

# Otpornost na antimikrobne tvari koagulaza-negativnih stafilokoka i bakterija mliječne kiseline iz industrijskih mliječnih proizvoda

*Nevijo Zdolec<sup>1</sup>, Vesna Dobranić<sup>1</sup>, Goran Zdolec<sup>2</sup>, Dražen Đuričić<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zavod za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane, Heinzelova 55, 10000 Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup>Veterinarska stanica Vrbovec d.o.o., Kolodvorska 68, 10340 Vrbovec, Hrvatska

<sup>3</sup>Veterinarska stanica Đurđevac d.o.o., Malinov trg 7, 48350 Đurđevac, Hrvatska

Prispjelo - Received: 27.12.2012.

Prihvaćeno - Accepted: 15.02.2013.

## Sažetak

U ovom radu istražena je osjetljivost koagulaza-negativnih stafilokoka (n=78) i bakterija mliječne kiseline (n=30) na klindamicin, tetraciklin, amikacin, amoksicilin + klavulanska kiselina, enrofloksacin, vankomicin, trimetoprim + sulfametoksazol, tobramicin, kloramfenikol, ciprofloksacin, eritromicin, penicilin i trimetoprim primjenom disk-difuzijskog testa i/ili E-testa. Izolati su izdvojeni iz industrijski proizvedenih mekih i tvrdih sireva, maslaca i salamure. Svi izolati stafilokoka bili su osjetljivi na klindamicin, amikacin, amoksicilin + klavulansku kiselinu, enrofloksacin, vankomicin, kloramfenikol i ciprofloksacin prema CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterijima. Ukupno 30 izolata (38,46 %) stafilokoka bilo je otporno na eritromicin, 18 na penicilin (23,07 %), 4 na tetraciklin (5,12 %), te po jedan izolat na trimetoprim, tobramicin i trimetoprim + sulfametoksazol (1,28 %). Od ukupno 78 testiranih izolata stafilokoka, njih 35 bilo je rezistentno na najmanje jednu antimikrobnu tvar (44,87 % izolata). Udio rezistentnih izolata u mekim sirevima kretao se od 22 do 70 % testiranih stafilokoka, dok u tvrdom siru i salamuri rezistentnih izolata nije bilo. Na rast bakterija mliječne kiseline nisu utjecali trimetoprim + sulfametoksazol (n=29), vankomicin (n=29), trimetoprim (n=28), amikacin (n=10) i tobramicin (n=10). Dobiveni rezultati ukazuju na to da značajan udio nepatogene mikroflore različitih mliječnih proizvoda s hrvatskog tržišta pokazuje fenotipsku rezistenciju na antimikrobne tvari.

*Ključne riječi:* rezistencija, mliječni proizvodi, nepatogena mikroflora, koagulaza-negativni stafilokoki, bakterije mliječne kiseline

## Uvod

Otpornost bakterija na antimikrobne tvari (antibiotike i kemoterapeutike) jedan je od najznačajnijih problema u veterinarskom javnom zdravstvu. Pored patogenih bakterija, ta otpornost opterećuje i nepatogene bakterije koje prenose gene rezistencije kroz prehrambeni lanac. Koagulaza-negativni stafilokoki (KNS) i bakterije mliječne kiseline (BMK) prepoznati su kao tehnološki/zdravstveno važni mikroorganizmi u proizvodnji hrane animalnog podrijetla (Hadžiosmanović i sur., 2005; Šušković i

sur., 2010) no zdravstveni rizici mogu se očekivati pri nalazu sojeva koji produciraju biogene amine, enterotoksine ili prenose antimikrobnu rezistenciju (Dobranić i sur., u tisku; Zdolec i sur., 2013). U Hrvatskoj je provedeno tek nekoliko istraživanja prevalencije rezistentnih KNS i BMK u hrani, primarno tradicionalnim autohtonim proizvodima - svježim kravljim sirevima i trajnim kobasicama (Zdolec i sur., 2011; Zdolec i sur., 2012ab; Zdolec i sur., u tisku). S druge strane, prema našim saznanjima, istraživanja tog tipa nisu provedena na industrijski proizvedenim mliječnim proizvodima. Stoga je cilj

ovog rada bio ispitati osjetljivost na antimikrobne tvari KNS i BMK iz svježih sireva, salamure, tvrdih sireva i maslaca proizvedenih u industrijskim uvjetima.

### Materijal i metode

Izolati KNS (n=78) i BMK (n=30) izdvojeni su iz svježih sireva od pasteuriziranog mlijeka, salamure za sir, tvrdih sireva i maslaca (proizvodi s tržišta). Uzorci mliječnih proizvoda pripremljeni su za mikrobiološka ispitivanja prema standardnom postupku (HRN ISO 7218:1999). Uzorci (0,1 mL) odabranih decimalnih razrjeđenja nacijski su na Manitol Salt Agar (MSA, bioMerieux, Francuska) i de Man, Ragosa Sharpe agar (MRS, Merck, Njemačka) te inkubirani 48 sati na 37 °C, odnosno 30 °C. Porasle kolonije stafilokoka izdvojene su u Brain Heart Infusion bujonu (BHI, bioMerieux, Francuska) i inkubirane 24 sata na 37 °C. Bakterijska kultura ponovno je precijepljena na MSA, inkubirana (24 h, 37 °C) te bojana po Gramu i podvrgnuta koagulaza-testu (Bactident Coagulase, Merck, Njemačka). Gram pozitivni, koagulaza-negativni koki zadržani su za ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne tvari. Kolonije s MRS

agara precijepljene su u MRS bujon, inkubirane 24-48 sati na 30 °C, te presađene na MRS agar i podvrgnute bojanju po Gramu i katalaza testu. Gram-pozitivni, katalaza-negativni bacili i kokobacili zadržani su za testiranje osjetljivosti na antimikrobne tvari.

Izolati KNS i BMK su testirani na osjetljivost prema sljedećim antimikrobnim tvarima: klindamicinu (2 µg), tetraciklinu (30 µg), amikacinu (30 µg), amoksicilinu + klavulanskoj kiselini (30 µg), enrofloksacinu (5 µg), vankomicinu (30 µg), trimetoprimu + sulfametoksazolu (25 µg), tobramicinu (10 µg), kloramfenikolu (30 µg), ciprofloksacinu (5 µg), eritromicinu (15 µg), penicilinu (10 IU) i trimetoprimu (5 µg) primjenom disk-difuzijskog testa (ATB diskovi, Biorad, Francuska) na Mueller-Hinton agaru (bioMerieux, Francuska). Dodatno su za 30 izolata KNS određivane minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) za eritromicin, penicilin i tetraciklin pomoću E-testa (bioMerieux, Francuska). Po inkubaciji (24 h, 35±2 °C) izmjerene su zone inhibicije i očitane MIC (E-test), a rezultati interpretirani prema kriterijima za stafilokoke (Tablica 1; CLSI, 2008, 2010). Osjetljivost BMK na antimikrobne tvari određivana je samo disk-difuzijom, a kriterij osjetljivosti bila je pojava zone inhibicije rasta.

Tablica 1. Interpretacijski standardi otpornosti/osjetljivosti stafilokoka na odabrane antimikrobne tvari

Skupina	Antimikrobna tvar	Zona inhibicije (mm)		Minimalne inhibicijske koncentracije (µg/mL)	
		Rezistentan	Osjetljiv	Rezistentan	Osjetljiv
Linkozamini	Klindamicin	≤14	≥21	≥4	≤0,5
Tetraciklini	Tetraciklin	≤14	≥19	≥16	≤4
Aminoglikozidi	Amikacin	≤14	≥17	≥64	≤16
	Tobramicin	≤12	≥15	≥16	≤4
Glikopeptidi	Enrofloksacin	≤16	≥23	-	-
	Vankomicin	-	-	≥16	≤2
Sulfonamidi	Trimetoprim + Sulfametoksazol	≤10	≥16	≥4	≤2
	Trimetoprim	≤10	≥16	≥16	≤8
Kloramfenikol	Kloramfenikol	≤12	≥18	≥32	≤8
Kinoloni 2. generacije	Ciprofloksacin	≤15	≥21	≥4	≤1
Makrolidi	Eritromicin	≤13	≥23	≥8	≤0,5
Penicilini	Penicilin	≤28	≥29	≥0,25	≤0,12
Aminopenicilini + inhibitori β-laktamaze	Amoksicilin + klavulanska kiselina	≤19	≥20	≥8	≤4

- standard nije određen

### Rezultati i rasprava

Rezultati testiranja osjetljivosti/otpornosti 78 izolata KNS prikazani su u tablicama 2, 3 i 4. Sukladno kriterijima za disk-difuziju, svi izolati bili su osjetljivi na klindamicin, amikacin, amoksicilin + klavulansku kiselinu, enrofloksacin, vankomicin, kloramfenikol i ciprofloksacin. Najviše izolata bilo je otporno na eritromicin, potom penicilin i tetraciklin, pa su za njih određivane MIC.

Iz tablice 2 vidljivo je da je disk-difuzijskim testom i E-testom podudarnost rezultata bila potpuna pri interpretaciji zona inhibicije i MIC-a u slučaju testiranja osjetljivosti stafilokoka na eritromicin, penicilin i tetraciklin. Na rezultate i interpretaciju rezultata disk-difuzijskog testa mogu utjecati brojni čimbenici uključujući bakterijsku vrstu i soj, uvjete rasta (vrijeme, temperatura), pH hranilišta i preporučeni kriteriji interpretacije (Bubonja i sur., 2008). Iako E-test

Tablica 2. Broj rezistentnih koagulaza-negativnih stafilokoka (KNS) s obzirom na metodu ispitivanja

Antimikrobna tvar	Disk difuzijski test		E-test	
	Broj rezistentnih (n=78)	Raspon zona inhibicije (mm)	Broj rezistentnih (n=78)	MIC* (µg/mL)
Eritromicin	30	0-10	30	8-32
Penicilin	18	14-20	18	0,5-1
Tetraciklin	4	0-12	4	16-32
Trimetoprim	1	8	/	/
Trimetoprim + sulfametoksazol	1	8	/	/
Tobramicin	1	0	/	/

\*minimalne inhibicijske koncentracije  
/ nije testirano

Tablica 3. Broj i postotak rezistentnih izolata koagulaza-negativnih stafilokoka (KNS) prema određenim antimikrobnim tvarima

Antimikrobna tvar	Broj izolata	Broj rezistentnih	Postotak (%) rezistentnih
Eritromicin	78	30	38,46
Penicilin	78	18	23,07
Tetraciklin	78	4	5,12
Trimetoprim	78	1	1,28
Trimetoprim + sulfametoksazol	78	1	1,28
Tobramicin	78	1	1,28

Tablica 4. Broj i postotak na antibiotike rezistentnih koagulaza-negativnih stafilokoka (KNS) obzirom na vrstu mliječnog proizvoda iz kojeg su izolirani

Vrsta hrane	Broj izolata	Broj rezistentnih	Postotak (%) rezistentnih
Svježi sirevi od pasteriziranog mlijeka	58	32	55,2
Salamura za sir	9	0	0
Maslac	3	3	100
Tvrđi sirevi	8	0	0
<b>Ukupno</b>	<b>78</b>	<b>35</b>	<b>44,87</b>

Tablica 5. Broj i postotak rezistentnih izolata bakterija mliječne kiseline (BMK) prema određenim antimikrobnim tvarima

Antimikrobna tvar	Broj izolata	Broj rezistentnih	Zone inhibicije (mm)	Postotak (%) rezistentnih
Amikacin	30	10	0	30,00
Tobramicin	30	10	0	30,00
Vankomicin	30	29	0	96,66
Trimetoprim	30	28	0	93,33
Trimetoprim + sulfametoksazol	30	29	0	96,66

nije službena metoda CLSI-a, naši rezultati pokazuju njegovu pouzdanost u odnosu na disk-difuzijski test, kako uostalom potvrđuju i drugi autori (Baker i sur., 1991; Mayrhofer i sur., 2008). Rezultati iz tablice 3 i 4 upućuju na značajan udio rezistentnih KNS u industrijski proizvedenim mliječnim proizvodima, poglavito svježim sirevima od pasteriziranog mlijeka (44,87 %; n=78) što može predstavljati potencijalni rizik za potrošače u smislu prijenosa gena rezistencije kroz prehrambeni lanac. Udio rezistentnih izolata u svježim sirevima kretao se od 22 do 70 % testiranih stafilokoka, dok u tvrdom siru i salamuri rezistentnih izolata nije bilo. Naši rezultati u suglasju su s istraživanjima drugih autora koji izvješćuju o najčešćem nalazu otpornosti KNS iz hrane na eritromicin, tetracikline i peniciline (Simeoni i sur., 2008; Resch i sur., 2008; Even i sur., 2011). Nalaz izolata otpornih na penicilin u mliječnim proizvodima vjerojatno je posljedica njihove prisutnosti u sirovini tj. svježem mlijeku na što upućuju neka istraživanja (Sampimon i sur., 2011; Kalmus i sur., 2011). Pojava i nalaz rezistentnih sojeva stafilokoka u mlijeku i mliječnim proizvodima može se očekivati uslijed (nekritičke) primjene penicilinskih i tetraciklinskih antibiotika u terapiji i prevenciji mastitisa krava (Zdolec i sur., 2006; Vragović i sur., 2012ab). S druge strane, naši rezultati govore o dominaciji otpornosti stafilokoka na eritromicin, antibiotik koji se pak ne koristi intramamarno. Stoga je prisutnost stafilokoka otpornih na eritromicin u pretraženim mliječnim proizvodima najvjerojatnije rezultat naknadnog onečišćenja mlijeka i/ili proizvoda ili horizontalnog prijenosa gena za rezistenciju.

Osjetljivost BMK na antimikrobne tvari određivali smo samo agar difuzijskim testom, a kriterij otpornosti bio je izostanak zone inhibicije. U našem istraživanju svi su izolati BMK bili osjetljivi na klinda-

micin, tetraciklin, penicilin, eritromicin, amoksicilin + klavulansku kiselinu, enrofloksacin, kloramfenikol i ciprofloksacin. Na rast većine izolata nisu utjecale tvari trimetoprim + sulfametoksazol (n=29), vankomicin (n=29) i trimetoprim (n=28), dok je 10 izolata (30 %) pokazalo otpornost na amikacin i tobramicin (tablica 5). Dobiveni rezultati u suglasju su s radovima drugih autora koji najčešće izvješćuju o otpornosti BMK, izoliranih iz hrane, na antibiotike iz skupine glikopeptida i aminoglikozida (Zhou i sur., 2005; Klein, 2011; Zdolec i sur., 2011). Džidić i sur. (2010) navode kako je stečena antimikrobna rezistencija BMK iz hrane nedovoljno istražena, no postoji realna opasnost horizontalnog prijenosa gena rezistencije na druge nepatogene i patogene bakterije u lancu prehrane.

## Zaključak

Mikrobiološki prihvatljivo mlijeko za preradu u mliječne proizvode mora zadovoljiti propisane kriterije ukupnog broja bakterija i somatskih stanica, a mliječni proizvodi propisane kriterije sigurnosti i higijene hrane. Ti kriteriji kao potencijalni rizik u svježim sirevima prepoznaju samo koagulaza-pozitivne vrste stafilokoka i stafilokokne enterotoksine. Međutim, naši rezultati pokazuju da na tržištu nalazimo svježe sireve od pasteriziranog mlijeka s rezistentnim koagulaza-negativnim stafilokokima. Iako su prema propisanim mikrobiološkim kriterijima ovi sirevi mikrobiološki ispravni, mišljenja smo da antimikrobna rezistencija nepatogene mikroflore mliječnih proizvoda iziskuje preispitivanje potencijalnog rizika za zdravlje potrošača. Procjena rizika podrazumijeva prikupljanje više podataka o primjeni antimikrobnih lijekova u kontroli mastitisa, ostacima u mlijeku (rezidue) te posljedičnoj prisutnosti rezistentnih koagu-

laza-negativnih stafilokoka u sirovom mlijeku, okolišu i mliječnim proizvodima.

## Zahvala

Istraživanje je provedeno uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta (projekt br. 053-0532052-2040).

## *Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci and lactic acid bacteria from industrially produced dairy products*

## Summary

In this research, the susceptibility to clindamycin, tetracycline, amikacin, amoxicillin + clavulanic acid, enrofloxacin, vancomycin, trimethoprim + sulphametoxazol, tobramycin, chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, penicillin and trimethoprim was tested in coagulase-negative staphylococci (n=78) and lactic acid bacteria (n=30) by means of disk diffusion test and E-test. The isolates were collected from soft and hard cheeses, butter and brine. All isolates of coagulase-negative staphylococci were susceptible to clindamycin, amikacin, amoxicillin + clavulanic acid, enrofloxacin, vancomycin, chloramphenicol and ciprofloxacin according to CLSI break-points. A total of 30 staphylococci isolates (38.46 %) were resistant to erythromycin, 18 to penicillin (23.07 %), 4 to tetracycline (5.12 %), and one isolate to trimethoprim, tobramycin and trimethoprim + sulphametoxazol (1.28 %). Among 78 tested staphylococci, 35 of them were resistant to at least one antimicrobial substance (44.87 %). The rate of resistant isolates of different soft cheese types ranged from 22 to 70 %, while resistant staphylococci were absent in hard cheese and brine. The growth of lactic acid bacteria was not influenced by trimethoprim + sulphametoxazol (n=29), vancomycin (n=29), trimethoprim (n=28), amikacin (n=10) and tobramycin (n=10). The results show that significant part of apathogenic microbiota in different dairy products is phenotypically resistant to antimicrobial agents.

**Key words:** resistance, dairy products, apathogenic microbiota, coagulase-negative staphylococci, lactic acid bacteria

## Literatura

1. Baker, C.N., Stocker, S.A., Culver, D. H., Thornsberry, C. (1991): Comparison of the E test to Agar Dilution, Broth Microdilution, and Agar Diffusion Susceptibility Testing Techniques by Using a Special Challenge Set of Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 533-538.
2. Bubonja, M., Mesarić, M., Miše, A., Jakovac, M., Abram, M. (2008): Utjecaj različitih čimbenika na rezultate testiranja osjetljivosti bakterija disk difuzijskom metodom. *Medicina* 44, 280-284.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (2008): Performance Standards for Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standards, third edition. CLSI document M31-A3. Wayne, PA.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (2010): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA.
5. Dobranić, V., Zdolec, N., Račić, I., Vujnović, A., Zdelar-Tuk, M., Filipović, I., Špičić, S. (2013): Determination of enterotoxin genes in coagulase-negative staphylococci from autochthonous Croatian fermented sausages. *Veterinarski arhiv, u tisku*.
6. Džidić, S., Šušković, J., Kos, B. (2010): Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technology and Biotechnology* 46, 11-21.
7. Even, S., Leroy, S., Charlier, C., Zakour, N.B., Chacornac, J.P., Lebert, I., Jamet, E., Desmonts, M.H., Coton, E., Pochet, S., Donnio, P.Y., Gautier, M., Talon, R., Leloir, Y. (2010): Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology* 139, 87-95.
8. Hadžiosmanović, M., Gasparik-Reichardt, J., Smajlović, M., Vesković-Moračanin, S., Zdolec, N. (2005): Possible use of bacteriocins and starter cultures in upgrading of quality and safety of traditionally fermented sausages. *Tehnologija mesa* 46, 194-211.
9. Kalmus, P., Aasmäe, B., Kärssin, A., Orro, T., Kask, K. (2011): Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Veterinaria Scandinavica* 53, 4.
10. Klein, G. (2011): Antibiotic Resistance and Molecular Characterization of Probiotic and Clinical *Lactobacillus* Strains in Relation to Safety Aspects of Probiotics. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, 267-281.
11. Mayrhofer, S., Domig, K.J., Mair, C., Zitz, U., Huys, G., Kneifel, W. (2008): Comparison of Broth Microdilution, ETest and Agar Disk Diffusion Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for *Lactobacillus acidophilus* Group Members. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3745-3748.
12. Sampimon, O.C., Lam, T.J.G.M., Mevius, D.J., Schukken, Y.H., Zadoks, R.N. (2011): Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Veterinary Microbiology* 150, 173-179.

13. Simeoni, D., Rizzotti, L., Cocconcelli, P., Gazzola, S., Dellaglio, F., Torriani, S. (2008): Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci collected from the production chain of swine meat commodities. *Food Microbiology* 25, 196-201.
14. Šušková, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., Matošić, S. (2010): Antimicrobial activity - the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology* 48, 296-307.
15. Resch, M., Nagel, V., Hertel, C. (2008): Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. *International Journal of Food Microbiology* 127, 99-104.
16. Vragović, N., Bažulić, D., Zdolec, N. (2012): Dietary exposure assessment of  $\beta$ -lactam antibiotic residues in milk on Croatian market. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 4, 81-84.
17. Vragović, N., Bažulić, D., Jakupović, E., Zdolec, N. (2012): Dietary exposure assessment of streptomycin and tetracycline in food of animal origin on the Croatian market. *Food Additives and Contaminants: Part B: Surveillance* 5, 236-240.
18. Zdolec, N., Hadžiosmanović, M., Kozračinski, L., Cvrtić, Ž., Filipović, I. (2006): Ostatci biološki štetnih tvari u mlijeku. *Mljekarstvo* 56, 191-202.
19. Zdolec, N., Filipović, I., Cvrtić Fleck, Ž., Marić, A., Jankuloski, D., Kozračinski, L., Njari, B. (2011): Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages and raw cheese. *Veterinarski arhiv* 81, 133-141.
20. Zdolec, N., Dobranić, V., Filipović, I. (2012a): Nalaz rezistentnih koagulaza-negativnih stafilocoka u mesnim i mliječnim proizvodima. Zbornik radova 5. Hrvatski veterinarski kongres, Tuheljske toplice, 71-76.
21. Zdolec, N., Dobranić, V., Filipović, I., Marcincakova, D. (2012b): Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from spontaneously fermented wild boar sausages. *Folia veterinaria* 56, Suppl. 1, 60-62.
22. Zdolec, N., Dobranić, V., Horvatić, A., Vučinić, S. (2013): Selection and application of autochthonous functional starter cultures in traditional Croatian fermented sausages. *International Food Research Journal* 20, 1-6.
23. Zdolec, N., Račić, I., Vujnović, A., Zdelar-Tuk, M., Matanović, K., Filipović, I., Dobranić, V., Cvetnić, Ž., Špičić, S. (2013): Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from spontaneously fermented sausages. *Food Technology and Biotechnology, u tisku*.
24. Zhou, J.S., Pillidge, C.J., Gopal, P.K., Gill, H.S. (2005): Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology* 98, 211-217.