



FAKULTET VETERINARNE MEDICINE
UNIVERZITETA U BEOGRADU
KATEDRA ZA HIGIJENU I TEHNOLOGIJU NAMIRNICA
ANIMALNOG POREKLA

5.
SIMPOZIJUM

***BEZBEDNOST I KVALITET NAMIRNICA
ANIMALNOG POREKLA***

ZBORNIK RADOVA

Beograd, 03. i 04. novembar 2016.

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

637.04/.07(082)

664:658.56(082)

614.31(082)

СИМПОЗИЈУМ Безбедност и квалитет намирница анималног
пореkla (5 ; 2016 ; Београд)

Zbornik radova / 5. simpozijum Bezbednost i kvalitet namirnica
animalnog porekla, Beograd, 03. i 04. novembar 2016. ; [organizator]
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Katedra za
higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla ; [urednici Mirjana
Dimitrijević, Snežana Bulajić, Dragan Vasilev]. - Beograd : Fakultet
veterinarske medicine, 2016 (Beograd : Naučna KMD). - [4], 124 str. :
ilustr. ; 26 cm

Tiraž 120. - Bibliografija uz svaki rad.

ISBN 978-86-80446-09-7

а) Животне намирнице - Контрола квалитета - Зборници

б) Животне

намирнице - Хигијена - Зборници с) Ветеринарска хигијена -
Зборници

COBISS.SR-ID 226925836

SADRŽAJ

1. Virusne bolesti prenosive hranom	1
Mirjana Dimitrijević, Nevena Ilić, N. Karabasil, Vera Katić, V. Teodorović, D. Vasilev	
2. Epidemiološki značaj virusnih bolesti koje se prenose hranom.....	17
Nevenka Pavlović, Tijana Relić	
3. Procena rizika od nalaza enterotoksina stafilokoka u mekim sirevima.....	27
Radoslava Savić Radovanović, Vera Katić, B.Velebit	
4. Uloga bakterija mlečne kiseline u prenosu gena rezistencije na antibiotike	43
Snežana Bulajić, Tijana Ledina	
5. Novija saznanja o nalazu histamina u mesu riba.....	53
S. Stefanović, S. Janković, Tatjana Radičević, Vesna Đorđević, Mirjana Dimitrijević	
6. Fleksibilnost i kategorizacija objekata za proizvodnju hrane životinjskog porekla.....	64
N. Karabasil, Tamara Bošković, D. Vasilev, B. Suvajdžić, V. Teodorović	
7. Uticaj premortalnih postupaka na odabrane parametre stresa i kvalitet mesa svinja	76
Silvana Stajković, Sunčica Borozan, M. Ž. Baltić, V. Teodorović, D. Vasilev, N. Čobanović, N. Karabasil	
8. Uticaj ishrane na masnokiselinski sastav goveđeg mesa	85
Mirjana Lukić, Jelena Janjić, Jelena Ivanović, Jasna Đorđević, Marija Bošković, Radmila Marković, M. Ž. Baltić	
9. Kvalitet proizvoda od mesa sa oznakom geografskog porekla i utvrđivanje njihove autentičnosti	93
D. Vasilev, N. Karabasil, Mirjana Dimitrijević, B. Suvajdžić, V. Teodorović	
10. Primena etarskih ulja u cilju unapređenja bezbednosti i kvaliteta mesa	107
Marija Bošković, Jasna Đorđević, Jelena Janjić, Jelena Ivanović, Milica Glišić, Nataša Glamočlija, Radmila Marković, M. Ž. Baltić	
11. Dobrobit životinja u objektima za klanje	119
N. Karabasil, Maja Andrijašević, Mirjana Dimitrijević, N. Čobanović, Silvana Stajković	

PROCENA RIZIKA OD NALAZA ENTEROTOKSINA STAFILOKOKA U MEKIM SIREVIMA

Radoslava Savić Radovanović¹, Vera Katić¹, B. Velebit²

¹Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

²Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

Kratak sadržaj

Procena rizika je naučno baziran proces koga čine identifikacija hazarda, karakterizacija hazarda, procena izloženosti i karakterizacija rizika. U kontekstu bezbednosti hrane rizik predstavlja verovatnoću i posledice da posle konzumiranja hrane nastane štetno delovanje na zdravlje ljudi. Sirevi kao hrana zauzimaju važno mesto u ishrani ljudi. U Republici Srbiji veliki broj sireva, prisutan na tržištu gradskih pijaca, proizvodi se u domaćinstvima i može se svrstati u grupu mekih sireva bez zrenja ili sa zrenjem. Budući da se određen broj mekih sireva proizvodi od nekuvanog mleka, kao deo tradicije, postoji mogućnost da sa sirovim mlekom u sir dospeju patogeni mikroorganizmi kao što su koagulaza pozitivne stafilocoke. Trovanja hranom izazvana enterotoksinima stafilocoka su intoksikacije, koje nastaju konzumiranjem hrane koja sadrži dovoljnu količinu (<1µg/kg telesne mase konzumenta) jednog, ili više enterotoksina. Cilj ovog rada je bio da se na osnovu broja koagulaza pozitivnih stafilocoka u siru, uslova za njihovo razmnožavanje i stvaranje enterotoksina, kao i prisustva gena za sintezu enterotoksina kod koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz sira, proceni rizik od nalaza enterotoksina stafilocoka u mekim sirevima. Za određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilocoka u ispitanim uzorcima mekih sireva je korišćena standardna metoda SRPS EN ISO 6888-2. Za ispitivanje sposobnosti primoizolata stafilocoka da stvaraju enterotoksine i prisustvo enterotoksina u uzorcima mekih sireva je korišćena ELFA tehnika. Dokazivanje gena za sintezu enterotoksina je vršeno konvencionalnom multipleks PCR tehnikom (za gene *sea* i *seb*), odnosno tehnikom Real-Time PCR (za gene *sec*, *sed* i *see*).

Koagulaza pozitivne stafilocoke su dokazane u 85 (20,48%) uzoraka sireva različite starosti a njihov broj se kretao od 1 do 5,79 log cfu/g sira. Od 85 izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka poreklom iz sireva kod 26 (30,59%) izolata je dokazana sposobnost da stvaraju klasične enterotoksine (SEA-SEE). Od 26 enterotoksogenih primoizolata 20 (76,92%) izolata je bilo poreklom iz uzoraka sireva proizvedenih od nekuvanog mleka, a 6 (23,08%) izolata poreklom iz uzoraka sireva proizvedenih od kuvanog mleka. Kod svih 26 primoizolata koagulaza pozitivnih stafilocoka, poreklom iz sireva, za koje je ELFA tehnikom utvrđeno da stvaraju enterotoksin, dokazan je gen za enterotoksin A (*sea*), a kod 24 izolata je pored *sea* gena dokazan i gen za sintezu enterotoksina B (*seb*). Nijedan izolat nije posedovao gene za sintezu enterotoksina C (*sec*), D (*sed*) i E (*see*). Od 26 uzoraka u kojima su dokazane enterotosogene koagulaza pozitivne stafilocoke, enterotoksini su dokazani u 2 (7,69%) uzorka slatko-koagulišućeg sira proizvedenog od nekuvanog mleka u kojima je broj enterotoksogenih koagulaza pozitivnih stafilocoka bio iznad 5 log cfu/g sira. Slatko-koagulišućci sirevi proizvedeni od nekuvanog mleka u kojima je broj koagulaza pozitivnih stafilocoka veći od 5 log cfu/g i u kojima je pH iznad 5,0 mogu

da sadrže enterotoksine u količinama koje izazivaju intoksikacije i predstavljaju rizik po zdravlje ljudi.

Ključne reči: koagulaza pozitivne stafilokoke, *S. aureus*, meki sirevi, enterotoksini

Uvod

Sirevi kao hrana zauzimaju važno mesto u ishrani ljudi. U Evropi se danas oko 10% sireva proizvodi od sirovog mleka i ovi sirevi mogu da predstavljaju potencijalni rizik po javno zdravlje (Hunt i sar., 2012). U Republici Srbiji veliki broj sireva, prisutan na tržištu gradskih pijaca, proizvodi se u domaćinstvima i može se svrstati u grupu mekih sireva bez zrenja ili sa zrenjem. Budući da se određen broj mekih sireva proizvodi od nekuvanog mleka, kao deo tradicije, postoji mogućnost da sa sirovim mlekom u sir dospeju patogeni mikroorganizmi kao što su koagulaza pozitivne stafilokoke. U proceni rizika od nalaza enterotoksina koagulaza pozitivnih stafilokoka u mekim sirevima prvi korak bi bio identifikacija hazarda. Biologija, ekologija i patogenost koagulaza pozitivnih stafilokoka, kao i njihov značaj za javno zdravlje, dobro su proučeni i opisani u literaturi. Do danas je opisano 50 vrsta i podvrsta stafilokoka. Na osnovu sposobnosti za stvaranje enzima koagulaze, razlikuju se koagulaza pozitivne stafilokoke (KPS) i koagulaza negativne stafilokoke (KNS). Od sedam opisanih vrsta, koje pripadaju grupi koagulaza pozitivnih stafilokoka, kao glavni uzročnik trovanja hranom navodi se *S. aureus* subsp. *aureus*. Ovaj mikroorganizam, prvi put opisan u XIX veku, zaokuplja naučnu javnost već dva veka i često je nazivan superpatogenom zbog svoje sposobnosti da stvara egzocelularne enzime i toksine.

Sa stanovišta higijene hrane stvaranje jednog, ili više enterotoksina (SE) je suštinsko za nastanak trovanja ljudi stafilokokama. Da bi došlo do stvaranja dovoljne količine enterotoksina, koja može da izazove intoksikacije, potrebno je da broj *S. aureus* bude iznad 10^5 cfu/g namirnice (Jablonski i Bohach, 1997; Le Loir i sar., 2003). Do sada poznati enterotoksini stafilokoka čine grupu serološki različitih ekstracelularnih proteina, kojima su zajedničke važne karakteristike: 1) sposobnost da izazovu emezu kod primata, 2) superanigenost kroz nespecifičnu aktivaciju T limfocita praćenu oslobađanjem citokina i sistemskim šokom, 3) otpornost na visoke temperature i digestiju pepsinom, 4) strukturna sličnost. Prema sposobnosti da izazovu emezu kod primata podeljeni su na prave (klasične) enterotoksine (SEA-SEE) i toksine slične enterotoksinima (Argudin i sar., 2010).

Enterotoksini i enterotoksinima slični toksini su globularni, ili jednolančani polipeptidi sa molekulskom masom od 22-28 kDa. Hidrolizom se dobija 18 aminokiselina, pretežno aspartamska, glutaminska kiselina, lizin i tirozin. Na osnovu poređenja sekvenci amino kiselina enterotoksini stafilokoka (SE) i enterotoksinima slični toksini su svrstani u četiri, odnosno 5 grupa, zavisno da li se enterotoksin H (SEH) svrstava, ili ne u grupu 1 (Larkine i sar., 2009; Thomas i sar., 2007; Ono i sar., 2008; Uschyma i sar., 2006).

Do danas je opisano 23 enterotoksina stafilokoka (staphylococcal enterotoxins-SEs) i enterotoksinima sličnih toksina (staphylococcal enterotoxin-like toxins-SEL): enterotoksin A (SEA), B (SEB), C1 (SEC1), C2 (SEC2), C3 (SEC3), D (SED), E (SEE), G (SEG), H (SEH), I (SEI), J

(SEJ) (Balaban i Rasooly, 2000), K (SE/K) (Orwin i sar., 2001), L (SE/L), M (SE/M), N (SE/N), O (SE/O), (Jarraud i sar., 2001), P (S/EP) (Omoe i sar., 2005), Q (SE/Q) (Orwin i sar., 2002), R (SE/R) (Omoe i sar., 2003), S (SE/S), T (SE/T) (Ono i sar., 2008), U (SE/U) (Letertre i sar., 2003) i U2 i V, koji se nalaze na klasteru *egc*, koji kodira sintezu enterotoksina sličnih toksina (Thomas i sar., 2006). Pet eneterotoksina SEA, SEB, SEC (SEC1, SEC2 i SEC3), SED i SEE, različiti u antigenoj reakciji, koji mogu da izazovu trovanja hranom u literaturi se navode kao klasični eneterotoksini, a na tržištu su prisutni komercijalni kitovi za dokazivanje ovih enterotoksina.

Sinteza eneterotoksina stafilokoka može biti kodirana profagima (Betley i Mekalanos, 1985), plazmidima (Bayles i landolo, 1989), ili hromozomskim ostrvcima patogenosti (Yarwood i sar., 2002). Geni za sintezu enterotoksina (*se*) imaju različitu lokaciju. Plazmidi su nosioci *seb*, *sed*, *sej*, *ser*, *ses*, *set* gena. Fagi su umereno nosioci za gen *sea*, ali ne za gen *sec*. Hromozomska ostrvca patogenosti su nosioci gena *seb*, *sec*, *seg*, *seh*, *sei*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep* i *seq*. Gen *sec* može da se nalazi na plazmidu, ili hromozomskim ostrvcima patogenosti zavisno od porekla soja (Fitzgerald i sar., 2001). Lokacija *se* gena na mobilnim genetskim elementima može da dovede do horizontalnog transfera gena između izolata *S. aureus* (Hennekinne i sar., 2012). Na primer gen *seb* se nalazi na hromozomima kod nekih kliničkih izolata (Shafer i landolo, 1978), dok je kod drugih izolata na plazmidu (Shalita i sar., 1977). Glavni regulatorni sistem, koji kontroliše ekspresiju faktora virulencije *S. aureus*, je *agr* sistem ("akcesorni gen regulator") (Kornblum i sar., 1990). Ovaj sistem deluje u kombinaciji sa *sar* sistemom ("stafilokokni akcesorni regulator") (Cheung i sar., 1992; Novick i sar., 2001). Većinu ekspresije gena za sintezu eneterotoksina stafilokoka (SE) kontroliše sistem *agr*. Tako na primer ekspresija *seb*, *sec* i *sed* gena zavisi od *agr* sistema, dok ekspresija *sea* i *sej* gena ne zavisi od ovog sistema (Tremaine i sar., 1993; Zhang i sar., 1998). Sinteza enterotoksina je mogućatokom svih faza rasta *S. aureus* (SEB i SED), samo kao sekundarni metaboliti u kasnoj ekspanzionalnoj, ili stacionarnoj fazi rasta (SEB i SEC). Većina sojeva *S. aureus* može da stvara jedan, ili više eneterotoksina, koji su rezistentni na proteolitičke enzime kao što su tripsin, himotripsin, renin i papain, a pri pH 2 su osetljivi na pepsin (Baird-Parker AC, 1990; Baird-Parker T 2000; Halpin-Dohnalek i Marth, 1989; Jay, 2000; Kérouanton i sar., 2007; Normanno i sar., 2007). Enterotoksin A (SEA), sam, ili u kombinaciji sa drugim enterotoksinima se najčešće navodi kao uzrok trovanja hranom (Argudin i sar., 2010). Nasuprot tome, enterotoksin C (SEC) neki autori navode kao uzrok intoksikacija nastalih posle konzumiranja proizvoda od mleka (Normanno i sar., 2007). Enterotoksin A (SEA) najčešće stvaraju sojevi poreklom od ljudi, pa se nalaz ovog toksina u hrani objašnjava kontaminacijom hrane od osoba koje učestvuju u procesu proizvodnje hrane (Akineden i sar., 2008, Rosengren i sar., 2010).

U Evropi je 2012. godine zabeleženo 777 epidemija izazvanih bakterijskim toksinima *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. i koagulaza pozitivnih stafilokoka, koje se smatraju drugim najčešćim uzročnikom intoksikacija. Prema podacima EFSA-e iz 2014. godine. 346 epidemija je bilo izazvano enterotoksinima stafilokoka od kojih se u 20% slučajeva navodi kao uzrok trovanja (Anonymus, 2014). Često mnogi slučajevi trovanja prođu nezapaženo iz

razloga što je inkubacioni period kratak, male epidemije nisu prijavljene, postoje greške u dijagnostici, nepravilnosti tokom uzimanja uzoraka i grešaka u laboratorijskoj dijagnostici.

U EU 2005. godine u okviru mikrobioloških kriterijuma definisani su kriterijumi bezbednosti hrane za enterotoksine koagulaza pozitivnih stafilokoka, a u okviru kriterijuma higijene u procesu proizvodnje definisani su kriterijumi za broj koagulaza pozitivnih stafilokoka u različitim kategorijama hrane. Prema ovoj EU direktivi hrana se mora ispitati na prisustvo enterotoksina, ako je broj koagulaza pozitivnih stafilokoka iznad 10^5 cfu/g hrane kada se očekuje da će broj ovog mikroorganizma biti najveći. Ako se dokaže prisustvo enterotoksina u 25 g isptanog uzorka, smatra se da hrana nije bezbedna. U Republici Srbiji zakonska regulativa je usklađena sa regulativom EU i od 2010. godine je na snazi Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa (Službeni glasnik RS 72/10).

Da bi došlo do alimentarnih intoksikacija ljudi koagulaza pozitivnim stafilokokama treba da bude ispunjeno 5 uslova: 1) prisustvo izvora kontaminacije, koji sadrži enterotoksogene stafilokoke (sirov materijal, zdravi, ili inficirani nosioci), 2) prenos stafilokoka iz izvora u hranu (slaba higijena tokom procesa dobijanja hrane), 3) hrana, čiji sastav i fizičko-hemijske osobine podržavaju rast *S. aureus* i stvaranje eneterotoksina, 4) optimalna temperatura i dovoljno vremena za rast ovog mikroorganizma i stvaranje eneterotoksina i 5) unošenje hrane, koja sadrži dovoljnu količinu toksina koji može da izazove simptome (Hennekinne i sar., 2010).

Trovanja eneterotoksinima stafilokoka su relativno blage intoksikacije, najčešće dokazane u slučajevima alimentarnih intoksikacija nastalih posle konzumiranja mleka i proizvoda od mleka. Ranija istraživanja su pokazala da je unošenje 20-25 μg SEB (0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesne mase) izazvalo povraćanje (Raj i Bergdoll, 1969). Prosečna doza eneterotoksina A (SEA), koja je izazvala trovanje studenata čokoladnim mlekom u SAD, bila je 114 ± 50 ng (Evenson i sar., 1988). Količina 20-100 ng enterotoksina A (SEA) je izazvala trovanje pasterizovanim mlekom (Asao i sar., 2003), međutim, neki autori smatraju da veoma mala količina enterotoksina stafilokoka 0,5 ng/ml može da izazove oboljenje (Murray, 2005; Evenson i sar., 1988). Inkubacioni period zavisi od količine unetog enterotoksina (Murray, 2005). Najčešće je inkubacioni period kratak (2-8h), a simptomi su mučnina, povraćanje, abdominalni bolovi praćeni sa ili bez dijareje. Oboljenje traje 24-48 h posle čega dolazi do oporavka obolelih. Komplikacije su moguće kod dece i starih osoba. Dijagnoza intoksikacija izazvanih enterotoksinima stafilokoka se potvrđuje na osnovu: 1) nalaza $10^5 S. aureus/\text{g}$ hrane, 2) dokaza prisustva enterotoksina u hrani i/ili 3) izolacije istog soja *S. aureus* kod pacijenta i iz hrane (Bryan i sar., 1997). U velikom broju studija je ispitan uticaj faktora sredine (temperatura, pH, oksigenacija...) na umžavanje *S. aureus*, ekspresiju gena i sintezu enterotoksina u laboratorijskim medijumima, ili u hrani, uključujući proces proizvodnje sira (Cretenet, Even i Le Loir, 2011). Danas je prihvaćeno da je za razumevanje i kontrolu ponašanja *S. aureus* neophodna analiza direktno *in situ*, u matriksu hrane (Schelin i sar., 2011). Uticaj tehnoloških parametara na ekspresiju gena i sintezu enterotoksina tokom proizvodnje sira je važno pitanje.

Cilj

Podaci iz literature pokazuju da su koagulaza pozitivne stafilokoke prisutne u odedenom broju u mleku i sirevima. Uslovi tokom proizvodnje mekih sireva slatkom koagulacijom pogoduju razmnožavanju koagulaza pozitivnih stafilokoka, a budući da u Republici Srbiji nema epidemioloških podataka o alimtnim intoksikacijama izazvanim sirevima za cilj ovog rada je postavljeno da se na osnovu broja koagulaza pozitivnih stafilokoka u mekim sirevima, uslova za njihovo razmnožavanje i stvaranje enterotoksina, kao i prisustva gena za sintezu enterotoksina kod koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz sira, proceni rizik od nalaza enterotoksina stafilokoka u mekim sirevima.

Materijal i metode

Ispitivanjem je obuhvaćeno 415 uzoraka mekih sireva proizvedenih od kuvanog i nekuvanog mleka. Uzorci sireva su bili različite starosti, koji su proizvedeni u individualnim domaćinstvima iz različitih geografskih lokaliteta u Srbiji. Na osnovu pH vrednosti sira svi sirevi su razvrstani na slatko-koagulišuće i kiselo-koagulišuće. Sirevi u kojima je pH vrednost bila viša od 4,6 su svrstani u slatko-koagulišuće, a sirevi sa pH vrednošću nižom od 4,6 u kiselo-koagulišuće. Starost sireva je određivana na osnovu ankete proizvođača i svi sirevi starosti do 10 dana su svrstani u sireve bez zrenja, a sirevi čija je starost bila preko 10 dana u sireve sa zrenjem. U toku eksperimenta ispitano je 85 primoizolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, izolovanih iz 415 uzoraka sireva. Prisustvo gena za sintezu enterotoksina je ispitano kod 26 izolata za koje je ELFA tehnikom utvrđeno da stvaraju enterotoksin. Kao referentni soj korišćeni su: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Staphylococcus aureus aureus* CIP 67.8 koji stvara enterotoksin A i enterotoksin B.

U istim uzorcima sireva su ispitane fizičko-hemijske karakteristike. Izolacija, identifikacija i održavanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka rađeni su standardnom metodom SRPS EN ISO 6888-2, Mikrobiologija hrane i hrane za životinje-Horizontalnom metodom za određivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste)-Deo 1: Tehnika upotrebom agara po Baird-Parkeru, a broj *Lactococcus spp.* i *Lactobacillus spp.* je određen metodom opisanom u standardu ISO 27205:2010 (IDF 149:2010). pH vrednost uzoraka sira je merena potenciometrijski (Carić i sar., 2000) pomoću pH-metra (pH-vision 246071 Ex tech instruments) uz prethodnu kalibraciju standardnim rastvorima (pH 4,01 i 7,0). Aktivnost vode u uzorcima sireva je izmerena pomoću a_w -metra (GBX Scientific Instruments, FA-st/1 tastatura: Model MX 3700/ML 4700), koji radi na principu određivanja tačke rose. Sadržaja natrijum hlorida (NaCl) u siru je određen titrimetrijskom metodom (IDF/ISO/AOAC) (Carić i sar., 2000).

Za ispitivanje sposobnosti primoizolata stafilokoka da stvaraju enterotoksine i prisustvo enterotoksina u uzorcima mekih sireva je korišćena ELFA tehnika VIDAS SET2 (BioMerieux, Francuska). Prisustvo gena za sintezu enterotoksina stafilokoka (SE) u dobijenim ekstraktima DNK iz 26 izolata enterotoksogenih koagulaza pozitivnih stafilokoka ispitano je konvencionalnom multipleks PCR tehnikom (za gene *sea* i *seb*), odnosno tehnikom Real-Time PCR (za gene *sec*, *sed* i *see*). Za dokazivanje prisustva *sea* gena korišćeni su

prajmeri sea-f (5'- TCA ATT TAT GGC TAG ACG GTA AAC AA - 3') i sea-r (5'- GAA GAT CCA ACT CCT GAA CAG TTA CA - 3'), za prisustvo gena *seb* korišćeni su prajmeri seb-f (5'- AAC AAC TCG CCT TAT GAA ACG GGA T-3') i seb-r (5'- CTC CTG GTG CAG GCA TCA TGT CA - 3'), za dokazivanje gena *sec* korišćeni su prajmeri sec-f (5'- CGT ATT AGC AGA GAG CCA ACC A- 3') i sec-r (5'- GTG AAT TTA CTC GCT TTG TGC AA - 3'), za dokazivanje gena *sed* korišćeni su prajmeri sed-f (5'-AAA CGT TAA AGC CAA TGA AAA CA - 3') i sed-r (5'- TGA TCT CCT GTA CTT TTA TTT TCT CCT A - 3'), a za dokazivanje gena *see* korišćeni su prajmeri see-f (5'-TAC CAA TTA ACT TGT GGA TAG AC - 3') i see-r (5'- CTC TTT GCA CCT TAC CGC - 3').

Rezultati

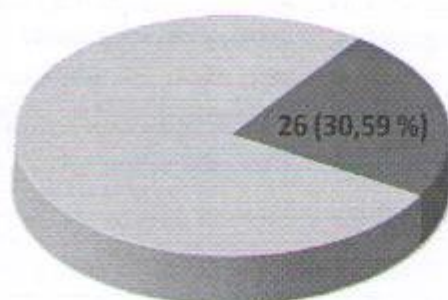
U cilju sagledavanja procene rizika od nalaza enterotoksina stafilokoka u mekim sirevima i procene izloženosti, ispitani su uzorci sireva, koji se proizvode različitim tehnologijama u individualnim domaćinstvima sa više područja u Srbiji, a iznose na tržište u Beogradu. Rezultati ispitivanja nalaza koagulaza pozitivnih stafilokoka u sirevima (Grafikon 1) su pokazali da od ukupno 415 uzoraka sireva različite starosti, proizvedenih od kuvanog ili sirovog mleka, koagulaza pozitivne stafilokoke su dokazane u 85 (20,48%) uzoraka, a njihov broj se kretao od 1 do 5,79 log cfu/g.



■ Uzorci sireva sa koagulaza pozitivnim stafilokokama

Grafikon 1. Nalaz koagulaza pozitivnih stafilokoka u mekim sirevima

Od 85 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka poreklom iz sireva kod 26 (30,59%) izolata je dokazana sposobnost da stvaraju klasične enterotoksine (SEA-SEE).



■ Broj izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka, koji stvaraju klasične enterotoksine (SEA-SEE)

Grafikon 2. Nalaz enterotoksogenih stafilocoka

U cilju procene uslova za razmnožavanje koagulaza pozitivnih stafilocoka i stvaranje enterotoksina određeni su broj *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. i fizičko-hemijski parametri (pH, aktivnost vode i sadržaj NaCl) u sirevima, a rezultati su prikazani u Tabeli 1.

Tabela 1. Statistički parametri broja koagulaza pozitivnih stafilocoka, *Lactococcus* spp, *Lactobacillus* spp. i fizičko-hemijski parametri (pH, aktivnost vode i sadržaj NaCl) u mekom siru

Parametri	Statistički parametri				
	n	$\bar{X} \pm SD$ (log cfu/g)	Xmin	Xmax	Cv(%)
Broj koagulaza pozitivnih stafilocoka (log cfu/g)	85	3,60 ± 1,19	1,00	5,79	33,27
Broj <i>Lactococcus</i> spp. (log cfu/g)	85	8,33 ± 0,55	7,02	9,80	6,58
Broj <i>Lactobacillus</i> spp. (log cfu/g)	85	6,62 ± 0,95	4,00	9,19	14,43
pH	85	4,98 ± 0,50	4,30	6,25	10,16
a_w	85	0,95 ± 0,02	0,82	0,977	2,42
Sadržaj NaCl (%)	85	1,10 ± 0,71	<0,01	3,48	64,31

Nalaz koagulaza pozitivnih stafilocoka, koje su stvarale enterotoksine u mekim sirevima bez zrenja dat je u Tabeli 2.

Tabela 2. Nalaz koagulaza pozitivnih stafilokoka, koje su stvarale enterotoksine u mekim sirevima bez zrenja proizvedenim od kuvanog ili nekuvanog mleka

Vrsta sira	Broj uzoraka sira	Dokazane koagulaza pozitivne stafilokoke, koje stvaraju enterotoksine u uzorcima sira			
		Kuvano mleko		Nekuvano mleko	
		Broj	%	Broj	%
Kiselo-koagulišući	19	1	5,26	5	26,32
Slatko-koagulišući	66	5	7,58	15	22,73
Ukupno	85	6	7,06	20	23,53

Poreklo izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, koje su stvarale enterotoksine u mekim sirevima bez zrenja je prikazano u Tabeli 3.

Tabela 3. Poreklo izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, koje su stvarale enterotoksine u mekim sirevima

Vrsta sira	Broj uzoraka	Poreklo koagulaza pozitivnih stafilokoka, koje stvaraju enterotoksine			
		Kuvano mleko		Nekuvano mleko	
		Broj	%	Broj	%
Kiselo-koagulišući	6	1	16,67	5	83,33
Slatko-koagulišući	20	5	20,00	15	80,00
Ukupno	26	6	23,08	20	76,92

Rezultati ispitivanja prisustva gena za stvaranje enterotoksina su prikazani u tabeli 4.

Tabela 4. Rezultati ispitivanja prisustva gena za sintezu enterotoksina kod izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz mekih sireva

Vrsta stafilokoka	Broj izolata	<i>sea</i> gen		<i>seb</i> gen		<i>sec</i> gen		<i>sed</i> gen		<i>see</i> gen	
		Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%
<i>S. aureus</i>	26	26	100	24	92,31	0	0	0	0	0	0

Rezultati ispitivanja prisustva enterotoksina u sirevima proizvedenim od kuvanog ili nekuvanog mleka su pokazali da je od 26 ispitanih uzoraka sira enterotoksin dokazan u 2 (7,69%) uzorka slatko-koagulišućia sira proizvedena od nekuvanog mleka. U ova 2 uzorka sira je prethodno dokazano prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka, koje imaju

sposobnost da stvaraju enterotoksine i kod oba izolata je dokazano prisustvo sea i seb gena. Sirevi u kojima je dokazano prisustvo enterotoksina bili su starosti 3-4 dana, odnosno 7 dana, a broj koagulaza pozitivnih stafilocoka je bio iznad 5 log cfu/g. Izolati su ispitivanjem biohemijskih osobina identifikovani kao *Staphylococcus aureus*.

Diskusija

Bakteriološkim ispitivanjem mekih sireva dokazano je prisustvo koagulaza pozitivnih stafilocoka u 85 (20,48%) uzoraka mekih sireva (Grafikon 1). Naš nalaz se slaže sa nalazom Araújo i sar. (2002), koji su dokazali koagulaza pozitivne stafilocoke u 20% pregledanih uzoraka mekih sireva u Brazilu. Slične rezultate su dobili De Luca i sar. (1997), dok El-Sharound i Spano (2008) nisu dokazali *S. aureus* u uzorcima mekih sireva. U mleku koje se dobija pravilnom mužom broj *S. aureus* se kreće od 100-200 cfu/ml, a u slučaju latentne infekcije mlečne žlezde ovaj broj se povećava do 10^4 cfu/ml (Asperger i Zangerl, 2003). Broj koagulaza pozitivnih stafilocoka veći od 10^4 cfu/g sira proizvedenog od nekuvanog mleka je posledica primarne kontaminacije mleka ovim mikroorganizmom usled latentne infekcije ili supkliničkih mastitisa. U prilog poreklu koagulaza pozitivnih stafilocoka govore podaci iz leiterature o čestom nalazu koagulaza pozitivnih stafilocoka u mleku (Medvedova i sar., 2014; Rajić, 2014; Boynukara i sar., 2008; Pelisser i sar., 2008; Rall i sar., 2008; Jorgensen i sar., 2005; Hunt i sar., 2012; Korpysa-Dzirba i Osek, 2011). Nalaz koagulaza pozitivnih stafilocoka u sirevima proizvedenim od kuvanog mleka se može objasniti naknadnom kontaminacijom iz spoljne sredine, sa ruku radnika i opreme za proizvodnju sira, a visoka aktivnost vode (0,94-0,96) i visoka pH vrednost (6,0-6,2) u siru omogućavaju njihovo razmnožavanje. U prilog kontaminaciji poreklom od ljudi govore podaci da je učestalost nalaza enterotoksogenih stafilocoka kod ljudi 40-60% (Medvedova i Valik, 2012).

Proces proizvodnje sireva je kompleksan proces. Ponašanje *S. aureus* u siru zavisi od procesa proizvodnje i kapaciteta mikroorganizma da preživi stres u matriksu sira (Cretenet i sar., 2011). Meki sirevi se na teritoriji Republike Srbije u individualnim domaćinstvima proizvode od kuvanog ili nekuvanog mleka. Za proizvodnju mekih sireva od nekuvanog mleka u individualnim domaćinstvima koristi se mleko jutarnje, večernje, ili mešano mleko jutarnje i večernje muže. Ako se sir proizvodi mešanjem mleka obe muže, mleko večernje muže se tokom noći čuva u rashlađenom stanju, ali često se čuva i u ambijentalnim uslovima što pogoduje razmnožavanju koagulaza pozitivnih stafilocoka. Sagledavanjem procesa proizvodnje mekih sireva, može se zaključiti da postoje uslovi za rast *S. aureus*, naročito u ranim fazama, kada su visoke pH vrednost i temperatura. Rast mikroorganizma je moguć sve dok fizičko-hemijski parametri (pH, aktivnost vode, sadržaj NaCl) i prisustvo kompetitivne mikroflore ne počnu da utiču na rast *S. aureus*. Ambijentalni uslovi u kojima se proizvode sirevi, naročito tokom toplih meseci godine pogoduju razmnožavanju koagulaza pozitivnih stafilocoka, tako da tokom proizvodnje i skladištenja mekog sira koagulaza pozitivne stafilocoke mogu da se razmnožavaju i stvaraju enterotoksine, posebno ako u proizvodnju sira nije uključena mlečnokiselinska fermentacija, kao što je to kod slatko-koagulišućih sireva. Uslovi tokom proizvodnje mekih sireva slatkim koagulacijom, kada je pH sira iznad 4,6 pogodovali su rastu i

razmnožavanju koagulaza pozitivnih stafilokoka. Prema podacima iz literature (ICMSF, 1996) rast ovog mikroorganizma je moguć pri rasponu pH od 4 do 10, dok je optimalno pri pH 6-7. Pri vrednostima za pH, aktivnost vode sadržaj NaCl, koje smo dobili (Tabela 1) bio je moguć rast koagulaza pozitivnih stafilokoka.

Naši rezultai su pokazali da je od 85 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka 26 (30,59%) izolata imalo sposobnost da stvara enterotoksine (Tabela 2 i 3). Primenom skrining metoda VIDAS SET 2 (BioMerieux, Francuska) dokazuje se grupa enterotoksina (SEA-SEE). Budući da nismo mogli da utvrdimo koje od pet klasičnih enterotoksina stvaraju izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka odlučili smo se da izvršimo identifikaciju gena za sintezu enterotoksina. Od 85 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, koje u stvarale enterotoksine kod 26 (30,59%) izolata je dokazan gen za sintezu enterotoksina A (*sea*), dok je kod 24 izolata utvrđeno istovremeno prisustvo gena za sintezu enterotoksina A (*sea*) i enterotoksina B (*seb*) (Tabela 4). Naši rezultati se slažu sa rezultatima Medvedova i sar. (2014), koji su kod 32% izolata *S. aureus* poreklom iz mleka i proizvoda od mleka dokazali gene za sintezu enterotoksina (SEA-AEE). Naši rezultati se slažu sa podacima iz literature o predominaciji nalaza enterotoksina A (SEA), koji su zabeleženi u različitim zemljama sveta. U Velikoj Britaniji u toku opsežnog praćenja epidemija u periodu od 1969-1990. godine 79% izolata *S. aureus* je stvaralo enterotoksin A (SEA) (Wieneke i sar., 1993). U Francuskoj se enterotoksin A (SEA) navodi kao najčešći uzročnik trovanja (69,7%) u 31 epidemiji zabeleženoj tokom perioda od 1981-2002. godine, a bila su izazvana različitom hranom kao što su mleko, proizvodi od mleka, meso i salate (Kerouanton i sar., 2007). Najčešće su u ovoj epidemiji dokazani *sea* gen, zatim *sed*, *seg*, *sei* i *seh*, ređe su dokazani *seb* i *sec*, dok *see* gennije uopšte dokazan. Naš nalaz se slaže sa nalazom Kerouantona i sar. (2007) u pogledu nalaza *sea* gena, ali se razlikuje u pogledu nalazu drugih gena, jer našim ispitivanjem nisu dokazani *sec* i *sed* geni.

Ispitivanjem prisustva enterotoksina u uzorcima sira (26 uzoraka), iz kojih su izolovane stafilokoke koje stvaraju enterotoksine, primenom ELFA tehnike enterotoksini stafilokoka su dokazan u dva uzorka sira u kojima je broj koagulaza pozitivnih stafilokoka bio iznad 5 log cfu/g. Kod koagulaza pozitivnih stafilokoka poreklom iz ova dva sira utvrđeni su geni za sintezu enterotoksina A i B (*sea* i *seb*). Oba izolata su ispitivanjem biohemijkih osobina identifikovana kao *Staphylococcus aureus*. Vrednost pH u oba sira je bila 5,08 i 5,35, a vrednost za aktivnost vode je bila 0,960 i 0,962. Pri ovim vrednostima je moguć rast *S. aureus*, a s obzirom da je temperatura za rast bila optimalna u uslovima dobijanja sira, mikroorganizam je imao dovoljno vremena i povoljne uslove da se umnoži do vrednosti iznad 5 log cfu/g i stvori dovoljnu količinu enterotoksina, koja je detektovana. Sadržaj NaCl u 2 uzorka sira u kojima su dokazani enterotoksini je bio 0,497 i 1,872%. Budući da je *S. aureus* halotolerantan mikroorganizam i može da raste pri sadržaju NaCl od 20%, izmerene vrednosti nisu inhibitorno uticale na rast i razmnožavanje ovog mikroorganizma. Iako je broj *Lactococcus* spp. bio više od 7 log cfu/g u uzorcima sira nije uticao na smanjenje broja *S. aureus*. Niska vrednost pH može da izazove indukciju profaga dovodeći do ekspresije *sea* gena (Schelin i sar., 2011) što objašnjava učestaliji nalaz *sea* gena i SEA toksina. Cretenet i sar. (2011) su dokazali da *Lc. lactis* može pozitivno ili negativno da moduliše ekspresiju *se* gena u matriksu sira. Ekspresija *sea* gena je blago povećana u

prisustvu *Lc. lactis*, dok je jaka supresija *sec* zapažena u matriksu sira u odsustvu *Lc. lactis*. U prisustvu *Lc. lactis* je smanjena regulacija *agr* sistema u vezi sa snižavanjem pH vrednosti. Čest nalaz enterotoksina A (SEA) se može objasniti uticajem aktivnosti vode. Vrednosti aktivnosti vode (a_w) pri kojim može da se razmnožava *S. aureus* se razlikuju od vrednosti pri kojim može da se stvara enterotoksin. Minimalna vrednost a_w pri kojoj mikroorganizam može da raste je 0,83-0,86, što je ekvivalentno koncentraciji od 20% NaCl. Optimalna vrednost za rast *S. aureus* je >0,99. Međutim, stvaranje enterotoksina A i D (SEA i SED) je manje podložno uticaju i moguće pri približno istim vrednostima aktivnosti vode, koje omogućavaju rast *S. aureus* kada su drugi uslovi optimalni. Nasuprot tome, stvaranje enterotoksina B (SEB) je vrlo osetljivo na snižavanje vrednosti za aktivnosti vode i teško da SEB može da se stvara pri vrednosti od 0,93, uprkos intenzivnom rastu mikroorganizma (Hennekinne i sar., 2012). Sličan uticaj a_w ima na stvaranje enterotoksina C (SEC). Pored a_w , nizak pH može da izazove indukciju profaga, koja ima za posledicu povećanje ekspresije *sea* gena (Schelin i sar. 2011).

Nasuprot našim rezultatima su rezultati Rola i sar. (2013), koji su dokazali prisustvo *S. aureus* u 56% uzoraka sireva proizvedenih od sirovog mleka. Iako je broj *S. aureus* bio $\geq 10^5$ log cfu/g, a najveća vrednost $2,6 \times 10^7$ log cfu/g autori nisu dokazali prisustvo enterotoksina ni u jednom uzorku sira. Prisustvo enterotoksina u 33 uzorka sira nisu dokazali ni Cremonesi i sar. (2007). Takođe, Rosengren (2012) nije dokazala enterotoksine (SEA-SEE) u uzorcima sireva proizvedenim od sirovog mleka bez starter kultura u kojima je broj *Staphylococcus aureus* bio 5-6,5 log cfu/g i za koji je dokazano da stvara enterotoksin C (SEC).

Zaključak

Od ukupno 415 uzoraka sireva različite starosti, proizvedenih od kuvanog ili nekuvanog mleka, koagulaza pozitivne stafilokoke su dokazane u 85 (20,48%) uzoraka sira. Primenom ELFA skrining tehnike dokazano je da od 85 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka 26 (30,59%) izolata ima sposobnost da stvara klasične enterotoksine (SEA-SEE). Od 26 enterotoksogenih primoizolata 20 (76,92%) izolata je bilo poreklom iz uzoraka sireva proizvedenih od nekuvanog mleka, a 6 (23,08%) izolata poreklom iz uzoraka sireva proizvedenih od kuvanog mleka. Kod svih 26 primoizolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, poreklom iz sireva proizvedenih od kuvanog ili nekuvanog mleka za koje je ELFA tehnikom utvrđeno da stvaraju enterotoksin, dokazan je gen za enterotoksin A (*sea*), a kod 24 izolata je pored *sea* gena dokazan i gen za sintezu enterotoksina B (*seb*). Nijedan izolat nije posedovao gene za sintezu enterotoksina C (*sec*), D (*sed*) i E (*see*). Od 26 uzoraka u kojima su dokazane enterotosogene koagulaza pozitivne stafilokoke, enterotoksini su dokazani u 2 (7,69%) uzorka slatko-koagulišućeg sira proizvedenog od nekuvanog mleka u kojima je broj enterotoksogenih koagulaza pozitivnih stafilokoka bio iznad 5 log cfu/g sira. Slatko-koagulišući sirevi proizvedeni od nekuvanog mleka u kojima je broj koagulaza pozitivnih stafilokoka veći od 5 log cfu/g i u kojima je pH iznad 5,0 mogu da sadrže enterotoksine u količinama koje izazivaju intoksikacije i mogu da predstavljaju rizik po zdravlje ljudi.

Literatura

1. Akineden O, Hassan A, Scheider E, Usleber.: Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated goats' milk cheese. *Int J Food Microbiol*, 2008, 124: 211- 216.
2. Anonymous. The European Union Summary report on Trends and Sources of Zoonose, Zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, 2014, 12(2),312.
3. Araújo, V. S., Pagliares, V. A., Queiroz, M. L., & Freitas-Almeida, A. C. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 2002., 92, 1172–1177.
4. Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR.: Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2010, 2(7): 1751–73.
5. Asperger H, Zangerl P: *Staphylococcus aureus*. In: Roginski H, Fuquay J, Fox P, editors. *Encyclopedia of Dairy Science*. San Diego: Academic Press, 2003, 2563-69.
6. Baird-Parker AC.: The staphylococci: an introduction. Pg 15-85 In: *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement Series 19*. 1990, D. Jones, R G Board, and M Sussman, ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
7. Baird-Parker T:*Staphylococcus aureus*. In: Lund B, Baird-Parker T, Gould G, editors. *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000,1317-1330.
8. Balaban N, RasoolyA.Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol*,2000, 61, 1–10.
9. Bayles, KW, landolo JJ. Genetic and molecular analysis of gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol*. 1989, 171, 4799–4806.
10. Betley MJ, Mekalanos JJ. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by a phage. *Science*, 1985, 229, 185–7.
11. Boynukara B, Gulhan T, Alisarli M, Gurturk K,Solmaz H. Classical enterotoxinogenic characteristics of *S. aureus* strains isolated form bovine subclinicalmastitis in Van, Turkey. *International Journal of FoodMicrobiology*, 2008, 125: 209–211.
12. Bryan FL, Guzewich JJ, Todd ECD.. Surveillance of foodborne disease II. Summary and presentation of descriptive data and epidemiologic patterns; their value and limitations. *J. Food Prot*, 1997, 160, 567–578.
13. Carić Marija, Milanović Spasenija, Vucelja Dragica: Standardne metode analize mleka i mlečnih proizvoda. *Prometej*, Novi Sad, 2000, 137-18.
14. Cheung AL, Koomey JM, Butler CA. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 6462–66.
15. Cremonesi P, Perez G, Pisoni G, Moroni P, Morandi S, Luyyana M, Brasca M.. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 45, (6), 586-591.
16. Cretenet Marina, Even Sergine, Le Loir Yves.. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Sci. & Technol*. 2011, 91:127–150.

31. K rouanton A, Hennekinne JA, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A, De Buyser ML, Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiol*, 2007, 115, 369–375.
32. Kornblum J, Kreiswirth B, Projan SJ, Ross H and Novick RP. Agr : a polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*. In *Molecular Biology of the Staphylococci*. Novick, R.P. (ed.). New York: VCH Publishers,1990, pp. 373–402.
33. Korpysa-Dzirba Weronika and Osek Jacek. Identification of genes encoding classical staphylococcal enterotoxins in *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2011, 55-58.
34. Larkin EA, Carman RJ, Krakauer T, Stiles BG. *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. *Curr Med Chem*, 2009, 16, 4003–4019.
35. Le Loir Y, Baron F, Gautier M.: *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2003, 2, 7–28.
36. Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P.: Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.*, 2003, 95, 38–43.
37. Medvedova A, Valik L.: *Staphylococcus aureus*: Characterization and quantitative growth description in milk and artisanal raw milk production. Chapter 4, 201, Licensee InTech , Licensee <http://dx.doi.org/10.5772/48175>
38. Medvedova A, Studenicova A, Valik L, Horvathova Z. Prevalence and growth dynamics of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in Slovakian dairy products. *Czech J Food Sci*, 2014, Vol 32, No 4, 337-341.
39. Murray RJ.. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Internal Medicine Journal*, 2005, 35, supplement 2, S106–S119.
40. Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A, Santagada G, Firinu A, Crisetti E, Celano GV. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 115:290–296.
41. Novick RP, Schlievert P, Ruzin A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes Infect*, 2001, 3: 585–594.
42. Ono HK, Omoe K, Imanishi K, Iwakabe Y, Hu DL, Kato H, Saito N, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K.. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins types S and T. *Infect Immun*, 2008, 76, 4999–5005.
43. Omoe K, Imanishi K, Hu DL, Kato H, Fugane Y, Abe Y, Hamaoka S, Watanabe Y, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K. Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. *Infect. Immun*, 2005, 73, 5540–5546.
44. Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect Immun*, 2003, 71, 6088–6094.
45. Orwin PM, Leung DYM, Tripp TJ, Bohach GA, Earhart CA, Ohlendorf DH, Schlievert PM.. Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. *Biochemistry*, 2002, 41, 14033–14040.

46. Pelisser M, Klein C, Ascoli KR, Zotti TR, ArisiACM. Occurrence of *S. aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2008, 40: 145–148.
47. Raj HD and Bergdoll MS. Effect of enterotoxin B on human volunteers. *J Bacteriol*, 1969, 98, 833–834.
48. Rajić SN: Fenotipske i genotipske karakteristike koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz vimena krava. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, 2014, Beograd.
49. Rola JG, Korpysa-Dzirba W, Osek J. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins at different stages of production of raw milk cheeses - preliminary results. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2013, 57, 341-345.
50. Rosengren A, Fabricius A, Guss B, Sylvén, S, Lindqvist R. Occurrence of food-borne pathogens and characterizations of *Staphylococcus aureus* in cheese produced in farm-dairies. *Int J Food Microbiol*, 2010, 144: 263-269.
51. Shafer WM & Landolo JJ. Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. *Infect Immun*, 1978, 20: 273–278.
52. Rall VL, Vieira FP, Rall R, Vieitis RL, Fernandes JrA, Candeias JMG, Cardoso KFG, Araujo JrJP. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Veterinary Microbiology*, 2008, 132, 408-413.
53. Rosengren A, Fabricius A, Guss B, Sylvén, S, Lindqvist R. Occurrence of food-borne pathogens and characterizations of *Staphylococcus aureus* in cheese produced in farm-dairies. *Int J Food Microbiol*, 2010, 144: 263-9.
54. Shalita Z, Hertman, Sarid S. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 1977, 129: 317–325.
55. Schelin, J., Wallin-Carlquist, N., Cohn, M. T., Lindqvist, R., Barker, G. C., & Radstrom, P. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, 2011, 2(6), 580e592.
56. Thomas DV, Jarraud S, Lemercier B, Cozon G, Echasserieu K, Etienne J, Gougeon MI, Lina G. and Vandensch F.. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infect. Immun*. 2006, 74: 4724-4734.
57. Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chem Immunol Allergy*, 2007, 93, 24–41.
58. Tremaine MT, Brockman DK, Betley MJ. Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). *Infect Immun*, 1993, 61: 356–359.
59. Uchiyama T, Imanishi K, Miyoshi-Akiyama T, Kato H.: Staphylococcal superantigens and the diseases they cause. In *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, 3rd ed, 2006, Alouf JE, Popoff MR, Eds. Academic Press, Burlington, VT, USA, 830–843.
60. Wieneke AA, Roberts D, Gilbert RJ: Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969–90. *Epidemiol Infect*, 1993, 110, 519–531.

61. Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, Orwin PM, Kapur V, Schlievert PM. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *Biol Chem*, 2002, 277, 13138–13147.
62. Zhang S, landolo JJ, Stewart GC. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 168: 227–233.