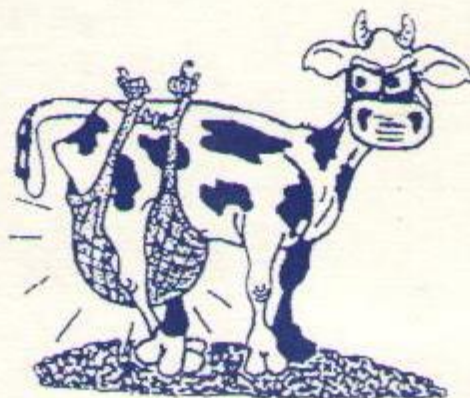


SRPSKO VETERINARSKO DRUŠTVO

**SIMPOZIJUM
MASTITIS I KVALITET MLEKA**

ZBORNİK RADOVA



**30. maj – 2. jun 2001. god.
Vrnjačka Banja**

Izdavač:

Srpsko veterinarsko društvo,
Fakultet veterinarske medicine,
11000 Beograd
Bulevar JNA 18

Tehnička priprema:

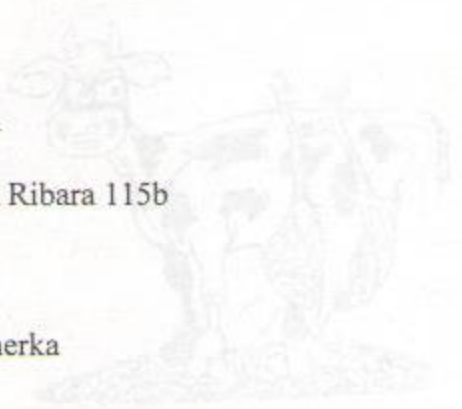
Dejan Smiljanić

Štampa:

JUNIOR
Beograd
Dr Ivana Ribara 115b

Tiraž:

150 primerka



12. Zora M. Mijačević, Snežana B. Bulajić: 85
 PRINCIPI INTEGRISANOG SISTEMA DETEKCIJE REZIDUA
 ANTIBIOTIKA I SULFONAMIDA U MLEKU – KONTROLA
 POJEDINAČNOG MLEKA
13. Predrag D. Puđa: 95
 UTICAJ MASTITISA NA TOK PROIZVODNJE I KVALITET
 SIREVA
14. J. Bosnakovski, D. Mitrov, I. Naletoski, M. Danev, M. Panevska: 99
 DETECTION OF BRUCELLA ANTIBODIES IN SERUM AND
 MILK FROM RUMINANTS USING ELISA
15. Radoslava Savić-Radovanović: 107
 PROMENA POPULACIJE *Staphylococcus aureus* U SIROVOM
 MLEKU
16. S. Boboš, Branka Vidić: 113
 INFEKCIJE VIMENA KRAVA SA *Staphylococcus aureusom* I
 NJIHOV UTICAJ NA KOLIČINU IZLUČENOG MLEKA
17. Z. Sabo, P. Kulešević, J. Kakonji, Lj. Pušin: 119
 NALAZ KOAGULAZA POZITIVNIH STAFILOKOKA U
 ODNOSU NA BROJ SOMATSKIH ČELIJA U SIROVOM MLEKU
 NA PODRUČJU VSI "SUBOTICA" U PERIODU 1998.-2000.
 GODINE
18. M. Adamović, G. Grubić, Lj. Stoićević, S. Nešić, P. Nikolić, 125
 O. Adamović:
 DOPRINOS DODATAKA OBROCIMA KRAVA POVEĆANJU
 PROIZVODNJE I KVALITETU MLEKA
19. Mila Savić, Ružica Trailović, S. Jovanović, V. Dimitrijević: 141
 KONTROLA MASTITISA U ORGANSKOM UZGOJU GOVEDA
20. Vera Katić: 147
 DEFINICIJA I DIJAGNOSTIKA MASTITISA
21. Ljiljana Suvajdžić, Dubravka Milanov, M. Lalić, D. Bugarški, I. 155
 Pušić:
 ZNAČAJ DVOSTRUKOG CAMP TESTA, ESKULINA I
 RESTRIKTIVNIH PODLOGA U DIJAGNOSTICI BAKTERIJSKIH
 UZROČNIKA MASTITISA
22. M.M. Petrović, Mr. R. Ignjatović, Z. Raičević, G. Stojanović, S. 161
 Mančić, D. Vidanović, I. Petreski:
 SISTEMATSKO OTKRIVANJE I SUZBIJANJE SUBKLINIČKIH
 MASTITISA IZAZVANI STREPTOCOCCUS AGALACTIAE I
 STAPHYLOCOCCUS AUREUS U 2000. GODINI NA NIŠKOM I
 JUŽNOMORAVSKOM EPIZOOTIOLOŠKOM PODRUČJU

PROMENA POPULACIJE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* U SIROVOM MLEKU

Radoslava Savić-Radovanović
Katedra za higijenu i tehnologiju animalnih proizvoda,
Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Praćena je promena populacije *S. aureus* u sirovom mleku. *S. aureus* je izolovan iz 5 uzoraka jutarnjeg mleka, 5 uzoraka večernjeg mleka i 2 uzorka mesanog mleka. Populacija *S. aureus* u uzorcima jutarnjeg mleka kretala se od 2,38 log cfu/ml do 3,31 log cfu/ml. Sa udaljavanjem od muže broj *S. aureus* se uvećavao i u uzorcima večernje muže se kretao od 3,67 log cfu/ml do 5,89 log cfu/ml. Populacija *S. aureus* u mešanom mleku je bila zastupljena sa 5,69 log cfu/ml i u mešanom mleku u momentu podsiravanja sa 5,78 log cfu/ml. Poreklo *S. aureus* u mleku je iz mlečne zlezde, jer su bakteriološkim pregledom mleka na uzročnike mastitisa dokazane koagulaza pozitivne stafilokoke u po dve četvrti vimena krava od kojih je dobijano mleko.

Uvod

S. aureus je uslovno patogen mikroorganizam, koji kao ubikvitaran mikroorganizam živi na koži čoveka i životinja. Ovaj mikroorganizam je tipičan mezofil, jer je optimalna temperatura pri kojoj se razmnožava 37° C, ali može da raste pri širokom rasponu temperature 7-48° C (1), pri pH od 4,2-9,3 (optimalan rast pri 7,0-7,5) (2). Sa aspekta higijene namirnica značaj *S. aureus* se ogleda u tome što ovaj mikroorganizam može da stvara termostabilne enterotoksine, koji mogu da dovedu do alimentarnih intoksikacija ljudi, ako se konzumira namirnica u kojoj je prisutna dovoljna količina enterotoksina. Da bi se stvorila dovoljna količina enterotoksina uslov je da stafilokoke budu enterotoksogene i da su prisutne u velikom broju u namirnici (>10⁶ bakterijskih celija/ml/g) (1). Samo 10% koagulaza pozitivnih stafilokoka bovinog porekla ima sposobnost da stvara enterotoksine, dok 60-80% humanih izolata stvaraju enterotoksine (3). Kod zdravih ljudi ovaj mikroorganizam može da se izoluje sa sluzokože nosa, grla i inficiranim ranama i prema podacima 25-50% humane populacije su mogući nosioci *S. aureus*. Najvažniji rezervoar ovog mikroorganizma je inficirana mlečna žlezda muznih životinja, a ona se uglavnom inficira sa kože vimena. Najnovija literatura pokazuje da je 0,2% do 17,6% četvrti vimena krava inficirano sa *S. aureus* (3). Sirovo mleko može da bude kontaminirano ovim mikroorganizmom direktno iz vimena, ili indirektno u toku muže sa ruku mužača, kože vimena, opreme za mužu i u toku transporta. Rasprostranjenost stafilokoka po koži krava muzara i prisutnost u/i oko vimena ima za posledicu da se pri muži praktično ne može izbeći kontaminacija ovim mikroorganizmom. Kostić (4) je pregledom mleka pojedinih četvrti vimena od 1.365

krava izolovala *S. aureus* iz 4,35% četvrti. Isti autor (4) je pregledom 352 uzoraka zbirnog mleka dokazala *S. aureus* u 46 (13,06%) uzoraka od kojih je u 82% *S. aureus* bio poreklom iz vimena. Sabo i saradnici (5) su u toku kontrole higijenske ispravnosti mleka pri predaji u sabirnoj stanici i stavljanja u promet na pijace od 2.825 uzoraka sirovog mleka dokazali u 416 (14,72%) uzoraka koagulaza pozitivne stafilokoke. Veliki broj podataka iz širokih eksperimentalnih istraživanja pokazuje da uzorci sirovog mleka sadrže manji, ili veći broj *S. aureus*. Tako Bijker i saradnici (6), Dack (7), Masson (8), Santos i saradnici (9) navode da broj *S. aureus* u sirovom mleku može da iznosi preko 4 log cfu/ml. Rezultati istraživanja Mijačević (10) pokazuju da kontaminacija uzoraka zbirnog mleka iz cisterni iznosi 10^2 - 10^3 /ml. Adesiyun i saradnici (11) navode da se broj *S. aureus* u zbirnom mleku sa farmi kretao od $5,9 \times 10^3$ do $1,2 \times 10^5$ cfu/ml, a u mleku pomuženom iz vimena od $2,4 \times 10^3$ do 3×10^4 cfu/ml. Gostović i Prusac (12) su dokazale koagulaza pozitivne stafilokoke u 80% ispitanih uzoraka zbirnog mleka iz cisterni tokom meseca aprila i 20% uzoraka tokom septembra. Stafilokokni mastitisi, odsustvo higijene u praksi na farmama, transportnim sredstvima (cisternama), proizvodnim pogonima kao i izostanak kontinuiranog lanca hlađenja mleka naročito tokom letnjih meseci su značajni faktori koji doprinose visokoj prevalenci *S. aureus* u sirovom mleku (13). Budući da veliki broj podataka iz eksperimentalnih istraživanja pokazuje da uzorci sirovog mleka sadrže manji, ili veći broj *S. aureus* cilj ovog rada je bio da se ispita promena populacije *S. aureus* u uzorcima sirovog mleka u zavisnosti od vremena proteklog od muže, temperature ambijenta, uzorka i pH mleka.

Materijal i metode rada

Uzorcima mleka: Uzorci mleka su uzimani tokom leta aseptično u domaćinstvu od dve krave, koje se dva puta dnevno muzu. Uzorci sirovog mleka od jutarnje muže uzimani su najkasnije 45 minuta posle obavljene muže, a pre mešanja sa mlekom od večernje muže. Uzorci mleka večernje muže su uzimani ujutro, 12 h posle obavljene muže, istovremeno kada i uzorci jutarnje muže. Mleko posle večernje muže je preko noći hlađeno na temperaturu ambijenta i čuvano u za to namenjenoj prostoriji i spajano sa mlekom dobijenim jutarnjom mužom. Uzorci mešanog mleka su uzeti posle spajanja mleka jutarnje i večernje muže (2 h posle jutarnje muže) i u momentu dodavanja sirila (1 h posle spajanja jutarnjeg i večernjeg mleka). Svi uzorci su nakon uzorkovanja rashlađivani na temperaturu do 4 °C i u ručnom frižideru transportovani do laboratorije gde je odmah započinjana analiza.

Izolovanje *S. aureus* iz mleka: Izolovanje *S. aureus* je vršeno zasejavanjem po 0,1 ml iz decimalnih razblaženja mleka na površinu Baird-Parker agara (Torlak). Decimalna razblaženja su pravljena od 20 ml mleka i 180 ml sterilnog fiziološkog rastvora. Baird-Parker podloga je inkubisana 24-48 h pri 37° C. Karakteristične kolonije su identifikovane na osnovu morfoloških osobina i koagulaza testa.

Bakteriološki pregled mleka na uzročnike mastitisa: Vršen je zasejavanjem mleka na krvni agar (5% krvi), koji je inkubisan 24-48 h pri 37° C. Kolonije su identifikovane na osnovu morfoloških osobina, katalaza testa, hemolize i koagulaza testa.

pH vrednost: Merenje pH vrednosti je vršeno pomoću digitalnog pH-metra (Iskra-Kranj, MA 5735).

Rezultati i diskusija

Rezultati promene populacije *S. aureus* u mleku jutarnje muže u zavisnosti od vremena uzorkovanja, temperature ambijenta i pH prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Promena populacije *S. aureus* u mleku jutarnje muže

Oznaka uzorka	Vreme od završetka muže (min)	Temperatura ambijenta (°C)	Temperatura mleka (°C)	<i>S. aureus</i> (log cfu/ml)	pH
1	30	12	34	2,38	6,58
2	40	14,9	34	2,90	6,64
3	35	15,5	36	3,31	6,60
4	45	21	36	3,21	6,56
5	5	25	36,5	3,23	6,53

Iz prikazanih rezultata se može zapaziti da se temperatura ambijenta, u vreme jutarnje muže kretala od 12° C do 25° C, a temperatura uzoraka od 34° C do 36,5° C. Populacija *S. aureus* se kretala od 2,38 log cfu/ml do 3,31 log cfu/ml, a pH vrednost od 6,53 do 6,64. Najveći broj *S. aureus* 3,31 log cfu/ml bio je u uzorku 3, kada je uzorak uzet 35 minuta posle muže i pri temperaturi ambijenta od 15,5° C. Najmanji broj *S. aureus* je zabeležen u uzorku 1 (2,38 log cfu/ml), koji je uzet 30 minuta posle muže pri najnižoj zabeleženoj temperaturi ambijenta od 12° C.

Rezultati promene populacije *S. aureus* u mleku večernje muže u zavisnosti od temperature ambijenta i pH prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2. Promena populacije *S. aureus* u mleku večernje muže

Oznaka uzorka	Temperatura ambijenta (°C)	Temperatura mleka (°C)	<i>S. aureus</i> (log cfu/ml)	pH
1	12	13	3,67	6,58
2	15,5	18,5	5,81	6,64
3	18	22	5,15	6,60
4	21	18	4,84	6,56
5	25	20	5,89	6,53

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 2 se zapaža da se temperatura ambijenta, prostorije u kojoj je čuvano mleko posle večernje muže, kretala od 12° C do 25° C. Pri ovim uslovima temperature ambijenta, iako je mleko čuvano preko noci, temperatura uzoraka mleka je bila visoka i kretala se od 13 °C do 22 °C. Populacija *S. aureus* u mleku večernje muže se kretala od 3,67 log cfu/ml do 5,89 log cfu/ml. Najveći broj *S. aureus* je bio u uzorku 5, koji je uzorkovan pri najvišoj temperaturi ambijenta od 25° C,

Mastitis i kvalitet mleka

temperaturi uzorka od 20° C i pH vrednosti 6,58. Najmanji broj *S. aureus* je zabeležen u uzorku broj 1, koji je uzet iz ambijenta sa najniže zabeleženom temperaturom od 12° C.

Rezultati određivanja broja *S. aureus* u mešanom mleku tokom proizvodnje belog sira prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3. Promena populacije *S. aureus* u mešanom mleku tokom proizvodnje belog sira

Vrsta uzorka	Temperatura ambijenta (°C)	Temperatura mleka (°C)	<i>S. aureus</i> * (log cfu/ml)	pH*
mleko (jutarnje+večernje)	21,5	25	5,69	6,80
mleko (podsiravanje)	22	25	5,78	6,69

* rezultati su srednja vrednost tri merenja

Iz podataka prikazanih u tabeli 3 se vidi da je populacija *S. aureus* bila prisutna i u uzorcima mešanog mleka, koje je korišćeno za proizvodnju belog sira. Temperatura ambijenta (22° C) i uzoraka (25° C) je bila visoka i pri toj temperaturi su postojali uslovi za umnožavanje populacije *S. aureus*. Dobijeni rezultati se slažu sa nalazima nekih autora (6, 7, 8, 9), dok se razlikuju od rezultata, koje su dobili Mijačević (10) i Stojanović (14).

Populacija *S. aureus* je bila manja u uzorcima mleka jutarnje muže u odnosu na vrednosti zabeležene u mleku večernje muže i mešanog mleka. Ovi rezultati se mogu objasniti time da su uzorci od jutarnje muže uzeti u okviru baktericidne faze mleka pri čemu je populacija ovog mikroorganizma bila najmanja u uzorku uzorkovanom pri najnižoj zabeleženoj temperaturi ambijenta (12° C). Sa udaljavanjem od muže populacija *S. aureus* se uvećavala, jer su uslovi (temperatura, pH, hranljive materije) pogodovali umnožavanju. Temperatura ambijenta i uzoraka je uticala na umnožavanje populacije *S. aureus* u uzorcima mleka večernje muže. Pri nižoj temperaturi ambijenta mleko je brže rashlađivano, tako da je usporen proces umnožavanja populacije *S. aureus*, pa je i najmanji broj ovog mikroorganizma (3,67 log cfu/ml) zabeležen u uzorku sa najnižom temperaturom ambijenta (12° C). Uticaj pH na populaciju *S. aureus* u mleku nije bio značajan, jer nije došlo do njegovog snižavanja do vrednosti, koja bi delovala inhibitoryno. Međutim, iako je došlo do uvećanja populacije *S. aureus* u sirovom mleku pri ovim vrednostima pH i temperature nisu postojali uslovi za stvaranje enterotoksina.

S obzirom da su bakteriološkim pregledom mleka na uzročnike mastitisa dokazane koagulaza pozitivne stafilokoke u po dve četvrti vimena krava od kojih je dobijano mleko poreklo *S. aureus* u sirovom mleku je iz mlečne žlezde. Ovome govori u prilog i β hemoliza na krvnom agaru, koju pretežno daju izolati poreklom od životinja.

Zaključak

S. aureus je dokazan u svih 12 ispitanih uzoraka sirovog mleka. *S. aureus* se umnožavao tokom čuvanja mleka. Populacija *S. aureus* se uvećala od 2,38 log cfu/ml-3,31 log

cfu/ml u uzorcima jutarnje muže do 3,67 log cfu/ml-5,89 log cfu/ml mleka večernje muže. Populacija *S. aureus* u mešanom mleku je bila zastupljena sa 5,69 log cfu/ml i u mesanom mleku u momentu podsiravanja sa 5,78 log cfu/ml.

Na promenu populacije *S. aureus* u sirovom mleku je uticalo vreme uzorkovanja, temperatura ambijenta i uzoraka. Najmanji broj *S. aureus* je bio u uzorcima mleka jutarnje muže uzetim u okviru baktericidne faze i to u uzorku uzetom pri najnižoj a temperaturi ambijenta (12° C). Najveći broj *S. aureus* je bio zabeležen u uzorku mleka večernje muže uzetom pri najvišoj temperaturi ambijenta (25° C) i visokoj temperaturi uzorka (20° C). Populacija ovog mikroorganizma se nije smanjila u uzorcima mešanog mleka, jer su temperatura ambijenta i uzoraka bile visoke (iznad 20° C). Na smanjenje populacije *S. aureus* bi se moglo uticati redovnom kontrolom zdravstvenog stanja muznih životinja, higijenom tokom muže i adekvatnim postupkom sa mlekom posle muže u smislu dodatnog rashlađivanja na temperaturu ispod 8° C.

Literatura

1. Adams M.R. and Moss, M.O.: Food Microbiology, The Royal Society of Chemistry, University of Surrey, GU, UK, 206. 1995.
2. Bergdoll M.S.: *Staphylococcus aureus*. In: M.P. Doyle (Ed.) Foodborne Bacterial Pathogens, Marcel Dekker Inc., New York, 463-523. 1989.
3. Stojanovi L., Katić Vera: Higijena mleka, Naučna knjiga komerc, Beograd, 145-146, 162. 1998.
4. Kostić Gordana: *Staphylococcus aureus* kao pokazatelj higijene u proizvodnji i preradi mleka. Magistarski rad, Veterinarski fakultet, Beograd. 1985.
5. Sabo Z., Molnar Olga, Kakonji J.: Nalaz koagulaza pozitivnih stafilokoka u sirovom mleku na području V.S.I. "Subotica" u periodu 1995-1999. Zbornik kratkih sadržaja radova VIII Kongresa mikrobiologa Jugoslavije, Vrnjačka Banja, 187. 2000.
6. Biyker, P.G.H., Mol, H. and Vincente, H.M.: An investigation of the occurrence of staphylococci in raw milk. Tijdschrift voor Diegeneeskunde, 101, 365-371. 1976.
7. Duck: Citat po Stojanoviću L.: Uticaj ekoloških činilaca na dinamiku stvaranja i održivost stafilokoknih enterotoksina u mlečnim proizvodima. Doktorska disertacija, Veterinarski fakultet, Beograd, 1980.
8. Masson, A.: Hygienic quality of the Swiss cheese Vacherin Mont d' Or. Lait, 57 (565-566), 271-277. 1977.
9. Santos, E.C. Gengigeorgis C., Ferver T.B.: Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of Brazilian Minas cheese. Journal of Food Protection, 44, 3, 172-176. 1981.
10. Mijačević Zora: Biohemijska aktivnost stafilokoka u mleku pri različitim tehnološkim uslovima obrade i prerade mleka. Doktorska disertacija, Veterinarski fakultet, Beograd. 1983.
11. Adesiyun, A.A., Webb L.A. and Romain H.T.: Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. Journal of Food Protection, 61, 5, 629-632. 1998.

12. Gostović Gordana i Prusac Ljiljana: Neki aspekti higijenske ispravnosti zbirnog mleka u odnosu na higijensko stanje cisterni za prevoz mleka. Veterinarski glasnik, Vo 50, 5-6, 409-413. 1996.
13. Santos E.C., Gengigeorgis C.: Survival and growth of *Staphylococcus aureus* in commercially manufactured Brazilian Minas cheese. Journal of Food Protection, 44, 3, 177-184. 1981.
14. Stojanović L.: Uticaj ekoloških činilaca na dinamiku stvaranja i održivost stafilokoknih enterotoksina u mlečnim proizvodima. Doktorska disertacija, Veterinarski fakultet, Beograd. 1980.