

STAFILOKOKE U MLEKU I PROBLEMI KONTROLE MLEKA U PROMETU

Dr Zora MIJAČEVIĆ, prof. dr Višeslava MILJKOVIĆ,
Veterinarski fakultet, Beograd

S a ž e t a k

Osnova problema stafilokoka pri kontroli mleka proizlazi iz visoke frekvencije nalaza koagulaza pozitivnih stafilokoka u mleku (6, 7, 8), srazmerno česte enterotoksičnosti (2, 3, 5) izolovanih sojeva i termostabilnosti enterotoksina. Za nastajanje trovanja ljudi enterotoksičnim stafilokokama potreban je visok broj stafilokoka koji se stvara u neodgovarajućim uslovima čuvanja i transporta mleka.

Čuvanjem mleka ohlađenog odmah posle dobijanja na 4°C i 10°C TN-aza i enterotoksin nisu dokazani u intervalu od 48 časova, ni pri visokim početnim populacijama stafilokoka. Čuvanjem mleka 9 časova na 25°C enterotoksin i TN-aza su pozitivni. U mleku hlađenom 5 časova posle muže TN-aza se dokazuje posle 24 i 36 časova u zavisnosti od početne kontaminacije. Iz iznetih rezultata može se zaključiti da pri nepravilnoj primarnoj obradi mleka postoje uslovi za stvaranje dovoljnih količina enterotoksina koje mogu izazvati trovanja kod ljudi. TN-aza testom mogu se otkriti uzorci u kojima je enterotoksin na nivou detekcije.

Uvod

U nizu uzroka higijensko zdravstvene neispravnosti mleka u prometu nalaz stafilokoka zaslužuje posebnu pažnju. Razlog za to je što predstavnik ovog roda *Staph. aureus*, ili u široj definiciji koja je prihvaćena i propisima, koagulaza pozitivnih stafilokoka mogu da stvaraju enterotoksine (1, 2, 3, 4, 5). Osnova problema stafilokoka pri kontroli mleka proizlazi iz visoke frekvencije nalaza koagulaza pozitivnih stafilokoka u mleku (6, 7, 8), srazmerno česte enterotoksigenosti (2, 3, 5) izolovanih sojeva, termostabilnosti enterotoksina, bolje i duže održivosti enterotoksina u mleku i proizvodima od mleka od sojeva koji su proizveli enterotoksine i drugih činioca (3).

Propisima o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica mleko je neupotrebljivo i posle termičke obrade ako sadrži koagulaza pozitivne stafilokoke u 0,01 ml (Sl. list SFRJ br. 2/80 i 25/81). Veterinarskim propisima mleko krava obolelih od subkliničkog mastitisa izazvanog *Staph. aureusom* je neupotrebljivo (Sl. list SFRJ 48/78). Iz ovog kratkog izvoda propisa vidi se da su preduzete mere zaštite čoveka od štetnog dejstva stafilokoka u mleku. Pa ipak, pod pretpostavkom da se one slede, u kontroli postoji rizik u slučaju da su stafilokoke dokazane, a mleko otišlo u promet. Ovo je najrealnija pretpostavka jer se u

praksi mleko većeg broja proizvođača meša (9) i tako mu se gubi trag potreban za identifikaciju i isključenje iz prometa u slučaju potrebe.

Prema našem mišljenju bilo bi neophodno da se u propisima kojima se definiše postupak sa mlekom u slučaju kontaminacije stafilokokama nađe metod za brzu detekciju sumnje na prisustvo enterotoksina. Najrealnija bi bila primena TN-aze jer prema podacima u literaturi (4, 10, 11, 12 i 13) ovaj enzim je prisutan u populacijama stafilokoka pri kojima je enterotoksin na nivou mogućnosti detekcije, odnosno njegovog potencijalnog izazivanja trovanja ljudi. Razlog za uvođenje ovog testa potkrepljuju podaci iz literature (3, 11) da enterotoksin može da bude prisutan i posle propadanja ćelija koagulaza pozitivnih stafilokoka, tj. pri negativnom bakteriološkom nalazu stafilokoka.

Poseban problem u kontroli mleka, kada su stafilokoke u pitanju, predstavlja činjenica da su izvori kontaminacije mleka mnogobrojni, pa samim tim i nalaz koagulaza pozitivnih stafilokoka u mleku veoma čest. Dosledno sprovođenje propisa izazvalo bi konfiskaciju velikih količina mleka, a s tim u vezi ekonomske štete i značajna pomeranja u snabdevanju tržišta mlekom.

Stoga smo u vezi sa izloženim problemima izučavali uslove razmnožavanja stafilokoka u mleku, jer je za stvaranje enterotoksina potrebno da broj stafilokoka iznosi najmanje 10^6 /ml mleka, odnosno druge hranjive sredine.

Ako u mleku nema uslova da se taj nivo postigne onda bi propise trebalo promeniti u smislu toga da je mleko posle termičke obrade neupotrebljivo pri kontaminaciji sa 0,01/ml samo ako postoji opravdana sumnja da se enterotoksin mogao da stvori. To bi se proverilo određivanjem obima kontaminacije i dokazom indirektnog pokazatelja enterotoksina tj. TN-aze.

Način rada

Razmnožavanje *Staph. aureus* u mleku pratili smo pri temperaturama hlađenja mleka koje su utvrđene propisima (4°C i 10°C) i pri 25°C tj. temperaturi nehlađenog mleka koja se najčešće utvrđuje. Obzirom da na nivo populacije stafilokoka u hranjivim sredinama utječe i početni broj ćelija, posmatranja razmnožavanja stafilokoka su obavljena pri početnom broju 10^2 , 10^3 i 10^5 /ml.

Stvaranje TN-aze u mleku i enterotoksina rađeno je u mleku držanom na različitim temperaturama koje u primarnoj proizvodnji mleka nastaju pri pravilnoj i nepravilnoj obradi (4, 10, 15, 20, 25 i 30°C). Nivo kontaminacije stafilokokama je varirao od 10^2 do 10^5 /ml.

Ispitivanje TN-aze je rađeno prema Internacionalnom standardu 83:1978.

Dokazivanje enterotoksina je rađeno serološkom metodom-gel imunodifuzijom, metodom po W a d s v o r t h - u.

Određivanje broja stafilokoka u mleku je rađeno na B a i r d - P a r k e r agaru.

Rezultati i diskusija

Rezultati ispitivanja porasta *Staph. aureus* pri različitoj temperaturi prikazani su na tabeli 1.

Tablica 1.

Razmnožavanje stafilokoka u mleku pri različitim temperaturama čuvanja

Početni nivo kontaminacije <i>Staph. aureus/ml</i>	Temperatura čuvanja mleka	Čuvanje mleka u intervalu (h)			
		0	3	6	9
10 ²	4°C	5,0×10 ²	3,0×10 ³	3,0×10 ²	3,0×10 ²
10 ³		6,0×10 ³	6,0×10 ³	6,5×10 ³	6,4×10 ³
10 ⁵		4,9×10 ⁵	4,9×10 ⁵	4,8×10 ⁵	5,0×10 ⁵
10 ²	10°C	3,0×10 ²	3,2×10 ²	3,4×10 ²	3,9×10 ²
10 ³		6,0×10 ³	6,0×10 ³	6,5×10 ³	8,5×10 ³
10 ⁵		5,5×10 ⁵	5,5×10 ⁵	7,0×10 ⁵	9,5×10 ⁵
10 ²	25°C	2,5×10 ²	5,0×10 ²	2,0×10 ³	1,0×10 ⁴
10 ³		3,5×10 ³	6,0×10 ³	4,1×10 ⁴	5,2×10 ³
10 ⁵		1,5×10 ⁵	6,0×10 ⁵	5,0×10 ⁶	1,5×10 ⁷⁺

Legenda: + = dokazan enterotoksin

Prema ovako dobijenim podacima pri temperaturi 4° i 10°C u intervalu do 9 časova populacija stafilokoka ne dostiže broj potreban da se stvore količine enterotoksina koje se mogu dokazati. Enterotoksin pri ovim temperaturama nije dokazan ni posle 48 časova inkubacije.

Pri temperaturi 25°C enterotoksin je dokazan u mleku posle 9 časova, ali samo pri početnoj kontaminaciji 10⁵/ml.

Iz ovog proizilazi da je za stvaranje enterotoksina u mleku-pored temperature — značajan i obim kontaminacije stafilokokama.

U uslovima primarne obrade mleka koji su česti kod individualnih proizvađača mleko se posle muže ne hladi već se u različitom vremenskom intervalu predaje sabirnom mestu gde se uključuje u proces hlađenja. Utjecaj ovakve nepravilne primarne obrade mleka na razmnožavanje stafilokoka i stvaranje produkata metabolizma koji su indikativni za enterotoksin prikazano je u tablici 2.

Tablica 2.

Razmnožavanje stafilokoka u nepravilno hlađenom mleku

Vremenski interval hlađenja sati	Broj stafilokoka/ml mleka			
	Oznaka uzorka			
	I	II	III	IV
0	4×10 ³	2×10 ³	5,2×10 ⁵	4,4×10 ⁵
20	1,8×10 ⁴	2,9×10 ⁴	3,3×10 ⁶	2,3×10 ⁶
24	6,1×10 ⁴	9,4×10 ⁴	2,9×10 ⁶	6,0×10 ^{6x}
36	3,6×10 ⁴	9,8×10 ⁴	3,1×10 ^{6x}	3,4×10 ^{6x}
48	8,8×10 ⁴	1,4×10 ⁵	7,9×10 ^{6x}	1,0×10 ^{7x}

Legenda: x = dokazana TN-aza

Iz tablice se uočava da se stafilokoke razmnožavaju u intervalu do 48 časova i da je povećanje broja ovih mikroorganizama najintenzivnije u prvih 10 časova što ukazuje na značaj početka hlađenja mleka. Uzorci mleka sa višom početnom kontaminacijom stafilokoka u uslovima nepravilnog hlađenja posle 24 i 36 časova stvaraju TN-azu koja je indikativna za enterotoksin.

Mogućnost otkrivanja stafilokoknog enterotoksina prethodnim dokazivanjem TN-aze prikazano je u tablici 3.

Tablica 3.

Dokazivanje enterotoksina i TN-aza stafilokoka u mleku čuvanom pri različitim temperaturama

Temperatura mleka	Nivo kontaminacije stafilokoka	Vreme inkubacije u časovima			
		0	3	6	9
4°C	10 ³ /ml	6,0×10 ³	4,1×10 ³	2,0×10 ³	2,0×10 ³
	10 ⁵ /ml	1,5×10 ⁵	1,5×10 ⁵	1,0×10 ⁵	2,1×10 ⁵
10°C	10 ² /ml	4,0×10 ²	4,0×10 ²	4,2×10 ²	8,0×10 ²
	10 ³ /ml	6,0×10 ³	6,0×10 ³	6,5×10 ³	8,5×10 ³
	10 ⁵ /ml	6,5×10 ⁵	5,5×10 ⁵	7,0×10 ⁵	9,5×10 ⁵
15°C	10 ² /ml	2,0×10 ²	3,5×10 ²	4,5×10 ²	3,0×10 ²
	10 ⁴ /ml	2,0×10 ⁴	3,5×10 ⁴	3,5×10 ⁴	3,5×10 ⁴
20°C	10 ² /ml	2,5×10 ²	5,5×10 ²	5,5×10 ²	1,5×10 ³
	10 ⁴ /ml	2,0×10 ⁴	6,7×10 ⁴	6,6×10 ⁴	1,5×10 ⁵
25°C	10 ² /ml	2,5×10 ²	5,0×10 ²	2,0×10 ³	1,0×10 ⁴
	10 ³ /ml	3,5×10 ³	6,0×10 ³	4,1×10 ⁴	5,2×10 ⁵
	10 ⁴ /ml	2,0×10 ⁴	7,0×10 ⁴	1,8×10 ⁵	1,5×10 ^{6*}
	10 ⁵ /ml	1,5×10 ⁵	6,0×10 ⁵	5,0×10 ^{6*}	1,5×10 ^{7**}
30°C	10 ² /ml	2,5×10 ²	8,0×10 ²	4,5×10 ⁴	5,6×10 ^{6*}
	10 ⁴ /ml	2,5×10 ⁴	3,4×10 ⁵	1,2×10 ^{6*}	9,0×10 ^{7**}

Legenda: * = dokazana TN-aza

Legenda: † = dokazan enterotoksin

TN-aza i enterotoksin se ne stvaraju u mleku čuvanom 9 časova na 4°C. Na temperaturama 10,15 i 20°C povećanje populacije stafilokoka zavisi od početnog nivoa i u ispitivanom intervalu (9 časova) ne dostiže nivo na kome se dokazuju TN-aza i enterotoksin. U uzorcima mleka čuvanim 9 časovima na 25°C TN-aza i enterotoksin se dokazuju u zavisnosti od početne kontaminacije stafilokokama.

TN-aza se dokazuje u uzorcima mleka posle 9 časova pri početnoj kontaminaciji 10⁴ ili već posle 6 časova pri početnoj kontaminaciji 10⁵ stafilokoka/ml. Enterotoksin je dokazan u uzorcima mleka kontaminiranim 10⁵ stafilokoka/ml posle 9 časova. Držanjem mleka na 30°C TN-aza se dokazuje posle 6 i 9 časova ako je početna kontaminacija iznosila 10² i 10⁴/ml stafilokoka. Enterotoksini se dokazuju posle 9 časova u uzorcima mleka sa početnom kontaminacijom 10⁴ stafilokoka/ml.

U pravilno ohlađenom mleku nema uslova za nastajanje visoke populacije stafilokoka pa s tim u vezi ni stvaranja enterotoksina, što predstavlja efikasnu meru zaštite od trovanja ljudi enterotoksinima stafilokoka.

Na prijemnoj rampi u mlekari nemoguće je utvrditi prethodne uslove u kojima se nalazilo mleko, pa je stoga potrebno brзом kontrolom izdvojiti uzorke sumnjive na prisustvo enterotoksina. Da bi se poboljšala kontrola mleka potrebno je u mleku utvrditi prisustvo TN-aze, jer bi se na taj način povećala zaštita potrošača od konzumiranja mleka koje sadrži enterotoksin.

Zaključci

Hlađenjem mleka posle muže na 4°C i 10°C ne nastaje intenzivno povećanje populacije stafilokoka zbog čega ni enterotoksin nije dokazan.

U nepravilno hlađenom mleku pri različitim vremenskim intervalima (24—36^h) stižu se uslovi za razmnožavanje stafilokoka i nastajanje dovoljnih količina enterotoksina koji se mogu dokazati.

Primenom TN-aze testa postiže se efikasna mera zaštite potrošača od trovanja stafilokoknim enterotoksinima, jer se ovim testom otkrivaju uzorci mleka u kojima je nastala visoka populacija stafilokoka, a s tim u vezi i stvaranje enterotoksina.

Summary

A basic problem dealing with the control of milk refers to the high frequency by which the coagulase of the positive staphylococci is found in milk (6, 7, 8) as related to the enterotoxigenicity (2, 3, 5) of the isolated strains and the thermolability of enterotoxins. A high count of staphylococci is necessary to get people poisoned by enterotoxic staphylococci which use to grow under inadequate milk storage and transport conditions.

By storing milk cooled down to 4°C, and 10°C just after it was milked, no TN-ase and enterotoxin were recorded within 48 hours, even not in cases when a high initial population of staphylococci was observed. By storing milk for 9 hours at 25°C the enterotoxins and TN-ase were positive. In milk, cooled for 5 hours after milking, a TN-ase was observable after 24 and 36 hours dependent on the value of the initial contamination. From the results presented the conclusion can be drawn that an incorrect processing of milk help to create conditions favouring formation of a sufficient quantity of enterotoxins capable of getting people poisoned. By a TN-ase test it was possible to screen out samples indicative of enterotoxins the quantity of which was recorded on the detection level.

Literatura

- MAHMOUD, S. A. Z., SABBOUR, M. M. NAGUIB N., HAZAM, A. i SHARAF, O. M., 1980: Archiv f. Lebensmittelhyg. 31 (1) 5—6.
- BERGDOLL, M. S., 1970: Enterotoxin p.p. 265—326. In T. C. MANTIĆ, S. KADIĆ and S. J. AYL (ed) Microbiol. Toxins. Vol. 3, Academic Press, New York and London.
- STOJANOVIĆ L., 1980: Uticaj ekoloških činilaca na dinamiku stvaranja i održivost stafilokoknih enterotoksina u mlečnim proizvodima, doktorska disertacija, Beograd.

- NISKANEN, A., KOIRANEN, L., ROINE, K., 1978: *Infection and Immunity* 19 (2) 493—498.
- LOMBAI, G., JANOSI, L., KATONA, F., MAJOR, P., MILCH, H., ORNAJ, L., TAKACS, J., 1980: *Archiv f. Lebensmittelhyg.* 31 (6) 206.
- GLIŠOVIĆ, B., STANKOVIĆ JELENA, RUDIĆ RAJNA, KOSANOVIĆ, M., 1979: II Jugoslavenski simpozijum o suzbijanju mastitisa krava, Šabac, 3—15.
- ILIĆ, M., OLUJIĆ MIROSLAVA, MILJKOVIĆ, V., ANBARI A. A., CERIĆ, S., JOVANOVIĆ, Z., 1979: II Jugoslavenski simpozijum o suzbijanju mastitisa krava, Šabac, 145—149.
- MARIĆ, J., MAJIĆ B., 1979: II Jugoslovenski simpozijum o suzbijanju mastitisa krava, Šabac, 47—71.
- MIJAČEVIĆ, Z., 1983: Biohemijska aktivnost stafilokoka u mleku pri različitim tehnološkim uslovima obrade i prerade mleka, doktorska disertacija, Beograd.
- LACHICA, R. V. F., GENIGEORGIS, C., HOEPRICH, P. D., 1971: *Appl. Microbiol.* 21: 585—587.
- PARK, C., EL DERE, H. B. RAYMAN, M. K., 1979: *Can. J. Microbiol.* 25, 44.
- VON SCHONWENBURG VON FOEKKEN, A. W. J., STANDHOUDERS, J., JANS, J. A., 1978: ***Netherlands Milk and Dairy Journal***, 32, 217—231.
- ZAADHOFF, K. J., 1978: *Archiv. f. Lebensmittelhyg.* 29 (4) 138.
- Internacionalni standard 83: 1978: ***Milchwissenschaft***, 34 (5) 292—294.
- Pravilnik o uslovima u pogledu mikrobiološke ispravnosti kojima moraju odgovarati namirnice u prometu (Sl. list SFRJ 2/80).
- Pravilnik o izmenama i dopunama Pravilnika o uslovima u pogledu mikrobiološke ispravnosti kojima moraju odgovarati namirnice u prometu (Sl. list 25/81).
- Pravilnik o načinu vršenja stalnog veterinarsko-sanitarnog pregleda životinja za klanje i proizvoda životinjskog porekla (Sl. list SFRJ 47/78).