

**ZNAČAJ KOAGULAZA POZITIVNIH STAFILOKOKA ZA  
MIKROBIOLOŠKU ISPRAVNOST HRANE\***  
*SIGNIFICANCE OF COAGULASE-POSITIVE STAPHYLOCOCCI FOR  
MICROBIOLOGICAL FOOD SAFETY*

Vera Katić\*\*

*Alimentarne intoksikacije hranom, kod kojih je glavni simptom povraćanje i dijareja, nastaju posle unosa enterotoksina koje su u hrani stvorili enterotoksogeni sojevi koagulaza pozitivnih stafilocoka. Enterotoksini stafilocoka se normalno ili veoma malo inaktiviraju za vreme procesa proizvodnje, skladištenja, distribucije ili za vreme kulinarske pripreme hrane. Stoga, ukoliko koagulaza pozitivne stafilocoke mogu da se razmnožavaju u hrani do broja većeg od  $10^5 - 10^6$  cfu/g/ml pre nego što budu uništene, konzumiranje takve hrane predstavlja rizik od intoksikacije.*

*U "Pravilniku o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica u prometu" (Sl. list SRJ 26/93) propisani su kriterijumi za koagulaza pozitivne stafilocoke u hrani. Međutim, broj koagulaza pozitivnih stafilocoka nije uvek dobar indikator za prisustvo enterotoksina stafilocoka, budući da broj ćelija može da se smanji, a da enterotoksin bude prisutan u hrani. Mikrobiološki kriterijum za koagulaza pozitivne stafilocoke i/ili enterotoksine stafilocoka u hrani su neophodni i korisni za zaštitu zdravlja ljudi.*

*Ključne reči: koagulaza pozitivne stafilocoke, enterotoksini stafilocoka, hrana, bezbednost hrane*

#### **Uvod / Introduction**

Alimentarne intoksikacije, kod kojih su dominantni simptomi povraćanje i dijareja, nastaju posle konzumiranja hrane koja sadrži termostabilne enterotoksine koagulaza pozitivnih stafilocoka uglavnom *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). U većini zemalja intoksikacija enterotoksinima stafilocoka jedna je od najčešće opisanih bakterijskih intoksikacija nastalih posle konzumiranja hrane

\* Rad saopšten na simpozijumu "Bezbednost namirnica animalnog porekla", Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd 16 i 17. oktobar 2008. godine

\*\* Dr sci med. vet. Vera Katić, redovni profesor, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

(Balaban i Rasooly, 2000). U Evropi, mleko i proizvodi od mleka su opisani u 1–9% (prosečno 4,8%) od svih alimentarnih intoksikacija izazvanih enterotoksinima *S. aureus* (EC, 2003). Jedna od najvećih epidemija alimentarnih intoksikacija, nastalih posle konzumiranja proizvoda od mleka, zabeležena je 2000. godine u Japanu (Asao i sar., 2003). Najčešće su u slučajevima alimentarnih intoksikacija enterotoksinima stafilokoka opisani nepasterizovano mleko i sirevi.

Proizvodi od mleka, kao i drugi proizvodi sa visokim sadržajem proteina, dobar su substrat za rast *S. aureus*. Takvi proizvodi su uključeni u alimentarne intoksikacije zbog prisustva koagulaza pozitivnih stafilokoka u sirovom mleku, unakrsne kontaminacije za vreme proizvodnje i moguće kontaminacije posle završenog procesa proizvodnje.

Mossel i sar., (1995) navode da je za nastajanje simptoma povraćanja kod odraslih osoba potrebno da se hranom unese u organizam 10–20 µg stafilokoknih enterotoksina/kg telesne mase. Drugi autori (Martin i sar., 2001) smatraju da manje od 1 µg stafilokoknih enterotoksina može izazvati simptome trovanja kod osetljivih osoba. U velikoj epidemiji trovanja, izazvanog enterotoksinom A stafilokoka u Japanu, utvrđeno je da je ukupan unos stafilokoknog enterotoksina A u mleku sa smanjenim sadržajem mlečne masti bio oko 0,02–0,1 µg (Asao i sar., 2003).

Diferenciranje enterotoksogenih sojeva od ostalih stafilokoka moguće je samo na osnovu dokazivanja enterotoksina. Iako danas ima razvijenih tehnika za rutinsko dokazivanje enterotoksina stafilokoka u hrani, one su još uvek skupe, pa je uobičajeno da se u hrani dokazuju stafilokoke sa osobinama patogenih vrsta. Jedna od osobina patogenih vrsta je stvaranje koagulaze, pa je prema "Pravilniku o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica u prometu" (Sl. list SRJ 26/93) predviđeno dokazivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka. Međutim, sve koagulaza pozitivne stafilokoke ne stvaraju enterotoksine. Pasterizacijom mleka se uništavaju koagulaza pozitivne stafilokoke, ali ne i enterotoksini. Budući da su enterotoksini stafilokoka mnogo stabilniji u poređenju sa ćelijama *S. aureus* moguće je da se ispitivanjem proizvoda dobije negativan nalaz *S. aureus*, a da je enterotoksin prisutan u hrani. Negativan nalaz koagulaza pozitivnih stafilokoka u određenoj količini hrane ne znači da u toj hrani sigurno nema enterotoksina stafilokoka, kao što i pozitivan nalaz koagulaza pozitivnih stafilokoka u određenoj količini hrane ne znači uvek i prisustvo enterotoksina u hrani. Stoga u cilju zaštite zdravlja ljudi od intoksikacija enterotoksinima stafilokoka kriterijum za utvrđivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka, kakav je danas u pravilniku, nije dobar pa je potrebna njegova izmena.

Novi mikrobiološki kriterijum za određivanje broja *S. aureus* i/ili enterotoksina, koji treba da osigura zaštitu zdravlja ljudi od intoksikacija enterotoksinima stafilokoka, treba da bude zasnovan na podacima o razmnožavanju stafilokoka i stvaranju enterotoksina u toku proizvodnje namirnica animalnog porekla, epidemiološkim podacima, kao i na osnovu danas raspoloživih metoda za detekciju *S. aureus* i enterotoksina stafilokoka.

**Izvori kontaminacije hrane bakterijom *S. aureus* i uslovi za razmnožavanje /**  
*Sources of food contamination with *S.aureus* and conditions for multiplication*

Bakterijom *S. aureus* hrana se kontaminira iz više izvora. Primarna kontaminacija nastaje iz inficiranog tkiva ili obolele mlečne žlezde. Sekundarna kontaminacija nastaje od ljudi kliconoša, a ređe sa opreme i iz vazduha (Stojanović i sar., 1999). *S. aureus* je ubikvitarni mikroorganizam koji se nalazi na koži i mukoznim membranama najvećeg broja toplokrvnih životinja uključujući i one životinje koje su namenjene za proizvodnju hrane. Često se dokazuje u hrani animalnog porekla, kao što su sirovo mleko i sirovo meso, međutim, zbog slabe kompeticije prema drugim mikroorganizmima retko dovodi do intoksikacija posle konzumiranja sirovih proizvoda (izuzev kada se radi o mleku krava sa subkliničkim mastitisima). Oko 50 % ljudi ima ovaj mikroorganizam na površinama kože i sluzokože, pa radnici koji rade u proizvodnji i prometu hrane mogu da budu izvor kontaminacije hrane. Pored toga, ovaj mikroorganizam dobro preživljava u spoljašnjoj sredini pa može da bude deo mikroflore opreme za proizvodnju hrane. U objektima za proizvodnju hrane, zbog njegove otpornosti na sušenje, *S. aureus* se često nalazi u prašini, u ventilacionim sistemima i ciklonima. Bakterija takođe može da kolonizuje opremu za proizvodnju hrane koja se teško čisti i ostavlja vlažna (Bockelmann i sar., 1997).

*S. aureus* se razmnožava u rasponu od 7°C do 47,8°C temperature medijuma, optimum 37°C, a enterotoksin stvara pri 10°C do 48°C, optimum 40°C do 45°C (Tatini, 1973) (tabela 1). Ove temperature su određene za *S. aureus* umnožavan u bujonu u čistoj kulturi. Međutim, za proučavanje ponašanja ovog patogena u hrani, moraju se uzeti u obzir i drugi faktori koji utiču na rast. Za predviđanje stvaranja enterotoksina u hrani mora se uzeti u obzir sledeće: a) u bilo kojoj hrani, optimalna temperatura za stvaranje enterotoksina je za nekoliko stepeni viša od temperature za razmnožavanje, b) temperatura znatno više utiče na stvaranje enterotoksina nego na razmnožavanje *S. aureusa* (Smith i sar., 1983). Drugi važan faktor od koga zavisi razmnožavanje *S. aureus* i stvaranje enterotoksina je pH vrednost. *S. aureus* može da se razmnožava u rasponu pH vrednosti od 4,0 do 10, optimum 6,0 do 7,0 (tabela 1). Međutim, raspon pH vrednosti za stvaranje enterotoksina se menja sa drugim uslovima posebno anaerobiozom. Na primer minimalna pH vrednost za stvaranje enterotoksina u aerobnim uslovima se kreće od 4,9 do 5,7, a u anaerobnim uslovima od 5,7 do 7,0 (Varnam, 1996).

Poznavanje sposobnosti *S. aureus* da se razmnožava i stvara enterotoksine, pri relativno niskoj aktivnosti vode, veoma je važno za definisanje sadržaja vode u hrani. *S. aureus* se razmnožava pri  $a_w$  od 0,83 do 0,99, a enterotoksin stvara pri  $a_w$  od 0,85 do 0,99. *S. aureus* je halotolerantan mikroorganizam koji može da raste pri 10 do 20% NaCl, ali toksin ne stvara pri više od 10% NaCl (Smith i sar., 1983) (tabela 1).

Tabela 1. Faktori koji utiču na razmnožavanje *S. aureus* i stvaranje enterotoksina /  
Table 1. Factors that affect multiplication of *S.aureus* and production of enterotoxins

Faktor / Factor	Rast <i>S. aureus</i> / Growth of <i>S.aureus</i>		Stvaranje enterotoksina / Production of enterotoxins	
	Optimum / Optimum	Interval varijacija / Variation interval	Optimum / Optimum	Interval varijacija / Variation interval
Temperatura (°C) / Temperature (°C)	37	7-47,8	40-45	10-48
pH	6-7	4-10	7-8	4-9,6
Aktivnost vode / Water activity	0,98	0,83->0,99 <sup>1</sup>	0,98	0,85 ->0,99 <sup>2</sup>
NaCl (%)	0	0-20	0	0-10
Redoks potencijal / Redox potential	> +200mV	<-200mV do > +200mV	> +200mV	<-100mV do > +200mV
Atmosfera / Atmosphere	Aerobna / Aerobic	Anaerobna-aerobna / Anaerobic-Aerobic	Aerobna (5-20% rastvorenog O <sub>2</sub> ) / Aerobic (5-20% diluted O <sub>2</sub> )	Anaerobna-aerobna / Anaerobic-Aerobic

<sup>1</sup> Aerobna (anaerobna 0,90 - >0,99) / Aerobic (anaerobic 0.90->0.99)

<sup>2</sup> Aerobna (anaerobna 0,92 - >0,99) / Aerobic (anaerobic 0.92->0.99)

Ćelije *S. aureus* se uništavaju toplotnim tretmanima, koji se najčešće koriste u industriji hrane. Otpornost na grejanje menja se pod uticajem različitih faktora, kao što su: sredstvo za zagrevanje, starost ćelija i temperatura pri kojoj je umnožavan *S. aureus*. Veća otpornost je utvrđena ako je patogen rastao pri 46°C nego pri 37°C. Vrednost decimalne redukcije (D<sub>60</sub>) se kreće od 0,43 do 7,9 minuta, a z vrednost od 4,5°C do 10°C (Roberts, 1982). Ćelije *S. aureus* se uništavaju u mleku ako se primeni odgovarajući toplotni tretman. *S. aureus* je potpuno inaktivisan u mleku posle aplikacije sledećih temperatura u vremenu: 57,2°C u trajanju od 80 min; 60°C u trajanju od 24 min; 62,8°C u trajanju od 6,8 min; 65,6°C u trajanju od 1,9 min i 71,7°C u trajanju od 0,14 min (Bergdoll, 1989). Enterotoksini *S. aureus* su termorezistentniji od samih ćelija, preživljavaju kuvanje i najveći broj toplotnih tretmana koji se primenjuju u pripremi hrane. Stabilnost molekula enterotoksina je pod uticajem različitih faktora sredine i postoje podaci da inaktivacija toplotom može da nastane pri temperaturama nižim od opšte prihvaćenih. Na primer termorezistencija enterotoksina A i B je mnogo niža u fermentisanoj soji nego u *brain-heart infusion* bujonu. Kuvanjem fermentisane soje, jedan minut pri 80°C, kompletno se inaktiviraju enterotoksin A i 92% enterotoksina B (Nout i sar., 1988). Enterotoksini stafilokoka su otporniji na delovanje gama zraka od ćelija *S. aureus*. Ćelije stafilokoka i enterotoksini su otporni na sušenje, hlađenje, zamrzavanje i uslove skladištenja (tabela 2).

Tabela 2. Faktori koji utiču na destrukciju *S. aureus* i enterotoksina (Baird-Parker, 1990; Concon 1998) /

Table 2. Factors that affect destruction of *S.aureus* and enterotoxins (Baird-Parker, 1990, Concon, 1998)

Faktor / Factor	<i>S. aureus</i>	Enterotoksin stafilokoka / <i>Staphylococcal enterotoxins</i>
Toplota / Heat	Bujon / <i>Bouillon</i> (D <sub>60°C</sub> ) 0,43-8,0 min Mleko / <i>Milk</i> (D <sub>60°C</sub> ) 3,16-3,29 min	Bujon / <i>Bouillon</i> (D <sub>121°C</sub> ) 3-8,0 min
Radijacija / <i>Radiation</i> (D-kGy)	0,1 - 0,6	>30
Sušenje, hlađenje, zamrzavanje, uslovi skladištenja / <i>Drying, cooling, freezing, storage conditions</i>	Otporan / <i>Resistant</i>	Otporan / <i>Resistant</i>

\*Otpornost na toplotu je iskazana kao D- vrednost, odnosno kao vreme u minutima pri datoj temperaturi potrebno da se postigne redukcija 90 % živih ćelija /

\**Resistance to heat is presented as D-value, actually as time in minutes at a given temperature required for achieving reduction of 90% living cells.*

*S. aureus* je slab u kompeticiji sa drugim mikroorganizmima i retko dostiže veliki broj i ne stvara značajne količine enterotoksina ako je prisutna mikroflora kvara. Stvaranje toksina je pod većim uticajem temperature nego prisustva drugih mikroorganizama (Herten i sar., 1989). Inhibitorni efekat bakterija mlečne kiseline iz starter kultura je značajan sa aspekta sprečavanja razmnožavanja *S. aureus* i stvaranja toksina u hrani. Prvo se smatralo da inhibicija rasta stafilokoka nastaje zbog stvaranja mlečne kiseline. Danas se zna da i drugi proizvodi, koji nastaju pri razmnožavanju bakterija mlečne kiseline, kao što su vodonik peroksid i bakteriocini, utiču na razmnožavanje *S. aureus*. Pri proučavanju razmnožavanja *S. aureus* u hrani i stvaranja enterotoksina moraju se uzeti u obzir svi faktori u vezi sa hranom i sredinom u kojoj se hrana proizvodi i skladišti.

#### Enterotoksini stafilokoka / *Staphylococcal enterotoxins*

Enterotoksini stafilokoka su termostabilni proteini koje stvaraju mnogi sojevi *S. aureus*. Enterotoksine mogu da stvaraju i neke druge koagulaza pozitivne stafilokoke, kao što su: *S. aureus* subsp. *aureus*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* i *S. lutrae*. Prema Casman i saradnicima (1963) enterotoksini stafilokoka su označeni velikim slovima abecede po redu otkrivanja. Do danas je opisano 16 imunološki različitih enterotoksina: A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N i O (EC, 2003). Za enterotoksin F stafilokoka, koji je opisan u slučaju *toxic shock syndrome* (TSS) (Bergdoll i sar., 1981), u kasnijim istraživanjima je utvrđeno da nije enterotoksin i da ne daje simptome povraćanja, pa je ovaj enterotoksin isključen iz sistema no-

menklature enterotoksina stafilokoka i danas se opisuje kao *toxic shock syndrome toxin* (TSST) (Betley i sar., 1990).

Enterotoksini stafilokoka predstavljaju grupu serološki različitih ekstracelularnih proteina i imaju zajedničke osobine kao što su: sposobnost da izazovu povraćanje i gastroenteritis kod primata; superantigenost (nespecifična aktivacija T limfocita praćena oslobađanjem citokina i sistemski šok) koji su opisali Fraser i sar., (2000), Papageorgiou (2000) i Ulrich (2000); otpornost na toplotu i digestiju pepsinom; i strukturna sličnost (dva domena molekula i intramolekularna disulfidna veza) koje su opisali Balaban i Rasooly (2000) i Dinges i sar., (2000).

Enterotoksini stafilokoka su slične molekulske mase između 25.000–29.000 kD. Stvaranje enterotoksina je kodirano pomoću profaga (npr. enterotoksin A; Betley i Mekalanos, 1985), plasmida (enterotoksin D; Bayles i landolo, 1989) ili hromozomalnih ostrvaca patogenosti (npr. enterotoksin B) (Yarwood i sar., 2002).

Enterotoksigenost sojeva stafilokoka je različita u zavisnosti od porekla. Enterotoksin češće stvaraju sojevi poreklom od ljudi (70% do 80%), a ređe sojevi poreklom od životinja (15%). Najznačajniji sa gledišta alimentarnih trovanja su enterotoksini A i D. Količina enterotoksina potrebna da dođe do alimentarnih trovanja je veća od 1 µg (Stojanović, 1980; Bennett, 1986; Olivera Bunčić, 1986).

Sinteza enterotoksina je specifična za određeni soj, međutim, jedan soj *S. aureus* može da sintetiše više enterotoksina. Sinteza enterotoksina je selektivna i enterotoksini A i D se stvaraju u logaritamskoj fazi rasta stafilokoka, a enterotoksini B i C se stvaraju za vreme kasne logaritamske faze i na početku stacionarne faze. Stvaranje enterotoksina A i D je u uskoj korelaciji sa razmnožavanjem *S. aureus*, a umnožavanje sojeva koji stvaraju enterotoksin B i C nije u korelaciji sa stvaranjem enterotoksina. U mnogim ispitivanjima je ustanovljeno, da je za stvaranje količine enterotoksina, koja se može detektovati, potreban veliki broj *S. aureus* (više od  $2,8 \times 10^8$ /ml; Otero i sar, 1987). Na stvaranje enterotoksina utiče više različitih ekstracelularnih faktora (hranljive komponente, pH vrednost, temperatura, aktivnost vode, atmosferski pritisak, NaCl, drugi inhibitori i drugi mikroorganizmi).

Definicija enterotoksogenih sojeva nije jasna budući da neki sojevi poseduju gen za stvaranje enterotoksina, ali ga ne stvaraju. Prema podacima iz literature neki sojevi koji mogu da stvaraju enterotoksine ne stvaraju ih u siru (EC, 2003).

### **Metode za dokazivanje enterotoksina / *Methods for proving enterotoxins***

Za dokazivanje enterotoksina koriste se tri tipa metoda: biološke metode, metode molekularne biologije i imunološke metode.

Biološke metode se zasnivaju na praćenju emetičke aktivnosti na majmunima i mačićima. Simptomi alimentarne intoksikacije toksinima stafilokoka su zapaženi kada je doza unetog enterotoksina bila iznad 200 ng. Zbog slabe

osetljivosti metode i teškoće za njeno izvođenje ona nema više praktičnu primenu.

Druga grupa metoda su metode molekularne biologije kao što je lančana reakcija polimeraze (*polymerase chain reaction*- PCR). Ovom metodom dobijaju se podaci o prisustvu ili odsustvu gena za enterotoksin stafilokoka, a ne dobija se informacija o prisustvu ili odsustvu ekspresije tog gena za vreme proizvodnje i skladištenja hrane. Ova metoda takođe nije primenjiva za detekciju enterotoksina stafilokoka u hrani. Međutim, ona omogućava karakterizaciju sojeva *S. aureus* izolovanih u slučaju alimentarnih trovanja.

Danas se za dokazivanje enterotoksina u hrani koriste imunološke metode, koje se zasnivaju na upotrebi specifičnih antitela za enterotoksine. Detekcija enterotoksina stafilokoka u hrani zahteva osetljivije metode od metoda koje se koriste za ispitivanje enterotoksogenosti sojeva, pošto količina enterotoksina stafilokoka u hrani može da varira od manje od 0,1 do više od 20 ng/g hrane. Stoga metode za dokazivanje enterotoksina treba da budu dovoljno osetljive za procenu bezbednosti hrane.

Za dokazivanje enterotoksina u hrani razvijeno je nekoliko imunoloških metoda: imunodifuzija, Radio imunoAssay (RIA), Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA) i Enzyme Immunoassay (EIA).

Na principu difuzije u gelu razvijene su tri metode za dokazivanje enterotoksina stafilokoka. Prva metoda mikro slajd tehnike je bila prva semikvantitativna metoda za dokazivanje enterotoksina stafilokoka u hrani. Ovom metodom se može dokazati 100 ng/ml enterotoksina u hrani. Druge metode razvijene iz metode gel difuzije nisu bile dovoljno osetljive za dokazivanje enterotoksina stafilokoka u hrani.

Radio imunoassay je prva metoda dovoljno osetljiva da se dokaže manje od 1 ng enterotoksina po gramu hrane. Međutim, pri izvođenju ove metode koriste se radionuklidi, kao što je  $J^{125}$ . Iz razloga bezbednosti pri radu sa radionuklidima i problema pri odlaganju upotrebljenog materijala ova metoda se ne koristi u većini laboratorija.

U metodi Reversed Passive Latex Agglutination koriste se specifična antitela povezana za lateks partikule. Granica detekcije ove metode je 1 ng enterotoksina stafilokoka po gramu hrane, pa nije adekvatna za detekciju malih količina enterotoksina u hrani.

Razvojem Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) zamenjena je upotreba RIA metoda za dokazivanje enterotoksina u hrani. Monoklonska antitela prema enterotoksinima stafilokoka su upotrebljena za razvoj ELISA sendvič metode za primenu pri službenoj kontroli proizvoda od mleka. Ovom metodom može se detektovati manje od 0,1 ng enterotoksina stafilokoka po gramu hrane.

### **Kriterijumi za koagulaza pozitivne stafilokoke u hrani /**

#### *Criteria for coagulase-positive staphylococci in food*

Diferenciranje enterotoksogenih sojeva od ostalih stafilokoka moguće je samo na osnovu dokazivanja enterotoksina. Iako danas ima razvijenih tehnika za rutinsko dokazivanje enterotoksina stafilokoka u hrani, one su još uvek skupe, pa je uobičajeno da se u hrani dokazuju stafilokoke sa osobinama patogenih vrsta. Jedna od osobina patogenih vrsta je stvaranje koagulaze, pa je u "Pravilniku o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica u prometu" (Sl. list SRJ 26/93) predviđeno dokazivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka. Osim ako navedenim pravilnikom za pojedine namirnice nije drugačije određeno, namirnice u prometu ne smeju sadržavati koagulaza pozitivne stafilokoke u 0,01 gramu ili mililitru hrane. Sve koagulaza pozitivne stafilokoke nisu i enterotoksogene. Enterotoksini stafilokoka su otporniji na toplotu od ćelija stafilokoka. Budući da je za nastanak alimentarnih intoksikacija potrebna određena količina enterotoksina koju stvara  $10^5$  do  $10^6$  enterotoksogenih stafilokoka/g ili /ml hrane kriterijum koji je danas propisan u "Pravilniku..." (Sl. list SRJ 26/93) nije pouzdan za donošenje zaključka o bezbednosti određene hrane.

Na osnovu naučnih saznanja o uslovima za razmnožavanje koagulaza pozitivnih stafilokoka i stvaranje enterotoksina u hrani, u količini koja dovodi do alimentarnog trovanja, epidemioloških podataka i metoda za dokazivanje enterotoksina potrebna je promena dosadašnjih kriterijuma za koagulaza pozitivne stafilokoke u hrani.

S gledišta bezbednosti hrane samo enterotoksogeni sojevi *S. aureus* predstavljaju rizik po zdravlje ljudi, a kriterijumi koji se primenjuju treba da spreče stvaranje enterotoksina stafilokoka za vreme procesa proizvodnje i pojavu enterotoksina u finalnom proizvodu. (Katić i sar. 2000).

Broj *S. aureus* u mleku s farme je u korelaciji sa subkliničkim mastitisima i varira od 10 do nekoliko hiljada po mililitru mleka (Asperger i sar., 2002; Mijačević, 1983). Mleko je dobar medijum za razmnožavanje *S. aureus* i stvaranje enterotoksina (pogodan pH, visoka aktivnost vode, hranljive materije) pa se pri temperaturi iznad 10 °C, broj *S. aureus* može brzo povećati čak i u slučajevima kada je početni broj nizak.

S ciljem da se zaštiti zdravlje ljudi, potreban je kriterijum za utvrđivanje broja *S. aureus*. Ukoliko sirovo mleko sadrži veliki broj *S. aureus*, za vreme prerade mleka u proizvode može doći do stvaranja enterotoksina. Opisana su alimentarna trovanja enterotoksinima stafilokoka posle konzumiranja maslaca i sira proizvedenih od sirovog mleka. Stoga sirovo mleko namenjeno za preradu u proizvode ne treba da sadrži veliki broj *S. aureus*. Utvrđivanje mikrobioloških kriterijuma za sirovo mleko, namenjeno za preradu u proizvode, ima značajnu ulogu u zaštiti zdravlja ljudi.

Kriterijumi za određivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka, za sireve proizvedene iz sirovog mleka ili termiziranog mleka, imaju značajnu ulogu u oceni

tih proizvoda sa gledišta bezbednosti po zdravlje ljudi. *S. aureus* može biti prisutan u sirovom mleku, a kombinacija vremena i temperature za vreme termizacije nije dovoljna da u svakom slučaju garantuje uništavanje velikog broja *S. aureus*. Ako postoji mogućnost da se enterotoksogeni *S. aureus* umnoži u velikom broju u prvih 48 časova proizvodnje sira, stvoriće se i enterotoksin. Tokom zrenja i skladištenja sira često dolazi do smanjenja broja *S. aureus*, međutim, enterotoksin ostaje prisutan za sve vreme roka upotrebe sira.

U zavisnosti od vrste sira kritičan period za stvaranje enterotoksina su prva 2 do 3 dana od početka proizvodnje sira, kada broj *S. aureus* može da se poveća. U kasnijim fazama proizvodnje sira broj *S. aureus* se obično smanjuje i na osnovu njegovog broja određenog u tim fazama ne može se dobiti prava informacija o mogućnosti stvaranja enterotoksina u siru.

Zbog intrinzič i ekstrinzič faktora, od kojih zavisi razmnožavanje *S. aureus* i stvaranje enterotoksina, nivo stvorenog enterotoksina u optimalnim laboratorijskim uslovima u poređenju sa sumnjivim sirom mora biti mnogo veći. Stoga određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka ne može biti kriterijum za prisustvo enterotoksina stafilokoka u siru.

Tokom proizvodnje i skladištenja svežeg sira, *S. aureus* može da se razmnožava i stvara enterotoksin, posebno ako u proizvodnju sira nije uključena mlečnokiselinska fermentacija. Kontaminacija *S. aureus* svežih sireva, napravljenih iz termički obrađenog mleka, može da nastane posle toplotne obrade, a visoka aktivnost vode (0,94–0,96) i visoka pH vrednost (6,0–6,2) u surutki sira omogućavaju razmnožavanje ovog mikroorganizma.

Pasterizacija mleka je efikasan postupak u eliminaciji *S. aureus*, pa broj ovih mikroorganizama u mekom siru proizvedenom iz pasterizovanog mleka ukazuje na kontaminaciju posle pasterizacije. Ukoliko je broj *S. aureus* visok u prvih 48 časova proizvodnje sira, postoji rizik od stvaranja enterotoksina. Utvrđeno je da se broj *S. aureus* smanjuje za vreme zrenja i skladištenja mekog sira, međutim, enterotoksin ostaje u siru za sve vreme roka upotrebe. Kriterijum za koagulaza pozitivne stafilokoke je validan samo ako se primeni 48–72 časa od početka proizvodnje sira. Ako se sir ispituje posle tog vremena, umesto određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilokoka treba ispitati sir na prisustvo enterotoksina. Enterotoksini mogu da se dokazuju direktno u siru. Sir koji sadrži enterotoksine nije prihvatljiv za ishranu ljudi. Alternativno se može prvo izvršiti ispitivanje sira na prisustvo TNaze. Ukoliko je reakcija na TNazu pozitivna, sir se obavezno ispituje na prisustvo enterotoksina.

*S. aureus* može da se razmnožava i stvara enterotoksine za vreme proizvodnje mleka u prahu (npr. u tanku za skladištenje zgusnutog mleka pre sušenja). Zbog nepovoljnih uslova za razmnožavanje *S. aureus* u mleku u prahu tokom skladištenja njegov broj se smanjuje. Međutim, odsustvo *S. aureus* ne isključuje prisustvo enterotoksina stafilokoka, budući da se oni mogu stvoriti pre procesa sušenja. Međutim, ako se mleko u prahu koristi u pripremi određenih namirnica, *S. aureus* može da se umnožava i stvara enterotoksine. Mleko u prahu i

proizvodi koji sadrže mleko u prahu opisani su u slučajevima alimentarnih intoksikacija toksinima stafilocoka.

Pri utvrđivanju mikrobioloških kriterijuma za bezbednost mleka u prahu treba uzeti u obzir mogućnost da je došlo do stvaranja enterotoksina u mleku u prahu za vreme proizvodnje kao i mogućnost da je proizvod kontaminiran bakterijom *S. aureus* posle proizvodnje. Stoga mleko u prahu treba ispitivati na broj koagulaza pozitivnih stafilocoka i prisustvo enterotoksina.

*S. aureus* može da se razmnožava tokom proizvodnje zamrznutih proizvoda od mleka, ali ne i tokom njihovog skladištenja.

#### **Zaključak / Conclusion**

Alimentarne intoksikacije enterotoksinima stafilocoka nastaju kao posledica konzumiranja hrane koja sadrži enterotoksine koagulaza pozitivnih stafilocoka, najčešće *S. aureus*. Do danas ni u jednom slučaju alimentarnih intoksikacija enterotoksinima stafilocoka nisu dokazane koagulaza negativne stafilocoke. Međutim, sve koagulaza pozitivne enterotoksogene stafilocoke ne stvaraju enterotoksine u svakoj vrsti hrane. Stvaranje enterotoksina stafilocoka u hrani zavisi od međusobnog odnosa brojnih faktora kao što su: aktivnost vode, pH, redoks potencijal, temperatura i inhibitorno dejstvo drugih bakterija. Razmnožavanje enterotoksogenih stafilocoka i stvaranje enterotoksina u fermentisanim proizvodima od mleka mogu da spreče bakterije mlečne kiseline. Opšte je prihvaćeno da izolati poreklom od ljudi mnogo češće stvaraju enterotoksin nego izolati poreklom od goveda i da su izolati stafilocoka iz obolelog vimena rezistentniji od izolata iz zdravog vimena. Izolati stafilocoka iz hrane najčešće stvaraju enterotoksin A i enterotoksin D.

Enterotoksini stafilocoka su mnogo otporniji na štetno delovanje okoline nego ćelije stafilocoka. Enterotoksini stafilocoka se normalno ne inaktivišu ili veoma slabo inaktivišu za vreme proizvodnje, skladištenja, distribucije ili kulinarne pripreme hrane. Stoga, ako su enterotoksogene stafilocoke mogle da se razmnožavaju u hrani do broja većeg od  $10^5$ – $10^6$  cfu/g ili/ml, pre nego što su uništene, postoji rizik od intoksikacije toksinima stafilocoka.

Enterotoksogene stafilocoke mogu da se razmnožavaju i stvaraju enterotoksin u prvim fazama proizvodnje sira kada je pH grušića veći od 5,0 i kada bakterije mlečne kiseline nisu prisutne u velikom broju. Period pogodan za umnožavanje *S. aureus* u siru kreće se od nekoliko časova do najviše 48 časova u zavisnosti od vrste sira.

Budući da su enterotoksini stabilniji od ćelija *S. aureus* mikrobiološkim kriterijumima treba definisati graničnu vrednost za broj koagulaza pozitivnih stafilocoka u ranoj fazi proizvodnje sira (2–3 dana od početka proizvodnje), a graničnu vrednost za enterotoksine u kasnijim fazama proizvodnje sira.

Rizik od alimentarnih intoksikacija toksinima stafilokoka može se smanjiti primenom dobre higijenske prakse, dobre proizvođačke prakse i integrisanim pristupom proizvodnji hrane zasnovanom na principima HACCP-a.

#### Literatura / References

1. Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H, Kozaki S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol Infect* 2003; 130: 33-40.
2. Asperger H, Zangerl P. *Staphylococcus aureus*. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (eds Roginski H, Fuquay JW, Fox P). Academic press, Elsevier Science, London, 2002; 2563-9.
3. Baird-Parker AC. The staphylococci: an introduction. *J Appl Bact Symp* 1990; Suppl. 1S-8S.
4. Balaban N, Rasooly. Review – Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol* 2000; 61: 1-10.
5. Bayles KW, landolo JJ. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol* 1989; 171: 4799-806.
6. Bennett RW, Yetevoim M, Smith W. *Staphylococcus aureus* identification characters and enterotoxigenity. *J Food Sci* 1986; 51: 1337-9.
7. Bennett RW. Atypical toxigenic *Staphylococcus* and non-*Staphylococcus aureus* species on the horizon? An update. *J. Food Protect.* 1996; 59(10): 1123-6.
8. Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Bobbins RN, Davis PD. A new staphylococcal enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet I* 1981; 1017-21.
9. Bergdoll MS. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP (ed). *Foodborne bacterial pathogens*. Marcel Dekker, Inc, New York, Basel, 1989; 463-523.
10. Betley MJ, Schlievert PM, Bergdoll MS, Bohach GA, landolo IJ, Khan SA, Pattee PA, Reiser RF. Staphylococcal gene nomenclature. *ASM Nws*, 1990; 56: 182.
11. Bockelmann W, Krusch U, Engel G, Klijn N, Smit G, Heller KJ. The microflora of Tilsit cheese. Part 1. Variability of the smear flora. *Nahrung*, 1997; 41: 208-12.
12. Bunčić O. Antagonističko delovanje laktobacila izolovanih iz fermentovanih kobasica na razmnožavanje *Staph. aureus* i stvaranje enterotoksina. Doktorska disertacija, Beograd, 1986.
13. Concon JM. *Food toxicology* (in two parts). Part B: contaminants and additives, Marcel Dekker, Inc, New York, Basel, 1988; 802-3.
14. Council Directive 92/46, 1992, The health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat-treated milk and milk-based products.
15. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, 2003, Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on Staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses.
16. Fraser J, Arcus V, Kong P, Baker E, Proft T. Super antigens- powerful modifiers of the immune system. *Mol Med Today* 2000; 6: 125-32.
17. Genigeorgies CA. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *Int. J Food Mic* 1989; 9: 327-60.

18. Herten B, Board RG, Mead GC. Conditions affecting growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* on temperature-abused chicken meat. Lett Appl Mic 1989; 9: 145-8.
19. Jay MJ, Loessner MJ, Golden DA. Staphylococcal Gastroenteritis, In: Dennis R. Heldman, editor, Modern food microbiology, VII th edition, Springer, 2005; 545-90.
20. Katić V, Stojanović L. Mikrobiološki kriterijumi za ocenu higijenske ispravnosti mleka i proizvoda od mleka. J Sci Agric Research/Arh. poljopr. nauke, 2000; 61 (1-2): 147-58.
21. Khambaty FM, Bennett RW, Shah DB. Application of pulse field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. Epidemiol Infect 1994; 113: 75-81.
22. Martin SE, Mayers ER, Iandolo JJ. *Staphylococcus aureus* In: Hui YH, Pierson MD, Gorham JR (eds) Foodborne disease handbook, Vol. 1 Bacterial pathogens. New York Basel: Marcel Dekker Inc. 2001; 345-81.
23. Mijačević Z. Biohemijska aktivnost stafilokoka u mleku pri različitim tehnološkim uslovima obrade i prerade mleka. Doktorska disertacija, Beograd, 1983.
24. Nout MJR, Notermans S, Rombouts FM. Effect of environmental conditions during soya-bean fermentation on the growth of *Staphylococcus aureus* and production thermal stability of enterotoxins A and B. Int J Food Microb 1988; 7: 299-309.
25. Pravilnik o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica u prometu (Sl. list SRJ 26/93).
26. Papageorgiou AC, Acharya KR. Microbial super antigens: from structure to function. Trends Microbiol 2000; 8: 369-75.
27. Roberts D. Bacteria of public health significance. In: Meat Microbiology, Brown, M. (Ed). Applied Science Publishers: London and New York, 1982.
28. Smith JL, Buchanan RL, and Palumbo SA. Effect of food components on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. J Food Protec 1983; 46: 545-55.
29. Stojanović L. Uticaj ekoloških činilaca na dinamiku stvaranja i održivost stafilokoknih enterotoksina. Doktorska disertacija, Beograd, 1980.
30. Stojanović L, Bunčić O, Katić V. Toksini aerobnih mikroorganizama u hrani. Zbornik radova i kratkih sadržaja "11. savetovanja veterinara Srbije", Zlatibor, 1999; 50-5.
31. Tatini SR. Influence of food environments on growth *S. aureus* and production of staphylococcal enterotoxins. J. Milk Fd. Tech. 1973; 36: 559-63.
32. Ulrich RG. Envolving superantigens of *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol 2000; 27: 1-7.
33. Vaugh VC. Poisonous or sick cheese. Public Healt, 1884; 10: 241-5.
34. Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, Orwin PM, Kapur V, Schlievert PM. Characterization and spression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. J Biol Chem 2002; 277: 1338-47.

ENGLISH

**SIGNIFICANCE OF COAGULASE-POSITIVE STAPHYLOCOCCI FOR MICROBIOLOGICAL FOOD SAFETY**

Vera Katić

Staphylococcal foodborne intoxication, in which major symptoms are vomiting and diarrhoea, occurs after ingestion of thermostable staphylococcal enterotoxins produced in food by enterotoxigenic strains of coagulase-positive staphylococci. Staphylococcal enterotoxins are normally not or only slightly inactivated during food processing, storage, distribution or during the preparation of the food in the kitchen. Therefore, if enterotoxigenic staphylococci are able to grow in food to more than  $10^5$  -  $10^6$  cfu/g/ml before they are killed there is still a risk of intoxication with consumption.

The legislation of the Republic of Serbia lays down criteria for coagulase-positive staphylococci in food. However, the number of coagulase-positive staphylococci may not always be a good indicator of the presence of staphylococcal enterotoxins, and the number of cells may have already decreased although the product still contains enterotoxins. The microbiological criteria for coagulase-positive staphylococci and/or staphylococcal enterotoxins in food are essential and useful to protect public health.

Key words: coagulase-positive staphylococci, staphylococcal enterotoxins, food, food safety

РУССКИЙ

**ЗНАЧЕНИЕ КОАГУЛЯЗ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ СТАФИЛОКОККОВ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ИСПРАВНОСТИ КОРМА**

Вера Катич

Алиментарные интоксикации кормом, у которых главный симптом рвота и диаря, возникают после вноса энтеротоксинов, которые в корме создали энтеротоксигенные штаммы коагуляз положительных стафилококков. Энтеротоксины стафилококков нормально или очень мало инактивируются во время процесса производства, склада, дистрибуции или во время кулинарной подготовки корма. Оттого, насколько коагуляза положительные стафилококки могут размножиться в корме до числа большего от  $10^5$ - $10^6$  цфу/г/мл прежде чем, что будут уничтожены, потребление корма представляет собой риск от интоксикации.

В Регламенте о микробиологической исправности пищевых продуктов в обороте (Сл. Лист СРЮ 26/93) предписанные критерии для коагулязы положительного стафилококка в корме. Между тем, число коагулязов положительных стафилококков не всегда хороший индикатор для присутствия энтеротоксинов стафилококков, так как число клеток может уменьшиться, а что энтеротоксин будет присутствующий в корме. Микробиологический критерий для коагуляза положительного стафилококка и/или энтеротоксины стафилококков в корме необходимы и полезны для охраны здоровья людей.

Ключевые слова: коагуляз положительного стафилококка, энтеротоксины стафилококков, корм, безопасность корма