

FIL/IDF - ref. S.I. 9405

Značaj patogenih mikroorganizama u sirovom mlijeku

G. Vlaemynck, Rijkszuivelstation, Brusselsesteenweg 370, 9090 Melle, Belgium

SALMONELLA

1. Uvod

Odavno su poznate pojave bolesti izazvanih hranom, a vezanih s rodom *Salmonella* i još su stalan problem kako u razvijenim zemljama tako i u Trećem svijetu (1). *Salmonella* je dobro poznat kontaminant peradi i proizvoda od peradi (jaja), mesa i mesnih proizvoda, mlijeka i mliječnih proizvoda. Većina trovanja hranom bila je izazvana zastupljenošću jaja i proizvoda peradi. Ipak, bilo je više pojava salmoneloza izazvanih mlijekom i mliječnim proizvodima. Istraživanja se nastavljaju i sve su brojniji podaci o tim mikroorganizmima. Naglašavala se brzina metoda za otkrivanje *Salmonella* u hrani (2,3).

2. Klasifikacija

Familija: *Enterobacteriaceae*

Rod: *Salmonella*

Rod *Salmonella* je podijeljen u takozvane "podrodove" Kauffmana. Sada se razlikuje sedam "podrodova" (I, II, IIIa, IIIb, IV, V i VI). Ipak ove "podrodove" valja genetički promatrati na razini subspecies, a takozvani rod "*Salmonella*" mora se stvarno klasirati kao jedan, različit rod. Ove podvrste se dalje dijele u serovarijante na temelju antigenih svojstava.

U pogledu nomenklature nazivi *Salmonella* vrste koriste se historijski da bi označili serovarijante *Salmonella*. Da bi bili ispravni, nazivi podvrsta moraju sadržati i oznaku serovara. Navode se nazivi podvrsta:

- Subspecies I: *Salmonella enterica* subsp. *enterica*
- Subspecies II: *Salmonella enterica* subsp. *salamae*
- Subspecies IIIa: *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*
- Subspecies IIIb: *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*
- Subspecies IV: *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*
- Subspecies V: *Salmonella enterica* subsp. *bongori*
- Subspecies VI: *Salmonella enterica* subsp. *indica*

Ipak, kako su ti "historijski" nazivi vrsta tako poznati, a u praksi je prikladnija skraćena oznaka, imena ovih vrsta su se zadržala za podvrste i serovare. Ona se više ne pišu kurzivom, a prvo je slovo veliko. Naziv podvrste ne treba označavati. Serovari i druge podvrste su označene samo njihovom antigenom formulom. Sada je poznato više od 2000 serovara *Salmonella*, a svake godine se njihov broj povećava.

3. Karakteristike

3.1. Morfologija i uzgajanje

Rod *Salmonella* sastoji od malih, Gram-negativnih štapića, koji ne stvaraju spore, a pod mikroskopom ili na običnim hranjivim tvarima se ne razlikuje od *E. coli*. Mogu se pojavljivati kao pokretni ili nepokretni sojevi s bičevima ili bez njih. Iako je većina *Salmonella* pokretna, jedan tip (*S. pullorum* ili *S. gallinarum*) je uvijek nepokretan.

Salmonella mogu na nizu hranjivih podloga proizvesti vidljive kolonije unutar 24 sata pri oko 37°C. Većina tipova stvara velike kolonije (promjer 2-4 mm), a neki tipovi obično stvaraju neobično male kolonije (promjer 1 mm).

Uvjeti rasta: *Salmonella* raste pri 35 - 37°C, ali ovisno o sojevima i hranjivoj podlozi ili drugim uvjetima, rast je moguć u rasponu od 5 do 47°C. Osim temperature važan je parametar rasta pH. Optimalna vrijednost je između 6,5 i 7,5, dok su baktericidne vrijednosti pH ispod 4,0 i iznad 9,0. Sojevi *Salmonella* obično su relativno osjetljivi na niske vrijednosti a_w (<0,94) i ne mogu podnositi visoke koncentracije soli (9%).

Različiti parametri rasta, na primjer pH, a_w , hranjiva i temperatura, uzajamno djeluju na *Salmonellae*, kao i na većinu bakterija. *Salmonellae* su fakultativno anaerobni organizmi.

3.2. Biokemija

Velika je biokemijska heterogenost unutar skupine *Salmonella*. Obično one ne mogu fermentirati saharozu i laktozu (uz iznimku *S. arizonae*). Većina proizvodi H₂S. One ne formiraju indol niti hidroliziraju ureu. Plin se obično proizvodi od glukoze (osim *S. typhi* i *S. gallinarum*), a citrat se obično koristi kao jedini izvor ugljika. Ove se karakteristike općenito koriste u standardnim metodama za otkrivanje *Salmonella*. Neke karakteristike razlikovanja "podrodova" i "sojeva" *Salmonella* navedene su u Tabeli 1.

3.3. Serologija

Nakon što se neki mikroorganizam identificira kao *Salmonella* biokemijskim testovima, može se dalje identificirati antigenom strukturom serološkim metodama. Zbog toga se određuju somatski (O) antigeni kulture kao flegelarni (H) antigeni te antigeni ovojnice (Vi). Postoje dva tipa H-antigena: specifične faze ili faze 1, te skupne faze ili faze 2. Svaki antigen posjeduje vlastitu genetski određenu specifičnost koja omogućuje korištenje antigenih modela za klasifikaciju prema slijedećoj shemi:

Skupina	Somatski antigeni "O"	Flagelarni antigeni "H"	
	Specifični antigeni	Specifični antigeni Faza I	Specifični antigeni Faza II
	mali arapski broj	mala slova	mali arapski brojevi i mala slova

Tabela 1: Karakteristike razlikovanja "podrodova" roda *Salmonella*

	"Subgenus"						
	I	II	III ^a	III ^b	VI	V ^b	VI
β-Galaktozidaza (ONPG test)	-	-	+	+	-	+	d
Proizvodnja kiseline od:							
Laktoze	-	-	-(75%)	+(75%)	-	-	d
Dulcitol	+	+	-	-	-	+	d
Mukata	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Galakturonata	-	+	-	+	+	+	+
Upotreba:							
Malonata	-	+	+	+	-	-	-
d-Tartrata	+	-	-	-	-	-	-
Hidroliza želatine (metoda sloja)	-	+	+	+	+	-	+
Rast u prisustvu KCN	-	-	-	-	+	+	-
Nalazište većine sojeva:							
Toplokrvne životinje	+	-	-	-	-	-	-
Hladnokrvne životinje i okoliš	-	+	+	+	+	+	+

^a Simboli +, pozitivno za 90% ili više sojeva za 1-2 dana;
d, različite reakcije dobivene različitim serovarima;
- pozitivno za 0-10% sojeva za 1-2 dana.

Temperatura je za sve reakcije 37°C.

^b le Minor, L. Véron, M. and Popoff, M. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur): 133B: 223-243 (1982).
Adaptirano iz le Minor, L. and Popoff, M. WHO Document, 1987 (4).

Na primjer *S. typhimurium* (1), 4, (5), 12 i 1,2. Razvijeni su i drugi sustavi tipiziranja sojeva srodnih *Salmonelli* za daljnji studij i diferenciranja epidemioloških karakteristika: biotipiziranje (biovari) tipiziranje faga

(fagovari), tipiziranje bakteriocina (proizvodnja i osjetljivost bakteriocina se uzima u obzir), uzimanje otisaka plasmida te sustav koji temelji na otpornosti prema antibioticima (2).

4. Otpornost i antibiotska sposobnost

4.1. Preživljavanje

Sa stanovišta javnog zdravstva valja uzeti u obzir dugotrajno preživljavanje salmonela u hrani, krmi, prašini u tvornicama proizvodnje hrane, drugim talozima, vodi i otpadnim vodama, koje onečišćuju ptice izmetom kao i muzara, peradi i drugih životinja.

Postoji mnogo podataka o dugotrajnom zadržavanju salmonela u uvjetima temperatura sredine u obranom mlijeku u prahu, te proizvodima od jaja. Tu se može navesti niz radova (2), naročito onih o mliječnim proizvodima. Salmonela može dugo preživljavati u različitim tipovima sira, do skladištenja i potrošnje. Salmonela su se mogle pronaći već u mlijeku u prahu skladištenom do 12 mjeseci u uvjetima sobne temperature (5) te u mlijeku i gorkoj čokoladi poslije 18 mjeseci (2). Ipak više temperature skladištenja umanjuju razdoblje preživljavanja (6). Općenito se može tvrditi da smanjenje broja živih salmonela ovisi posebno o sastavu proizvoda (pH, a_w , hranjiva...), tipu *Salmonella* i fiziološkom stanju stanica i temperaturi skladištenja.

4.2. Zamrzavanje

Smanjivanje broja salmonela zamrzavanjem je ograničeno. *Salmonellae* mogu preživljavati u zamrznutoj hrani tijekom dugih razdoblja. *S. Enteritidis* i *S. typhimurium* su izolirane iz sladoleda držanog 7 godina pri -23°C (7).

4.3. Otpornost prema toplini

Osjetljivost sojeva prema toplini bitno ovisi o uvjetu stanica i prirodi otopljene tvari. Ovisno o tome, zaštitni kapacitet mlijeka je, čini se, razmjerno velik. Sve se salmonela lako uništavaju pri temperaturama pasterizacije. Niz studija o otpornosti *Salmonella* prema toplini u sirovom tekućem mlijeku proveli su d' O u s t et al. (8). Najotporniji mutant *Salmonella* otporan prema toplini izoliran je iz jaja i označen kao *Salmonella senftenberg 775w*, S h r i m p t o n et al. (9) spominje smanjenje broja na $10^4 - 10^5$ zagrijavanjem 2,5 minute pri $64,4^{\circ}\text{C}$ cijelog jajeta u tekućini. N g et al. (10) su izvijestili

da je D-vrijednost tog soja 31 minuta pri 57°C, u usporedbi s 1,2 min za njegov referentni soj *S. typhimurium*, ta otpornost je opravdana samo pri visokom a_w (11).

4.4. *Otpornost prema antibiotiku*

Izmjena prilikom vezanja ili prenosa citoplazmatske DNA (R-plazmid) kodirana za jednostavnu ili multiplu otpornost prema antibiotiku je pojava do koje redovito dolazi između *Salmonella*. Uvijek se pokazivao genetski transfer otpornosti između *Salmonella* i drugih Gram-negativnih bakterija poput *E. coli* (Enterobacteriaceae). U nekim se sojevima može prenijeti otpornost prema različitim antibioticima kao jedinica, dok se u drugima faktori otpornosti za neke kombinacije droga mogu prenositi.

Posljedica toga je opći porast otpornosti *Salmonella* prema lijeku, što znači potencijalni rizik za zdravlje. U tom je kontekstu došlo vrijeme da se ponovno prouči čitavo pitanje korištenja i zloupotrebe korištenja antibiotika u uzgoju stoke i liječenju infekcija. Od posebnog je značaja upotreba profilaktičkih razina antibiotika u krmi i u svrhe ubrzanja rasta. Postotke otpornosti sojeva *Salmonella* prema ampicilinu, kloramfenikolu, trimetoprim-sulfametoksazolu, tetraciklinu, streptomycinu, sulfonamidu i multiplu otpornost (>2 antibiotika) navodi d' A o u s t (2).

5. *Izoliranje i identificiranje*

Obzirom na malen omjer *Salmonella* prema ukupnom broju mikroorganizama, valja spriječiti ili uništiti tipove *ne-Salmonella* koliko je samo moguće, dok salmonelama valja dozvoliti da dovoljno povećaju brojeve kako bi se poboljšale mogućnosti da ih se pronalazi.

5.1. *Tradicionalne metode*

5.1.1. *Prethodno obogaćivanje*

Prethodno obogaćivanje ili neselektivno obogaćivanje bolje je provesti sa svim uzorcima hrane i uzorcima iz sredine budući da *Salmonellae* izazivaju oštećenje, a stanice mogu oštetiti termička obrada hrane, zamrzavanje, otapanje, osmotski udar ili produljeno skladištenje. Ipak, odgovarajuće vraćanje u prethodno stanje i prerastanje *ne-salmonela* valja uvijek upoređivati. Prilikom prethodnog bogaćenja posebno je kritično trajanje inkubacije (12) dok kapacitet hranjivosti supstrata nije odlučan. Čini se da

valja odbaciti kratka razdoblja prethodnog obogaćivanja, jer su ocijenjena kao općenito neadekvatna za većinu analiza hrane. Supstrat za prethodno obogaćivanje obično propisan standardnim metodama je stabilizirana peptonska voda ili destilirana voda s briljant zelenom bojom za potiskivanje entero i Gram-pozitivnih bakterija.

Prethodno se obogaćivanje provodi pri 37°C tijekom 16 - 20 sati (FIL 93A, 1985 = ISO 6785) (13). Za prethodno se obogaćivanje mogu koristiti i drugi supstrati, poput tekućeg laktoza supstrata, hranjivog tekućeg supstrata, sojinog tekućeg supstrata s tripsinom.

5.1.2. Obogaćivanje

Stanice *Salmonellae* oštećene za prethodnog obogaćivanja mogu ponovno oživjeti sve dok također rastu *ne-Salmonellae*. Selektivno obogaćivanje je važan korak u analizi *Salmonella*. Veliku populaciju mikroorganizama valja potisnuti kako bi postalo laganije prevladavanje *Salmonella*.

U tekući supstrat za obogaćivanje prenosi se 0,1 - 10,0 ml. D' A o u s t i M a i s h m e n t (14) nisu mogli utvrditi razliku između primjene 1 ili 10 ml prenijetog volumena. K a f e l i P o g o r z e l s k a (15) izvještavaju o porastu osjetljivosti metode kada su prenošeni razrijeđeni dijelovi supstrata za prethodno obogaćivanje.

Za analizu mliječnih proizvoda općenito se, kao supstrati za obogaćivanje, biraju selenit cistin ili tetracionat, tekući supstrat. Osim ovih spomenutih, opisan je i proučen niz supstrata koji temelje na tetracionatu ili selenitu (2, 12). Nedavno su tekući supstrati Rappaport ili Rappaport-Vassiliadis bili predmetom znatne pažnje jer temelje na inhibitornim koncentracijama $MgCl_2$ i malahit zelene boje kao i njihovih različitih modifikacija.

Selektivnost postupka obogaćivanja je rezultat djelovanja inhibicijskih agenasa u supstratu za obogaćivanje i temperature inkubiranja. Posljednja je vrlo važan parametar vraćanja *Salmonella*. U proučavanju izolacije *Salmonella* iz sirovog mlijeka i obogaćivanju pri 36-37°C izvještavaju M c M a n u s i L a n i e r (16) o ponovnom dobivanju 97% u usporedbi s 52% uz obogaćivanje pri 41-43°C.

5.1.3. Supstrati za ploče i dokaz

Tekući supstrat za obogaćivanje može se lijevati na ploče na različite agar supstrate od kojih se najviše upotrebljavaju: briljant zeleni agar (BG),

agar ksiloza lizin dezoksiholat (XLD), Hektoen entero agar (Hek) i bizmut sulfid agar (BS). Ipak, istraživanja još uvijek traju u nastojanju da se poboljšaju supstrati za izoliranje, a pronalaze se i novi agar supstrati. Ti supstrati se inkubiraju 24 ili 48 sati pri 35 - 37°C, a iza toga slijedi pažljivo proučavanje tipičnih ili sumnjivih kolonija *Salmonella*.

Sumnjive, dobro izolirane kolonije se zatim dokazuju inokuliranjem na šećer trovalentnog željeza (TSI) ili Klinger glukoza, laktoza željezni agar. Prilikom testiranja mliječnih proizvoda nužno je traženje laktoza pozitivnih tipova *Salmonella*, jer se čini da ih ta sredina selekcionira (17, 18). Za to je potrebno inokuliranje na lizin željezni agar.

Potvrđivanje se zatim upotpuni inokuliranjem na urea agar (test ureaze), supstratom dekarboksiliranja lizina (test lizin dekarboksilaze) i na tripton-triptofan supstratu (indol test) ili korištenjem kompleta za diagnostiku za te testove biokemijskog karakteriziranja (na pr. API-sistem, Minitek, Entero epruveta). Konačna serološka potvrda se može izvesti što je važno serološko oruđe tijekom izbijanja *Salmonella*.

5.2. Brze metode

U posljednjoj su dekadi bile uvedene nove metode koje među ostalim uključuju različite imunopokuse i tehnike rekombiniranja DNA. Sada su dostupni mnogi trgovački sustavi pokusa (19). Zatim, posvećuje se posebna pažnja i predlagalo se skraćivanje tradicionalne metode.

Promjene supstrata za obogaćivanje (prethodno ili selektivno) i/ili trajanje inkubacije obogaćivanja u namjeri da se rezultati postižu što brže nisu urodili očekivanim plodom. de Smedt et al. (20) su uveli pokretno obogaćivanje na modificiranom polu-čvrstom Rappaport Vassiliadis supstratu što je omogućilo serološki potvrđeno otkrivanje *Salmonella* unutar 48 sati poslije početka prethodnog obogaćivanja. Ipak, ova je tehnika prikladna samo za pokretne sojeve.

Ohrabrujuće tehnike što su bile znatnije temelje na mjerenjima sprovodljivosti. Dodavanjem trimetilamin oksida (TMAO) u tekuće supstrate selenit cistina uvjetovalo je brzu promjenu provodljivosti unutar 24 sata. Ipak, nailazilo se i na lažne-pozitivne kao i na lažne-negativne rezultate (21).

Primjena bakteriofaga, posebno hemiluminiscentnih faga ili faga označenih enzimom istraživana je testovima brzog snimanja ili identificiranja *Salmonellae* u hrani i čini se da budi velike nade (22).

U početnom pristupu otkrivanju *Salmonella*, primjenom metoda DNA-hibridiziranja, nasumce klonirani segmenti DNA su prikazani na filmu (23).

Obično je selekcionirano pet fragmenata DNA od 3,6 do 6,0 kilobaza (24). Pouzdanost tog pokusa hibridizacije nedavno je priznao AOAC (25, 26).

Serološko obogaćivanje (27-29), imunofluorescencija (30,31) i ELISA tehnike (26,32) postaju sve korisniji. Tehnika serološkog obogaćivanja se izvodi na ne-selektivnom tekućem supstratu, inokuliranom s nešto selektivnog tekućeg supstrata za obogaćivanje. Test daje brze vjerojatne pozitivne rezultate. Ipak, promjenljivi odnosi lažno-negativnih i činjenica da se primjenom flagelarnih antiseruma, ne-flagelarni sojevi ne mogu otkriti ozbiljne su nepogodnosti serologije obogaćivanja.

U tehnici imunofluorescentnog antitijela koristi se tekući hranjivi supstrat za izvođenje reakcije fluorescentnog antitijela. Čini se da je metoda osjetljiva kao i tradicionalni postupak. Tehnika je ocijenjena kao naporna i traži dobro obučene analitičare, jer se nalaze lažni-pozitivni rezultati.

Čini se da je najzanimljivija imunološka tehnika ELISA. Izvedene su mnoge studije ELISA otkrivanjem različitim postupcima (2). Većina tih sustava pokusa daje samo vjerojatnu identifikaciju *Salmonellae*. Negativni se rezultati mogu smatrati definitivnim, pozitivni se moraju potvrditi. Različite metode su prihvatili Službena prva ili konačna akcija (Official First or Final Action - AOAC) za prikazivanje na filmu *Salmonellae* u različitim tipovima hrane (19, 33).

6. Mehanizam kontaminiranja

6.1. Hrana općenito

Salmonella može kontaminirati gotovo svaku hranu ili lošim proizvodnim postupkom te uslijed neodgovarajućeg postupka čuvanja. Kontaminaciju mogu uvjetovati osobe koje hranu proizvode, spremaju, prodaju ili su prenosnici bolesti.

6.2. Sirovo mlijeko i mliječni proizvodi

Eksperimentalno je dokazano da vime može biti zaraženo sa *S.typhi* (34). Prirodna infekcija mliječne žlijezde krave moguća je, ali se rijetko događa. Krave oboljele od salmoneloze mogu s balegom izlučivati mnogo salmonela te, u određenim uvjetima izlučivati žive salmonele u mlijeku (35). *S. dublin* i *S. typhimurium* su glavni mikroorganizmi infekcije u Vel. Britaniji, SAD i Francuskoj (2). Kontaminiranje sirovog mlijeka obično uvjetuju salmonele iz vanjskih izvora. To može biti balega, farmer ili njegova obitelj, onečišćena voda, prašina... Zdrave krave također redovito izlučuju salmonele u balegu.

7. Pojava i ponašanje u mlijeku i mliječnim proizvodima

Iako većina salmoneloza izazvanih hranom nije bila pripisana mlijeku ili mliječnim proizvodima, mljekarski su proizvodi bili upleteni u neka velika izbijanja te pojave (vidi Tablicu 2).

Tablica 2: Neke pojave salmoneloza povezane s mlijekom i mliječnim proizvodima

Zemlja	Uzročnik	Slučajevi	Umrlo	Literatura
<u>Sirovo mlijeko</u>				
USA (1974)	<i>S. dublin</i>	74	16	Kamei et al. (1974)
Australia (1976)	<i>S. typhimurium</i>	>500	0	Seglenieks and Dixon (1977)
Scotland (1976)	<i>S. dublin</i>	>190	0	Small and Sharp (1979)
Scotland (1981)	<i>S. typhimurium</i>	654	2	Cohen et al. (1983)
England and Wales (1984)	<i>S. zooepidemicus</i>	12	8	Edwarda et al. (1984)
<u>Pasterizirano mlijeko</u>				
USA (1985)	<i>S. typhimurium</i>	16284	7	Lecos (1986) Ryan et al. (1987)
Švedska (1985)	<i>S. saintpaul</i>	153	0	Andersson et al. (1985)
<u>Mlijeko u prahu</u>				
USA (1965-66)	<i>S. newbrunswick</i>	29	0	Bryan (1983)
Trinidad (1976)	<i>S. derby</i>	3000	0	Weismar et al. (1977)
UK (1985)	<i>S. ealing</i>	48	1	Rowe et al. (1987)
<u>Sir</u>				
<u>Cheddar</u>				
USA (1976)	<i>S. heidelberg</i>	339	0	Fontaine et al. (1980)
Kanada (1984)	<i>S. typhimurium pt10</i>	>1500	0	d'Aoust et al. (1985)
<u>Mozzarella</u>				
Italija (1981)	<i>S. typhimurium</i>	100	0	Felip and Toti (1984)
<u>Bijeli sir (kućna proizvodnja)</u>				
SAD (1983)	<i>S. zooepidemicus</i>	16	2	Espinosa et al. (1983)
<u>Francuski Brie /Camembert</u>				
Skandinavija (1982)	<i>S. sonnei</i>	>50	0	Sharp (1987)
<u>Vacherin (sirovo mlijeko/meki)</u>				
Švicarska (1985)	<i>S. typhimurium</i>	>22	0	Sadik et al. (1986)
<u>Sladoled</u>				
Trinidad (1971)	<i>S. typhi</i>	-	-	Taylor et al. (1974) /36/

Temelji na d'Aoust /37/

Sirovo mlijeko

Salmonellae se u mlijeku ne nalaze često. Njihova je zastupljenost većinom uvjetovana kontaminacijom.

Pasterizirano mlijeko

Kako je općenito usvojeno mišljenje da su *Salmonellae* uništene tijekom HTST pasterizacije, ako se pojave, posljedica je to kontaminacije mlijeka poslije pasterizacije.

Mlijeko u prahu

Pojava *Salmonella* u mlijeku u prahu ukazuje na više slučajnosti. Preživljavanje *Salmonella* tijekom postupka raspršivanja podvrgnuto je istraživanjima (38, 39). Moglo se zaključiti da sojevi *Salmonella* mogu preživjeti sušenje raspršivanjem. Skladištenje praha pri 45 i 55°C djeluje letalno dok temperature od 25°C do 35°C umanjuje zastupljenost tijekom 4 - 8 tjedana (40).

Mlijeko u prahu se može kontaminirati prašinom iz okoline ili kontaminiranim talogom.

Sirevi

Hargrove et al. (4) su pokazali da se salmonele mogu razvijati za postupka proizvodnje sira Cheddar. Ukupni rast može dostići do faktora 21. Park et al. (42) pokazali su također razmnožavanje *S. typhimurium* u siru tijekom prva 2 tjedna zrenja. Mikroorganizam je ustrajao u siru pri 7°C gotovo 10 mjeseci. Općenito se smatra da neki sojevi *Salmonella* mogu preživjeti do potrošnje sira. Vrlo je važan razvoj kiseline u siru kao parametar u kontroli proizvoda i/ili preživljavanja *Salmonellae* (43).

8. Patogenost za čovjeka

8.1. Patogeni mehanizam

Salmonelozu uzrokuje uzimanje živih bakterija iz skupine *Salmonella*. Nasuprot stafilokoknom trovanju hranom čini se da je za salmonelozu potrebno uzimanje živih stanica.

Broj stanica koje valja uzeti da izazovu bolest varira prema tipu i soju. Brojevi kolebaju od jedne stanice *S. Typhi* do više milijuna, navedeni su na primjer *S. derby* i *S. anatum* (2). Djeca kao i vrlo mlade te stare osobe posebno su osjetljive pa i male količine mogu izazvati bolest.

Prosjek smrtnosti je 4,1%, a koleba od 5,8% tijekom prve godine života do 2% između prve i pedesete i 15% osoba preko 50 godina. Između različitih sojeva o *S. choleraesuis* se izvještavalo da uzrokuje najviši stupanj mortaliteta: 21%. Do 5% bolesnika mogu postati prenosnici bolesti dok se ne oporave. Takvi prenosnici izlučuju bakterije *Salmonella* u izmetine. Njihov stadij prenosnika bolesti može trajati od 12 tjedana do više godina.

U odnosu na patogenezu mogu se razlikovati dvije glavne skupine: (1) tifoidne i paratifoidne groznice i (2) gastro-intestinalne infekcije. Tifoidne i paratifoidne groznice štete gotovo isključivo primatima. Ova je bolest odvojena od epidemiologije salmoneloze.

Gastro-intestinalne infekcije, koje se označavaju i kao "enterokolitis", otkrivaju se najčešće. Simptomi bolesti su izazvani toksinima izazivačima proljeva tijekom napadačke aktivnosti salmonela.

Zarazni proljevi izazvani salmonelom posredstvom toksina izazivaju tipičnu upalnu reakciju. Općenito se mogu naći dva tipa toksina. Termolabilan, topiv enterotoksin i termostabilan, membranom vezan citotoksin /44/. Prvo spomenuti je dobro proučen i čini se da kromosomna DNA kodira taj toksin (2). Zatim, taj je toksin usko vezan uz toksin kolere i također ga neutralizira antitoksin za toksin kolere (45). Postupci za otkrivanje koleratoksina mogu se također koristiti za enterotoksin *Salmonellae*.

Citotoksin *Salmonellae* neutralizira antiserum toksina za *Shigella dysenteriae*. Zatim se nastavlja daljnje karakteriziranje toksina.

U odnosu na virulenciju može se tvrditi da postoji velika razlika između serotipova salmonele. Važna je uloga toksina u virulenciji soja. Virulencija soja *Salmonella* ovisi ne samo o mnogim vanjskim faktorima (temperatura, pH...) već i o faktorima strukture, na primjer, sastavu somatskih 0 lipopolisaharida. Novija genetska proučavanja (46, 47) su pokazala da je faktor virulencije povezan sa specifičnim plasmidima. Urcrtavanjem takvih plasmida *S. typhimurium* jedinstvene DNA sekvence bilo je objašnjeno kodiranje virulencije. Ukazuje se da bi virulenciju općenito valjalo povezivati sa sačuvanom regijom plasmida DNA (2).

8.2. Epidemiologija

Epidemiologija salmoneloze je krajnje kompleksna.

Intestinalni trakt životinje je primarno stanište *Salmonella* spp. poput ptica, domaćih životinja, reptila i povremeno insekata. *Salmonellae* se mogu naći u ribama, jestivim morskim školjkama i oštrigama. Kao intestinalni mikroorganizmi ove se bakterije izlučuju s izmetom iz koga se mogu prenijeti

na najrazličitija mjesta. Kao takve nalaze se u vodi, hrani i krmi pa ih zatim mogu uzeti druge životinje i ljudi koji postaju prenosioci, ponovno prenoseći *Salmonella* i nastavljajući ciklus.

Salmonelom može biti kontaminirana gotovo sva hrana. One vjerojatno uvjetuju provale salmoneloza i tako se uključuju u prenos bolesti. Jaja, proizvodi od jaja i meso peradi naročito često sadrže *Salmonella*. Najčešće je kontaminacija prehrambenih proizvoda posljedica lošeg postupka s hranom ili neodgovarajućih zdravstvenih uvjeta.

Čini se da je životinja važan izvor i da je njena uloga važna u odnosu na cjelokupnu kontrolu salmoneloze (48).

Sada je salmoneloza raširena diljem svijeta, a trovanje hranom koja sadrži *Salmonellae* znatna i vjerojatno u porastu. K a m p e l m a c h e r (49) navodi niz tumačenja: (1) znatan porast mase hrane koja pogoduje širenju *Salmonella*, (2) neodgovarajuće metode skladištenja hrane, zbog modernih uvjeta života, nekada nagomilavanjem prekomjernih količina, (3) uvođenje običaja konzumiranja sirove ili nedovoljno grijane hrane, djelomice uslijed prevelikog povjerenja u nadzor ispravnosti hrane, (4) povećana međunarodna trgovina hranom i (5) opadanje otpornosti prema infekcijama.

Bilo je nekoliko pojava salmoneloza koje su skrivili mlijeko i mliječni proizvodi.

U tablici 2, koja se temelji na podacima d' A o u s t a (37) dat je pregled nekih većih pojava povezanih s mlijekom i mliječnim proizvodima.

Mnoge su studije utvrdile da se *Salmonellae* nalaze u sirovom mlijeku. H u m p h r e y i H a r t (50) bilježe da je 0,2% uzoraka sirovog mlijeka pozitivno, dok M c M a n u s i L a n i e r (16) otkrivaju 4,7% pozitivnih uzoraka u SAD. Prema tome, ne iznenađuje da su mnoge pojave salmoneloza bile izazvane konzumiranjem sirovog mlijeka.

Ipak, pasterizirano mlijeko i mliječni proizvodi (mlijeko u prahu, sir, sladoled) su također bili upleteni u nastupe *Salmonella* (51). Takve pojave nisu pitanje ispravnosti pasterizacije već prije ukazuju na loše provedene postupke ili naknadnu kontaminaciju proizvoda zbog loših zdravstvenih uvjeta. Dobar postupak proizvodnje nastoji umanjiti na najmanju mjeru taj rizik a može se poistovjetiti s primjenom HACCR principa u procesu.

8.3. Simptomi

Poslije uzimanja hrane kontaminirane *Salmonellama*, poslije 7 do 72 sata, obično se pojave simptomi obične salmoneloze. Razdoblje inkubiranja s tifoidnom groznicom traje od 7 do 21 dana.

Kliničku sliku tifoidne groznice karakteriziraju žestoki simptomi kao septikemija, eventualno s leukopeniom, endokarditis ili perikarditis, meningitis. Općenito nema simptoma enteritisa. Smrt može uslijediti zbog vrlo visoke groznice ili zbog perforiranja u probavnom traktu što može završiti kao peritonitis.

U slučaju obične salmoneloze susreću se gastro-intestinalni simptomi. To karakterizira groznica, glavobolja, proljev, grčevi u probavnom traktu te bol u abdomenu i često povraćanje.

8.4. Terapija

Postoje antibiotici za liječenje salmoneloze. Ipak, valja paziti na povećanje multiple otpornosti prema mnogim antibioticima. Osim toga, nisu poznati antibiotici, koji bi potpuno eliminirali stadij prenosnika.

Literatura

- 1 Bean, N.H., Griffin, P. M., Goulding, M.D. & Ivey, C.B. Foodborne disease outbreaks, 5-year summary, 1983-1987. *J. Food Prot.* 53, 8: 711-728 (1990).
- 2 d'Aoust, J.Y. *Salmonella*. In: M.P. Doyle (Editor), *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 321-445 (1989).
- 3 Curiale, M.S., MCiver, D., Weathersby, S. & Planer, C. Detection of salmonellae and other enterobacteriaceae by commercial desoxyribonucleic acid hybridization and enzyme immunoassay kits. *J. Food Prot.* 53: 1037-1046 (1990).
- 4 le Minor, L., Véron, M. & Popoff, M. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. WHO Document (1987).
- 5 Ray, B., Jezeski, J.J. & Busta, F.F. Isolation of *Salmonella* from naturally contaminated dried milk products. II. Influence of storage time on the isolation of salmonellae. *J. Milk Food Technol.* 34: 423-427 (1971).
- 6 Licari, J.J. & Potter, N.N. *Salmonella* survival during spray drying and subsequent handling of skimmilk powder. III. Effects of storage temperature on *Salmonella* and dried milk properties. *J. Dairy Sci.* 53: 877-882 (1970).
- 7 Georgala, D.L. & Hurst, A.J. *Appl. Bacteriol.* 26: 346-358 (1963).
- 8 d'Aoust, J.-Y., Emmons, D.B., McKellar, R., Timber, G.E., Todd, E.C.D., Sewell, A.M. & Warburton, D.W. Thermal inactivation of *Salmonella* species in fluid milk. *J. Food Prot.* 50: 404-501 (1987).
- 9 Shrimpton, D.H., Monsey, J.B., Hobbs, B.C. & Smith, M.E. A collaborative determination of the destruction of α -amylase and *Salmonella* in whole egg by heat pasteurization. *J. Hyg.* 60: 153-162 (1962).
- 10 Ng, H., Bayne, H.G. & Garibaldi, J.A. Heat resistance of *Salmonella*. The uniqueness of *Salmonella Senftenberg* 775W. *Appl. Microbiol.* 17: 78-82 (1969).
- 11 Goepfert, J.M., Iskander, I.K. & Amundson, C.H. Relation of the heat resistance of *Salmonella* to the water activity of the environment. *Appl. Microbiol.* 19: 429-433 (1970).

- 12 Fricker, C.R. The isolation of *Salmonellas* and *Campylobacters*. A review. J. Appl. Bacteriol. 63: 99-116 (1987).
- 13 International Dairy Federation. International Norm 93A. Milk and milk products-detection of *Salmonella* (1985).
- 14 d'Aost, J.-Y & Maishment, C. Preenrichment conditions for effective recovery of *Salmonella* in foods and feed ingredients. J. Food Prot. 42: 153-157 (1979).
- 15 Kafel, S. & Pogorzelska, E. Transfervolume dependent recovery of *Salmonella* from minced meat. J. Food Prot. 50: 584-586 (1987).
- 16 McManus, C. & Lanier, J.M. *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* and *Yersinia enterocolitica* in raw milk. J. Food Prot. 50: 51-55 (1987).
- 17 Gonzalez, A.B. Lactose-fermenting *Salmonella*. J. Bacteriol. 91: 1661 (1966).
- 18 Blackburn, B.O. & Ellis, E.M. Lactose fermenting *Salmonella* from dried milk and milk-drying plants. Appl. Microbiol. 26: 672 (1973).
- 19 Feng, P.F. Commercial assay systems for detecting foodborne *Salmonella*: a review. J. Food Prot. 55: 927-934 (1992).
- 20 de Smedt, J.M. & Bolderdijk, R.F. Dynamiscs of *Salmonella* isolation with modified semi-solid Rappaport Vassiliadis medium. J. Food Prot. 50: 658-661 (1987).
- 21 Easter, M.-C. & Gibson, D.M. Rapid and automated detection of *Salmonella* by electrical measurements. J. Hyg. 94: 245-262 (1985).
- 22 d'Aoust, J.Y. & Sewell, A. Efficacy of an international method for detection of *Salmonella* in chocolate and cocoa products. J. Food Prot. 47: 78-81 (1984).
- 23 Flowers, R.S., Klatt, M.J., M.A. Mozola, Curiale, M.S., Gabis, D.A. & Silliker, J.M. DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* in foods: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70: 521-529 (1987).
- 24 Fitts, R., Diamond, M., Hamilton, C. & Neri, M. DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp. in foods. Appl. Environ. Microbiol. 46: 1146-1151 (1983).
- 25 Curiale, M.S., Klatt, M.J. & Mozola, M.A. Colorimetric DNA hybridization assay for rapid screening of *Salmonella* in foods: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73: 248-256 (1990).
- 26 Chan S.W., Wilson, S., Johnson, A., Whippie, K., Shab, A., Whilby, A., Ottaviani, M., Vera-Garcia, M., Mozola, M. & Halbert, D. Comparative study of a colorimetric DNA hybridization assay and the conventional culture procedure for the detection of *Salmonella* in food. Annual Meeting of the Association of Official analytical Chemists, St. Louis, MO, 25-28 September, Abstract (1989).
- 27 Surdy, T.E. & Haas, S.O. Modified enrichment serology procedure for detection of salmonellae in soy products. Appl. Environ. Microbiol. 42: 704-707 (1981).
- 28 Thomason, B.M. Current status of immunofluorescent methodology for salmonellae. J. Food Prot. 44: 381-384 (1981).
- 29 Mohr, M.K., Trenk, H.L. & Yeterian, M. Comparison of fluorescent antibody methods and enrichment serology for the detection of *Salmonella*. Appl. Microbiol. 27: 324 (1974).
- 30 Flowers, R.S., Eckner, K., Gabis, D.A., Robinson, B.J., Mattingly, J.A. & Silliker, J.M. Enzyme immuno assay for detection of *Salmonella* in foods: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69: 786-798 (1986).
- 31 Reamer, R.M. & Hargrove, R.E. Twenty-four-hour immunofluorescence technique for the detection of *Salmonella* in nonfat dry milk. Appl. Microbiol. 23: 78 (1972).

- 32 Flowers, R.S. & Klatt, M.J. Immunodiffusion screening method for detection of motile *Salmonella* in foods: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72: 303-311 (1989).
- 33 Anonymous. *Salmonella* in Foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70: 396-397.
- 34 Cousins, M.G. & Bramley, A.J. The microbiology of raw milk. In: R.K. Robinson (Editor), Dairy Microbiology, Vol. 1. Applied Science Publishers (1981).
- 35 Hobbs, B.C. & Gilbert, R.J. Food Poisoning and Food Hygiene, 4th edition. Edward Arnold, London (1978).
- 36 Taylor, W.I., Jr., Santiago, A., Gonzalez-Cortes, A. & Gangarosa, E.J. Outbreak of typhoid fever in Trinidad in 1971 traced to a commercial ice cream product. Am. J. Epidemiol. 100: 150-157 (1974).
- 37 d' Aoust, J.Y. Contemporary concerns on the microbiological safety of milk and dairy products. Proceedings of a Seminar "Modern Microbiological Methods for Dairy Products", Santander, Int. Dairy Fed. Spec. Issue 8901 (1989).
- 38 McDonough, F.E. & Hargrove, R.E. Heat resistance of *Salmonella* in dried milk. J. Dairy Sci. 51, 10: 1587-1591 (1968).
- 39 Licari, J.J. & Potter, N.N. *Salmonella* survival during spray drying and subsequent handling of skimmilk powder. J. Dairy Sci. 53, 7, Part I: 865-870, Part II: 871-876, Part III: 877-882 (1970).
- 40 Lovel, H.R. The microbiology of dried milk powders. In: R.K. Robinson (Editor), Dairy Microbiology, Vol. 1. Applied Science Publishers, London, New York, pp. 209-231 (1981).
- 41 Hargrove, R.E., McDonough, F.E. & Mattingly, W.A. Factors affecting survival of *Salmonella* in Cheddar and Colby cheese. J. Milk Food Technol. 32: 480-484 (1969).
- 42 Park, H.S., Marth, E.H., Goepfert, J.M. & Olson, N.F. The fate of *Salmonella typhimurium* in the manufacture and ripening of low-acid Cheddar cheese. J. Milk Food Technol. 33: 280 (1970).
- 43 Reamer, R.H., Hargrove, R.E. & McDonough, F.E. A selective plating agar for direct enumeration of *Salmonella* in artificially contaminated dairy products. J. Milk Food Technol. 37: 441 (1974).
- 44 Koupal, L.R. & Deibel, R.M. Assay, characterization and localization of an enterotoxin produced by *Salmonella*. Infect. Immun. 11: 14-22 (1975).
- 45 Sandefur, P.D. & Peterson, J.W. Neutralization of *Salmonella* toxin-induced elongation of Chinese hamster ovary cells by cholera antitoxin. Infect. Immun. 15: 988-992 (1977).
- 46 Michiels, T.M., Popoff, M.Y., Durviaux, S., Coynault, C. & Cornelis, G. A new method for the physical and genetic mapping of large plasmids: application to the localisation of the virulence determinants on the 90 kb plasmid of *Salmonella typhimurium*. Microb. Pathogen. 3: 109-116 (1987).
- 47 Baird, G.D., Manning, E.J. & Jones, R.W. Evidence for related virulence sequences in plasmids of *Salmonella dublin* and *Salmonella typhimurium*. J. Gen. Microbiol. 131: 1815-1823 (1985).
- 48 Stott, J.A., Hodgson, J.E. & Chaney, J.C. Incidence of *Salmonella* in animal feed and the effect of pelleting on the content of Enterobacteriaceae. J. Appl. Bacteriol. 39: 41-46 (1975).

49. Kampelmacher, E.H. The role of salmonellae in foodborne diseases. In: L.W. Slanetz, C.O. Chichester, A.R. Gaufin, Z.S. Ordal (Editors), Microbiological Quality of Foods. Academic Press, New York, NY, pp 84-101 (1963).
50. Humphrey, J.J. & Hart, R.J.C. *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of unpasteurized cow's milk on sale to the public. J. Appl. Bacteriol. 65: 463-467 (1980).
51. Marth, E.H. *Salmonella* and salmonellosis associated with milk and milk products. A review. J. Dairy Sci. 52: 283-315 (1969).