

SNEŽANA B. BULAJIĆ
ZORA M. MIJAČEVIĆ

Univerzitet u Beogradu, Fakultet
veterinarske medicine, Beograd, Srbija

ORIGINALNI NAUČNI RAD

UDK: 637.3:579.86

RIZIK PRISUSTVA STAFILOKOKA U SIREVIMA

Koagulaza pozitivni sojevi izolovani iz autohtonih sireva su okarakterisani u odnosu na njihov enterotoksogeni potencijal i profil fenotipske antimikrobne rezistencije. Primenom VIDAS tehnologije, od 73 koagulaza pozitivna soja stafilocoka analiziranih u našem radu, potencijal produkcije enterotoksina je pokazalo 22 (30,14%) sojeva. Rezistencija na jedan ili više odabranih antibiotika je utvrđena kod 11 (50%) sojeva, od kojih se 6 (54,54%) karakterisalo svojstvom multiple rezistencije. Svojstvo enterotoksogenosti i antimikrobne rezistencije ispitivanih koagulaza pozitivnih stafilocoka predstavlja snažan argument u karakterizaciji rizika njihovog prisustva u sirevima.

Key words: stafilocoke • enterotoksogeni potencijal • antimikrobna rezistencija • rizik

UVOD

Prema podacima Evropske agencije za bezbednost hrane, enterotoksini stafilocoka se navode kao uzrok trovanja u 293 (55,4%) od 525 slučajeva alimentarnih trovanja u 2009. godini. Ispitivanja sprovedena u periodu od 1993. do 1998. godine pokazuju da je 4,8% registrovanih slučajeva stafilocoknih trovanja u Evropi povezano sa konzumacijom mleka i proizvoda od mleka (Lopez-Pedemonte i sar., 2007).

Sa aspekta bezbednosti hrane, najvažnija karakteristika koagulaza pozitivnih stafilocoka je produkcija enterotoksina. Koagulaza pozitivni sojevi, i to pre svega *Staphylococcus aureus*, su jasno implicirani u slučajevima alimentarnih intoksikacija (Hennekinne i sar., 2011). U naučnoj zajednici ne postoji usaglašen stav o enterotoksogenom potencijalu koagulaza negativnih sojeva stafilocoka.

Do danas je otkriven 21 tip stafilocoknih enterotoksina (SE) i enterotoksinima sličnih tipova (*Staphylococcal Enterotoxin-like (SEI)*) (Hennekinne i sar., 2011). U 95% slučajeva stafilocoknih trovanja implicirani su klasični enterotoksini (A, B, C, D, i E) (Schelin i sar., 2011), s time da se u najvećem broju slučajeva dokazuje enterotoksin A (Bergdoll, 1989; Mossel i sar., 1995). Prema današnjem naučnom konsenzusu, količina enterotoksina potrebna za ispoljavanje tipičnih simptoma trovanja u korelaciji je sa približnim brojem stafilocoka od 10^5 CFU/g namirnice, što je pri mikrobiološkoj karakterizaciji sireva ujedno i vrednost postavljena kao hazard od strane evropske (European Commission Regulation (EC) No. 1441/2007), ali i naše legislative (Sl. glasnik RS, br. 72/10).

Antimikrobna rezistencija, zahvaljujući perzistentnoj cirkulaciji rezistentnih sojeva bakterija u okruženju, ali i kroz lanac hrane, predstavlja ozbiljan problem globalnih razmera. Prema

postojećoj, tzv. "rezervoar" teoriji, lanac hrane se može smatrati jednim od glavnih puteva transmisije rezistentnih mikroorganizama između populacije ljudi i životinja (Witte, 1997). Sojevi *S. aureus* i koagulaza negativnih stafilocoka poreklom iz sireva u najvećem broju pokazuju rezistenciju na tetraciklin, eritromicin, hloramfenikol i linkomicin (Perreten i sar., 1998). Kako u određenim slučajevima, molekularnu bazu rezistencije na antibiotike predstavlja ekstrahromozomalna DNK, odnosno mobilni genetski elementi, takvi rezistentni sojevi stafilocoka mogu poslužiti kao rezervoari gena rezistencije, gde se rizik posledičnog prenosa takvih gena na druge mikroorganizme u okruženju (komentare, oportuniste ili patogene) ne može isključiti (Teale, 2002).

Cilj ovog rada jeste da se sojevi koagulaza pozitivnih sojeva stafilocoka, izolovani iz autohtonih sireva poreklom od sirovog mleka, okarakterišu u odnosu na njihov enterotoksogeni potencijal i profil fenotipske antimikrobne rezistencije. Time bi na osnovu podataka o enterotoksogenom potencijalu i fenotipu antimikrobne rezistencije bila moguća preliminarna karakterizacija rizika.

MATERIJAL I METODI

Materijal ispitivanja predstavljali su koagulaza pozitivni sojevi stafilocoka (ukupno 73 soja), izolovani iz sireva predstavljenih tradicionalnom tehnologijom, poreklom od sirovog mleka.

Određivanje enterotoksogenosti koagulaza pozitivnih sojeva *Staphylococcus spp.*

Koagulaza pozitivne stafilocoke su testirane na potencijal produkcije enterotoksina upotrebom VIDAS tehnologije (Vitek Immuno Diagnostic Assay System, bioMérieux, France), koja koristi princip Enzyme Linked Fluorescent Assay testa (ELFA), a prema in-

Author address:
Dr Snežana Bulajić, Fakultet veterinarske medicine, Bulevar oslobođenja 18, 11000 Beograd
Tel: 011/2685-653
e-mail: snezab@vet.bg.ac.rs

strukcijama proizvođača. Sojevi koagulaza pozitivnih stafilokoka su kultivirani u Brain Heart Infusion (BHI) bujonu (37°C/24h). Po završenoj inkubaciji obavi se centrifugovanje na 7000 g pri 4°C/10 min. 500 µl supernatanta dodaje se u odgovarajuća udubljenje VIDAS strip – a (Staph enterotoxin II, SET 2, bio-Merieux), a potom se strip ubaci u aparat Mini VIDAS (Vitek Immuno Diagnostic Assay System, bio-Mérieux, France) i po obavljenoj kalibraciji, aparat izvrši očitavanje i izbaci listu dobijenih vrednosti.

Ispitivanje fenotipske rezistencije na odabrane antibiotike kod izolovanih sojeva stafilokoka primenom disk difuzione metode i E-testa

Ispitivanje osetljivosti/rezistencije sojeva stafilokoka je obavljeno primenom disk difuzione metode, sledeći preporuku Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standard Institution - CLSI, bivši National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS) (NCCLS, 2002), time da su korišćeni BBL diskovi impregnirani odgovarajućim antibiotikom (BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs) (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France). Primenjeni su sledeći antibiotici: eritromicin (15 µg), tetraciklin (30 µg), gentamicin (10 µg), penicilin (10 IU), hloramfenikol (30 µg), ampicilin (10 µg), oksacilin (1 µg), vankomicin (30 µg), neomicin (30 µg), ciprofloksacin (5 µg).

Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije za tetraciklin, penicilin i oksacilin kod enterotoksogenih sojeva gde je disk difuzionom metodom potvrđena fenotipska rezistencija, korišćeni su E test stripovi ((AB Biomerieux, Solna, Sweden) na osnovu instrukcija proizvođača.

REZULTATI I DISKUSIJA

Primenom VIDAS tehnologije, od 73 koagulaza pozitivna soja stafilokoka analiziranih u našem radu, potencijal produkcije enterotoksina je pokazalo 22 (30,14%) sojeva. Morandi i sar. (2007) ispitujući enterotoksogeni potencijal 107 koagulaza pozitivna soja poreklom iz proizvoda od mleka, sposobnost ekspresije enterotoksina utvrđuju kod 52% izolata. Normanno i

sar. (2007) ispitujući enterotoksogeni potencijal sojeva stafilokoka izolovanih iz proizvoda od mleka i mesa, sposobnost produkcije enterotoksina utvrđuju kod 125 (59,8%) sojeva. VIDAS metoda (Vitek Immuno Diagnostic Assay System, bioMérieux, France) je brza i jednostavna za izvođenje, ali njenom primenom se detektuju samo SAE-SEE, ali ne i drugi, u skorije vreme, okarakterisani enterotoksini (Chiang i sar., 2008). Pored toga, rezultati se izražavaju kao pozitivni i negativni, i ne postoji mogućnost diferencijacije različitih enterotoksina. Princip metode je imunološka reakcija (EFLA), čija osetljivost zavisi od količine proizvedenog toksina, tako da postoji mogućnost da se slabo produkujući enterotoksogeni sojevi, ne detektuju (Cunha i sar., 2006). Prema Schmitz i sar. (1998), u kliničkoj praksi, svaki soj stafilokoka koji nosi gen za produkciju enterotoksina trebao bi se smatrati potencijalnim producentom enterotoksina kako se toksogeneza *in vivo* ne može isključiti.

Enterotoksogeni sojevi su dalje analizirani u odnosu na profil antimikrobne rezistencije, gde je 11 (50%) sojeva pokazalo rezistenciju na jedan ili više odabranih antibiotika, od kojih se 6 (54,54%) karakterisalo svojstvom multiple rezistencije (rezistencija na dva ili više antibiotika).

Zastupljenost sojeva stafilokoka u odnosu na fenotipsku rezistenciju ispoljenu prema jednom, dva ili više

odabranih antibiotika prikazana je u tabeli 1.

Najčešći fenotipovi antimikrobne rezistencije kod sojeva stafilokoka podrazumevaju rezistenciju na vankomicin, penicilin i ampicilin (54,54%), dok se rezistencija na tetraciklin utvrđuje kod 3 (27,27%), odnosno 2 (18,18%) soja u slučaju rezistencije na oksacilin. Fenotip rezistencije na hloramfenikol i ciprofloksacin nosi po jedan izolat stafilokoka. Perreten i sar. (1998) ispitujući osetljivost koagulaza negativnih stafilokoka izolovanih iz narmirica kao najčešće fenotipove utvrđuju rezistenciju na hloramfenikol, tetraciklin, eritromicin i linkomicin. Naši rezultati su saglasni rezultatima ispitivanja Resch i sar. (2008), gde se kao dominantni profil rezistencije utvrđuje rezistencija na penicilin, oksacilin, ampicilin, ali i na linkomicin, tetraciklin, i fusidiksličnu kiselinu. U radu Spanu i sar. (2010) sojevi *Staphylococcus aureus* izolovani iz sireva proizvedenih od sirovog ovčijeg mleka pokazuju rezistenciju na ampicilin (36,1%), penicilin (33,3%), tetraciklin (11,1%) i kloksacilin (2,8%).

Rezistentna populacija stafilokoka je izložena proceduri određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za penicilin, tetraciklin i oksacilin primenom E testa, gde se 3 soja karakterisalo rezistencijom na penicilin i 1 soj je pokazao rezistenciju na tetraciklin. Rezistencija na oksacilin nije potvrđena (tabela 2).

Tabela 1. FENOTIPSKA REZISTENCIJA IZOLOVANIH SOJEVA STAFILOKOKA U ODNOSU NA ODABRANE ANTIBIOTIKE

Table 1. ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF ISOLATED STAPHYLOCOCCAL STRAINS

Rezistencija na Resistance to	Rezistentni sojevi stafilokoka Resistant strains of staphylococci		Zastupljenost sojeva u odnosu na rezistenciju prema antibioticku/antibioticima *-profilu rezistencije Antimicrobial resistance profiles
	broj number	%	
1 antibiotik 1 antibiotic	5	45,45	Van
2 antibiotika 2 antibiotics	1	9,09	P/Am
3 antibiotika 3 antibiotics	2	18,18	Te/P/Am (1) P/Am/Cip (1)
4 antibiotika 4 antibiotics	3	27,27	P/Tet/Am/Van/(1) P/C/Am/Ox (1) Te/P/Am/Ox (1)

* E – eritromicin; Te – tetraciklin; Gm – gentamicin; P – penicilin; C – hloramfenikol; Am – ampicilin; Ox – oksacilin; Va – vankomicin; N – neomicin; Cip – ciprofloksacin

Tabela 2. REZISTENTNA POPULACIJA STAFILOKOKA PREMA REZULTATIMA ODREĐIVANJA MIC ZA PENICILIN I TETRACIKLIN

Table 2. RESISTANT POPULATION OF STAPHYLOCOCCI ACCORDING TO RESULTS OF MIC EVALUATION FOR TETRACYCLINE AND PENICILLIN

Antibiotik Antibiotic	MIC (µg/mL)	Broj rezistentnih sojeva Number of resistant strains
<i>Staphylococci</i> spp.		
tetraciklin tetracycline	R ≥ 1	1
penicilin penicillin	R ≥ 0.125	3

Rezultati određivanja antimikrobne rezistencije ispitivanih izolata stafiloka opravdavaju primenu disk difuzionog testa kao orijentacione, odnosno „screening“ metode, ali u objektivnoj proceni rezistencije sasvim sigurno je opravdano uvođenje jedne od kvantitativnih metoda, odnosno određivanje MIC-a.

ZAKLJUČAK

Na osnovu utvrđenog enterotoksogenog potencijala, i svojstva multiple rezistencije na odabrane antibiotike, prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka u sirevima predstavlja biološki hazard. Potrebna su daljna ispitivanja kako bi se u potpunosti spoznao složeni mehanizam ekspresije enterotoksina stafilokoka u samom matriksu namirnica, ali i utvrdila genetska baza antimikrobne rezistencije.

ZAHVALNICA

Istraživanja predstavljena u ovom radu finansirana su od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (projekat br. III 46009).

SUMMARY

THE RISK OF STAPHYLOCOCCI PRESENCE IN CHEESES

Snežana B. Bulajić, Zora M. Mijačević

University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

Coagulase positive staphylococci isolated from autochthonous cheeses were screened regarding their enterotoxigenic potential and antimicrobial resistance profile. By applying the VIDAS technology, out of 73 coagulase positive staphylococcal isolates, 22 (30,14%) strains showed enterotoxigenic potential. The 50% analysed strains showed antimicrobial resistance properties at least at one of antibiotics tested, and among those resistant population 54,54% strains were characterized by multiple resistance. The obtained results presented the strong argument in risk characterization.

Mossel D A A, Corry J E L, Struijk C B, Baird R M, (1995): Essentials of the microbiology of foods. A textbook for advanced studies. John Wiley and Sons (eds), Chichester, England, 146-150.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), (2002): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; twelfth informational supplement, NCCLS document M100-S12 22, 56-8.

Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Corrente, M., Parisi, A., Santagada, G., Firinu a., Crisetti, E., Celano G. V. (2007): Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 115, 290-296

Perreten V., Giampa N., Schuler-Schmid U. and Teuber M. (1998): Antibiotic resistance genes in coagulase-negative staphylococci isolated from food. *System. Appl. Microbiol.* 21: 113–120

Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje prerade i prometa (Sl. Glasnik RS broj 72/10).

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

Schelin J, Wallin – Carlquist N, Thorup Cohn M, Lindqvist R, Barker G, Rådström P. (2011): The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence* 2:6, 580-592

Schmitz FJ, Steiert M, Hofmann B, Verhoef J, Hadding U, Heinz HP, Kohrer K (1998): Development of a multiplex-PCR for direct detection of the genes for enterotoxin B and C and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Med. Microbiol.* 47: 335-340.

Spanu V, Virdis S, Scarano C, Cossu F. (2010): Antibiotic resistance assessment in *S. aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. *Vet Res Commun* 34 (Suppl): S87-S90

Teale C J, (2002): Antimicrobial resistance and the food chain. *J Appl Microbiol.*, 92:85S-89S

Witte, W., (1997): Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in humans. In: Chadwick, D.J., Goode, J. (Eds), Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread, Ciba Foundation Symposium 207. Wiley, Chichester, pp. 61-75.

LITERATURA

Bergdoll M S (1989): *Staphylococcus aureus*, p. 247-254. In M.P.Doyle (ed), Food-borne Bacterial Pathogens. *Marcel Dekker, Inc, New York, N.Y.*

Chiang, Y., Liao, W., Fan, C., Pai, W., Chiou, C., Tsen, H., (2008): PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 66–73.

COMMISSION REGULATION (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs

Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RAO, Araújo Jr. JP, (2006): Detection of Enterotoxins genes in coagulase-negative Staphylococci isolated from foods. *Braz. J. Microbiol.* 37: 64-69.

Hennekinne J. A., De Buyser M. L., Dragacci S. (2011): *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* 36(4):815-36

Lopez-Pedemonte T, Roig-Sagues A X, De Lamo S, Gervilla R, Guamis B. (2007): High hydrostatic pressure treatment applied to model cheeses made from cow's milk inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 18: 441–447.

Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., Castiglioni, B. (2007): Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Vet. Microbiol.* 124, 66–72.

Key words: staphylococci • enterotoxigenic potential • antimicrobial resistance • risk