26. PMID: 22448723.

*35.*Chajęcka-Wierzchowska W, Gajewska J, Zadernowska A, Randazzo CL, Caggia C. A Comprehensive Study on Antibiotic Resistance among Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS) Strains Isolated from Ready-to-Eat Food Served in Bars and Restaurants. Foods. 2023 Jan 23;12(3):514. doi: 10.3390/foods12030514. PMID: 36766043; PMCID: PMC9914766.

36.Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK; Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus Investigative Team. Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the vanA resistance gene. N Engl J Med. 2003 Apr 3;348(14):1342-7. doi: 10.1056/NEJMoa025025. PMID: 12672861.

*37.*Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. Virulence. 2021 Dec;12(1):547-569. doi: 10.1080/21505594.2021.1878688. PMID: 33522395; PMCID: PMC7872022.

38.Chrobak D, Kizerwetter-Swida M, Rzewuska M, Binek M. Antibiotic resistance of canine Staphylococcus intermedius group (SIG)--practical implications. Pol J Vet Sci. 2011;14(2):213-8. doi: 10.2478/v10181-011-0032-9. PMID: 21721404.

39.Clinical and Laboratory Standard Institute 2024. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. CLSI M02 ED-14.

40.Clinical and Laboratory Standard Institute 2024. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Animals, 7-th ed. CLSI Supplement VET 01 S.

41.Clinical and Laboratory Standard Institute 2024. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. CLSI M02 ED-14.

42.Clinical and Laboratory Standard Institute 2024. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Animals, 7-th ed. CLSI Supplement VET 01 S.

43.Clinical and Laboratory Standard Institute 2024. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Animals, 7-th ed. CLSI Supplement VET 01 S.

44.Clinical and Laboratory Standard Institute 2025. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 35-rd edition. CLSI Supplement M 100.

45.Cuny C, Layer-Nicolaou F, Weber R, Köck R, Witte W. Colonization of Dogs and Their Owners with *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in Households, Veterinary Practices, and Healthcare Facilities. Microorganisms. 2022 Mar 22;10(4):677. doi: 10.3390/microorganisms10040677. PMID: 35456729; PMCID: PMC9024920.

46.Cuny C, Abdelbary MMH, Köck R, Layer F, Scheidemann W, Werner G, Witte W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from infections in horses in Germany are frequent colonizers of veterinarians but rare among MRSA from infections in humans. One Health. 2015 Dec 12;2:11-17. doi: 10.1016/j.onehlt.2015.11.004. PMID: 28616471; PMCID: PMC5441336.

47.Cybulska A, Kornacka A, Bień J, Goździk K, Kalisińska E, Łanocha-Arendarczyk N, Budis H, Pilarczyk B, Cabaj W, Moskwa B. The Occurrence of Trichinella spp. in Red Foxes (Vulpes vulpes) in Different Regions of Poland: Current Data. Vector Borne Zoonotic Dis. 2016 Nov;16(11):717-721. doi: 10.1089/vbz.2016.1996. Epub 2016 Oct 5. PMID: 27705096.

48.Daly KG, Mullin VE, Hare AJ, Halpin Á, Mattiangeli V, Teasdale MD, Rossi C, Geiger S, Krebs S, Medugorac I, Sandoval-Castellanos E, Özbaşaran M, Duru G, Gülcür S, Pöllath N, Collins M, Frantz L, Vila E, Zidarov P, Stoddart S, Boldgiv B, Orlando L, Pearson MP, Mullville J, Askeyev IV, Askeyev AO, Askeyev OV, Shaymuratova DN, Van den Hurk Y, Zeeb-Lanz A, Arbogast RM, Hemmer H, Davoudi H, Amiri S, Doost SB, Decruyenaere D, Fathi H, Khazaeli R, Hassanzadeh Y, Sardari A, Lhuillier J, Abdolahi M, Summers GD, Marro C, Bahshaliyev V, Berthon R, Çakirlar C, Benecke N, Scheu A, Burger J, Sauer E, Horwitz LK, Arbuckle B, Buitenhuis H, Gourichon L, Bulatović J, O'Connor T, Orton D, Jalabadze M, Rhodes S, Chazan M, Özkaya V, Zeder M, Atıcı L, Mashkour M, Peters J, Bradley DG. Ancient genomics and the origin, dispersal, and development of domestic sheep. Science. 2025 Jan 31;387(6733):492-497. doi: 10.1126/science.adn2094. Epub 2025 Jan 30. PMID: 39883774.

49.Delcourt J, Brochier B, Delvaux D, Vangeluwe D, Poncin P. 2022. Fox *Vulpes vulpes* population trends in Western Europe during and after the eradication of rabies. Mammal Rev. 52(3), 343-359. doi.org/10.1111/mam.12289.

50.Dong Q, Liu Y, Li W, Liu Y, Ye X. Cross-species transmission risk of livestock-associated MRSA: A systematic review and Bayesian meta-analysis of global data. Prev Vet Med. 2021 Sep;194:105429. doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105429. Epub 2021 Jul 9. PMID: 34271475.

51.Downs CJ, Boan BV, Lohuis TD, Stewart KM. Investigating Relationships between Reproduction, Immune Defenses, and Cortisol in Dall Sheep. Front Immunol. 2018 Jan 31;9:105. doi: 10.3389/fimmu.2018.00105. PMID: 29445376; PMCID: PMC5797757.

52.Ebani VV, Trebino C, Guardone L, Bertelloni F, Cagnoli G, Nardoni S, Sel E, Wilde E, Poli A, Mancianti F. Occurrence of Bacterial and Protozoan Pathogens in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Central Italy. Animals (Basel). 2022 Oct 21;12(20):2891. doi: 10.3390/ani12202891. PMID: 36290277; PMCID: PMC9598198.

53.EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for DiseasePrevention and Control), 2022. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance inzoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. EFSA J. 20(3), 7209, 197 pp. doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7209ISSN:1831-4732.

54.EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Nielsen SS, Bicout DJ, Calistri P, Canali E, Drewe JA, Garin-Bastuji B, Gonzales Rojas JL, Gortázar C, Herskin M, Michel V, Miranda Chueca MÁ, Padalino B, Pasquali P, Roberts HC, Spoolder H,

Ståhl K, Velarde A, Viltrop A, Winckler C, Baldinelli F, Broglia A, Kohnle L, Alvarez J. Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): antimicrobial-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs and cats. EFSA J. 2022 Feb 1;20(2):e07080. doi: 10.2903/j.efsa.2022.7080. PMID: 35126739; PMCID: PMC8805099.

55. Elshebrawy HA, Kasem NG, Sallam KI. Methicillin- and vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in chicken carcasses, ready-to-eat chicken meat sandwiches, and buffalo milk. Int J Food Microbiol. 2025 Jan 16;427:110968. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110968. Epub 2024 Nov 9. PMID: 39546899.

56. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol. 2000 Mar;38(3):1008-15. doi: 10.1128/JCM.38.3.1008-1015.2000. PMID: 10698988; PMCID: PMC86325.

57. European Commission Directorate-General For Health And Food Safety Food sustainability, international relations Unit D4 - Food safety programmes, Emergency funding Programmes for eradication, control and surveillance of animal diseases and zoonoses submitted for obtaining EU financial contribution Annex I.a: Programme for the eradication of Rabies Document Version: 2021 2.2 https://food.ec.europa.eu/horizontal-topics/funding-procurement-grants/food-chain-funding/funding-animal-health-measures/national-veterinary-programmes_en

58. Exel CE, Geus Y, Spaninks M, Koop G, Benedictus L. Colonization of Extramammary Sites with Mastitis-Associated *S. aureus* Strains in Dairy Goats. Pathogens. 2023 Mar 26;12(4):515. doi: 10.3390/pathogens12040515. PMID: 37111401; PMCID: PMC10140999.

59. Feßler AT, Thomas P, Mühldorfer K, Grobbel M, Brombach J, Eichhorn I, Monecke S, Ehricht R, Schwarz S. Phenotypic and genotypic characteristics of Staphylococcus aureus isolates from zoo and wild animals. Vet Microbiol. 2018 May;218:98-103. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.03.020. Epub 2018 Mar 20. PMID: 29685228.

60. Feuer L: Analysing the MRSA and MRSP Prevalence in dogs and cats in Germany (2019-2021): A Pathway for Continuous AMR Monitoring. 2025. Doctoral Thesis.

61. Feuerstein N, Terkel J. Interrelationships of dogs (Canis familiaris) and cats (Felis catus L.) living under the same roof. Appl Anim Behav Sci. 2008; 113: 150–165. https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.10.010.

62.Fisher EL, Otto M, Cheung GYC. Basis of Virulence in Enterotoxin-Mediated Staphylococcal Food Poisoning. Front Microbiol. 2018 Mar 13;9:436. doi: 10.3389/fmicb.2018.00436. PMID: 29662470; PMCID: PMC5890119.

63.Fragkou IA, Skoufos J, Cripps PJ, Kyriazakis I, Papaioannou N, Boscos CM, Tzora A, Fthenakis GC. Differences in susceptibility to Mannheimia haemolytica-associated mastitis between two breeds of dairy sheep. J Dairy Res. 2007 Aug;74(3):349-55. doi: 10.1017/S0022029907002518. Epub 2007 Apr 24. PMID: 17451623.

64.Galeta P, Lázničková-Galetová M, Sablin M, Germonpré M. Morphological evidence for early dog domestication in the European Pleistocene: New evidence from a randomization approach to group differences. Anat Rec (Hoboken). 2021 Jan;304(1):42-62. doi: 10.1002/ar.24500. Epub 2020 Aug 31. PMID: 32869467.

65.Galloway DB. The Aberdeen Medico-Chirurgical Society 1789 to the present day: some leaders in medicine. J Pediatr Surg. 2011 Feb;46(2):284-8. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2010.11.003. PMID: 21292074.

66.García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RL, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis. 2011 Aug;11(8):595-603. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70126-8. PMID: 21641281; PMCID: PMC3829197.

67.Gharsa H, Ben Slama K, Lozano C, Gómez-Sanz E, Klibi N, Ben Sallem R, Gómez P, Zarazaga M, Boudabous A, Torres C. Prevalence, antibiotic resistance, virulence traits and genetic lineages of Staphylococcus aureus in healthy sheep in Tunisia. Vet Microbiol. 2012 May 4;156(3-4):367-73. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.11.009. Epub 2011 Nov 17. PMID: 22176760.

68.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. Prevalence and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying mecA or mecC and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus in dairy sheep farms in central Italy. J Dairy Sci. 2017 Oct;100(10):7857-7863. doi: 10.3168/jds.2017-12940. Epub 2017 Aug 2. PMID: 28780098.

69.Gilbert FB, Cunha P, Jensen K, Glass EJ, Foucras G, Robert-Granié C, Rupp R, Rainard P. Differential response of bovine mammary epithelial cells to

Staphylococcus aureus or Escherichia coli agonists of the innate immune system. Vet Res. 2013 Jun 11;44(1):40. doi: 10.1186/1297-9716-44-40. PMID: 23758654; PMCID: PMC3686618.

70. Glajzner P, Szewczyk EM, Szemraj M. Pathogenic potential and antimicrobial resistance of Staphylococcus pseudintermedius isolated from human and animals. Folia Microbiol (Praha). 2023 Apr;68(2):231-243. doi: 10.1007/s12223-022-01007-x. Epub 2022 Oct 12. PMID: 36221001; PMCID: PMC10104922.

71. Graham DW, Bergeron G, Bourassa MW, Dickson J, Gomes F, Howe A, Kahn LH, Morley PS, Scott HM, Simjee S, Singer RS, Smith TC, Storrs C, Wittum TE. Complexities in understanding antimicrobial resistance across domesticated animal, human, and environmental systems. Ann N Y Acad Sci. 2019 Apr;1441(1):17-30. doi: 10.1111/nyas.14036. PMID: 30924539; PMCID: PMC6850694.

72. Greguła-Kania M, Nazar P, Kulik M, Patkowski K, Hahaj-Siembida A, Junkuszew A. Some physiological responses of native sheep breeds to environmental conditions during grazing in Natura 2000 Habitats. Agriculture. 2023. 13, 982, doi: 10.3390/agriculture13050982.

73. Greguła-Kania M, Kosior-Korzecka U, Patkowski K, Juszczuk-Kubiak E, Plewik M, Gruszecki TM. Acute-phase proteins, cortisol and haematological parameters in ewes during the periparturient period. Reprod Domest Anim. 2020 Mar;55(3):393-400. doi: 10.1111/rda.13628. Epub 2020 Jan 26. PMID: 31916297.

74. Greguła-Kania M, Patkowski K, Kosior-Korzecka U, GruszeckiTM. 2018. Reference gene selection for quantitative Real-Time PCR analysis in ovine whole blood. International Conference Animal Genetics and Genomics. 2018.Book of abstracts (89-90).

75. Grossman TH. Tetracycline Antibiotics and Resistance. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016 Apr 1;6(4):a025387. doi: 10.1101/cshperspect.a025387. PMID: 26989065; PMCID: PMC4817740.

76. Haag AF, Fitzgerald JR, Penadés JR. *Staphylococcus aureus* in Animals. Microbiol Spectr. 2019 May;7(3):10.1128/microbiolspec.gpp3-0060-2019. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019. PMID: 31124433; PMCID: PMC11257167.

77. Hadfield JM, Bowdridge EC, Holásková I, Elsasser TH, Dailey RA. Breed-specific differences in the immune response to lipopolysaccharide in ewes. J Anim Sci. 2018

Sep 29;96(10):4220-4228. doi: 10.1093/jas/sky288. PMID: 30107562; PMCID: PMC6162594.

78. Hahaj-Siembida A, Nowakiewicz A, Greguła-Kania M, Bochniarz M, Trościańczyk A, Osińska M. Characteristics of drug-resistant staphylococci isolated from milk of lambed ewes during the perinatal period. J Vet Res. 2025 Mar 25;69(1):41-50. doi: 10.2478/jvetres-2025-0014. PMID: 40144065; PMCID: PMC11936087.

79. Hahaj-Siembida A, Nowakiewicz A, Korzeniowska-Kowal A, Szecówka K, Trościańczyk A, Zięba P, Kania MG. Red foxes (Vulpes vulpes) as a specific and underappreciated reservoir of resistant and virulent coagulase-positive Staphylococcus spp. strains. Res Vet Sci. 2024 Jan;166:105111. doi: 10.1016/j.rvsc.2023.105111. Epub 2023 Dec 13. PMID: 38113638.

80. Hattori M, Saito A, Nagasawa M, Kikusui T, Yamamoto S. Changes in Cat Facial Morphology Are Related to Interaction with Humans. Animals (Basel). 2022 Dec 10;12(24):3493. doi: 10.3390/ani12243493. PMID: 36552413; PMCID: PMC9774281.

81. Hauschild T, Vuković D, Dakić I, Jezek P, Djukić S, Dimitrijević V, Stepanović S, Schwarz S. Aminoglycoside resistance in members of the Staphylococcus sciuri group. Microb Drug Resist. 2007 Summer;13(2):77-84. doi: 10.1089/mdr.2007.713. PMID: 17650957.

82. Hauschild T, Sacha P, Wieczorek P, Zalewska M, Kaczyńska K, Tryniszewska E. Aminoglycosides resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus from a University Hospital in Bialystok, Poland. Folia Histochem Cytobiol. 2008;46(2):225-8. doi: 10.2478/v10042-008-0034-3. PMID: 18519242.

83. Heaton CJ, Gerbig GR, Sensius LD, Patel V, Smith TC. *Staphylococcus aureus* Epidemiology in Wildlife: A Systematic Review. Antibiotics (Basel). 2020 Feb 18;9(2):89. doi: 10.3390/antibiotics9020089. PMID: 32085586; PMCID: PMC7168057.

84. Himsworth CG, Miller RR, Montoya V, Hoang L, Romney MG, Al-Rawahi GN, Kerr T, Jardine CM, Patrick DM, Tang P, Weese JS. Carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by wild urban Norway rats (Rattus norvegicus). PLoS One. 2014 Feb 3;9(2):e87983. doi: 10.1371/journal.pone.0087983. PMID: 24498421; PMCID: PMC3912160.

85. Howden BP, Giulieri SG, Wong Fok Lung T, Baines SL, Sharkey LK, Lee JYH, Hachani A, Monk IR, Stinear TP. Staphylococcus aureus host interactions and

adaptation. Nat Rev Microbiol. 2023 Jun;21(6):380-395. doi: 10.1038/s41579-023-00852-y. Epub 2023 Jan 27. PMID: 36707725; PMCID: PMC9882747.

86.Hritcu OM, Schmidt VM, Salem SE, Maciuca IE, Moraru RF, Lipovan I, Mareş M, Solcan G, Timofte D. Geographical Variations in Virulence Factors and Antimicrobial Resistance Amongst Staphylococci Isolated From Dogs From the United Kingdom and Romania. Front Vet Sci. 2020 Jul 21;7:414. doi: 10.3389/fvets.2020.00414. PMID: 32851008; PMCID: PMC7396606.

87.Huuki H, Vilkki J, Vanhatalo A, Tapio I. Fecal microbiota colonization dynamics in dairy heifers associated with early-life rumen microbiota modulation and gut health. Front Microbiol. 2024 Mar 5;15:1353874. doi: 10.3389/fmicb.2024.1353874. PMID: 38505558; PMCID: PMC10949896.

88.Idrees MM, Saeed K, Shahid MA, Akhtar M, Qammar K, Hassan J, Khaliq T, Saeed A. Prevalence of *mecA*- and *mecC*-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Clinical Specimens, Punjab, Pakistan. Biomedicines. 2023 Mar 13;11(3):878. doi: 10.3390/biomedicines11030878. PMID: 36979857; PMCID: PMC10045897.

89.Islam MZ, Espinosa-Gongora C, Damborg P, Sieber RN, Munk R, Husted L, Moodley A, Skov R, Larsen J, Guardabassi L. Horses in Denmark Are a Reservoir of Diverse Clones of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus*. Front Microbiol. 2017 Apr 3;8:543. doi: 10.3389/fmicb.2017.00543. PMID: 28421046; PMCID: PMC5376617.

90.Iyori K, Futagawa-Saito K, Hisatsune J, Yamamoto M, Sekiguchi M, Ide K, Son WG, Olivry T, Sugai M, Fukuyasu T, Iwasaki T, Nishifuji K. Staphylococcus pseudintermedius exfoliative toxin EXI selectively digests canine desmoglein 1 and causes subcorneal clefts in canine epidermis. Vet Dermatol. 2011 Aug;22(4):319-26. doi: 10.1111/j.1365-3164.2011.00952.x. Epub 2011 Mar 17. PMID: 21410798.

91.Jackowiak M, Gryz J, Jasińska K, Brach M, Bolibok L, Kowal P, Krauze-Gryz D. Colonization of Warsaw by the red fox Vulpes vulpes in the years 1976-2019. Sci Rep. 2021 Jul 6;11(1):13931. doi: 10.1038/s41598-021-92844-2. PMID: 34230499; PMCID: PMC8260808.

92.Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, 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

Feb;70(2):631-41. doi: 10.1128/IAI.70.2.631-641.2002. PMID: 11796592; PMCID: PMC127674.

93.Jenul CA, Horswill R. Regulation of Staphylococcus aureus Virulence.ASM Journals.2018.Volume 7 Issue 2 7.2.29https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018

94.Jeżak K, Kozajda A. Occurrence and spread of antibiotic-resistant bacteria on animal farms and in their vicinity in Poland and Ukraine-review. Environ Sci Pollut Res Int. 2022 Feb;29(7):9533-9559. doi: 10.1007/s11356-021-17773-z. Epub 2021 Dec 6. PMID: 34870776; PMCID: PMC8783842.

95.Jung HR, Lee YJ. Characterization of Virulence Factors in Enterotoxin-Producing *Staphylococcus aureus* from Bulk Tank Milk. Animals (Basel). 2022 Jan 26;12(3):301. doi: 10.3390/ani12030301. PMID: 35158625; PMCID: PMC8833733.

96.Kaminska P, Tempes A, Scholz E, Malik AR. Cytokines on the way to secretion. Cytokine Growth Factor Rev. 2024 Oct;79:52-65. doi: 10.1016/j.cytogfr.2024.08.003. Epub 2024 Aug 25. PMID: 39227243.

97.Kaneko J, Kamio Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. Biosci Biotechnol Biochem. 2004 May;68(5):981-1003. doi: 10.1271/bbb.68.981. Erratum in: Biosci Biotechnol Biochem. 2004 Jun;68(6):A4. PMID: 15170101.

98.Kaptan D, Atağ G, Vural KB, Morell Miranda P, Akbaba A, Yüncü E, Buluktaev A, Abazari MF, Yorulmaz S, Kazancı DD, Küçükakdağ Doğu A, Çakan YG, Özbal R, Gerritsen F, De Cupere B, Duru R, Umurtak G, Arbuckle BS, Baird D, Çevik Ö, Bıçakçı E, Gündem CY, Pişkin E, Hachem L, Canpolat K, Fakhari Z, Ochir-Goryaeva M, Kukanova V, Valipour HR, Hoseinzadeh J, Küçük Baloğlu F, Götherström A, Hadjisterkotis E, Grange T, Geigl EM, Togan İZ, Günther T, Somel M, Özer F. The Population History of Domestic Sheep Revealed by Paleogenomes. Mol Biol Evol. 2024 Oct 4;41(10):msae158. doi: 10.1093/molbev/msae158. PMID: 39437846; PMCID: PMC11495565.

99.Karakulska J, Woroszyło M, Szewczuk M, Fijałkowski K. Identification, Superantigen Toxin Gene Profile and Antimicrobial Resistance of Staphylococci Isolated from Polish Primitive Sheep Breeds. Animals (Basel). 2022 Aug 20;12(16):2139. doi: 10.3390/ani12162139. PMID: 36009729; PMCID: PMC9404845.

100.Karamon J, Dąbrowska J, Kochanowski M, Samorek-Pieróg M, Sroka J, Różycki M, Bilska-Zając E, Zdybel J, Cencek T. Prevalence of intestinal helminths of red foxes (Vulpes vulpes) in central Europe (Poland): a significant zoonotic threat. Parasit Vectors. 2018 Jul 28;11(1):436. doi: 10.1186/s13071-018-3021-3. PMID: 30055657; PMCID: PMC6064108.

101.Karamon J, Kochanowski M, Sroka J, Cencek T, Różycki M, Chmurzyńska E, Bilska-Zając E. The prevalence of Echinococcus multilocularis in red foxes in Poland--current results (2009-2013). Parasitol Res. 2014 Jan;113(1):317-22. doi: 10.1007/s00436-013-3657-z. Epub 2013 Nov 13. PMID: 24221887; PMCID: PMC3898514.

102.Kashif A, McClure JA, Lakhundi S, Pham M, Chen S, Conly JM, Zhang K. *Staphylococcus aureus* ST398 Virulence Is Associated With Factors Carried on Prophage ϕSa3. Front Microbiol. 2019 Sep 24;10:2219. doi: 10.3389/fmicb.2019.02219. PMID: 31608039; PMCID: PMC6771273.

103.Kasprowicz A, Białecka A, Białecka J, Godzisz I, Barabasz W, Jaworska O, Małachowa N, Miedzobrodzki J. The occurrence and comparative phenotypic characteristics of Staphylococcus spp. from healthy and diseased, household and shelter dogs, based on routine biochemical diagnostic methods. Pol J Microbiol. 2011;60(1):19-26. PMID: 21630570.

104.Kawęcka A, Pasternak M, Miksza-Cybulska A, Puchała M. Native Sheep Breeds in Poland-Importance and Outcomes of Genetic Resources Protection Programmes. Animals (Basel). 2022 Jun 9;12(12):1510. doi: 10.3390/ani12121510. PMID: 35739847; PMCID: PMC9219539.

105.Kawecka-Grochocka E, Zalewska M, Rzewuska M, Kościuczuk E, Ząbek T, Sakowski T, Marczak S, Bagnicka E. Expression of cytokines in dairy cattle mammary gland parenchyma during chronic staphylococcal infection. Vet Res. 2021 Oct 18;52(1):132. doi: 10.1186/s13567-021-01003-y. PMID: 34663465; PMCID: PMC8522155.

106.Kelly BG, Vespermann A, Bolton DJ. The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. Food Chem Toxicol. 2009 May;47(5):951-68. doi: 10.1016/j.fct.2008.02.006. Epub 2008 Feb 14. PMID: 18420329.

107.Kicińska-Jakubowska A, Broda J, Zimniewska M, Przybylska P. Characteristics of Wool of Selected Polish Local Sheep Breeds with Mixed Type Fleece. *Journal of Natural Fibers*. 2024. *21*(1). https://doi.org/10.1080/15440478.2023.2290855.

108.Kim SJ, Ali MS, Kang HS, Moon BY, Hwang YJ, Yoon SS, Park SC, Lim SK. Characterization of fusidic acid-resistant Staphylococcus aureus isolated from food animals during 2010-2021 in South Korea. Int J Food Microbiol. 2025 Feb 16;430:111026. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2024.111026. Epub 2024 Dec 19. PMID: 39731987.

109.Kizerwetter-Świda M, Chrobak-Chmiel D, Rzewuska M, Binek M. Changes in the population structure of canine methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius in Poland. Vet Microbiol. 2017 Sep;208:106-109. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.07.025. Epub 2017 Jul 25. PMID: 28888624.

110.Kizerwetter-Świda M, Chrobak-Chmiel D, Kwiecień E, Rzewuska M, Binek M. Molecular characterization of high-level mupirocin resistance in methicillin-resistant staphylococci isolated from companion animals. Vet Microbiol. 2021 Aug;259:109160. doi: 10.1016/j.vetmic.2021.109160. Epub 2021 Jun 18. PMID: 34197979.

111.Klein S, Hannesen J, Zanger P, Heeg K, Boutin S, Nurjadi D. Entry of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant Staphylococcus aureus into the hospital: prevalence and population structure in Heidelberg, Germany 2015-2018. Sci Rep. 2020 Aug 6;10(1):13243. doi: 10.1038/s41598-020-70112-z. PMID: 32764618; PMCID: PMC7413528.

112.Kmieciak W, Szewczyk EM. Gatunki koagulazododatnie rodzaju *Staphylococcus*– taksonomia, chorobotwórczość. Post. Mikrobiol. 2017. 56(2), 233–244.

113.Kołodziej-Sobocińska M, Zalewski A, Kowalczyk R. Sarcoptic mange vulnerability in carnivores of the Białowieża Primeval Forest, Poland: underlying determinant factors Ecol. Res. 2014.29, 237–244. doi: 10.1007/s11284-013-1118-x.

114.Kotzamanidis C, Vafeas G, Giantzi V, Anastasiadou S, Mygdalias S, Malousi A, Loukia E, Daniel S, Zdragas A. *Staphylococcus aureus* Isolated from Ruminants with Mastitis in Northern Greece Dairy Herds: Genetic Relatedness and Phenotypic and Genotypic Characterization. Toxins (Basel). 2021 Feb 25;13(3):176. doi: 10.3390/toxins13030176. PMID: 33668901; PMCID: PMC7996520.

115.Koyama H, Sanui M, Saga T, Harada S, Ishii Y, Tateda K, Lefor AK. A fatal infection caused by sequence type 398 methicillin-resistant Staphylococcus aureus

carrying the Panton-Valentine leukocidin gene: A case report in Japan. J Infect Chemother. 2015 Jul;21(7):541-3. doi: 10.1016/j.jiac.2015.03.013. Epub 2015 Apr 9. PMID: 25922086.

116. Krawczyk B, Leibner J, Barańska-Rybak W, Samet A, Nowicki R, Kur J. ADSRRS-fingerprinting and PCR MP techniques for studies of intraspecies genetic relatedness in Staphylococcus aureus. J Microbiol Methods. 2007 Nov;71(2):114-22. doi: 10.1016/j.mimet.2007.08.010. Epub 2007 Aug 31. PMID: 17889385.

117. Krawczyk B, Lewandowski K, Bronk M, Samet A, Myjak P, Kur J. Evaluation of a novel method based on amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites (ADSRRS fingerprinting) for typing strains of vancomycin-resistant Enterococcus faecium. J Microbiol Methods. 2003 Mar;52(3):341-51. doi: 10.1016/s0167-7012(02)00187-2. PMID: 12531503.

118. Latimer KS, Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology, 5th ed., Wiley-Blackwell, 2011; and Weiss DJ, Wardrop KJ, Schalm's Veterinary Hematology, 6th ed., Wiley-Blackwell, 2010.

119. Leroy S, Christieans S, Talon R. Tetracycline Gene Transfer in *Staphylococcus xylosus in situ* During Sausage Fermentation. Front Microbiol. 2019 Mar 6;10:392. doi: 10.3389/fmicb.2019.00392. PMID: 30894841; PMCID: PMC6414713.

120. Lianou DT, Fthenakis GC. Use of Antibiotics against Bacterial Infections on Dairy Sheep and Goat Farms: Patterns of Usage and Associations with Health Management and Human Resources. Antibiotics (Basel). 2022 May 31;11(6):753. doi: 10.3390/antibiotics11060753. PMID: 35740159; PMCID: PMC9219691.

121. Licitra F, Perillo L, Antoci F, Piccione G, Giannetto C, Salonia R, Giudice E, Monteverde V, Cascone G. Management Factors Influence Animal Welfare and the Correlation to Infectious Diseases in Dairy Cows. Animals (Basel). 2021 Nov 20;11(11):3321. doi: 10.3390/ani11113321. PMID: 34828052; PMCID: PMC8614703.

122. Lienen T, Schnitt A, Hammerl JA, Maurischat S, Tenhagen BA. *Mammaliicoccus* spp. from German Dairy Farms Exhibit a Wide Range of Antimicrobial Resistance Genes and Non-Wildtype Phenotypes to Several Antibiotic Classes. Biology (Basel). 2022 Jan 18;11(2):152. doi: 10.3390/biology11020152. PMID: 35205019; PMCID: PMC8869381.

123. Loncaric I, Kübber-Heiss A, Posautz A, Ruppitsch W, Lepuschitz S, Schauer B, Feßler AT, Krametter-Frötscher R, Harrison EM, Holmes MA, Künzel F, Szostak

MP, Hauschild T, Desvars-Larrive A, Misic D, Rosengarten R, Walzer C, Slickers P, Monecke S, Ehricht R, Schwarz S, Spergser J. Characterization of mecC gene-carrying coagulase-negative Staphylococcus spp. isolated from various animals. Vet Microbiol. 2019 Mar;230:138-144. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.02.014. Epub 2019 Feb 6. PMID: 30827379.

124. Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicols, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Jul;50(7):2500-5. doi: 10.1128/AAC.00131-06. PMID: 16801432; PMCID: PMC1489768.

125. Lynch SA, Helbig KJ. The Complex Diseases of Staphylococcus pseudintermedius in Canines: Where to Next? Vet Sci. 2021 Jan 18;8(1):11. doi: 10.3390/vetsci8010011. PMID: 33477504; PMCID: PMC7831068.

126. Ma R, Lu Y, Li M, Gao Z, Li D, Gao Y, Deng W, Wang B. Whole-Genome Resequencing in Sheep: Applications in Breeding, Evolution, and Conservation. Genes (Basel). 2025 Mar 22;16(4):363. doi: 10.3390/genes16040363. PMID: 40282323; PMCID: PMC12026845.

127. Madhaiyan M, Wirth JS, Saravanan VS. Phylogenomic analyses of the *Staphylococcaceae* family suggest the reclassification of five species within the genus *Staphylococcus* as heterotypic synonyms, the promotion of five subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five *Staphylococcus* species to *Mammaliicoccus* gen. nov., and the formal assignment of *Nosocomiicoccus* to the family *Staphylococcaceae*. Int J Syst Evol Microbiol. 2020 Nov;70(11):5926-5936. doi: 10.1099/ijsem.0.004498. PMID: 33052802.

128. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012 Mar;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. Epub 2011 Jul 27. PMID: 21793988.

129. Maity S, Ambatipudi K. Mammary microbial dysbiosis leads to the zoonosis of bovine mastitis: a One-Health perspective. FEMS Microbiol Ecol. 2020 Dec 30;97(1):fiaa241. doi: 10.1093/femsec/fiaa241. PMID: 33242081.

130.Marco-Fuertes A, Marin C, Gimeno-Cardona C, Artal-Muñoz V, Vega S, Montoro-Dasi L. Multidrug-Resistant Commensal and Infection-Causing *Staphylococcus* spp. Isolated from Companion Animals in the Valencia Region. Vet Sci. 2024 Jan 26;11(2):54. doi: 10.3390/vetsci11020054. PMID: 38393072; PMCID: PMC10891909.

131.Marco-Fuertes A, Marin C, Lorenzo-Rebenaque L, Vega S, Montoro-Dasi L. Antimicrobial Resistance in Companion Animals: A New Challenge for the One Health Approach in the European Union. Vet Sci. 2022 Apr 24;9(5):208. doi: 10.3390/vetsci9050208. PMID: 35622736; PMCID: PMC9146952.

132.Markiewicz Z, Kwiatkowski ZA. Bakterie antybiotyki lekooporność. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa. 2021.ISBN: 9788301148607

133.Martineau F, Picard FJ, Lansac N, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Feb;44(2):231-8. doi: 10.1128/AAC.44.2.231-238.2000. PMID: 10639342; PMCID: PMC89663.

134.Martínez-Seijas C, Mascarós P, Lizana V, Martí-Marco A, Arnau-Bonachera A, Chillida-Martínez E, Cardells J, Selva L, Viana D, Corpa JM. Genomic Characterization of *Staphylococcus aureus* in Wildlife. Animals (Basel). 2023 Mar 15;13(6):1064. doi: 10.3390/ani13061064. PMID: 36978605; PMCID: PMC10044652.

135.Mascaro V, Squillace L, Nobile CG, Papadopoli R, Bosch T, Schouls LM, Casalinuovo F, Musarella R, Pavia M. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage and pattern of antibiotic resistance among sheep farmers from Southern Italy. Infect Drug Resist. 2019 Aug 20;12:2561-2571. doi: 10.2147/IDR.S211629. PMID: 31692514; PMCID: PMC6708399.

136.Matanovic K, Pérez-Roth E, Pintarić S, Šeol Martinec B. Molecular characterization of high-level mupirocin resistance in Staphylococcus pseudintermedius. J Clin Microbiol. 2013 Mar;51(3):1005-7. doi: 10.1128/JCM.02904-12. Epub 2012 Dec 26. PMID: 23269741; PMCID: PMC3592079.

137.Mauffré V, Grimard B, Eozenou C, Inghels S, Silva L, Giraud-Delville C, Capo D, Sandra O, Constant F. Interferon stimulated genes as peripheral diagnostic markers of early pregnancy in sheep: a critical assessment. Animal. 2016 Nov;10(11):1856-1863. doi: 10.1017/S175173111600077X. Epub 2016 May 6. PMID: 27150201.

138. McBurney S, Veitch AM, Daoust PY. Bacterial valvular endocarditis in a black bear from Labrador. J Wildl Dis. 2000 Oct;36(4):788-91. doi: 10.7589/0090-3558-36.4.788. PMID: 11085446.

139. Menchetti L, Riggio G, Calipari S, Mariti C, Menor-Campos DJ, Diverio S. Exploring Dog and Cat Management Practices in Multispecies Households and Their Association with the Pet-Owner Relationship. Animals (Basel). 2024 Nov 30;14(23):3465. doi: 10.3390/ani14233465. PMID: 39682430; PMCID: PMC11639825.

140. Merz A, Stephan R, Johler S. Staphylococcus aureus Isolates from Goat and Sheep Milk Seem to Be Closely Related and Differ from Isolates Detected from Bovine Milk. Front Microbiol. 2016 Mar 14;7:319. doi: 10.3389/fmicb.2016.00319. PMID: 27014240; PMCID: PMC4789554.

141. Michael CK, Lianou DT, Vasileiou NGC, Mavrogianni VS, Petinaki E, Fthenakis GC. Longitudinal Study of Subclinical Mastitis in Sheep in Greece: An Investigation into Incidence Risk, Associations with Milk Quality and Risk Factors of the Infection. Animals (Basel). 2023 Oct 22;13(20):3295. doi: 10.3390/ani13203295. PMID: 37894019; PMCID: PMC10603708.

142. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality, National Mastitis Council (U.S.). 2004.

143. Mikkelsen JH, Runager K, Andersen CBF. The human protein haptoglobin inhibits IsdH-mediated heme-sequestering by *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem. 2020 Feb 14;295(7):1781-1791. doi: 10.1074/jbc.RA119.011612. Epub 2019 Dec 9. PMID: 31819010; PMCID: PMC7029131.

144. Miklasińska-Majdanik M. Mechanisms of Resistance to Macrolide Antibiotics among *Staphylococcus aureus*. Antibiotics (Basel). 2021 Nov 17;10(11):1406. doi: 10.3390/antibiotics10111406. PMID: 34827344; PMCID: PMC8615237.

145. Mills KHG. IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology. Nat Rev Immunol. 2023 Jan;23(1):38-54. doi: 10.1038/s41577-022-00746-9. Epub 2022 Jul 5. PMID: 35790881; PMCID: PMC9255545.

146. Miszczak M, Korzeniowska-Kowal A, Wzorek A, Gamian A, Rypuła K, Bierowiec K. Colonization of methicillin-resistant Staphylococcus species in healthy and sick pets: prevalence and risk factors. BMC Vet Res. 2023 Jul 18;19(1):85. doi: 10.1186/s12917-023-03640-1. PMID: 37464252; PMCID: PMC10353091.

147. Miszczak M, Korzeniowska-Kowal A, Wzorek A, Gamian A, Szenborn L, Rypuła K, Bierowiec K. Prevalence of coagulase-negative staphylococci (cons) in healthy and sick cat and dog populations in Poland. I J I D. 2022. S64-S65, ISSN 1201-9712, https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.12.152.

148. Miszczak M, Korzeniowska-Kowal A, Wzorek A, Prorok P, Szenborn L, Rypuła K, Bierowiec K. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from humans and pets - a comparison of drug resistance and risk factors associated with colonisation. J Vet Res. 2025 Jun 18;69(2):199-211. doi: 10.2478/jvetres-2025-0036. PMID: 40568467; PMCID: PMC12189987.

149. Miyazawa R, Shimoda S, Matsuda K, Tobe R, Ando T, Yoneyama H. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis and Bulk Tank Milk: First Isolation of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in Japan. Microorganisms. 2022 Oct 26;10(11):2117. doi: 10.3390/microorganisms10112117. PMID: 36363708; PMCID: PMC9696108.

150. Monecke S, Burgold-Voigt S, Feßler AT, Krapf M, Loncaric I, Liebler-Tenorio EM, Braun SD, Diezel C, Müller E, Reinicke M, Reissig A, Cabal Rosel A, Ruppitsch W, Hotzel H, Hanke D, Cuny C, Witte W, Schwarz S, Ehricht R. Characterisation of *Staphylococcus aureus* Strains and Their Prophages That Carry Horse-Specific Leukocidin Genes *lukP/Q*. Toxins (Basel). 2025 Jan 3;17(1):20. doi: 10.3390/toxins17010020. PMID: 39852974; PMCID: PMC11769447.

151. Monecke S, Feßler AT, Burgold-Voigt S, Krüger H, Mühldorfer K, Wibbelt G, Liebler-Tenorio EM, Reinicke M, Braun SD, Hanke D, Diezel C, Müller E, Loncaric I, Schwarz S, Ehricht R. Staphylococcus aureus isolates from Eurasian Beavers (Castor fiber) carry a novel phage-borne bicomponent leukocidin related to the Panton-Valentine leukocidin. Sci Rep. 2021 Dec 22;11(1):24394. doi: 10.1038/s41598-021-03823-6. PMID: 34937862; PMCID: PMC8695587.

152. Monecke S, Gavier-Widén D, Hotzel H, Peters M, Guenther S, Lazaris A, Loncaric I, Müller E, Reissig A, Ruppelt-Lorz A, Shore AC, Walter B, Coleman DC, Ehricht R. Diversity of Staphylococcus aureus Isolates in European Wildlife. PLoS One. 2016 Dec 16;11(12):e0168433. doi: 10.1371/journal.pone.0168433. PMID: 27992523; PMCID: PMC5161505.

153. Moses IB, Esimone CO, Iroha IR, Rubin JE, Sniatynsky MK, Ribeiro ÁCDS, Santos FF, Cayo da Silva R, Gales AC. Antibiotypes and high frequency of toxin genes in methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius from nares of dogs and dog

guardians in Nigeria. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2022 Oct;89:101870. doi: 10.1016/j.cimid.2022.101870. Epub 2022 Sep 6. PMID: 36088796.

154. Moses IB, Santos FF, Gales AC. Human Colonization and Infection by *Staphylococcus pseudintermedius*: An Emerging and Underestimated Zoonotic Pathogen. Microorganisms. 2023 Feb 25;11(3):581. doi: 10.3390/microorganisms11030581. PMID: 36985155; PMCID: PMC10057476.

155. Moura GS, Saraiva MMS, Stipp DT, Gebreyes WA, Oliveira CJB. Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 causing severe mastitis in a meat sheep herd in the United States. Am J Vet Res. 2024 Nov 1;86(1):ajvr.24.05.0137. doi: 10.2460/ajvr.24.05.0137. PMID: 39488073.

156. Müller E, Monecke S, Armengol Porta M, Narvaez Encalada MV, Reissig A, Rüttiger L, Schröttner P, Schwede I, Söffing HH, Thürmer A, Ehricht R. Rapid Detection of Panton-Valentine Leukocidin Production in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* from Saxony and Brandenburg and Their Molecular Characterisation. Pathogens. 2025 Mar 1;14(3):238. doi: 10.3390/pathogens14030238. PMID: 40137723; PMCID: PMC11945114.

157. Muwonge KM, Ndagire H, Mulindwa J, Twesigye CK. Multiple antimicrobial resistance indices of Staphylococcus aureus from the nares of goats and slaughterhouse attendants in Kampala city, Uganda- a cross sectional study. BMC Microbiol. 2025 Mar 22;25(1):162. doi: 10.1186/s12866-025-03891-y. PMID: 40121403; PMCID: PMC11929349.

158. Muzammil I, Ijaz M, Saleem MH, Ali MM. Molecular characterization of vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolated from bovine milk. Zoonoses Public Health. 2023 Aug;70(5):420-433. doi: 10.1111/zph.13047. Epub 2023 May 10. PMID: 37165559.

159. Nowakowicz-Dębek B, Wlazło Ł, Kasela M, Ossowski M.,Epidemiologia wielolekoopornych szczepów Staphylococcus aureus. Probl. Hig. i Epidemiol. 2016.97, 106–112

160. National Mastitis Council (U.S.). Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. 2004.

161. Nocera FP, Romano A, Arslan S, Schena R, Pizzano F, Cappiello S, Palma CD, Lamagna B, Pompameo M, De Martino L. Occurrence and Antimicrobial Resistance Profiles of Staphylococcus spp. Strains Isolated From Healthy Stray Dogs. Vet Med

Sci. 2025 Sep;11(5):e70599. doi: 10.1002/vms3.70599. PMID: 40944940; PMCID: PMC12433246.

162. Noli Truant S, Redolfi DM, Sarratea MB, Malchiodi EL, Fernández MM. Superantigens, a Paradox of the Immune Response. Toxins (Basel). 2022 Nov 18;14(11):800. doi: 10.3390/toxins14110800. PMID: 36422975; PMCID: PMC9692936.

163. Nowakiewicz A, Ziółkowska G, Zięba P, Gnat S, Wojtanowicz-Markiewicz K, Trościańczyk A. Coagulase-positive Staphylococcus isolated from wildlife: Identification, molecular characterization and evaluation of resistance profiles with focus on a methicillin-resistant strain. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2016 Feb;44:21-8. doi: 10.1016/j.cimid.2015.11.003. Epub 2015 Nov 28. PMID: 26851590.

164. Nowakiewicz A, Zięba P, Gnat S, Osińska M, Łagowski D, Kosior-Korzecka U, Puzio I, Król J. Analysis of the occurrence and molecular characteristics of drug-resistant strains of Enterococcus faecalis isolated from the gastrointestinal tract of insectivorous bat species in Poland: A possible essential impact on the spread of drug resistance? Environ Pollut. 2021 Jan 15;269:116099. doi: 10.1016/j.envpol.2020.116099. Epub 2020 Nov 23. PMID: 33272805.

165. Nowakiewicz A, Zięba P, Gnat S, Trościańczyk A, Osińska M, Łagowski D, Kosior-Korzecka U, Puzio I. A significant number of multi-drug resistant Enterococcus faecalis in wildlife animals; long-term consequences and new or known reservoirs of resistance? Sci Total Environ. 2020 Feb 25;705:135830. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135830. Epub 2019 Dec 2. PMID: 31818604.

166. Nowakiewicz A, Zięba P, Gnat S, Trościańczyk A, Osińska M, Łagowski D, Kosior-Korzecka U, Puzio I. Bats as a reservoir of resistant Escherichia coli: A methodical view. Can we fully estimate the scale of resistance in the reservoirs of free-living animals? Res Vet Sci. 2020 Feb;128:49-58. doi: 10.1016/j.rvsc.2019.10.017. Epub 2019 Oct 30. PMID: 31710964.

167. Nowakiewicz A, Zięba P, Ziółkowska G, Gnat S, Muszyńska M, Tomczuk K, Majer Dziedzic B, Ulbrych Ł, Trościańczyk A. Free-Living Species of Carnivorous Mammals in Poland: Red Fox, Beech Marten, and Raccoon as a Potential Reservoir of Salmonella, Yersinia, Listeria spp. and Coagulase-Positive Staphylococcus. PLoS One. 2016 May 12;11(5):e0155533. doi: 10.1371/journal.pone.0155533. PMID: 27171434; PMCID: PMC4865137.

168.O'Hagan MJH, Pascual-Linaza AV, Couzens C, Holmes C, Bell C, Spence N, Huey RJ, Murphy JA, Devaney R, Lahuerta-Marin A. Estimation of the Prevalence of Antimicrobial Resistance in Badgers (*Meles meles*) and Foxes (*Vulpes vulpes*) in Northern Ireland. Front Microbiol. 2021 Feb 18;12:596891. doi: 10.3389/fmicb.2021.596891. PMID: 33679630; PMCID: PMC7930819.

169.Obaidat MM, Bani Salman AE, Roess AA. High prevalence and antimicrobial resistance of mecA Staphylococcus aureus in dairy cattle, sheep, and goat bulk tank milk in Jordan. Trop Anim Health Prod. 2018 Feb;50(2):405-412. doi: 10.1007/s11250-017-1449-7. Epub 2017 Oct 23. PMID: 29063353.

170.Ojo KK, Striplin MJ, Ulep CC, Close NS, Zittle J, Luis H, Bernardo M, Leitao J, Roberts MC. Staphylococcus efflux msr(A) gene characterized in Streptococcus, Enterococcus, Corynebacterium, and Pseudomonas isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Mar;50(3):1089-91. doi: 10.1128/AAC.50.3.1089-1091.2006. PMID: 16495276; PMCID: PMC1426440.

171.Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Jul;46(7):2155-61. doi: 10.1128/AAC.46.7.2155-2161.2002. PMID: 12069968; PMCID: PMC127318.

172.Osińska M, Nowakiewicz A, Zięba P, Gnat S, Łagowski D, Trościańczyk A. A rich mosaic of resistance in extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli isolated from red foxes (Vulpes vulpes) in Poland as a potential effect of increasing synanthropization. Sci Total Environ. 2022 Apr 20;818:151834. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.151834. Epub 2021 Nov 20. PMID: 34808162.

173.Parisi A, Caruso M, Normanno G, Latorre L, Sottili R, Miccolupo A, Fraccalvieri R, Santagada G. Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in bulk tank milk from southern Italy. Food Microbiol. 2016 Sep;58:36-42. doi: 10.1016/j.fm.2016.03.004. Epub 2016 Mar 10. PMID: 27217357.

174.Pandey GS, Nomura Y, Kobayashi K, Fujise H, Yamada T. Cutaneous staphylococcal granuloma in a free living zebra (Equus burchelli) in Zambia. J Vet Med Sci. 1998 Jan;60(1):137-8. doi: 10.1292/jvms.60.137. PMID: 9492376.

175.Papadopoulos P, Angelidis AS, Papadopoulos T, Kotzamanidis C, Zdragas A, Papa A, Filioussis G, Sergelidis D. Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus (MRSA) in bulk tank milk, livestock and dairy-farm personnel in north-

central and north-eastern Greece: Prevalence, characterization and genetic relatedness. Food Microbiol. 2019 Dec;84:103249. doi: 10.1016/j.fm.2019.103249. Epub 2019 Jun 22. PMID: 31421759.

176. Parco A, Macaluso G, Foti M, Vitale M, Fisichella V, Tolone M, Loria GR. Phenotypic and genotypic study on antibiotic resistance and pathogenic factors of *Staphylococcus aureus* isolates from small ruminant mastitis milk in South of Italy (Sicily). Ital J Food Saf. 2021 Oct 4;10(3):9722. doi: 10.4081/ijfs.2021.9722. PMID: 34733802; PMCID: PMC8513188.

177. Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. Int J Syst Evol Microbiol. 2020 Nov;70(11):5607-5612. doi: 10.1099/ijsem.0.004332. Epub 2020 Jul 23. PMID: 32701423; PMCID: PMC7723251.

178. Paul NC, Bärgman SC, Moodley A, Nielsen SS, Guardabassi L. Staphylococcus pseudintermedius colonization patterns and strain diversity in healthy dogs: a cross-sectional and longitudinal study. Vet Microbiol. 2012 Dec 7;160(3-4):420-7. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.06.012. Epub 2012 Jun 19. PMID: 22770516.

179. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Animals 6 th ed. CLSI Supplement VET 01 S Clinical and Laboratory Standard Institute 2023.

180. Peton V, Le Loir Y. Staphylococcus aureus in veterinary medicine. Infect Genet Evol. 2014 Jan;21:602-15. doi: 10.1016/j.meegid.2013.08.011. Epub 2013 Aug 23. PMID: 23974078.

181. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45. PMID: 11328886; PMCID: PMC55695.

182. Phophi L, Abouelkhair M, Jones R, Henton M, Qekwana DN, Kania SA. The molecular epidemiology and antimicrobial resistance of Staphylococcus pseudintermedius canine clinical isolates submitted to a veterinary diagnostic laboratory in South Africa. PLoS One. 2023 Aug 30;18(8):e0290645. doi: 10.1371/journal.pone.0290645. PMID: 37647319; PMCID: PMC10468042.

183. Pickering AC, Yebra G, Gong X, Goncheva MI, Wee BA, MacFadyen AC, Muehlbauer LF, Alves J, Cartwright RA, Paterson GK, Fitzgerald JR. Evolutionary and Functional Analysis of Coagulase Positivity among the Staphylococci. mSphere.

2021 Aug 25;6(4):e0038121. doi: 10.1128/mSphere.00381-21. Epub 2021 Aug 4. PMID: 34346700; PMCID: PMC8386474.

184.Podkowik M J, Bania J, Schubert J, Bystroń J. Gronkowce koagulazo-ujemne: nowe zagrożenie dla zdrowia publicznego? Życie Weterynaryjne 2014. 89(1). ISSN 0137-6810, 1689-0299

185.Prabhu K, Rao S, Rao V. Inducible Clindamycin Resistance in Staphylococcus aureus Isolated from Clinical Samples. J Lab Physicians. 2011 Jan;3(1):25-7. doi: 10.4103/0974-2727.78558. PMID: 21701659; PMCID: PMC3118052.

186.Preda M, Mihai MM, Popa LI, Dițu LM, Holban AM, Manolescu LSC, Popa GL, Muntean AA, Gheorghe I, Chifiriuc CM, Popa MI. Phenotypic and genotypic virulence features of staphylococcal strains isolated from difficult-to-treat skin and soft tissue infections. PLoS One. 2021 Feb 2;16(2):e0246478. doi: 10.1371/journal.pone.0246478. PMID: 33529240; PMCID: PMC7853507.

187.Radocchia G, Brunetti F, Marazzato M, Totino V, Neroni B, Bonfiglio G, Conte AL, Pantanella F, Ciolli P, Schippa S. Women Skin Microbiota Modifications during Pregnancy. Microorganisms. 2024 Apr 17;12(4):808. doi: 10.3390/microorganisms12040808. PMID: 38674752; PMCID: PMC11051999.

188.Rahbarnia L, Khosravi Rad R, Dehnad AR, Naghili B. The examination of some virulence factors in *S. aureus* isolates obtained from the healthy human population, sheep mastitis, and cheese. Iran J Vet Res. 2023;24(2):110-115. doi: 10.22099/IJVR.2023.43730.6410. PMID: 37790118; PMCID: PMC10542877.

189.Rahman MM, Lecchi C, Fraquelli C, Sartorelli P, Ceciliani F. Acute phase protein response in Alpine ibex with sarcoptic mange. Vet Parasitol. 2010 Mar 25;168(3-4):293-8. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.12.001. Epub 2009 Dec 11. PMID: 20036058.

190.Rajkovic A. Staphylococcus: food poisoning. Encyclopedia of Food and Health. 2016. pp. 133-139. doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00655-3.

191.Ratia C, Sueiro S, Soengas RG, Iglesias MJ, López-Ortiz F, Soto SM. Gold(III) Complexes Activity against Multidrug-Resistant Bacteria of Veterinary Significance. Antibiotics (Basel). 2022 Dec 1;11(12):1728. doi: 10.3390/antibiotics11121728. PMID: 36551386; PMCID: PMC9774617.

192.Renna MS, Silvestrini P, Beccaria C, Velázquez NS, Baravalle C, Engler C, Pereyra EAL, Calvinho LF, Dallard BE. Effects of chronic Staphylococcus aureus infection on immunological parameters and functionality of macrophages isolated from bovine

mammary secretions. Microb Pathog. 2019 Dec;137:103743. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103743. Epub 2019 Sep 9. PMID: 31513899.

193. Robb AR, Ure R, Chaput DL, Foster G. Emergence of novel methicillin resistant Staphylococcus pseudintermedius lineages revealed by whole genome sequencing of isolates from companion animals and humans in Scotland. PLoS One. 2024 Jul 5;19(7):e0305211. doi: 10.1371/journal.pone.0305211. PMID: 38968222; PMCID: PMC11226068.

194. Roberts MC, Feßler AT, Monecke S, Ehricht R, No D, Schwarz S. Molecular Analysis of Two Different MRSA Clones ST188 and ST3268 From Primates (*Macaca* spp.) in a United States Primate Center. Front Microbiol. 2018 Oct 9;9:2199. doi: 10.3389/fmicb.2018.02199. PMID: 30356855; PMCID: PMC6190752.

195. Roer L, Yin N, Denis O, Vendrik KE, Zwittink RD, Notermans DW, Perrin M, Khonyongwa K, Tristan A, Youenou B, Layer-Nicolaou F, Werner G, Enger H, Eikrem ECH, Darenberg J, Mäkitalo B, Paulsson M, Björkman J, Fang H, Hallbäck ET, Sundqvist M, Lindholm L, Moganeradj K, García-Cobos S, Cañada-García JE, Holzknecht BJ, Eriksen HB, Hoppe M, Bartels MD, Samaniego Castruita JA, Urth TR, Larsen AR, Petersen A. Spread of the FAR-MRSA clone, a fusidic acid- and meticillin-resistant Staphylococcus aureus ST121, Europe, 2014 to 2024. Euro Surveill. 2025 Jul;30(28):2500452. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2025.30.28.2500452. PMID: 40682456; PMCID: PMC12273254.

196. Rossi BF, Bonsaglia ÉCR, Castilho IG, Dantas STA, Langoni H, Pantoja JCF, Júnior AF, Gonçalves JL, Santos MV, Mota RA, Rall VLM. First investigation of Staphylococcus argenteus in a Brazilian collections of S. aureus isolated from bovine mastitis. BMC Vet Res. 2020 Jul 20;16(1):252. doi: 10.1186/s12917-020-02472-7. PMID: 32690007; PMCID: PMC7372812.

197. Roșu RD, Morar A, Ban-Cucerzan A, Imre M, Popa SA, Pătrînjan RT, Pocinoc A, Imre K. Raw Sheep Milk as a Reservoir of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*: Evidence from Traditional Farming Systems in Romania. Antibiotics (Basel). 2025 Aug 2;14(8):787. doi: 10.3390/antibiotics14080787. PMID: 40867982; PMCID: PMC12382675.

198. Rubin JE, Chirino-Trejo M. Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among Staphylococcus pseudintermedius isolated from healthy dogs in

Saskatoon, Canada. J Vet Diagn Invest. 2011 Mar;23(2):351-4. doi: 10.1177/104063871102300227. PMID: 21398462.

199. Ruiz-Ripa L, Simón C, Ceballos S, Ortega C, Zarazaga M, Torres C, Gómez-Sanz E. S. pseudintermedius and S. aureus lineages with transmission ability circulate as causative agents of infections in pets for years. BMC Vet Res. 2021 Jan 21;17(1):42. doi: 10.1186/s12917-020-02726-4. PMID: 33478473; PMCID: PMC7819200.

200. Ruzauskas M, Couto N, Pavilonis A, Klimiene I, Siugzdiniene R. Virgailis M, Sakalauskas P, Lipatova I, Radzijevskaja J, Paulauskas A. Pathogen screening in the red fox (Vulpes Vulpes) from Lithuania. Biologija. 2019. 65(4), 283–295 doi.org/10.6001/biologija.v65i4.4122.

201. Saad T, Naguib D, Gwida M, Elgohary A, Mohamed A. Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolated from Shepherds and Apparently Healthy Goats and Sheep in Egypt. Egypt J. Vet. Sci. 2024. 1-10. doi: 10.21608/ejvs.2024.311375.2313.

202. Sakalauskas P, Lipatova I, Radzijevskaja J, Paulauskas A. Pathogen screening in the red fox (*Vulpes Vulpes*) from Lithuania. Biologija. 2019.65(4), 283–295 doi.org/10.6001/biologija.v65i4.4122.

203. Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirotaki S, Kawakami T, Fukata T, Hiramatsu K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. J Clin Microbiol. 2010 Mar;48(3):765-9. doi: 10.1128/JCM.01232-09. Epub 2010 Jan 6. PMID: 20053855; PMCID: PMC2832457.

204. Scholtzek AD, Hanke D, Walther B, Eichhorn I, Stöckle SD, Klein KS, Gehlen H, Lübke-Becker A, Schwarz S, Feßler AT. Molecular Characterization of Equine *Staphylococcus aureus* Isolates Exhibiting Reduced Oxacillin Susceptibility. Toxins (Basel). 2019 Sep 13;11(9):535. doi: 10.3390/toxins11090535. PMID: 31540335; PMCID: PMC6783909.

205. Schwarz S, Shen J, Wendlandt S, Feßler AT, Wang Y, Kadlec K, Wu CM. Plasmid-Mediated Antimicrobial Resistance in Staphylococci and Other Firmicutes. Microbiol Spectr. 2014 Dec;2(6). doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0020-2014. PMID: 26104453.

206. Sezzi E, Fanelli R, Gobbi D, Scandurra P, Mannucci V, Usai I, Ragionieri G, Mezher Z, Fichi G. An Investigation of Virulence Genes of *Staphylococcus aureus* in Autologous Vaccines Against Sheep Mastitis. Animals (Basel). 2024 Nov 6;14(22):3172. doi: 10.3390/ani14223172. PMID: 39595225; PMCID: PMC11591023.

207. Sfaciotte RAP, Parussolo L, Melo FD, Schneider MF, da Costa UM, Schwarz DGG, Salbego FZ, Ferraz SM. Vancomycin-resistant Enterococcus (VRE) isolates from dogs and cats in veterinary hospitals in Brazil. BMC Vet Res. 2025 Feb 25;21(1):99. doi: 10.1186/s12917-025-04557-7. PMID: 39994632; PMCID: PMC11852552.
208. Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2013 Jan;13(1):43-54. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70238-4. Epub 2012 Oct 26. PMID: 23103172; PMCID: PMC3530297.
209. Silverman ES, Palmer LJ, Subramaniam V, Hallock A, Mathew S, Vallone J, Faffe DS, Shikanai T, Raby BA, Weiss ST, Shore SA. Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2004 Jan 15;169(2):214-9. doi: 10.1164/rccm.200307-973OC. Epub 2003 Nov 3. PMID: 14597484.
210. Simpson VR, Davison NJ, Kearns AM, Pichon B, Hudson LO, Koylass M, Blackett T, Butler H, Rasigade JP, Whatmore AM. Association of a lukM-positive clone of Staphylococcus aureus with fatal exudative dermatitis in red squirrels (Sciurus vulgaris). Vet Microbiol. 2013 Mar 23;162(2-4):987-991. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.10.025. Epub 2012 Nov 2. PMID: 23182436.
211. Skarżyńska M, Leekitcharoenphon P, Hendriksen RS, Aarestrup FM, Wasyl D. A metagenomic glimpse into the gut of wild and domestic animals: Quantification of antimicrobial resistance and more. PLoS One. 2020 Dec 3;15(12):e0242987. doi: 10.1371/journal.pone.0242987. PMID: 33270717; PMCID: PMC7714112.
212. Smith TC. Livestock-associated Staphylococcus aureus: the United States experience. PLoS Pathog. 2015 Feb 5;11(2):e1004564. doi: 10.1371/journal.ppat.1004564. PMID: 25654425; PMCID: PMC4412291.
213. Smreczak M, Orłowska A, Trębas P, Stolarek A, Freuling C, Müller T. Re-emergence of rabies in Mazowieckie Voivodeship, Poland, 2021. Zoonoses Public Health. 2023 Feb;70(1):111-116. doi: 10.1111/zph.13005. Epub 2022 Oct 12. PMID: 36225087.
214. Sobkowich KE, Hui AY, Poljak Z, Szlosek D, Plum A, Weese JS. Nationwide analysis of methicillin-resistant staphylococci in cats and dogs: resistance patterns and geographic distribution. Am J Vet Res. 2025 Feb 10;86(3):ajvr.24.09.0253. doi: 10.2460/ajvr.24.09.0253. PMID: 39929078.
215. Solyman SM, Black CC, Duim B, Perreten V, van Duijkeren E, Wagenaar JA, Eberlein LC, Sadeghi LN, Videla R, Bemis DA, Kania SA. Multilocus sequence

typing for characterization of Staphylococcus pseudintermedius. J Clin Microbiol. 2013 Jan;51(1):306-10. doi: 10.1128/JCM.02421-12. Epub 2012 Oct 31. PMID: 23115265; PMCID: PMC3536184.

216. Sordillo EM, Polsky B. Infections in Pregnancy. Principles of Gender-Specific Medicine. 2010. 531–62. doi: 10.1016/B978-0-12-374271-1.00047-2.

217. Sousa M, Silva N, Manageiro V, Ramos S, Coelho A, Gonçalves D, Caniça M, Torres C, Igrejas G, Poeta P. First report on MRSA CC398 recovered from wild boars in the north of Portugal. Are we facing a problem? Sci Total Environ. 2017 Oct 15;596-597:26-31. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.054. Epub 2017 Apr 14. PMID: 28412568.

218. Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol. 2003 Sep;41(9):4089-94. doi: 10.1128/JCM.41.9.4089-4094.2003. PMID: 12958230; PMCID: PMC193808.

219. Thompson-Crispi K, Atalla H, Miglior F, Mallard BA. Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. Front Immunol. 2014 Oct 7;5:493. doi: 10.3389/fimmu.2014.00493. PMID: 25339959; PMCID: PMC4188034.

220. Thomsen M, Künstner A, Wohlers I, Olbrich M, Lenfers T, Osumi T, Shimazaki Y, Nishifuji K, Ibrahim SM, Watson A, Busch H, Hirose M. A comprehensive analysis of gut and skin microbiota in canine atopic dermatitis in Shiba Inu dogs. Microbiome. 2023 Oct 21;11(1):232. doi: 10.1186/s40168-023-01671-2. PMID: 37864204; PMCID: PMC10590023.

221. Tommasoni C, Fiore E, Lisuzzo A, Gianesella M. Mastitis in Dairy Cattle: On-Farm Diagnostics and Future Perspectives. Animals (Basel). 2023 Aug 6;13(15):2538. doi: 10.3390/ani13152538. PMID: 37570346; PMCID: PMC10417731.

222. Touaitia R, Ibrahim NA, Abdullah Almuqri E, Basher NS, Idres T, Touati A. Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1) in *Staphylococcus aureus*: Prevalence, Molecular Mechanisms, and Public Health Implications. Toxins (Basel). 2025 Jun 24;17(7):323. doi: 10.3390/toxins17070323. PMID: 40711134; PMCID: PMC12298739.

223. Trościańczyk A, Nowakiewicz A, Kasela M, Malm A, Tracz AM, Hahaj-Siembida A, Osińska M, Gula S, Jankowiak I. Multi-Host Pathogen *Staphylococcus aureus*-Epidemiology, Drug Resistance and Occurrence in Humans and Animals in Poland. Antibiotics (Basel). 2023 Jun 30;12(7):1137. doi: 10.3390/antibiotics12071137. PMID: 37508233; PMCID: PMC10376275.

224.Trzcinski K, Cooper BS, Hryniewicz W, Dowson CG. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Antimicrob Chemother. 2000 Jun;45(6):763-70. doi: 10.1093/jac/45.6.763. PMID: 10837427.

225.Truszczyński M, Pejsak Z. Zoonotyczne znaczenie zwierzęcego rezerwuaru gronkowca złocistego opornego na metycylinę. Medycyna Wet. 2009, 65 (2)

226.Truszczyński M, Pejsak Z. „Jedno Zdrowie" – koncepcja łącząca działalność naukową i praktyczną z zakresu ochrony zdrowia człowieka i zwierząt. Życie Weterynaryjne / 2015 /90(5)

227. Tuffs SW, Goncheva MI, Xu SX, Craig HC, Kasper KJ, Choi J, Flannagan RS, Kerfoot SM, Heinrichs DE, McCormick JK. Superantigens promote *Staphylococcus aureus* bloodstream infection by eliciting pathogenic interferon-gamma production. Proc Natl Acad Sci U S A. 2022 Feb 22;119(8):e2115987119. doi: 10.1073/pnas.2115987119. PMID: 35165181; PMCID: PMC8872782.

228.Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, Holland TL, Fowler VG Jr. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. Nat Rev Microbiol. 2019 Apr;17(4):203-218. doi: 10.1038/s41579-018-0147-4. PMID: 30737488; PMCID: PMC6939889.

229.Uchida-Fujii E, Niwa H, Kanai K, Kinoshita Y, Kuroda T, Nukada T, Ueno T. Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 1, *spa* type t1784, in an equine hospital in Japan. Vet Anim Sci. 2022 Jun 25;17:100259. doi: 10.1016/j.vas.2022.100259. PMID: 35800153; PMCID: PMC9253831.

230.Ünal N, Askar Ş, Macun HC, Sakarya F, Altun B, Yıldırım M. Panton-Valentine leukocidin and some exotoxins of Staphylococcus aureus and antimicrobial susceptibility profiles of staphylococci isolated from milks of small ruminants. Trop Anim Health Prod. 2012 Mar;44(3):573-9. doi: 10.1007/s11250-011-9937-7. Epub 2011 Jul 29. PMID: 21800213.

231.Vasileiou NGC, Chatzopoulos DC, Sarrou S, Fragkou IA, Katsafadou AI, Mavrogianni VS, Petinaki E, Fthenakis GC. Role of staphylococci in mastitis in sheep. J Dairy Res. 2019 Aug;86(3):254-266. doi: 10.1017/S0022029919000591. Epub 2019 Aug 19. PMID: 31423957.

232.Vasileiou NGC, Mavrogianni VS, Petinaki E, Fthenakis GC. Predisposing factors for bacterial mastitis in ewes. Reprod Domest Anim. 2019 Oct;54(10):1424-1431. doi: 10.1111/rda.13541. Epub 2019 Aug 27. PMID: 31361921.

233. Ruzauskas M, Couto N, Pavilonis A, Klimiene I, Siugzdiniene R, Virgailis M, Vaskeviciute L, Anskiene L, Pomba C. Characterization of Staphylococcus pseudintermedius isolated from diseased dogs in Lithuania. Pol J Vet Sci. 2016;19(1):7-14. doi: 10.1515/pjvs-2016-0002. PMID: 27096782.

234. Vautor E, Abadie G, Guibert JM, Chevalier N, Pépin M. Nasal carriage of Staphylococcus aureus in dairy sheep. Vet Microbiol. 2005 Apr 10;106(3-4):235-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.11.019. PMID: 15778029.

235. Vautor E, Cockfield J, Le Marechal C, Le Loir Y, Chevalier M, Robinson DA, Thiery R, Lindsay J. Difference in virulence between Staphylococcus aureus isolates causing gangrenous mastitis versus subclinical mastitis in a dairy sheep flock. Vet Res. 2009 Nov-Dec;40(6):56. doi: 10.1051/vetres/2009039. Epub 2009 Jul 7. PMID: 19576164; PMCID: PMC2733328.

236. Vercelli C, Gambino G, Amadori M, Re G. Implications of Veterinary Medicine in the comprehension and stewardship of antimicrobial resistance phenomenon. From the origin till nowadays. Vet Anim Sci. 2022 Mar 30;16:100249. doi: 10.1016/j.vas.2022.100249. PMID: 35479515; PMCID: PMC9036142.

237. Víchová B, Bona M, Miterpáková M, Kraljik J, Čabanová V, Nemčíková G, Hurníková Z, Oravec M. Fleas and Ticks of Red Foxes as Vectors of Canine Bacterial and Parasitic Pathogens, in Slovakia, Central Europe. Vector Borne Zoonotic Dis. 2018 Nov;18(11):611-619. doi: 10.1089/vbz.2018.2314. Epub 2018 Jul 17. PMID: 30016223.

238. Viegas FM, Santana JA, Silva BA, Xavier RGC, Bonisson CT, Câmara JLS, Rennó MC, Cunha JLR, Figueiredo HCP, Lobato FCF, Silva ROS. Occurrence and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus spp. in diseased dogs in Brazil. PLoS One. 2022 Jun 3;17(6):e0269422. doi: 10.1371/journal.pone.0269422. PMID: 35657980; PMCID: PMC9165789.

239. Vitali LA, Beghelli D, Balducci M, Petrelli D. Draft genome of an extremely drug-resistant st551 Staphylococcus pseudintermedius from an Italian dog with otitis externa. J Glob Antimicrob Resist. 2021 Jun;25:107-109. doi: 10.1016/j.jgar.2021.02.025. Epub 2021 Mar 1. PMID: 33662646.

240. Wang N, Luo J, Deng F, Huang Y, Zhou H. Antibiotic Combination Therapy: A Strategy to Overcome Bacterial Resistance to Aminoglycoside Antibiotics. Front Pharmacol. 2022 Feb 23;13:839808. doi: 10.3389/fphar.2022.839808. PMID: 35281905; PMCID: PMC8905495.

241. Wang Z, Guo L, Li J, Li J, Cui L, Dong J, Meng X, Qian C, Wang H. Antibiotic resistance, biofilm formation, and virulence factors of isolates of *staphylococcus pseudintermedius* from healthy dogs and dogs with keratitis. Front Vet Sci. 2022 Aug 10;9:903633. doi: 10.3389/fvets.2022.903633. PMID: 36032292; PMCID: PMC9399793.

242. Werckenthin C, Cardoso M, Martel JL, Schwarz S. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine Staphylococcus aureus, porcine Staphylococcus hyicus, and canine Staphylococcus intermedius. Vet Res. 2001 May-Aug;32(3-4):341-62. doi: 10.1051/vetres:2001129. PMID: 11432424.

243. Wesołowska M, Szczuka E. Occurrence and Antimicrobial Resistance among Staphylococci Isolated from the Skin Microbiota of Healthy Goats and Sheep. Antibiotics (Basel). 2023 Nov 5;12(11):1594. doi: 10.3390/antibiotics12111594. PMID: 37998796; PMCID: PMC10668681.

244. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

245. Wierzbicki H, Zatoń-Dobrowolska M, Mucha A, Moska M. Insight into the Genetic Population Structure of Wild Red Foxes in Poland Reveals Low Risk of Genetic Introgression from Escaped Farm Red Foxes. Genes (Basel). 2021 Apr 25;12(5):637. doi: 10.3390/genes12050637. PMID: 33922932; PMCID: PMC8146073.

246. Wodecka B, Michalik J, Grochowalska R. Red Foxes (*Vulpes vulpes*) Are Exposed to High Diversity of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Species Infecting Fox-Derived *Ixodes* Ticks in West-Central Poland. Pathogens. 2022 Jun 16;11(6):696. doi: 10.3390/pathogens11060696. PMID: 35745549; PMCID: PMC9229790.

247. Woolhouse M, Ward M, van Bunnik B, Farrar J. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015 Jun 5;370(1670):20140083. doi: 10.1098/rstb.2014.0083. PMID: 25918441; PMCID: PMC4424433.

248. Yarbrough ML, Lainhart W, Burnham CA. Epidemiology, Clinical Characteristics, and Antimicrobial Susceptibility Profiles of Human Clinical Isolates of Staphylococcus intermedius Group. J Clin Microbiol. 2018 Feb 22;56(3):e01788-17. doi: 10.1128/JCM.01788-17. PMID: 29305548; PMCID: PMC5824035.

249. Yudhanto S, Hung CC, Maddox CW, Varga C. Antimicrobial Resistance in Bacteria Isolated From Canine Urine Samples Submitted to a Veterinary Diagnostic Laboratory, Illinois, United States. Front Vet Sci. 2022 May 4;9:867784. doi: 10.3389/fvets.2022.867784. PMID: 35601398; PMCID: PMC9114880.

250. Yoon JW, Lee GJ, Lee SY, Park C, Yoo JH, Park HM. Prevalence of genes for enterotoxins, toxic shock syndrome toxin 1 and exfoliative toxin among clinical isolates of Staphylococcus pseudintermedius from canine origin. Vet Dermatol. 2010 Oct;21(5):484-9. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00874.x. Epub 2010 May 24. PMID: 20500497.

251. Yu W, Kim HK, Rauch S, Schneewind O, Missiakas D. Pathogenic conversion of coagulase-negative staphylococci. Microbes Infect. 2017 Feb;19(2):101-109. doi: 10.1016/j.micinf.2016.12.002. Epub 2016 Dec 21. PMID: 28012900; PMCID: PMC5274588.

252. Zeder MA. Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Aug 19;105(33):11597-604. doi: 10.1073/pnas.0801317105. Epub 2008 Aug 12. PMID: 18697943; PMCID: PMC2575338.

253. Zhang H, Monk IR, Braverman J, Jones CM, Brooks AG, Stinear TP, Wakim LM. Staphylococcal superantigens evoke temporary and reversible T cell anergy, but fail to block the development of a bacterium specific cellular immune response. Nat Commun. 2024 Nov 14;15(1):9872. doi: 10.1038/s41467-024-54074-8. PMID: 39543088; PMCID: PMC11564628.

254. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. Int Anesthesiol Clin. 2007 Spring;45(2):27-37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e. PMID: 17426506; PMCID: PMC2785020.

255. Zhao H, Wang X, Wang B, Xu Y, Rao L, Wan B, Guo Y, Wu X, Yu J, Chen L, Li M, Yu F. The Prevalence and Determinants of Fusidic Acid Resistance Among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates in China. Front Med (Lausanne). 2021 Nov 30;8:761894. doi: 10.3389/fmed.2021.761894. PMID: 34917634; PMCID: PMC8669822.

256. Zhu Y, Liu J, Guo K, Qiu J, Cheng Z, Liu F, Zhao Y, Zhang D, Guo H, Li H. Outbreak of a novel disease caused by Staphylococcus pseudintermedius in raccoon dogs (Nyctereutes procyonoides). Transbound Emerg Dis. 2021 Jul;68(4):1995-2004. doi: 10.1111/tbed.13847. Epub 2020 Oct 12. PMID: 32966709.

Research in Veterinary Science 166 (2024) 105111

Contents lists available at ScienceDirect

Research in Veterinary Science

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

Red foxes (*Vulpes vulpes*) as a specific and underappreciated reservoir of resistant and virulent coagulase-positive *Staphylococcus* spp. strains

Agata Hahaj-Siembida [a], Aneta Nowakiewicz [a,*], Agnieszka Korzeniowska-Kowal [b], Kamila Szecówka [b], Aleksandra Trościańczyk [a], Przemysław Zięba [c], Monika Greguła Kania [d]

[a] Sub-Department of Veterinary Microbiology, Department of Preclinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences, Akademicka 12, 20-033 Lublin, Poland
[b] Polish Collection of Microorganisms (PCM), Department of Immunology of Infectious Diseases, Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wroclaw, Poland
[c] State Veterinary Laboratory, Droga Męczenników Majdanka 50, 20-325 Lublin, Poland
[d] Department of Animal Breeding and Agricultural Advisory, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Coagulase-positive *Staphylococcus*
Red foxes
Drug resistance
Virulence
One health

ABSTRACT

The aim of the study was to analyze the presence of coagulase-positive *Staphylococcus* in swabs collected from red foxes and to characterize the drug resistance and virulence of these bacteria. In total, 415 rectal and oral swabs were collected, and coagulase-positive strains of *S. pseudintermedius* ($n = 104$) and *S. aureus* ($n = 27$) were identified using multiplex-PCR and MALDI TOF MS. Subsequent analyses showed the highest phenotypic resistance of the strains to penicillin (16.8%) and tetracycline (30.5%) confirmed by the presence of the *bla*Z, *tet*M, and *tet*K genes. Slightly lower resistance to erythromycin (6.9%), clindamycin (9.2%), gentamicin, streptogramins, rifampicin, nitrofurantoin, and sulphamethoxazol/trimetophrim was exhibited by single strains.

Several virulence genes in a few different combinations were detected in *S. aureus*; *Luk*E-*Luk*D, and *se*B were the most frequent genes (37%), *Luk*E-*Luk*D, *se*B, and *se*C were detected in 11% of the strains, and PVL, *et*A, *et*B, and *tst* genes were present in two or single strains.

The results of our research have confirmed that the red fox is an underestimated reservoir of coagulase-positive *Staphylococcus* strains, with approximately 50% of carriers of at least one resistance gene. In turn, 88.8% of the *S. aureus* strains had one or more virulence genes; therefore, this species of wildlife animals should be monitored as part of epidemiological surveillance.

1. Background

The red fox (*Vulpes vulpes*) is a representative of the canid family (Canidae). This species occurs commonly in some parts of Asia, Europe, northern America, and Africa. In Central Europe, it is the most numerous wild species of the canid family (Karamon et al., 2014, 2018; Wodecka et al., 2022). In Poland, the wild population of the red fox is estimated at 200–250 thousand individuals (Nowakiewicz et al., 2016; Wierzbicki et al., 2021).

Due to the great adaptability of this species to more or less urbanized environments and the official activities related to combating diseases threatening the red fox population (obligatory vaccinations against rabies), a very rapid increase in the number of these animals was observed in Poland between the end of the 20th century and the first decade of the 21st century (Jackowiak et al., 2021). Typically, red foxes inhabit forests, fields, and agricultural areas. However, due to the easy access to food in urban areas and the progressive synanthropization of this animal species, foxes can increasingly be seen interacting with humans or other species of domesticated animals in city centers (Jackowiak et al., 2021; Karamon et al., 2018). Therefore, they may acquire or share microbiota (including pathogens) with different host species.

The red fox has been analyzed as a reservoir of pathogens responsible for typical zoonoses diagnosed in Poland, i.e. rabies (Smreczak et al., 2023), echinococcosis (Karamon et al., 2014), various *Trichinella* spp.

* Corresponding author.
E-mail addresses: agata.hahaj-siembida@up.lublin.pl (A. Hahaj-Siembida), aneta.nowakiewicz@up.lublin.pl (A. Nowakiewicz), agnieszka.korzeniowska-kowal@hirszfeld.pl (A. Korzeniowska-Kowal), kamila.szecowka@hirszfeld.pl (K. Szecówka), aleksandra.troscianczyk@up.lublin.pl (A. Trościańczyk), monika.gregulakania@up.lublin.pl (M.G. Kania).

https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.105111
Received 18 June 2023; Received in revised form 3 December 2023; Accepted 7 December 2023
Available online 13 December 2023
0034-5288/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

infections (Cybulska et al., 2016), and scabies (Kołodziej-Sobocińska et al., 2014), which are regarded as vector-borne diseases. As shown by Wodecka et al. (2022), over 32% of *Ixodes* tick species parasitizing foxes are vectors of *Borrelia* spp., including human pathogens. Only single studies have been conducted to determine the drug resistance of microorganisms present in these animals in Poland (Nowakiewicz et al., 2016; Osińska et al., 2022; Skarżyńska et al., 2020).

However, there are still insufficient data on the occurrence of other pathogenic bacteria in red foxes both in Poland and in other countries of the world (Ebani et al., 2022; Vıchova et al., 2018). Moreover, the available findings cover a small group of animals and cannot be regarded as representative results, also in the case of the colonization of the red fox by bacteria of the genus *Staphylococcus.* Available research results are mainly focused on methicillin-resistant strains (MRSA) (Carson et al., 2016; Monecke et al., 2016). As highlighted by Nielsen et al. (2020), the data on the colonization of the red fox by *S. pseudintermedius* are limited to North American studies only.

Bacteria of the *Staphylococcus* genus have a dual nature. On the one hand, similar to *E. coli* or *Enterococcus*, these bacteria are a natural component of the skin and mucous membrane biota in animals and humans; on the other hand, they are responsible for local or generalized infection (sepsis), food poisoning, or even lethal septic shock-inducing infections (Monecke et al., 2016). In this genus, coagulase-positive *Staphylococcus* strains (CoPS) are regarded to have a particular status of potentially pathogenic species (Yu et al., 2017) due to their ability to produce many virulence factors, including free coagulase (Preda et al., 2021). The best-studied species in this group is *S. aureus*, and the greatest epidemiological importance for humans and animals is ascribed to strains with resistance to beta-lactams and/or multidrug resistance (MDR), i.e. hospital-associated MRSA (HA-MRSA), community-associated MRSA (CA -MRSA), and livestock-associated MRSA (LA-MRSA) (Dong et al., 2021). Methicillin resistance or multidrug resistance in these strains is very often associated with the presence of virulence factors, e.g. PVL, enterotoxins, or TSST-1, which makes these bacteria "superbugs" posing a serious threat to public health (Dong et al., 2021). *S. pseudintermedius*, i.e. the second epidemiologically most important species among CoPS, is responsible for infections primarily in canines and in humans (Börjesson et al., 2015; Kmieciak and Szewczyk, 2017). However, this species is much less known, and its epidemiological characteristics have mainly been determined in strains isolated from healthy or diseased dogs (Abdullahi et al., 2022; Carroll et al., 2021; Glajzner et al., 2023; Ruzauskas et al., 2016).

Therefore, we hypothesized that the red fox may be a relevant carrier of coagulase-positive staphylococci with epidemiologically important resistance and virulence characteristics. The increasing synanthropization of the red fox may primarily be reflected in the profile of drug resistance and in the virulence of CoPS colonizing its digestive and upper respiratory tract. Moreover, our previous studies on the resistance and virulence of other species of indicator bacteria in wildlife animals in Poland have shown a very high (over 50%) percentage of carriers of multidrug-resistant strains with highly diverse profiles of virulence genes (Nowakiewicz et al., 2020a, Nowakiewicz et al., 2020b; Nowakiewicz et al., 2021; Osińska et al., 2022).

Therefore, taking into account the common occurrence of the red fox in Poland and its close contact with humans as well as the zoonotic potential of coagulase-positive *Staphylococcus* species, the aim of the study was to analyze the occurrence of this group of bacteria in the red fox population and to characterize their drug resistance and virulence in the zoonotic aspect.

2. Materials and methods

2.1. Collection of animal samples, isolation of bacteria, and identification of species

The material for the study was collected as oral and rectal swabs from 209 red foxes (*Vulpes vulpes*) culled in the south-eastern region of Poland. In total, 415 samples were obtained (206 swabs from the rectum and 209 swabs from the mouth). Since Poland is still not a rabies-free country, monitoring of this disease in the red fox is carried out annually (controlled culling of animals) in compliance with the applicable law (European Commission Directorate, 2021). Therefore, the material for the study was collected from the foxes post mortem by qualified veterinary personnel in the State Veterinary Laboratory (ZHW) and, until a negative result was obtained from a given animal, the material was stored at −80°C for a maximum of 30 days. Subsequently, the swabs were subjected to microbiological tests (culture and identification) carried out at the Sub-Department of Veterinary Microbiology, University of Life Sciences in Lublin. In the first stage, the swabs were cultured in nutrient broth supplemented with 6.5% NaCl (Biomaxima, Lublin Poland) for 24 h at the temperature of 37°C. Standard selection and differentiation media dedicated to isolation of *Staphylococcus* spp. (Mannitol Salt LAB Agar and Baird Parker LAB agar, Biomaxima, Lublin, Poland) were used sequentially for further cultures (each stage was performed at 37°C for 24 h). Simultaneously, the samples were cultured on the Chromagar MRSA medium (Graso Biotech, Poland) and incubated in the same conditions. Then, one typical colony was selected from each positive sample, plated on nutrient agar, and further analyzed. Gram staining (Gram Staining Kit), catalase (hydrogen peroxide 3% solution), and coagulase assays (BBL™ Coagulase Plasma) were performed in accordance with the manufacturers' instructions (BD Polska sp. z o.o., Warsaw, Poland, Merck, sp. z o.o., Warsaw, Poland).

The analysis of all the bacterial isolates was performed using the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI TOF) method. Ribosomal proteins were extracted from each isolate using the ethanol/formic acid extraction method to receive high quality mass spectra. For the extraction, from one to five colonies of freshly grown cultures incubated on Nutrient Agar at 37°C for 24 h were collected and suspended in 300 µl of double-distilled water. Next, 900 lL of absolute ethanol was added. The samples were mixed using a vortex mixer for 30 s and then centrifuged for 2 min at 13000 ×*g*. The supernatant was removed and the pellet was dried at room temperature. Subsequently, 25 µl of a 70% formic acid solution was added and the sample was carefully mixed. Next, 25 µl of acetonitrile was added and the sample was mixed again. The samples were centrifuged for 2 min at 13000 ×*g*. The supernatant (1 µl) was then transferred onto the MSP 96 target polished steel BC plate and left for 15 min at room temperature to dry. Next, the same amount of the HCCA (α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid) matrix was placed on top of the dry samples and again the plate was left for 15 min at room temperature. The target plate was loaded into the MALDI Biotyper sirius mass spectrometer (Bruker, laser frequency: 200 Hz) and mass spectra of extracted ribosomal proteins were acquired using flexControl Version 3.4 software. Each of the bacterial mass spectra was acquired by averaging 1500 laser shots from three spot positions. The spectra were externally calibrated using an *E. coli* DH5-alpha standard (Bruker). The calibrant consisted of six ribosomal proteins from *E. coli* with RNAse A and myoglobin added to cover a range of 3637.8–16,952.3 Da. The MBT Compass 4.1, MALDI Biotyper Compass Explorer 4.1 software, and the MBT Compass Library Revision H (2022) (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG) database containing 3893 species/entries were used to identify the mass spectra. As specified by the manufacturer's instruction, the identification scores are classified as follows:

2.300–3.000: Highly probable species identification

2.000–2.299: Secure genus identification, probable species identification

1.700–1.999: Probable genus identification

0.000–1.699: No reliable identification

The coagulase-positive strains with an identification score in the range from 3.000 to 1.700 log were confirmed additionally by the molecular method based on *nuc* gene polymorphism analysis (Sasaki et al., 2010).

Bacterial DNA was isolated using the Gram Plus and Yeast Genomic DNA Purification Kit (Eurx, Gdańsk, Poland) following the manufacturer's instructions. The amplification was carried out in the conditions described above using the Silver Taq Mix (Syngen Biotech, Wrocław, Poland) and appropriate primers (Genomed, Warsaw, Poland).

2.2. Disk diffusion test

The drug resistance of the coagulase-positive species was assessed with the disk diffusion method on Mueller Hilton medium (Biomaxima, Lublin Poland). Fourteen disks were impregnated with the following antibiotics: erythromycin 15 μg, oxacillin 1 μg, cefoxitin 30 μg, gentamicin 10 μg, rifampicin 5 μg, quinupristin/dalfopristin 15 μg, clindamycin 2 μg (alone and in tests for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* spp.), penicillin G 10 U, sulphamethoxazole/trimethoprim 25 μg, tetracycline 30 μg, nitrofurantoin 300 μg, linezolid 30 μg, ciprofloxacin 5 μg, and chloramphenicol 30 μg (Thermo Scientific™ Oxoid™). The procedure and interpretation of the assessment results complied with the recommendations from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI VET 01 S, 2023; CLSI M100-ED33, 2023). *S. aureus* ATCC 25923 was used as a quality control. The multidrug resistance of the strains was classified according to criteria described by Magiorakos et al. (2012).

2.3. Detection of resistance and virulence genes

The coagulase-positive strains were tested for the presence of genes encoding phenotypic resistance. The following genes were selected: *mec*A, *mec*C, *bla*Z (resistance to beta lactams), *erm*A, *erm*B, *erm*C, *msr*A (resistance to macrolides), *cat*pC223, *cat*pC221, *cat*pC194 (resistance to phenicols), *tet*K, *tet*M, *tet*L (resistance to tetracycline), *acc(6′)-le,* and *aph (3)-IIIa* (resistance to aminoglycosides). The primer sequences and reaction conditions were the same as described elsewhere (García-Álvarez et al., 2011; Hauschild et al., 2007; Martineau et al., 2000; Oliveira and de Lencastre, 2002; Strommenger et al., 2003).

The *S. aureus* isolates were also tested for the presence of selected virulence genes: *se*A, *se*B, *se*C, *se*D, and *se*E encoding enterotoxins (SEA-E), *tst* encoding toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), *et*A and *et*B encoding exfoliative toxins ETA and ETB, *PVL* encoding leukocidin (components S and F), and *Luk*E-*Luk*D encoding leukotoxin LUKE/LUKD (Jarraud et al., 2002).

2.4. Statistical analysis

The Mann-Whitney *U* test was performed using STATISTICA 13.1 (StatSoft, Kraków, Poland); $p < 0.05$ was considered significant. The test was used to compare the frequency of isolation of staphylococci from the mouth and rectum as well as the occurrence of resistance to antibacterial substances between *S. aureus* and *S. pseudintermedius* isolates.

3. Results

3.1. Isolation and identification of Staphylococcus species

In total, 157 strains were isolated and assigned to specific *Staphylococcus* species using the MALDI TOF-MS method and the *nuc* gene polymorphism analysis. We identified 60 rectal and 97 oral isolates, with 83.4% ($n = 131$) of coagulase-positive strains (CoPS) (Table 1). The Mann-Whitney *U* test showed a statistically significantly higher percentage of isolation of staphylococci from the oral cavity than from the rectum ($p < 0.05$). A similar relationship was demonstrated in the case of the frequency of isolation of CoPS; however, due to the small number of coagulase-negative strains (CoNS), no statistical analysis was performed for this group of *Staphylococcus*. Irrespective of the isolation site, only two species: *S. aureus* and *S. pseudintermedius* were identified in the CoPS group, with the dominance of the latter species ($n = 104$; 79.4% of all the CoPS isolates, with statistical significance). The frequency of isolation of *S. aureus* from the oral cavity was statistically significantly higher than that from the rectum. The small difference observed in the case of *S. pseudintermedius* was not statistically significant (Table 1).

The coagulase-negative species were statistically significantly less numerous ($n = 26$) and more diverse than CoPS. They were represented by *S. sciuri, S. succinus, S. xylosus, S. warneri, S. vitulinus, S. haemolyticus,* and *S. chromogenes* (Table 1). Moreover, the majority of the CoNS strains were oral isolates (69.2% of all the CoNS isolates).

3.2. Phenotypic drug resistance of S. aureus and S. pseudintermedius

The isolated strains were resistant to 10 out of the 14 antimicrobials tested. As many as 50% ($n = 52$) of the *S. pseudintermedius* strains and only 22.2% ($n = 6$) of the *S. aureus* isolates were susceptible to all the antimicrobials. No strain was resistant or intermediate to chloramphenicol, ciprofloxacin, linezolid, and oxacillin or cefoxitin (tested only for *S. aureus* and *S. pseudintermedius*, respectively, according to the CLSI standard). Similarly, none of the *S. aureus* and *S. pseudintermedius* isolates grew on the chromagar MRSA medium. Four of the strains tested (3%) exhibited multidrug resistance associated with insusceptibility to three or four antimicrobials.

Furthermore, we found simultaneous resistance to rifampicin and streptogramins in a single strain (*S. aureus*) and another nitrofurantoin-intermediate strain (Table 2). Only three strains of *S. pseudintermedius* showed phenotypic resistance to sulfamethoxazole/trimethoprim and three (2.3%) other strains showed resistance to gentamicin. Most of the strains were resistant to tetracycline ($n = 40$) and penicillin ($n = 22$) (30.5% and 16.8%, respectively), with dominant (statistically significant) resistance to penicillin observed in *S. aureus* (18 out of the 22 penicillin-resistant strains) and resistance to tetracycline in *S. pseudintermedius* (39 out of the 40 tetracycline-resistant strains) (Table 2). Resistance to clindamycin (inducible resistance was not observed in any of the strains) was exhibited by 9.2% ($n = 12$) of all the CoPS isolates, and erythromycin resistance was only found in 6.9% of the strains ($n = 9$). Four of the strains (3%) were multidrug resistant. (See Table 3.)

Table 1
Occurrence of *Staphylococcus* species in the red fox depending on the site of strain isolation.

	Confirmed *Staphylococcus* species ($n = 157$)								
	Coagulase-positive (131) 83.4*		Coagulase-negative (Howden et al., 2023) 16.6						
Site of isolation	*S. aureus*	*S. pseudintermedius*	*S. sciuri*	*S. succinus*	*S. xylosus*	*S. warneri*	*S. vitulinus*	*S. haemolyticus*	*S. chromogenes*
Mouth	22	57	6	3	4		1	3	1
Rectum	5	47	1	1	4	1	1		
Total	27	104	7	4	8	1	2	3	1
%	17.2	66.2	4.5	2.54	5.1	0.64	1.27	1.9	0.64

* percentage of strains in relation to the total number of isolates ($n = 157$).

Table 2
Phenotypic resistance of coagulase-positive *Staphylococcus* strains.

Antimicrobials	*Staphylococcus n = 131/%*		
	S. aureus n = 27	*S. pseudintermedius n = 104*	Total
Erythromycin	2/17.4	7/6.7	9/6.9
Gentamicin		2/1.9	2/1.5
Rifampicin	1/3.7		1/0.76
Streptogramin	1/3.7		1/0.76
Clindamycin	3/11.1	9/8.6	12/9.2
Penicillin*	18/75	4/3.8	22/16.8
Trimethoprim/sulfamethoxazole		3/2.9	3/2.3
Tetracycline*	1/3.7	39/37.5	40/30.5
Nitrofurantoin	1/3.7		1/0.76

* statistically significant differences between *S. aureus* and *S. pseudintermedius* (The Mann-Whitney *U* test; $p < 0.05$).

Table 3
Occurrence of resistance genes in coagulase-positive strains of *Staphylococcus* spp.

Resistance gene	*Staphylococcus n = 131/%*		
	S. aureus n = 27	*S. pseudintermedius n = 104*	Total
*msr*A		1/0.96	1/0.76
*tet*K		3/2.9	3/2.3
*tet*M		28/26.9	28/21.4
*bla*Z	15/55.5	1/0.96	16/12.2
acc(6′)-Ie-aph(3)-IIIa	1/3.7	2/1.9	2/1.5 1/0.76

3.3. Occurrence of resistance and virulence genes

In 15 (55.5%) of all the *S. aureus* tested, the presence of the *bla*Z gene was detected, which confirmed the penicillin resistance in 93% of the penicillin-resistant strains (Table S1). Only one *S. pseudintermedius* strain had this gene, and we found only four penicillin-resistant strains of this species. Opposite results were obtained in the case of genes encoding resistance to tetracycline, as 71.8% ($n = 28$) of *S. pseudintermedius* strains with resistance to this antibiotic exhibited the presence of the *tet*M gene, and three strains had the *tet*K gene simultaneously. None of the tetracycline-susceptible strains had tetracycline resistance-encoding genes (Table S2). It seems interesting that no gene encoding resistance to macrolides was found in the strains with phenotypic resistance to these antimicrobials. The *msr*A gene was only detected in the strain with phenotypic susceptibility to macrolides. The analysis of gentamicin resistance resulted in similar findings: despite the phenotypic resistance to this drug detected in two strains, the presence of the *acc(6′)-Ie-* gene was demonstrated in two other phenotypic gentamicin-susceptible strains of *S. pseudintermedius*. Moreover, one strain of *S. aureus* was characterized by the presence of a gene encoding resistance to kanamycin (*aph(3)-IIIa*) (Table S1). The other genes analyzed in this study were not found in any strain characterized by resistance or susceptibility to the tested antimicrobials.

Due to their species specificity, the presence of the most important virulence genes was analyzed only in the *S. aureus* strains. Most of the strains ($n = 24$) were characterized by the presence of the leukotoxin-encoding *Luk*E-*Luk*D gene. It was the only virulence gene detected in eight strains and was accompanied by other virulence genes in the other cases, most often by the enterotoxin-encoding *se*B gene (70.4% of *S. aureus* strains) or the *se*C gene (22.2% of *S. aureus*). However, no other genes coding for enterotoxins were detected.

One strain was found to have the toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1)-encoding gene, and genes encoding exfoliative toxins (*et*A, *et*B) were found in two others. Two other strains of *S. aureus* also showed the potential to produce Panton Valentine leukocidin (Table 4).

4. Discussion

The natural environment is one of the three main elements of the generally known One Health concept, which assumes that human health is inextricably linked to the health of animals and the natural environment (Aslam et al., 2021). On the one hand, various species of wildlife animals can be regarded as an integral part of the natural environment; on the other hand, they can be potential and unknown reservoirs of various microorganisms posing a risk to public health. The red fox (*Vulpes vulpes*), i.e. one of the most common species in Poland and other European countries (Delcourt et al., 2022; Jackowiak et al., 2021), is an excellent example of a species that can be a biomarker of real environmental pollution. It is characterized by relatively high migration potential, which is especially important in the case of the strains analyzed in the present study. Another element indicating the suitability of the red fox to be an indicator species is its high potential for synanthropization and its highly diverse diet. The quite common presence of red foxes in cities and near livestock farms is associated with easy access to food sources (e.g. garbage cans) (Jackowiak et al., 2021). On the other hand, the omnivorous nature of this group of animals increases the possibility of accumulation of various types of pathogens and multidrug-resistant strains, including commensal species or the so-called indicator bacteria, which can easily transfer resistance and even virulence genes to strictly pathogenic species through horizontal gene transfer (HGT) (Nowakiewicz et al., 2020 a).

The rich panel of virulence factors combined with numerous mechanisms of acquisition of drug resistance via HGT has also been found in *Staphylococcus* bacteria, which makes these microorganisms extremely unpredictable and difficult-to-combat causes of infection in humans and animals (Gordon et al., 2021; Howden et al., 2023).

In the first stage of our study, we analyzed the general occurrence and range of *Staphylococcus* species in samples collected from two body areas of red foxes, i.e. the oral cavity and the rectum. Many reports have confirmed the greatest frequency of *Staphylococcus* colonization of the oral and nasal mucus membranes, the final segment of the digestive tract, and the skin in canids (Nowakiewicz et al., 2016; Paul et al., 2012). The present study strongly corroborated this observation. However, the majority, i.e. two-thirds of all the *Staphylococcus* isolates (61.8%), originated from the oral samples; almost three-quarters of the oral strains (81.4%) belonged to CoPS and this dominance was statistically relevant. Similarly, this result was reflected in the significantly higher percentage of positive isolation from samples taken from the oral cavity (46.4%) compared to the rectal swabs (*Staphylococcus* was isolated in only 29% of the rectal swab samples). Therefore, our research has shown that it is much more advisable to collect samples from the oral cavity than from the rectum in *Staphylococcus* surveillance studies. On the other hand, the present results indicate no statistically significant differences in the frequency of *S. pseudintermedius* isolation between samples collected from the oral cavity and the rectum.

Table 4
Virulence profiles of *S. aureus* strains.

Number of *S. aureus* strains /%	Virulence profile	Source of sample	
		rectum	mouth
8/29.6	*Luk*E-*Luk*D	1	7
10/37	*Luk*E-*Luk*D, *se*B	3	7
3/11.1	*Luk*E-*Luk*D, *se*B, *se*C	1	2
1/3.7	*se*B, *se*C, *tst*		1
1/3.7	*Luk*E-*Luk*D, *se*B, *PVL*		1
1/3.7	*se*B, *se*C, *PVL*		1
1/3.7	*Luk*E-*Luk*D, *se*B, *se*C, *et*A, *et*B		1
1/3.7	*Luk*E-*Luk*D, *se*B, *et*A, *et*B		1
1/3.7	*se*B		1
$n = 27$	Total	5/18.6	22/81.4

Similarly, the data reported by Paul et al. (2012) and Rubin and Chirino-Trejo (2011) in studies on dogs indicated a comparable degree of colonization of the pharynx and rectum by *S. pseudintermedius*.

The results of the current study confirmed our previous findings, which showed that 60% of animals were colonized by *S. pseudintermedius* (Nowakiewicz et al., 2016). Although this species is the dominant in canids, it is increasingly being isolated from humans (Carroll et al., 2021). However, these bacteria are isolated only from immunocompromised patients and those with coexisting metabolic diseases (Yarbrough et al., 2018), while healthy humans who have daily contact with dogs (owners, veterinarians, breeders, and other veterinary healthcare personnel) are usually only temporarily colonized by this species (Carroll et al., 2021).

S. aureus is common to almost all animal species and humans. There are many literature reports on the occurrence and epidemiological significance of this species of bacteria isolated from various animal species, including free-living animals (Abdullahi et al., 2021; Heaton et al., 2020; Martínez-Seijas et al., 2023). Depending on the animal species and protocol of isolation, the *S. aureus* prevalence ranges from 0% to even over 90% (Feßler et al., 2018; Heaton et al., 2020; Martínez-Seijas et al., 2023; Monecke et al., 2016). However, in the case of the red fox, the number of publications on the occurrence and characteristics of *S. aureus* in this animal species is limited (Heaton et al., 2020; Monecke et al., 2016; Nowakiewicz et al., 2016; O'Hagan et al., 2021).

Since wildlife animals are not subjected to targeted therapy, we expected that the percentage of the drug-resistant *S. aureus* and *S. pseudintermedius* isolates would be much lower than in companion and farm animals. However, despite the use of the standard strain selection method for further analysis (a randomly selected strain from each positive sample with typical morphology obtained on nutrient medium), only half of all the coagulase-positive isolates had phenotypic susceptibility to all the tested antimicrobials. However, only four strains meeting the criterion of drug resistance proposed by Magiorakos et al. (2012) were found.

Nevertheless, the results obtained in the current study confirmed the resistance to penicillin, tetracycline, macrolides, and clindamycin as the most frequently reported type (EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for DiseasePrevention and Control), 2022; Nielsen et al., 2020).

No strains were found to be resistant to fluoroquinolones, phenicols, oxazolidinones, and penicilinase-stable penicillins in this study, and only single strains showed resistance or intermediate susceptibility to rifampicin, antifolates, streptogramins, and nitrofurantoin. These results are comparable with findings reported by other authors in free-living animals, as only single cases of *S. aureus* resistance to these antimicrobials have been reported in rats and other rodents, hedgehogs, wild boar, and some non-human primates (Himsworth et al., 2014; Monecke et al., 2016; Roberts et al., 2018; Sousa et al., 2017).

The coagulase-positive *Staphylococcus* species isolated from the red foxes in this study have a rather specific drug resistance profile, indicating some correlation between the resistance profile and strain species. We showed that penicillin resistance was the dominant type of phenotypic resistance of the *S. aureus* strains, which was confirmed in most cases by the presence of the *bla*Z gene, while tetracycline resistance dominated both phenotypically and genotypically among the *S. pseudintermedius* isolates. Tetracycline resistance was confirmed by the presence of the *tet*M gene, which is easily acquired by this species, but in three cases we also showed the presence of the *tet*K gene, which is responsible for tetracycline resistance but acts through a different mechanism (membrane-associated efflux system) (Grossman, 2016). Interestingly, in previous studies on the drug susceptibility profiles of strains (mainly *S. pseudintermedius*) isolated from companion animals, penicillin resistance generally prevailed and tetracycline resistance was usually much less prevalent (Bierowiec et al., 2021; Glajzner et al., 2023; Ruzauskas et al., 2016). Such a high level of resistance to tetracycline may be related to the fact that oral vaccinations against rabies are still carried out in Poland, and the effectiveness of the vaccine is evaluated in wildlife animals (including red foxes) by monitoring of the deposition of tetracycline in animal bones (since the vaccine is marked with tetracycline). Fluorescence observed in bone cuts from animals culled under mandatory monitoring proves that the vaccine was successfully administered. Since many wildlife animals are subjected to direct tetracycline exposure, the percentage of tetracycline-resistant *S. pseudintermedius* strains was high in this study.

However, to find out why this phenomenon was observed only in the case of *S. pseudintermedius* colonizing the foxes, further comparative studies should be conducted and more than one *Staphylococcus* isolate from a given animal should be analyzed for the presence of tetracycline in its bone cuts.

From the epidemiological point of view, the presence of MRSA strains in wildlife animals is one of the most frequently described types of resistance (Abdullahi et al., 2021; Martínez-Seijas et al., 2023; Monecke et al., 2016). However, despite the use of typical chromogenic media for the detection of methicillin-resistant strains, we did not detect such a phenotype in the present study. Nevertheless, it should be emphasized that the study had some limitations related to the use of the chromogenic medium, which is dedicated to the detection of MRSA rather than MRSP.

An additional factor worth noting in the current study is the presence of some resistance genes (encoding resistance to aminoglycosides and macrolides) in strains that did not show phenotypic expression. The *msr*A gene is responsible for encoding the efflux pump mechanism (macrolides and streptogramins), while the *aac(6′)-Ie/aph (2″)* gene is responsible for the production of enzymes responsible for resistance to most aminoglycosides except streptomycin (Hauschild et al., 2007). It is probable that these strains are characterized by reduced susceptibility that is undetectable with the disk diffusion method used in this study or, due to frameshift mutations, these genes were not functionally expressed (Hauschild et al., 2007). On the other hand, the lack of genetic confirmation of the phenotypic resistance to macrolides and/or clindamycin, as well as gentamicin in other strains isolated in this study, may be associated with the occurrence of other less frequent mechanisms of resistance (Miklasińska-Majdanik, 2021). The drug resistance of coagulase-positive *Staphylococcus* strains isolated from red foxes is not the only potential threat to public health. The analysis of the presence of virulence genes in the *S. aureus* strains showed a fairly rich profile, including genes encoding the so-called superantigens (SAg) responsible for acute and violent infections in humans (Tuffs et al., 2022). Due to the impossibility to monitor the occurrence of this type of infection in animals, especially wildlife species, it is not entirely clear whether strains with genes encoding enterotoxins (SEs), PVL leukocidin, or TSST-1 toxin can cause similar rapidly progressing infections in animals. Nevertheless, the presence of these genes in the red fox isolates may indicate this animal species as a potential reservoir of strains that are pathogenic to humans. In addition, taking into account the high survival rate of *Staphylococcus* strains in the environment and their high resistance to adverse conditions, strains with potentially high zoonotic potential may be quite common in the natural environment. The presence of at least one gene encoding SEs was observed in >70% of all *S. aureus*, likewise in previous studies of the same species isolated from foxes and other predatory wildlife species (Nowakiewicz et al., 2016).

However, the gene profile obtained in this study is significantly different, as the dominant *se*B gene was accompanied by the *se*C gene in 18.5% of the strains. After SEA, enterotoxins SEB, SEC, and SED are the most frequent causes of outbreaks of food poisoning in the world (Argudín et al., 2010; Fisher et al., 2018). Moreover, the SEB and SEC toxins are thermostable, and their resistance to temperature or low pH is much greater than that of other enterotoxins (Rajkovic, 2016).

Panton-Valentine leukocidin is produced by a very small percentage of *S. aureus* strains, and its presence is considered a marker of strains responsible for extremely invasive diseases, such as necrotizing pneumonia, sepsis syndrome, necrotizing fasciitis, and musculoskeletal

disease in humans (Shallcross et al., 2013). PVL can be transferred from a PVL-positive *S. aureus* strain to a PVL-negative *S. aureus* strain via phage conversion. Since temperate bacteriophages in *S. aureus* are common and most strains carry at least one on their genome, there is a high probability of prophage induction and the possibility of further gene spread (Kelly et al., 2009).

Exfoliative toxins (ETA, ETB, ETD) are involved in the pathogenesis of *S. aureus* skin infections, such as staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS), bullous impetigo, furuncles, and abscesses; however, the first two toxins are associated with more severe cases of infection in humans (Bukowski et al., 2010).

Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) is the major toxin causing staphylococcal toxic shock syndrome (TSS). TSST-1 together with enterotoxins SEs (mainly staphylococcal enterotoxin serotype A (SEA), SEB, SEC) and exfoliative toxins are responsible for excessive antigen-independent activation of T cells and antigen presenting cells (APCs) and subsequent massive secretion of pro-inflammatory cytokines, which produces symptoms associated with damage to many organs or autoimmune diseases (Noli Truant et al., 2022). Surely, the expression of these toxins depends on many factors related to both the bacteria and the environment; however, the presence of strains with genes encoding SAg in wild animals may pose a certain risk to human health.

5. Conclusion

The results of our research have confirmed that the red fox, a species common in Europe, is an underestimated reservoir of coagulase-positive *Staphylococcus* species, mainly *S. pseudintermedius* and *S. aureus*. Importantly, approximately 50% of these strains are carriers of at least one resistance gene and at least one virulence gene in 100% of *S. aureus*, which indicates that even the absence of MRSA and MRSP strains in the red fox does not exclude the role of this animal species as a reservoir of pathogens of public health concern. Strains inhabiting the oral cavity as well as the final section of the digestive tract of these animals can easily enter the environment, contaminate both soil and water, and pose a threat to professionals associated with the forest environment. Simultaneously, the increasing synanthropization of the red fox may be quite an important link in the distribution of such strains between the natural environment and the anthroposphere. Therefore, one of the elements of the implementation of the One Health concept should include the monitoring of selected species of wildlife animals in terms of the presence of both pathogenic and multidrug-resistant microorganisms.

Funding

This research was funded by an internal project of the University of Life Sciences in Lublin: Grant No SD-44/WET/2022 financed by the Ministry of Education and Science of the Republic of Poland.

Animal welfare

The material for this study was taken from dead wildlife animals culled under mandatory rabies monitoring (https://ec.europa.eu/info/funding-tenders/opportunities/portal/screen/opportunities/projects-details/43252476/101101594/SMP); therefore, no consent from the Local Ethics Committee for Experiments on Animals was required.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.105111.

References

Abdullahi, I.N., Fernández-Fernández, R., Juárez-Fernández, G., Martínez-Álvarez, S., Eguizábal, P., Zarazaga, M., Lozano, C., Torres, C., 2021. Wild animals are reservoirs and sentinels of *Staphylococcus aureus* and MRSA clones: a problem with "one health" concern. Antibiotics 10, 1556. https://doi.org/10.3390/antibiotics10121556.

Abdullahi, I.N., Zarazaga, M., Campaña-Burguet, A., Eguizábal, P., Lozano, C., Torres, C., 2022. Nasal *Staphylococcus aureus* and *S. pseudintermedius* carriage in healthy dogs and cats: a systematic review of their antibiotic resistance, virulence and genetic lineages of zoonotic relevance. J. Appl. Microbiol. 133, 3368–3390. https://doi.org/10.1111/jam.15803.

Argudín, M.A., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R., 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins 2, 1751–1773. https://doi.org/10.3390/toxins2071751.

Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M.I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T.H., Rasool, M.H., Shahid, A., Xueshan, X., Baloch, Z., 2021. Antibiotic resistance: one health one world outlook. Front. Cell. Infect. Microbiol. 11, 771510. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510.

Bierowiec, K., Miszczak, M., Korzeniowska-Kowal, A., Wzorek, A., Płókarz, D., Gamian, A., 2021. Epidemiology of *Staphylococcus pseudintermedius* in cats in Poland. Sci. Rep. UK 11, 18898. https://doi.org/10.1038/s41598-021-97976-z.

Börjesson, S., Gómez-Sanz, E., Ekström, K., Torres, C., Grönlund, U., 2015. *Staphylococcus pseudintermedius* can be misdiagnosed as *Staphylococcus aureus* in humans with dog bite wounds. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 34, 839–844. https://doi.org/10.1007/s10096-014-2300-y.

Bukowski, M., Władyka, B., Dubin, G., 2010. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. Toxins 2, 1148–1165. https://doi.org/10.3390/toxins2051148.

Carroll, K.C., Burnham, C.-A.D., Westblade, L.F., 2021. From canines to humans: clinical importance of *Staphylococcus pseudintermedius*. PLoS Pathog. 17 (12) https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009961 e1009961.

Carson, M., Meredith, A.L., Shaw, D.J., Giotis, E.S., Lloyd, D.H., Loeer, A., 2016. Foxes as a potential wildlife reservoir for *mec*A-positive staphylococci. Vector-Borne Zoonotic 12, 583–587. https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0825.

CLSI Supplement., 2023. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2023. In: CLSI Supplement M 100 Clinical and, 33rd Edition. Laboratory Standard Institute.

CLSI VET 01 S, 2023. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Animals 6 th ed. CLSI Supplement VET 01 S Clinical and. Laboratory Standard Institute.

Cybulska, A., Kornacka, A., Bień, J., Goździk, K., Kalisińska, E., Łanocha-Arendarczyk, N., Budis, H., Pilarczyk, B., Cabaj, W., Moskwa, B., 2016. The occurrence of *Trichinella* spp. in red foxes (*Vulpes vulpes*) in different regions of Poland: current data. Vector-Borne Zoonotic 16 (11), 717–721. https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1996.

Delcourt, J., Brochier, B., Delvaux, D., Vangeluwe, D., Poncin, P., 2022. Fox *Vulpes vulpes* population trends in Western Europe during and after the eradication of rabies. Mammal Rev. 52 (3), 343–359. https://doi.org/10.1111/mam.12289.

Dong, Q., Liu, Y., Li, W., Liu, Y., Ye, H., 2021. Cross-species transmission risk of livestock-associated MRSA: a systematic review and Bayesian meta-analysis of global data. Prev. Vet. Med. 194, 105429. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105429.

Ebani, V.V., Trebino, C., Guardone, L., Bertelloni, F., Cagnoli, G., Nardoni, S., Sel, E., Wilde, E., Poli, A., Mancianti, F., 2022. Occurrence of bacterial and protozoan pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) in central Italy. Animals 12, 2891. https://doi.org/10.3390/ani12202891.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for DiseasePrevention and Control), 2022. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance inzoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. EFSA J. 20 (3) https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7209ISSN:1831-4732, 7209, 197 pp.

European Commission Directorate, 2021. General For Health And Food Safety Food sustainability, international relations Unit D4 - Food safety programmes, Emergency funding Programmes for eradication, control and surveillance of animal diseases and zoonoses submitted for obtaining EU financial contribution Annex I.a: Programme for the eradication of Rabies Document Version: 2021 2.2. https://food.ec.europa.eu/horizontal-topics/funding-procurement-grants/food-chain-funding/funding-animal-health-measures/national-veterinary-programmes_en.

Feßler, A.T., Thomasa, P., Mühldorferd, K., Grobbeld, M., Brombacha, J., Eichhornb, I., Monecke, S., Ehricht, R., Schwarz, S., 2018. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from zoo and wild animals. Vet. Microbiol. 218, 98–103. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.020.

Fisher, E.L., Otto, M., Cheung, G.Y.C., 2018. Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. Front. Microbiol. 9, 436. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00436.

García-Álvarez, L., Holden, M., Lindsay, H., Webb, C.R., Brown, D.F.J., Curran, M.D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, D.J., Teale, C., Parkhill, J., Bentley, S.D., Edwards, G.F., Girvan, K., Kearns, A.M., Pichon, B., Hill, R., Larsen, A.R., Skov, R.L., Peacock, S.J., Maskell, D.J., Holmes, M.A., 2011. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mec*A homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect. Dis. 11 (8) https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70126-8, 595–60.

Glajzner, P., Szewczyk, E.M., Szemraj, M., 2023. Pathogenic potential and antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from human and animals. Folia Microbiol. 68, 231–243. https://doi.org/10.1007/s12223-022-01007-x.

Gordon, Y., Cheung, C., Bae, J.S., Otto, M., 2021. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. Virulence 12 (1), 547–569. https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688.

Grossman, T.H., 2016. Tetracycline antibiotics and resistance. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 6 (4) https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387 a025387.
Hauschild, T., Vukovic, D., Dakic, I., Jezek, P., Djukic, S., Dimitrijevic, V., Stepanovic, S., Schwarz, S., 2007. Aminoglycoside resistance in members of the *Staphylococcus sciuri* group. Microb. Drug Resist. 13 (2), 77–84. https://doi.org/10.1089/mdr.2007.713.
Heaton, C.J., Gerbig, G.R., Sensius, L.D., Patel, V., Smith, T.C., 2020. *Staphylococcus aureus* epidemiology in wildlife: a systematic review. Antibiotics 9, 89. https://doi.org/10.3390/antibiotics9020089.
Himsworth, C.G., Miller, R.R., Montoya, V., Hoang, L., Romney, M.G., Al-Rawahi, G.N., Kerr, T., Jardine, C.M., Patrick, D.M., Tang, P., Weese, J.S., 2014. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by wild urban Norway rats (*Rattus norvegicus*). PLoS One 9 (2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087983 e87983.
Howden, B.P., Giulieri, S.G., Wong Fok Lung, T., Baines, S.L., Sharkey, L.K., Lee, J.Y.H., Hachani, A., Monk, I.R., Stinear, T.P., 2023. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. Nat. Rev. Microbiol. 21, 380–395. https://doi.org/10.1038/s41579-023-00852-y http://www.pm.microbiology.pl.
Jackowiak, M., Gryz, J., Jasińska, K., Brach, M., Bolibok, L., Kowal, P., Krauze-Gryz, D., 2021. Colonization of Warsaw by the red fox *Vulpes vulpes* in the years 1976–2019. Sci. Rep. 11, 13931. https://doi.org/10.1038/s41598-021-92844-2.
Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J., Vandenesch, F., 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. Infect. Immun. 70 (2), 631–641. https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.631–641.2002.
Karamon, J., Kochanowski, M., Sroka, J., Cencek, T., Różycki, M., Chmurzyńska, E., Bilska-Zając, E., 2014. The prevalence of *Echinococcus multilocularis* in red foxes in Poland–current results (2009–2013). Parasitol. Res. 113 (1), 317–322. https://doi.org/10.1007/s00436-013-3657-z.
Karamon, J., Dąbrowska, J., Kochanowski, M., Samorek-Pieróg, M., Sroka, J., Różycki, M., Bilska-Zając, E., Zdybel, J., Cencek, T., 2018. Prevalence of intestinal helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Central Europe (Poland): a significant zoonotic threat. Parasite Vector 11, 436. https://doi.org/10.1186/s13071-018-3021-3.
Kelly, B.G., Vespermann, A., Bolton, D.J., 2009. The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. Food Chem. Toxicol. 47 (5), 951–968. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.02.006.
Kmieciak, W., Szewczyk, E.M., 2017. Gatunki koagulazododatnie rodzaju *Staphylococcus*–taksonomia, chorobotwórczość. Post. Mikrobiol. 56 (2), 233–244.
Kołodziej-Sobocińska, M., Zalewski, A., Kowalczyk, R., 2014. Sarcoptic mange vulnerability in carnivores of the Białowieża primeval Forest, Poland: underlying determinant factors. Ecol. Res. 29, 237–244. https://doi.org/10.1007/s11284-013-1118-x.
Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. Microbiol. Infect. 18 (3), 268–281. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
Martineau, F., Picard, F.O.J., Lansac, N., Menard, C., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G., 2000. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. 44 (2), 231–238. https://doi.org/10.1128/aac.44.2.231-238.2000.
Martínez-Seijas, C., Mascarós, P., Lizana, V., Martí-Marco, A., Arnau-Bonachera, A., Chillida-Martínez, E., Cardells, J., Selva, L., Viana, D., Corpa, J.M., 2023. Genomic characterization of *Staphylococcus aureus* in wildlife. Animals 13, 1064. https://doi.org/10.3390/ani13061064.
Miklasińska-Majdanik, M., 2021. Mechanisms of resistance to macrolide antibiotics among *Staphylococcus aureus*. Antibiotics 10, 1406. https://doi.org/10.3390/antibiotics10111406.
Monecke, S., Gavier-Widén, D., Hotzel, H., Peters, M., Guenther, S., Lazaris, A., Loncaric, I., Müller, E., Reissig, A., Ruppelt-Lorz, A., Shore, A.C., Walter, B., Coleman, D.C., Ehricht, R., 2016. Diversity of *Staphylococcus aureus* isolates in European wildlife. PLoS One 11 (12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168433 e0168433.
Nielsen, S.S., Bicout, D.J., Calistri, P., Canali, E., Drewe, J.A., Garin-Bastuji, B., Gonzales Rojas, J.L., Gortazar, C., Herskin, M., Michel, V., Miranda Chueca, M.-A., Padalino, B., Pasquali, P., Roberts, H.C., Spoolder, H., Stahl, K., Velarde, A., Viltrop, A., Winckler, C., Baldinelli, F., Broglia, A., Kohnle, L., Alvarez, J., 2020. Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (regulation (EU) No 2016/429): antimicrobial-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs and cats. EFSA J. 20 (2), 7080. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7080.
Noli Truant, S., Redolfi, D.M., Sarratea, M.B., Malchiodi, E.L., Fernández, M.M., 2022. Superantigens, a paradox of the immune response. Toxins 14, 800. https://doi.org/10.3390/toxins14110800.
Nowakiewicz, A., Zięba, P., Ziółkowska, G., Gnat, S., Muszyńska, M., Tomczuk, K., Majer Dziedzic, B., Ulbrych, Ł., Trościańczyk, A., 2016. Free-living species of carnivorous mammals in Poland: red fox, beech marten, and raccoon as a potential reservoir of *Salmonella, Yersinia, Listeria* spp. and coagulase-positive *Staphylococcus*. PLoS One 11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155533 e0155533.
Nowakiewicz, A., Zięba, P., Gnat, S., Trościańczyk, A., Osińska, M., Łagowski, D., Kosior-Korzecka, U., Puzio, I., 2020a. A significant number of multi-drug resistant *Enterococcus faecalis* in wildlife animals; long-term consequences and new or known reservoirs of resistance? Sci. Total Environ. 705 (25), 135830. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135830.
Nowakiewicz, A., Zięba, P., Gnat, S., Trościańczyk, A., Osińska, M., Łagowski, D., Kosior-Korzecka, U., Puzio, I., 2020b. Bats as a reservoir of resistant *Escherichia coli*: a methodical view. Can we fully estimate the scale of resistance in the reservoirs of free-living animals? Res. Vet. Sci. 128, 49–58. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.10.017.
Nowakiewicz, A., Zięba, P., Gnat, S., Osińska, M., Łagowski, D., Kosior-Korzecka, U., Puzio, I., Król, J., 2021. Analysis of *the occurrence and molecular characteristics of drug-resistant strains of Enterococcus* faecalis isolated from the gastrointestinal tract of insectivorous bat species in Poland: a possible essential impact on the spread of drug resistance? Environ. Pollut. 269, 116099. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116099.
O'Hagan, M.J.H., Pascual-Linaza, A.V., Couzens, C., Holmes, C., Bell, C., Spence, N., Huey, R.J., Murphy, J.A., Devaney, R., Lahuerta-Marin, A., 2021. Estimation of the prevalence of antimicrobial resistance in badgers (*Meles meles*) and foxes (*Vulpes vulpes*) in Northern Ireland. Front. Microbiol. 12, 596891. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.596891.
Oliveira, D.C., de Lencastre, H., 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 46 (7), 2155–2161. https://doi.org/10.1128/AAC.46.7.2155–2161.2002.
Osińska, M., Nowakiewicz, A., Zięba, P., Gnat, S., Łagowski, D., Trościańczyk, A., 2022. A rich mosaic of resistance in extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from red foxes (*Vulpes vulpes*) in Poland as a potential effect of increasing synanthropization. Sci. Total Environ. 818 (20), 151834. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151834.
Paul, N.C., Bargman, S.C., Moodley, A., Nielsen, S.S., Guardabassi, L., 2012. *Staphylococcus pseudintermedius* colonization patterns and strain diversity in healthy dogs: a cross-sectional and longitudinal study. Vet. Microbiol. 160, 420–427. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.06.012.
Preda, M., Mihai, M.M., Popa, L.I., Dițu, L.-M., Holban, A.M., Manolescu, L.S.C., Popa, G. L., Muntean, A.-A., Gheorghe, I., Chifiriuc, C.M., Popa, M.-I., 2021. Phenotypic and genotypic virulence features of staphylococcal strains isolated from difficult-totreat skin and soft tissue infections. PLoS One 16 (2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246478 e0246478.
Rajkovic, A., 2016. Staphylococcus: food poisoning. In: Encyclopedia of Food and Health, pp. 133–139. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00655-3.
Roberts, M.C., Feßler, A.T., Monecke, S., Ehricht, R., No, D., Schwarz, S., 2018. Molecular analysis of two different MRSA clones ST188 and ST3268 from primates (*Macaca* spp.) in a United States primate center. Front. Microbiol. 9, 2199. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02199.
Rubin, J.E., Chirino-Trejo, M., 2011. Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. J. Vet. Diagn. Investig. 23, 351–354. https://doi.org/10.1177/104063871102300227.
Ruzauskas, M., Couto, N., Pavilonis, A., Klimiene, I., Siugzdiniene, R., Virgailis, M., Vaskeviciute, L., Anskiene, L., Pomba, C., 2016. Characterization of Staphylococcus pseudintermedius isolated from diseased dogs in Lithuania. Pol. J. Vet. Sci. 19 (1), 7–14. https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0002.
Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirotaki, S., Kawakami, T., Fukata, T., Hiramatsu, K., 2010. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. J. Clin. Microbiol. 48 (3), 765–769. https://doi.org/10.1128/JCM.01232-09.
Shallcross, L.J., Fragaszy, E., Johnson, A.M., Hayward, A.C., 2013. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect. Dis. 13 (1), 43–54. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70238-4.
Skarżyńska, M., Leekitcharoenphon, P., Hendriksen, R.S., Aarestrup, F.M., Wasyl, D., 2020. A metagenomic glimpse into the gut of wild and domestic animals: quantification of antimicrobial resistance and more. PLoS One 15 (12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242987 e0242987.
Smreczak, M., Orłowska, A., Trębas, P., Stolarek, A., Freuling, C., Müller, T., 2023. Re-emergence of rabies in Mazowieckie Voivodeship, Poland. Zoonoses Public Health 70, 111–116. https://doi.org/10.1111/zph.13005.
Sousa, M., Silva, N., Manageirod, V., Ramos, S., Coelho, A., Gonçalves, D., Caniça, M., Torres, C., Igrejas, G., Poeta, P., 2017. First report on MRSA CC398 recovered from wild boars in the north of Portugal. Are we facing a problem? Sci. Total Environ. 596–597, 26–31. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.054.
Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G., Witte, W., 2003. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 41 (9), 4089–4094. https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4089–4094.2003.
Tuffs, S.W., Goncheva, M.I., Xu, S.X., McCormick, J.K., 2022. Superantigens promote Staphylococcus aureus bloodstream infection by eliciting pathogenic interferon-gamma production. Microbiology 119 (8). https://doi.org/10.1073/pnas.2115987119 e2115987119.
Vıchova, B., Bona, M., Miterpakova, M., Kraljik, J., Cabanova, V., Nemcikova, G., Hurnıkova, Z., Oravec, M., 2018. Fleas and ticks of red foxes as vectors of canine bacterial and parasitic pathogens, in Slovakia, Central Europe. Vector-Borne Zoonotic 18 (11), 611–619. https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2314.
Wierzbicki, H., Zatoń-Dobrowolska, M., Mucha, A., Moska, M., 2021. Insight into the genetic population structure of wild red foxes in Poland reveals low risk of genetic introgression from escaped farm red foxes. Genes (Basel) 12 (5), 637. https://doi.org/10.3390/genes12050637.

Wodecka, B., Michalik, J., Grochowalska, R., 2022. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are exposed to high diversity of *Borrelia burgdorferi Sensu Lato* species infecting fox-derived *Ixodes* ticks in west-Central Poland. Pathogens 11 (6), 696. https://doi.org/10.3390/pathogens11060696.

Yarbrough, M.L., Lainhart, W., Burnham, C.A., 2018. Epidemiology, clinical characteristics, and antimicrobial susceptibility profiles of human clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* group. J. Clin. Microbiol. 56 (3) https://doi.org/10.1128/JCM.01788-17 e01788–17.

Yu, W., Kim, H.K., Rauch, S., Schneewind, O., Missiakas, D., 2017. Pathogenic conversion of coagulase-negative staphylococci. Microbes Infect. 19 (2), 101–109. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.12.002.

sciendo

J Vet Res 69, 41-50, 2025
DOI:10.2478/jvetres-2025-0014

Characteristics of drug-resistant staphylococci isolated from milk of lambed ewes during the perinatal period

Agata Hahaj-Siembida[1], Aneta Nowakiewicz[1]✉, Monika Greguła-Kania[2], Mariola Bochniarz[1], Aleksandra Trościańczyk[1], Marcelina Osińska[1]

[1]Department of[1]Sub-Department of Veterinary Microbiology, Department of Preclinical Veterinary Sciences, University of Life Sciences, 20-950 Lublin, Poland
[2]Department of Animal Breeding and Agricultural Advisory, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences, 20-950 Lublin, Poland
aneta.nowakiewicz@up.lublin.pl

Received: August 1, 2024 *Accepted: March 13, 2025*

Abstract

Introduction: Staphylococci are still a challenge in veterinary medicine, as they are one of the aetiological factors causing clinical and subclinical mastitis in small ruminants. The aim of the study was to analyse the occurrence of staphylococci in milk obtained from Świniarka (SW) and Uhruska (UHR) sheep and to characterise their drug resistance and virulence. **Material and Methods:** In total, 50 milk samples were collected from ewes seven days after parturition. Drug susceptibility analysis was performed based on Clinical and Laboratory Standards Institute standards and demonstration of the presence of resistance genes was attempted. **Results:** *Staphylococcus* spp. strains were identified in 70% of the samples, and 57.2% of the strains were *S. aureus*. Most of the tested strains (88.6%) were resistant to at least one antimicrobial, and resistance to tetracycline and erythromycin was the dominant type in *S. aureus* strains. Coagulase-negative species (CoNS) exhibited resistance predominantly to penicillin, cefoxitin and tetracycline (86.6%, 73.3% and 46.6%, respectively).The presence of the *mec*C gene was detected in four cefoxitin-resistant strains. In tetracycline- and chloramphenicol-resistant strains, phenotypic and genotypic resistance was statistically significantly more common among strains isolated from UHR than SW. **Conclusion**: The present study highlights the problem of potential subclinical mastitis caused by drug-resistant strains of *S. aureus* and other CoNS species in lambed ewes. However, the occurrence of virulence factors in these strains is very rare.

Keywords: *Staphylococcus*, sheep mothers, drug resistance, animal health.

Introduction

Bacteria of the *Staphylococcus* genus belong to a group of microorganisms occurring both as commensals of the mucous membranes of various species of animals and humans and as causative agents of many local and generalised infections of varying severity, ranging from mild or subclinical changes to life-threatening infections. This genus currently includes over 70 different species (27). Because of their relatively high resistance to unfavourable environmental conditions, such as low water activity, high temperatures, high sodium chloride concentration and low pH, staphylococci are able to survive outside the host for a relatively long time, constituting one of the most common pathogens contaminating food of animal origin. Numerous species belonging to the *Staphylococcus* genus are also components of the natural biota of the skin and mucous membranes of healthy sheep (30, 31). However, bacteria of the *Staphylococcus* genus are also the most common cause of infections in these animals, including those which develop into clinical and subclinical mastitis. The coagulase-positive species (CoPS) *S. aureus* is a particularly frequent aetiological agent of mastitis and is responsible for over 70% of cases, while a similar percentage of coagulase-negative species (CoNS) are isolated from cases of subclinical mastitis (29). The change in the status of a microorganism from a commensal to the causative agent of infection depends on many factors, including the way animals are kept and fed, the level of hygiene and biosecurity, milking practices and even climate changes (30). The breed of animal is also of great importance given the susceptibility to infections, anatomical condition of teats, number and size of offspring, length of the lactation period and typical prevalence

© 2025 A. Hahaj-Siembida et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution 4.0 License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

of coexisting health problems which all vary from breed to breed (24). It has been shown that ewes of different breeds have different genetic predispositions to the development of clinical or subclinical mastitis (30).

Although sheep breeding has a long tradition in Poland, currently sheep constitute only 1% of the number of animals kept in our country and used for milk and meat. There are over a dozen breeds of sheep in specific or mixed types of use, with 17 native breeds covered by the Genetic Resources Protection Programme (19). These breeds include the Uhruska and Świniarka sheep examined in the current work.

The Uhruska Sheep (UHR) is a refined breed. This is a native variety developed in the region of central-eastern Poland as a cross between Merino ewes from the Poznań region and Leine and Kent rams. The animals make good use of farm feed and natural pastures. Sheep of this breed are medium in size and their body weight ranges from 55 to 60 kg. The Uhruska sheep is a meat breed with high fertility (140–160%) and high-quality wool (14).

The Świniarka Sheep (SW) is a primitive breed that is relatively resistant to diseases and unfavourable living conditions; the breed is undemanding in feeding (low-quality feed). These animals adapt perfectly to local environmental conditions. The representatives of this breed are small with a slight build and a body weight of 25–35 kg. The usability of this breed is low, and its milk production is only sufficient to feed the offspring. The reproduction of these sheep is characterised by seasonality and a high frequency of single litters. Sexual maturation is moderately late, at the age of 9–12 months, and fertility is estimated at 120% (14).

The analysis of factors that may potentially negatively affect the health status of these animals seems extremely important from the point of view of conservation and protection of the species. Both sheep breeds are considered endangered; moreover, the Świniarka breed currently requires conservation efforts (19).

The common occurrence of microorganisms of the *Staphylococcus* genus makes their contribution to the infection threat to sheep a serious one. Staphylococcal infections are associated with huge economic losses because of decreased milk production and poor milk quality. In addition, they negatively affect the welfare of both sheep and lambs and worsen lamb mortality. Infections may also cause fear, anxiety, changes in feeding behaviour and pain in affected ewes, which have adverse impacts on meat production (24).

Public health is an important issue regarding the consumption of products manufactured from raw materials originating from various breeds of sheep. The presence of staphylococci, especially of *S. aureus*, in consumed milk or milk products poses a significant threat to public health. This is related, on the one hand, to the increasing number of multidrug-resistant (MDR) isolates belonging to this group of microorganisms and, on the other hand, to the numerous virulence factors of *S. aureus* causing many life-threatening infections, such as those where its toxigenic mechanism is activated and leads to toxic shock syndrome (28). Increasing resistance usually results from the selection pressure associated with the frequent use of antimicrobials in the equally frequent infections in animals. There is usually a positive correlation between modified breeds with high milk or meat production and increased susceptibility to infections (31). When focusing on the presence of *Staphylococcus* in sheep, the "One Health" concept should not be ignored. A crucial aspect of this concept is food safety, including microbiological safety, which is determined by the health of food animals and necessarily by the health of sheep (22). Therefore, the aim of the study was to analyse the occurrence of *Staphylococcus* in the milk of lactating mothers of sheep from two different breeds and to characterise the strains in terms of their drug resistance and potential virulence.

Material and Methods

The samples of milk were taken from two local native Polish breeds of sheep: SW and UHR. The animals were kept in the Bezek experimental station belonging to the University of Life Sciences in Lublin (51°11'60.00" N 23°15'60.00" E), located in south-eastern Poland. The basic herd numbers over 500 animals, including approximately 200 UHR dams and 50 SW dams. The ewes were fed according to the French Institut National de la Recherche Agronomique feeding system (according to their physiological status). All animals housed in the sheepfold were fed in the same way using the feed available on the farm. The animals were kept in the same building in uniform environmental conditions; however, the breeds were separated inside the building and during pasturing. The animals were kept in a closed system from September to mid-May and an open system with grazing from mid-May to early September. Mating lasted six weeks, starting in September for the UHR ewes and in October for the SW, and lambing lasted from mid-January to February for the UHR sheep and from February to March for the SW. The animals were of the same age, *i.e*. two years old.

Milk sample collection, isolation and species identification. Milk samples were collected during a standard clinical examination conducted by a veterinarian between March and April 2023. Twenty-five animals with no clinical symptoms detected during the basic clinical examination of the udder (observation, palpation and comparison of both glands) were selected from each breed to provide the material. A total of 50 milk samples were collected as 25 samples from UHR and 25 from SW. Milk samples of 5 mL volume were collected aseptically from an udder half from each animal, on average seven days after parturition, according to a procedure described previously (25). In refrigeration conditions, the samples were transported to the laboratory within two hours, where 1 mL of each sample was cultured in nutrient broth medium supplemented with 6.5% NaCl

(Biomaxima, Lublin, Poland) and incubated for 24 h at 37°C. Mannitol Salt LAB Agar and Baird-Parker LB (lysogeny broth) Agar (Biomaxima) were selected from the products for specific application to *Staphylococcus* spp. and used as selective media. Samples of 100 µL volume were streaked onto plates and incubated at 37°C for 24 h. One typical colony obtained from the media was selected for further analyses. Next, Gram staining (Gram Staining Kit, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), catalase (3% hydrogen peroxide solution), and coagulase assays were performed (BBL Coagulase Plasma, Rabbit, with EDTA, BD, Franklin Lakes, NJ, USA). All catalase- and Gram-positive cocci were analysed using the matrix-assisted laser desorption/ionisation–time-of-flight mass spectrometry (MALDI TOF-MS) and coagulase-positive strains were further confirmed using the molecular method based on the analysis of *nuc* gene polymorphism as described previously (15). DNA was isolated from 24-h pure bacterial colonies using a commercial kit (Gram Plus and Yeast Genomic DNA Purification Kit; EURx, Gdańsk, Poland) in accordance with the manufacturer's instructions. Amplification was performed according to the conditions described previously (14) and with Silver Taq Mix (Syngen Biotech, Teipei, Taiwan) and appropriately selected primers (Genomed, Warsaw, Poland) as described previously (15).

Analysis of phenotypic antimicrobial susceptibility. The phenotypic antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. was assessed using the disc-diffusion method on Mueller Hinton LAB-AGAR (Biomaxima Lublin, Poland). Thirteen discs with antibiotics (Oxoid, Basingstoke, UK) were used for this study: erythromycin 15 mg, cefoxitin 30 mg, gentamicin 10 mg, rifampicin 5 mg, quinupristin/dalfopristin 15 mg, clindamycin 2 mg (alone and in tests for the detection of inducible clindamycin-resistant *Staphylococcus* spp.), penicillin 10 IU, sulfamethoxazole/trimethoprim 25 mg, tetracycline 30 mg, nitrofurantoin 300 mg, linezolid 30 mg, ciprofloxacin 5 mg and chloramphenicol 30 mg. The procedure and interpretation of the results were performed in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (8, 9). The American Type Culture Collection *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 reference strain was used for quality control, and the multidrug resistance of the strains was classified according to criteria described in a previous study (15).

Detection of resistance and virulence genes. The *Staphylococcus* spp. strains isolated from the milk were tested for the presence of genes encoding phenotypic resistance. The following genes were selected: *mecA*, *mecC*, *blaZ* (resistance to β -lactams), *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA* (resistance to macrolides), *cat pC223*, *cat pC221*, *cat pC194* (resistance to phenicols), *tetK*, *tetM*, *tetL* (tetracycline resistance), *acc(6')-le* and *aph(3)-IIIa* (resistance to aminoglycosides). The sequences of the selected primers and the reaction conditions are described in previously published articles (10, 14). The *S. aureus* strains were also tested for the presence of the following virulence genes: *seA-E* (encoding enterotoxins), *tst* (encoding toxic shock syndrome toxin-1), *etA*, *etB* (encoding the ETA and ETB exfoliative toxins), *LukE-LukD* (responsible for leukotoxin *LUKE/LUKD*) and *PVL* (encoding leukocidin) (17).

DNA isolated according to the method described above (1 µL/20 µL of total volume of amplification reaction) and PCR reagent (PCR Mix Plus Red, A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) were used in all the analyses.

Statistical analysis. The statistical analysis was performed using the Statistica 13.1 program (Dell Technologies,Round Rock, TX, USA). The Mann–Whitney U test (P-value < 0.05) was used to determine statistically significant differences between *S. aureus* and CoNS in terms of the level of phenotypic resistance and the occurrence of resistance genes and to compare the phenotypic resistance and the occurrence of resistance genes between strains isolated from the two breeds of sheep (P-value < 0.05).

Results

Isolation and identification of *Staphylococcus* species. MALDI TOF-MS confirmed that 35 isolates obtained from tested sheep milk samples belonged to the *Staphylococcus* genus. Among them, 20 strains (57%) were coagulase-positive and were all *S. aureus*, which was further confirmed by the results of the amplification of the *nuc* gene, and 15 strains (30%) were four different coagulase-negative species (*S. xylosus*, *S. simulans*, *S. condimenti* and *S. lentus*) (Table 1). A comparable positive rate of *Staphylococcus* isolation from the samples was observed in both animal breeds, with a slight predominance in the SW breed (54% *vs.* 46% of samples were positive, respectively).

Table 1. Occurrence of *Staphylococcus* species in milk by sheep breed

		Staphylococcus aureus	*S. xylosus*	*S. simulans*	*S. lentus*	*S. condimenti*
Breed	Uhruska (n = 16)	10	1	4		1
	Świniarka (n = 19)	10	7	1	1	
Total (n = 35)		20	8	5	1	1
%*		57.2	22.8	14.3	2.85	2.85

* – percentage of strains in relation to the total number of isolates

Table 2. Characteristics of *Staphylococcus* spp. strains isolated from Polish ewes of the Uhruska (n = 16) and Świniarka (n = 19) breeds

Breed	Species	Number of isolates	MDR	Phenotypic resistance profiles	Resistance and virulence gene profiles
Uhruska	*S. aureus*	1		R: P10	
		1		R: DA2	
		1		I: TE30, C30	*cat* (pC221), *tet*L
		1	5	R: P10, TE30, C30 I: E15	*cat* (pC194)
		1		I: E15	*mrs*A
		1	3	R: P10 I: QD15, DA2	
		1	3	I: TE30, CIP5, C30	*cat* (pC221), *tet*L, *tet*K
		1	4	I: E15, CN10, TE30, C30	*cat* (pC221), *cat* (pC194), *tet*L, *aph(3)-IIIa*, seB
		1		R: E15 I: TE30, DA2,	*tet*L, *erm*A, *erm*B
		1	4	R: FOX30, P10 I: CN10, TE30, C30	*cat* (pC221), *cat* (pC194), *tet*L, *mec*C, *aph(3)-IIIa*, *acc(6')-Ie-*
	S. xylosus	1		R: FOX 30, P10	
	S. condimenti	1		R: P10	
	S. simulans	1		R: TE30	*tet*K, *tet*L, *aph(3)-IIIa*
		1	3	R: FOX 30, P10, TE30 I: DA2	*tet*K
		1	4	R: FOX 30, P10, E15, TE30 I: DA2	*mec*C, *erm*B, *cat* (pC194), *tet*K, *tet*L, *aph(3)-IIIa*, *blaZ*
		1		R: TE30	*cat* (pC194)
Świniarka	*S. aureus*	4		susceptible	
		2		I: DA2	
		1		R: P10	
		1		R: P10 I: E15	
		1		I: E15	
		1	4	I: E15, DA2, TE30, C30	*cat* (pC221), *tet*L
		3		R: FOX30, P10	
		1		R: P10	*tet*M, *aph(3)-IIIa*, *blaZ*
	S. xylosus	1		R: FOX30, P10	*tet*M, *mec*C, *aph(3)-IIIa*, *acc(6')-Ie-*
		1	4	R: FOX30, P10,TE30 I: E15, RD5	*tet*M ,*tet*K, *mecC, aph(3)-IIIa*, *msr*A
		1		R: FOX 30, P10, TE30	*tet*M, *tet*L, *aph(3)-IIIa*
	S. lentus	1	5	R: FOX 30, P10, E15, CN10, TE30 I: DA2	
	S. simulans	1	3	R: FOX30, P10, E15 I: RD5	

R – resistant; I – intermediate; ** P10 – penicillin 10 IU; E15– erythromycin 15 mg; DA2 – clindamycin 2 mg; TE30 – tetracycline 30 mg; RD5 – rifampicin 5 mg; QD15 – streptogramin 15 mg; C30 – chloramphenicol 30 mg; FOX30 – cefoxitin 30 mg; CN10 – gentamycin`10 mg; CIP5 – ciprofloxacin 5 mg

Phenotypic drug susceptibility profiles of *Staphylococcus* species. Resistance to at least one antimicrobial was observed among most strains. Only four (11.4%) strains of the *S. aureus* species, originating from SW, were susceptible to all the tested antimicrobials. In turn, all the strains were susceptible to linezolid, nitrofurantoin and trimethoprim/sulfamethoxazole (Table 2). Additionally, no resistance of *S. aureus* to rifampicin was observed, and none of the CoNS strains was resistant to chloramphenicol, ciprofloxacin or streptogramins (Table 3). The highest percentage of resistance among *S. aureus* strains was recorded for tetracycline and erythromycin (35% each) and the next highest to chloramphenicol, penicillin and clindamycin (30% each). Constitutive resistance was noted for all the clindamycin-resistant strains. In terms of the breed of sheep providing a sample from which a resistant strain was isolated, in most cases, resistant *S. aureus* isolates originated from UHR, which also correlated with a higher proportion of MDR *S. aureus* strains from this breed, five coming from UHR and only one from SW. The profile of the CoNS strains was dominated by resistance to penicillin, cefoxitin and tetracycline (86.6%, 73.3%, and 46.6% of such strains, respectively) (Table 3), classifying of 1/3 (n = 5) of the CoNS strains as MDR (Table 2).

Detection of resistance and virulence genes. The phenotypic resistance of the tested strains was confirmed by the presence of resistance genes; however, no resistance genes were found in as many as 48,4% (n = 15) of strains with phenotypic resistance to at least one tested antimicrobial (n = 31). Resistance to cefoxitin was confirmed by the presence of the *mec*C gene in four cefoxitin-resistant strains (*S. aureu*s, *S. xylosus* and two strains of *S. simulans*) originating from both UHR and SW. In turn, the presence of the *mec*A gene was not detected. Although more than 54% of the strains showed phenotypic resistance to penicillin, the presence of the *blaZ* gene was detected in only two of them (*S. xylosus* and *S. simulans*), and only the *mec*C gene was detected in one additional penicillin-resistant CoNS strain (Table 4).

Table 3. Phenotypic resistance of *Staphylococcus* strains isolated from Polish ewes of the Świniarka and Uhruska breeds

Antimicrobial	*Staphylococcus* spp. n/%		
	S. aureus (n = 20)	CoNS (n = 15)	Total
FOX 30*	1/5	11/73.3	12/34.3
C 30*	6/30		6/17.1
CIP 5	1/5		1/6.6
DA 2	6/30	3/20	9/25.7
E15	7/35	4/26.6	11/31.4
CN10	2/10	1/6.6	3/8.5
P10*	6/30	13/86.6	19/54.3
RD 5		2/13.3	2/5.7
QD 15	1/5		1/6.6
TE 30	7/35	7/46.6	14/40

CoNS – coagulase-negative species; E15 – erythromycin 15 mg; FOX 30 – cefoxitin 30 mg; CN10 – gentamicin 10 mg; RD5 – rifampicin 5 mg; QD15 – quinupristin/dalfopristin 15 mg; DA2 – clindamycin 2 mg; P10 –penicillin 10 IU; TE30 – tetracycline 30 mg; CIP5 – ciprofloxacin 5 mg; C30 – chloramphenicol 30 mg; * – statistically significant difference (P-value < 0.05) between resistance to given antibiotic in *S. aureus* and CoNS isolates

Table 4. Occurrence of resistance genes in *Staphylococcus* strains isolated from Polish ewes of the Świniarka and Uhruska breeds

Resistance gene	*Staphylococcus* spp. %		
	S. aureus (n = 20)	CoNS (n = 15)	Total
acc(6')-Ie-	1/5	1/6.6	2/5.7
*aph(3)-IIIa**	2/10	6/40	8/22.8
*bla*Z		2/13.3	2/5.7
cat (pC194)	3/15	2/13.3	5/14.2
cat (pC221)*	5/25		5/14.2
*erm*A	1/5		1/6.6
*erm*B	1/5	1/6.6	2/5.7
*mec*C	1/5	3/20	4/11.4
*msr*A	1/5	1/6.6	2/5.7
*tet*K	1/5	4/26.6	5/14.2
*tet*L	6/30	3/20	9/25.7
*tet*M*		4/26.6	4/11.4

CoNS – coagulase-negative species; * – statistically significant difference (P-value < 0.05) between occurrence of resistance genes in *S. aureus* and CoNS isolates

In the cases of the tetracycline-resistant strains, phenotypic resistance was statistically significantly more common among strains isolated from UHR and was confirmed by the presence of at least one *tet* gene in the majority of the strains (85.7%). Interestingly, the *tetL* gene dominated in the tetracycline-resistant *S. aureus* strains (6 out of 7 isolates) and occurred statistically significantly more frequently among the strains isolated from UHR (Table 5 and Table 6). In the case of the CoNS strains, the *tet*M gene was present with the two other *tet* genes at similar levels, but the presence of this gene was detected only in this group of staphylococci (Table 4). Only two tetracycline-resistant strains did not have any of the analysed genes, while two more strains with phenotypic susceptibility to tetracycline showed the presence of the *tet*M gene, both isolated from SW (Table 6).

Almost all strains with phenotypic resistance to chloramphenicol were isolates from UHR (five of the six chloramphenicol-resistant strains) (Table 5) and represented only the *S. aureus* species. In all the cases, phenotypic resistance was confirmed by the presence of the *cat* (p221) and/or *cat* (p194) gene(s). Interestingly, despite the lack of phenotypically identified resistance to chloramphenicol, the presence of the *cat* (p194) gene was detected in two CoNS strains (*S. simulans* strains isolated from UHR). This latter gene predominated statistically significantly among the strains isolated from UHR (Table 6).

Despite the analysis of a relatively wide panel of genes responsible for the phenotype of resistance to macrolides or macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS_B), a large percentage of strains with phenotypic resistance to macrolides/lincosamides or streptogramins (n = 15) did not demonstrate the presence of any of the tested genes (n = 11, 73.3%) (Table 2). The *msr*A gene (encoding the macrolide efflux pump) was found only in two erythromycin-resistant strains, while the *erm*A and *erm*B genes (responsible for MLS_B) were present in only two erythromycin/clindamycin-resistant isolates, one of which was *S. aureus*. In this strain, both these genes were present at the same time.

Although resistance to kanamycin and neomycin was not tested, the *aph(3)-IIIa* gene was found in as many as eight (22.9%) strains, and most of them (n = 6) were CoNS (*S. xylosus* n = 4 and *S. simulans* n = 2) (P-value < 0.05). In turn, the *acc(6')-Ie-aph(2")* gene, encoding the bifunctional enzyme aminoglycoside-6'-N-acetyltransferase/2"-O-phosphoryltransferase responsible for resistance to gentamicin/tobramycin/kanamycin, was demonstrated only in one phenotypically gentamicin-resistant strain of *S. aureus* and in one gentamicin-susceptible strain of *S. xylosus*.

Only a single *S. aureus* strain isolated from UHR showed the presence any gene encoding staphylococcal enterotoxin B (SEB), and this isolate possessed a single such gene. In the case of the remaining strains, none of the virulence determinants tested were detected.

Table 5. Phenotypic resistance of *Staphylococcus* strains by sheep breed

Antimicrobial	*Staphylococcus* spp. n/%		
	Uhruska (n = 16)	Świniarka (n = 19)	Total
Cefoxitin	4/25	8/42.1	12/34.3
Chloramphenicol*	5/31.3	1/5.3	6/17.1
Ciprofloxacin	1/6.3		1/6.6
Clindamycin	6/37.5	3/15.8	9/25.7
Erythromycin	5/31.3	6/31.6	11/31.4
Gentamicin	2/12.5	1/5.3	3/8.5
Penicillin	8/50	11/57.8	19/54.3
Rifampicin		2/10.5	2/5.7
Streptogramin	1/6.3		1/6.6
Tetracycline*	10/62.5	4/21	14/40

* – statistically significant difference (P-value < 0.05) between resistance to given antibiotic in *Staphylococcus* spp. isolated from Uhruska and Świniarka breed

Table 6. Occurrence of resistance genes in *Staphylococcus* spp. by sheep breed

Resistance gene	*Staphylococcus* spp. n/%		
	Uhruska (n = 16)	Świniarka (n = 19)	Total
acc(6')-Ie-	1/6.3	1/5.3	2/5.7
aph(3)-IIIa	4/25	4/21	8/22.8
*bla*Z	1/6.3	1/5.3	2/5.7
cat (pC194)*	5/31.3		5/14.2
cat (pC221)	4/25	1/5.3	5/14.2
*erm*A	1/6.3		1/6.6
*erm*B	2/12.5		2/5.7
*mec*C	2/12.5	2/10.5	4/11.4
*msr*A	1/6.3	1/5.3	2/5.7
*tet*K	4/25	1/5.3	5/14.2
*tet*L*	7/43.7	2/10.5	9/25.7
*tet*M		4/21	4/11.4

* – statistically significant differences (P-value < 0.05) between occurrence of resistance genes in in *Staphylococcus* spp. isolated from Uhruska and Świniarka breed

Discussion

The presence of *Staphylococcus* bacteria in the milk of 70% of the examined lactating sheep may be the result of various processes also related to the occurrence of a pathological condition. The presence of the accepted major pathogens (which include *E. coli*, *Streptococcus agalactiae* and *S. aureus*) is one determiner of whether a given case is diagnosed as clinical or subclinical mastitis (24). Interestingly, in the current study, the sheep did not present any clinical changes in the udder, which may potentially qualify the *S. aureus*-positive cases as subclinical mastitis, but it should be emphasised that, because sampling followed parturition very closely, the assessment of the number of somatic cells would not have been reliable (3). When CoNS are isolated in the absence of clinical symptoms in the animal, there is a high probability that it may be a subclinical infection, usually with an environmental source, or may merely be carriage of the pathogen. As reported by Vassielieou (29), staphylococcal mammary carriage in ewes is about 6.5%, while the percentage of isolation of CoNS strains in our study was as much as 30%; therefore, it would be difficult to consider all cases as carriers, especially since *S. xylosus* or *S. simulans* (both CoNS), were isolated in over 22% and 14% of the animals, respectively. As shown by Fragkou *et al.* (10), the carrier status in favourable conditions (suppressed animal immunity) may develop into mastitis, especially since clinical mastitis most often develops at the time of weaning as the milking period begins (30). Among the CoNS, different species may be isolated from the udder with different frequencies, depending on the geographical location and the dominant species in the environment (30). *Staphylococcus xylosus* and *S. simulans* were the most frequent species isolated in our study, while they were detected by other researchers at 17 and 9%, respectively, or even in significantly lower counts with only single representatives of these species (2). They also constituted the dominant microbiota of sheep skin (31) and nostrils (18); therefore, their presence may be of environmental origin. Interestingly, *Staphylococcus condimenti* belongs to the staphylococci termed "food associated"; however, like other isolated CoNS species, it may be responsible for invasive infections in humans with reduced immune system efficiency. The number of the CoNS isolates was too low to show a correlation between them and the animal breed, while the number of *S. aureus* isolates was the same in UHR and SW; therefore, it was difficult to indicate the host-species specificity.

The high percentage of *S. aureus* (40%) and CoNS (30%) in the animals may be related to the sheep's common origin from one farm and the possible direct transmission of strains or species caused by their close contact. One of the causes may be the permanent presence of a specific strain of *S. aureus* on the farm, of which the primary source is not necessarily animals but rather breeders or animal handlers. Generally, the *S. aureus*

carriage rate in sheep is relatively low (9–14%), while the carriage rate in breeders is quite high, reaching 60% (23). Permanent contact between animals and the presence of suckling lambs may also be one of the factors predisposing a flock to such a high percentage of *S. aureus* in milk (30). It is related to the potential cross-suckling of other mothers and the spread of the pathogen among animals in this way.

Phenotypic resistance to at least one antimicrobial was recorded in as many as 88.6% of the isolated strains. Among all the isolates, only four *S. aureus* strains (isolated from SW) were susceptible to all the tested antimicrobials, but only one MDR strain was observed in the sheep of this breed. All the isolates from the UHR sheep were resistant, and as many as seven isolates (43% of all the UHR isolates) from both the CoNS group and *S. aureus* were included in the group of MDR strains. However, only in the cases of tetracycline and chloramphenicol was statistically significantly higher resistance observed in the isolates originating from UHR than in those from SW. A similar relationship was also noted for the resistance genes to these antibiotics: *cat* (pC194) and *tet*L, occurred statistically significantly more often in the isolates from UHR than in strains from SW. These results allow us to formulate a cautious hypothesis that the more primitive breed of sheep (SW) may be more resistant to udder colonisation by staphylococci. Because disease incidents are rarer, this breed requires targeted therapy less often, which is associated with the much lower percentage of resistant and multidrug-resistant strains inhabiting the mammary gland of these animals. However, the percentage of positive *Staphylococcus* isolations in both animal breeds was similar (SW 55% *vs* UHR 45%). Additionally, in the case of strains originating from refined breeds, the presence of an MRSA strain was shown, and methicillin resistance was confirmed by the presence of the *mec*C gene. Currently, MRSA strains pose a significant threat to public health and their occurrence in farm animals has increased significantly in recent years, also constituting a source of infection for humans (6). Since MRSA strains may be responsible for causing subclinical mastitis, they are excreted in milk and constitute a potential source of infection for consumers of raw milk or dairy products made from unprocessed milk (6). The occurrence of MRSA in sheep milk was also recorded earlier at a similar, rather low level of only 1.2% (6) or 0.44% (4). Although *mec*C was first demonstrated in 2011 (11), since then it has also appeared as a homologue of the *mec*A gene in MRSA strains from both humans and animals, particularly cattle (4). However, it seems that the occurrence or dominance of the *mec*C or *mec*A gene in a specific herd or even in a given area is related to the spread of a specific type of gene or strain with a specific genotype among animals in close contact with each other (1). Although the occurrence of *mec*C genes in CoNS strains is rare, Loncariac *et al.* (21) demonstrated this type of gene in some *Staphylococcus* species (including *S. xylosus, S. sciuri* and *S. warneri*), the sources of which were both farm animals and wild animals. That the sources were distributed indicates the wide spread of this gene (1). Moreover, it has been proven that genetic elements responsible for methicillin resistance may be transferred between CoNS and CoPS (including *S. aureus*); therefore, CoNS may constitute an important reservoir of beta-lactam resistance (19). However, regardless of the source of CoNS strains, they usually have a high percentage of phenotypic resistance to cefoxitin, as in our study (7).

Generally, although CoNS have been regarded for a long time as less virulent, many researchers consider them a natural reservoir of various resistance mechanisms transferred through horizontal exchange (1). In our study, we confirmed this observation by demonstrating the presence of resistance genes to tetracyclines, aminoglycosides, macrolides and chloramphenicol in many CoNS strains. Interestingly, the gene encoding *aph*(3')-IIIa (a plasmid-encoded aminoglycoside phosphotransferase) and responsible for resistance to kanamycin and neomycin (16) was also dominant in the CoNS strains. Although this dominance was not statistically significant, these results may confirm the significant role of CoNS strains as reservoirs of resistance genes transferred horizontally. Since the phenotypic resistance to kanamycin and neomycin has not been determined, it is not known whether the presence of the *aph(3)-IIIa* gene is correlated with phenotypic expression of resistance to these antimicrobials, especially in CoNS strains, as four strains belonging to this group also showed the presence of other resistance genes responsible for insensitivity to tetracycline, chloramphenicol and aminoglycosides, including gentamicin (*tet*L, *tet*M, *cat* (pC194) and *acc(6')-Ie-)* but without their phenotypic expression. This phenomenon was not observed in any of the *S. aureus* strains. Quite interesting is the contrast observed between species: phenotypic resistance to phenicols was detected in over 17% of *S. aureus* isolates and correlated with the presence of one or two resistance genes, while no phenotypic resistance was observed in certain CoNS strains despite their carrying chloramphenicol resistance genes, suggesting lack of gene expression in these strains. The resistance to chloramphenicol is an unexpected phenomenon, because the toxicity of this drug precludes its approval for use in animals and humans; therefore, researchers either did not even analyse this type of resistance (23) or did, but obtained full phenotypic susceptibility of CoNS (31). Both the *cat* (p221) and *cat* (p194) genes encode the production of type A acetyltransferases and are located on the plasmids enumerated in their symbols, which guarantees their rapid spread. They can occur individually on plasmids but often co-occur with other genes encoding resistance to streptomycin or macrolides or are part of a multi-resistance plasmid. These characteristics may partially explain the phenotypic and genetic resistance to chloramphenicol observed in our study despite this drug not having been used in the animals. However, a similar

quite high resistance rate of 17% was obtained by other researchers (26).

Resistance to MLS_B is the most common resistance mechanism reported in bacteria of the *Staphylococcus* genus; however, there may not be only one mechanism, because MLS_B resistance is related to the presence of over 90 different genes (24). We analysed only three genes from the *erm* group, which are most often responsible for this type of resistance. Nevertheless, despite the high percentage of erythromycin- (31.4%) and lincomycin-resistant strains (25.7%), only two strains showed the presence of these genes. Resistance in the absence of the three analysed *erm*-group genes can be explained by the presence of numerous other mechanisms encoding this type of resistance. At the same time, only one erythromycin-resistant strain showed the presence of the *msr*A gene encoding macrolide-streptogramin B (MS_B) -type resistance.

The phenotypic resistance to tetracycline was quite high at 40%, as in studies conducted by other authors (13). Tetracycline is a broad-spectrum antibiotic that has been used for over 80 years; therefore, resistance to tetracycline is common in various species of microorganisms isolated from pets, livestock and wildlife (15). In our study, the dominant gene responsible for tetracycline resistance was *tet*L, present in both *S. aureus* and CoNS (25.7%), while *tet*M appeared only in the CoNS strains. The *tet*K and *tet*L genes encode the efflux pump, while the *tet*M gene encodes another resistance mechanism related to ribosome protection (20). Unlike the other genes mentioned above, *tet*M is also responsible for resistance to minocycline and doxycycline (29). This gene, as indicated by other authors, is mainly associated with the *S. xylosus* species (20), which was also confirmed by our results. In many cases, it is possible to observe the simultaneous occurrence of at least two different genes in the same strain. If they encode two different resistance mechanisms, they may potentially yield a synergistic effect associated with a reduction in the zone of inhibition or an increase in the minimum inhibitory concentration (29).

An interesting phenomenon in our study was the relatively low level of the *bla*Z gene in the genome of penicillin-resistant strains. This gene is most often responsible for encoding penicillinases, associated with phenotypic resistance to beta-lactams. The studies by Aubry *et al.* (5) left confidence in amplification of the *bla*Z gene as the reference method for detecting the presence of penicillinases. Nevertheless, the positive correlation of gene amplification with phenotypic resistance among *Staphylococcus* spp. strains depends largely on the method used to measure drug susceptibility (microdilution method or disc-diffusion method), the *Staphylococcus* species tested and the interpretation criteria used. For example, depending of the bacterial species, the criteria regarding the size of the inhibition zone recommended by EUCAST (the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) or the CLSI may correspond better or worse to the presence of the *bla*Z gene. Concurrently, the opposite phenomenon should be taken into account, whereby there may be phenotypic resistance with no parallel genotypic resistance: the *bla*Z gene (like other genes) is not always expressed, because of the relatively high fitness costs for bacteria associated with its expression. Despite the relatively wide pool of analysed virulence genes, especially those of superantigen nature, only one strain of *S. aureus* showed the presence of the SEB enterotoxin encoding gene. Therefore, despite the high potential risk associated with the occurrence of the wide panel of drug resistance, the genome of the tested strains does not indicate that isolated *Staphylococcus* have the status of foodborne pathogens. Similar results were obtained by Gharsa *et al.* (12). It should, however, be borne in mind that in some studies, especially those regarding *S. aureus* isolated from cow's milk, the range and frequency of occurrence of genes encoding enterotoxins or toxic shock toxin and even Panton–Valentine toxin was significantly higher (17).

Conclusion

Clinical and subclinical staphylococcal infections currently pose a great diagnostic and therapeutic challenge. Drug-resistant and MDR strains, of which the genomes often contain many genes encoding resistance to several different groups of antimicrobials, easily share this mobilome with other bacterial strains, sometimes even belonging to separate species, through horizontal exchang, causing resistance even without selective pressure. Therefore, unprocessed sheep's milk may be an important source of highly drug-resistant *Staphylococcus* strains for consumers. The present study highlights the problem of potential subclinical mastitis caused by drug-resistant strains of *S. aureus* and CoNS of the *Staphylococcus* genus among lambed ewes and indicates that the resistance may be related to the selection pressure resulting from frequent application of antibiotic therapy. However, the relationship between the occurrence of drug-resistant *Staphylococcus* strains and the animal breed (domesticated *vs* primitive, *i.e.* more *vs* less resistant to infections and treated more *vs* less frequently), requires further research.

Conflict of Interests Statement: The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

Financial Disclosure Statement: This research was funded by an internal project of the University of Life Sciences in Lublin: Grant No. SD/78/WET/2023 financed by the Ministry of Education and Science.

Animal Rights Statement: None required.

CRediT Authorship Contribution Statement: Agata Hahaj-Siembida: research concept and design,

collection and assembly of data, data analysis and interpretation, writing the article, final approval of the article. **Aneta Nowakiewicz:** writing the article, critical revision of the article, final approval of the article. **Monika Greguła-Kania:** collection and assembly of data, data analysis and interpretation, final approval of the article. **Mariola Bochniarz:** data analysis and interpretation, writing the article, final approval of the article. **Aleksandra Trościańczyk:** data analysis and interpretation, writing the article, final approval of the article. **Marcelina Osińska:** data analysis and interpretation, final approval of the article.

References

1. Abdullahi I.N., Latorre-Fernandez J., Reuben R.C., Trabelsi I., Gonzalez-Azcona C., Arfaoui A., Usman Y., Lozano C., Zarazaga M., Torres C.: Beyond the wild MRSA: genetic features and phylogenomic review of mecc-mediated methicillin resistance in non-aureus staphylococci and mammaliicoci. Microorganisms 2024, 12, 66, doi: 10.3390/microorganisms12010066.
2. Achek R., El-Adawy H., Hotzel H., Tomaso H., Ehricht R., Hamdi T.M., Azzim O., Monecke S.: Diversity of staphylococci isolated from sheep mastitis in northern Algeria. J Dairy Sci 2019, 103, 890–897, doi: 10.3168/jds.2019-16583.
3. Albenzio M., Figliola L., Caroprese M., Marino R., Sevi A., Santillo A.: Somatic cell count in sheep milk. Small Ruminant Res 2019, 176, 24–30, doi:10.1016/j.smallrumres.2019.05.013.
4. Ariza-Miguel J., Hernández M., Fernández-Natal I., Rodríguez-Lázaroa D.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring *mec*C in livestock in Spain. J Clin Microbiol 2014, 52, 4067–4069, doi: 10.1128/JCM.01815-14.
5. Aubry B., Lemarié C., Chenouard R., Kempf M., Eveillard M., Pailhoriès H.: Performance of penicillinase detection tests in *Staphylococcus epidermidis*: comparison of different phenotypic methods. BMC Microbiol 2020, 5, 240, doi: 10.1186/s12866-020-01929-x.
6. Caruso M., Latorre L., Santagada G., Fraccalvieri R., Miccolupo A., Sottili R., Palazzo L., Parisi A.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in sheep and goatbulk tank milk from Southern Italy. Small Ruminant Res 2016, 135, 26–31, doi: 10.1016/j.smallrumres.2015.12.023.
7. Chajęcka-Wierzchowska W., Gajewska J., Zadernowska A., Randazzo C.L., Caggia C.A.: Comprehensive study on antibiotic resistance among coagulase-negative staphylococci (CoNS) strains isolated from ready-to-eat food served in bars and restaurants. Foods 2023, 12, 514, doi: 10.3390/foods12030514.
8. Clinical and Laboratory Standard Institute 2023. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Animals, 6-th ed. CLSI Supplement VET 01 S.
9. Clinical and Laboratory Standard Institute 2023. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33-rd edition. CLSI Supplement M 100.
10. Fragkou I.A., Skoufos J., Cripps P.J., Kyriazakis I., Papaioannou N., Boscos C.M., Tzora A., Fthenakis G.C.: Differences in susceptibility to *Mannheimia haemolytica*-associated mastitis between two breeds of dairy sheep. J Dairy Res, 2014, 74, 349–355, doi: 10.1017/S0022029907002518.
11. García-Alvarez L., Holden M., Lindsay H., Webb C.R., Brown D.F.J., Curran M.D., Walpole E., Brooks K., Pickard D.J., Teale C., Parkhill J., Bentley S.D., Edwards G.F., Girvan K., Kearns A.M., Pichon B., Hill R., Larsen A.R., Skov R.L., Peacock S.J., Maskell D.J., Holmes M.A.: Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mec*A homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis 2011, 11, 595–603, doi: 10.1016/S1473-3099(11)70126-8.
12. Gharsa H., Slama K.B., Lozano C., Gomez-Sanz E., Klibi N., Sallem R.B., Gomez P., Zarazaga M., Boudabous A., Torres C.: Prevalence, antibiotic resistance, virulence traits and genetic lineages of *Staphylococcus aureus* in healthy sheep in Tunisia. Vet Microbiol 2012, 156, 367–373, doi: 10.1016/j.vetmic.2011.11.009.
13. Giacinti G., Carfora V., Caprioli A., Sagrafoli D., Marri N., Giangolini G., Amoruso R., Iurescia M., Stravino F., Dottarelli D., Feltrin F., Franco A., Amatiste S., Battisti A.: Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying *mec*A or *mec*C and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in dairy sheep farms in central Italy. J Dairy Sci 2017, 100, 7857–7863, doi: 10.3168/jds.2017-12940.
14. Greguła-Kania M., Nazar P., Kulik M., Patkowski K., Hahaj-Siembida A., Junkuszew A.: Some physiological responses of native sheep breeds to environmental conditions during grazing in Natura 2000 Habitats. Agriculture 2023, 13, 982, doi: 10.3390/agriculture13050982.
15. Hahaj-Siembida A., Nowakiewicz A., Korzeniowska-Kowal A., Szecówka K., Trościańczyk A., Zięba P., Greguła Kania M.: Red foxes (*Vulpes vulpes*) as a specific and underappreciated reservoir of resistant and virulent coagulase-positive *Staphylococcus* spp. strains. Res Vet Sci 2024, 166, 105111, doi: 10.1016/j.rvsc.2023.105111.
16. Hauschild T., Sacha P., Wieczorek P., Zalewska M., Kaczyńska K., Tryniszewska E.: Aminoglycosides resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from a University Hospital in Bialystok, Poland. Folia Histochem Cytobiol 2008, 46, 225–228, doi: 10.2478/v10042-008-0034-3.
17. Jung H-R., Lee Y.J.: Characterization of virulence factors in enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk. Animals 2022, 12, 301, doi: 10.3390/ani12030301.
18. Karakulska J., Woroszyło M., Szewczuk M., Fijałkowski K.: Identification, superantigen toxin gene profile and antimicrobial resistance of staphylococci isolated from Polish primitive sheep breeds. Animals 2022, 12, 2139, doi: 10.3390/ani12162139.
19. Kawęcka A., Pasternak M., Miksza-Cybulska A., Puchała M.: Native sheep breeds in Poland – Importance and outcomes of Genetic Resources Protection Programmes. Animals 2022, 12, 1510, doi: 10.3390/ani12121510.
20. Leroy S., Christieans S., Talon R.: Tetracycline gene transfer in *Staphylococcus xylosus in situ* during sausage fermentation. Front Microbiol 2019, 10, 392, doi: 10.3389/fmicb.2019.00392.
21. Loncaric I., Kübber-Heiss A., Posautz A., Ruppitsch W., Lepuschitz S., Schauer B., Feßler A.T., Krametter-Frötscher R., Harrison E.M., Holmes M.A., Künzel F., Szostak M.P., Hauschild T., Desvars-Larrive A., Misic D., Rosengarten R., Walzer C., Slickers P., Monecke S., Ehricht R., Schwarz S., Spergser, J.: Characterization of *mec*C gene-carrying coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from various animals. Vet Microbiol 2019, 230, 138–144, doi:10.1016/j.vetmic.2019.02.014.
22. Maity S., Ambatipudi K.: Mammary microbial dysbiosis leads to the zoonosis of bovine mastitis: a One-Health perspective. FEMS Microbiol Ecol 2020, 97, fiaa241, doi: 10.1093/femsec/fiaa241.
23. Mascaro V., Squillace L., Nobile C.G.A., Papadopoli R., Bosch T., Schouls L.M., Casalinuovo F., Musarella R., Pavia M.: Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage and pattern of antibiotic resistance among sheep farmers from Southern Italy. Infect Drug Resist 2019, 12, 2561–2571, doi: 10.2147/IDR.S211629.
24. Michael C.K., Lianou D.T., Vasileiou N.G.C., Mavrogianni V.S., Petinaki E., Fthenakis G.C.: Longitudinal study of subclinical mastitis in sheep in Greece: an investigation into incidence risk, associations with milk quality and risk factors of the infection. Animals 2023, 13, 3295, doi: 10.3390/ani13203295..
25. National Mastitis Council (U.S.), 2004. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality.
26. Obaidat M.M., Salman A.E.B., Roess A.A.: *Staphylococcus aureus* in dairy cattle, sheep, and goat bulk tank milk in Jordan. Trop Anim Health Prod 2018, 50, 405–412, doi:10.1007/s11250-017-1449-7.

27. Parte A.C., Sardà Carbasse J., Meier-Kolthoff J.P., Reimer L.C., Göker M.: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. Int J Syst Evol Microbiol 2020, 70, 5607–5612, doi: 10.1099/ijsem.0.004332, https://lpsn.dsmz.de/genus/staphylococcus.
28. Trzcinski K., Cooper B.S., Hryniewicz W., Dowson C.G.: Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* J Antimicrob Chemother 2020, 45, 763–770, doi: 10.1093/jac/45.6.763.
29. Vasileiou N.G.C., Chatzopoulos D.C., Sarrou S., Fragkou I,A,, Katsafadou A.I., Mavrogianni V.S., Petinaki E., Fthenakis G.C.: Role of staphylococci in mastitis in sheep. J Dairy Res 2019, 86, 254–266, doi: 10.1017/S0022029919000591.
30. Vasileiou N.G.C., Mavrogianni V.S., Petinaki E., Fthenakis G.C.: Predisposing factors for bacterial mastitis in ewes. Reprod Domest Anim 2019, 54, 1424–1431, doi: 10.1111/rda.13541.
31. Wesołowska M., Szczuka E.: Occurrence and antimicrobial resistance among staphylococci isolated from the skin microbiota of healthy goats and sheep. Antibiotics 2023, 12, 1594, doi: 10.3390/antibiotics12111594.

Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 31.12.2025

mgr inż. Agata Hahaj-Siembida
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych,
Zakład Mikrobiologii,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin
Nr telefonu: 814456696
E-mail: agata.hahaj-siembida@up.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Agata Hahaj-Siembida, Aneta Nowakiewicz, Agnieszka Korzeniowska-Kowal, Kamila Szecówka, Aleksandra Trościańczyk, Przemysław Zięba, Monika Greguła-Kania 2024, pt. „Red foxes (*Vulpes vulpes*) as a specific and underappreciated reservoir of resistant and virulent coagulase-positive *Staphylococcus* spp. strains" Res. Vet. Sci. 166:105111. doi: 10.1016/j.rvsc.2023.105111, mój udział polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu metodyki badań, przeprowadzeniu analiz badawczych zawartych w części metodycznej pracy, wizualizacji i dokumentacji wyników i bankowaniu szczepów, udziale w analizie i interpretacji wyników, gromadzeniu literatury i opracowaniu oraz korekcie manuskryptu po ocenie recenzentów.

Agata Hahaj-Siembida
Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 31.12.2025

mgr inż. Agata Hahaj-Siembida
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych,
Zakład Mikrobiologii,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin
Nr telefonu: 814456696
E-mail: agata.hahaj-siembida@up.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Agata Hahaj-Siembida, Aneta Nowakiewicz, Monika Greguła-Kania, Mariola Bochniarz, Aleksandra Trościańczyk, Marcelina Osińska , 2025 pt. "Characteristics of drug-resistant staphylococci isolated from milk of lambed ewes during the perinatal period". Journal of Veterinary Research, vol. 69, no. 1, National Veterinary Research Institute in Pulawy, 41-50. https://doi.org/10.2478/jvetres-2025-0014, mój udział polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu metodyki badań, przeprowadzeniu analiz badawczych zawartych w części metodycznej pracy, wizualizacji i dokumentacji wyników i bankowaniu szczepów, udziale w analizie i interpretacji wyników, gromadzeniu literatury i przygotowaniu manuskryptu.

Agata Hahaj-Siembida
.....
Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 31.12.2025

Prof. dr hab. Aneta Nowakiewicz
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych,
Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin
Nr telefonu: 814456008
E-mail: aneta.nowakiewicz@up.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Agata Hahaj-Siembida, Aneta Nowakiewicz, Agnieszka Korzeniowska-Kowal, Kamila Szecówka, Aleksandra Trościańczyk, Przemysław Zięba, Monika Greguła-Kania 2024, pt. „Red foxes (*Vulpes vulpes*) as a specific and underappreciated reservoir of resistant and virulent coagulase-positive *Staphylococcus* spp. strains" Res. Vet. Sci. 166:105111. doi: 10.1016/j.rvsc.2023.105111, mój udział polegał na: pomocy w opracowaniu koncepcji pracy, opiece merytorycznej, udziale w analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz roli autora korespondencyjnego.

.....
Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 31.12.2025

Prof. dr hab. Aneta Nowakiewicz
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych,
Zakład Mikrobiologii,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin
Nr telefonu: 814456008
E-mail: aneta.nowakiewicz@up.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Agata Hahaj-Siembida, Aneta Nowakiewicz, Monika Greguła-Kania, Mariola Bochniarz, Aleksandra Trościańczyk, Marcelina Osińska , 2025 "Characteristics of drug-resistant staphylococci isolated from milk of lambed ewes during the perinatal period". Journal of Veterinary Research, vol. 69, no. 1, National Veterinary Research Institute in Pulawy, 41-50. https://doi.org/10.2478/jvetres-2025-0014, mój udział polegał na: opiece merytorycznej, udziale w analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz roli autora korespondencyjnego.

.....

Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 31.12.2025

dr hab. inż. Monika Greguła-Kania
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki,
Katedra Hodowli Zwierząt i Doradztwa
Rolniczego,
Zakład Hodowli Małych Przeżuwaczy i Doradztwa
Rolniczego
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin
Nr telefonu: 814456826
E-mail: monika.gregulakania@up.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Agata Hahaj-Siembida, Aneta Nowakiewicz, Agnieszka Korzeniowska-Kowal, Kamila Szecówka, Aleksandra Trościańczyk, Przemysław Zięba, Monika Greguła-Kania 2024, pt. „Red foxes (*Vulpes vulpes*) as a specific and underappreciated reservoir of resistant and virulent coagulase-positive *Staphylococcus* spp. strains" Res. Vet. Sci. 166:105111. doi: 10.1016/j.rvsc.2023.105111, mój udział polegał na: opiece merytorycznej, udziale w analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu.

.....
Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 31.12.2025

dr hab. inż. Monika Greguła-Kania
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki,
Katedra Hodowli Zwierząt i Doradztwa
Rolniczego,
Zakład Hodowli Małych Przeżuwaczy i Doradztwa
Rolniczego
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin
Nr telefonu: 814456826
E-mail: monika.gregulakania@up.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Agata Hahaj-Siembida, Aneta Nowakiewicz, Monika Greguła-Kania, Mariola Bochniarz, Aleksandra Trościańczyk, Marcelina Osińska , 2025 "Characteristics of drug-resistant staphylococci isolated from milk of lambed ewes during the perinatal period". Journal of Veterinary Research, vol. 69, no. 1, National Veterinary Research Institute in Pulawy, 41-50. https://doi.org/10.2478/jvetres-2025-0014, mój udział polegał na: opiece merytorycznej, pomocy w gromadzeniu materiału badawczego, udziale w analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz poprawkach pokorekcyjnych.

.....
Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 31.12.2025

dr hab. Mariola Bochniarz prof. uczelni
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych,
Zakład Mikrobiologii,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin
Nr telefonu: 814456093
E-mail: mariola.bochniarz@up.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Agata Hahaj-Siembida, Aneta Nowakiewicz, Monika Greguła-Kania, Mariola Bochniarz, Aleksandra Trościańczyk, Marcelina Osińska , 2025 "Characteristics of drug-resistant staphylococci isolated from milk of lambed ewes during the perinatal period". Journal of Veterinary Research, vol. 69, no. 1, National Veterinary Research Institute in Pulawy, 41-50. https://doi.org/10.2478/jvetres-2025-0014, mój udział polegał na: udziale w analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz poprawkach porecenzyjnych.

Mariola Bochniarz

Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 31.12.2025

dr Aleksandra Trościańczyk
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych,
Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin
Nr telefonu: 814456016
E-mail: aleksandra.troscianczyk@up.lublin.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Agata Hahaj-Siembida, Aneta Nowakiewicz, Agnieszka Korzeniowska-Kowal, Kamila Szecówka, Aleksandra Trościańczyk, Przemysław Zięba, Monika Greguła-Kania 2024, pt. „Red foxes (*Vulpes vulpes*) as a specific and underappreciated reservoir of resistant and virulent coagulase-positive *Staphylococcus* spp. strains" Res. Vet. Sci. 166:105111. doi: 10.1016/j.rvsc.2023.105111, mój udział polegał na: udziale w analizie i interpretacji wyników oraz wsparciu w analizie statystycznej, przygotowaniu manuskryptu oraz poprawkach porecenzyjnych.

Trościańczyk Aleksandra
.....
Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 31.12.2025

dr Aleksandra Trościańczyk
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych,
Zakład Mikrobiologii,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin
Nr telefonu: 814456016
E-mail: aleksandra.troscianczyk@up.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Agata Hahaj-Siembida, Aneta Nowakiewicz, Monika Greguła-Kania, Mariola Bochniarz, Aleksandra Trościańczyk, Marcelina Osińska , 2025 "Characteristics of drug-resistant staphylococci isolated from milk of lambed ewes during the perinatal period". Journal of Veterinary Research, vol. 69, no. 1, National Veterinary Research Institute in Pulawy, 41-50.https://doi.org/10.2478/jvetres-2025-0014, mój udział polegał na: udziale w analizie i interpretacji wyników oraz wsparciu w analizie statystycznej, przygotowaniu manuskryptu oraz poprawkach porecenzyjnych.

Trościańczyk Aleksandra

Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 31.12.2025

dr Marcelina Anna Osińska
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych,
Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin
Nr telefonu: 814456696
E-mail: marcelina.osinska@up.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Agata Hahaj-Siembida, Aneta Nowakiewicz, Monika Greguła-Kania, Mariola Bochniarz, Aleksandra Trościańczyk, Marcelina Osińska , 2025 "Characteristics of drug-resistant staphylococci isolated from milk of lambed ewes during the perinatal period". Journal of Veterinary Research, vol. 69, no. 1, National Veterinary Research Institute in Pulawy, 41-50. https://doi.org/10.2478/jvetres-2025-0014, mój udział polegał na: udziale w analizie i interpretacji wyników dotyczących lekooporności, przygotowaniu manuskryptu i współuczestniczeniu w poprawkach porecenzyjnych.

Marcelina Osińska

Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

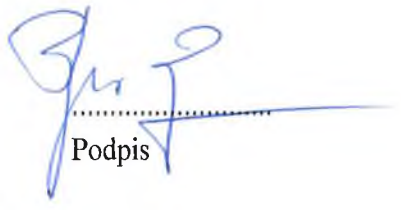
Lublin, 31.12.2025

dr n. wet Przemysław Zięba
Wojewódzki Inspektorat Weterynarii,
Zakład Higieny Weterynaryjnej,
ul. Droga Męczenników Majdanka 50,
20-325 Lublin
Nr telefonu: 817443691
E-mail: przemekzieba@gmail.com

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Agata Hahaj-Siembida, Aneta Nowakiewicz, Agnieszka Korzeniowska-Kowal, Kamila Szecówka, Aleksandra Trościańczyk, Przemysław Zięba, Monika Greguła-Kania 2024, pt. „Red foxes (*Vulpes vulpes*) as a specific and underappreciated reservoir of resistant and virulent coagulase-positive *Staphylococcus* spp. strains" Res. Vet. Sci. 166:105111. doi: 10.1016/j.rvsc.2023.105111, mój udział polegał na: wyselekcjonowaniu i pobraniu materiału do badań laboratoryjnych od zwierząt wolno żyjących, udziale w korekcie i opracowaniu manuskryptu.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 31.12.2025

dr inż. Agnieszka Korzeniowska-Kowal
Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
Polska Akademia Nauk
ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław
tel. + 48 71 337 11 72 wew. 392
email: akorzen@iitd.pan.wroc.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria

Uniwersytetu Przyrodniczego

w Lublinie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Agata Hahaj-Siembida, Aneta Nowakiewicz, Agnieszka Korzeniowska-Kowal, Kamila Szecówka, Aleksandra Trościańczyk, Przemysław Zięba, Monika Greguła-Kania 2024, pt. „Red foxes (*Vulpes vulpes*) as a specific and underappreciated reservoir of resistant and virulent coagulase-positive *Staphylococcus* spp. strains" Res. Vet. Sci. 166:105111. doi: 10.1016/j.rvsc.2023.105111, mój udział polegał na: pomocy w opracowaniu części metodycznej dotyczącej identyfikacji szczepów, udziale w analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu.

Agnieszka Korzeniowska-Kowal

Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Wrocław, 31.12.2025

mgr Kamila Szecówka
Zakład Patomorfologii i Cytologii Klinicznej
Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. Jana Mikulicza-Radeckiego we Wrocławiu
ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław
email: kamila.szecowka@usk.wroc.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria

Uniwersytetu Przyrodniczego

w Lublinie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Agata Hahaj-Siembida, Aneta Nowakiewicz, Agnieszka Korzeniowska-Kowal, Kamila Szecówka, Aleksandra Trościańczyk, Przemysław Zięba, Monika Greguła-Kania 2024, pt. „Red foxes (*Vulpes vulpes*) as a specific and underappreciated reservoir of resistant and virulent coagulase-positive *Staphylococcus* spp. strains" Res. Vet. Sci. 166:105111. doi: 10.1016/j.rvsc.2023.105111, mój udział polegał na: pomocy w opracowaniu części metodycznej dotyczącej identyfikacji szczepów, udziale w analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu.

Szecówka

Podpis