

Keragaman Spesies dan Genetik Bakteri *Staphylococcus* pada Ikan Tuna dengan Analisis Sekuen 16s rRNA

(SPECIES DIVERSITY AND GENETIC OF STAPHYLOCOCCUS BACTERIA IN TUNA FISH BY USING 16S rRNA SEQUENCE ANALYSIS)

Putu Mei Purnama Dewi¹, I Nengah Kerta Besung²,
I Gusti Ngurah Kade Mahardika^{3,4}

¹Mahasiswa Program Dokter Hewan, ²Laboratorium Mikrobiologi

³Laboratorium Virologi, ⁴UPT Laboratorium Biomedika,

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana

Jln. Sudirman Denpasar, Bali

Telpon. 0361223791. E-mail: meipurnama29@gmail.com

ABSTRAK

Ikan tuna merupakan komoditi perikanan laut yang bernilai ekonomi tinggi. Bakteri yang ditemukan pada ikan tuna berdampak pada kesehatan konsumen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman spesies dan variasi genetik bakteri *Staphylococcus* pada ikan tuna, khususnya yang dipasarkan di Pasar Ikan Kedonganan, Kuta, Badung, Bali dengan analisis sekuens 16S rRNA. Bakteri *Staphylococcus* diisolasi dari 30 sampel feses ikan tuna. Setelah diidentifikasi dengan pewarnaan Gram, koloni bakteri *Staphylococcus* dipindahkan ke dalam media chelex 10% untuk ekstraksi DNA, amplifikasi gen 16S rRNA dengan *polymerase chain reaction* (PCR), dan dielektroforesis. Hasil PCR disekuensing, kemudian sekuen yang diperoleh diedit dengan menggunakan program MEGA 5 serta di-BLAST untuk konfirmasi spesies. Variasi genetik ditentukan dengan analisis situs polimorfik dengan program yang sama. Bakteri yang dapat diidentifikasi adalah *Staphylococcus sciuri* dan *Staphylococcus haemolyticus*. Jarak genetik dua isolat *S. sciuri* sangat dekat. Bakteri lain yang dapat diidentifikasi adalah *Enterococcus faecalis* dan *Macrocooccus caseolyticus*. Simpulan yang dapat ditarik adalah bakteri *Staphylococcus* yang ditemukan beragam dan dua spesies *S. sciuri* bervariasi.

Kata-kata kunci: ikan tuna, bakteri *Staphylococcus*, sekuen 16S rRNA, Kedonganan

ABSTRACT

Tuna industry belongs to high economic value fish of marine fisheries commodity. Bacteria found in tuna might have impact on consumer health. The purpose of this research was to determine the genetic variation of *Staphylococcus* in Kedonganan fish market, Kuta, Badung, Bali by sequence analysis of 16S rRNA. *Staphylococcus* bacteria was isolated from feces samples of 30 tuna. After identification with Gram staining, *Staphylococcus* colonies were transferred to the medium chelex 10% for DNA extraction, 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction (PCR), and electrophoresis. PCR results were sequenced, and the sequence obtained was edited using MEGA 5 and then BLAST was applied to confirm the species. Genetic variation was determined by analysis of polymorphic sites with MEGA 5. The identified bacteria were *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus*. Genetic distance of two isolates *S. sciuri* are close. The Other species that were identified were *Enterococcus faecalis* and *Macrocooccus caseolyticus*. Conclusion on this research is *Staphylococcus* bacteria and two species *S. sciuri* have many variation.

Keywords: Tuna Fish, *Staphylococcus*, 16S rRNA sequences, Kedonganan

PENDAHULUAN

Isu hangat yang merebak di kalangan masyarakat terkait dengan kesehatan dan keamanan pangan adalah adanya isu tentang keracunan histamin setelah mengkonsumsi ikan

tuna. Gejala keracunan pada manusia antara lain ruam, mual, muntah, dan diare (Shalaby,1996). Beberapa kasus dilaporkan sampai meninggal dunia. Histamin pada ikan tuna terjadi akibat pembentukan amin biogenik melalui reaksi dekarboksilasi asam amino

histidin bebas dengan aktivitas dari bakteri. Histamin juga dikenal sebagai *scromboid toxine*, karena umumnya ditimbulkan akibat mengkonsumsi ikan-ikan dari famili *Scombridae* (Murray *et al.*, 1981). Bakteri yang dapat membentuk histamin adalah *Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella planticola*, *R. ornithinolytica*, *Photobacterium damsela*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Vibrio alginolyticus*, *Escherichia coli* (Taylor dan Speckhard 1983; Butler *et al.*, 2010), *Morganella psychrotolerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, dan *Staphylococcus piscifermentans* (Hwang *et al.*, 2010).

Staphylococcus merupakan bakteri fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak (Fischetti *et al.*, 2000). *Staphylococcus* adalah bakteri yang dapat ditemukan di udara, debu, pasir, air, susu, makanan, lingkungan dan saluran pencernaan ikan. Penyakit yang ditimbulkan akibat mengkonsumsi ikan tuna yang mengandung bakteri *Staphylococcus* dalam jumlah yang cukup tinggi adalah timbulnya kejadian keracunan histamin (Hwang *et al.*, 2010).

Gotz *et al.*, (2006) melaporkan, bakteri *Staphylococcus* memiliki keragaman spesies berjumlah 36 spesies dan delapan sub-spesies. Beberapa dari spesies *Staphylococcus* merupakan spesies yang bersifat patogen dan zoonosis (Kloos dan Musselwhite, 1975). Allen *et al.*, (2005) melaporkan salah satu spesies *Staphylococcus* yaitu *S. klosii* sebagai bakteri pembentuk histamin pada sediaan makanan asal ikan mahi-mahi dan tuna di Amerika Serikat. Kung *et al.*, (2012) melaporkan *S. pasteurii* sebagai pembentuk histamin pada saus ikan tuna di Taiwan. Produksi histamin yang berbahaya pada ikan tuna dan hasil-hasil olahannya dapat mengandung bakteri penghasil lipase seperti *S. xylosum* yang dapat sangat bermanfaat untuk industri (Rebah *et al.*, 2008). Peneliti lain, Economou *et al.*, (2007) berhasil mengidentifikasi berbagai spesies bakteri pembentuk histamin, seperti *M. morganii*, *Klebsiella oxytoca*, *S. hominis*, dan *Enterococcus hirae* dari daging ikan tuna setelah dibiarkan beberapa saat pada suhu kamar.

Penentuan keragaman spesies dan variasi genetik dari bakteri *Staphylococcus* dapat dilakukan dengan menggunakan analisis sekuen 16S rRNA. Bavykin *et al.*, (2004) menyatakan sekuen 16S rRNA adalah suatu metode yang umum digunakan untuk menganalisis suatu DNA mikroorganisme.

Sebab Sekuen 16S rRNA merupakan target untuk memonitor perubahan genetik yang baik (Stackebrandt dan Goebel, 1995). Basis data sekuen bakteri *Staphylococcus* tersedia banyak di *GenBank* adalah 16S rRNA, sehingga penelitian difokuskan pada gen tersebut untuk mempermudah pengolahan data.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman spesies dan variasi genetik dari bakteri *Staphylococcus* pada ikan tuna yang dipasarkan di Pasar Ikan Kedonganan, Kuta, Badung, Bali dengan analisis sekuen 16S rRNA.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan 30 sampel ikan tuna yang didapat dari Pasar Ikan Kedonganan. Pengambilan ikan tuna dilakukan lima kali secara acak di masing-masing pedagang ikan tuna. Jumlah ikan tuna yang diambil sebanyak enam ekor dalam sekali pengambilan sampel. Feses ikan tuna diambil dengan cara membedah bagian perut lalu memotong bagian usus paling belakang dekat dengan kloaka yang berisi feses.

Isolasi Bakteri *Staphylococcus*

Feses ikan tuna diambil sedikit dengan menggunakan *ose* untuk ditanam dalam media *Blood agar*. Selanjutnya media agar tersebut diinkubasikan selama 24 jam dalam suhu 37°C. Koloni yang tumbuh diidentifikasi bentuknya dengan pewarnaan Gram. *Slide* pewarnaan Gram diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1.000 kali. *Staphylococcus* berbentuk bulat dan tersusun seperti untaian buah anggur (Jawetz *et al.*, 1995; Fischetti *et al.*, 2000). Koloni tersebut diambil dan dimasukkan pada media *chelex* selanjutnya dibawa ke Laboratorium *Indonesian Biodiversity Research Center* (IBRC) Universitas Udayana, untuk dilakukan ekstraksi DNA.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA bakteri dilakukan dengan cara mengambil satu koloni *Staphylococcus* dengan *ose* dan dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* yang sudah berisi 250 µL *chelex* 10%. Selanjutnya tabung di-*vortex* selama satu menit, di-*spin* dengan kecepatan 15.000 rpm selama 30 detik menggunakan *microcentrifuge*, dan diinkubasikan selama 45 menit pada suhu 95°C menggunakan *heating block*. Setelah selesai, tabung di-*vortex* kembali

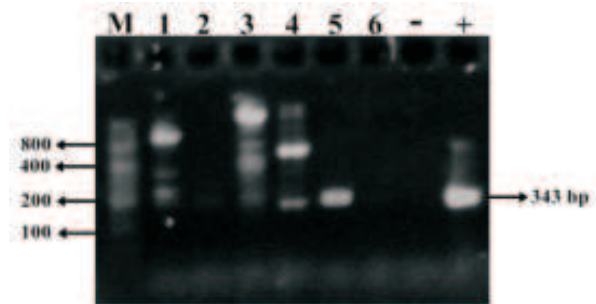
selama satu menit, dan di-spin selama 30 detik.

Amplifikasi Gen 16S rRNA *Staphylococcus*. Amplifikasi DNA bakteri menggunakan primer 16S rRNA TStAG422 (5'-GGC CGT GTT GAA CGT GGT CAA ATC-3') dan TStAG765 (5'-TAC CAT TTC AGT ACC TTC TGG TAA-3') (Martineau *et al.*, 2001). Dibuat PCR *mixes* sejumlah 24 µL yang terdiri dari 14,5 µL ddH₂O, 2,5 µL 10X PCR Buffer (*Hot start*), 2,5 µL dNTPs (8 mM), 2,0 µL MgCl₂ Solution (25 mM), 1,25 µL dari masing-masing primer (10 µM), 0,125 µL *Amplitaq Hot start* (5 units/µL), dan 3 µL DNA *template*. Amplifikasi menggunakan alat *Thermal Cycler* (Applied Biosystem). Tahapan Pre-PCR selama 10 menit pada suhu 94°C. Proses PCR dilakukan sebanyak 38 siklus dengan tahap *denaturasi* 30 detik suhu 94°C, *annealing* 30 detik suhu 50°C, *extention* selama 45 detik suhu 72°C. *Post PCR* 10 menit suhu 72°C dan satu menit suhu 24°C.

Elektroforesis. Setelah PCR, 4 µL dari volume produk ditambahkan dengan 1µL *loading dye* (*Bromphenol-blue* dan *Cyline Cyanol*) dan selanjutnya dielektroforesis pada gel 1% yang telah diisi *etidium bromide* (EtBr) sebanyak 4 µL. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 v, dengan arus 400 mA menggunakan marker 100 bp DNA *ladder* (Invitrogen) selama 30 menit. Visualisasi fragmen DNA dilakukan di bawah sinar *ultraviolet* dan foto diambil menggunakan kamera digital.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Koloni bakteri yang tumbuh pada media agar darah berukuran sedang sampai besar dan berwarna kuning halus. Pada pewarnaan Gram setelah diamati di bawah mikroskop cahaya terlihat bakteri Gram positif dengan bentuk menyerupai untaian buah anggur. Koloni bakteri yang diduga sebagai bakteri *Staphylococcus* selanjutnya diambil untuk dilakukan ekstraksi DNA dan amplifikasi 16S rRNA. Amplifikasi 16S rRNA dilakukan dengan menggunakan primer TStAG422 dan TStAG765 (Martineau *et al.*, 2001). Hasil elektroforesis PCR pada agarose 1% dengan menggunakan marker *low mass ladder* disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Foto elektroforesis dari hasil PCR pada agarose 1%. Mulai dari kiri adalah M (*Marker*), hasil PCR nomor tube 1-6, kontrol negatif (-), dan kontrol positif (+).

Dari 30 sampel yang diamati, 27 sampel diduga positif bakteri *Staphylococcus*. Setelah diamplifikasi, 16 sampel dinyatakan positif *Staphylococcus*. Urutan DNA 16S rRNA dari 16 produk PCR bakteri *Staphylococcus* didapat dari hasil sekuensing, kemudian diedit dengan menggunakan program MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011). Hasil perunutan data sekuen dapat dibaca dengan baik yaitu berkisar 347 bp hingga 382 bp.

Hasil BLAST menunjukkan bahwa dari 16 sampel yang dikirim untuk disekuensing, terdapat 11 sekuen yang terbaca. Dari 11 sampel tersebut didapat bakteri *S.sciuri* dengan homologi 99%-100%, *S.haemolyticus* dengan homologi 99%, *Enterococcus faecalis* dengan homologi 98%, dan *Macroccoccus caseolyticus*. Sampel lainnya tidak dapat diidentifikasi. Data *GeneBank* yang terdekat adalah *Vagococcus teuberi* dengan homologi antara 88%-91%.

Jarak genetik dari ketiga sampel Bakteri *Staphylococcus* dan tiga data dari *GeneBank* adalah beragam. Analisis jarak genetik dari setiap spesies bakteri *Staphylococcus* disajikan pada Tabel 1. Pada tabel tersebut jarak genetik yang paling dekat adalah 0.000 dan jarak yang paling jauh 0.115. Dua sampel memiliki jarak genetik paling dekat dengan spesies *S.sciuri* dengan jarak genetik sebesar 0.000 dan 0.003. Satu sampel memiliki jarak genetik yang terdekat dengan spesies *S.haemolyticus* dengan jarak genetik sebesar 0.003. Dengan demikian spesies ketiga spesimen dapat dikorfiriasi sebagai spesies bakteri *Staphylococcus*.

Tabel 1. Jarak genetik dari sampel bakteri *Staphylococcus* asal ikan tuna yang dipasarkan di Pasar Ikan Kedonganan dengan data yang ada di *GenBank*

No. dan Data dari GenBank	Kode Sampel	S.KD.T.02	S.KD.T.16	S.KD.T.27	<i>S. sciuri</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. haemolyticus</i>
1.	S.KD.T.02						
2.	S.KD.T.16	0.111					
3.	S.KD.T.27	0.003	0.115				
4.	<i>S. sciuri</i>	0.000	0.111	0.003			
5.	<i>S. sciuri</i>	0.000	0.111	0.003	0.000		
6.	<i>S. haemolyticus</i>	0.107	0.003	0.111	0.107	0.107	

Sekuen di *GenBank* diunduh untuk mengetahui hubungan bakteri *Staphylococcus* pada sampel feses ikan tuna di Pasar Ikan Kedonganan dengan data *Staphylococcus* yang ada di *GenBank*. Data berupa sekuen yang telah diunduh dari *GenBank* di-alignment dengan sampel yang dikelompokkan dalam satu spesies. Analisis situs *poliorfik* disajikan pada Tabel 2. Dari tabel tersebut teramati bahwa sampel dengan kode 80-SKDT02_TSTAG422_MEI terdapat perbedaan basa pada nomor 315.

Tabel 2. Situs *polimorfik* sampel S.KD.T.02 dan S.KD.T.27 yang diduga bakteri *Staphylococcus sciuri* terhadap beberapa data yang ada di *GenBank*

Sampel	Situs Polimorfik
	315
80-SKDT02_TSTAG422_MEI	A
86-SKDT27_TSTAG765_MEI	.
<i>S. sciuri</i> 2 100	.
<i>S. sciuri subsp. sciuri</i> 27 99	.
<i>S. sciuri subsp. sciuri</i> (2)	.
<i>S. sciuri subsp. rodentium</i>	.
<i>S. sciuri subsp. carnaticus</i>	.
<i>S. sciuri</i> (2)	.
<i>S. sciuri subsp. rodentium</i> (2)	.
<i>S. sciuri subsp. sciuri</i> (3)	.
<i>S. sciuri subsp. carnaticus</i> (2)	.
<i>S. sciuri subsp. sciuri</i> (4)	.
<i>S. sciuri subsp. sciuri</i> (5)	.
<i>S. sciuri subsp. rodentium</i> (3)	.
<i>S. sciuri subsp. rodentium</i> (4)	.
<i>S. sciuri subsp. carnaticus</i> (3)	.
<i>S. sciuri subsp. carnaticus</i> (4)	.

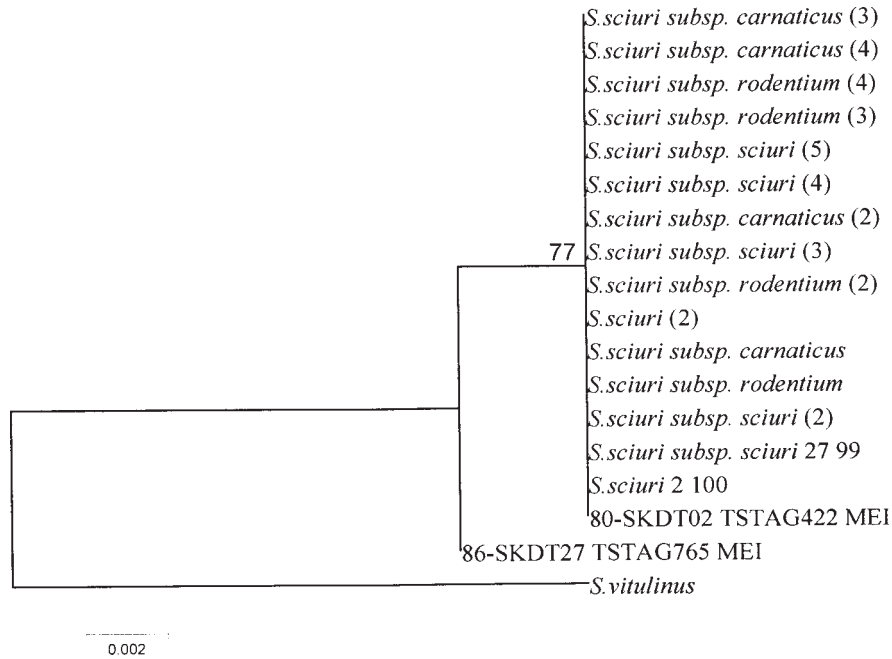
Keterangan: Titik-titik pada setiap sekuens menunjukkan kesamaan basa.

Hasil analisis pohon filogenetik setiap kelompok spesies disajikan pada Gambar 2 dan Gambar 3. Dari gambar tersebut tampak bahwa sampel merupakan spesies yang sama yaitu spesies bakteri *S. sciuri*. Sedangkan satu sampel merupakan spesies bakteri *S. haemolyticus*.

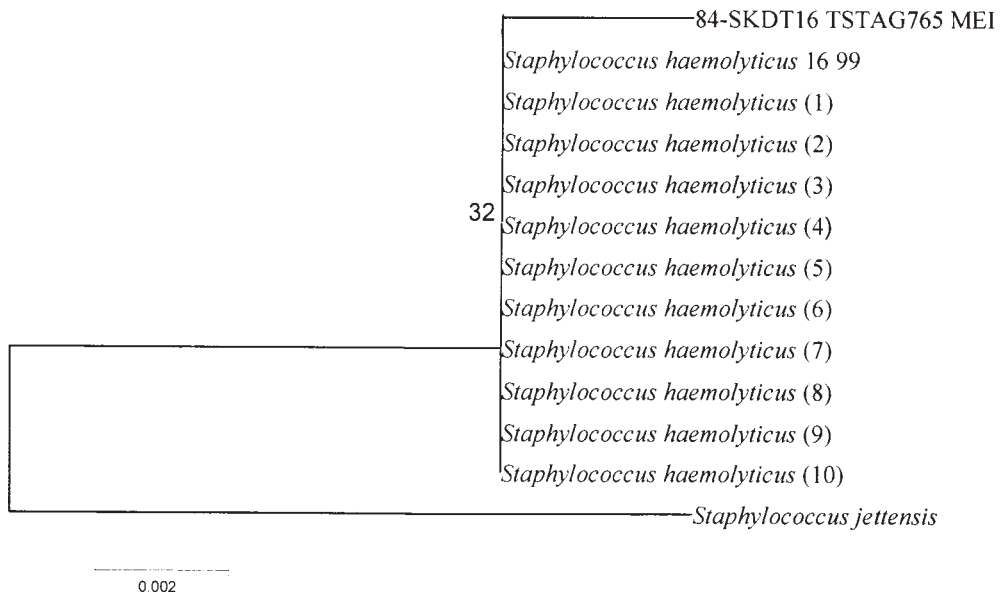
Stackebrandt dan Goebel (1995) begitu pula Janda dan Abbot (2007) menyatakan bahwa suatu spesies bakteri dikatakan sama apabila memiliki homologi lebih dari atau sama dengan 97%. Untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai spesies yang belum dapat teridentifikasi tersebut. Dalam penelitian ini ditemukan dua spesies bakteri *S. sciuri*. Spesies lainnya yang ditemukan adalah *E. faecalis*.

Bakteri *S. sciuri* pada manusia bersifat patogen dan menyebabkan terjadinya endokarditis (Hedin *et al.*, 1998), infeksi pada saluran kemih (Stepanovic *et al.*, 2003), infeksi pada luka (Shittu *et al.*, 2004; Coimbra *et al.*, 2011), peritonitis (Wallet *et al.*, 2000), syok septik (Horii *et al.*, 2001), dan penyakit radang panggul (Stepanovic *et al.*, 2005). Bakteri *S. sciuri* dapat ditemukan secara luas di alam sebagai komensal spesies hewan pengerat, marsupial dan dapat pula diisolasi dari hewan peliharaan dan peternakan (Juuti, 2004). Thorberg (2008) melaporkan bahwa spesies bakteri tersebut dapat menimbulkan penyakit mastitis pada ternak ruminansia dan epidermitis eksudatif (EE) pada babi dan tikus. Dengan kata lain, bakteri tersebut dapat dikatakan sebagai agen zoonosis. Tsai *et al.*, (2007) menemukan *S. sciuri subsp. sciuri* sebagai bakteri pembentuk histamin pada ikan bandeng kering, yang dianalisis dengan menggunakan sekuen 16S rDNA.

Bakteri *S. haemolyticus* merupakan bakteri *patogen* yang keberadaannya sangat penting bagi manusia. Bakteri tersebut dapat



Gambar 2. Pohon filogeni *Staphylococcus sciuri* dari sampel S.KD.T.02 dan S.KD.T.27 dengan data dari *GenBank*. *Staphylococcus vitulinus* digunakan sebagai *out group*. Pohon filogenetik ini disimpulkan dengan menggunakan metode *maximum likelihood*, persentase pohon filogenetik untuk menentukan taksa yang sama dites bootstrap (100 ulangan) yang ditampilkan di samping cabang, jarak evolusi dihitung dengan menggunakan metode Kimura 2-parameter dan analisis evolusioner dilakukan di MEGA 5.



Gambar 3. Pohon filogeni *Staphylococcus haemolyticus* dari sampel S.KD.T.16 dengan data dari *Genbank*. *Staphylococcus jettensis* digunakan sebagai *out group*. Pohon filogenetik ini disimpulkan dengan menggunakan metode *maximum likelihood*, persentase pohon filogenetik untuk menentukan taksa yang sama dites bootstrap (100 ulangan) yang ditampilkan di samping cabang, jarak evolusi dihitung dengan menggunakan metode Kimura 2-parameter dan analisis evolusioner dilakukan di MEGA 5.

menimbulkan penyakit yang terkait dengan sistem saraf pusat, *native-valve* endokarditis, septicemia, peritonitis, infeksi saluran kemih / *urinary tract infections* (UTIs), luka, infeksi pada tulang dan persendian (Castro *et al.*, 2006). Bakteri *S. haemolyticus* dapat diisolasi dari monyet dan hewan domestik (seperti anjing, babi, kuda, sapi). Bakteri *S. haemolyticus* merupakan bakteri patogen nosokomial nomor dua setelah *S. epidermidis*. Penelitian yang menemukan spesies bakteri *S. sciuri* dan *S. haemolyticus* pada ikan tuna sebagai bakteri pembentuk histamin belum pernah diporkan di Indonesia.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa spesies *Staphylococcus* yang dapat teridentifikasi pada saluran cerna ikan tuna adalah *S. sciuri* dan *S. haemolyticus*. Bakteri lain yang dapat teridentifikasi adalah *E. faecalis* dan *M. caseolyticus*. Kedua isolat bakteri *S. sciuri* memiliki perbedaan genetik yang dekat.

SARAN

Peranan bakteri *S. sciuri* dan *S. haemolyticus* pada manusia, hewan dan khususnya pada ikan tuna perlu mendapatkan kajian lebih lanjut. Bakteri yang belum teridentifikasi dalam penelitian ini perlu dikaji lebih mendetail. Ditemukannya *S. sciuri* dan *S. haemolyticus* pada ikan tuna yang dipasarkan di Pasar Ikan Kedonganan, perlu mendapatkan perhatian khususnya kepada penjual ikan agar memerhatikan sanitasi dan penyimpanan ikan tuna yang dijual.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan atas dana yang diberikan pada penelitian ini. Analisis genetik pada penelitian ini didanai oleh USAID melalui *sub-grant* dari NAS (*National Academy of Science*) dengan NAS *sub-grant number* PGA-2000001987 dan sponsor *grant award number* AID-OAA-A-11-00012 dengan judul *Building Indonesia Capacity through Genetic Assessment of Commercial Fish Species*.

DAFTAR PUSTAKA

- Allen DGJ, Green DP, Bolton GE, Jaykus LA, Cope WG. 2005. Detection and identification of histamine-producing bacteria associated with harvesting and processing mahimahi and yellowfin tuna. *J Food Prot* 68(8): 1676-1682.
- Bavykin SG, Yuri PL, Vladimir Z, John JK, Joany J, David AS, Alexey C. 2004. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and gyrB Gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J Clin Mikrobiol* 42(8): 3711-3730.
- Butler AH, Thompson DWJ, Heikes R, 2010. The steady-state atmospheric circulation response to climate change-like thermal forcings in a simple general circulation model. *J Climate* 23: 3474-3496.
- Castro N, Loeza MSL, Navarro AC, Sánchez A, Sánchez JS. 2006. Estudio molecular de *Staphylococcus haemolyticus* resistente a meticilina en un hospital de México. *Revista de Investigación Clínica* 58(6): 580-585.
- Coimbra DG, Almeida AGCS, Júnior JBO, Silva LAFD, Pimentel BJ, Gitaí DLG, Moreira LS, Filho EAS, Andrade TGD. 2011. Wound infection by multiresistant *Staphylococcus sciuri* identified by molecular methods. *New Microbiologica* 34: 425-427.
- Economou V, Brett MM, Papadopoulou C, Frillingos S, Nichols T. 2007. Changes in histamine and microbiological analyses in fresh and frozen tuna muscle during temperature abuse. *Food Addit Contam* 24(8): 820-832.
- Fischetti AV, Novick RP, Ferreti JJ, Portnoy DA, Rood JI. 2000. Gram positif. *Washington DC: ASM Press* : 315.
- Gotz F, Bannerman T, Schleifer KH. 2006. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. *The Prokaryotes* 4: 5-75.
- Hedin G, Widerstrom M. 1998. Endocarditis due to *Staphylococcus sciuri*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17: 673-675.
- Horii T, Suzuki Y, Kimura T, Kanno T, Maekawa M. 2001. Intravenous catheter-related septic shock caused by *Staphylococcus sciuri* and *Escherichia vulneris*. *Scand J Infect Dis* 33: 930-932.

- Hwang H, Malhotra N, Kim Y, Tomiuk M, Hong S. 2010. A comparative study on parameter recovery of three approaches to structural equation modeling. *Journal of Marketing Research* 47 (4): 699-712.
- Janda JM, Abbott SL. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory. *J Clin Mikrobiol* 45(9): 2761.
- Juuti K. 2004. Surface protein PIs of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* role in adhesion, invasion and pathogenesis, and evolutionary aspects. *Dissertation*. Helsinki. University of Helsinki.
- Kloos WE, Musselwhite MS. 1975. Distribution persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl Mbiol* 30: 381-385.
- Kung HF, Tsai YH, Chang SC, Hong TY. 2012. Biogenic amine content, histamine-forming bacteria, and adulteration of pork in tuna sausage products. *J Food Prot* 75(10): 1814-1822.
- Martineau F, Picard FJ, Ke D, Paradis S, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. 2001. Development of a PCR assay for identification of *Staphylococci* at genus and species levels. *J Clin Mikrobiol* 39(7): 2541.
- Murray M, Clifford DJ, Gettinby G, Snow WF, McIntyre WIM. 1981. Susceptibility to african trypanosomiasis of N'dama and zebu cattle in an area of glossina morsitans morsitans challenge. *Veterinary Record* 109: 503.
- Rebah BF, Frikha F, Kamoun W, Belbahri L, Gargouri Y, Miled N. 2008. Culture of *Staphylococcus xylosus* in fish processing by-product-based media for lipase production. *Lett Appl Microbiol* 47(6): 549-554.
- Shalaby AR. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* 29(7): 675-690.
- Shittu A, Lin J, Morrison D, Kolawole D. 2004. Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. *J Med Microbiol* 53: 51-55.
- Stackebrandt E, Goebel BM. 1995. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 846-849.
- Stepanovic S, Opavski IDN, Jezek P, Ranin L. 2003. Influence of the growth medium composition on biofilm formation by *Staphylococcus sciuri*. *Annals of Microbiology* 53: 63-74.
- Stepanovic S, Morrison DID, Hauschild T, Jezek P. 2005. Identification and characterization of clinical isolates of members of the *Staphylococcus sciuri* group. *J Clin Microbiol* 43: 956-958.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol* 28: 2731-2739.
- Taylor SL, Speckhard MW. 1983. Isolation of histamine producing bacteria from frozen tuna. *Food Research Institute* 35-59.
- Thorberg BM. 2008. Coagulase-negative *Staphylococci* in bovine sub-clinical mastitis. (Thesis). Uppsala. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Tsai YH, Kung HF, Chen HC, Chang SC, Hsu HH, Wei CI. 2007. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in dried milk fish (*Chanos chanos*) implicated in a food-borne poisoning. *Food Chemistry* 105: 1289-1296.
- Wallet F, Stuit L, Boulanger E, Delvallez MR, Dequiedt P. 2000. Peritonitis due to *Staphylococcus sciuri* in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Scand J Infect Dis* 32: 697-698.