

MEĐUNARODNA MLJEKARSKA FEDERACIJA FIL-IDF

Specijalno izdanje broj 9405

3. *Staphylococcus aureus*

Asperger, H., Veterinär Medizinische Universität, Wien, Linke Bahngasse 11, A-1030 Wien, Austria

1. UVOD

Staphylococcus vrste koje proizvode enterotoksin, posebno *Staphylococcus aureus* glavni su uzročnici oboljenja izazvanih hranom u svijetu. Mlijeko i mliječni proizvodi vrlo se lako kontaminiraju ako uvjeti higijene na farmi ne zadovoljavaju (uključivo mastitis), pa mlijeko valja pasteurizirati i poduzeti mjere kako bi se spriječili kontaminiranje i kasniji rast stafilokoka tijekom postupaka obrade i u gotovom proizvodu.

Patogenost *Staphylococcus aureus* odavno je poznata, a može izazvati mastitis ili bolesti kože životinja i proizvođača mlijeka, ili uvjetovati intoksikacije izazvane hranom potrošača mlijeka i mliječnih proizvoda.

Ovo je poglavlje posvećeno karakteristikama, izoliranju i identificiranju stafilokoka u mlijeku, promatranju mehanizama kontaminiranja sirovog mlijeka, njihovoj pojavi u različitim okolnostima, njihovoj patogenosti za čovjeka te postupcima kontrole, kao i njihovom značaju u hrani.

Monografiju Minor i Marth (1976) o vrsti *Staphylococcus* i njenoj ulozi u hrani treba prihvatiti kao posebni izvor podataka.

2. KLASIFICIRANJE

Ti mikroorganizmi svrstani su u porodicu *Micrococcaceae*. Rod *Staphylococcus* se razlikuje od morfološki sličnih članova time što raste u anaerobnim uvjetima i pokazuje fermentativni metabolizam, a i filogenetičkim karakteristikama na temelju količine DNA u stanicama i sastavu stijenki stanica (Sneath, 1986.).

Rod *Staphylococcus* bio je podijeljen u najmanje 23 soja. Bitne karakteristike *Staphylococcus aureus* su proizvodnja koagulaze i termonukleaza. Kloos (1990) opisuje neke koagulaza-pozitivne vrste poput *Staphylococcus intermedius* i *Staphylococcus hyicus* o kojima se izvješćivalo da proizvode vrlo malo enterotoksina. Nije poznato koliko su često oni bili upleteni u trovanje hranom.

Neki stariji pristupi klasiciranju, naročito *Micrococcaceae*, na području mljekarstva, kao oni koje predlažu Abd el Malek i Gibson (1948) ili Baird-Parker (1963.), također primjenjuju biokemijske i fiziološke karakteristike razlike kao što su otpornost prema toplini, proizvodnja kiselirfe, lipoliza itd.

3. KARAKTERISTIKE

3.1. Morfologija i uzgoj

Staphylococci su Gram-pozitivni, katalaza-pozitivni koki promjera 0,5 do 1,5 μm , koji se dijele u više ravnina i stvaraju nepravilne, trodimenzionalne nakupine stanica. *Staphylococci* su nepomični u stadijima mirovanja. Ne stvaraju endospore.

Kolonije su mekane, povišene, sjajne, okrugle, cjelovite, a pojedine kolonije mogu dostići promjer od 6-8 mm na neselektivnim supstratima. Boja kolonija varira od sive do sivobijele sa žučkastim tonom, od zelenonarančastog do narančastog. Na proizvodnju pigmenta mogu utjecati uvjeti rasta. U tekućim supstratima rast se mijenja od jednoličnog zamućivanja do sitnog taloga koji lako suspendira.

3.2. Biokemija

Fakultativni anaerobi. Rast je najbolji u aerobnim uvjetima, ali u anaerobnom dijelu polutvrdog supstrata tioglikolata rast je brz i također jednolične gustoće. Katalazu proizvode stanice koje rastu u aerobnim uvjetima. Rast je dobar kada koncentracije NaCl dođu do 10%, a razmjerno slab uz 15%. Većina sojeva raste između 10°C i 45°C (optimum 30-37°C) i pri pH vrijednostima između 4,2 i 9,3 (optimum pH 7,0 do 7,5).

Metabolizam je respiratorni i fermentativni. Glikoza se metabolizira u piruvate Embden-Meyerhof glikolitičkim putem i/ili heksoza monofosfat putem. Acetil metilkarbinol (acetoin) je obično minorni krajnji proizvod metabolizma glukoze. Kiselina se proizvodi aerobno i anaerobno od mnogih drugih ugljikohidrata.

Za rast su potrebni jedan organski izvor dušika i B skupina vitamina.

Amonij se proizvodi od arginina uz pomoć arginin dihidrolaze i od ureje uz pomoć ureaze. Mnogi sojevi će hidrolizirati native životinjske bjelančevine (primjerice kazeine, želatinu, fibrin). Stvaraju se proteaze, lipaze i esteraze. Različiti lipidi, Tweeni, fosfolipoproteini hidroliziraju otpuštanjem kiselina. Neki sojevi mogu proizvoditi lecitinazu.

3.3. Serološko i lizo određivanje tipa

Serološko određivanje tipa stafilokoka nije općenito prihvaćeno pa je zbog toga možda ograničene vrijednosti u epidemiološkim izučavanjima. Zasad nema međunarodnog standarda sojeva ili metoda. Razlog tome je kompleksna i nedovoljno poznata struktura antigena *Staphylococcus aureus*, poteškoće oko dokazivanja pojedinog antigena i vrlo komplicirana proizvodnja specifičnih antiseruma.

Određivanje tipa faga uključuje proučavanje osjetljivosti mikroorganizama prema aktivnosti liziranja odabranih bakteriofaga. Stafilokoki izolirani iz mlijeka i mliječnih proizvoda mogu biti humanog ili animalnog porijekla. Zbog navedenih razloga dobre će rezultate dati bakteriofagi izolirani iz prikladnih stafilokoka prilagođenih domaćinu. U slučaju *Staphylococcus aureus* uvedeni su međunarodno priznati kompleti za određivanje humanog i bovinog tipa faga.

3.4. Otpornost i osjetljivost prema antibiotiku

Osjetljivost i otpornost prema antibiotiku bitno su važne za svaki *Staphylococcus aureus* koji izaziva bolesti. Neki stafilocoki su vrlo otporni na mnoge antibiotike, a glavni je mehanizam proizvodnja β -laktamaze. Cookson i Philips (1980.) opisuju mehanizam specifične otpornosti. Oni su zabilježili i pojavu otpornosti stafilokoka prema meticilinu. Različiti mehanizmi otpornosti, koji se sastoje od niza gena otpornosti prema antibioticima β -laktamaze, tetraciklinu, sulfonamidu, trimetropimu, makrolidima i aminoglikozidima, otporni su i prema posredniku plazmida.

U sirovom je mlijeku otpornost ili osjetljivost prema antibiotiku prvenstveno dana u odnosu na stafilokoke koji uzrokuju mastitis vimena krava muzara. Hranom izazvano oboljenje, koje je posljedica djelovanja *Staphylococcus aureus*, rezultat je proizvodnje enterotoksina u proizvodu pa zbog toga nema koristi od postupka davanja antibiotika u namjeri da se spriječi trovanje hrane.

Intramamarne infuzije penicilina, obično uspješne u liječenju mastitisa izazvanog stafilokokima, obično ne djeluju kada je uzročnik *Staphylococcus aureus*. Čini se da je otpornost prema penicilinu stafilokoka povezana sa zaštitom mikroorganizama ogradom tkiva, ako su smješteni u dubokim položajima. To je razlog poklanjanju u novije vrijeme, znatne važnosti mastitisu izazvanom stafilokokima.

Iskustva zemalja članica IDF u osjetljivosti uzročnika mastitisa navedena su u Biltenu IDF br. 121 (1980.). Podaci koji se odnose na *Staphylococcus aureus* prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Osjetljivost *Staphylococcus aureus* - podaci zemalja članica IDF

Austrija	penicilin 80%, streptomycin 70%, eritromicin 98%, tripl sulfa 32%, tetraciklin 96%, kloramfenikol 98%, bacitracin 87%, neomicin 45%, stapenor 95%
Australija	70% rezistentno prema 25 mcg/ml penicilina, 6,5% otporno prema 25 mcg/ml streptomicina, ništa nije otporno prema meticilinu uz 10 mcg/ml. Otpornost manje od 1% sojeva prema linkomicinu, tetraciklinu, eritromicinu, a nema otpornih prema kloramfenikolu, neomicinu, furezolidonu
Belgija	otpornost <i>Staphylococcus</i> prema penicilinu 45%, eritromicinu 98%, cloksacilinu 90%, streptomicinu 56%, tetraciklinu 82%, novobiocinu 97%, trimetropinu 85%, linkomicinu 83%
Švicarska	ograničena otpornost prema penicilinu od 25-30 do 40%
Danska	94,3% osjetljivo prema penicilinu
Izrael	40% osjetljivo prema penicilinu
Japan	70% osjetljivo prema penicilinu
Norveška	85% osjetljivo prema penicilinu
Nizozemska	64% osjetljivo prema penicilinu
Novi Zeland	72% osjetljivo prema penicilinu, 96% osjetljivo prema streptomicinu
Švedska	98% osjetljivo prema penicilinu, 33% osjetljivo prema streptomicinu
Finska	90% osjetljivo prema penicilinu

4. IZOLIRANJE I IDENTIFICIRANJE

U literaturi postoje brojne metode izoliranja i identificiranja stafilokoka. Metode izoliranja tih mikroorganizama iz hrane primjenjuju selektivne, diferencijalne i selektivno-diferencijalne supstrate. Selektivni i diferencijalni agensi upotrebljeni u supstratima su telurit, žutanjak, piruvat, glicin, fibrinogen, zečja plazma, NaCl, manitol, litrijev klorid i dr. Sada su na području mljekarstva dostupne Standardne metode IDF 60B:1990 (1990.), IDF 138:1986 (1986.) za mlijeko u prahu i IDF 145:1990 (1990.) za druge proizvode. Radna skupina E 24 standardizirala je iste metode za proizvode na temelju mlijeka.

Terplan et al. (1982.) dali su pregled sigurnosti kvalitete novijih supstrata za određivanje broja *Staphylococcus aureus* u hrani.

Za bakteriološka istraživanja *Staphylococcus aureus* povezana s kontrolom mastitisa većinom se koriste neselektivni supstrati. Prema Biltenu IDF br. 132. (1981.), tipičan rast na krvnom agaru i neki testovi identificiranja poput Gram bojenja i koagulaza pokusa dovoljni su za razlikovanje od drugih bakterija uzročnika mastitisa.

4.1. Obogaćivanje (razmnožavanje)

Za obogaćivanje je preporučena supstrat Giolitti-Cantoni kome je dodan Tween 80 da bi popravio njegova svojstva ponovnog oživljavanja. Redukcija kalijeva telurita služi kao način dijagnoze upućivanja na vjerojatnu zastupljenost *Staphylococcus aureus*. Kao supstrat dvostruke jačine može se primijeniti pri traženju *Staphylococcus aureus* u velikim količinama uzoraka.

4.2. Selekcija

Površinski se inokulira na **Baird-Parker supstratu** iz vjerojatno pozitivnog supstrata za obogaćivanje ili direktno iz materijala uzoraka. Poslije inkubiranja vjerojatno su pozitivne kolonije koje su reducirale kalijev telurit i koje reagiraju specifično na žutanjke. Te se kolonije potvrđuju reakcijom koagulaze.

Alternativno se može primijeniti **fibrinogen agar zečje plazme**. Specifična reakcija zečje plazme temelji se na reakciji koagulaze, pa zbog toga nije potrebno daljnje potvrđivanje kolonija.

4.3. Identificiranje

Za identificiranje se obično koristi koagulaza test sa zečjom plazmom u epruveti.

Proizvodnja termonukleaze (IDF standard 83:1978) (1978.) može se primijeniti za temeljito istraživanje. Metoda ovisi o promjeni modre boje toluidina u crvenu cijepanjem DNA termonukleazom. Identificira se na sloju agara koji sadrži toluidin modru boju i DNA poslije stavljanja kultura stafilokoka ili ekstrakta hrane.

Dostupni su mnogi komercijalni sustavi testova koji se temelje na takozvanom **faktoru nagomilavanja** za koje tvrde da omogućuju brzo identificiranje

Staphylococcus aureus. To je točno za gotovo sve sojeve humanog porijekla, ali samo za 80% bovinih *Staphylococcus aureus* prema Becker et al. (1987.).

4.4. Utvrđivanje enterotoksina

Enterotoksin stafilokoka klasično se utvrđuje animalnim testovima, bilo intraperitonealnom injekcijom ekstrakta hrane u mačice ili intragastralnim hranjenjem mladih majmuna. Ovi su testovi bili zamijenjeni osjetljivim imunološkim testovima poput ELISA koji koriste poliklonalna ili monoklonalna antitijela i mogu otkriti do oko 0,1 ng toksina (Bergdoll, 1990.)

Druge su mogućnosti testovi aglutiniranja lateksa koje su nešto manje osjetljive od ELISA testova, ali se vrlo lako primjenjuju, ili korištenje DNA sonda. Ovom posljednjom metodom otkrivaju se i mikroorganizmi s potencijalom formiranja enterotoksina. Pregled budućeg razvoja tehnika dali su Tranter i Brehm (1990).

Utvrđivanje enterotoksina traži djelotvorna sredstva za ekstrahiranje i koncentriranje prije identificiranja. Hahn et al. (1986.) opisuju metodu koja te postupke skraćuje za 6-7 sati.

5. MEHANIZAM KONTAMINIRANJA

5.1. Zaraženo vime

Vime krave i ostalih životinja koje proizvode mlijeko vrlo je osjetljiv organ. Upalne reakcije ustanovljene bakteriološkim i kliničkim istraživanjima označavaju se kao **mastitis**. Ta upala znatno utječe na kvalitetu i kvantitetu sastava te na mikroorganizme izlučenog mlijeka. Promjene sastava mogu utjecati na prikladnost za preradu te na kvalitetu proizvoda. Prema IDF definiciji (1987.) bit će klasificirano kao zaraženo (klinički ili subklinički) mastitisom, ako su patogeni određeni u aseptički uzetim uzorcima mlijeka, ili nespecifičnim (klinički ili subklinički) mastitisom kada uzorak nije uzet aseptički.

Mastitis većinom počinje kao posljedica prodora patogenih bakterija kroz sisu u unutrašnjost mliječne žlijezde. Patogeni se mogu naći u zaraženim četvrtima, na površini vimena, na rukama mužača, na kontaminiranim ručnicima i na stroju za mužnju. Hamann (1992.) je pokazao da tip sustava za mužnju bitno utječe na pojavu kontaminiranja. Prijenos između čašica i unakrsni prijenosi protoka mlijeka mogući su u sustavima za mužnju s dvostrukom komorom. Zaražena mliječna žlijezda i ozljede sisa glavni su izvori infekcije sa *Staphylococcus aureus*. Stafilocoki iz vagine, tonzila ili kože znatno su manje važni. Do kontaminacije dolazi najviše tijekom mužnje. Zbog toga Hamann preporuča higijenski postupak i dezinfekciju sise poslije mužnje uranjanjem u otopinu dezinficijensa.

Ako se bakterije razmnožavaju u žlijezdi, nusproizvodi njihovog rasta mogu iritirati osjetljiva tkiva i uzrokovati buduću upalnu reakciju. Najčešći oblik mastitisa izazvanog stafilocokima je kroničan subklinički ili relativno blaga bolest s povremenim akutnim razbuktavanjem. Stafilocoki mogu izazvati i žestoki oblik

infekcije poznat kao perakutni mastitis koji može završiti gangrenom ili odbacivanjem žlijezde. Oni posjeduju sposobnost prodiranja u tkivo i stvaranja duboko smještenih fokusa.

Neke krave nikada ne odbacuju stafilokoke iz vimena (ili smo ponekad), druge ih odbacuju na mahove u kratkim razmacima, a treće su stalno u stanju odbacivanja, koje se proteže na nekoliko razdoblja laktacije. Kliničko prepoznavanje mastitisa izazvanog stafilokokima, čini se, izravno je povezano s učestalosti kojom se stafilokoki odbacuju. Frekvencija pojavljivanja *Staphylococcus aureus* u mlijeku također je obično povezana sa sve većom laktacijom.

Heeschen et al. (1985.) navode kao odnos mastitis - infekcija za *Staphylococcus aureus* 5 do 22,4% mlijeka iz četvrti, a prema informaciji iz UK 93,2% uzoraka mlijeka stada. Izlučivanje /ml u mlijeku iz četvrti je 0 do 10^8 (85%: 10^4 do 10^5).

5.2. Izvori - čovjek

Stafilokoki su dobro prilagođeni životu na površinama toplokrvnih životinja - prikladnom mjestu koje dijele s ostalim Gram-pozitivnim bakterijama. Njihova je uloga korisna u proizvodima koji se metaboliziraju na koži i u spojenim žlijezdama. Također, oni mogu biti važni u sprečavanju koloniziranja patogenih mikroorganizama na površinama kože.

Mnogi različiti sojevi *Staphylococcus aureus* mogu postojati u stanju prenosnika bolesti na različitim mjestima tijela. Ta mjesta su: nos, grlo, pazuh, pupak, međica, gastrointestinalni i urogenitalni trakt te različite površine kože. Čini se da je nos glavno mjesto za razmnožavanje. Stafilokoki su uobičajeni sastojci izlučevina nosa i mogu se naći u području ždrijela i nosa te u nosnim sinusima. Često se nalaze i u grlu. Ovisno o izvoru podataka, njihova zastupljenost je između 4 i 60%.

Procjenjuje se da ih se na kožu prenese 5 do 20%. Neka zanimanja mogu povećati mogućnost koloniziranja na koži do viših razina. Zadržavanje na koži može se karakterizirati kao dva različita stanja. Jedno je prolazne prirode i predstavlja neprekidni ciklus nestajanja mikroorganizama ljuštenjem, pranjem itd. Drugo stanje predstavljaju mikroorganizmi koji su postali dio prirodene mikroflore u dubini kože.

Marples et al. (1990.) u jednom radu raspravljaju o stafilokokima kao dijelu normalne mikroflore kože čovjeka.

Stafilokoki se često nalaze u izmetima ljudi. Stafilokoke vjerojatnije sadrže fekalije djece nego odraslih.

Oštećenja kože stafilokokima te potkožna tkiva osiguravaju izvor stafilokoka, što je neobično važno za epidemiologiju infekcija i intoksikacija stafilokokima. Ta oštećenja mogu sadržavati vrlo mnogo patogenih mikroorganizama, često u čistim kulturama, koje su obično sredini najdostupnije. Budući da je koža izvrsna pregrada invaziji bakterija, oštećenja izazvana stafilokokima izlaze na površinu samo onda kada se epitel raskoli ili postranim putem. Ljuštenja, rane, kirurška rezanja i opeko-

tine sklone su infekcijama stafilokokima. Budući da su mnoga oštećenja kože, izazvana stafilokokima, blaga, a pojavljuju se vrlo često, mnogi pojedinci se na njih ne obaziru. Kada se to dogodi osobama koje dolaze u dodir s hranom, takva oštećenja kože postaju vrlo opasan izvor epidemija bolesti izazvanih stafilokokima.

5.3. Izvori - okolina

Stafilokoki su u prirodi vrlo rasprostranjeni. Iako ih se nalazi uglavnom na koži, kožnim žlijezdama i sluzavim membranama sisavaca i ptica, povremeno su izolirani iz tla, pijeska, morske i svježe vode, blata iz kanala, s površine bilja i iz biljnih proizvoda, krmiva, mesa, živadi i mliječnih proizvoda te na površinama, prašini i u zraku naseljenih površina. Mnoge od navedenih točaka su kontaminirali sisavci ili ptice. Neke sredine mogu podnijeti nešto više vrsta koje žive slobodno tijekom duljih vremenskih razdoblja.

Stafilokoki su rasprostranjeni u zraku. Kontaminiranje zraka tim mikroorganizmima prvenstveno je u svezi sa stanovanjem ljudi i nastaje oslobađanjem kontaminiranih čestica prašine s kože i odjeće, pa čak i gubljenjem komadića oguljene kože. Zrak se može kontaminirati stafilokokima u kapljicama, ali znanstvenici se općenito slažu s mišljenjem da je taj način kontaminiranja manje značajan. Pod običnim uvjetima, najviše 0,7% čestica iz zraka sadrži stafilokoke. Praktički svaki neživi predmet iz okoline može se kontaminirati stafilokokima.

6. POJAVLJIVANJE

6.1. Uzorci mlijeka iz četvrti vimena

Uzorci mlijeka iz pojedinih četvrti vimena većinom se analiziraju da bi se utvrdili stafilokoki i dobili podaci o pojavi mastitisa za veterinaru, a ne za narodno zdravlje.

Kako zaključuje Tolle u Biltenu IDF br. 120 (1980.), pojava *Staphylococcus aureus* prema navodima iz literature varira u uzorcima mlijeka iz pojedinih četvrti od 5 do 22,4%. Iz klinički inficiranog vimena izlučeno mastitis mlijeko može sadržavati i do 10^8 mikroorganizama/ml mlijeka, u subkliničkim slučajevima 10^4 do 10^5 mikroorganizama/ml mlijeka. Fluktuacija brojeva je velika. *Staphylococcus aureus* varira u prvim mlazovima subkliničkih slučajeva od 30 do 380 000/ml, a u mlijeku iz četvrti od 210 do 78 000/ml. U uzorcima mlijeka iz kanti u kojima se mlijeko predaje mljekari dostiže od manje od 100 do 50 000/ml.

Neumeister (1977.) je proučavao 46.308 uzoraka mlijeka od 11 577 krava. U 10,4% uzoraka moglo se naći stafilokoke. 26,5% krava sadržavalo je stafilokoke u mlijeku, 16,7% u jednoj četvrti, 6,4% u dvije četvrti, 2,7% u tri četvrti, 1,1% u sve četiri četvrti. Infekcija krava muzenih rukom iznosila je 23,9% prema 28,2% krava muzenih strojem.

6.2. Zbirno mlijeko

Glavni izvor kontaminacije sirovog mlijeka stafilokokima je vime krave oboljele od mastitisa. Minor i Marth (1976.) načinili su pregled literature koja se

odnosi na te mikroorganizme u mlijeku. Godine 1941., prije korištenja antibiotika za liječenje mastitisa, utvrdio je Williams (1941.) da je mlijeko 50% analiziranih krava sadržavalo stafilokoke. Zastupljenost stafilokoka iznad 1000/ml bila je česta. U Austriji su Lengauer i Stumtner (1974.) proučavali zbirno mlijeko različitih proizvođača. Prosječno je 37% uzoraka mlijeka sadržavalo koagulazapozitivne stafilokoke. U više od 90% pozitivnih uzoraka brojevi nisu bili veći od 5000/ml, a niti u jednom slučaju broj nije prelazio 30 000/ml.

U analizi bakterija u sirovom mlijeku našli su Kurzweil i Busse (1973.) 14,6% stafilokoka. Uz manje ukupne brojeve porasla je veličina postotne stavke stafilokoka zbog pojave mikroorganizama s kože vimena i opadanja broja mikroorganizama iz mljekarskog posuđa.

Gimour i Harvey (1990.) raspravljaju o zastupljenosti stafilokoka u miješanom mlijeku. Iako su stafilokoki glavni uzrok bolesti mastitisa u Engleskoj i Walesu, oni se nalaze u do 21% uzoraka mlijeka. O najnižoj takvoj razini infekcije izazvane sa *Staphylococcus aureus* izviještjuju i u drugim zemljama: u Australiji, Novom Zelandu i Zapadnoj Njemačkoj. Brojevi *Staphylococcus aureus*, koji se može izlučiti iz zaraženog vimena, veći su od $1,5 \times 10^6$ jedinica koje tvore kolonije/ml, a u zbirom mlijeku dostižu, prema izviješćima, 10^2 do 10^3 JTK/ml.

Sposobnost za proizvodnju enterotoksina manja je u sojevima izdvojenim od krava oboljelih od mastitisa. Prema Garcia et al. (1980.), Jarvis i Lawrence (1970.) te Olson et al. (1970.), enterotoksine je proizvodilo 0 - 15% izoliranih sojeva u usporedbi s 40 - 50% stafilokoka izolirani iz zdravih ljudi. Rast i proizvodnju enterotoksina stafilokoka u sirovom su mlijeku testirali Donnelly et al. (1968.). Oni su inokulirali sirovo mlijeko koje je sadržavalo malo i mnogo mikroorganizama sa *Staphylococcus aureus* i držali ga u uvjetima različitih temperatura. Podaci su pokazali: (a) da stafilokoki mogu rasti i proizvoditi enterotoksine u sirovom mlijeku, (b) da je sirovo mlijeko s manje bakterija pogodnije za rast i sintezu enterotoksina stafilokoka od onog s mnogo bakterija.

Budući da se mora kontrolirati kvaliteta mlijeka u pogledu stafilokoka operacijom djelotvornog programa kontrole mastitisa, mlijeko se mora držati u uvjetima temperature ne više od 5°C, od točke proizvodnje pa nadalje. To je posebno važno kada se konzumira sirovo mlijeko.

6.3. Mliječni proizvodi

Tekući proizvodi: Normalno se sirovo mlijeko prije potrošnje pasteurizira, bez obzira je li namijenjeno za konzum kao tekuće mlijeko ili se koristi u svrhe prerade. Očito je da je pasteurizirano mlijeko čak pogodnije za rast i proizvodnju enterotoksina od sirovog mlijeka. *Staphylococcus aureus* može lako rasti i proizvoditi enterotoksin u tekućem mlijeku, jer su prikladni njegov prehrambeni status, aktivnost vode, pH vrijednost i redoks potencijal. Ipak, tekuće se mlijeko rjeđe povezuje sa širom pojavom otrovanja hranom od mliječnih proizvoda, poput mlijeka u prahu i sira.

Sušeni proizvodi: do intoksikacije mlijeka u prahu može doći na dva načina (Hawley, 1959.): izravno kada mlijeko u prahu sadrži enterotoksin, iako su sami stafilocoki inaktivirani postupkom sušenja, te neizravno, kada stafilocoki prisutni u prahu počnu rasti nakon rekonstitucije.

Tehnologija proizvodnje mlijeka u prahu uključuje pasterizaciju, odparavanje i sam proces sušenja. Koncentrat mlijeka kojim se puni raspršivač za sušenje podržat će rast i proizvodnju enterotoksina *Streptococcus aureus*. Svi toplinski postupci pridonose općoj smrtnosti. Ipak, ako supstrat sadrži dovoljno za život sposobnih mikroorganizama prije sušenja, tada neki mogu preživjeti. Izvješćivalo se da je odnos preživljavanja bio 0,25 - 3,5% za *Staphylococcus aureus* (Galesloot and Stadhouders, 1968; Chopin et al., 1977.).

Općenito, tijekom skladištenja mlijeka u prahu preživjeli mikroorganizmi polagano ugibaju.

Fermentirani mliječni proizvodi: Ometanje rasta antagonizmom uporabljenih kultura za proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda (vidjeti također 8.5) javlja se u tim proizvodima. Najvažniji su čimbenici uvjeti rasta kultura. Aktivni rast bakterija mliječne kiseline ometa rast stafilokoka, a i uništava ih do neke mjere. Ako se kontaminacija stafilokokima dogodi prije ili tijekom inokuliranja i inkubiranja bakterija mliječne kiseline, mogućnost razmnožavanja samo je ograničena. Ako se sam fermentirani proizvod kontaminira, tada stafilocoki nisu sposobni za razmnožavanje, čak ni kada hlađenje ne zadovoljava.

Sir: Mnogo je objavljenih radova o pojavi i ponašanju stafilokoka u siru (Minor i Marth, 1976: IDF Bull, 122, 1980.; Halpin - Dohnalek i Marth, 1989.).

Čimbenici koji utječu na rast stafilokoka u tekućem mlijeku utječu i na mlijeko namijenjeno preradi. U idealnim uvjetima, rast *Staphylococcus aureus* i proizvodnja enterotoksina mogući su u mlijeku za sir tijekom mnogih sati njegova stajanja u kotlu. Ako pH ne pada normalno, rast se može nastaviti tijekom tiještenja, iako se općenito to ne događa iznad tog stadija. Ipak, vjerojatnost rasta *Staphylococcus aureus* i proizvodnja enterotoksina znatno ovise o količini mikroorganizama u čistoj kulturi. Normalan rast stafilokoka tijekom procesa proizvodnje sira dozvoljava 6-7 generacija u Cheddar siru (od sirovog mlijeka 5-6, od pasteriziranog mlijeka 8-9), 4 - 5 generacija u ementalcu, 4 - 5 generacija u siru s modrim plijesnima u tijestu i 3 - 6 generacija u sir Gauda. Ako su aktivnosti zaustavljene s čistim kulturama rast stafilokoka može se povećati 5 - 10 puta. Rast i stvaranje enterotoksina *Staphylococcus aureus* tijekom proizvodnje sira može se također ometi uz umanjenu količinu NaCl, primjenu niže temperature zagrijavanja, izbjegavanje tiještenja pri visokim temperaturama ambijenta te skraćivanje trajanja tiještenja.

Iako postoji usmjeravanje velikim razlikama među vrstama, broj *Staphylococcus aureus* opada tijekom zrenja i skladištenja sira proizvedenog od sirovog mlijeka s čistim kulturama normalne aktivnosti i starenja sira od sirovog mlijeka, koje se preporučivalo. U siru male kiselosti ipak ne mora biti jasno opadanje

zastupljenosti *Staphylococcus aureus*. Općenito, što je viša temperatura zrenja, to je veće opadanje zastupljenosti, iako na to može utjecati i količina soli.

Enterotoksin stafilokoka može se u Cheddar siru zadržati preko tri godine, bio proizveden s normalnom ili čistom kulturom ograničenog djelovanja.

7. PATOGENOST ZA ČOVJEKA

7.1. Mehanizmi patogenosti

Patogenost *Staphylococcus aureus* valja razmatrati na dva načina:

- (a) ***Staphylococcus aureus* i infekcija:** Početak infekcije i razvoj bolesti ovise o napadnutom (mehanizmi obrane) i o sposobnosti mikroorganizma da ih nadvlada (faktori virulencije). *Staphylococcus aureus* proizvodi mnogo agresina i eksotoksina koje izručuju kromozom ili plazmid (Tablica 2. prema Arbuthnott et al. /1990./).

Tablica 2: Faktori ekstracelularne virulencije *Staphylococcus aureus*

Toksini	Egzoenzimi
Toksini oštećivanja membrane: α - toksin stafilokinaza β - toksin proteaze γ - toksin fosfolipaza leukocidin	Koagulaza Dnaza
Epidermolitički toksin hialuronidaza Toksin-1 sindrom toksičkog "šoka" Enterotoksin (6 serotipova) Piogeni egzotoksini	Fosfataza

Točna uloga mnogih od navedenih faktora u procesu infekcije ostaje nejasna, naročito zbog toga što inače patogeni sojevi mogu izostaviti jedan ili više od navedenih faktora. Također, često se tip i ravnoteža proizvedenih toksina in vitro razlikuje od onih proizvedenih in vivo. Nesumnjivo je ipak da je sposobnost *Staphylococcus aureus* da izaziva infekcije posljedica niza faktora.

Svi su ti faktori vrlo važni za infekciju mliječne žlijezde u patogenezi mastitisa.

Kako su opisali Minor i Marth (1976.), dugo se tražio fiziološki indeks enterotoksičnosti stafilokoka. Istražene fiziološke karakteristike su: proizvodnja katalaze, nukleaza otporna prema toplini, fosfataza, protein A, ureaza, β -hemolizin, fibrinolizin, lizozim, faktor žutanjka, pojava pigmentiranja, hidroliza želatine, fermentiranje manitola, proteolitička aktivnost i specifična liza bakteriofaga. Test kaogulaze postao je najpouzdaniji i mnogo se koristi u metodi predviđanja enterotoksičnosti stafilokoka.

- (b) **Staphylococcus aureus** i intoksikacija: Agensi koji uvjetuju trovanje hrane stafilocokima serije su toksina nazvanih enterotoksinima, jer djeluju na probavni trakt. Enterotoksini su označeni kao A (SEA), B (SEB), C₁ (SEC₁), C₂ (SEC₂), C₃ (SEC₃), D (SED) i E (SEE), a identificirani su reakcijama sa specifičnim antitijelima.

Enterotoksini stafilokoka su proteini jednostrukog lanca, molekularne mase 26.000-29.000; sadrže velike količine lizina, tirozina i asparaginske te glutaminske kiseline. To su osnovne bjelančevine izoelektirčnih točaka pri 7,0 - 8,6. Otporne su prema proteolitičkim enzimima poput pepsina i tripsina, što im omogućava prolaz kroz probavni trakt do mjesta djelovanja. Sastavi aminokiselina enterotoksina A, D i E su slični kao i onih B i C. Te dvije skupine enterotoksina proizvedene su na dva različita načina. Proizvodnju enterotoksina B i C kontroliraju plazmidi, do nje dolazi na kraju faze mirovanja. Proizvodnju enterotoksina A, D i E kontroliraju kromozomi i zbiva se u fazi logaritamskog rasta. Te se razlike odražavaju na razlikama formiranja toksina u hrani. Tipovi A i D nastaju pod znatno širim uvjetima okoline od onih u kojima nastaju B i C, poput pH, a_w ili E_p , iako se pod optimalnim uvjetima ovi drugi proizvode u znatno većim količinama. Većina masovnih trovanja hranom povezana je s enterotoksinima A i D, što ne iznenađuje, jer oni u hrani nastaju u velikom rasponu uvjeta.

Enterotoksini stvaraju antitijela, a svaki izaziva proizvodnju specifičnog antiseruma ako se uštrca u kuniće. Faktori utjecaja u proizvodnji enterotoksina u hrani su temperatura, pH, aktivnost vode, atmosferski uvjeti i prisutnost drugih mikroorganizama. Nije lako saznati kolike su potrebe za rast prije no što se proizvede dovoljno enterotoksina da bi izazvao bolest. Brojka 10^5 se koristila kao standard, ali u pokusima s laboratorijskim supstratima i različitom hranom, enterotoksin se nije mogao primijetiti prije nego što je broj dosegao 10^6 ili više. Ipak, u najviše masovnih trovanja, brojevi 10^8 pa i viši nisu bili neobični.

Pokušalo se dovesti u korelaciju proizvodnju enterotoksina koagulazom i termonukleazom kao i druge lako odredive fiziološke i biokemijske karakteristike. Postalo je jasno da, dok većina stafilokoka koji stvaraju enterotoksine proizvode koagulazu i termonukleazu, suprotno nije pouzdano. Zbog toga se čini da mikrobiolozi pri analizi sumnjive hrane moraju imati na umu i dokazivanje zastupljenosti stafilokoka i određivanje enterotoksina.

7.2. Epidemiologija

Kad se konzumira sirovo mlijeko ili proizvodi od sirovog mlijeka i kada se pojavi enterotoksikoza izazvana stafilocokom, prilikom proizvodnje nastale su bar dvije greške. Prva je kontaminiranje sa *Staphylococcus aureus* iz zaraženog vimena, preko ljudi ili iz okoliša. Druga je nastanak **povoljnih uvjeta za rast** i proizvodnju toksina mikroorganizma koji se pojavio u nekoj fazi proizvodnje ili skladištenja. To može biti polagano hlađenje mlijeka poslije mužnje, neodgovarajuće hlađenje ili dugotrajno skladištenje prije potrošnje. Različiti pravi i nebitni ekološki faktori utječu na stupanj i veličinu rasta bakterija i metabolizma i na formiranje

toksina u hrani. Interakcija s drugim mikroorganizmima potiskuje rast *Staphylococcus aureus* (vidi 8.5.). Obična "mikroflora sirovog mlijeka" sastoji se od različitih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija brzog rasta, a i u ohlađenom stanju, do neke mjere, od psihrotrofnog dijela. S druge strane, proizvodnja fermentiranih proizvoda od sirovog mlijeka koristi bakterije mliječne kiseline i odgovarajuće temperature rasta. Rizik od stafilokoka uvijek postoji kada ovi mikroorganizmi inhibicije ne postoje ili kad je spriječen njihov rast. Primjerice sirovo mlijeko s vrlo malo mikroorganizama iz zaraženog vimena ili zakiseljenog sirovog mlijeka bakterijama mliječne kiseline pri niskoj temperaturi ili zbog dodavanja tvari kočenja, poput soli ili antibiotika.

7.3. Simptomi

Obični simptomi trovanja hranom sa stafilokokima - mučnina, pokušaj povraćanja, povraćanje, grčevi u trbuhu i proljev, obično se pojave 2 - 4 sata poslije uzimanja hrane (vrijeme napada može kolebatiti od 0,5 do više od 7 sati). U težim slučajevima mogu se primijetiti glavobolja, grčevi mišića i malaksalost. Groznica i promjene krvnog tlaka, ako se pojave, nisu znatne osim u vrlo teškim slučajevima. U teškim se slučajevima temperatura može povisiti nekoliko stupnjeva, a krvni tlak može pasti na posve nisku razinu. Stupanj u kome se mogu pojaviti bilo koji od znakova i simptoma kao i težina bolesti uglavnom se određuju količinom u organizam unijetog toksina i osjetljivošću žrtve te bolesti. Zabilježeni su, iako rijetko i smrtni slučajevi, naročito djece i starijih osoba.

Količina enterotoksina potrebna za izazivanje bolesti osjetljivijih osoba povezana je s procjenama koje kolebaju od 1 µg do 100 ng. Najnoviji podaci o trovanju školske djece čokoladom pokazuju da je količina od 100 do 200 ng mogla biti dovoljna da uzrokuje bolest osjetljivih pojedinaca.

Način djelovanja je promjenljiv. Glavni je učinak na probavni trakt. Mjesto djelovanja enterotoksina u probavnom traktu nije poznato, iako tu očigledno počinje reakcija povraćanja. Enterotoksini sigurno znatno utječu na probavni trakt razarajući stanice kojima je taj trakt obložen i izazivajući upale. Poznato je da enterotoksini mogu proizvesti pseudomembranski enterokolitis, a to se očito događa prilikom trovanja hranom uzrokovanim stafilokokima. Djelovanje proljeva drugačije je od onog izazvanog takozvanim toksinima proljeva, kao što su *Salmonella* i *Clostridium perfringens*, jer enterotoksini stafilokoka ne uzrokuju nakupljanje tekućine kada se uštrcaju u petlju tankog crijeva pokusnih kunića. Nadalje, postoje utjecaji na cirkulatorni sustav. Međutim, količina toksina potrebnog za izazivanje djelovanja povraćanja i proljeva, kada se toksin uzima normalno, nije dovoljna da bi mogla uzrokovati ozbiljnije reakcije.

Među tim su reakcijama: visoka temperatura, vrlo niski krvni tlak, hipotenzija, smanjeno ispuštanje urina, plućni edemi, nakupljanje krvi u žilama, potres živaca i smrt. Drugi učinci koje su zabilježili laboratorijski radnici, koji su se bavili enterotoksinima, su: uvjetovanje alergičnih učinaka, pojava upale grla i hunjavice.

7.4. Terapija

Upalni procesi izazvani stafilokokima na koži ili tkivima (posebno mliječnoj žlijezdi) liječe se davanjem antibiotika s obzirom na svojstva osjetljivosti ili otpornosti uključenih *Staphylococcus* vrsta. Samo, to nije predmet ovoga poglavlja.

Patogenost za čovjeka *Staphylococcus aureus* u sirovu mlijeku nastaje trovanjem enterotoksinima koje je proizveo *Staphylococcus*. Žrtve te bolesti rijetko se vode u bolnicu, ozdravljenje je razmjerno brzo i neznačajno, od nekoliko sati do jednog dana, bez posljedica. Ne postoji djelotvoran postupak, prvenstveno stoga što se bolest razvija tako brzo i tako kratko traje. U slučaju da se javljaju jako povraćanje i proljev, može biti potrebno davati tekućinu zbog ponovne uspostave ravnoteže soli.

8. KONTROLA I PREVENTIVA

8.1. Opća higijena

U ovom su poglavlju opisane mjere kontrole i sprečavanja *Staphylococcus aureus*, ograničene na stafilokoke djelotvorne u sirovu mlijeku.

Tri su stanovišta o osnovnim higijenskim mjerama o kojima je riječ:

- (a) Istraživanje, programi nadzora i praktično iskustvo dali su mnogo podataka koji se odnose na uzrok i sprečavanje mastitisa izazvanog stafilokokima i bolesti koja je posljedica zastupljenosti stafilokoka u hrani. Ipak, taj podatak je neznatne praktične vrijednosti, ako ne služi za **ispravno školovanje** osoba koje sudjeluju u proizvodnji, preradi i distribuciji sirovog mlijeka. Iako je proizvodnja i postupak s mlijekom većinom u rukama ljudi na farmi, odgovornost za školovanje treba se nalaziti u tome području. Prema različitim strukturama proizvodnje mlijeka, i programi školovanja moraju se isto tako organizirati na vrlo različite načine.

Mnogi principi sigurnosti sirovog mlijeka mogu se kategorizirati pod naslovom zdravog razuma. Zbog toga se često prihvaća kao gotova činjenica da narod mora instinktivno znati kako da čuva hranu. Praksa dobre higijene nije instinktivno prirodna, pa je čovjek mora naučiti. Ljudi će vjerojatnije s hranom postupati na higijenski način, ako razumiju zašto ne smiju nešto učiniti, nego ako im se samo kaže da nešto ne čine. Nadalje, poučavanje o načinu sigurne pohrane hrane mora biti proces koji se neprekidno intenzivira. Ako je u sirovu mlijeku zastupljen *Staphylococcus aureus*, jedno je područje podučavanja razumijevanje veze između kontaminiranja i tehnike mužnje. To uključuje i poznavanje tehničkog principa strojeva za mužnju, tehnički i higijenski status mnogih dijelova sustava za mužnju te razumijevanje mužnje.

- (b) Druga mogućnost je kontrola **legislativom**. To će prisiliti da se u svakom poslu koji se odnosi na hranu ozbiljno razmisli o sigurnosti hrane i da se učini barem neki napor da se udovolji postojećim standardima i pravilima.

U slučaju sirovog mlijeka, mnoge razvijene zemlje koriste pravila za sirovo mlijeko, povezanim sa zabranom prodaje ili s umanjenom cijenom, kada je

kvaliteta lošija. Kriteriji higijene proizvodnje mlijeka (mjereni brojem kolonija), zdravlje vimena (mjereno brojem stanica) i nepostojanje inhibitornih tvari mogu se usvojiti pri ocjeni. Sva tri kriterija znatno utječu i na problem problem *Staphylococcus aureus*.

- (c) Treća je opcija usvajanje **ideologije osiguravanja kakvoće** naglašavanjem preventive, a ne sustava koji djeluju unatrag.

Na tom se području koriste mnogi pristupi, kao praksa dobre prerade (GMP, Good Manufacturing Practices) ili HACCP (Hazard Analysis Critical Point System - Sustav analize kontrolne točke rizika).

Premda moderan, ovaj je princip vrlo star. Kao primjer novije literature navodimo Bulletin IDF No. 229 (1988.) (Osiguravanje suvremene kvalitete) i ICMSF (1988.).

8.2. Dezinfekcija

Sirovo je mlijeko neprekidno izloženo površinama pribora i okoline, tijekom prolaza iz vimena kroz posude za mužnju i uređaja za hlađenje, sve dok se ne uskladišti. To izvrgavanje mlijeka površinama čini ga vrlo osjetljivim na kontaminaciju mikroorganizama. Mikroorganizmi i hranjiva koja podržavaju rast tih mikroorganizama mogu se gomilati na površinama u dodiru s mlijekom. Dva su elementa potrebna za kontrolu tog tipa kontaminacije:

- (a) **čišćenje**, da bi se uklonila organska tvar oplahivanjem toplom vodom i zatim sredstvima za čišćenje poput lužina, kiselina, organskih detergenata i sredstava za omekšavanje vode, nakon čega slijedi
- (b) **sanitacija**, da inaktivira većinu, ako ne sve patogene bakterije ostale nakon čišćenja. Takva dezinfekcijska sredstva su klor ili hipokloriti, jodofori, kvarterni amonijevi spojevi i drugo. Kemijski sastojci tih dezinficijensa sprečavaju rast i inaktiviraju stafilokoke. Neki podaci koje navode Minor i Marth (1976.) prikazani su u Tablici 3.

Dezinfekcija se može koristiti za kontrolu kontaminacije stafilokokima zdravih sisa kliničkim testovima zaraženih sisa i površina vimena. Sustav preventivne kontrole mastitisa djeluje **uranjanjem sisa** prije i poslije mužnje. Koriste se jodofori, kvarterni aminojevi spojevi formuliranja na temelju klora (kloramin T) i klorheksidina. Djelotvorna i brza redukcija stafilokoka na koži sise postiže se dezinfekcijom. Kapilarnim snagama ona također prodire u sisni kanal i sprečava infiltraciju stafilokoka. U razdoblju između mužnji, površina sise zaštićuje se tankim slojem dezinficijensa. Prije slijedeće mužnje papirnatim se ručnikom upije dezinficijens uporabljen za čišćenje vimena. Istovremeno se dezinficiraju ruke mužača.

Tablica 3: Neki podaci koje navode Minor i Marth (1976.), a odnose se na kemijske sastojke dezinficijensa

Sastojak	Učinak ^a	Potrebno trajanje	Potrebni uvjeti (ppm)	Minimalna koncentracija
Klor	c	30s	pH 7,2, 25°C	0,8
	<5 s	pH 8,5-8,9	15	
	111 s	pH 11,2	15	
Jod	c		pH 7, 30°C	5
o-fenilfenol	c	5 min		1250
formaldehid	s			20
heksaklorafenol	c	10 min		200-1000
kvarterni amonijevi spojevi	s			0,39

^a c = baktericidno sredstvo, s = bakteriostatik

8.3. Hlađenje mlijeka

Temperature hlađenja glavna su metoda za sprečavanje ili usporavanje rasta stafilocoka u mlijeku. U Tablici 4, uzetoj od Mossel i van Netten (1990.), navedene su granične vrijednosti temperature, a_w i pH za rast i proizvodnju enterotoksina.

Tablica 4: Granične vrijednosti temperature i stvaranja faktora a_w i pH za rast mikroorganizama i proizvodnju enterotoksina

	Aerobna atmosfera			Anaerobna atmosfera		
	°C	a_w	pH	°C	a_w	pH
Rast	7-46	0,83	4,0	7-46	0,90	4,6
Formiranje enterotoksina	10-45	0,84	4,0	10-45	0,90	5,3

Proizvodnja enterotoksina djelovanjem stafilocoka može se potpuno kontrolirati podešavanjem temperature. Razmnožavanje mikroorganizama i formiranje toksina gotovo se posve zaustavljaju ispod 7°C. U tom okviru temperature rastu samo psihrotrofni mikroorganizmi kvarenja, a njihov je učinak na stafilokoke izrazit.

Stafilokoki su zapravo otporni na inaktiviranje temperaturama zamrzavanja, naročito u usporedbi s Gram-negativnim mikroorganizmima. Zamrzavanje i otapanje neznatno utječu na životnu sposobnost. Stanice podvrgnute takvom postupku nešto su osjetljivije na koncentraciju NaCl, do 7,5% u supstratima koji služe za dokazivanje. Taj postupak uvjetuju izvjesna oštećenja stanica *Staphylococcus aureus*, ali ne i ugiibanje.

8.4. Zagrijavanje mlijeka

Iako je za sirovo mlijeko svojstvena činjenica da nije bilo podvrgnuto procesu zagrijavanja, zanimljivo je pogledati kako procesi koji se normalno koriste za zagrijavanje, posebice pasterizacija, utječu na opasnosti od stafilokoka. Podatke o toj temi revidirali su Minor i Marth (1976.) i u novije vrijeme Halpin-Dohnalek i Marth (1989.).

Dok stafilokoki mogu rasti u prikladnom supstratu pri temperaturama do 46°C, razmjerno su osjetljivi na visoke temperature. Toplinski postupci iznad temperatura maksimalnog rasta u rasponu 50-60°C djeluju prvo kao oštećenje. Radi se (Minor i Marth, 1976.) o oštećenju citoplazmatske membrane, i kao rezultat toga propuštanju staničnog materijala u okolinu (Sneath, 1986.), zatim o promjeni metaboličnih sposobnosti stanica i razgradnji (Kloos, 1990.) ribosomalne ribonukleinske kiseline (RNA).

Osjetljivost na selektivne tvari, posebice na sol koja se koristi u supstratima za otkrivanje *Staphylococcus aureus*, čini se da je glavna karakteristika oštećenih stanica. Hurst et al. (1976.) razlikuju s obzirom na reakcije rasta u supstratu između oštećenog *Staphylococcus aureus*, koji je sposoban rasti u supstratima sa 7,5% soli i oštećenih stanica koje mogu rasti i u supstratima bez soli. Vrlo oštećene stanice traže u supstratu tvari s funkcijama popravljivanja kao što su Na piruvat i mrtve stanice. Ti podaci već su uzeti u obzir u IDF standardnim metodama za otkrivanje stafilokoka. Kulture se oštete čim se zagriju, a visoke temperature uvjetuju veći početni toplinski udar. Pri 50-60°C oštećenje je brže od ugibanja.

Uz temperature više od 60°C nastupa smrt. Povećana otpornost stafilokoka prema toplinskoj destrukciji pri 60°C primijećena je u obranom mlijeku s 26-57% saharoze. Na otpornost prema toplini također znatno utječe pH. D-vrijednosti pri pH 4,5 i 7,5 bile su manje od onih uz pH 5,5 i 6,5.

Različite su studije određivale utjecaj postupka zagrijavanja na *Staphylococcus aureus* u okviru pasterizacije: 30 min pri 62°C, preživjelo je 1,5% stafilokoka, 15 s pri 72°C preživjelo je 0,38%, a nakon 45 min uz 62°C ili 35 s pri 72°C preživjelih nije bilo. Drugi su autori utvrdili da je preživljavanje bilo više u obranom mlijeku i u sirutki od Čeddar sira nego u punomasnom mlijeku ili fosfat pufetu. Primjećuje se i utjecaj množine mikroorganizama na obujam toplinske destrukcije. Od oko 10 milijuna *Staphylococcus aureus* stanica po ml, do 100-1000 dolazi do logaritamskog uništavanja, dok je razgradnja preostalih stanica postupna.

Čak i starost stanica bakterija utječe na njihovu otpornost prema toplinskoj razgradnji. Rast kultura tijekom 60 ili 228 sati bio je više puta otporniji nego rast istih kultura koji je trajao samo 12 sati. Toplinska otpornost varira među sojevima stafilokoka, ali je konzistentna za svaki soj.

Za razliku od vegetativnih oblika mikroorganizama, enterotoksini su neobično otporni prema toplini. Bird-Parker (1990.) konstatiraju uvjete temperature za uništenje *Staphylococcus aureus*: 0,43 - 8 min pri 60°C prema 3 - 8 min pri 121°C za enterotoksin.

8.5. Interakcije s drugim mikroorganizama

Minor i Marth (1976.) u izvješću prema literaturi govore o reakciji stafilocoka na druge mikroorganizme u njihovoj sredini. Jasni depresivni učinci na rast *Staphylococcus aureus* primijećeni su prilikom proučavanja bakterioloških supstrata smjesom saprofitskih, psihrotrofnih vrsta bakterija. Represija je bila krajnje djelotvorna uz ili ispod temperatura sredine. Nadalje, utvrdilo se da se stafilocoki uz populaciju saprofitskih bakterija mogu razmnožavati samo u rasponu pH 6-8 i pri temperaturi iznad 20°C, dok njihovi konkurenti mogu rasti pri pH 5 i 9 te uz niže temperature. *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* i *Achromobacter* sp. ometali su stafilocoke antibiotičkim tvarima koje su mogle filtrirati Seitz-filtrom, koje su se mogle dijalizirati i bile stabilne pri grijanju 10 min uz 90°C. *Serratia marcescens* i jedna pseudomonada vjerojatno mogu ometi *Staphylococcus aureus* uspješnim natjecanjem za aminokiseline.

Mossel i Netten (1990.) također opisuju upletene faktore kao što su ograničenja za rast stafilocoka u hrani. *Staphylococcus aureus* je uvijek vrlo osjetljiv u natjecanju s običnim mikroorganizmima kvarenja, kao što su *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Lactobacillaceae*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus epidermidis* i *Streptococcus*. Uz bilo koju temperaturu uz koju se hrana skladišti, ova vrst antagonizma može ograničiti rast i stvaranje toksina. Razmnožavanje mikroorganizama kvarenja obično će biti povodom lako utvrdivih promjena boje, mirisa, konzistencije i okusa hrane prije nego populacija *Staphylococcus aureus* dostigne zastupljenost i proizvode klinički signifikantne količine toksina.

Naprotiv, ako je aktivnost vode umanjena (0,95 ili manje), mikroorganizmi kvarenja ne mogu rasti, a stafilocoki su sposobni za rast. Oni prevladavaju u hrani koja sadrži 5,5% ili više soli. Dodavanje saharoze hrani bilo je jače inhibitorno u miješanoj kulturi prema populaciji saprofita nego prema stafilocokima.

Drugo područje interakcije, posebno važno za mlijeko i mliječne proizvode, su reakcija stafilocoka na bakterije mliječne kiseline. Znan broj studija o povezanom rastu potvrđuje mogućnost da bakterije mliječne kiseline utječu na stafilocoke (Asperger, 1986.). Mliječna kiselina se uvijek smatrala razlogom inhibicije stafilocoka. Asperger (1985.) je prepoznao minimalnu koncentraciju mliječne kiseline koja je ometala 17 sojeva *Staphylococcus aureus* pri pH 4,4 do 4,7 i minimalnu baktericidnu koncentraciju pri pH 3,9 - 4,5. Zbog aktivnosti zakiseljavanja, količina mliječne kiseline i pH supstrata koju su dostigle bakterije mliječne kiseline i pH supstrata koju su dostigle bakterije mliječne kiseline u korelaciji je s njihovom antagonističkom aktivnosti. U svim slučajevima gdje su aktivnost zakiseljavanja umanjili fagi, antibiotici u mlijeku, dodavanje NaCl, ili bakterije mliječne kiseline koje proizvode bakteriocin u miješanoj kulturi, stafilocoki su odmah bili sposobni za rast.

Za inaktiviranje stafilocoka u kulturama bakterija mliječne kiseline manje su važni bili peroksid, nizin i druge tvari ometanja koje su proizvele bakterije mliječne kiseline.

9. PROSUĐIVANJE POSEBNE VAŽNOSTI STAPHYLOCOCCUS AUREUS U SIROVU MLIJEKU

Teško se pojavljivanje *Staphylococcus aureus* u sirovu mlijeku može spriječiti. Terplan i Zaadhof (1985.) prema tome smatraju da je rizik za potrošača sporedan, jer samo ograničen dio bovinih stafilocoka proizvodi enterotoksine. Osim toga, stafilokoke ometaju bakterije normalno zastupljene u sirovu mlijeku tako dugo, dok posebni uvjeti (dodavanje soli, inhibitorne tvari) ne dozvole selektivni rast stafilocoka. Mastitično mlijeko zaraženo stafilocokima rijetko izaziva gnojnu zaraznu bolest. Glavna se važnost pridaje činjenici da je moguća proizvodnja enterotoksina.

U slučaju mliječnih proizvoda proizvedenih od sirovog mlijeka (više vrsta sira, tekuće mlijeko), u određenim uvjetima može postojati stvarni rizik. Razmnožavanje *Staphylococcus aureus* i proizvodnja enterotoksina pod utjecajem su primarne kontaminacije, kiselosti, starosti i koncentracije čiste kulture, pada pH vrijednosti tijekom procesa prerade, koncentracije dodane soli, uvjetima temperature zrenja i skladištenja te zastupljenosti konkurentnih antagonističkih mikroorganizama.

Dugo se priznavalo patogenost *Staphylococcus aureus*. Tim se mikroorganizmom bavilo vrlo mnogo istraživača. Ipak, posljednjih 10-15 godina sve je očitije da i druge vrste stafilocoka mogu biti potencijalno patogene za ljude, (primjerice *Staphylococcus hyicus*), proizvodnjom enterotoksina, da također mogu izazvati mastitis i bolesti kože muzara (Gilmour and Harvey, 1990.).

Jedan vid zastupljenosti *Staphylococcus aureus* je njihova funkcija mikroorganizama indikatora. Pojava tih bakterija u hrani obično se smatra indikacijom kontaminiranja s kože, usta ili nosa radnika koji barataju hranom. U slučaju sirovog mlijeka, tu funkciju indikatora nadilazi činjenica da je vime zaraženo sa *Staphylococcus aureus* glavni izvor tih bakterija.

Zanimljiv pristup objavili su Frank et al. (1990.). Oni su tragali za indikatorom zastupljenosti *Listeria* vrsta u okolišu tvornica za preradu mlijeka. Prema njihovim rezultatima, stafilocoki mogu poboljšati upozorenja za *Listeria* kada se promatra broj na različitim površinama iz okoliša, poput paleta za skladištenje proizvoda, tračnice prijevoznih sredstava, kondenzat na uređaju za punjenje i zamrzavanje, podovi, gumene podne prostirke te odvodni kanali.

Literatura

- 1 Minor, T. E. and Marth, E. H. *Staphylococci and Their Significance in Foods*. Elsevier Scientific Company, Amsterdam, Oxford, New York (1976).
- 2 Sneath P. H. A. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. William and Wilkins, Baltimore (1986).
- 3 Kloos, W. E. Systematics and the natural history of staphylococci. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 25S-35S (1990).

- 4 Abd el Malek, Y. and Gibson, T. Studies in the bacteriology of milk. II. The staphylococci and micrococci of milk. **J. Dairy Res.** 15: 249-260 (1948).
- 5 Baird-Parker, A. C. A classification of Micrococci and Staphylococci based on physiological and biochemical tests. **J. Gen Microbiol.** 30: 409-427 (1963).
- 6 Cookson, B. and Phillips, I. Methycillin-resistant staphylococci. **J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.** 55S-77S (1990).
- 7 IDF. Progress in Mastitis control in 23 countries. **Bull. Int. Dairy Fed.** 121 (1980).
- 8 IDF. Dried milk products. Enumeration of *Staphylococcus aureus* MPN technique IDF-Standard 60B (1990).
- 9 IDF. Dried milk - Enumeration of *Staphylococcus aureus* - Colony count technique IDF-Standard 138 (1986).
- 10 IDF. Milk and milk based products. Enumeration of *Staphylococcus aureus* - colony count technique at 37°C. IDF-Standard 145 (1990).
- 11 Terplan, G., Zaadhof, K.J. and Becker, H. Quality assurance of newer media for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in food. **Arch. Lebensmittelhyg.** 33: 142-145 (1982).
- 12 IDF. Laboratory methods for use in mastitis work. **Bull. Int. Dairy Fed., Doc.** 132 (1981).
- 13 IDF. Milk and milk products - Standard method for the detection of thermonuclease produced by coagulase positive Staphylococci. IDF-Standard 83 (1978).
- 14 Becker, H., Zaadhof, K.-J. and Terplan, G. Zur Charakterisierung von *Staphylococcus aureus*-Stämmen des Rindes unter besonderer Berücksichtigung des Klumpungs-faktors. **Arch. Lebensmittelhyg.** 38: 12-17 (1987).
- 15 Bergdoll, M. S. Staphylococcal food poisoning. In: D.O. Cliver (Editor), *Foodborne Diseases*. Academic Press, San Diego, pp. 85-106 (1990).
- 16 Tranter, H. S. and Brehm, R. D. Production, purification and identification of the staphylococcal enterotoxins. **J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.** 109S-122S (1990).
- 17 Hahn, G., Heeschen, W. and Südi, J. Zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin B aus verschiedenen Substraten. **Kieler Milchw. Forsch. - Ber.** 38: 217-225 (1986).
- 18 IDF. Bovine Mastitis - Definition and guidelines for Diagnosis. **Bull. Int. Dairy Fed., Doc.** 211 (1987).
- 19 Hamann, J. Zum Transfer von Mastitiserregern in Abhängigkeit vom Melksystem. **Milchwissenschaft** 37: 283-286 (1982).
- 20 Heeschen, W., Suhren, G. and Hahn, G. Mastitis - significance for processing of milk and public health aspects. **Kieler Milchw. Forsch. - Ber.** 37: 233-243 (1985).
- 21 Marples, R. R., Richardson, J.F. and Newton, F.E. Staphylococci as part of the normal flora of human skin. **J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.** 93S-99S (1990).
- 22 IDF. Factors influencing the bacteriological quality of raw milk. **Bull. Int. Dairy Fed.** 120 (1980).
- 23 Neumeister, E. Zur Diagnostik der Staphylokokkenmastitis des Rindes. **Wiener tierärztl. Mschr.** 64: 1-36 (1977).
- 24 Williams, W. L. Staphylococcus aureus contamination of a grade "A" milk supply. **J. Milk Technol.** 4: 311-313 (1941).
- 25 Lengauer, E. and Stumtner, E. Zum Gehalt der Rohmilch an koagulasepositiven Staphylokokken. **Land-fortstwirt. Forsch.** 6: 193-197 (1974).
- 26 Kuzwell, R. und Busse, M. Keimgehalt und Florazusammensetzung der Milch. **Milchwissenschaft** 28: 427-430 (1973).

27. Gimour, A. and Harvey, J. Staphylococci in milk and milk products. **J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.** 147S-166S (1990).
28. Garcia, M. L., Moreno, B. and Bergdoll, M. S. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. **Appl. Environ. Microbiol.** 39: 548-553 (1980).
29. Jarvis, A. W. and Lawrence, R. C. Production of high titers of enterotoxins for the routine testing of staphylococci. **Appl. Microbiol.** 19: 698-699 (1970).
30. Olson, J. C., Casman, E. P., Baer, E. F. and Stone, J. E. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* cultures isolated from acute cases of bovine mastitis. **Appl. Microbiol.** 20: 605-607 (1970).
31. Donnelly, C. B., Leslie, J.E. and Black, L.A. Production of enterotoxin A in milk. **Appl. Microbiol.** 16: 917-924 (1968).
32. Hawley, H. B. The problem of *Staph. aureus* in spray dried milk powder. XV. Int. Dairy Congr. 2: 1161-1166 (1959).
33. Galesloot, T.e. and Stadhouders, J. The microbiology of spray dried milk products with special reference to *Staphylococcus aureus* and salmonellae. **Neth. Milk Dairy J.** 22: 158-172 (1968).
34. Chopin, A., Mocquot, G. et le Graet, T. Destruction de *Microbacterium lacticum*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* au cours de séchage du lait par atomisation. II Influence des conditions de séchage. **Can. J. Microbio.** 23: 755-762 (1977).
35. IDF. Behaviour of pathogens in cheese. Bull. Int. Dairy Fed. 122 (1980).
36. Halpin-Dohnalek, M.I. and Marth, E.H. *Staphylococcus aureus* production of extracellular compounds and behavior in foods - a review. **J. Food Prot.** 52: 267-282 (1989).
37. Arbutnott, J.P., Coleman, D.C. and de Azavedo, J.S. Staphylococcal toxins in human disease. **J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.** 101S-107S (1990).
38. IDF. Contemporary Quality assurance. Bull. Int. Dairy Fed. 229 (1988).
39. ICMSF. Microorganisms in Foods. 4. Application of the Hazard Analysis Critical Control point (HACCP) System to Ensure Microbiological Safety and Quality. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1988).
40. Mossel, D. A. A. and van Netten, P. *Staphylococcus aureus* and related staphylococci in foods: ecology, proliferation, toxinogenesis, control and monitoring. **J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.** 123S-145S (1990).
41. Hurst, A., Hendry, G. S., Hughes, A. and Paley, B. Enumeration of sublethally heated staphylococci in some dried foods. **Can. J. Microbiol.** 22: 677-683 (1976).
42. Bird-Parker, A. C. The staphylococci: an introduction. **J. appl. Bacteriol. Symp. Suppl.** 1S-8S (1990).
43. Asperger, H. Wirkungen von Milchsäurebakterien auf andere Mikroorganismen - Ein Überblick. **Österr. Milchwirt.** 41 Blg. 1: 1-22 (1986).
44. Asperger, H. Zur Frage der antibakteriellen Wirkung von Milchsäurebakterienkulturen als Interaktionsphänomen bei der Technologie fermentierter Milchprodukte. Habilitationsschrift, Vet. Med. Univ., Wien (1985).
45. Terplan, G. and Zaadhof, K. J. The diagnostic and food hygienic importance of *Staph. aureus* in cow's milk. **Dte. Tierärztl. Mschr.** 76: 217-221 (1969).
46. Frank, J. F., Gilett, R. A. N. and Ware, G. O. Association of *Listeria* spp. contamination in the dairy processing plant environment with the presence of staphylococci. **J. Food Prot.** 53: 928-939 (1990).