

UNIVERZITET U BEOGRADU

Fakultet veterinarske medicine

Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla

mr Radoslava R. Savić Radovanović, dipl.veterinar

**PROCENA RIZIKA OD NALAZA
ENTEROTOKSINA STAFILOKOKA U MEKIM
SIREVIMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE
Faculty of Veterinary Medicine
Department of Food Hygiene and Technology

Radoslava R. Savić Radovanović, Bsc, DVM

**RISK ASSESMENT OF STAPHYLOCOCCAL
ENTEROTOXINS OCCURRENCE IN SOFT
CHEESES**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2015

Komisija za odbranu Doktorske disertacije

Mentor : **Dr Vera Katić**, redovni profesor za užu naučnu oblast Higijena i tehnologija mleka, Fakultet Veterinarske medicine, Beograd

Članovi:

Dr Zora Mijačević, redovni profesor za užu naučnu oblast Higijena i tehnologija mleka, Fakultet Veterinarske medicine, Beograd

Dr Branko Velebit, naučni saradnik, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

Datum odbrane:

Zahvaljujem se Prof. Dr Veri Katić na mentorskom radu, usmeravanju u toku rada, dragocenim savetima i pomoći prilikom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof. Dr Zori Mijačević na pomoći i korisnim sugestijama, koje su doprinele boljem prikazu i tumačenju rezultata.

Zahvaljujem se Dr Branku Velebitu, naučni saradnik na svesrdnoj pomoći u toku eksperimenta i primeni PCR tehnike za dobijanje rezultata.

Zahvaljujem se Svetlani Čolović, specijalisti mikrobiologije na pomoći u toku dela eksperimenta, koji se odnosio na primenu ELFA tehnike.

Zahvaljejem se Julijani Vrhunc i Siniši Bradonjiću, republičkim veterinarskim inspektorima Ministarstva poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva Vlade Republike Srbije, koji su mi pomogli oko uzorkovanja i koordinacije sa kolegama veterinarskim inspektorima na terenu.

Hvala profesorki engleskog jezika Nevenki Bjelici, Bsc za korekturu teksta na engleskom jeziku.

Hvala kolegama Nemanji Zdravkoviću, doktorandu i Tamásu Csordásu, studentu, koji su mi pomogli oko tehničke obrade teksta i kolegi Srećku Čupiću, dipl.veterinaru na podršci.

Hvala svim prijateljima i kolegama, koji su me podržali, a posebnu zahvalnost dugujem mojoj deci Teodori i Dragutinu, jer su u bili uz mene.

Rad posvećujem senima mojih predaka Radovanovića i Miljkovića.

Sa posebnim pijetetom mom tati Radisavu V. Radovanoviću, dipl.ing. elektrotehnike i prof.DrVasiliju S.Miljkoviću, intelektualnim gromadama, koji su bili stubovi u mom životu.

Žao mi je što moj učitelj prof.Dr Lazar Stojanović, koji je verovao u mene nije više među nama.

Procena rizika od nalaza enterotoksina stafilokoka u mekim sirevima

Kratak sadržaj

Procena rizika je naučno baziran proces koga čine identifikacija hazarda, karakterizacija hazarda, procena izloženosti i karakterizacija rizika. U kontekstu bezbednosti hrane rizik predstavlja verovatnoću i posledice da nastane štetno delovanje na zdravlje ljudi posle konzumiranja hrane. Sirevi kao hrana zauzimaju važno mesto u ishrani ljudi. U Evropi se danas oko 10% sireva proizvodi od sirovog mleka i ovi sirevi mogu da predstavljaju potencijalni rizik po javno zdravlje. U Republici Srbiji veliki broj sireva, prisutan na tržištu gradskih pijaca, proizvodi se u domaćinstvima i može se svrstati u grupu mekih sireva bez zrenja ili sa zrenjem. Budući da se određen broj mekih sireva proizvodi od nekuvanog mleka, kao deo tradicije, postoji mogućnost da sa sirovim mlekom u sir dospeju patogeni mikroorganizmi kao što su koagulaza pozitivne stafilokoke. Glavni predstavnik koagulaza pozitivnih stafilokoka je *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. Kao ubikvitarni mikroorganizam nalazi se na koži ljudi i životinja, a često kolonizuje *ductus papillaris* mlečne žlede muznih životinja. Sa aspekta bezbednosti hrane značaj ovog mikroorganizma se ogleda u tome što stvara termostabilne enterotoksine koji uneti u određenoj količini, putem hrane, u organizam čoveka izazivaju intoksikacije.

Cilj ove doktorske disertacije je bio da se, na osnovu broja koagulaza pozitivnih stafilokoka u siru, uslova za njihovo razmnožavanje i stvaranje enterotoksina, kao i prisustva gena za sintezu enterotoksina kod koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz sira, proceni rizik od nalaza enterotoksina stafilokoka u mekim sirevima.

Ispitivanjem je obuhvaćeno 555 uzoraka mekih sireva različite starosti proizvedenih od kuvanog ili nekuvanog mleka u individualnim domaćinstvima iz različitih geografskih lokaliteta u Srbiji, koji su uzeti sa 17 pijaca.

Izolacija, identifikacija i određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka rađeni su standardnom metodom (SRPS EN ISO 6888-2), a broj *Lactococcus spp.* i *Lactobacillus spp.* je određen metodom opisanom u standardu ISO 27205:2010 (IDF 149:2010).

Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokoka do vrste rađena je na osnovu biohemijskih osobina pomoću BBLCrystal Identifikacionim sistemom-BD i ID 32

Staph-Biomerieux (Francuska). Sposobnost izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka da stvaraju klasične enterotoksine (SEA, SEB, SEC, SED, SEE), kao i prisustvo enterotoksina u siru ispitani su primenom ELFA tehnike VIDAS SET2 (BioMerieux, Francuska). Fenotipska identifikacija izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, za koje je ELFA tehnikom dokazano da stvaraju enterotoksine, rađena je primenom ID 32 Staph-Biomerieux (Francuska). Prisustvo gena za sintezu enterotoksina stafilokoka (SE) u dobijenim ekstraktima DNK iz 26 izolata enterotoksogenih koagulaza pozitivnih stafilokoka ispitano je konvencionalnom multipleks PCR tehnikom (za gene *sea* i *seb*), odnosno tehnikom Real-Time PCR (za gene *sec*, *sed* i *see*). Za dokazivanje prisustva *sea* gena korišćeni su prajmeri *sea-f* (5'-TCAATTTATGGCTAGACGGTAAACAA-3') i *sea-r* (5'-GAAGATCCAACCTCCTGAACAGTTACA-3'), za prisustvo gena *seb* korišćeni su prajmeri *seb-f* (5'-AACAACTCGCCTTATGAAACGGGAT-3') i *seb-r* (5'-CTCCTGGTGCAGGCATCATGTCA-3'), za dokazivanje gena *sec* korišćeni su prajmeri *sec-f* (5'-CGTATTAGCAGAGAGCCAACCA-3') i *sec-r* (5'-GTGAATTTACTCGCTTTGTGCAA-3'), za dokazivanje gena *sed* korišćeni su prajmeri *sed-f* (5'-AAACGTTAAAGCCAATGAAAACA-3') i *sed-r* (5'-TGATCTCCTGTACTTTTATTCTCCTA-3'), a za dokazivanje gena *see* korišćeni su prajmeri *see-f* (5'-TACCAA TTAACCTTGTGGATAGAC-3') i *see-r* (5'-CTCTTTGCACCTTACCGC-3').

Od ukupno 555 uzoraka sireva različite starosti, proizvedenih od kuvanog ili nekuvanog mleka, koagulaza pozitivne stafilokoke su dokazane u 168 (30,27%) uzoraka sira. Od 168 uzoraka sira, u kojima su dokazane koagulaza pozitivne stafilokoke, 140 (83,33%) uzoraka sira proizvedeno je od nekuvanog mleka, a 28 (16,67%) uzoraka sira proizvedeno je od kuvanog mleka. Primenom skrining tehnike VIDAS SET2 (BioMerieux, Francuska) dokazano je da od 85 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka 26 (30,59%) izolata ima sposobnost da stvara klasične enterotoksine (SEA-SEE). Od 26 enterotoksogenih primoizolata 20 (76,92%) izolata je bilo poreklom iz uzoraka sireva proizvedenih od nekuvanog mleka, a 6 (23,08%) izolata poreklom iz uzoraka sireva proizvedenih od kuvanog mleka. Primenom ID 32 Staph-Biomerieux (Francuska) testa izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka, koji su stvarali enterotoksine, najčešće su identifikovani kao *S. aureus* (61,54% izolata), zatim *S. xylosus* (15,38 % izolata), *S. lentus* (11,54% izolata) *S. sciuri* (11,54 % izolata).

Kod svih 26 primoizolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, poreklom iz sireva proizvedenih od kuvanog ili nekuvanog mleka za koje je ELFA tehnikom utvrđeno da stvaraju enterotoksin, dokazan je gen za enterotoksin A (*sea*), a kod 24 izolata je pored *sea* gena dokazan i gen za sintezu enterotoksina B (*seb*). Nijedan izolat nije posedovao gene za sintezu enterotoksina C (*sec*), D (*sed*) i E (*see*). Od 26 uzoraka u kojima su dokazane enterotosogene koagulaza pozitivne stafilokoke, enterotoksini su dokazani u 2 (7,69%) uzorka slatko-koagulišućeg sira proizvedenog od nekuvanog mleka u kojima je broj enterotoksogenih koagulaza pozitivnih stafilokoka bio iznad 5 log cfu/g sira. Slatko-koagulišućí sirevi proizvedeni od nekuvanog mleka u kojima je broj koagulaza pozitivnih stafilokoka veći od 5 log cfu/g i u kojima je pH iznad 5,0 mogu da sadrže enterotoksine u količinama koje izazivaju intoksikacije i predstavljaju rizik po zdravlje ljudi.

Ključne reči: koagulaza pozitivne stafilokoke, *S. aureus*, meki sirevi, enterotoksini

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Higijena i tehnologija mleka

UDK 579.67:637.352.

Risk assessment of staphylococcal enterotoxins occurrence in soft cheeses

Summary

Risk assessment is a scientifically based process consisting of hazard identification, hazard characterization, exposure assessment and risk characterization. A risk in the food safety context is the probability and the consequences of adverse health effects following the ingestion of food. Cheeses represent an important part in the human diet. Approximately 10% of cheese in Europe is made from raw milk, presenting a considerable potential risk to public health. In Serbia, a large number of cheeses present at the town markets is produced in households and can be classified as soft cheeses regardless ripening. Since some soft cheeses are produced from raw milk in accordance with our tradition, there is a possibility that the pathogenic microorganisms, such as coagulase-positive staphylococci pass into cheese from raw milk. The main representative of coagulase-positive staphylococci is *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. As a ubiquitous microorganism is often present on the skin of humans and animals, and often colonizes *ductus papillaris* of dairy animals. From the point of view food safety this microorganism is significant because it may produce thermostable enterotoxins which ingested in a certain amount via food causes intoxication in the human organism.

The aim of this PhD thesis was to assess the risk of staphylococcal enterotoxin occurrence in soft cheeses on the basis of number of coagulase-positive staphylococci in cheese, conditions for their growth, synthesis of enterotoxins, and the presence of genes for enterotoxin synthesis in coagulase positive-staphylococci isolated from cheese, as well to assess the risk of staphylococcal enterotoxins occurrence in soft cheeses.

The material consisted of 555 samples of soft cheeses of different ages produced of raw, or cooked milk in individual households at different geographic localities in Serbia, and obtained from 17 markets.

In order to isolate and determine the number of coagulase-positive staphylococci, the standard method (SRPS EN ISO 6888-2) was used and the number of *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. was determined by the method described in ISO 27205: 2010 (IDF 149: 2010) standard.

The BBL Crystal Identification Systems BD and ID 32 Staph-Biomerieux (France) were used to identify coagulase-positive staphylococci to the species level on the basis of their biochemical characteristics. The ELFA technique VIDAS SET2 (BioMerieux, France) was used for testing coagulase-positive staphylococci isolates to produce classical enterotoxins (SEA, SEB, SEC, SED, SEE), and the occurrence of enterotoxins in cheese samples. The phenotypic identification of coagulase-positive staphylococci isolates, which were positive enterotoxin producers, was used ID 32 Staph-Biomerieux test (France). The presence of *se* genes for synthesis of staphylococcal enterotoxins (SE) in the obtained extracts of DNA from 26 enterotoxigenic coagulase isolates was detected by conventional multiplex PCR technique (for genes *sea* and *seb*) i.e the Real-Time PCR technique (for genes *sec*, *sed* and *see*).

In order to prove the presence of the *sea* gene the following primers *sea*-f (5'-TCAA TTTATGGCTAGACGGTAAACAA-3') and *sea*-r (5'-GAAGATCCAACCTCCTGAA CAGTTACA-3') were used; for the gene *seb* primers *seb*-f (5'-AACAACTCGCCT TATGAAACGGGAT-3') and *seb*-r (5'-CTCCTGGTGCAGGCATCATGTCA-3') were used; for the gene *sec* were used primers *sec*-f (5'-CGTATTAGCAGAGAGCCAA CCA-3') and *sec*-r (5'-GTGAATTTACTCGCTTTGTGCAA-3'); for the gene *sed* were used the primers *sed*-f (5'-AAACGTTAAAGCCAATGAAAACA-3') and *sed*-r (5'-TG ATCTCCTGTACTTTTATTTTCTCCTA-3'); and for the *see* were used the primers *see*-f (5'-TACCAATTAACCTTGTGGATAGAC-3') and *see*-r (5'-CTCTTTGCACCTT ACCGC -3').

Out of the total of 555 cheese samples different ages, made from raw or cooked milk, coagulase-positive staphylococci were present in 168 (30.27%) samples. Out of 168 samples of cheeses in which coagulase-positive staphylococci were present, 140 (83.33%) samples were produced from raw milk and 28 (16.67%) samples were produced from cooked milk. Using the screening method VIDAS SET2 (BioMerieux, France), it was found that out of 85 isolates of coagulase-positive staphylococci 26 (30.59%) isolates produced classical enterotoxins (SEA-SEE). The isolates of enterotoxigenic coagulase-positive staphylococci were identified as *S. aureus* (61.54% of isolates), *S. xylosum* (15.38% of isolates), *S. lentus* (11.54% of isolates), *S. sciuri* (11.54% of isolates) by using the ID 32 Staph-Biomerieux (France) test.

In all 26 isolates of coagulase-positive staphylococci originating from cheeses produced from raw or cooked milk, which were enterotoxin producers the gene for enterotoxin A (*sea*) was present, and in 24 isolates in addition the *sea* gene, the gene for the synthesis of enterotoxin B (*seb*) was detected. None of the isolates possessed the genes for the synthesis of enterotoxin C (SEC), D (SED) and E (SEE). Out of 26 tested cheese samples positive for enterotoxigenic coagulase-positive staphylococci, enterotoxin was detected in 2 (7.69%) sample sweet-coagulating cheese, made from raw milk in which the number of enterotoxigenic coagulase-positive staphylococci was more than 5 log cfu/g. In sweet-coagulated cheeses made from raw milk in which the number of coagulase-positive staphylococci was more than 5 log cfu/ g and the pH value was higher than 5.0, enterotoxins may be present in amounts sufficient to cause intoxication, thus they represent a risk to human health.

Keywords: coagulase-positive staphylococci, *S. aureus*, soft cheeses, enterotoxins

Scientific area: Veterinary Medicine

Special topics: Milk Hygiene and Technology

UDK number: 579.67: 637 352.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Procena rizika	4
2.1.1. Identifikacija hazarda	4
2.1.2. Karakterizacija hazarda	11
2.1.3. Procena izloženosti	20
2. 2. Faktori koji utiču na rast <i>S. aureus</i> i stvaranje enterotoksina	41
2.2.1. Uticaj temperatura na rast <i>S. aureus</i>	41
2.2.2. Uticaj pH na rast <i>S. aureus</i>	42
2.2.3. Uticaj organskih kiselina na rast <i>S. aureus</i>	42
2.2.4. Uticaj soli i aktivnosti vode (a_w) na rast <i>S. aureus</i>	43
2.2.5. Uticaj atmosfere na rast <i>S. aureus</i>	44
2.2.6. Uticaj kompetitivnih mikroorganizma na rast <i>S. aureus</i>	44
2.2.7. Uticaj sadržaja masti na rast <i>S. aureus</i>	45
2.2.8. Uticaj tempeartura na stvaranje enterotoksina stafilokoka.....	45
2.2.9. Uticaj pH na stvaranje enterotoksina stafilokoka	45
2.2.10. Uticaj aktivnost vode (a_w) na stvaranje enterotoksina stafilokoka	46
2.2.11. Uticaj kompetitivnih mikroorganizama na stvaranje enterotoksina stafilokoka	46
2.2.12. Uticaj atmosfere na stvaranje enterotoksina stafilokoka	46
2.2.13. Uticaj hranljivih materija na stvaranje enterotoksina stafilokoka.....	47
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA.....	48
4. MATERIJAL I METODE RADA	49
4.1. Materijal.....	49
4.1.1. Sirevi	49
4.1.2. Mikroorganizmi	49
4.1.3. Podloge.....	51
4.1.3.1. Podloga za izolaciju i određivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka i <i>Staphylococcus aureus</i>	52

4.1.3.2. Podloga za određivanje broja <i>Lactococcus</i> spp.	52
4.1.3.3. Podloga za određivanje broja <i>Lactobacillus</i> spp.	53
4.1.3.4. Sredstvo za razblaživanje i decimalna razblaženja uzoraka sira	53
4.1.3.5. Podloga za umnožavanje <i>Staphylococcus aureus</i> i ispitivanje sposobnosti izolata da stvaraju enterotoksine	54
4.1.3.6. Krvni agar za ispitivanje sposobnosti koagulaza pozitivnih stafilocoka da stvaraju hemolizine	54
4.1.3.7. Podloga za čuvanje izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka i <i>Staphylococcus aureus</i>	55
4.1.3.8. Plazma kunića za koagulaza test.....	55
4.1.4. Testovi za identifikaciju koagulaza pozitivnih stafilocoka.....	56
4.1.4.1. BBL Crystal Identifikacioni sistem (Gram-Positive ID Kit)	56
4.1.4.2. ID 32 STAPH -Identifikacioni sistem (BioMerieux, Francuska)	56
4.1.4.3. VIDAS Staphylococcal enterotoxin test SET 2, 30701 (BioMerieux, Francuska).....	57
4.1.5. Reagensi i oprema za ekstrakciju enterotoksina stafilocoka iz sira.....	57
4.1.6. Reagensi za ispitivanje prisustva gena za sintezu enterotoksina stafilocoka (SEA-SEE).....	58
4.2. Metode	59
4.2.1. Uzorkovanje sireva	59
4.2.2.1. Određivanje pH sira.....	59
4.2.2.2. Određivanje aktivnosti vode (a_w)	60
4.2.2.3. Određivanje sadržaja natrijum hlorida (NaCl) u siru.....	60
4.2.2.4. Određivanje sadržaja masti u siru.....	61
4.2.2.5. Određivanje suve materije sira	62
4.2.2.6. Određivanje sadržaja vode u siru	62
4.2.2.7. Određivanje sadržaja vode u bezmasnoj materiji sira	62
4.2.3. Dokazivanje enterotoksina	63
4.2.4. Ispitivanje prisustva gena za sintezu enterotoksina kod izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz sireva.....	63
4.2.5. Ispitivanje prisustva enterotoksina u sirevima	66
4.2.6. Bakteriološke metode	68

4.2.6.1. Priprema osnovnog i decimalnih razblaženja uzoraka sireva	68
4.2.6.2. Izolacija i određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilocoka u sirevima	68
4.2.6.3. Ispitivanje sposobnosti izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka da stvaraju hemolizine	68
4.2.11.5. Određivanje ukupnog broja <i>Lactococcus</i> spp. i <i>Lactobacillus</i> spp. u sirevima	68
4.2.11.6. Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz sireva ...	69
5. REZULTATI.....	72
5.1. Rezultati određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilocoka i <i>Lactococcus</i> spp. i <i>Lactobacillus</i> spp. u mekim sirevima	72
a. Rezultati određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilocoka u mekim sirevima	72
b. Rezultati određivanja broja <i>Lactococcus</i> spp. i <i>Lactobacillus</i> spp. u mekim sirevima proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka	75
5.2. Rezultati određivanja fizičko-hemijskih parametara (pH, sadržaj NaCl, masti, suve materije i aktivnost vode) u sirevima proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka.....	77
5.3. Rezultati identifikacije odabranih izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz mekih sireva.....	82
5.3.1. Rezultati ispitivanja sposobnosti koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz mekih sireva da stvaraju hemolizu	82
5.3.2. Rezultati biohemijske identifikacije odabranih izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz sireva proizvedenih od kuvanog i nekuvanog mleka.....	82
5.4. Rezultati ispitivanja sposobnosti koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz mekih sireva da stvaraju enterotoksine.....	83
5.5. Rezultati identifikacije gena za sintezu enterotoksina u koagulaza pozitivnim stafilocokama izolovanim iz mekih sireva	85

5.6. Rezultati ispitivanja prisustva enetroksina u sirevima proizvedenim od kuvanog ili nekuvanog mleka	91
6. DISKUSIJA	95
7. ZAKLJUČCI.....	108
8. LITERATURA.....	110
9. PRILOZI	131

1. UVOD

Sirevi kao hrana zauzimaju veoma važno mesto u ishrani ljudi. Proizvodnja sireva datira iz daleke prošlosti i imala je značaja u svim civilizacijama. Sirevi se tradicionalno proizvode u Srbiji vekovima, predstavljaju kulturno nasleđe i akumulirano iskustveno znanje, koje se prenosi sa generacije na generaciju. Istorijski gledano u srednjem veku glavna mesta gde se odvijala proizvodnja sireva su bili manastiri i feudalni posedi, tako da mnoge grupe današnjih sireva potiču iz tog vremena. Tradicionalan način proizvodnje sira zadržao se sve do XIX veka, a sticanjem znanja iz mikrobiologije i hemije mleka, upoznavanjem postupaka tokom dobijanja sireva i mogućnošću kontrole procesa, proizvodnja sireva se širila i razvijala poprimajući industrijski karakter. Danas je u zemljama razvijenog sveta više prisutna industrijska proizvodnja naspram tradicionalnog načina dobijanja sireva. U Srbiji je razvoj industrijske proizvodnje sireva započeo početkom XX veka, ali i danas značajan deo sireva, koji se mogu naći na tržištu se proizvodi na tradicionalan način u domaćinstvima i malim zanatskim pogonima za preradu mleka.

Prema definiciji ekspertske grupe FAO/WHO, sir predstavlja svež, ili sazreo proizvod od mleka, koji se dobija posle koagulacije proteina i odvajanja surutke iz mleka, pavlake, delimično obranog mleka, mlaćenice, ili mešavine ovih poluproizvoda. Sir spada u hranu spremnu za konzumiranje, što znači da se ne podvrgava dodatnim termičkim tretmanima pre konzumiranja. Sirevi, koji se mogu naći na tržištu gradskih pijaca se proizvode u individualnim domaćinstvima od kuvanog ili nekuvanog mleka, a poreklom su iz različitih geografskih lokaliteta u Srbiji. U procesu proizvodnje ovih sireva koagulacija se odvija dodavanjem sirila u mleko, bez dodavanja poznatih starter kultura, što znači da u procesu zrenje učestvuje samo prirodna mikroflora mleka. Prema važećoj zakonskoj regulativi u našoj zemlji sirevi se u promet mogu staviti kao: sirevi sa zrenjem i sirevi bez zrenja. Sirevi sa zrenjem su sirevi, koji moraju imati proces zrenja sa definisanim periodom u toku kojeg se dešavaju odgovarajuće biohemijske i fizičke promene i na taj način poprimaju svoje specifične senzorne karakteristike, što mora biti naznačeno u proizvođačkoj specifikaciji. Nasuprot tome, sirevi bez zrenja su sirevi koji se mogu koristiti neposredno posle proizvodnje. U Evropi se danas oko 10% sireva proizvodi od sirovog mleka. Sa sirovim mlekom mogu da

dospeju patogeni mikroorganizmi i na taj način ovi sirevi neposredno posle proizvodnje mogu da predstavljaju potencijalni rizik po javno zdravlje.

U Republici Srbiji veliki broj sireva, prisutan na tržištu gradskih pijaca, se može svrstati u grupu sireva bez zrenja. Budući da se određen broj sireva bez zrenja proizvodi od nekuvanog mleka kao deo tradicije, postoji mogućnost da sa sirovim mlekom u sir dospeju patogeni mikroorganizmi kao što su koagulaza pozitivne stafilokoke.

Stafilokoke su aerobne, fakultativno anaerobne bakterije, koje se taksonomski svrstavaju u familiju *Staphylococcaceae* rod *Staphylococcus*. Do danas je opisano 50 vrsta i podvrsta stafilokoka. Na osnovu sposobnosti da stvaraju enzim koagulazu razvrstavaju se na koagulaza pozitivne i koagulaza negativne stafilokoke. Glavni predstavnik koagulaza pozitivnih stafilokoka je *Staphylococcus aureus subsp. aureus*. Kao ubikvitarni mikroorganizam *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) živi na koži ljudi i životinja, a često kolonizuje *ductus papillaris* mlečne žlezde krava i može da prouzrokuje supkliničke mastitise. Bitna karakteristika mikroorganizma je sposobnost da stvara ekstracelularne enzime i toksine, od kojih su mnogi patogeni za čoveka i životinje. Sa gledišta higijene mleka značaj ima sposobnost *S. aureus* da sintetiše termostabilne enterotoksine, koji mogu da izazovu alimentarna trovanja ljudi. Trovanja hranom izazvana stafilokokama su intoksikacije, koje nastaju konzumiranjem hrane koja sadrži dovoljnu količinu (<1µg/kg telesne mase konzumenta) jednog, ili više enterotoksina. Do danas je opisano 11 enterotoksina stafilokoka (SE) i 11 enterotoksinima sličnih proteina (SEL).

Prema izveštaju EFSA-e iz 2014. godine 777 epidemija zabeleženih u 2012. godini su bile izazvane toksinima *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. i koagulaza pozitivnih stafilokoka. Trovanja izazvana enterotoksinima stafilokoka su na drugom mestu oboljenja izazvanih hranom. Od ukupnog broja zabeleženih oboljenja 346 je bilo izazvano enterotoksinima stafilokoka od kojih je u 20% slučajeva sir bio uzrok trovanja. Hrana, koja se dovodi u vezu sa trovanjima enterotoksinima stafilokoka je hrana bogata proteinima, koja se proizvodi u zanatskim uslovima, kod kojih je proces proizvodnje praćen manuelnom manipulacijom, često u kombinaciji sa neadekvatnom termičkom obradom i čuvanjem hrane. Često mnogi slučajevi ovih trovanja prođu nezapaženo iz razloga što je inkubacioni period kratak, male epidemije se ne prijavljuju, postoje greške u dijagnostici, nepravilnosti tokom uzimanja uzoraka i grešaka u laboratorijskoj

dijagnostici. Za nastajanje dovoljne količine enterotoksina, koja može da izazove intoksikacije ($<1\mu\text{g/kg}$ telesne mase konzumenta) potrebno je više od 10^5 cfu *S. aureus*/g sira. Stoga je u Pravilniku o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa (Službeni glasnik RS 72/10) predviđeno da se proizvodna partija sira mora ispitati na prisustvo enterotoksina stafilokoka ako se utvrdi više od 10^5 cfu koagulaza pozitivnih stafilokoka/g sira u fazi proizvodnje sira kada se očekuje da je njihov broj najveći. Budući da nema dovoljno podataka o intoksikacijama enterotoksinima stafilokoka posle konzumiranja sireva proizvedenih u domaćinstvu, a sirevi od nekuvanog mleka su prisutni na tržištu, smatarli smo da bi bilo korisno da se ispituju sirevi, koji se proizvode od nekuvanog ili kuvanog mleka u zanatskim uslovima i domaćinstvu i na taj način proceni da li postoji rizik od intoksikacija enterotoksinima stafilokoka nakon konzumiranja tako proizvedenog sira.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Procena rizika

Procena rizika zajedno sa upravljanjem rizikom i obaveštavanjem o riziku čini proces analize rizika. U kontekstu bezbednosti hrane rizik predstavlja verovatnoću i posledice da nastane štetno delovanje na zdravlje ljudi posle konzumiranja hrane. Procena rizika obuhvata: 1. Identifikaciju hazarda, 2. Karakterizaciju hazarda, 3. Procenu izloženosti i 4. Karakterizaciju rizika.

U proceni rizika od stvaranja enterotoksina koagulaza pozitivnih stafilokoka u mekim sirevima bez zrenja prvi korak bi bio identifikacija hazarda u okviru koga će biti opisane koagulaza pozitivne stafikoke i toksini koje stvaraju. Biologija, ekologija, patogenost koagulaza pozitivnih stafilokoka i problem, koji predstavljaju kao hazard u hrani su dobro proučeni i opisani u literaturi.

2.1.1. Identifikacija hazarda

Stafilokoke su gram-pozitivne koke (prečnika 0,5-1,5 μ m), koje su pojedinačne, u parovima, tetradama, kratkim lancima (tri, ili četiri ćelije), i u nepravilnim paketićima kao grozdovi.

Karakteristike stafilokoka

Minimalni standardi za svrstavanje mikroorganizma u rod *Staphylococcus* obuhvataju genotipske i fenotipske kriterijume (**Freney i sar. 1999**).

Genotipski kriterijumi

DNK stafilokoka sadrži guanin+citozina (G+C) od 30 do 39 mol%. Drugi genotipski kriterijumi, koji se uzimaju za svrstavanje nepoznatih vrsta u rod *Staphylococcus* se baziraju na filogenetskom stablu konstruisanom poređenjem sekvenci 16S rRNK, ili 23S RNK. Stafilokoke se mogu podeliti na osnovu analize gena 16S rRNK sekvenci i na osnovu ispitivanja celog genoma DNK na nekoliko filogenetskih grupa vrsta. Vrste u okviru ovih grupa obično imaju zajedničke karakteristike, teško se razlikuju između sebe i mogu da nastanjuju slične ekološke niše, ili pokazuju isti patogeni potencijal.

Fenotipski kriterijumi

Stvaranje katalaze je karakteristika svih *Staphylococcus* vrsta, izuzev *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* i *Staphylococcus saccharolyticus*. Stafilokoke su fakultativni anaerobni mikroorganizmi, izuzev *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* i *Staphylococcus saccharolyticus*, koji su striktni anareobi. Ultrastruktura i hemijski sastav ćelijskog zida stafilokoka su tipični za gram-pozitivne bakterije i čine ga peptidoglukani, tejkonska kiselina i proteini (Bevaridge, 2000; Schleifer i Kandler, 1972).

Na osnovu koagulaza testa, sposobnosti da stvaraju enzim koagulazu rod *Staphylococcus* se deli na koagulaza-pozitivne i koagulaza-negativne stafilokoke. Stvaranje koagulaze, enzima koji koaguliše plazmu kunića najčešće se koristi i opšte je prihvaćen kriterijum u identifikaciji patogenih stafilokoka, koje se dovode u vezu s akutnim infekcijama. Stafilokoke su među najčešćim uzročnicima bakterijskih infekcija kod ljudi, a *Staphylococcus aureus* je najznačajnija patogena vrsta stafilokoka. U veterinarskoj medicini 3 vrste stafilokoka imaju značaj kao patogeni uzročnici: *S. aureus*, *S. intermedius* i *S. hyicus* (Devriese, 1990). *S. aureus* i *S. intermedius* su koagulaza pozitivne, dok je stvaranje koagulaze varijabilno kod *S. hyicus*, uglavnom negativno, ili slabo pozitivno (Kloss i Schleifer, 1986). Još dve vrste stafilokoka imaju sposobnost da stvaraju koagulazu *S. delphini* i *S. schleiferi*. *S. delphini* je opisan kod delfina 1988. godine (Varaldo i sar. 1988). *S. schleiferi* je sve do 1990. godine svrstavan u koagulaza-negativne stafilokoke, kada je opisana nova podvrsta *S. schleiferi* subsp. *coagulans* posle izolacije kod otitisa pasa, koja je imala sposobnost da stvara koagulazu. Sve vrste stafilokoka, sem *S. aureus* pripadaju filogenetski blisko srodno *S. intermedius*-*S. hyicus* grupi vrsta.

Opšte karakteristike *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* pripada rodu *Staphylococcus* i familiji *Staphylococcaceae* (Euzéby, 2012). Mikroorganizam je prvi put opisao Sir Aleksandar Ogston, a dve godine kasnije Rozenbah je izolovao iz čiste kulture i dao ime *Staphylococcus aureus*, što potiče od grčkih reči *staphyle* (grozd) i *coccus* (zrna, ili bobice).

S. aureus je aerobni, fakultativno anaerobni, nepokretan, katalaza i koagulaza pozitivan mikroorganizam. Na mikroskopskom preparatu bakterijske ćelije su sferičnog oblika, pojedinačne koke, ili u parovima, koje formiraju klastere u vidu grozda (slika 2.1.1.). Na čvrstoj podlozi, krvnom agaru raste u vidu glatkih, konveksnih, sjajnih, okruglih kolonije prečnika 0,5-1,5 μm . U zavisnosti od uslova za rast pigmentacija kolonija varira od sive, sivo-bele boje sa žužkastim do narandžastim odsjajem i β hemolizom. Za rast su neophodni vitamini B kompleksa (tiamin i nikotinska kiselina), neorganske soli i amino kiseline kao izvor azota, naročito arginin, cistein, prolin i valin. Glutaminska kiselina, leucin i tirozin nisu neophodni za rast, ali su važni za sintezu enterotoksina. Lišavanje ovog mikroorganizma bilo koje amino kiseline više utiče na sintezu enterotoksina A, nego na sintezu enterotoksina B i C. Arginin je esencijalan za sintezu enterotoksina B (**Baird-Parker, 1990; Asperger i Zangerl, 2003; Jay, 2000**).

S. aureus spada u hemo-organotrofe sa respiratornim i fermentativnim metabolizmom. U aerobnim uslovima stvaraju kiselinu iz glukoze, laktoze, maltoze i manitola, dok se u anaerobnim uslovima kiselina dobija iz drugih šećera ili alkoholnih šećera.

Većina vrsta stafilokoka hidrolizuje prirodne životinjske proteine (kazein, želatin, fibrin), masti, fosfolipoproteine i Tween. Enzimska aktivnost *S. aureus* obuhvata stvaranje koagulaze, alkalne fosfataze, proteaze, lipaze i kod nekih sojeva lecitinaze (**Baird-Parker, 1990; Asperger i Zangerl, 2003; Jay, 2000**).

Ćelijski zid je rezistentan na lizozim i osetljiv na lisostafin, koji specifično cepa pentaglicinske mostove u zidu *S. aureus*.

Ovaj mikroorganizam je ubikvitaran u prirodi i može se naći u vazduhu, prašini, vodi, na raznim površinama u okruženju, na sluzokoži nosa ljudi, koži i dlaci toplokrvnih životinja. Kod oko 20-30% humane populacije *S. aureus* stalno kolonizuje, dok kod 60% populacije povremeno kolonizuje kožu i sluzokožu. Neki sojevi imaju sposobnost da stvaraju stafilokokne enterotoksine, koji mogu da prouzrokuju alimentarne intoksikacije.



2.1.1. Slika. Bakterijske ćelije *Staphylococcus aureus* pod elektronskim mikroskopom (20/000:1) (<http://www.micronaut.ch/>)

Taksonomija

Do danas je opisano 50 vrsta i podvrsta stafilokoka. Na osnovu sposobnosti za stvaranje enzima koagulaze, razlikuju se koagulaza pozitivne stafilokoke (KPS) i koagulaza negativne stafilokoke (KNS). Od sedam opisanih vrsta, koje pripadaju grupi koagulaza pozitivnih stafilokoka (tabela 2.1.1), kao glavni uzročnik trovanja hranom navodi se *S. aureus* subsp. *aureus*.

Tabela 2.1.1. Rod: *Staphylococcus*: koagulaza pozitivne vrste (Hennekinne i sar. 2010)

Vrsta	Glavni izvori	Referenca
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	ljudi, životinje	Rosenbach, 1884
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	ovce	De la Fuente i sar., 1976
<i>S. intermedius</i>	pas, konj, kuna, golub	Hajek, 1976
<i>S. hyicus</i>	svinje, živina	Devriese i sar., 1978
<i>S. delphini</i>	delfini	Varaldo i sar., 1988
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	pas (spoljašnji ušni kanal)	Igimi i sar., 1990
<i>S. lutra</i>	ostali	Foster i sar., 1997

Sinteza enterotoksina i faktori virulencije

Staphylococcus aureus karakterišu različiti faktori virulencije, koji se mogu podeliti u tri različite grupe, kao što su: ćelijske komponente, egzoenzimi, egzotoksini.

Ćelijske komponente

Protein A je površinski protein, koji vezuje molekule IgG preko Fc regiona. U serumu mikroorganizam vezuje molekule IgG u pogrešnom smeru (orijentaciji) što onemogućava opsonizaciju fagocita (**Grov, 1973**).

Kapsularni polisaharidi čine 11 serološki različitih tipova, koji su identifikovani kod izolata *S. aureus* poreklom od ljudi i goveda. Ovi kapsularni polisaharidi imaju ulogu da reaguju sa odbrambenim mehanizmom domaćina onemogućavajući vezivanje antitela. Takođe se vezuju za epitelne, endotelne ćelije, monocite dovodeći do oslobađanja citokina (**Soell i sar. 1995**).

Peptidoglukan i lipoteihoinjska kiselina kao komponente ćelijskog zida se ponašaju kao faktori virulencije i najverovatnije stimulišu oslobađanje citokina. Mogu da izazovu šok, ali nikada pojedinačno kao prečišćeni peptidoglukan, ili teihoinjska kiselina nisu izazvali šok kod eksperimentalnih životinja (**Projan i Novick, 1997**).

Adhezini su proteini na površini bakterijske ćelije stafilokoka, koji omogućavaju vezivanje za proteine domaćina kao što su fibronektin, laminin, vitronektin i kolagen, koji čine ekstracelularni matriks epitelnih i endotelnih površina (**Mamo i sar. 1988; Gillaspay i sar. 1998**). Određen broj izolata poseduje klamping-“clamping” faktor-fibrinogen vezujući protein, koji se vezuje za ćelije krvi i oštećeno tkivo. Interakcija sa kolagenom može takođe da bude važna za otpočinjanje vezivanja bakterije za oštećeno tkivo.

Sposobnost *S. aureus* da stvara površinske faktore, kao što su bakterijske površinske komponente koje prepoznaju adhezivne molekule matriksa, protein A, polisaharid A, peptidoglukan i klamping faktor omogućava mikroorganizmu rezistenciju na opsonofagocitozu, da stvara biofilm i adherira na matriks ćelije domaćina. Posle kolonizacije sekretuje različite egzotoksine i egzoenzime, koji su odgovorni za lezije tokom razvoja infekcije. Jednom kada *S. aureus* prodre u potkožno tkivo i dospe u krvotok, može da inficira bilo koji organ, najčešće koštano tkivo i srčane valvule (**Garzoni i Kelley, 2009**).

Egzoenzimi

1) Koagulaza

Koagulaza je ekstracelularni protein, koji se vezuje za protrombin u domaćinu i formira kompleks stafilotrombin. Aktivacija proteaze se odvija u kompleksu pri čemu fibrinogen prelazi u fibrin. Ovaj enzim ima sposobnost da koaguliše plazmu različitih vrsta životinja i čoveka. Humani izolati i izolati poreklom od životinja koagulišu plazmu kunića, konja, svinje i čoveka, dok ovčiju i goveđu plazmu koagulišu izolati poreklom od životinja. Dokaz da je koagulaza faktor virulencije je ograničavajući premda bakterije mogu da štite sebe od fagocitoze i imunološke odbrane izazivajući lokalno koagulaciju (**Projan i Novick, 1997**).

2) Lipaze

Lipaze su enzimi, koje stvaraju koagulaza pozitivne i koagulaza negativne stafilocoke. Sinteza se odvija za vreme logaritamske faze rasta i dostiže maksimum za vreme stacionarne faze stafilokoka. Ovi enzimi deluju na različite supstrate kao što su plazma, masne kiseline i ulja, koji se nalaze na površini kože. Uloga lipaza je i da omoguće stafilokokama da koriste hranljive materije iz okruženja (**Projan i Novick, 1997**). U identifikaciji *S. aureus* na podlozi po Baird-Parkeru se koristi delovanje ovih enzima na lipoprotein žumance jajeta i lipovitelin.

3) Hijaluronat liaza i hijaluronidaza

Hijaluronat liaza i hijaluronidaza predstavljaju grupu enzima, koje razlažu hijaluronsku kiselinu i u vezi su sa virulentnošću. Depolarizacija hijaluronske kiseline u vezivnom tkivu doprinosi širenju infekcije kroz razgradnju tkiva (**Farrell i sar. 1995**).

4) Proteaze

Najbolje opisana proteaza stafilokoka je serin-proteaza, poznata kao V8 proteaza. Proteaze bi trebalo da učestvuju u blokiranju aktivnosti antitela cepajući, ili inaktivirajući ih što je dokazano u uslovima *in vitro*. Druga uloga proteaza može da bude zaštita od antimikrobnih peptida, kao što su defenzini neutrofila, ili proteini krvnih pločica sa mikrobicidnim delovanjem. Proteaze mogu da doprinesu uništavanju tkivnih proteina i

povećaju invazivnost. Proteaza V8 učestvuje u razgradnji fibronektin-vezujućeg proteina, tako izazivajući širenje bakterije posle adherencije. Još jedna uloga ovih proteaza je snabdevanje hranljivim materijama iz okruženja (**McGavin i sar. 1997**). Neke stafilokoke, koje izazivaju mastitise često stvaraju u različitom stepenu proteine molekulske mase 34-36 kDa sa citotoksičnom aktivnošću (**Zhang i Maddox, 2000**).

Uloga enzima kao što su katalaza, hijaluronidaza, lipaza, termostabilna nukleaza, stafilokinaze i β -galaktozidaza je u narušavanju ćelijske strukture, razgradnji ćelijskih lipida i hijaluronske kiseline i prevodjenju fibrinogena u fibrin. Svi ovi mehanizmi čine da *S. aureus* deluje na leukocite, lojne žlezde i potkožno tkivo, povećava napredovanje infekcije i inaktiviše efekat β -laktamskih antibiotika (**Halpin-Dohnalek i Marth, 1989; Ote i sar. 2011; Post, 1999**).

Egzotoksini

1) Hemolizini i leukocidin

S. aureus može da stvara citotoksične molekule, koji se mogu podeliti u četiri klase u kojima su četiri hemolizina (α , β , γ , i δ) i leukocidin (**Dinges i sar. 2000**).

α -hemolizin je najbolje opisan hemolizin, koji najviše oštećuje ćelijsku membranu. Prijemčive ćelije, naročito trombociti i monociti u krvi ljudi imaju posebne receptore za ovaj hemolizin, omogućavajući njegovo vezivanje, što ima za posledicu formiranje pora kroz koje prolaze katjoni i na taj način oštećujući krvne ćelije.

β -hemolizin je sfingomijelinaza, koja oštećuje membrane bogate ovim lipidom. Klasičan test za dokazivanje β -hemolizina je liza goveđih i ovčijih eritrocita (**Cifrian i sar. 1996**). Ovaj hemolizin omogućava prepoznavanje većine, ali ne svih sojeva *S. aureus* u zavisnosti od vrste domaćina.

γ -hemolizin (leukotoksin) i leukocidin su proteini koji deluju udruženo oštećujući leukocite i lipidne membrane.

δ -hemolizin je veoma mali peptid koga stvara većina sojeva *S. aureus*. U literaturi je opisano da ima direktan, ili indirektan uticaj na aktivnost neutrofila i monocita, a time ima proinflamatorno delovanje (**Schmitz i sar. 1997**).

2) Toksini stafilokoka

S. aureus pored površinskih faktora, enzima i citotoksina može da stvara enterotoksine i toxic shock syndrome 1 (TST 1) toksin. Enterotoksini mogu da izazovu trovanja ljudi hranom, a TSST1 modulira imunološki odgovor domaćina (**Ote i sar. 2011**). Oslobođanje TSST-1 u krvotok može da dovede do pojave različitih ozbiljnih kliničkih komplikacija, kao što su toksični šok sindrom, iznenadne smrti novorođenčadi i Kawasaki sindrom (**Deurenberg i sar. 2005**).

2.1.2. Karakterizacija hazarda

Sa stanovišta higijene namirnica stvaranje jednog, ili više eneterotoksina (SE) je suštinsko za nastanak trovanja ljudi stafilokokama. Da bi došlo do stvaranja dovoljne količine enterotoksina, koja može da izazove intoksikacije, potrebno je da broj *S. aureus* bude veći od 10^5 cfu/g namirnice (**Jablonski i Bohach, 1997; Le Loir i sar. 2003**). Do sada poznati enterotoksini stafilokoka čine grupu serološki različitih ekstracelularnih proteina, kojima su zajedničke važne karakteristike: 1) sposobnost da izazovu emezu kod primata, 2) superanigenost kroz nespecifičnu aktivaciju T limfocita praćenu oslobađanjem citokina i sistemskim šokom, 3) otpornost na visoke temperature i digestiju pepsinom, 4) strukturna sličnost. Prema sposobnosti da izazovu emezu kod primata podjeljeni su na prave (klasične) enterotoksine (SEA-SEC) i toksine slične enterotoksinima (**Argudin i sar. 2010**).

Do danas je opisano 22 enterotoksina stafilokoka (staphylococcal enterotoxins-SEs) i enterotoksinima slična toksina (staphylococcal enterotoxin-like toxins-SEL): enterotoksin A (SEA), B (SEB), C1 (SEC1), C2 (SEC2), C3 (SEC3), D (SED), E (SEE), G (SEG), H (SEH), I (SEI), J (SEJ) (**Balaban i Rasooly, 2000**), K (SE/K) (Orwin i sar. 2001), L (SE/L), M (SE/M), N (SE/N), O (SE/O), (**Jarraud i sar. 2001**), P (S/EP) (**Omoe i sar. 2005**), Q (SE/Q) (**Orwin i sar. 2002**), R (SE/R) (Omoe i sar. 2003), S (SE/S), T (SE/T) (**Ono i sar. 2008**), U (SE/U) (**Letertre i sar. 2003**) i U2 i V, koji se nalaze na klasteru *egc*, koji kodira sintezu enterotoksinu sličnih toksina (**Thomas i sar. 2006**). Pet eneterotoksina SEA, SEB, SEC (SEC1,SEC2 i SEC3), SED i SEE, različiti u antigenoj reakciji, koji su izazvali trovanja hranom u literaturi se navode kao klasični eneterotoksini.

Enterotoksini i enterotoksinima slični toksini su globularni, ili jednolančani polipeptidi sa molekulskom masom od 22-28 kDa. Hidrolizom se dobija 18 aminokiselina, pretežno aspartamska, glutaminska kiselina, lizin i tirozin. Za većinu ovih aminokiselina izoelektrična tačka je pri pH 5,7-8,6. Na osnovu poređenja sekvenci amino kiselina enterotoksini stafilocoka (SE) i eneterotoksinima slični toksini su svrstani u četiri, odnosno 5 grupa, zavisno da li se eneterotoksin H (SEH) svrstava, ili ne u grupu 1 (**Larkine i sar.2009; Thomas i sar.2007; Ono i sar.2008; Uschyama i sar. 2006**) (Tabela 2.1.2.1.).

Tabela 2.1.2.1. Grupisanje eneterotoksina stafilocoka i eneterotoksinima sličnih toksina (SE i SEI) poređenjem sekvenci aminokiselina (**Modifikovano po Larkinu i sar. 2009**)

Grupa	SE i SEI
Grupa 1	SEA, SED, SEE, (SEH), SE/I, SE/N, SE/O, SE/P, SES
Grupa 2	SEB, SEC, SEG, SER, SE/U, SE/U2
Grupa 3	SEI, SE/K, SE/L, SE/M, SE/Q, SE/V
Grupa 4	SET
(Grupa 5)	(SEH)

Sinteza eneterotoksina stafilocoka može biti kodirana profagima (**Batley i Mekalanos, 1985**), plazmidima (**Bayles i Iandolo, 1989**), ili hromozomskim ostrvcima patogenosti (**Yarwood i sar. 2002**). Geni za sintezu enterotoksina (*se*) imaju različitu lokaciju. Sintezu klasičnih eneterotoksina kodiraju fagi (SEA), hromozomi (SEB i SEC), ili plazmidni geni (SED) (Tabela 2.1.2.2).

Plazmidi su nosioci *seb, sed, sej, ser, ses, set* gena. Fagi su umereno nosioci za gen *sea*, ali ne za gen *sec*. Hromozomska ostrvca patogenosti su nosioci gena *seb, sec, seg, seh, sei, sek, sel, sem, sen, seo, sep* i *seq*. Gen *sec* može da se nalazi na plazmidu, ili hromozomskim ostrvcima patogenosti zavisno od porekla soja (**Fitzgerald i sar. 2001**). Lokacija *se* gena na mobilnim genetskim elementima može da dovede do horizontalnog transfera gena između izolata *S. aureus* (**Hennekinne i sar. 2012**). Na primer gen *seb* se nalazi na hromozomima kod nekih kliničkih izolata (**Shafer i Iandolo, 1978**), dok je kod drugih izolata na plazmidu (**Shalita i sar. 1977**). Glavni regulatorni sistem, koji kontroliše ekspresiju faktora virulencije *S. aureus*, je *agr* sistem (“aksesorni gen regulator”) (**Kornblum i sar. 1990**). Ovaj sistem deluje u kombinaciji sa *sar* sistemom (“stafilokokni akcesorni regulator”) (**Cheung i sar. 1992; Novick i sar. 2001**).

Tabela 2.1.2.2. Karakteristike enterotoksina stafilokoka (**Hennekinne i sar. 2010**)

Tip toksina	Molekulska masa (Da)	Genetska baza	Superantigeno delovanje	Emetičko delovanje
SEA	27,100	Profag	+	+
SEB	28,336	Hromozom, plazmid, Hromozomsko ostrvce patogenosti	+	+
SEC ₁₋₂₋₃	≈27,500	Plazmid	+	+
SED	26,360	Plazmid (pIB485)	+	+
SEE	26,425	Profag	+	+
SEG	27,043	Enterotoksin gen cluster (<i>egc</i>), hromozom	+	+
SEH	25,210	transpozon	+	+
SEI	24,928	<i>egc</i> , hromozom	+	+
SE/J	28,565	Plazmid (pIB485)	+	n
SEK	25,539	Hromozomsko ostrvce patogenosti	+	n
SE/L	24,593	Hromozomsko ostrvce patogenosti	+	-
SE/M	24,842	<i>egc</i> , hromozom	+	n
SE/N	26,067	<i>egc</i> , hromozom	+	n
SE/O	26,777	<i>egc</i> , hromozom	+	n
SE/P	26,608	Profag (Sa3n)	+	n
SE/Q	25,076	Hromozomsko ostrvce patogenosti	+	-
SER	27,049	Plazmid (pIB485)	+	+
SES	26,217	Plazmid (pIB485)	+	+
SET	22,614	Plazmid (pIB485)	+	+
SE/U	27,192	<i>egc</i> , hromozom	+	n
Se/U ₂	26,672	<i>egc</i> , hromozom	+	n
Se/V	24,997	<i>egc</i> , hromozom	+	n

+: pozitivna reakcija; -: negativna reakcija; n: nepoznato

Većinu ekspresije enterotoksina stafilokoka (SE) kontroliše sistem *agr*. Tako na primer ekspresija *seb*, *sec* i *sed* gena zavisi od *agr* sistema, dok ekspresija *sea* i *sej* gena ne zavisi od ovog sistema (**Tremaine i sar. 1993; Zhang i sar. 1998**).

Sinteza enterotoksina je moguća tokom svih faza rasta *S. aureus* (SEB i SED), samo kao sekundarni metaboliti u kasnoj ekspanzionalnoj ili stacionarnoj fazi rasta (SEB i SEC). Većina sojeva *S. aureus* može da stvara jedan, ili više enterotoksina, koji su rezistentni

na proteolitičke enzime kao što su tripsin, himotripsin, renin i papain, a pri pH 2 su osetljivi na pepsin (**Baird-Parker AC, 1990, Baird-Parker T 2000; Halpin-Dohnalek i Marth, 1989; Jay, 2000; Kérouanton i sar. 2007; Normanno i sar. 2007**). Enterotoksin A (SEA), sam, ili u kombinaciji sa drugim enterotoksinima se najčešće navodi kao uzrok trovanja hranom (**Argudin i sar. 2010**). Nasuprot tome, enterotoksin C (SEC) neki autori navode kao uzrok intoksikacija nastalih posle konzumiranja proizvoda od mleka (**Norrmano i sar. 2007**). Enterotoksin A (SEA) najčešće stvaraju sojevi poreklom od ljudi, pa se nalaz ovog toksina u hrani objašnjava kontaminacijom hrane od osoba koje učestvuju u procesu proizvodnje hrane (**Akineden i sar. 2008, Rosengren i sar. 2010**).

Trovanja eneterotoksinima stafilokoka su relativno blage intoksikacije, najčešće dokazane u slučajevima alimentarnih intoksikacija nastalih posle konzumiranja mleka i proizvoda od mleka. Ranija istraživanja su pokazala da je unošenje 20-25 µg SEB (0,4 µg/kg telesne mase) izazvalo povraćanje (**Raj i Bergdoll, 1969**). Prosečna doza eneterotoksina A (SEA), koja je izazavala trovanje studenata čokoladnim mlekom u SAD, bila je 114±50 ng (**Evenson i sar. 1988**). Količina 20-100 ng enterotoksina A (SEA) je izazavala trovanje pasterizovanim mlekom (**Asao i sar. 2003**), međutim neki autori smatraju da veoma mala količina enterotoksina stafilokoka 0,5 ng/ml može da izazove oboljenje (**Murray, 2005; Evenson i sar. 1988**). Inkubacioni period zavisi od količine unetog enterotoksina (**Murray, 2005**). Najčešće je inkubacioni period kratak (2-8h), a simptomi su mučnina, povraćanje, abdominalni bolovi praćeni sa ili bez dijareje. Oboljenje traje 24-48 h posle čega dolazi do oporavka obolelih. Komplikacije su moguće kod dece i starih osoba. Dijagnoza intoksikacija izazvanih enterotoksinima stafilokoka se potvrđuje na osnovu: 1) nalaza 10^5 *S. aureus*/g hrane, 2) dokaza prisustva enterotoksina u hrani i i/ili 3) izolacije istog soja *S. aureus* kod pacijenta i iz hrane (**Bryan i sar. 1997**).

Hrana kao izvor trovanja stafilokoknim enterotoksinima

Prvi slučaj trovanja enterotoksinima stafilokoka opisan je 1884. god. u Mičigenu (SAD) nastao posle konzumiranja Cheddar sira. Nekoliko godina kasnije, 1914. godine **Barber** (1914) je dokazao da su enterotoksini stafilokoka bili uzrok trovanja nastalog posle konzumiranja mleka, koje je ostavljeno da stoji pri sobnoj temperaturi, a bilo je poreklom iz mlečne žlezde zahvaćene mastitisom.

Hrana koja je izazvala trovanja enterotoksinima stafilokoka je različita i zavisi od navika u ishrani. Hrana može da bude dobar medijum za razvoj *S. aureus* i postoje podaci da su mleko, kremovi, kolači filovani kremom, maslac, šunka, sirevi, kobasice, meso u konzervama, salate, kuvana jela i nadev za sendviče dokazani kao izvor enterotoksina u slučajevima intoksikacija ljudi. Incidencija trovanja enterotoksinima stafilokoka je sezonske prirode, jer najveći broj intoksikacija nastaje krajem leta, kada je temperatura visoka, a hrana se ne čuva na temperaturama frižidera (**Montville i Metthews, 2008**).

Da bi došlo do alimentarnih intoksikacija ljudi koagulaza pozitivnim stafilokokama treba da bude ispunjeno 5 uslova: 1) prisustvo izvora kontaminacije, koji sadrži enterotoksogene stafilokoke (sirov materijal, zdravi, ili inficirani nosioci), 2) prenos stafilokoka iz izvora u hranu (slaba higijena tokom procesa dobijanja hrane), 3) hrana, čiji sastav i fizičko-hemijske osobine podržavaju rast *S. aureus* i stvaranje enterotoksina, 4) optimalna temperatura i dovoljno vremena za rast ovog mikroorganizma i stvaranje enterotoksina i 5) unošenje hrane, koja sadrži dovoljnu količinu toksina i može da izazove simptome (**Hennekinne i sar. 2010**). U literaturi su opisani slučajevi trovanja enterotoksinima stafilokoka (**Bergdoll, 1989**) gde je sir, proizveden od mleka konatminiranog posle pasterizacije, a pre dodavanja starter kultura, bio uzrok trovanja. Rast *S. aureus* i stvaranje enterotoksina su bili mogući zbog inhibicije rasta starter kultura i izostanka fermentacije.

U zemljama EU u 2011. godini je zabeleženo 0,07 slučajeva trovanja enterotoksinima stafilokoka na populaciju od 100 000 ljudi (<0,01-0,45/100 000 zavisno od zemlje). Prema izveštaju EFSA-e (2012) tokom 2010. godine u Evropi je prijavljeno 274 epidemije izazvane enterotoksinima stafilokoka. Najčešće inkriminisana hrana u trovanjima stafilokoknim enterotoksinima se razlikuje od zemlje do zemlje. U Velikoj Britaniji 53% trovanja izazvanih stafilokokama, zabeleženih u periodu od 1969-1990.

godine, bilo je izazvano proizvodima od mesa, jelima od mesa, naročito šunkom; 22% slučajeva je nastalo posle konzumiranja živinskog mesa i jela od ovog mesa; 7% ribom i školjkama i 3,5% jajima. Mleko i proizvodi od mleka su imali udeo od 8% do 53% trovanja izazvanih enterotoksinima stafilokoka. Dokazano je da 79% izolata *S. aureus* stvara samo enterotoksin A (SEA), ili u kombinaciji sa još nekim od enterotoksina. Broj *S. aureus* u hrani se kretao od 0 do $1,5 \times 10^{10}$ cfu/g (srednja vrednost 3×10^7 cfu/g). Enterotoksin je dokazan u sirevima koji su bili uzrok 2 epidemije, a da u tim sirevima nije dokazano prisustvo *S. aureus* (**Wieneke i sar. 1993**).

U Francuskoj među prijavljenim slučajevima trovanja enterotoksinima stafilokoka tokom dve godine (1999-2000) mleko i proizvodi od mleka su bili najčešći uzrok trovanja (32%), potom meso (22%), kobasice i pite (15%), riba i morski plodovi (11%), jaja i proizvodi od jaja (11%) i živinsko meso (9,5%) (**Haeghebaert i sar. 2002**). Udeo značajnog broja proizvoda od mleka, dokazanih kao izvor enterotoksina u slučajevima trovanja, objašnjava se velikom potrošnjom sireva proizvedenih od sirovog mleka. U periodu od 1981-2002. godine u 31 epidemiji izazvanoj hranom u Francuskoj najčešće je dokazan SEA (69,7%) (**Kerouanton i sar. 2007**). Prvi slučajevi trovanja enterotoksinom E (SEE) su zabeleženi krajem 2009. godine, kada je u 6 epidemija u različitim distriktima Francuske obolelo 23 osobe. Uzrok trovanja su bili sirevi proizvedeni od nepasterizovanog mleka. U nekim od uzoraka sireva je utvrđen broj koagulaza pozitivnih stafilokoka $>1,5 \times 10^5$ cfu/g.

U Italiji, regija Pijemont u periodu od 2002. do 2010. godine, 181 osoba je obolela u epidemijama izazvanim *S. aureus* i enterotoksinima stafilokoka (**Ferrari i sar. 2011**). U literaturi je opisan slučaj porodice u kojoj su četiri člana obolela posle konzumiranja tradicionalnog jela „arancini“, koje se priprema od kuvanog pirinča i mesa i u kojem je utvrđen broj stafilokoka $>10^5$ /g i prisustvo enterotoksina SEA i SEC (**Bianchi i sar. 2013b**). U Švedskoj u periodu od 2003-2009. godine je zabeleženo 111 slučajeva i 30 epidemija, što je predstavljalo 1%, odnosno 2% ukupno prijavljenih slučajeva i epidemija nastalih posle konzumiranja hrane (**Lindqvist i sar. 2004, 2005, 2006; Linbland i sar. 2008, 2009, 2010**).

U Austriji 2007. godine opisana je epidemija u kojoj je 30 dece obolelo posle konzumiranja proizvoda od mleka u kojima su dokazane stafilokoke, koje su stvarale enterotoksine A i D (SEA i SED) (**Schmid i sar. 2009**).

U Švajcarskoj je jula 2008. godine zabeleženo trovanje troje dece 4 h posle konzumiranja kozijeg mleka u kojem je utvrđeno 5×10^7 cfu *S. aureus*/ml. Dokazano je prisustvo gena za sintezu enterotoksina D u izolatima *S. aureus* poreklom iz mleka (**Giezendanner i sar. 2009**).

U Norveškoj je zabeležena epidemija trovanja izazavna jelom od krompira pripremljenom sa sirovim mlekom. U jelu od krompira je dokazano 8×10^8 *S. aureus*/g, a *S. aureus* je dokazan i u sirovom mleku iz tanka na farmi koje je korišćeno za pripremu jela. Izolati *S. aureus* iz jela i mleka su nosili gen *seh*, a enterotoksina H (SEH) je dokazan u jelu, koje je izazvalo trovanje (**Jorgensen i sar. 2005b**).

S. aureus je u SAD sa 240.000 oboljenja godišnje značajan uzročnik trovanja hranom (**Scallan i sar. 2011**). Incidencija trovanja bi bila i veća da su zabeleženi i sporadični slučajevi (**Bennett i sar. 2013**). Trovanja zabeležena ovim mikroorganizmom u SAD od 1975-1982. godine bila su izazvana crvenim mesom (36%), salatama (12,3%), živinskim mesom (11,3%), testeninom (5,1%) i samo u 1,4% trovanja mlekom i plodovima iz mora. U 17,1% trovanja nepoznat je uzrok (**Genigeorgis, 1989**). Čokoladno mleko je bilo uzrok trovanja zabeleženog 1985. godine u Kentakiju (SAD). Ovo čokoladno mleko je bilo kontaminirano i čuvano pri visokim temperaturama 4-5h pre pasterizacije. Pasterizacijom su uništene stafilokoke, ali ne i eneterotoksini. Ovaj primer, kao i mnogi drugi ukazuju na značaj isključivanja svih izvora kontaminacije tokom procesa proizvodnje i hladjenja hrane i sastojaka hrane kada god je to moguće. Proizvodi se mogu rashlađivati pre, kao i posle termičke obrade (pasterizacija). U hrani, koja je pravilno prošla proces proizvodnje stafilokoke bivaju uništene. Noviji podaci pokazuju da je *S. aureus* u SAD bio uzrok 2,6% oboljenja, koja su izazvana hranom (**Scallan i sar. 2011**). Najčešće je u slučajevima intoksikacija, nastalih posle konzumiranja hrane, dokazan enterotoksin A (SEA) (77,8%), a zatim enterotoksin D i enterotoksin B (SED i SEB).

U Brazilu je 2004. godine zabeležena epidemija u kojoj je 4000 ljudi obolelo posle konzumiranja hrane u kojoj je dokazan *S. aureus* (**Do Carmo, 2004**). Ispitivanjem primoizolata stafilokoka, izolovanih u 16 epidemija iz proizvoda od mleka u Brazilu, najčešće su dokazani geni *sea* i *seb* za sintezu enterotoksina A (SEA) i B (SEB) (**Veras i sar. 2008**).

U azijskim zemljama je sprovedeno nekoliko istraživanja koja su pokazala da je u epidemijama izazvanim stafilokokama najzastupljeniji bio enterotoksin A (SEA). Izolati *S. aureus* poreklom od osoba obolelih tokom epidemija zabeleženih od 2001-2003. godine u Tajvanu su najčešće nosili *sea* gen, zatim *seb* i *sec* gen (**Chiang i sar. 2008**).

U Koreji oko 90% izolata *S. aureus* u trovanjima hranom su bili nosioci *sea* gena (**Cha i sar. 2006**).

U Japanu je enterotoksin A (SEA) bio najčešće uzrok trovanja (**Shimizu i sar. 2000**). U epidemijama zabeleženim u ovoj zemlji u periodu od 1995. do 1999. godine proizvodi od mleka su bili uzrok u manje od 1% epidemija.

Ikeda i sar. (2005) su opisali veliku epidemiju u Osaki 2000. godine kada je obolelo preko 10.000 ljudi posle konzumiranja pasteurizovanog mleka sa niskim sadržajem masti, za čije dobijanje je upotrebljeno mleko u prahu. U rekonstituisanom obranom mleku i mleku u prahu je dokazano prisustvo male količine SEA (80ng) i *sea* gena. Pored *sea* gena dokazano je i prisustvo *seh* gena.

U tabeli 2.1.2.3. hronološki su prikazane veće epidemije intoksikacija, izazvanih enterotoksinima stafilokoka, nastalih posle konzumiranja mleka i proizvoda od mleka,

Tabela 2.1.2.3. Epidemije trovanja eneterotoksinima stafilokoka nastale posle konzumiranja mleka i proizvoda od mleka (**Cretenet i sar. 2011**)

Zemlja	Godina	Br. slučajeva	Hrana	Tip SE	Vrsta mleka	Referenca
SAD	1884.	-	sir	-	-	Bergdol (1979)
SAD	1958.	200	sir	-	sirovo	Johnson i sar. (1990)
SAD	1965.	-	sir	-	-	Zehren i Zehren (1968)
Kanada	1977.	12	sir	-	-	Johnson i sar. (1990)
Kanada	1980.	62	sir	SEA i SEC	-	Todd i sar. (1981)
SAD	1981.	16	sir	-	pasteriz.	Aleknuse i sar.(1998)
Engleska	1983.	2	sir	-	pasteriz.	Baret (1986)
Francuska	1983.	20	sir	SEA i SED	sirovo	De Buyser i sar.(1985)
Škotska	1984.	27	sir	SEA	sirovo	Bone i sar.(1989)
Škotska	1985.	2	kozije mleko	-	nepasteriz.	Sharp (1989)
SAD	1985.	860	čokoladno mleko	SEA	pasteriz.	Evenson i sar. (1988)
Izrael	1987.	3	kozije mleko	SEB	sirovo	Gross i sar. (1988)
Engleska	1988.	155	sir	-	nepasteriz.	Maguire i sar. (1991)
Brazil	1994.	7	sir	SEH	-	Pereira i sar. (1996)
Francuska	1997.	140	sir	-	sirovo	Kerouanton i sar. (2007)
Francuska	1998.	62	sir	-	sirovo	Kerouanton i sar. (2007)
Francuska	1998.	37	polutvrđi sir	nije dokazan	sirovo	Kerouanton i sar. (2007)
Japan	2000.	13.420	mleko u prahu	SEA i SEH	-	Asao i sar. (2003) Ikeda i sar. (2005)
Francuska	2001.	4	meki sir	SEA	-	Kerouanton i sar. (2007)
Francuska	2001.	46	polutvrđi sir	SED	sirovo	Kerouanton i sar. (2007)
Francuska	2002.	104	sir od ovčijeg mleka	SEA	sirovo	Kerouanton i sar. (2007)
Francuska	2009.	23	sir	SEE	nepasteriz.	Ostyn i sar. (2010)

2.1.3. Procena izloženosti

Mleko i proizvodi od mleka predstavljaju dobar substrat za rast *S. aureus* i navode se kao izvor enterotoksina u slučajevima intoksikacija (De Buyser i sar. 2001).

Nalaz *Staphylococcus aureus* u mleku i sirevima

Staphylococcus aureus kao ubikvitarni mikroorganizam može se često naći u mleku i izolovati sa kože vimene, papila, rana, opreme za mužu i iz okoline (Jorgensen i sar. 2005a). Ovaj mikroorganizam može da izazove mastitise kod muznih životinja. U pomuženom mleku broj *S. aureus* je 100-200 cfu/ml. Kod mastitisa broj ovog mikroorganizma može da raste do 10^4 cfu/ml mleka (Euzéby, 2012). Kontaminacija mleka i proizvoda od mleka patogenim mikroorganizmima može da bude endogenog porekla, iz mlečne žlezde inficirane muzne životinje ili egzogenog porekla iz okoline (Brisabois i sar. 1997). Prirodni rezervoar *S. aureus* predstavljaju latentno inficirane muzne životinje i čovek. Ovaj mikroorganizam stalno kolonizuje 20-30% ljudske populacije, a 60% populacije povremeno. U stvari, samo 20% ljudi skoro nikada nije nosilac *S. aureus* (Kluytmans i Werheim, 2005). Kolonizacija *S. aureus*, ili gnojna infekcija bilo kog dela tela osobe, koja rukuje sa hranom sigurno ima za posledicu prisustvo ovog mikroorganizma na rukama, a posledično kontaminaciju hrane. Izvor intoksikacija ljudi može da bude različita hrana, kontaminirana od latentno inficiranih ljudi *S. aureus*, a kada sastav i fizičko hemijske osobine hrane kao i uslovi sredine pogoduju razmnožavanju stafilokoka i stvaranju enterotoksina.

U literaturi su prisutni podaci o kontaminaciji sirovog mleka i proizvoda od sirovog mleka *S. aureus*. Prema Boynukara i sar. (2008) i Pelisser i sar. (2008) učestalost nalaza *S. aureus* u sirovom mleku se kreće od 6 do 28%. Ovaj mikroorganizam je dokazan u 75% uzoraka kravljeg mleka i 96% uzoraka kozijeg mleka iz tankova za mleko na farmama u Norveškoj (Jørgensen i sar. 2005). Sličan nalaz navodi Rall i sar. (2008) po kojem je *S. aureus* dokazan u 70,4% uzoraka sirovog mleka.

Prevalencija *S. aureus* u sirovom mleku prema drugim autorima je bila veća i kretala se od 31,9 do 90,4% (Tabela 2.1.3.1.)

Tabela 2.1.3.1. Prevalencija *S.aureus* u sirovom mleku iz tankova i silo tankova na farmama (Kousta i sar. 2010)

Uzorak	Prevalencija % (ukupan br.uzoraka)	Zemlja porekla	Referenca
Mleko iz silo tanka	66,7 (24)	Brazil	Andre i sar. (2008)
Mleko iz tanka na farmi	85,5 (433)	Norveška	Jørgensen i sar. (2005)
Kozije mleko iz tanka	31,9 (407)	Švajcarska	Muehlherr i sar. (2003)
Sirovo mleko iz tanka	90,4 (21)	Brazil	Tondo i sar. (2000)

Na Novom Zelandu u 17% uzoraka sirovog mleka iz tanka je dokazano >500 cfu/ml *S. aureus* (Howard, 2006), a u Pensilvaniji je dokazan *S. aureus* u 31% uzorka sirovog mleka (Jayarao i sar. 2004). U Slovačkoj Zigo i sar. (2011) i Dobrikova i sar. (2010) navode da je incidencija *S. aureus* u sirovom mleku krava i ovaca 4-9%. Medvedova i Valik (2009) su dokazali *S. aureus* u 20% uzoraka mleka, od kojih je 33% izolata dokazano prisustvo gena za sintezu enterotoksina A (*sea*).

Rajić (2014) je dokazala prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoke u 1,64 do 17,20% uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava sa tri farme. Svi izolati su stvarali hemolizine, najčešće beta hemolizin (50% izolata), zatim alfa plus beta hemolizin (36% izolata), beta plus delta hemolizinon (8% izolata), delta hemolizin (4% izolata) i alfa hemolizin (2%). Na osnovu biohemijskih osobina izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka su najčešće identifikovani kao *S. aureus* (88%), zatim *S. chromogenes* (4%), *S. intermedius* (2%), *S. xylosus* (2%), *S. sciuri* (2%) i *S. lentus* (2%). Primenom ELFA tehnike utvrđeno je da 20% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, koji su na osnovu fenotipskih i genotipskih osobina, identifikovane kao *S. aureus*, ima sposobnost sinteze klasičnih enterotoksina (A, B, C, D i E). Od 10 izolata *S. aureus*, kod kojih je ELFA tehnikom utvrđena sposobnost sinteze klasičnih enterotoksina (A, B, C, D i E), samo kod jednog izolata identifikovan je gen za sintezu enterotoksina B. Autor je zaključila da ovaj nalaz ukazuje da ostalih 90% izolata *S. aureus* ima sposobnost da sintetiše enterotoksine grupe C i/ili E.

Hunt i sar. (2012.) su ispitali, na prisustvo *S. aureus*, 117 uzoraka sirovog mleka i sireva iz različitih faza proizvodnje poreklom od 4 proizvođača sireva i 5 snabdevača mlekom u Irskoj. Autori su izvršili karakterizaciju 151 izolata iz 81 uzorka u kojima je dokazan ovaj mikroorganizam. Rezultati su pokazali da 83,2% izolata nisu nosioci se

gena, i ne poseduju sposobnost sinteze enterotoksina, a kod 16,78 % izolata iz uzoraka poreklom od jednog proizvođača dokazan je *sec* gen.

Korpysa-Dzirba i Osek (2011) su analizirali 237 uzoraka sirovog mleka na prisustvo *S. aureus* i dokazali prisustvo ovog mikroorganizma u 77 (32,5%) uzoraka. Od 66 izolata 5 (7,6%) izolata su nosili gene za sintezu enterotoksina i to 3 izolata za sintezu enterotoksina C (*sec*) i 2 izolata za sintezu enterotoksina A (*sea*).

Tokom perioda od 6 meseci **Park i sar.** (2000) su ispitali prisustvo koagulaza pozitivnih *S. aureus* u mleku i sposobnost stvaranja enterotoksina u uzorcima sirovog mleka. Iz 178 uzoraka sirovog mleka sa 7 farmi izolovano je 18 (10,1 %) izolata *S. aureus* i 8 (38%) izolata iz 21 uzorka mleka, kod kojih je broj somatskih ćelija bio manji od 500.000 u mililitru. Autori su dokazali da 7 (87,5%) od 8 izolata i 15 (83,3%) od 18 izolata stvara enterotoksine. Enterotoksini su pripadali serotipu B (66,7%), tipu A (33,3%), a dva soja su stvarala enterotoksine A i B.

Radovanović Savić (2000) je ispitujući prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka u uzorcima sirovog mleka, koje se koristi za proizvodnju kiselo-koagulišućeeg sira u individualnom domaćinstvu, dokazala prisustvo ovog mikroorganizma čiji je broj bio 3 log cfu/ml neposredno posle muže i rastao sa udaljavanjem od muže, da bi dostigao vrednost od 5,1 log cfu/ml mleka večernje muže. *S. aureus* je preživljavao tokom procesa proizvodnje kiselo-koagulišućeeg sira. Populacija se uvećala od 5,69 log cfu/ml u mleku pri podsiravanju do 6,81 log cfu/g u grušu, 7,35 log cfu/g u grudi i siru 7,10 log cfu/g.

U uzorcima sirovog mleka krava i jaka (*Bos mutus*) *S. aureus* je bio dokazan u velikom broju uzoraka, što su pokazali rezultati ispitivanja **Urachimeg i sar.** (2007) u Mongoliji. Stafilokoke su izolovane iz 72 (74%) uzorka sirovog mleka. Od uzoraka u kojima su dokazane stafilokoke 69,44% (50 od 72) uzorka mleka je bilo poreklom od jaka a 30,5% (22 od 72) uzorka je bilo poreklom od goveda. Tehnikom reverzne pasivne aglutinacije su dokazali enterotoksin C u 10% (7 od 72) uzorka mleka jaka i 21 % (15 od 72) uzorka mleku goveda.

Stephen i sar. (2002) su u uzorcima mleka uzetim iz tankova, na farmama u Švajcarskoj, utvrdili $1,0 \times 10^1$ do $3,0 \times 10^3$ cfu *S. aureus* /ml mleka. Veličina farme nije imala značajnog uticaja ($p > 0,05$) na broj *S. aureus* u mleku iz tankova. Genotipizacijom 59 primoizolata, primenom, Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE),

su dokazali 22 različita genotipa *S. aureus*. Samo jedan od dva glavna tipa je dokazan na svakoj farmi, ukazujući na nedostatak genetskog diverziteta među izolatima *S. aureus* sa farmi. Samo dva pulsotipa su se pojavila na više od jedne farme. Rezultati PFGE su pokazali da postoji genetska relacija između izolata *S. aureus* dobijenih iz uzoraka mleka četvrti i mleka u tankovima na dve farme, na kojima je bio veliki broj ktrava sa mastitisom. Daljim ispitivanjem multipleks PCR tehnikom dokazano je da 16 (27,1%) izolata *S. aureus* sadrži *se* gene, od kojih je 15 bilo nosilac samo jednog gena, a jedan dva gena (*seg* i *sei*). Najčešće dokazani geni su bili *seb*, *sea*, *sec*, dok ni kod jednog izolata nisu dokazani *see*, *seh*, *sej*, ili *tst* geni.

Sa ciljem utvrđivanja da li stafilokoke, uzročnici mastitisa mogu da izazovu intoksikacije ljudi hranom, **Cenci-Goga i sar.** (2003) su ispitali 160 izolata *S. aureus*, poreklom od 146 krava sa 18 farmi u Kaliforniji. Rezultati, koje su autori dobili pokazuju da je značajan broj izolata *S. aureus* (22 od 160) stvarao enterotoksine. Sedam izolata je stvaralo SEC, 12 izolata SED, 3 izolata SEC i SED. Nijedan izolat nije stvarao SEA i SEB.

Tkacikova i sar. (2003) su na prisustvo gena za enterotoksine, primenom multipleks PCR tehnike, ispitali 87 izolata *S. aureus* iz 53 uzorka ovčijeg sirovog mleka, 21 uzorka sirovog kravljeg mleka, jednog uzorka kozijeg mleka sa farmi u istočnoj Slovačkoj i 12 uzoraka sira od ovčijeg mleka. Dokazali su gene za 4 tipa enterotoksina. Tri tipa gena za enterotoksine (SEA, SEC i SED) su dokazana kod *S. aureus* izolovanih iz ovčijeg sirovog mleka. Tri tipa (SEB, SEC i SED) su dokazana kod izolata iz uzoraka sireva od ovčijeg mleka; gen za enterotoksin C (SEC) je dokazan kod izolata iz uzorka kozijeg sirovog mleka i dva gena (SEC i SED) su dokazana kod izolata iz kravljeg sirovog mleka. Najveći broj enterotoksogenih stafilokoka (98,8%), izolovan iz sirovog mleka, posedovao je gena za sintezu SEC i SED. Autori su zaključili da je relativno visoka prevalencija enterotoksogenih sojeva *S. aureus* 28 (38,6%) od 75 izolata, verovatno u direktnoj korelaciji sa zdravstvenim stanjem mlečne žlezde životinja od kojih su uzeti uzorci.

Soriano i sar. (2002) su mikrobiološkim pregledom 504 uzoraka hrane (proizvodi od povrća, jaja, mesa, ribe, testa) prikupljenih iz kafeterija i restorana u završnom stadijumu pripreme, kada je hranu trebalo poslužiti, dokazali prisustvo enterotoksogenih stafilokoka u 19 (3,8%) uzoraka od kojih je 10 (52,6%) sojeva stvaralo enterotoksin C

(SEC), 4 (21,1%) soja enterotoksin D (SED), 3 (15,8%) soja je stvaralo enterotoksin B (SEB) i 2 (10,5%) soja je stvaralo enterotoksin A (SEA). Tri uzorka hamburgera su sadržavala SEA, SEB i SEC, dok su enterotoksini dokazani u ekstraktima hrane. Uzorci iz restorana su uzimani pre i posle implementacije sistema HACCP. Od 181 uzorka hrane prikupljenih iz 4 restorana pre implementacije sistema HACCP, u 7 (3,9%) uzoraka hrane su dokazane stafilokoke koje stvaraju enterotoksine. SED je stvaralo 4 (57,1%) izolata, 2 (28,6%) izolata SEC i 1 (14,3%) izolat SEA. U jednom uzorku kuglice od mesa iz restorana je dokazan SEC. Posle uvođenja sistema HACCP u 4 restorana ispitivanjem 196 uzoraka hrane nisu dokazane stafilokoke koje stvaraju enterotoksine, niti enterotoksini.

Tokom monitoringa bakteriološke ispravnosti mleka i proizvoda od mleka **De Reu i sar.** (2004) su pregledali 143 uzorka sirovog mleka i 100 uzoraka proizvoda od mleka sa farmi u Belgiji, 64 uzorka maslaca, 9 uzoraka jogurta, 16 uzoraka sireva, 7 uzoraka sladoleda i 4 uzorka svežeg sira. Rezultati su upoređeni sa maksimalnim vrednostima, koje propisuje EC direktiva 92/46/EC i maksimalnim vrednostima, koje propisuje regulativa u Belgiji. Enterotoksini stafilokoka su dokazivani u uzorcima u kojima je broj ovog mikroorganizma bio veći od dozvoljenih maksimalnih vrednosti propisanih direktivom i zakonskom regulativom.

Adwan i sar. (2005) su ispitali prisustvo enterotoksogenih *S. aureus* u ukupno 205 uzoraka sirovog mleka, koji su poticali sa farmi u severnoj Palestini od klinički zdravih krava (130) i ovaca (120). Od 100 izolata *S. aureus* kod 37 (37%) je dokazan gen za sitezu enterotoksina (*se*). Kod najvećeg broja izolata 20 (54,1%) je dokazan *seb*, zatim *sea* gen kod 4 izolata (10,8%), *sec* gen kod 4 izolata (10,8%) i *see* gen kod 3 izolata (8,19%). Nijedan od enterotoksogenih izolata nije bio nosilac više od jednog gena (*se*).

Morandi i sar. (2007) su pregledom mleka (krava, koza, ovaca i bivolice) i proizvoda od mleka (gruš, sirevi stari 1-2 meseca, maslac i surutka) iz različitih regiona u Italiji izolovali 112 izolata *S. aureus* od kojih je 86 izolata iz uzoraka sirovog mleka i 26 izolata iz uzoraka proizvoda od mleka. Svih 112 izolata su identifikovani kao *S. aureus*. Identifikacija 21 izolata (6 izolata poreklom od krava, 4 izolata poreklom od koza i 1 izolat poreklom od bivolice). Primenom metode reverzne pasivne lateks aglutinacije, dokazano je da *S. aureus* izolovane iz mleka stvaraju klasične enterotoksine (SEA-SED). Prisustvo gena za sintesu enterotoksina (*sea*, *sec*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* i *sel*) su ispitali

Multiplex-PCR tehnikom. Prisustvo gena za sintezu enterotoksina (*se*) su dokazali kod 67% izolata. Izolati stafilokoka iz mleka krava su češće stvarale SEA, SED i nosile *sej* gen, a stafilokoke izolovane iz mleka koza i ovaca su češće stvarale SEC i nosile *sel* gen.

U cilju karakterizacije *S. aureus* izolovanih iz mleka, poreklom od krava sa subkliničkim mastitisom i iz sabirnih tankova za mleko, **Peles i sar.** (2007) su ispitali uzorke mleka sa 20 farmi u istočnoj Mađarskoj. Mleko iz tankova sa 14 od 20 farmi je bilo kontaminirano ovim mikroorganizmom u broju 6×10^3 cfu *S. aureus* /ml.

U Brazilu su **Rall i sar.** (2008) pregledali ukupno 162 uzorka mleka sa pet farmi i po 54 uzoraka sirovog mleka iz glavnih tankova za mleko pre pasterizacije, posle pastirizacije i na dan isticanja roka trajanja pasterizovanog mleka. *S. aureus* su dokazali u 38 (70,4%) od 54 uzoraka sirovog mleka. *S. aureus* su dokazali i u 8 (14,7%) uzoraka mleka odmah posle pasterizacije i 11 (20,4%) uzoraka pasterizovanog mleka na dan isticanja roka upotrebe. Nalaz *S. aureus* u mleku posle pasterizacije prema mišljenju autora je posledica nepravilno izvedene pasterizacije. Genotipizacijom izolata *S. aureus* su utvrdili 12 genotipova. Najčešće su dokazali gen, koji kodira sintezu enterotoksina A-*sea* kod 16 (41%) izolata, zatim *seg* gen kod 11 izolata (28,2%), gen *sec* kod 2 (5,1%) izolata, *sed* gen kod 5 (12,8%) izolata, *seb* gen kod 3 (7,7%) izolata i *see* gen kod 2 (5,1%) izolata.

D'Amico i sar. (2008) su ispitali 133 uzorka sirovog mleka, koje se koristi za proizvodnju sireva na prisustvo *S. aureus*. Uzorci su prikupljeni jednom nedeljno od juna do septembra 2006. godine sa 11 farmi, koje proizvode sireve od kravljeg, kozijeg i ovčijeg mleka. U 34,6% (46 od 133) uzoraka mleka sa 8 farmi (73%) su dokazali *S. aureus*.

U Brazilu **Arcuri i sar.** (2010) su iz 125 uzoraka mleka poreklom od krava sa mastitisom, 96 uzoraka sirovog mleka iz tankova i 70 uzoraka Minas svežih sireva, izolovali 291 izolat *S. aureus*. Prisustvo gena za sintezu enterotoksina stafiloka (SE) (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj* i *sell*) i *tst-1* gen su ispitali primenom tehnike PCR. Kod 109 (37,5%) izolata je dokazano prisustvo bar jednog od 11 gena. Najčešće su dokazali gene za sintezu enterotoksina kod izolata poreklom iz Minas sira (72,9%), zatim kod izolata poreklom iz uzoraka mleka iz tanka (41,7%) izolata i kod izolata poreklom iz mleka krava sa subkliničkim mastitisom (13,6%). Nalaz nedavno opisanih

SE gena (*seg-sell*) je bio znatno veći (87 od 109 PCR-pozitivnih sojeva) nego klasičnih SE gena (*sea-see*), koji su dokazani kod 15 izolata. Najčešće dokazani SE geni su bili *seg* i *sei*, koji su bili pojedinačno, ili u kombinaciji sa drugim genima. Ni kod jednog izolata nije dokazano prisustvo *see*. Kod 8 izolata je dokazan *tst-1* gen, ali nijedan nije bio poreklom iz mleka krava sa subkliničkim mastitisom. Veliki genotipski diverzitet potencijalno toksogenih izolata *S. aureus*, naročito iz Minas sireva ukazuje na različite izvore kontaminacije.

U Brazilu je uobičajeno konzumiranje mekih belih sireva, koji se proizvode od sirovog mleka, čija je pH vrednost visoka, sadržaj vlage (>55%) i niska koncentraciju soli (1,4-1,6%). Ovi sirevi se proizvode na malim farmama-mlekarama, ili u domaćinstvima pri različitim higijenskim uslovima, dok industrijska proizvodnja podrazumeva korišćenje pasterizovanog mleka, period zrenja od najmanje 60 dana, ako se za proizvodnju sireva koristi sirovo mleko. Budući da meki sirevi od sirovog mleka mogu da budu potencijalni nosioci patogenih mikroorganizama, u drugom ispitivanju **Moraes Mendonca i sar.** (2009) su mikrobiološki ispitali 55 uzoraka sireva, koji se proizvode od sirovog mleka. Doakazali su prisustvo koagulaza pozitivnih stafilocoka u 17 (30,9%) uzoraka sireva u broju iznsd 10^4 cfu/g. Ovaj rezultat je ukazao na nizak kvalitet sirovog mleka, od kojeg su proizvedeni sirevi i da su uslovi proizvodnje neadekvatni.

Aydin i sar. (2011) su analizirali 1070 uzoraka hrane sa pijaca i mlekara u regionu Marmara, Turska na prisustvo *S. aureus*. Od 147 izolata 92 (62,6%) je imalo sposobnost da stvara enterotoksine. Primenom PCR tehnike utvrđeno je da 53,3% izolata nosi gene za eneterotoksinima slične tosine *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq* i *seu*, koji su bili više zastupljeni u odnosu na gene za klasične enetrotoksine (*sea-see*). Daljom analizom dokazani su *seo* (37,0%), *sei* (32,7%), *sem* (30,4%), *seg* (29,3%), *seu* (29,3%) i *sec* geni kod 27,2% izolata. Sposobnost izolata da stvaraju enterotoksine (SEA-SEE) je ispitana ELISA tehnikom. Izolati *S. aureus* su stvarali 1 do 3 eneterotoksina, najčešće SEA i SEC.

Holečková i sar. (2002) su u Slovačkoj ispitali uzorke sira proizvedenog od ovčijeg mleka, Bryndza sira, testenine, kobasica i briseve iz procesa proizvodnje (sa opreme, grlo i nos ljudi, koji učestvuju u procesu dobijanja hrane). Stvaranje enterotoksina je dokazano kod 20 (39,2%) izolata od ukupno 51 izolata *S. aureus* izolovanih iz ispitanih uzoraka. Stvaranje enterotoksina A (SEA) je dokazano kod 3 (5,9%), SEB kod 12

(23,5%), SEA i SEB kod 5 (9,8%) izolata *S. aureus*. Najveća zastupljenost enterotoksogenih izolata *S. aureus* bila je u siru proizvedenom od ovčijeg mleka (47,4%), sa prevalencijom SEB od 36,8%. Od 18 izolata *S. aureus* iz testenine 6 (33%) je bilo enterotoksogeno. Sinteza enterotoksina nije dokazana kod izolata poreklom iz uzoraka Brindza sira i kobasica. Iz uzoraka brisa sa opreme dokazan je jedan enterotoksogeni izolat i 4 enterotoksogena izolata iz briseva grla i nosa ljudi, koji su učestvovali u procesu proizvodnje.

Prevalencija *S. aureus* u različitim vrstama sira u prometu prema podacima iz literature kretala se od 0 do 25% (Tabela 2.1.3.2.)

Tabela 2.1.3.2. Prevalencija *S. aureus* u različitim vrstama sira (**Kousta i sar. 2010**)

Vrsta sira	Vrsta mleka	Mesto uzorkovanja	Prevalencija % (ukupan br.uzoraka)	Zemlja porekla	Referenca
Sir sa plesnima	Paster.	prodavnice	17,6 (34)	Italija	De Luca i sar.(1997)
Meki sir	Paster.	prodavnice	8,3 (36)	Italija	De Luca i sar.(1997)
Polutvrđi sir	Paster.	prodavnice	18,9 (53)	Italija	De Luca i sar.(1997)
Mozarella tip	Paster.	prodavnice	25,0 (12)	Italija	De Luca i sar.(1997)
Meki sir sa zrenjem	-	Lokalne pijace	3,8 (53)	Egipat	El-Sharound i Spano (2008)
Sveži meki sir	-	Lokalne pijace	0,0 (34)	Egipat	El-Sharound i Spano (2008)
Meki sir	-	Supermarket	20,0 (45)	Brazil	Araújo i sar.(2002)
Meki sir	kozije	prodavnice	8,0 (62)	Nemačka	Akineden i sar. (2008)
Krem sir	kozije	prodavnice	8,0 (50)	Nemačka	Akineden i sar. (2008)
Polutvrđi sir	kozije	prodavnice	5,4 (56)	Nemačka	Akineden i sar. (2008)
Tvrđi sir	kozije	prodavnice	15,3 (13)	Nemačka	Akineden i sar. (2008)

Normanno i sar. (2005) su u toku jednog opsežnog ispitivanja pregledali 11.384 uzoraka različite hrane sa tržišta i briseva sa površina iz pogona industrijske proizvodnje hrane da bi utvrdili prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka. Rezultai su pokazali da

je 1971 (17,3%) uzorak bio pozitivan na prisustvo ovog mikroorganizma, od kojih je 541 uzorak dalje ispitan i iz 537 (99,3%) uzoraka je izolovan *S. aureus*. Ukupno 298 (55,5%) od 537 izolata je stvaralo enterotoksine. Od 3097 ispitanih uzoraka mleka i proizvoda od mleka, 641 (20,7%) uzorak je bio kontaminiran koagulaza pozitivnim stafilokokama. Od 364 odabrana izolata za dalju identifikaciju, 362 izolata je identifikovano kao *S. aureus* od kojih je 217 (59,9%) izolata stvaralo enterotoksine. Ovi sojevi su stvarali SEA (26,7%), SEB (0,9%), SEC (28,1%), SED (15,7%), SEA+SEB (1,8%), SEA+SED (26%), SEA+SEC (0,5%) i SEC+SED (0,5%).

Bania i sar. (2006) su ispitali 50 izolata *S. aureus* poreklom iz sirovog mlevenog mesa i sirove kobasice na sposobnost stvaranja enterotoksina. Sposobnost stvaranja enterotoksina su dokazali kod 27 izolata. Samo 9 od 27 izolata su nosili gene, koji kodiraju klasične enterotoksine SEA-SEE. Autori su dokazali prisustvo novih gena za sintezu enterotoksina kod 18 izolata koji nisu stvarali klasične enterotoksine (SEA-SEE). Svi izolati za koje je dokazano da stvaraju klasične enterotoksine (SEA-SEE) su bili i nosioci gena koji kodiraju SEIs. Najčešće je bio dokazan gen, koji kodira SE/H (stafilokoni enterotoksin-sličan enterotoksinu H) kod 14 izolata, a zatim geni koji kodiraju SE/I i SE/G. Autori su takođe dokazali prisustvo tri manje proučena gena: *sep* (8 izolata), *sel* (2 izolata) i *sek* (1 izolat).

Borelli i sar. (2006) su ispitali prisustvo enterotoksogenih *Staphylococcus* spp. u Serra da Canastra sirevima u Brazilu. Ova vrsta sira se na tradicionalni način proizvodi preko 200 godina u Minas Geras oblasti od sirovog kravljeg mleka, dodavnjem surutke u kojoj je prisutna prirodna mikroflora (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. i *Streptococcus* spp.). Proizvodnja sireva se odvija na malim farmama-mlekarama u različitim higijenskim uslovima. Budući da ovi sirevi mogu da budu potencijalni nosioci patogenih mikroorganizama uzorci su prikupljeni sa 10 farmi i obuhvatili su vodu, korišćenu tokom procesa dobijanja sireva, sirovo mleko, surutku, grušu pre soljenja i sireve posle 5 dana zrenja. Broj *Staphylococcus* spp. u mleku se kretao od <2,0 do 4,9 log cfu/ml. Ovaj broj nije bio samo u vezi sa niskim higijenskim nivoom, već se može dovesti u vezu sa temperaturom čuvanja mleka, odsustvom hlađenja mleka pre procesa dobijanja sireva. Veliki broj *S. aureus* je dokazan u surutki, koja je korišćena kao starter kultura (<2,0 do 5,7 log cfu/ml), grušu (4,3-6,3 log cfu/g) i u 70% uzoraka sira (<2,0 do 6,3 log cfu/g). Autori su zaključili da tradicionalna upotreba, surutke kao izvora prirodne

mikroflora (*Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.* i *Streptococcus spp.*), predstavlja potencijalni opasnost za kontaminaciju Canastra sireva. Alternativu kontrole kontaminacije bi predstavljalo čuvanje prirodnih starter kultura pri temperaturama hlađenja sve do upotrebe. Od 75 izolata *Staphylococcus spp.* 70 (93,3%) je stvaralo barem jedan od toksina (SEA, SEB, SEC, SED i TSST-1), a najčešće su stvarali SEB i SEC. Izolati *S. intermedius* i *S. hyicus* iz mleka i grušā su stvarali SEB i SEC.

Alemida i sar. (2007) su uzorkovali 70 uzoraka sireva (mekih i tvrdih), koji se proizvedeni od sirovog kravljeg, ovčijeg i kozijeg mleka, ili kombinacijom ovih vrsta mleka u različitim regionima Portugalije. Mikrobiološkim pregledom dokazali su *S. aureus* u 37 uzoraka sireva, a u 11 uzoraka sireva broj *S. aureus* je bio iznad vrednosti potrebnih za formiranje enterotoksina u količinama koje izazivaju intoksikacije ljudi.

Cremonesi i sar. (2007) su ispitali 33 uzorka svežih sireva, mekih, polutvrdih i tvrdih sireva proizvedenih od sirovog mleka na prisustvo *S. aureus* i enterotoksine stafilokoka (SE) primenom klasične mikrobiološke i molekularne tehnike. U svim uzorcima je bilo dokazano prisustvo *S. aureus* koje su identifikovane fenotipskim i genotipskim metodama (23S rRNA, *coa* u *nuc* gen). Svi sirevi, kod kojih je broj *S. aureus* bio veći od 10^5 cfu/g, su bili ispitani na prisustvo enterotoksina primenom reverzne pasivne lateks aglutinacije (SET-RPLA) i ELFA VIDAS SET tehnike. Ni u jednom ispitanom uzorku sira nisu dokazani enterotoksini. Od 33 izolata 14 (42%) su imali *sea* gen. Izolati *S. aureus* poreklom iz 10 uzoraka sireva od kravljeg mleka su nosili *sea* ili *sed* gen, ili kombinaciju *sea*, *sed* i *sej* gena, dok je kombinacija *sec* i *sel* gena dokazana u 2 uzorka sira od kozijeg mleka. Samo kod jednog izolata *S. aureus* je dokazan *seg* gen.

Tokom trogodišnjeg istraživanja (2003-2005), koje su sprovedi **Normanno i sar.** (2007) su ispitali 1634 uzoraka mleka, proizvoda od mleka i mesa na prisustvo *Staphylococcus aureus* i izvršili karakterizaciju enterotoksogenih sojeva izolovanih iz ovih proizvoda. Od ukupno 1634 (641 uzorka mleka, proizvoda od mleka i 993 uzorka proizvoda od mesa) *S. aureus* je dokazan u 209 (12,8%) uzoraka od kojih je 109 (17%) uzoraka mleka i proizvoda od mleka, a 100 (10%) uzoraka proizvoda od mesa. Stopa kontaminacije mleka i proizvoda od mleka je bila značajno veća u odnosu na proizvode od mesa ($p < 0,001$). Od 209 izolata *S. aureus* (po jedan iz pozitivnog uzorka) 125 (59,8%) je stvaralo 1, ili više enterotoksina (SE). Najčešće je dokazan enterotoksin D (SED) kod 42 (33,6%) od 125 izolata, zatim enterotoksin A (SEA) kod 23 (18,4%),

enterotoksin C (SEC) kod 19 (15,2%) i enterotoksin B (SEB) kod 8 (6,4%) izolata. Od 125 ispitanih enterotoksogenih sojeva najveći broj 63 (50,4%) izolata su bili humanog porekla, zatim izolata poreklom od ovaca 29 (23,2%), 22 (17,6%) izolata poreklom od nespecifičnog domaćina, 9 (7,2%) izolata poreklom od goveda i 2 (1,6%) izolata poreklom od živine.

Poli i sar. (2007) su da bi utvrdili rizik od nalaza enterotoksogenih *S. aureus* u Monte Veronese siru (sa oznakom zaštićenog porekla), koji se proizvodi od sirovog kravljeg mleka pregledali 46 uzoraka (21 uzorak gruša i 16 uzoraka sireva posle 1 meseca zrenja i 9 uzoraka sireva posle 3 meseca zrenja) primenom standardnih kulturelnih metoda i real time PCR tehnike. Populacija *S. aureus* je bila veća od 10^3 cfu/g u 78% uzoraka sireva. Broj ovog mikroorganizma je bio veći tokom proleća, u uzorcima gruša (1×10^3 do $3,4 \times 10^5$ cfu/g) i sira ($<10^2$ do $3,3,4 \times 10^5$ cfu/g). Daljim ispitivanjem 37 izolata *S. aureus*, svaki iz različitog uzorka, utvrđeno je da izolati sadrže barem jedan gen za sintezu enterotoksina. Najčešće je bio dokazan gen, koji kodira sintezu SED (*sed*) i *ser*, *sed*, *seg* i *sem* geni. Autori su zaključili da nalaz gena za stvaranje enterotoksina kod izolata *S. aureus* poreklom iz sira Monte Veronese, u slučaju kada se koagulaza pozitivne stafilocoke umnože iznad 10^3 cfu/g, može da predstavlja rizik po zdravlje ljudi.

Akineden i sar. (2008) su ispitali 161 uzorak sira proizvedenog od kozijeg mleka sa tržišta u Nemačkoj (Hesse), koji su se mogli kupiti u prodavnicama, specijalizovanim radnjama za organsku hranu i na pijacama. Ispitivanjem je obuhvaćeno 50 uzoraka gruša, 62 uzorka mekih sireva, 56 uzoraka polutvrdih sireva i 13 uzoraka tvrdih sireva. Oko polovine (84) uzoraka je bilo poreklom iz Nemačke, dok su ostali sirevi bili poreklom iz Holandije (43 uzorka), Francuske (35 uzoraka), Austrije (7 uzoraka), Italije (4 uzorka), Norveške (3 uzorka), Španije (2 uzorka), Belgije (1 uzorak), Grčke (1 uzorak) i Švajcarske (1 uzorak). Koagulaza pozitivne stafilocoke su dokazane (>10 cfu/g) u 14 uzoraka i njihov broj se kretao od 30 cfu/g u grušu (krem siru) od pasterizovanog mleka iz Nemačke do $8,6 \times 10^5$ cfu/g u polutvrdom siru od pasterizovanog mleka iz Francuske.

El-Sharoud i Spano (2008) su ispitali 87 uzoraka svežih Domiati sireva (egipatski sveži sir) na prisustvo *Staphylococcus* spp. Izolati koagulaza pozitivnih stafilocoka su najčešće identifikovani kao *S. chromogenes* (5 izolata), zatim kao *S. xylosus* (4 izolata),

kao *S. caprae* (4 izolata) i kao *S. aureus* (2 izolata). Autori su dokazali da izolati *S. aureus* poseduju gene za enterotoksine (*sea* i *seb*) i SEI gene (*selg*, *seli*, *selm* i *selo*). **Bendahou i sar.** (2009) su bakteriološki pregledali 81 uzorak mleka i proizvoda od mleka, Iben (fermentisano mleko) i Jben (tradicionalni sir) u severnom Maroku na prisustvo *S. aureus*. Na sposobnost stvaranja enterotoksina (SEA-SED) i prisustvo *se* gena su ispitali 44 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka. Od 44 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka 40 izolata je identifikovano kao *S. aureus*, 2 izolata kao *Staphylococcus hyicus* i 2 izolata kao *Staphylococcus intermedius*. Dobijeni rezultati su pokazali da je 18 (38%) izolata *S. aureus* stvaralo jedan, ili više klasičnih enterotoksina (SEA, SEB, SEC i SED). Najveći broj izolata 11 (24%) je stvarao SEA, zatim SED 3(6,5%) izolata. Primenom PCR tehnike su dokazali da 39 od 44 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka ima jedan od gena za stvaranje enterotoksina (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* i *seh*).

Mikrobiološkim ispitivanjem sireva, proizvedenih na malim farmam u Irskoj, koje su sproveli **O'Brien i sar.** (2009) obuhvaćen je 351 uzorak sira od 15 proizvođača. Sirevi su bili proizvedeni od sirovog i pasterizovanog ovčijeg, kozijeg i kravljeg mleka i to tvrdi, polutvrđi, meki sirevi, meki sirevi sa plesnima i sirevi sa mažom, a poticali su iz različitih geografskih regiona. U 96% uzoraka sireva nalaz *S. aureus* je bio u skladu sa EU regulativom. Ovaj mikroorganizam nije dokazan, ili je bio u veoma malom broju (manje od 100.000 cfu/g za sireve od sirovog mleka, manje od 1000 cfu/g za termički obrađene sireve). Veliki broj (preko 10.000 cfu/g) ovog mikroorganizma je dokazan u 12 uzorka sira poreklom od jednog proizvođača. U uzorcima sireva, koji su uzorkovani tokom prvih 6 meseci u godini nisu dokazani enterotoksini, a tokom drugih 6 meseci u godini nije dokazano ni prisustvo *S. aureus*.

Pereira i sar. (2009) su izvršili karakterizaciju 206 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka poreklom iz različite hrane u Portugaliji i ispitali da li izolati stvaraju enterotoksine i hemolizine. Sposobnost stvaranja enterotoksina i prisustvo gena za enterotoksine su ispitali kod 148 izolata koji su, na osnovu fenotipskih osobina identifikovani kao *S. aureus* poreklom iz sirovog mesa (15 izolata), tradicionalnih fermentisanih proizvod od mesa (65 izolata), sireva (9 izolata), iz mleka u slučajevima subkliničkih mastitisa (18 izolata), sirovog kravljeg mleka (20 izolata) i drugih proizvoda (21 izolat). Stvaranje enterotoksina je ispitano VIDAS tehnikom, a prisustvo

gena za stvaranje enterotoksina multipleks PCR tehnikom. Dobijeni rezultati su pokazali da je za 148 izolata potvrđeno da su *S. aureus*. Genotipska identifikacija se u potpunosti slagala sa identifikacijom na osnovu fenotipskih osobina. Daljim ispitivanjem VIDAS tehnikom, utvrđeno je da 59 (40%) izolata ima sposobnost da stvara enterotoksine. Ispitivanjem 148 izolata primenom mPCR tehnike kod 69% izolata je dokazan 1, ili više gena za stvaranje enterotoksina i to 12 % izolata je imalo jedan gen, a preostalih 88% više od jednog *se* gena. Ispitano je 11 genotipova i najčešće su dokazani *sea* i *seg* (26%); *sea*, *seg* i *sei* (23%) i *seg* i *sei* (25%). Kod izolata poreklom iz sira, sirovog kravljeg mleka i mleka krava sa subkliničkim mastitisom je bila niska učestalost *se* gena. Nasuprot tome, kod izolata dobijenih iz fermentisanih proizvoda od mesa, češće su dokazali gene za sintezu enterotoksina.

Morandi i sar. (2009) su izvršili fenotipsku i genotipsku karakterizaciju primoizolata *S. aureus* izolovanih iz uzoraka mleka različitih vrsta životinja (81 izolat iz mleka krava, 22 izolata iz mleka koza, 17 izolata iz mleka ovaca i 2 izolata iz mleka bivolice). Svih 122 izolata je identifikovano kao *S. aureus* primenom PCR tehnike. Međutim, primenom Biolog GP identifikacije za 27 izolata su dobijeni sledeći rezultati: 2 izolata je identifikovano kao *S. delphini*, 1 izolat kao *S. xylosus*, 1 izolat kao *S. intermedius* i 1 izolat kao *S. haemolyticus*, 1 nije identifikovan i za 21 izolat identifikacija je bila samo do nivoa roda (*Staphylococcus spp.*). Fenotipizacijom, na osnovu rezultata dobijenih primenom Biolog GP, 78% izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka je identifikovano kao *S. aureus*. Za identifikaciju preostalih 22% izolata bilo je potrebno da se pored fenotipizacije uradi i genotipizacija. Prisustvo jednog, ili više *se* gena je dokazano kod 79 (65%) od 122 ispitana izolata *S. aureus*. Najčešće je dokazan *sed* gen (40 izolata), zatim *sea*, *sej*, *sec*, *sel* i *sei* gen. Najmanje je bio zastupljen *seh* gen. Kod 21 izolata *S. aureus* dokazan je samo jedan gen (13 izolata *sea*, 3 izolata *sed*, 1 izolat *seg*, 3 izolata *seh* i 1 izolat *sei*), dok je kod preostalih 58 izolata dokazano više od jednog gena.

Da bi utvrdili potencijalne izvore kontaminacije sireva *S. aureus* **Jørgensen i sar.** (2005a) su bakteriološki pregledali 144 uzorka sa jedne farme u Norveškoj na kojoj se proizvodi sir od sirovog kravljeg mleka. Uzorci su bili mleko krava, brisevi iz okoline, brisevi sa opreme za mužu, brisevi od ljudi koji su učestvovali u procesu dobijanja mleka i proizvodnji sira i sirevi iz različitih faza proizvodnog procesa. *S. aureus* je bio prisutan u mleku od početka procesa proizvodnje sira. Broj *S. aureus* u uzorcima mleka

uzetim iz tanka je bio 355 cfu/ml. Najveći broj je dokazan u grušu u fazi presovanja iznosio je 15×10^3 cfu/g, a potom se u sirevima 7. dana zrenja smanjio na 6×10^3 cfu/g. Iz sira posle 10 nedelja zrenja *S. aureus* nije izolovan.

Autori su izvršili genotipizaciju 75 izolata *S. aureus*, ispitali da li stvaraju enterotoksine i prisustvo *se* gena. Identifikovali su 5 različitih serotipova i dokazali da 11 izolata ima *se* gene, ali nijedan od tih izolata nije stvarao enterotoksine. Kao glavni izvor kontaminacije opreme, okoline i proizvoda od sirovog mleka autori su naveli prisustvo ovog mikroorganizma u mleku iz tanka.

Ikeda i sar. (2006) su ispitivali sireve proizvedene na Hokaidu (Japan) na prisustvo *S. aureus* tokom perioda od 3 godine. *S. aureus* je izolovan iz 38 uzoraka sireva i to 3,6-9,2% od ukupnog broja ispitanih uzoraka i 13-20% od ukupnog broja uzoraka sireva u tipu mocarela. Najveći broj ovog mikroorganizma je bio $2,0 \times 10^4$ cfu/g. Izolovani sojevi su dalje ispitani PCR tehnikom da bi se utvrdilo prisustvo *se* gena. Od 33 izolata kod 20 nisu dokazani *se* geni, dok je preostalih 13 izolata posedovalo *seg* gen i *sei* gen. Autori nisu, primenom komercijalnih kitova, dokazali prisustvo enterotosina u uzorcima sireva.

Prema podacima iz literature hrana spremna za konzumiranje, koja je kontaminirana toksogenim *S. aureus* se navodi kao najčešći uzročnik oboljenja izazvanih hranom u Koreji. Da bi ispitali kontaminaciju hrane, **Oh i sar.** (2007) su ispitali ukupno 3332 uzoraka hrane spremne za konzumiranje. U 285 (8,6%) uzoraka je dokazan *S. aureus*, od toga u 31,6% krem kolača, 19,8% sirove ribe i 19,3% kolača od pirinča sa punjenjem. Fenotipska ispitivanja su pokazala da je 48% izolata stvaralo jedan, ili više toksina, kao što su stafilokokni enterotoksini A, B, C (SEA, SEB i SEC). Preko 90 % izolata je stvaralo SEA. Takođe su dokazani SEB, SEC, SED, SEA+SEC i SEC+SED enterotoksini. Za 13 izolata iz hrane je dokazano da stvaraju TSST-1 toksin. Genotipizacijom je dokazano prisustvo gena za toksine kod 22 izolata, kod kojih nije dokazano da stvaraju enterotoksine. Kod 69% izolata, za koje je dokazano da stvaraju enterotoksine dokazano je prisustvo barem jednog *se* gena. Najčešće je bio zastupljen genotip *sea+seh* (34,4%), zatim *sea* (18,8%) i *sea+seg+sei* (15,6%). Gen *tst*, koji kodira TSST-1 je dokazan kod 13 (13,5%) izolata. Geni (*ete* i *etb*), koji kodiraju egzofolijativne toksine A i B nisu dokazani ni u jednom uzorku.

U Francuskoj su trovanja hranom izazvana stafilokoknim enterotoksinima na drugom mestu uzroka trovanja hranom, posle *Salmonella* (Kerouanton i sar. 2007). U periodu od 2001. do 2003. godine od ukupno 1787 zabeleženih slučajeva oboljenja izazvanih hranom, kao uzročnik bolesti prenosivih hranom *S. aureus* je dokazan u 86 slučajeva, a za 173 slučaja postoji sumnja (Delmes i sar. 2005). Kerouanton i sar. (2007) su sproveli istraživanje sa ciljem da izvrše karakterizaciju izolata, koji se dovode u vezu sa trovanjima stafilokoknim enterotoksinima. Ispitali su 178 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka poreklom iz hrane i kliničkog materijala u slučajevima trovanja hranom zabeleženih u periodu od 1981. do 2002. godine u različitim gradovima dve oblasti Francuske. Za fagotipizaciju i ispitivanje prisustva gena za sintezu enterotoksina (*se*) *sea-sei* i stvaranje enterotoksina (SEA-SED) odabrali su 33 izolata. Svi izolati (33) su identifikovani kao *S. aureus*, 27 izolata su bila poreklom od ljudi, 6 izolata poreklom od ovaca, ili poreklom od nespecifičnog domaćina. Dvadeset devet izolata je nosilo jedan ili više *se* gena. Gen *sea* je bio najčešće zastupljen (n=23) i u kombinaciji sa *sed* (n=12) i *seh* (n=5). Dokazani su *seg* i *sei* zajedno sa *sea-sed*, sem jednog koji je sadržavao samo *seg-sei*.

Little i sar. (2008) su sproveli dva ispitivanja svežih sireva, sireva sa zrenjem i polutvrđih sireva, proizvedenih od sirovog mleka, termiziranog, ili pasterizovanog mleka, u Velikoj Britaniji tokom 2004. i 2005. godine da bi utvrdili mikrobiološki kvalitet ovih proizvoda. Najveći broj prikupljenih uzoraka je proizveden od kravljeg mleka (63,9%). Prema mikrobiološkim kriterijumima, datim u Preporukama Evropske komisije (2004/24/EC) 95,8% pregledanih uzoraka sireva je bilo zadovoljavajućeg mikrobiološkog kvaliteta, 2,2% uzoraka je bilo na granici mikrobiološkog kvaliteta i 2% uzoraka su bili nezadovoljavajućeg mikrobiološkog kvaliteta zbog velikog broja *S. aureus* (u 2 uzorka je broj bio: $1,9 \times 10^4$ i 4×10^4 cfu/g). Svi izolati *S. aureus* poreklom iz 13 uzoraka sireva, proizvedenih od sirovog mleka, u kojima je broj ovog mikroorganizma bio $\geq 10^4$ cfu/g su imali gene za sintezu enterotoksina. Rezultati su pokazali da najčešće mikrobiološke kriterijume nisu zadovoljavali (4% uzoraka) sirevi proizvedeni od kozijeg sirovog ili termiziranog mleka, zatim sirevi od kravljeg mleka (2,7% uzoraka) i sirevi od ovčijeg mleka (0,3% uzoraka). Prema poreklu sirevi su bili iz 21 zemlje. Najveći broj uzoraka sireva je bio poreklom iz Francuske (38,3%) i Velike Britanije (25,6%). Sirevi bez zrenja, koji su proizvedeni od sirovog i

termiziranog mleka, kao i polutvrđi sirevi od pasterizovanog mleka su bili češće nezadovoljavajućeg mikrobiološkog kvaliteta.

Ispitivanjem mikrobiološkog kvaliteta mleka i proizvoda od mleka iz restorana u Španiji (Valencija) prema Evropskim mikrobiološkim kriterijumima (92/46 EEC, 93/43/EEC i Pravilnikom Komisije No.20073/2005) **Sospedra i sar.** (2009) ni u jednom od 265 ispitanih uzoraka (95 uzoraka termički obrađenog mleka, 95 uzoraka mleka čuvanog pri sobnoj temperaturi i 75 uzoraka proizvoda od mleka) nisu dokazali *S. aureus*.

U cilju utvrđivanja prisustva *S. aureus*, tokom procesa dobijanja sireva od sirovog mleka u malim proizvodnim pogonima u Norveškoj, **Jakobsen i sar.** (2011) su pregledali uzorke mleka i sireva, koje su sakupili sa 9 farmi na kojima se proizvodi sir od kozijeg mleka i 8 farmi na kojima se proizvodi sir od kravljeg mleka. Ispitani su sirevi iz 49 proizvodnih partija sira od kozijeg mleka i 73 proizvodne partije sira od kravljeg mleka. Prevalencija *S. aureus* u siru proizvedenom od kozijeg mleka je bila različita tokom procesa dobijanja sira, od 91,8% u mleku (0h), 95,9% posle 24 h, da bi se smanjivao posle 30 dana (42,9%). Tokom proizvodnje sira od kravljeg mleka prevalencija ovog mikroorganizma je bila u mleku iz 47,2% proizvodnih partija, posle 5-6 h od početka procesa proizvodnje u 80,8% proizvodnih partija, a 30. dana proizvodnje u 24,7% proizvodnih partija. Najveći broj *S. aureus* je utvrđen posle prvog presovanja (posle 5-6 h od otpočinjanja procesa proizvodnje) u siru proizvedenom od kozijeg mleka (1,26-5,07 log cfu/g), a siru od proizvedenom od kravljeg mleka (1,33-3,58 log cfu/g).

U cilju utvrđivanja prisustva *S. aureus* i nivoa kontaminacije u svežim sirevima i sirevima sa kratkim vremenom zrenja (<60 dana), koji se proizvode na farmama-mlekarama u Švedskoj, **Rosengren i sar.** (2010) su ispitali 151 uzorak sira. Izolate *S. aureus* su ispitali na prisustvo gena za sintezu enterotoksina i sakupili informacije o proizvodnoj praksi. Od ukupno 151 uzorka sira *S. aureus* su dokazali u 69% (38/55) uzoraka sireva od sirovog mleka i 6% (6/96) sireva od pasterizovanog mleka. Broj ovog mikroorganizma manji od 5 log cfu/g su dokazali u 16% (6/39) uzoraka sireva od sirovog mleka i ni u jednom uzorku sira od pasterizovanog mleka. Broj *S. aureus* je bio značajno manji u sirevima proizvedenim od sirovog mleka sa dodatkom starter kultura, nego u sirevima proizvedenim od sirovog mleka bez dodatih starter kulture. Najveći broj (6,56 log cfu/g) dokazan je u siru od sirovog mleka proizvedenom bez

dodavanja starter kulture. Drugi faktori, kao što su pH, a_w i vrsta mleka nisu značajno uticali na broj koagulaza pozitivnih i *S. aureus* u sirevima. Za fenotipsku identifikaciju koagulaza pozitivnih stafilocoka, izolovanih iz 44 uzorka sira, odabrano je 156 izolata. Najveći broj izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka 152 (97%) je identifikovano kao *S. aureus*, zatim kao *S. intermedius* 3 (2%) izolata i kao *S. hyicus* 1 (1%) izolat. Dalja karakterizacija je vršena samo za izolate *S. aureus*. Geni za sintezu enterotoksina (*se*) nisu dokazani kod 45 (30%) izolata, 67 (44%) izolata je bilo nosilac samo jednog gena (*sec*), a 40 (26%) izolata je nosilo više od jednog *se* gena u kombinaciji *sea*, *seg*, *sei*, ili *sea* i *seh*. Kod ispitanih izolata nisu dokazani *seb*, *sed*, *see* i *sef* geni. Od svih izolata, 113 (74%) izolata je nosilo *tsst* gen. U supernatantima kultura poreklom od 28 izolata su dokazani SEA i SEC. Najčešće identifikovan biotip *S. aureus* je bio poreklom od ovaca (51%), ljudi (24%), nespecifičnog porekla (13%), živine (11%) i od goveda (1%). Izolati iz sira proizvedenog od kozijeg mleka su pripadali uglavnom biotipu poreklom od ovaca (73%). Izolati iz kravljeg mleka su uglavnom pripadali biotipu poreklom od ljudi (60%). Enterotoksine stafilocoka (SEA-SEE) nisu dokazali ni u jednom uzorku sira.

U Turskoj **Ertas i sar.** (2010) su koristeći multipleks PCR (mPCR) tehniku utvrdili prisustvo *S. aureus* i gena za sintezu enterotoksina stafilocoka (*Ses*) u sirevima proizvedenim od ovčijeg mleka i mlečnim dezertima. Prisustvo koagulaza pozitivnih stafilocoka je dokazano u 86 (57,3%) ispitanih uzoraka. Ukupan broj *S.aureus* je određivan na Baird Parker agaru i kretao se od 1×10^2 do 1×10^6 cfu/g. Broj koagulaza pozitivnih stafilocoka je bio manji od 10^5 cfu/g u 25 (25%) uzoraka sireva i 12 (24%) uzoraka mlečnih dezertata. Primenom ELISA tehnike enterotoksini stafilocoka (SEs) su dokazani u 7 (2,3%) uzoraka sireva i 5 (3,8%) uzoraka mlečnog dezerta. Enterotoksin A (SEA) je dokazan u 4 (1,3%) uzorka sira i 3 (2,3%) uzorka mlečnog dezerta; enterotoksin B (SEB) je dokazana u 2 (0,6%) uzorka sira; enterotoksin C (SEC) je dokazan samo u 1 (0,76%) uzorku mlečnog dezerta, enterotoksin D (SED) je dokazan u 1 (0,3%) uzorku sira i 1 (0,76%) uzorku mlečnog dezerta. Korišćenjem mPCR tehnike dokazani su geni za sintezu enterotoksina kod 13 (3,02%) od 80 izolata. Najčešće je dokazan *sea* gen kod 8 (1,8%) izolata, zatim *seb* gen kod 2 (0,46%) izolata, *sec* gen kod 1 (0,23%) izolata i *sed* gen kod 2 (0,46%) izolata. Među izolatima iz sireva dokazani su

geni *sea* kod 5 (1,6%) izolata, *seb* gen kod 2 (0,6%) izolata i *sed* gen kod 1 (0,3%) izolata.

Fooladi i sar. (2010) su bakteriološkim analizom 100 proizvoda od mleka, proizvedenih na tradicionalan način u Iranu, izolovali 32 izolata *S. aureus* (18 izolata iz krema, 10 izolata iz sireva i 4 izolata iz mleka). Od 32% uzoraka u kojima je dokazan ovaj mikroorganizam najviše je bilo uzoraka krema (18%), a najmanje uzoraka mleka (4%). Broj ovog mikroorganizma u uzorcima je varirao. Najveći broj *S. aureus* (7×10^5 log cfu/g) je utvrđen u kremu. Daljim ispitivanjem autori su dokazali da je 15,6% izolata iz proizvoda od mleka stvaralo enterotoksine (12,5% SEA i 3,1% SEB). Najveći broj ovih izolata je bio poreklom iz krema od kojih je 2 (6,2%) izolata *S. aureus* stvaralo SEA, ili SEB. Enterotoksin B (SEB) je stvarao samo 1 izolat (3,1%) iz sira. Nijedan izolat nije stvarao oba enterotoksina u isto vreme.

Zocche i sar. (2010) su koristeći PCR tehniku ispitali prisustvo gena koji kodiraju sintezu enterotoksina stafilokoka i pripadaju *egc* klasteru (*seg*, *sei*, *selm*, *seln* i *selo*) kod izolata *S. aureus* poreklom iz različite hrane životinjskog porekla (živalsko meso, sirovo mleko, kobasice i sir). Autori su dokazali prisustvo *egc* klastera kod izolata *S. aureus* i nalaz različitih genotipova, zavisno od vrste hrane iz koje je mikroorganizam izolovan. Kod izolata poreklom iz živalskog mesa su dokazani svi geni iz klastera, dok je kod druge vrste hane ovaj nalaz bio manji.

U Francuskoj proizvodi od mleka su hrana, koja se najčešće dovodi u vezu sa nalazom *S. aureus*. **Meyranda i sar.** (1998) su eksperimentalno inokulisali sirovo kozije mleko, koje se koristi za proizvodnju Camembert sira da bi ispitali sposobnost rasta *S. aureus* i stvaranje enterotoksina u toku proizvodnje i zrenja ovog sira. Kozije mleko je zagrevano do 34°C, a potom inokulisano sa sojem *S. aureus* 4890 1 A, koji je izolovan iz sira i ima sposobnost da stvara enterotoksin A (SEA) ≥ 1000 ng/ml i u tragovima enterotoksine B, C, D pri optimalnim uslovima. Početni broj *S. aureus* je bio 2, 3, 4, 5 i 6 log cfu/ml mleka. Sirevi su proizvedeni po proizvođačkoj specifikaciji i zrenje je trajalo 41 dan. Ovaj mikroorganizam je bio koncentrisan u grušu i broj je rastao do momenta soljenja. Posle soljenja, populacija *S. aureus* je bila stabilna i u velikom broju. Zapažena je redukcija za 1 log u sirevima sa početnim inokulumom većom od 10^3 cfu/ml na kraju zrenja (41. dan), upoređujući sa brojem određenim 22 h posle inokulacije. Broj stafilokoka u unutrašnjosti sira nije bio značajno veći u odnosu na broj na površini sira.

Ni iz jednog uzorka mleka, uzetih iz tankova za čuvanje mleka, negativne kontrole i salamure nije izolovan *S. aureus*. Enterotoksin A (SEA) je dokazan u uzorcima sira proizvedenog od mleka eksperimentalno kontaminiranog *S. aureus*. Količina enterotoksina se kretala od 1 do 3,2 ng/g u siru proizvedenom od mleka sa početnim brojem *S. aureus* 10^3 - 10^6 cfu/g. Enterotoksin nije dokazan u sirevima proizvedenim od mleka sa najmanjim inokulumom. Rezultati određivanja pH u sirevima pokazuju da se ova vrednost blago snižavala tokom koagulacije i na ktraju ceđenja, kada je bila 6,3. Tokom procesa zrenja sira pH vrednost je rasla i 20. dana dostigla 7,1, a 41. dana 7,3. Na površini sira pH vrednost je bila znatno viša u odnosu na unutrašnjost sira.

Rast *S. aureus* i stvaranje enterotoksina tokom proizvodnje 3 tipa polutvrda sira (Saint-Nactaire tipa, Saint-Nactaire sa registrovanim geografskim poreklom i sira sa registrovanim geografskom poreklom Salers) od kravljeg sirovog mleka su ispitali **Delbes i sar.** (2006). Rezultati koje su dobili pokazuju da je broj koagulaza pozitivnih stafilocoka rastao tokom prvih 6 h. Između 6 i 24 h, broj koagulaza pozitivnih stafilocoka se uvećao za manje od 0,5 log cfu/ml. Broj koagulaza pozitivnih stafilocoka u sirovom mleku se kretao od <10 cfu/ml do 3,3 log cfu/ml. Maksimalan broj koagulaza pozitivnih stafilocoka je dosignut u siru starom 1 dan (2,82-6,84 cfu/g). Na broj koagulaza pozitivnih stafilocoka je uticao pH. Početni broj stafilocoka u mleku bi trebalo da bude manji od 100 cfu/ml, a najbolje da je manji od 40 cfu/ml mleka. Autori su dali preporuku, da bi se ograničio rast koagulaza pozitivnih stafilocoka, pH vrednosti bi trebale da budu oko, ili niže od 5,8 u 6 h za Saint-Nactaire sireve i 6,3 i niže za Salers sireve. Enterotoksini su dokazani u dva Salers sira kod kojih je broj koagulaza pozitivnih stafilocoka 1. dana bio 5,55 i 5,06 log cfu/g i u kojima je pH vrednost bila posle 6 h veća od 6,6, odnosno 6,5.

Akkaya i Sancak (2007) su ispitali sposobnost rasta i stvaranja enterotoksina u Herby siru, koji se proizvodi od sirovog mleka uz dodavanje 25 različitih biljaka iz Anadolije, Turska. Autori su eksperimentalno inokulisali sirovo i pasterizovano mleko za proizvodnju 10 sireva sa monokulturom i mešenom kulturom referentnih sojeva *S. aureus* (10^5 cfu/ml) koji sintetišu A, B, C, D enterotoksine. Sposobnost rasta i stvaranja enterotoksina je praćeno tokom 90 dana zrenja. Broj *S. aureus* u uzorcima sira, proizvedenim od pasterizovanog mleka je rastao u koagulumu i grušu, dostižući najveći broj od 7,778 log cfu/g sira starog 3 dana, a potom je došlo do smanjivanja broja posle

15 dana, da bi posle 90. dana zrenja broj *S. aureus* bio 2,146 log cfu/g. U sirevima proizvedenim od sirovog mleka broj *S. aureus* u koagulumu i grušu je bio visok (8,531-9,431 log cfu/g), a najveći broj je bio u siru starom 3 dana (9,799 log cfu/g), a potom je došlo do smanjenja broja i u siru starom 90 dana broj se kretao od 5,954-6,278 log cfu/g.

Enterotoksin A je dokazan u grušu tokom dobijanja sira od eksperimentalno kontaminiranog pasterizovanog mleka. Enterotoksini A, B, C i D su dokazani 3. dana zrenja, a enterotoksin C je dokazan 15. dana u siru proizvedenom od eksperimentalno kontaminiranog pasterizovanog mleka. Ni u jednom uzorku sira proizvedenog od eksperimentalno kontaminiranog sirovog mleka tokom proizvodnje nisu dokazani enterotoksini, iako je broj *S. aureus* dostizao vrednost od 10^7 cfu/g.

Bianchi i sar. (2013a) su u periodu od januara 2010. do jula 2011. godine analizirali ukupno 1245 uzoraka (848 uzoraka sirovog mleka i 397 uzoraka proizvoda od mleka) na prisustvo 11 eneterotoksina stafilokoka i eneterotoksinima sličnih toksina (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SER SE/J i SE/P). Iz 481 (39%) uzoraka je izolovan *S. aureus*. Od 481 izolata *S. aureus* iz sireva prisustvo jednog, ili više gena je dokazano kod 255 (53%) izolata, a utvrđeno je 35 različitih profila gena za sintezu eneterotoksina. Ni kod jednog izolata nije dokazano prisustvo *seb* i *sec* gena, dok je najčešće dokazan *ser* gen kod 134 (28%) izolata, zatim *sed* (25%) i *selj* (25%).

Rola i sar. (2013) su ispitali 82 uzorka (48 uzoraka sirovog mleka, poluproizvoda i proizvoda od mleka i 34 brisa iz okruženja proizvodnje) sa 9 farmi-mlekara u Poljskoj. Uzorci su uzeti u fazama proizvodnje kada se očekuje najveći broj *S. aureus*. Koagulaza pozitivne stafilokoke su dokazane u 39 (81,3%) uzoraka mleka i sireva i 12 (35,3%) briseva. Od 39 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka poreklom iz mleka i sireva 27 (69,2%) je identifikovano kao *S. aureus* pomoću Api 32 Staph testa, a 12 (30,8%) kao *Staphylococcus* sp. Enterotoksogene koagulaza pozitivne stafilokoke su dokazane u uzorcima sa 6 farmi-mlekara. Primenom PCR tehnike ispitano je da li su prisutni geni za sintezu enterotoksina. Više od polovine (54,9%) izolata je nosilo gene za sintezu enterotoksina, od kojih je 17 (60,7%) izolata nosilo gene *sed* i *sej* a 5 izolata istovremeno i *ser* gen. Geni nisu bili prisutni pojedinačno ni u jednom ispitanom izolatu. Kod 3 (10,7%) izolata je utvrđeno prisustvo *seg* i *sei* gena.

Ispitivanjem 220 uzoraka mleka i proizvoda od mleka **Hassani i sar. (2014)** su dokazali *S. aureus* u 58 (26,36%) uzoraka. Gen *sea* su dokazali kod 25% izolata poreklom iz mleka i 18% izolata poreklom iz sireva.

Ispitivanjem prevalncije *S. aureus* u proizvodima od mleka u Slovačkoj i prisustva *se* (*sea*, *seb* i *sed*) gena **Medvedova i sar. (2014)** su dokazali prisustvo *sea* gena kod 32% izolata. Ni kod jednog izolata *S. aureus* nisu dokazali *seb* gen i *sed* gen.

Pedonese i sar. (2014) su proučili rast *S. aureus* i stvaranje enterotoksina posle eksperimentalne kontaminacije u toku proizvodnje Caciotta (Ricotta) italijanskog mekog sira proizvedenog od sirovog mleka sa i bez dodavanja komercijalnih starter kultura. Za eksperimentalnu kontaminaciju korišćena su dva različita inokuluma (5,03 i 3,22 log cfu/ml) *S. aureus*, koji ima sposobnost da stvara eneterotoksine. U eksperimentu je ispitan sir proizveden od sirovog mleka kontaminiranog sa 2,15 log cfu/ml koagulaza pozitivnih stafilokoka. U siru proizvedenom bez starter kulture sa većim inokulumom broj koagulaza pozitivnih stafilokoka je dostigao 7,57 log cfu/g i veće vrednosti posle faze acidifikacije, nego u siru proizvedenom sa starter kulturom (manje od 6,5 log cfu/g). Enterotoksini su dokazani u sirevima proizvedenim sa i bez starter kultura. U siru sa manjim inokulumom i bez starter kultura broj koagulaza pozitivnih stafilokoka je bio 5 do 6 log cfu/g i nije dokazano stvaranja enterotoksina.

Ispitivanjem nivoa kontaminacije *S. aureus* sira Cotija u Meksiku i prisustva gena za stvaranje toksina **Torbido-Jimenez i sar. (2014)** su dokazali *S. aureus* u 27 (54%) od 50 uzoraka sira. Broj *S. aureus* se kretao se od 12×10^3 do 3×10^6 cfu/g. Primenom PCR tehnike su dokazali *tstt-1* gen kod jednog izolata *S. aureus*.

Vicosa i sar. (2013) su primenom PCR tehnike kod 91 (98,9%) od 92 izolata *S. aureus* poreklom iz sirovog mleka i sireva u Minas Gerisa oblasti, Brazil dokazali prisustvo bar jednog *se* gena. Najčešće dokazan gen je bio *sei* (97,8%), a gen *seu* je dokazan kod 35 (38%) izolata. Geni *seg* i *sei* su dokazani istovremeno kod 49 izolata.

U Poljskoj **Lawrinowicz i sar. (2007)** su ispitali prisustvo *se* i *sel* gena kod 53 izolata *S. aureus* iz uzoraka hrane prikupljenih u periodu od 2004-2005. godine, 18 izolata iz hrane prikupljenih u periodu od 1960-1970.godine i 30 izolata poreklom sa sluzokože nosa ljudi kliconoša u periodu od 2000-2002.godine. Kod 80% od svih ispitanih izolata je dokazano prisustvo *se* i *sel* gena, sa većom prevalencijom kod izolata porekom od ljudi kliconoša (93%) u odnosu na izolate iz hrane (76%). Gen *sea* je češće dokazan

kod izolata poreklom od ljudi kliconoša (27%) u odnosu na izolate poreklom iz hrane (11%) u periodu od 2004-2005.godine. Od 18 izolata poreklom iz hrane u periodu 1960-1970. godine *sea* gen je dokazan kod 10 izolata *S. aureus*.

2. 2. Faktori koji utiču na rast *S. aureus* i stvaranje enterotoksina

U ovom delu pregleda literature će biti prikazani faktori, koji utiču na rast *S. aureus* i stvaranje enterotoksina.

Staphylococcus aureus ima sposobnost da raste i stvara eneterotoksine pri različitim uslovima u hrani. U literaturi je dobro proučena sposobnost rasta, umnožavanja *Staphylococcus aureus* posle eksperimentalne kontaminacije mleka i sireva (Tabela 2.2.1.)

Tabela 2.2.1. Limiti za rast i stvaranje enterotoksina (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1996).

Faktor	Rast		Stvaranje toksina	
	Optimum	Raspon	Optimum	Raspon
Temperatura °C	37	7-48	40-45	10-48
pH	6-7	4-10	7-8	4,5-9,6 Aerobno 5,0-9,6 Anaerobno
Aktivnost vode (a _w)	0,98	0,83->0,99 Aerobno 0,90->0,99 Anaerobno	0,98	0,87-->0,99 Aerobno 0,90->0,99 Anaerobno

2.2.1. Uticaj temperatura na rast *S. aureus*

S. aureus je mezofilni mikroorganizam sa optimalnom temepturom rasta pri 37°C. Minimalna temperaturta pri kojoj ovaj mikroorganizam raste u hrani je 5°C i to u slanini (Farrrel i Upton, 1978). Rast je bio moguć pri 6,7°C u živinskom mesu „á la king“ (Angelotti i sar.1961). Rast pri 7°C je zabeležen u UHT mleku (Medvedova i sar. 2009). U bujonu sa mešanom kulturom 5 enterotosogenih izolata *S. aureus* nije bilo rasta pri 7,5°C. Pri 8°C rast je bio zabeležen kada su drugi uslovi bili optimalni (Valero i sar. 2009). Ispitujući sposobnost različitih izolata da rastu unutar uskih interavala temperature Schmitt i sar. (1990) su zaključili da je rast moguć pri 7°C.

Kao maksimalna temperatura pri kojoj je bio moguć rast *S. aureus* se navodi 48,9°C u obranom mleku (**Stiles i Witter, 1965**). Druga istraživanja su pokazala da je to oko 45°C (**Angelotti i sar. 1961, Vandesbosch i sar. 1973**). Dalja istraživanja su potvrdila da ovaj mikroorganizam može da raste pri 46°C samo ako je zaštićen rastvorom 1M NaCl (**El-Banna and Hurst, 1983**), iako su **George i sar. (1959)** zabeležili rast u obranom mleku. Nije bilo rasta za jedan izolat pri 51°C, ali je rastao pri 46°C (**Medvedova i sar. 2009**).

2.2.2. Uticaj pH na rast *S. aureus*

Većina izolata *S. aureus* raste u rasponu pH od 4,5 do 9,3 (**Bergdoll i Lee Wong, 2006**) sa optimalnim rastom pri pH 6-7 (**Baird-Parker, 2000; Bremer i sar. 2004; Halpin-Dohnalek i Marth, 1989; Jay, 2000**).

Na rast pri niskim vrednostima pH utiču i drugi faktori sredine. Rast je inhibisan sa 0,1% rastvorom sirćetne kiseline i prisustvom masnih kiselina kratkih lanaca (C₁-C₄) (**Normano i sar. 2007**). *S. aureus* je više osetljiv na acidifikaciju kada je koncentracija soli povećana, iako je halotolerantan mikroorganizam.

Brza acidifikacija do pH vrednosti pri kojima nije moguć rast je najefikasniji način inhibicije ovog mikroorganizma. Kiseline nemaju isti kapacitet za inhibiciju pri određenim pH vrednostima i uticaj zavisi od kiseline koja se koristi za inhibiciju. Veći efekat imaju organske kiseline pri pH vrednostima ekvivalentnim onim, koje su postignute neorganskim kiselinama.

U mešanoj kulturi 5 enterotoksogenih izolata *S. aureus* je raslo pri 4,5 (**Valero i sar. 2009**). Slične rezultate su dobili **Charlier i sar. (2008)** u eksperimentu u kojem je pH podešavan sa mlečnom kiselinom. Prethodno izlaganje *S. aureus* 2 sata pri pH 4,5 i 30 minuta pri pH 9,5 su povećali preživljavanje ove bakterije pri pH 2,5 i 12,0 (**Cebrian i sar. 2010**).

2.2.3. Uticaj organskih kiselina na rast *S. aureus*

Uticaj organskih kiselina na rast *S. aureus* zavisi od koncentracije njihovih nedisosovanih jona. Konstanta disocijacije (pK_a) je vrednost pH pri kojoj je odnos disosovanih i nedisosovanih oblika 50:50. Sirćetna kiselina i propionska kiselina čije su pK_a 4,8 i 4,9 su jači inhibitori od mlečne kiseline čija je pK_a 3,9 (**Baird-Parker, 2000**;

Charlier i sar. 2009). Otpornost *S. aureus* na pH vrednosti veće od 5,5 se objašnjava održavanjem intracelularnog pH disocijacijom, ili otpuštanjem protona iz citoplazme, a takođe i ekspresijom gena odgovornih za puferski kapacitet citoplazme. Ovi geni obuhvataju gene, koji kodiraju intracelularni haperoni, ureaza operon i geni za metabolizam i transport aminokiselina (histidin, lizin, arginin), ugljenih hidrata i fosforne kiseline (**Charlier i sar. 2009; Baker-Austin i Dopson, 2007**).

Potpuna inhibicija se postiže pri pH ispod 5,0. Snižavanje intracelularnog pH i stres oštećuju strukturu zida bakterijske ćelije i vode ka smanjenoj aktivnosti enzima, koji su osetljivi na pH. Nedisosovani oblici kiseline učestvuju u respiratornom lancu. Protonski oblici difunduju u ćeliju pri niskim pH što je praćeno disocijacijom protona. Rast mikroorganizma je tada jako ugrožen, jer se onda raspoloživa energija u ćeliji koristi za deacidifikaciju citoplazme aktivacijom proton gradijenta duž cele citoplazmatske membrane (**Baker-Austin i Dopson, 2007**).

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) sirćetne i mlečne kiseline za *S. aureus* je 0,6 i 2,5 µl/ml (**de Oliviera i sar. 2010**). Pokazalo se da mlečna kiselina ispoljava veći efekat u kontroli patogenih bakterija u mesnom bujonu kada je dodata u količini, koja se navodi kao MIC. Inhibitorna aktivnost je dokazana kada su organske kiseline korišćene u sub MIC koncentracijama u kombinaciji sa karvakrolom i timolom.

Rast *S. aureus* u rekonstituisanom mleku je bio moguć pri pH 4,5 i temperaturi od 37°C kada je pH podešen sa HCl, ali je izostao pri istom pH podešenom sa mlečnom kiselinom.

2.2.4. Uticaj soli i aktivnosti vode (a_w) na rast *S. aureus*

Iako je *S. aureus* halotolerantan mikroorganizam u poređenju sa drugim mikroorganizmima so inhibiše rast *S. aureus*. Ovaj mikroorganizam može da raste pri koncentraciji NaCl od 2,5 do 20%. **Valero i sar. (2009)** su dokazali da je 5 enterotoksogenih sojeva stafilokoka u mešanoj kulturi raslo pri a_w 0,867 kada je kao hjumektant korišćena so. *S. aureus* je rastao u testenini sa a_w ispod 0,86 (**Valik i Görner, 1993**). Rast izolata *S. aureus* je dokazan pri a_w 0,893 (15,25% NaCl), ali ne i pri a_w 0,869 (18,17% NaCl) (**Medvedova i sar. 2009**). **Kreisman i Labuza (1978)** su dokazali da *S. aureus* može da raste u siru pri a_w 0,94 i pH oko 5,7, ali ne i pri a_w 0,91. Snižavanje vrednosti za a_w od 0,993 do 0,95 je uticalo na produženje lag faze, stopu

rasta i maksimalnu koncentraciju, a efekat je bio izraženiji pri snižavanju temperature. Rast *S. aureus* je zabeležen u mesu pri koncentraciji NaCl od 20% (Tatini, 1973).

2.2.5. Uticaj atmosfere na rast *S. aureus*

S. aureus je fakultativni anaerobni mikroorganizam koji može da raste usporeno u odsustvu kiseonika. Rast *S. aureus* u bujonu bio je brži a maksimalna gustina populacije je veća u aerobnim u odnosu na anaerobne uslove (Belay i Rasooly, 2002). Oksigenacija, tokom sabiranja mleka posle muže ili tokom proces proizvodnje sira, može da favorizuje umnožavanje ovog mikroorganizma, dok mikro-anaerobni uslovi u siru mogu da budu nepovoljni za stvaranje enterotoksina (Cretenet i sar. 2011).

2.2.6. Uticaj kompetitivnih mikroorganizma na rast *S. aureus*

Pitt i sar. (2000) su proučili kinetiku rasta *S. aureus* u sirovom i pasterizovanom mleku pri 37°C koja je bila ista u prvih 16 h inkubacije. Smanjenje broja ovog mikroorganizma posle dostignute maksimalne gustine populacije je bilo brže u sirovom mleku a broj je bio za 2 log cfu/ml manji nego u pasterizovanom mleku posle 72 h inkubacije. Ovi podaci mogu da ukazuju da je rast isti u sirovom i pasterizovanom mleku u ranim fazama proizvodnje sireva. Posle inokulacije *S. aureus* u mleko, poreklom iz četvrti zahvaćene mastitisom izazvanim streptokokama, rast ovog mikroorganizma je bio neznatno veći u odnosu na rast u sirovom mleku (Fang et. al. 1993). U sirevima proizvedenim od sirovog mleka bakterije mlečne kiseline, kao kompetitivna mikroflora pokazuju inhibitorno delovanje prema patogenim mikroorganizmima (Ortolani i sar. 2010). Pereira i sar. (2009) su ispitali uticaj izolata tri vrste bakterija mlečne kiseline tokom proizvodnje portugalskog sira. Izolat *Lactococcus lactis* je pokazao efiksano inhibitorno delovanje na *S. aureus*, dok su *Lactobacillus brevis* i *Lb. plantarum* pokazali manju inhibiciju. Radovanović i Katić (2009) su dokazale da mešana kultura *Lb. lactis* i *Lb. plantarum* usporava rast *S. aureus* u sterilnom obranom mleku pri temperaturi od 30°C.

2.2.7. Uticaj sadržaja masti na rast *S. aureus*

Postoje dokazi da *S. aureus* raste u manjem broju u proizvodima od mleka sa većim sadržajem masti, ali ovo zavisi od soja (**Halpin-Dohnalek i Marth, 1989**). Ova pojava se može dovesti u vezu sa osobinom da stvara lipaze i inhibicijom rasta, koja nastaje zbog slobodnih masnih kiselina. Slobodne masne kiseline se oslobađaju usled lipolitičke aktivnosti *S. aureus* i na taj način deluju autoinhibitorno.

2.2.8. Uticaj temperature na stvaranje enterotoksina stafilokoka

Minimalna i maksimalna temperatura pri kojoj *S. aureus* može da se stvara enterotoksin su 10°C i 45°C (**Bergdoll i Lee Wong, 2006**) sa optimalnom temperaturom 30-40°C. **Aoyama i sar. (2008)** su dokazali enterotoksin u BHI bujonu posle 5 dana inkubacije pri temperaturi od 10,8 °C, ali i ne pri temperaturi od 8,7°C posle 10 dana inkubacije. Iako mikroorganizam raste pri temperaturama ispod 10°C ne znači da će stvarati enterotoksine. Enterotoksin nisu stvarala 2 enterotoksigena soja *S. aureus* posle inkubacije 36 h pri temperaturi od 18°C kada je populacija *S. aureus* bila 10⁹ cfu/g (**Yang i sar. 2001**). Termička stabilnost enterotoksina zavisi od vrste hrane, pH, sadržaja NaCl i od same vrste enterotoksina. Enterotoksin A (SEA) je otporniji na delovanje temperature pri pH 6,0 i višim vrednostima, nego pri pH 4,5-5,5, dok je enterotoksin D (SED) više stabilan pri pH 4,5-5,5, nego pri 6,0. Ako enterotoksin nije u potpunosti inaktivisan delovanjem temperature može da dođe do reaktivacije tokom kuvanja, čuvanja, inkubacije (**Tatini, 1976**).

2.2.9. Uticaj pH na stvaranje enterotoksina stafilokoka

Stvaranje enterotoksina je moguće u rasponu pH od 4,5 do 9,6 (**ICMSF, 1996**). Optimalna pH vrednost za sintezu enterotoksina je 5,0. Rast *S. aureus* je moguć pri 12% NaCl, ali nema sinteze enterotoksina. **Carpenter i Silverman (1976)** su zabeležili stvaranje enterotoksina A (SEA) pri pH 6,5-7,0 u kulturi sa kontrolisanim pritiskom kiseonika. Posle eksperimentalne inokulacije sa 10⁸ cfu *S. aureus* /ml bez dodavanja soli **Genigeorgis i saradnici (1971)** su dokazali sintezu enterotoksina pri rasponu pH od 4,0 do 9,83. Minimalna vrednost pH pri kojoj može da se stvara enterotoksin zavisi da li je rast u aerobnim ili anaerobnim uslovima. Za osam sojeva *S. aureus*, koji su stvarali

enterotoksin A, minimalna pH vrednost je bila od 4,9 do 5,9 u aerobnim uslovima. U anaerobnim uslovima nema sinteze enterotoksina B i C pri pH 5,7.

2.2.10. Uticaj aktivnost vode (a_w) na stvaranje enterotoksina stafilokoka

Niske vrednosti za aktivnost vode više utiču na sintezu enterotoksia B (SEB), nego na enterotoksin A (SEA) (Qi i Miller, 2000). Rast tri soja *S. aureus* pri 37°C i stvaranje eneterotoksina A i B (SEA i SEB) su zabeleženi pri a_w 0,95. Količina eneterotoksina A, koja je stvorena pri a_w 0,996 i 0,95 je bila je približno ista, dok je je sinteza eneterotoksina B bila smanjena pri nižim vrednostima (Paullin i sar. 2011). Sinteza enterotoksina A (SEA) je bila pri 35°C u svinjskom mesu sa a_w 0,86, ali ne i pri a_w 0,83. U goveđem mesu stvaranje enterotoksina je bilo pri a_w 0,88 (Tatini, 1973). Rast *S. aureus* je moguć u širem rasponu a_w u odnosu na stvaranje enterotoksina.

2.2.11. Uticaj kompetitivnih mikroorganizama na stvaranje enterotoksina stafilokoka

U literaturi su prisutni podaci o uticaj kompetitivnih mikroorganizama na sintezu enterotoksina (Smith i sar. 1983). Stvaranje enteretoksina zavisi od vrste mikroorganizma, koji je u kompeticiji sa *S. aureus*. Bakterije mlečne kiseline (*Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Leuconostoc*) su razgradile delimično prečišćen enterotoksin A. Opšte je prihvaćeno da se enterotoksin manje stvara kada je *S. aureus* u prisustvu drugih mikroorganizama i da je potreban veći broj ovog mikroorganizma da bi se stvorio enterotoksin (Tatini, 1973).

2.2.12. Uticaj atmosfere na stvaranje enterotoksina stafilokoka

Anaerobni uslovi pri 37°C nisu inhibisali stvaranje eneterotoksina A (SEA), ali je količina enterotoksina bila manja nego u aerobnim uslovima (Belay i Rasooly, 2002, Carpenter i Silverman, 1976).

2.2.13. Uticaj hranljivih materija na stvaranje enterotoksina stafilokoka

Izvori ugljenika utiču na stvaranje enterotoksina (**Smith i sar. 1983**). Dodavanje glukoze inhibiše stvaranje SEA, SEB i SEC, a objašnjava se snižavanjem pH kao rezultat metabolizma šećera. Dodavanje amino kiselina je uticalo na stvaranje SEB.

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Podaci iz literature pokazuju da su koagulaza pozitivne stafilokoke i *Staphylococcus aureus* prisutni u odeđenom broju u mleku i sirevima. S aspekta bezbednosti hrane značaj ovog mikroorganizma se ogleda u tome što stvara termostabilne enterotoksine koji uneti u određenoj količini, putem hrane, u organizam čoveka dovode do intoksikacije. Dovoljna količina enterotoksina, koja dovodi do intoksikacije, nastaje pri broju koagulaza pozitivnih stafilokoka većem od 10^5 cfu/g hrane. Uslovi tokom proizvodnje mekih sireva slatkom koagulacijom pogoduju razmnožavanju koagulaza pozitivnih stafilokoka. Za procenu rizika od nalaza enterotoksina stafilokoka u mekom siru, proizvedenom u domaćinstvu, važno je da se odrede fizičko hemijske karakteristike, broj laktobacila i laktokoka, broj koagulaza pozitivnih stafilokoka u siru i ispita sposobnost stafilokoka izolovanih iz sira da stvaraju enterotoksine. Stoga je cilj ove doktorske disertacije bio da se, na osnovu broja koagulaza pozitivnih stafilokoka u siru, uslova za njihovo razmnožavanje i stvaranje enterotoksina, kao i prisustva gena za sintezu enterotoksina kod koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz sira, proceni rizik od nalaza enterotoksina stafilokoka u mekim sirevima.

Za ostvarivanje ovog cilja postavljeni su sledeći zadaci:

- 3.1. Odrediti broj koagulaza pozitivnih stafilokoka, *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. u sirevima proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka.
- 3.2. Odrediti fizičko-hemijske parametre (pH, sadržaj NaCl, masti, suve materije i aktivnost vode) u sirevima proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka.
- 3.3. Formirati pul koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz sireva i izvršiti njihovu identifikaciju ispitivanjem makromorfoloških, mikromorfoloških i biohemijskih osobina.
- 3.4. Ispitati da li koagulaza pozitivne stafilokoke, izolovane iz sireva, stvaraju klasične enterotoksine (SEA, SEB, SEC, SED i SEE) .
- 3.5. Identifikovati gen ili gene za sintezu enterotoksina.
- 3.6. Ispitati na prisustvo enterotoksina sireve u kojima je utvrđen broj enterotoksogenih stafilokoka iznad 10^5 cfu/g.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. Materijal

Materijal za ispitivanje predstavljalo je 555 uzoraka mekih sireva proizvedenih od kuvanog i nekuvanog mleka od kojih je 10 sireva bilo proizvedeno od kozijeg mleka, a 545 sireva od kravljeg mleka.

4.1.1. Sirevi

Uzorci sireva uzeti su na 17 pijaca (16 pijaca na teritoriji Beograda i 1 pijaca u Srbiji, selo Guča) (Tabela 4.1.1.). Ispitano je 555 uzoraka sireva različite starosti, koji su proizvedeni u individualnim domaćinstvima iz različitih geografskih lokaliteta u Srbiji (slika 4.1.1). Od 555 uzoraka sira, 389 uzoraka sira bili su slatko-koagulišući sirevi, a 166 uzoraka sira kiselo-koagulišući sirevi. Kriterijum po kojem su razvrstani sirevi u slatko-koagulišuće i kiselo-koagulišuće sireve je bila pH vrednost sira. Svi sirevi u kojima je pH vrednost bila viša od 4,6 su svrstani u slatko-koagulišuće, a sirevi sa pH vrednošću nižom od 4,6 u kiselo-koagulišuće (**Jovanović i sar. 2000**). Starost sireva je određivana na osnovu ankete proizvođača i svi sirevi starosti do 10 dana su svrstani u sireve bez zrenja, a sirevi čija je starost bila preko 10 dana u sireve sa zrenjem (Prilog 1 i 2.)

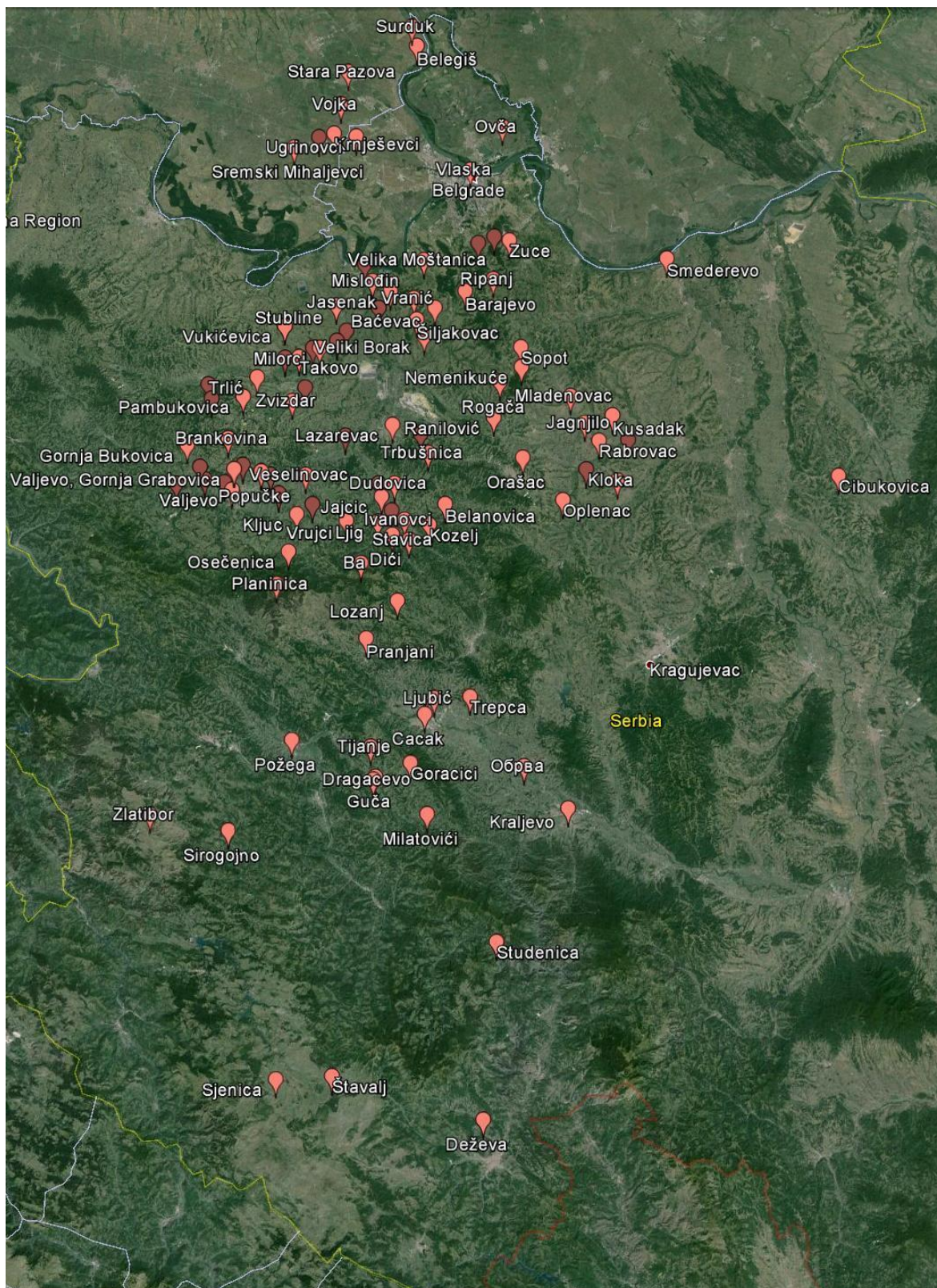
4.1.2. Mikroorganizmi

U toku eksperimenta ispitivano je 168 primoizolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, izolovanih iz 555 uzorka sireva. Za dalja ispitivanja odabrano je 85 koagulaza pozitivnih stafilokoka iz uzoraka sireva proizvedenih od kuvanog ili nekuvanog mleka na osnovu sposobnosti da stvaraju hemolizine. Ispitivanjem biohemijskih osobina identifikovana su 45 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, a potom je kod 26 izolata, za koje je dokazano da stvaraju enterotoksine, ispitano prisustvo gena za sintezu enterotoksina.

Kao referentni soj korišćeni su:

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Staphylococcus aureus aureus CIP 67.8 koji stvara enterotoksin A i enterotoksin B.



Slika 4.1.1. Prikaz mesta iz kojih potiču ispitani uzorci mekih sireva sa pijaca



Slika 4.1.2. Pizance na teritoriji Beograda sa kojih su uzeti uzorci sireva za ispitivanje

4.1.3. Podloge

U toku eksperimenta korišćene su sledeće mikrobiološke podloge:

Podloge za izolaciju i određivanje ukupnog broja mikroorganizama

Mikrobiološke podloge, koje su korišćene tokom ispitivanja su pripremane iz praha komercijalnih hranljivih podloga.

4.1.3.1. Podloga za izolaciju i određivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka i *Staphylococcus aureus*

Za izolaciju i određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka i *Staphylococcus aureus* korišćena je podloga po Baird-Parkeru.

Sastav podloge po Baird Parkeru (LAB 85, Engleska) (g/l):

Trypton	10,0 g
Mesni ekstrakt	7,5 g
Ekstrakt kvasca	1,0 g
Glicin	12,0 g
Natrijum piruvat	10,0 g
Litijum hlorid (LiCl)	5,0 g
Agar	20,0 g

Podloga je pripremana tako što je 65,5 g praha rastvoreno u 1000 ml destilovane vode, a posle zagrevanja, podloga je sterilisana u autoklavu 15 minuta pri 121°C, krajnji pH je bio 6,8±0,2. U podlogu rashlađenu na oko 47°C je dodata suspenzija žumanca jajeta (10 ml) i 1 ml 2% kalijum telurita na 100 ml podloge.

4.1.3.2. Podloga za određivanje broja *Lactococcus* spp.

Za određivanje broja *Lactococcus* spp. korišćen je M-17 agar.

Sastav M-17agara (Liofilchem, Italija) (g/l):

Trypton	2,5 g
Sojin pepton	5,0 g
Ekstrakt mesa	5,0 g
Laktoza	5,0 g
Pepton	2,5 g
Askorbinska kiselina	0,5 g
Ekstrakt kvasca	2,5 g
Magnezijum sulfat (MgSO ₄)	0,25 g
Dinatrijum-β-glicerofosfat	19,0 g
Agar	15,0 g

Podloga je pripravljena tako što je 57,3 g praha rastvoreno u 1000 ml destilovane vode, potom je zagrevana da se otopi i sterilisana 15 minuta pri 121°C, krajnji pH je bio 7,2±0,2 pri 25°C.

4.1.3.3. Podloga za određivanje broja *Lactobacillus spp.*

Za određivanje broja *Lactobacillus spp.* korišćen je M.R.S agar (De Man, Rogosa Sharpe agar).

Sastav M.R.S agara (LAB, Engleska) (g/l):

Pepton	10,0 g
Ekstrakt mesa	8,0 g
Ekstrakt kvasca	4,0 g
D(+) glukoza	20,0 g
Kalijum hidrogen fosfat (KH ₂ PO ₄)	2,0 g
Tween 80	1,0 g
Diamonijumhidrogenacetat	2,0 g
Natrijum acetat	5,0 g
Magnezijum sulfat (MgSO ₄)	0,2 g
Mangan sulfat (MnSO ₄)	0,004 g
Agar	12,0 g

Podloga je pripravljena tako što je 70 g praha rastvoreno u 1000 ml destilovane vode. Podloga je zagrevana da se otopi i sterilisana 15 minut pri 121°C, krajnji pH je bio 6,4±0,2 pri 25°C.

4.1.3.4. Sredstvo za razblaživanje i decimalna razblaženja uzoraka sira

Za pripremanje osnovnog i decimalnih razblaženja korišćena je puferisana peptonska voda.

Sastav puferisane peptonske vode (LAB, Engleska) (g/l):

Produkt enzimskog razlaganja kazrina	10.0 g
Natrijum hlorid (NaCl)	5,0g
Dinatrijumhidrogenfosfat (anhidrat)	3,6 g
Kalijumhidrogenfosfat	2,5 g

Podloga je pripravljena tako što je 20,1 g praha rastvoreno u 1000 ml destilovane vode i ostavljeno da stoji 10 minuta, a potom je podloga sterilisana u autoklavu 15 minuta pri 121°C, krajnji pH bio je 7,0±0,2.

4.1.3.5. Podloga za umnožavanje *Staphylococcus aureus* i ispitivanje sposobnosti izolata da stvaraju enterotoksine

Za umnožavanje *Staphylococcus aureus* i ispitivanje sposobnosti izolata da stvaraju enterotoksine korišćen je Brain Heart Infusion (BHI)-bujon (LAB, Engleska).

Sastav BHIbujona (LAB, Engleska) (g/l):

	17,5 g
Moždano srčani infuz	
Triptoza	10,0 g
Glukoza	2,0 g
Natrijum hlorid (NaCl)	5,0 g
Dinatrijumhidrogenfosfat	2,5 g

Podloga je pripravljena tako što je 37 g praha podloge rastvoreno u 1000 ml destilovane vode i ostavljeno da stoji 10 minuta, a potom uz mešanje podloga je blago zagrevana da se rastvori i razlivena u epruvete. Sterilizacija podloge vršena je u autoklavu 15 minuta pri 121°C, krajnji pH je bio 7,0±0,2.

4.1.3.6. Krvni agar za ispitivanje sposobnosti koagulaza pozitivnih stafilokoka da stvaraju hemolizine

Za ispitivanje sposobnosti *Staphylococcus aureus* da stvara hemolizine korišćen je krvni agar, koji je pripreman od baze za krvni agar uz dodatak 8-10% ovčije krvi.

Sastav baze za krvni agar (Torlak) (g/l):

Triptozni pepton	20,0 g
Ekstrakt kvasca	3,0 g
Natrijum hlorid (NaCl)	5,0 g

Agar 15,0 g

Podloga je pripremana tako što je 43 g praha rastvoreno u 1000 ml destilovane vode, ostavljeno da da stoji 10 minuta, a zatim zagrevano do ključanja da se potpuno rastvori. Sterilizacija podloge je vršena u autoklavu 15 minuta pri 121°C, krajnji pH je bio 7,2±0,2.

4.1.3.7. Podloga za čuvanje izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka i *Staphylococcus aureus*

Izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka i *Staphylococcus aureus* su čuvani na kosom hranljivom agaru pri temperaturi 4°C.

Sastav hranljivog agara (Torlak) (g/l):

Pepton-1	15,0 g
Ekstrakt mesa	3,0 g
Natrijum hlorid (NaCl)	5,0 g
Kalijum fosfat	0,3 g
Agar	18,0 g

Podloga je pripremana tako što je 41,3 g praha rastvoreno u 1000 ml destilovane vode, ostavljeno da stoji 10 minuta, a zatim zagrevano do ključanja da se prah potpuno rastvori. Sterilizacija podloge je vršena u autoklavu 15 minuta pri 121°C, krajnji pH je bio 7,3.

4.1.3.8. Plazma kunića za koagulaza test

Za kogulaza test je korišćena liofilizovana plazma kunića (Veterinarski zavod-Zemun i Himedia). Liofilizovana plazma rastvorena je u destilovanoj vodi (1:1), a potom je razblaživana sa fiziološkim rastvorom u odnosu 1:4.

4.1.4. Testovi za identifikaciju koagulaza pozitivnih stafilokoka

Identifikacija 45 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka iz sireva je vršena pomoću komercijalnih testova BBL Crystal Identifikacioni sistem (Gram-Positive ID Kit) i ID 32 STAPH - Identifikacioni sistem (BioMerieux, Francuska).

4.1.4.1. BBL Crystal Identifikacioni sistem (Gram-Positive ID Kit)

Za identifikaciju 19 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka u toku prvog dela ispitivanja korišćen je sistem za identifikaciju (ID) gram-pozitivnih bakterija (GP).

Komplet BBL Crystal Test GP ID se sastoji od: a) BBL Crystal GP ID poklopca za panele, b) BBL Crystal baza i c) BBL Crystal ANR, GP, RGP,N/HID epruveta za suspenziju gram pozitivnih bakterija tečnošću. Poklopac sadrži 29 dehidriranih biohemijskih i enzimskih supstrata. Baza ima 30 reakcionih polja. Inokulum za ispitivanje je pripreman sa tečnošću ya suspenziju bakterija i njime je punjeno svih 30 reakcionih polja u bazi. U prvom reakcionom polju je bila negativna kontrola fluorescencije (FCT), a preostalih 29 reakcionih polja je sadržavalo sledeće supstrate: 4MU- β -D-glukozid (FGC), L-valin-AMC (FVA) L-fenilalanin-AMC (FPH), 4MU- α -D-glukozid (FGS), L-piroglutaminska kiselina-AMC (FPY), L-triptofan-AMC (FAR), 4MU-N-acetil- β -D-glukozamid (FGA), 4MU-fosfat (FHO), 4MU- β -D-glukoronid (FGN), L-izoleucin (FIS), trehaloza (TRE), laktoza (LAC), metil- α i β glukozid (MAB), saharoza (SUC), manitol (MNT), malotrioza (MTT), arabinoza (ARA), glicerol (GLR), fruktoza (FRU), p-n-p- β -D glukozid (BGL), p-n-p- β -D-celobiozid (PCE), prolin ileucin-p-nitroanilid (PLN), p-n-p-fosfat (PHO), p-n-p- α -D-maltoza (PAM), ONPG i p-n-p- α -D galaktozid (PGO), urea (URE), eskulin (ESC), arginin (ARG).

4.1.4.2. ID 32 STAPH -Identifikacioni sistem (BioMerieux, Francuska)

Za identifikaciju 26 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka iz sireva, koji su stvarali enterotoksine, korišćen je ID 32 STAPH identifikacioni sistem (BioMerieux, Francuska), koji se sastoji od stripova sa 32 mikroeprevete, od kojih se 26 koriste u testu u kojima su dehidrovani supstrati: URE-urea, ADH-L-arginin, ODC-L-ornitin, ESC-eskulin, GLU-D-glukoza, FRU-D-fruktoza, MNE-D-manoza, MAL-D-maltoza, LAC-D-laktoza (goveđeg porekla), TRE- D-trehaloza, MAN-D-manitol, RAF-D-

rafinoza, RIB-D-riboza, CEL-D-celobioza, NIT-kalijum nitrat, VP-natrijuum piruvat, β GAL-2-naftil- β D-galaktopirinozid, ArgA-L-arginin β -naftilamid, PAL-2-naftil fosfat, PyrA-piroglutaminska kiselina- β -naftil amid, NOVO-novobiocin, SAC-D-saharoza, NAG-N-acetil-glukozamin, TUR-D-turanoza, ARA-L-arabinoza, β GUR-4-nitrofenil- β D-glukuronid. Za prve tri mikrotube sa oznakama URE, ADH i ODC je bilo potrebno mineralno ulje. Za očitavanje su korišćeni reagensi: VPA i VPB, NIT1 i NIT2 i FB reagensi. Suspenzija mikroorganizama za inokulaciju je pravljena u odnosu rastvor na 0,5 McFarland standard.

4.1.4.3. VIDAS Staphylococcal enterotoxin test SET 2, 30701 (BioMerieux, Francuska)

ELFA tehnika VIDAS Staphylococcal enterotoxin test SET 2, 30701 (BioMerieux, Francuska) je automatizovani kvalitativni test, koji se koristi na VIDAS analajzeru za detekciju stafilokoknih enterotoksina (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) u hrani. U toku ispitivanja korišćeni su stripovi (BioMerieux, Francuska) za ovaj test u kojima se nalazi standard, pozitivna i negativna kontrola, kojima je vršena kalibracija pre svakog ispitivanja. VIDAS Staphylococcal enterotoxin test SET2, 30701 (BioMerieux, Francuska) je korišćen za ispitivanje prisistva enterotoksina u 26 uzoraka sireva. U toku ispitivanje sposobnosti koagulaza pozitivnih stafilokoka da stvaraju eneterotoksine kao podloga je korišćen BHI bujon.

4.1.5. Reagensi i oprema za ekstrakciju enterotoksina stafilokoka iz sira

Za dokazivanje entrotoksina stafilokoka u sirevima korišćeni su sledeći reagensi:

1. Dejonizovana voda;
2. 5N hlorovodonična kiselina (HCl);
3. 5N rastvor natrijum hidroksida (NaOH);
4. PBS pufer (Phosphate Buffer Saline). Npr.: NaCl/Na₂HPO₄:145 mM/10 mM, pH 7,3 ± 0,2;
5. PolyEthylen Glycol 20000 (PEG);
6. Rastvor za ispiranje elektroda (npr: etanol 70%).

Za ekstrakciju enterotoksina stafilokoka iz sireva korišćena je standardna laboratorijska oprema. Supernatant u toku ekstrakcije uzoraka dobijen je korišćenjem centrifuge

(3000-5000 obrtaja) i odgovarajućih kiveta (50 ml). Za koncentraciju uzoraka sireva bili su potrebni: dijalizna membrana (MWCO: 6.000 – 8.000 Daltona), zatvarači za membranu, staklena vuna ili filter

4.1.6. Reagensi za ispitivanje prisustva gena za sintezu enterotoksina stafilokoka (SEA-SEE)

U toku ispitivanja prisustva gena za sintezu enterotoksina stafilokoka kod 26 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, za koje je ELFA tehnikom dokazano da stvaraju enterotoksine korišćeni su sledeći reagensi:

- 1. MasterPure Complete DNA and RNA Purification kit (Tissue and Cell Lysis solution, MPC protein Precipitation Reagent, TE buffer)** - kit za izolaciju ukupnih nukleinskih kiselina, proizvođač Epicentre, USA;
- 2. Proteinaza K** (Merck, Nemačka);
- 3. Izopropanol** (Aldrich, Nemačka);
- 4. Etanol 75%** – (Sigma Aldrich, Nemačka);
- 5. Amplitaq Gold PCR Master Mix (2×)** – kit za pripremu reakcione smeše, proizvođač Invitrogen, USA;
- 6. SYBR Green MasterMix (2×)** – kit za pripremu *RealTime*PCR reakcione smeše (Invitrogen, USA);
- 7. Agarozni gel u prahu**– (Invitrogen, USA);
- 8. Etidijum bromid** – (Sigma Aldrich, Nemačka);
- 9. Gel Loading Dye** – marker za vizuelizaciju amplifikovanih sekvenci u elektroforetskom polju (Invitrogen, USA);
- 10. Set prajmera za ispitivanje prisustva gena za sintezu enterotoksina stafilokoka (SEA-SEE) (100 μM)** (Invitrogen, USA).

Spisak prajmera prikazan je u tabeli 4.1.6.1.

Tabela 4.1.6.1. Spisak prajmera korišćenih za ispitivanje prisustva gena za sintezu enterotoksina stafilokoka

Prajmer	Target gen	Dužina amplifikovane sekvence (bp)	Sekvenca
sea-f sea-r	<i>sea</i>	93	5'-TCAATTTATGGCTAGACGGTAAACAA-3' 5'- GAAGATCCAACCTCCTGAACAGTTACA -3'
seb-f seb-r	<i>seb</i>	85	5'- AACAACTCGCCTTATGAAACGGGAT -3' 5'- CTCCTGGTGCAGGCATCATGTCA -3'
sec-f sec-r	<i>sec</i>	284	5'- CGTATTAGCAGAGAGCCAACCA - 3' 5'- GTGAATTTACTCGCTTTGTGCAA -3'
sed-f sed-r	<i>sed</i>	150	5'- AAACGTTAAAGCCAATGAAAACA -3' 5'- TGATCTCCTGTACTTTTATTTTCTCCTA -3'
see-f see-r	<i>see</i>	171	5'- TACCAATTAACCTTGTGGATAGAC -3' 5'- CTCTTTGCACCTTACCGC -3'

4.2. Metode

Uzorci sireva su ispitivani primenom standardnih fizičko-hemijskih, hemijskih, instrumentalnih i bakterioloških metoda.

4.2.1. Uzorkovanje sireva

Uzorkovanja za mikrobiološka ispitivanja su vršena primenom tehnike aseptičnog uzorkovanja prema međunarodnom standardu ISO 707:2008 (E) IDF 50:2008 (E). Uzorci su uzimani u količini od oko 250 g pod aseptičnim uslovima u polietilenske kese, označavani i u ručnom frižideru pri 4 °C dostavljani u laboratoriju, gde su odmah započete analize. U istim uzorcima sireva su vršena fizičko-hemijska ispitivanja i hemijska ispitivanja.

4.2.2. FIZIČKO-HEMIJSKE METODE

4.2.2.1. Određivanje pH sira

Određivanje pH sira je vršeno potenciometrijski u rastvoru sira pripremljenom mešanjem jednakih količina sira i destilovane vode (Carić i saradnici, 2000).

Prethodno usitnjen sir u količini od 10 g je izmešan u porcelanskoj posudi sa 10 ml destilovane vode i u tako pripremljenom uzorku je merena pH vrednost pH-metrom (Ex tech instruments) uz prethodnu kalibraciju standardnim rastvorima (pH 4,01 i 7,0).

4.2.2.2. Određivanje aktivnosti vode (a_w)

Aktivnost vode merena je u uzorcima sireva pomoću a_w -metra (a_w -Wert-Messer, Luftt Durotherm, Stuttgart), koji radi na principu vlakna. Uzorci sira su homogenizovani i stavljeni u donji deo instrumenta tako da bude prekriveno dno. Merenje je trajalo 4 h pri temperaturi od 25°C.

Za određivanje aktivnosti vode u uzorcima sireva korišćen je i a_w -metar (GBX Scientific Instrumewnts, FA-st/1 tastatura: Model MX 3700/ML 4700), koji radi na principu određivanja tačke rose. Homogenizovani uzorci su stavljeni u plastične posudice za jednokratnu upotrebu, tako da uzorak zauzme 3/4 zapremine posudice. Uzorak u otklopljenoj posudici je stavljan u ležište aparata, a potom je spuštена glava aparata u kome se nalazi komora u čijem gornjem delu se nalazi ogledalo. Optički senzor je detektovao momenat u kome se na ogledalu pojavi kondenzat. Termokapl koji je dodat na ogledalo je merio i temperaturu u momentu pojave kondenza, a termofilni senzor je merio temperaturu uzorka. Temperatura ogledala u momentu pojave kondenza i temperatura uzorka određivali su aktivnost vode. Instrument je ponavljao merenja temperature, dok se ne postigne ekvilibrijum. Pri postizanju ekvilibrijuma relativna vlažnost vazduha u komori je identična aktivnosti vode u uzorku. Rezultati merenja su dobijeni posle 3-5 minuta i očitavani na displeju aparata i štampani na traci.

4.2.2.3. Određivanje sadržaja natrijum hlorida (NaCl) u siru

Za određivanje sadržaja natrijum hlorida (NaCl) u siru korišćena je titrimetrijska metoda (IDF/ISO/AOAC), koja se zasniva na razaranju organske supstance sira uz pomoć kalijum-permanganata ($KMNO_4$) i kiseline (HNO_3). Hloridni joni su određivani titracijom sa 0,1 mol/l amonijum rodanidom ($(NH_4)_2SCN$).

U erlenmajer sa odmerenim uzorkom sira u količini od 2 g \pm 0,001g, koji je prethodno usitnjen i homogenizovan je dodato 25 ml 0,1 mol/l rastvora srebro nitrata ($AgNO_3$) i 25 ml conc HNO_3 . Sadržaj erlenmajera je zagrevan do ključanja, potom je dodat

kalijumpermanganat (KMnO₄). Postupak zagrevanja do ključanja i dodavanje KMnO₄ ponavljani su sve dok se reakciona smeša obezbojavala (oko 10-15 ml KMnO₄). U trenutku kada je postignuta postojana tamna, smeđa boja smeše dodata je glukoza da se smeša obezboji. Zatim je u erlenmajer dodato 100 ml destilovane vode i 5 ml indikatora gvožđe(III)-amonijum sulfata uz temeljno mešanje. Odmah potom, dok je rastvor topao višak AgNO₃ titrovan je sa 0,1 mol/l (NH₄)₂SCN do pojave crveno-smeđe boje (boja cigle), koja je postojana 30 sekundi (**Carić i saradnici, 2000**).

Sadržaj NaCl u siru izračunavan je po sledećoj formuli:

$$NaCl(\%) = \frac{0,585 \times (V_1 - V_2)}{m}$$

Gde je :

V₁-zapremina 0,1 mol/l rastvora srebro nitrata (AgNO₃)-25 ml

V₂-zapremina 0,1 mol/l rastvora amonijum rodanida, koja je utrošena za titraciju (ml)

m-masa uzorka sira

4.2.2.4. Određivanje sadržaja masti u siru

Sadržaj masti u siru određivan je referentnom acidobutirometrijskom metodom u butirometru za sir po principu Schmidth-Bonzzmski-Ratzlaff-a. U čašicu butirometra za sir odmereno je 3 g homogenizovanog uzorka sira i čašica je vraćena u butirometar. Kroz gornji, uži deo je sipano 10 ml sumporne kiseline (ρ=1,50-1,55 g/ml). Po zatvaranju butirometar je snažno protresan i stavljan u vodeno kupatilo na 65°C. Uz postepeno mućkanje na svakih 15 minuta sve dok se sadržaj potpuno ne rastvori. Potom je dodat 1 ml amil alkohola (ρ=0,815 g/ml) i iste H₂SO₄ do gornje crte na skali butirometra. Butirometri su stavljeni u centrifugu po Gerberu i centrifugovanje je vršeno 10 minuta na 1100 obrtaja. Postupak centrifugovanja i držanja u vodenom kupatilu 5 minuta na 65°C je ponavljan dva puta. Očitavanje rezulta određivanja sadržaja masti u masenim % je vršeno vizuelno na skali suženog dela butirometra za sir u kojoj je bila izdvojena mast.

Sadržaja masti u suvoj materiji sira je izračunat prema sledećem obrascu:

$$\% \text{ masti u suvoj materiji sira} = \frac{a}{b} \times 100$$

Gde je:

a - % masti u originalnoj materiji sira

b -% suve materije sira

4.2.2.5. Određivanje suve materije sira

Suva materija sira je određivana metodom sušenja u sušnici pri $102 \pm 2^\circ\text{C}$. U aluminijsku posudicu sa izarenim kvarcnim peskom, koja je prethodno ohlađena i odmerena je izmereno oko 3 g sira sa tačnošću $\pm 0.0001\text{g}$. Posudica sa uzorkom je stavljena zajedno sa štapićem i otklopljenim poklopcem u zagrejanu sušnicu. Posle 2 h sušenja posudica je zaklopljena hlađena u eksikatoru, merena na analitičkoj vagi. Postupak sušenja ponavljan je u trajanju od 30 minuta, a hlađenje merenje i ponovno sušenje je ponavljano dok razlika između dva poslednja merenja nije bila manja od 0,5 mg. Za izračunavanje sadržaja suve materije korišćena je najniža zabeležena vrednost. Za izračunavanje sadržaja suve materije korišćen je sledeći obrazac:

$$\text{SM}(\%) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Gde je:

m_0 -masa aluminijske posudice bez uzorka (g)

m_1 -masa aluminijske posudice sa uzorkom pre sušenja (g)

m_2 -masa aluminijske posudice sa uzorkom posle sušenja(g)

4.2.2.6. Određivanje sadržaja vode u siru

Sadržaj vode u siru izračunavan je računskim putem pomoću obrasca:

$$\% \text{ H}_2\text{O} = 100 - \text{SM}(\%)$$

4.2.2.7. Određivanje sadržaja vode u bezmasnoj materiji sira

Sadržaj vode u bezmasnoj materiji sira izračunavan je računskim putem pomoću obrasca (Bylund, 1995):

$$\% \text{ VBMS} = \% \text{ H}_2\text{O} / (100 - \% \text{ MM}) \times 100$$

Gde je:

% VBMS- sadržaj vode u bezmasnoj materiji sira

% H₂O-sadržaj vode u siru

% MM- % masti u originalnoj materiji sira

4.2.3. Dokazivanje enterotoksina

Da bi se utvrdila sposobnost primoizolata za sintezu enterotoksina stafilokoka korišćena je fluorescentna imunoenzimski (ELFA) skrining metoda VIDAS SET2 (BioMerieux, Francuska). Izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka zasejavani su u BHI bujon, koji je inkubisan tokom 24 h pri 37°C. Prekonoćna bujonska kultura u kojoj je bilo rasta, termički je inaktivisana tokom 15 min pri 95°C. Tokom termičke obrade dolazi do istovremene sterilizacije bujona, a ćelijski zidovi stafilokoka se raspadaju, što za posledicu ima znatno bolje vezivanje glikopolisaharidnih antigenih determinanti sa antistafilokoknim antitelima impregniranim u insuflacionim nastavcima. Inaktivisani bujon otpipetiran je u količini od po 500µl u Vidas SET 2 strip. Tako pripremljen strip, postavljen je u Mini Vidas imunoenzimski analizator. Pre svakog ispitivanja vršena je kalibracija pomoću standarda enterotoksina, koji se nalaze u kitu. Rezultati su očitavani automatski na displeju aparata i štampani na traci.

4.2.4. Ispitivanje prisustva gena za sintezu enterotoksina kod izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz sireva

Nakon analize genoma koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz sireva, koje su stvarale enterotoksine *Staphylococcus aureus* „BLAST“ softverom za ispitivanje su izabrani sledeći geni: gen *sea* – koji kodira sintezu stafilokoknog enterotoksina A, *seb* – koji kodira sintezu stafilokoknog enterotoksina B, *sec*–koji kodira sintezu stafilokoknog enterotoksina C, gen *sed*–koji kodira sintezu stafilokoknog enterotoksina D i *see* – koji kodira sintezu stafilokoknog enterotoksina E.

Softverskom analizom konstruisani su parovi prajmera koji se komplementarno vežu ispred i iza odgovarajuće sekvence određenog gena. Prvog dana ispitivanja izolovane su ukupne nukleinske kiseline iz svih 26 ispitivanih primoizolata. U svaku od mini tubica

koje su sadržavale precipitirane bakterijske ćelije dodato je po 0,3 ml Tissue and Cell rastvora i po 1 µl Proteinaze K koncentracije 50 µg/µl. Uzorci su potom postavljeni u vodeno kupatilo na temperaturu od 65°C u trajanju od 15 minuta. Nakon inkubiranja, uzorci su stavljeni na led u trajanju od 5 minuta, a zatim je u svaki uzorak dodato po 0,15 ml MPC Protein Precipitation reagensa. Uzorci su potom mešani na vibratoru za epruvete tokom 10 s. Nakon mešanja, uzorci su centrifugirani tokom 10 min pri 13.000 obrtaja/min. Dobijeni supernatant je pipetiran u nove minutube i u svaku je potom dodato po 0,5 ml izopropanola. Potom su nukleinske kiseline precipitirane centrifugiranjem tokom 10 minuta pri 13.000 obrtaja/min. Izopropanol je odliven, a precipitat je 2 puta ispran 75% etanolom, a potom je sav rezidualni etanol uklonjen. Dobijeni precipitat nukleinskih kiselina rastvoren je u 35 µl pufera za čuvanje DNK i stavljen u zamrzivač na temperaturu od –30°C.

Prisustvo gena za sintezu SE u dobijenim ekstraktima DNK ispitano je konvencionalnom multipleks PCR tehnikom (za gene *sea* i *seb*), odnosno tehnikom *RealTime* PCR (za gene *sec*, *sed* i *see*). Za gene ispitivane konvencionalnom multipleks PCR tehnikom pripremljena je posebna smeša čiji je sastav dat u Tabeli 4.2.4.1.

Tabela 4.2.4.1. Sastav reakcione smeše za konvencionalni multipleks PCR

Ukupni volumen smeše (µl)	25
Sastav i koncentracije komponenti:	
2×Amplitaq Gold PCR Master Mix (µL)	12,5
SE gen-f (µL)	1,0
SE –r (µL)	1,0
Sterilna dd H ₂ O (µL)	8,5
DNK ispitivanog uzorka	1,0

Program multipleks PCR reakcije prikazan je u tabeli 4.2.4.2.

Tabela 4.2.4.2. Program za konvencionalni multipleks PCR

Inicijalna denaturacija	95°C	5 min
30 ciklusa	95°C	30 s
	55°C	30 s
	72°C	60 s
Finalna elongacija	72°C	7 min

Nakon amplifikacije, po 10 µl dobijenog amplifikata pomešano je sa 2 µl boje za elektroforezu i mešavina je pipetirana u bunarčice 2% agaroznog gela obojenog etidijum bromidom. Gel je stavljen u kadu i podvrgnut elektroforezi pri naponu od 120 V, jačini struje od 400 mA tokom 30 minuta. Nakon elektroforeze, gelovi su stavljeni na UV transiluminator radi vizuelizacije traka, nakon čega su snimljeni sistemom za fotografisanje gelova GelDoc (Eppendorf, Nemačka).

Za gene ispitivane *RealTime* PCR tehnikom pripremljena je posebna smeša čiji je sastav dat u Tabeli 4.2.4.3.

Tabela 4.2.4.3. Sastav reakcione smeše za za *Real Time* PCR

Ukupni volumen smeše (µl)	25
Sastav i koncentracije komponenti:	
2× SYBR Green MasterMix (µl)	12,5
SE gen-f (µl)	1,0
SE gen-r (µl)	1,0
Sterilna dd H ₂ O (µl)	8,5
DNK ispitivanog uzorka	1,0

Program ispitivanja gena za sintezu enterotoksina *Real Time* PCR metodom dat je u tabeli 4.2.4.4.

Tabela 4.2.4.4. Program za *Real Time* PCR

Inicijalnadenaturacija	95°C	10 min
40 ciklusa	95°C	15 s
	60°C(sva trigena)	30 s
Čitanje ploče		

Nakon *RealTime* PCR reakcije očitane su Ct vrednosti sva tri ispitivana gena u svakom uzorku i upoređene sa Ct vrednosti referentnih SE-produkujućih sojeva *Staphylococcus aureus*.

4.2.5. Ispitivanje prisustva enterotoksina u sirevima

Za dokazivanje prisutva enterotoksina u sirevima odabrano je 26 uzoraka sireva iz kojih su izolovane koagulaza pozitivne stafilokoke, koje su stvarale enterotoksin i čiji se broj kretao od 1,00 do 5,79 log cfu/g sira (Prilog 3 i 4).

Protokol za ispitivanje prisustva enterotoksina stafilokoka u sirevima tekao je u 3 faze:

I Ekstrakcija,

II Koncentracija

III Detekcija

I Ekstrakcija:

1. Odvagano je 25 g sira (minimalna masa za ekstrakciju iznosi 12,5 g);
2. Dodato 40 ml dejonizovane vode, prethodno zagrejane na 38°C;
3. Uzorak je homogenizovan Ultraturaxom, blenderom ili Stomacherom;
4. Ostavljen pri sobnoj temperaturi 30 minuta kako bi toksini difundovali u slobodnu tečnost;
5. Uzorak je zakišeljjen 5N rastvorom HCl tako da finalna pH vrednost homogenizata bude u rasponu od 3,5-4,0;
6. Centrifugovan je pri 3000 g tokom 15 minuta pri sobnoj temperaturi;
7. Supernatant je prikupljen i izmeren njegov pH koji mora da se kreće u rasponu 3,5-4,5;
8. Mešavina je neutralizovana dodavanjem 5N NaOH tako da finalna pH vrednost uzorka bude u rasponu od 7,4-7,6;
9. Uzorak je centrifugiran pri 3000 g tokom 15 minuta pri sobnoj temperaturi;
10. Supernatant je prikupljen i prenet u novi sterilan sud.

II Koncentracija:

1. Pripremljeno je 100 ml 30% rasvora polietilenglikola (PEG) ($M_w=20.000$);
2. Odrezano je 50 cm dijalizne membrane;
3. Dijalizna membrani je potapana u dejonizovanu voda tokom 30 minuta kako bi se rehidrirala;
4. Nakon rehidracije, jedan kraj dijalizne membrane je podvezan.
5. Na drugi kraj je stavljen levak i prenet prikupljeni supernatant iz tačke I/10;
6. Zatvoren je i drugi kraj dijalizne membrane;
7. Napunjena dijalizna membrana je postavljena u rastvor PEG-a i ostavljena da se toksin koncentriše držanjem pri 4°C tokom noći;
8. Nakon koncentrisanja, otvoren je jedan kraj membrane i dodat PBS, tako da finalna masa ekstrakta bude u rasponu od 5,0 do 5,5 g;
9. Ekstrakt je prenet u novi sterilni stakleni ili polipropilenski sud i čuvan pri 4°C max. 48 sati ili pri -18°C do početka ispitivanja.

III Detekcija:

1. Za detekciju je se korišćen VIDAS Staphylococcal enterotoxin test SET2, 30701 (BioMerieux, Francuska). VIDAS SET2 koristi ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) tehniku za direktnu simultanu detekciju sedam tipova enterotoksina (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED i SEE), koristeći monoklonska anti-stafilokokni enterotoksin antitela. Ovaj test je kvalitativan i semikvantitativan. Osetljivost testa VIDAS SET2 je manje od 0,5 ng/g za toksine A i B, manje od 1,0 ng/g za toksine C2 i E i blizu 1 ng/g za toksin D;
2. 500 µl je otpipetirano u Vidas SET2 strip.
3. Tako pripremljen uzorak postavljen je u aparat Mini Vidas.
4. Rezultati su očitavani direktno poređenjem dobijenih vrednosti sa standardom, što je i štampano.

4.2.6. Bakteriološke metode

4.2.6.1. Priprema osnovnog i decimalnih razblaženja uzoraka sireva

Priprema osnovnog i decimalnih razblaženja uzoraka sireva je vršeno prema standardu ISO 8261:2001. Milk and milk products — General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination.

4.2.6.2. Izolacija i određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilocoka u sirevima

Određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilocoka je vršeno prema standardu SRPS EN ISO 6888-2, Mikrobiologija hrane i hrane za životinje-Horizontalnom metodom za određivanje koagulaza pozitivnih stafilocoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste)-Deo 1: Tehnika upotrebom agara po Baird-Parkeru.

4.2.6.3. Ispitivanje sposobnosti izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka da stvaraju hemolizine

Ispitivanje sposobnosti da stvaraju hemolizine je vršeno zasejavanjem izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka na površinu krvnog agara, koji je inkubisan 24 h pri 37°C. Ploče su hladene tokom 15-20 minuta na sobnoj temperaturi, kako bi se podstakao toplo-hladni efekat. Procena je vršena na sledeći način: **α hemoliza**-potpuno prosvetljenje oko kolonija, **β hemoliza**-nepotpuno prosvetljenje oko kolonija, **δ hemoliza**-vrlo uska zona od oko 1 mm potpunog prosvetljenja oko kolonije, **α+ β hemoliza** potpuno i nepotpuno prosvetljenje oko kolonija

4.2.11.5. Određivanje ukupnog broja *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. u sirevima

Ispitivanje je vršeno prema ISO 27205:2010 (IDF 149:10) standardu, odnosno ISO 20128:2005 (IDF 192:2006) standardu za *Lactobacillus* spp.

Određivanje ukupnog broja *Lactococcus* spp. vršeno je zasejavanjem 1 ml iz odgovarajućeg decimalnog razblaženja (10^{-5} , 10^{-6} i 10^{-7}) u po 2 prazne Petri šolje za svako razblaženje, a potom je uzorak prelivan M-17 agarom, koji je prethodno otopljen

i rashlađen na oko 45°C. Inkubacija zasejanih ploča je bila 24 h pri 30°C. Za brojanje su uzimane ploče iz dva susedna razblaženja na kojim je izraslo 30-300 kolonija.

Određivanje ukupnog broja *Lactobacillus* spp. je vršeno zasejavanjem 1 ml iz odgovarajućeg decimalnog razblaženja (10^4 , 10^{-5} i 10^{-6}) u po 2 prazne Petri šolje za svako razblaženje, a potom je uzorak prelivan M.R.S.-agarom, koji je prethodno otopljen i rashlađen na oko 45°C. Zasejane ploče su inkubisane 48 h pri 37°C. Za brojanje su uzimane ploče iz dva susedna razblaženja na kojim je izraslo 30-300 kolonija. Za izračunavanje ukupnog broja *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. korišćen je sledeća formula:

$$N = \frac{\sum c}{[n_1 - (0,1 \times n_2)]d}$$

Gde je:

Σc -Zbir kolonija izbrojanih na svim podlogama odabranim za brojanje

n_1 - broj Petri šolja odabranih u prvom razblaženju

n_2 - broj Petri šolja odabranih u drugom razblaženju

d - faktor prvog razblaženja odabranog za brojanje

4.2.11.6. Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz sireva

Koagulaza pozitivne stafilokoke su identifikovane na osnovu ispitivanja makromorfoloških, mikromorfoloških i biohemijskih osobina. Po 5 tipičnih i atipičnih kolonija je presejano na kosi hranljivi agar, koji je inkubisan 24 h pri 37°C. Mikromorfološke osobine su ispitivane pravljenjem mikroskopskih preparata, koji su bojeni po Gramu i posmatrani pod imerzionim objektivom mikroskopa. Izolati su ispitani katalaza testom sa 3% vodonik peroksidom i da li stvaraju enzim koagulazu.

Koagulaza test

U epruvete je razlivano po 0,3-0,5 ml razblažene plazme kunića u odnosu 1:4 sa fiziološkim rastvorom. U epruvete su zasejavani izolati i kontroni soj, inkubacija je vršena pri 37 °C, a rezultati su očitavani posle 2 h, 4 h, 6 h i 24 h.

Identifikacija 19 izolata koagulaza pozitivnih stafiloka ispitivanjem biohemijskih osobina je vršena pomoću BBL Crystal Identifikacionim sistemom-BD.

BBL Crystal Identifikacioni sistem-BD, minimizovani metod identifikacije koristi modifikovane fluorogene i hromogene supstrate za identifikaciju aerobnih gram-pozitivnih mikroorganizama.

Inokulum za ispitivanje je pripreman sa inokulacionom tečnošću u koju je brisem preneseno 1-2 kolonije izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka sa krvnog agara, koji je prethodno inkubisan 24 h pri 37°C. Zamućenost inokuluma je bila jednaka 0,5 McFarland standardu. Inokulumom je punjeno svih 30 reakcionih polja u bazi. Kada se poklopac izravna sa bazom i čvrsto zatvori, inokulum za ispitivanje je rehidrirao isušene supstrate i pokretao test reakcije. Posle inkubacije panela 18-24 h pri 37°C ispitano je da li su u reakcionim poljima prisutne promene u boji ili fluorescencija kao posledica metaboličkih aktivnosti mikroorganizama. Enzimska hidroliza fluorogenih supstrata koji sadrže kumarinske derivative 4-metilumbeliferona (4MU) ili 7-amino-4-metilumarina (7-AMC) dovodi do povećane fluorescencije koja se lako može videti pomoću ultraljubičaste lampe. Hromogeni supstrati hidrolizom stvaraju vidljive promene u boji. Očitavanje promene boje je vršeno vizuelno pomoću vidljivog (belog) svetla (kolone E do J) i ultraljubičastog svetla i UV lempe (386 nm) (kolone A do D). Obrazac koji nastaje kao posledica 29 reakcija se prebacuje u desetocifreni broj profila koji se koristi kao osnova za identifikaciju. Obrasci biohemijskih i enzimskih reakcija za 29 BBL Crystal RGP ID supstrata se čuvaju u BBL Crystal RGP ID bazi podataka. Identifikacija je izvođena iz komparativne analize šifre reakcija test izolata i šema koje se čuvaju u bazi podataka.

Za fenotipsku identifikaciju 26 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, koji su stvarali enterotoksine i koji su bili nosioci gena za sintezu enterotoksina korišćen je **ID 32 STAPH** (BioMerieux, Francuska).



Slika 4.2.11.6. Kit ID 32 STAPH (BioMerieux, Francuska).

Inokulum sa izolatima koagulaza pozitivnih stafilokoka pripreman je u API inokulacionom medijumu (3 ml) u koju je prenet izolat sa krvnog agara prethodno inkubisan 24 h pri 37°C, tako da zamućenje bude jednako standardu 0.5 McFarlanda. Posle homogenizacije, inokulacioni medijum sa izolatom koagulaza pozitivnih stafilokoka je u količini od po 55 µl pipetiran u mikrotube na stripu. Otvori mikrotuba sa testovima URE, ADH i ODC prekrivani su sa po 2 kapi mineralnog ulja. Po stavljanju poklopca, strip je inkubiran tokom 24 h pri 37°C. Očitavanje je vršeno vizuelno pomoću tabele za očitavanje. Testovi NIT, VP, od â-GAL do PYRA očitavani su posle ukapavanja reagenasa NIT 1 i NIT 2, VPA i VPB, odnosno FB reagenasa u roku od 5 minuta. Identifikacija je vršena formiranjem numeričkog profila-broj sa 9 cifara, koji je unosen u API WEB identifikacioni softver.

5. REZULTATI

5.1. Rezultati određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilokoka i *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. u mekim sirevima

a. Rezultati određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilokoka u mekim sirevima

U cilju sagledavanja problematike procene rizika od stvaranja enterotoksina u mekim sirevima bez zrenja ispitani su sirevi, koji se proizvode različitim tehnologijama u individualnim domaćinstvima sa više područja u Srbiji, a iznose na tržište u Beogradu. Ispitivanjem su obuhvaćeni sirevi, koji se proizvode od kuvanog ili nekuvanog mleka, različite starosti, a podeljeni su u 2 grupe na osnovu pH vrednosti. Grupu kiselo-koagulišućih sireva činili su sirevi različite starosti u kojima je izmerena pH vrednost bila 4,6 i niža, dok su grupu slatko-koagulišućih sireva činili sirevi, čija je vrednost pH bila viša od 4,6. Budući da je za stvaranje dovoljne količine enterotoksina (najmanje 1 µg), koja može da izazove alimentarne intoksikacije potrebno da u siru bude više od 10⁵ cfu/g koagulaza pozitivnih stafilokoka, ispitani su i nivo kontaminacije sireva ovim mikroorganizmom. Rezultati ispitivanja nalaza koagulaza pozitivnih stafilokoka u sirevima prikazani su u Tabeli 5.1.1.

Tabela 5.1.1. Nalaz koagulaza pozitivnih stafilokoka u mekim sirevima proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka

Vrsta sira	Broj Uzoraka (n)	Dokazane koagulaza pozitivne stafilokoke					
		Sirevi od kuvanog mleka		Sirevi od nekuvanog mleka		Ukupno	
		Broj	%	Broj	%	Broj	%
Kiselo-koagulišući	166	2	1,20	37	22,29	39	23,49
Slatko-koagulišući	389	26	6,68	103	26,48	129	33,16
Ukupno	555	28	5,05	140	25,23	168	30,27

Od ukupno 555 uzoraka sireva, različite starosti, koji su proizvedeni od kuvanog i nekuvanog mleka, koagulaza pozitivne stafilokoke su dokazane u 168 (30,27%) uzoraka sireva. Od 168 uzoraka sireva u kojima su dokazane koagulaza pozitivne stafilokoke,

140 (83,33%) uzoraka sira proizvedeno je od nekuvanog mleka, a 28 (16,67%) uzoraka sireva proizvedeno je od kuvanog mleka. Najveći broj uzoraka sireva u kojima su dokazane koagulaza pozitivne stafilokoke je pripadao grupi slatko-koagulišućih sireva proizvedenih od nekuvanog mleka (n=103), a zatim grupi kiselo-koagulišućih sireva proizvedenih od nekuvanog mleka (n=37), grupi slatko-koagulišućih sireva proizvedenih od kuvanog mleka (n=26), a najmanje grupi kiselo-koagulišućih sireva proizvedenih od kuvanog mleka (n=2).

Rezultati ispitivanja nivoa kontaminacije koagulaza pozitivnih stafilokoka u slatko-koagulišućim i kiselo-koagulišućim sirevima proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka su prikazani u Tabeli 5.1.2.

Tabeli 5.1.2. Nivoi kontaminacije mekih sireva koagulaza pozitivnim stafilokokama

Nivoi kontaminacije	Slatko-koagulišući sirevi					Kiselo-koagulišući sirevi				
	Broj uzoraka (n)	Od kuvanog mleka		Od nekuvanog mleka		Broj uzoraka (n)	Od kuvanog mleka		Od nekuvanog mleka	
		n	%	n	%		n	%	n	%
≤ 2 log cfu/g	12	4	33,33	8	66,66	11	1	0,09	10	99,91
2-4 log cfu/g	63	12	19,05	51	80,95	18	1	0,06	17	99,04
> 4 log cfu/g	54	10	18,52	44	81,48	10	0	0	10	100
Ukupno	129	26	20,15	103	79,84	39	2	0,05	37	99,05

Iz prikazanih rezultata se vidi da je od 168 uzoraka sira, u kojima su dokazane koagulaza pozitivne stafilokoke, bilo 129 uzoraka slatko-koagulišućeg sireva i 39 uzoraka kiselo-koagulišućeg sira. Kontaminacija od 2 log cfu/g i manje dokazana je u 12 uzoraka slatko-koagulišućih sireva od kojih je 4 (33,33%) uzoraka proizvedena od kuvanog mleka i 8 (66,66%) uzoraka od nekuvanog mleka. U 11 uzorka kiselo-koagulišućih sireva konataminacija je bila ≤ 2 log cfu/g i to u 1 (0,09%) uzorku proizvedenom od kuvanog mleka i u 10 (99,91%) uzoraka od nekuvanog mleka. U najvećem broju uzoraka sireva kontaminacija koagulaza pozitivnim stafilokokama se kretala od 2-4 log cfu/g i to u 63 uzoraka slatko-koagulišućih sireva od kojih je 51 (80,95%) uzorak sira bio proizveden od nekuvanog mleka i 12 (19,05%) uzoraka od

kuvanog mleka. U 18 uzoraka kiselno-koagulišućih sireva kontaminacija koagulaza pozitivnim stafilocokama se kretala od 2-4 log cfu/g i to u 17 (99,04%) uzoraka proizvedena od nekuvanog mleka i jednom (0,06%) uzorku od kuvanog mleka. Najveći nivo kontaminacije, preko 4 log cfu/g je dokazan u 54 uzorka slatko-koagulišućeg sira od kojih je najveći broj (n=44) pripadao grupi sireva proizvedenih od nekuvanog mleka, a 10 uzoraka je bilo proizvedeno od kuvanog mleka. Kod 10 uzoraka kiselno-koagulišućih sireva proizvedenih od nekuvanog mleka je utvrđena kontaminacija koagulaza pozitivnim stafilocokama više od 4 log cfu/g, a ni u jednom uzorku kiselno-koagulišućeg sira proizvedenog od kuvanog mleka nije dokazano više od 4 log cfu/g. Rezultati nalaza koagulaza pozitivnih stafilocoka u zavisnosti od vrste mekih sireva, odnosno da li su sirevi bez zrenja ili sa zrenjem, proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka su prikazani u Tabeli 5.1.3.

Tabela 5.1.3. Nalaz koagulaza pozitivnih stafilocoka u mekim sirevima bez zrenja i sa zrenjem proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka

Vrsta sira	Broj uzoraka (n)	Dokazane koagulaza pozitivne stafilocoke			
		Meki sirevi bez zrenja		Meki sirevi sa zrenjem	
		Broj	%	Broj	%
Kiselno-koagulišući	39	36	92,31	3	7,69
Slatko-koagulišući	129	121	93,80	8	6,20
Ukupno	168	157	93,45	11	6,55

Iz prikazanih rezultata se zapaža da je najveći broj uzoraka sireva 157 (93,45%) u kojima su dokazane koagulaza pozitivne stafilocoke bio iz grupe mekih sireva bez zrenja. Od 129 uzoraka slatko koagulišućih mekih sireva bez zrenja u 121 (93,80%) dokazane su koagulaza pozitivne stafilocoke i 36 (92,31%) uzoraka kiselno-koagulišućih sireva. Koagulaza pozitivne stafilocoke su dokazane u 11 (6,55%) uzoraka mekih sireva sa zrenjem, od kojih su 8 (6,20%) uzoraka bili slatko-koagulišući, a 3 (7,69%) uzorka kiselno-koagulišuća sira.

b. Rezultati određivanja broja *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. u mekim sirevima proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka

Rezultati određivanja broja *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. u slatko-koagulišućim sirevima bez zrenja i sa zrenjem proizvedenim od kuvanog mleka i nekuvanog mleka su prikazani u Tabeli 5.1.4.

Tabeli 5.1.4. Nalaz *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. u slatko-koagulišućim sirevima bez zrenja i sa zrenjem proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka

Vrsta sira	Vrsta mikroorganizma	Od kuvanog mleka		Od nekuvanog mleka	
		n	$\bar{X} \pm SD$ (log cfu/g)	n	$\bar{X} \pm SD$ (log cfu/g)
Sir bez zrenja	<i>Lactococcus</i> spp..	21	8,26±0,54	42	8,32±0,56
	<i>Lactobacillus</i> spp.	21	6,58±0,95	42	6,50±1,06
Sir sa zrenjem	<i>Lactococcus</i> spp..	2	8,07±0,49	1	8,28
	<i>Lactobacillus</i> spp.	2	6,59±0,61	1	6,96

Iz prikazanih rezultata se vidi da je srednja vrednost broja *Lactococcus* spp. u uzorcima slatko-koagulišućih sireva bez zrenja proizvedenim od kuvanog mleka bila 8,26 log cfu/g, a u uzorcima sireva proizvedenim od nekuvanog mleka neznatno viša 8,32 log cfu/g. Srednja vrednost broja *Lactobacillus* spp. u uzorcima slatko-koagulišućih sireva bez zrenja, koji su proizvedeni od kuvanog i nekuvanog mleka je bila približno ista, iznosila je 6,58, odnosno 6,50 log cfu/g. Srednja vrednost broja *Lactococcus* spp. u uzorcima slatko-koagulišućih sireva sa zrenjem, proizvedenih od kuvanog i nekuvanog mleka je bila neznatno niža u odnosu na vrednosti u sirevima bez zrenja. Srednja vrednost broja *Lactococcus* spp. u slatko-koagulišućim sirevima sa zrenjem proizvedenim od kuvanog mleka je bila 8,07 log cfu/g i 8,28 log cfu/g u siru sa zrenjem proizvedenom od kuvanog mleka. Srednja vrednost broja *Lactobacillus* spp. u slatko-koagulišućim sirevima sa zrenjem proizvedenim od kuvanog mleka je bila 6,59 log cfu/g, a u uzorku sira sa zrenjem od nekuvanog mleka 6,96 log cfu/g.

Rezultati određivanja broja *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. u uzorcima kiselokoagulišućih sireva bez zrenja, koji su proizvedeni od kuvanog i nekuvanog mleka prikazani su u Tabeli 5.1.5.

Tabela 5.1.5 Nalaz *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. u kiselokoagulišućim sirevima bez zrenja proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka

Vrsta sira	Vrsta mikroorganizma	Od kuvanog mleka		Od nekuvanog mleka	
		n	$\bar{X} \pm SD$ (log cfu/g)	n	$\bar{X} \pm SD$ (log cfu/g)
Sir bez zrenja	<i>Lactococcus</i> spp.	1	7,68	18	8,50±0,55
	<i>Lactobacillus</i> spp.	1	6,07	18	6,99±0,74

Iz prikazanih rezultata se vidi da je srednja vrednost broja *Lactococcus* spp. u uzorku kiselokoagulišućeg sira bez zrenja, koji je proizveden od kuvanog mleka bila 7,68 log cfu/g, a u sirevima proizvedenim od nekuvanog mleka bila je 8,50 log cfu/g. Broj *Lactobacillus* spp. u uzorku kiselokoagulišućeg sira proizvedenog od kuvanog mleka je bio 6,07 log cfu/g, a u uzorcima od nekuvanog mleka 6,99 log cfu/g.

U toku ispitivanja nisu obuhvaćeni uzorci kiselokoagulišućih sireva sa zrenjem, koji su proizvedeni od kuvanog i nekuvanog mleka.

Rezultati određivanja broja *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. u mekim sirevima proizvedenim od nekuvanog i kuvanog mleka su prikazani u Tabeli 5.1.6.

Tabela 5.1.6. Nalaz *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. u mekim sirevima proizvedenim od nekuvanog i kuvanog mleka

Vrsta sira	Sir proizveden od	Broj uzoraka (n)	<i>Lactococcus</i> spp. $\bar{X} \pm SD$ (log cfu/g)	<i>Lactobacillus</i> spp. $\bar{X} \pm SD$ (log cfu/g)
Slatko-koagulišući	nekuvanog mleka	103	8,35±0,49	6,30±1,09
	kuvanog mleka	26	8,25±0,53	6,58±0,91
Kiselokoagulišući	nekuvanog mleka	37	8,41±0,57	6,88±0,76
	kuvanog mleka	2	7,68	6,07

Iz prikazanih rezultata se vidi da je broj *Lactococcus* spp. bio približno isti u slatko-koagulišućim i kiselo-koagulišućim sirevima proizvedenim od nekuvanog i kuvanog mleka i srednja vrednost broja ovog mikroorganizma iznosila je 8,35 log cfu/g, odnosno 8,41 log cfu/g. Srednja vrednost broja *Lactococcus* spp. u uzorcima slatko-koagulišućeg sira proizvedenim od kuvanog mleka je bila 8,25, a u uzorcima kiselo-koagulišućeg sira od kuvanog mleka je bila manja i iznosila je 7,68 log cfu/g.

Srednja vrednost broja *Lactobacillus* spp. u slatko-koagulišućim i kiselo-koagulišućim sirevima proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka je dostizala 6 logaritamskih jedinica. Srednja vrednost broja *Lactobacillus* spp. u uzorcima slatko-koagulišućih sireva proizvedenog od nekuvanog i kuvanog mleka je bila približno ista i iznosila je 6,30 log cfu/g, odnosno 6,58 log cfu/g. U uzorcima kiselo-koagulišućih sireva proizvedenih od nekuvanog mleka srednja vrednost broja *Lactobacillus* spp. je bila 6,88 log cfu/g. Najmanji broj *Lactobacillus* spp. je utvrđen u uzorcima kiselo-koagulišućeg sira proizvedenog od kuvanog mleka u kojima je srednja vrednost broja bila 6,07 log cfu/g.

5.2. Rezultati određivanja fizičko-hemijskih parametara (pH, sadržaj NaCl, masti, suve materije i aktivnost vode) u sirevima proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka

U drugom delu ispitivanja određeni su fizičko-hemijski parametri u uzorcima sireva kod kojih je dokazano prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka, različite starosti uzetih na 16 pijaca, koji su proizvedeni od kuvanog i nekuvanog mleka. Rezultati određivanja fizičko-hemijskih parametara (pH, a_w , sadržaj NaCl), u mekim sirevima proizvedenim od nekuvanog i kuvanog mleka prikazani su u Tabeli 5.2.1.

Tabela 5.2.1. Fizičko-hemijski parametri u mekim sirevima proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka

Parametar	Sir od nekuvanog mleka				Sir od kuvanog mleka			
	n	$\bar{X} \pm SD$	Xmin	Xmax	n	$\bar{X} \pm SD$	Xmin	Xmax
mast u SM (%)	79	57,05±10,21	25,29	76,84	4	42,63±17,68	16,47	55,25
voda u BM (%)	79	79,55±4,86	67,89	88,72	4	71,95±4,46	67,63	76,54
pH	140	5,06±0,63	4,10	6,94	28	5,35±0,49	4,50	6,25
a_w	61	0,95±0,01	0,92	0,98	24	0,95±0,02	0,87	0,98
NaCl (%)	61	1,08±0,68	<0,01	3,04	24	1,14±0,79	<0,01	3,48

Iz prikazanih rezultata se vidi da se sadržaj masti u suvoj materiji mekih sireva proizvedenih od nekuvanog mleka kretao od 25,29 do 76,84% (srednja vrednost 57,05±10,21). U uzorcima mekih sireva proizvedenih od kuvanog mleka sadržaj masti je bio niži i kretao se od 16,47% do 55,25% (srednja vrednost 42,63±17,68).

Sadržaj vode u bezmasnoj materiji u uzorcima mekih sireva, proizvedenih od nekuvanog mleka, kretao se od 67,89 do 88,72% (srednja vrednost 79,55±4,86). Sadržaj vode u bezmasnoj materiji u uzorcima mekih sireva proizvedenih od kuvanog mleka kretao se od 67,63 do 76,54 (srednja vrednost 71,95±4,46).

Izmerena pH vrednost u uzorcima mekih sireva od nekuvanog mleka se kretala od 2,10 do 6,94 (srednja vrednost 5,06±0,63), dok je u uzorcima mekih sireva proizvedenih od kuvanog mleka bila od 4,50 do 6,25 (srednja vrednost 5,35±0,49).

Vrednost za aktivnost vode u uzorcima mekih sireva proizvedenih od kuvanog mleka je bila od 0,92 do 0,98 (srednja vrednost 0,95±0,01), dok se u uzorcima mekih sireva proizvedenih od kuvanog mleka kretala od 0,87 do 0,98 (srednja vrednost 0,95±0,02). Sadržaj NaCl u ispitanim uzorcima mekih sireva proizvedenih od nekuvanog mleka se kretao od 0,01 do 3,04% (srednja vrednost 1,08±0,68) a u uzorcima sireva proizvedenih od kuvanog mleka kretala se od 0,01 do 3,48% (srednja vrednost 1,14±0,79).

Rezultati održavanja fizičko-hemijskih parametara u uzorcima mekih sireva bez zrenja i sa zrenjem su prikazani u Tabeli 5.2.2.

Tabela 5.2.2. Fizičko-hemijski parametri u mekim sirevima bez zrenja i sa zrenjem

Parametar	Sir bez zrenja				Sir sa zrenjem			
	n	$\bar{X} \pm SD$	Xmin	Xmax	n	$\bar{X} \pm SD$	Xmin	Xmax
mast u SM (%)	76	55,85±11,03	16,47	76,84	7	61,33±9,43	48,42	74,05
voda u BM (%)	76	79,37±4,99	67,63	88,72	7	77,41±6,22	70,67	88,42
pH	156	5,12±0,63	4,10	6,94	12	4,88±0,31	4,39	5,50
a_w	80	0,95±0,02	0,87	0,98	5	0,94±0,02	0,91	0,96
NaCl (%)	80	1,06±0,67	<0,01	3,04	5	1,74±1,06	0,73	3,48

Iz prikazanih rezultata se može videti da se sadržaj masti u suvoj materiji mekih sireva bez zrenja kretao od 16,47 do 76,84% (srednja vrednost 55,85±11,03). Neznatno viša vrednost za isti parametar je dokazana u uzorcima sireva sa zrenjem u kojima se sadržaj masti u suvoj materiji kretao od 48,42 do 74,05% (srednja vrednost 61,33±9,43). Sadržaj vode u bezmasnoj materiji u uzorcima mekih sireva bez zrenja kretao se od 67,63 do 88,72% (srednja vrednost 79,37±4,99), a u uzorcima sireva sa zrenjem od 70,67 do 88,42% (srednja vrednost 77,41±6,22). Izmerena pH vrednost u uzorcima mekih sireva bez zrenja se kretala od 4,10 do 6,94 (srednja vrednost 5,12±0,63), dok je u uzorcima mekih sireva sa zrenjem bila u rasponu od 4,39 do 5,50 (srednja vrednost 4,88±0,31). Vrednost za aktivnost vode u mekim sirevima bez zrenja se kretala od 0,87 do 0,98 (srednja vrednost 0,95±0,02). Isti parametar u uzorcima mekih sireva sa zrenjem se kretao od 0,91 do 0,96 (srednja vrednost 0,94±0,02). Sadržaj NaCl u uzorcima mekih sireva bez zrenja se kretao od 0,01 do 3,04% (srednja vrednost 1,06±0,67), a u sirevima sa zrenjem od 0,73 do 3,48% (srednja vrednost 1,74±1,06) Rezultati određivanja fizičko-hemijskih parametara u slatko-koagulišućim sirevima su prikazani u Tabeli 5.2.3.

Tabela 5.2.3. Fizičko-hemijski parametri u slatko-koagulišućim i kiselo-koagulišućim sirevima

Parametar	Slatko-koagulišući sir				Kiselo-koagulišući sir			
	n	$\bar{X} \pm SD$	Xmin	Xmax	N	$\bar{X} \pm SD$	Xmin	Xmax
mast u SM (%)	64	55,70±11,79	16,47	76,84	19	58,36±7,42	43,72	69,86
voda u BM (%)	64	77,98±4,58	67,63	88,42	19	83,23±4,56	70,67	88,72
pH	130	5,32±0,54	4,61	6,94	38	4,39±0,14	4,10	4,60
a_w	66	0,95±0,02	0,87	0,98	19	0,95±0,02	0,92	0,97
NaCl (%)	66	1,16±0,67	<0,01	3,48	19	0,87±0,80	<0,01	3,04

Iz prikazanih rezultata se vidi da se sadržaj masti u suvoj materiji slatko-koagulišućih sireva kretao od 16,47 do 76,84% (srednja vrednost 55,70±11,79), a u uzorcima kiselo-koagulišućih sireva od 43,72 do 69,86% (srednja vrednost 58,36±7,42). Sadržaj vode u bezmasnoj materiji u uzorcima slatko-koagulišućih sireva je bila u rasponu od 67,63 do 88,42% (srednja vrednost 77,98±4,58), a u kiselo-koagulišućim sirevima od 70,67 do 88,72% (srednja vrednost 83,23±4,56). Izmerena pH vrednost u uzorcima slatko-koagulišućih sireva se kretala od 4,61 do 6,94 (srednja vrednost 5,32±0,54), a u kiselo-koagulišućim od 4,10 do 4,60 (srednja vrednost 4,39±0,14). Vrednost za aktivnost vode u uzorcima slatko-koagulišućih sireva je bila od 0,87 do 0,98 (srednja vrednost 0,95±0,02), a u kiselo-koagulišućim od 0,92 do 0,97 (srednja vrednost 0,95±0,02). Sadržaj NaCl u uzorcima slatko-koagulišućih sireva se kretao od <0,01 do 3,48% (srednja vrednost 1,16±0,67), dok je u kiselo-koagulišućim sirevima najviša vrednost bila 3,04%, a najniža manje od 0,01% (srednja vrednost 0,87).

*

*

*

Statistički parametri broja koagulaza pozitivnih stafilokoka, *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. i fizičko-hemijski parametri (pH, aktivnost vode i sadržaj NaCl) u sirevima proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka prikazani su u Tabeli 5.2.4.

Tabela 5.2.4. Statistički parametri broja koagulaza pozitivnih stafilokoka, *Lactococcus* spp, *Lactobacillus* spp. i fizičko-hemijski parametri (pH, aktivnost vode i sadržaj NaCl) u mekom siru

Parametri	Statistički parametri				
	n	$\bar{X} \pm SD$ (log cfu/g)	Xmin	Xmax	Cv(%)
Broj koagulaza pozitivnih stafilokoka (log cfu/g)	168	3,60±1,19	1,00	5,79	33,27
Broj <i>Lactococcus</i> spp. (log cfu/g)	168	8,33±0,55	7,02	9,80	6,58
Broj <i>Lactobacillus</i> spp. (log cfu/g)	168	6,62±0,95	4,00	9,19	14,43
pH	168	4,98±0,50	4,30	6,25	10,16
a_w	85	0,95±0,02	0,82	0,977	2,42
Sadržaj NaCl (%)	85	1,10±0,71	<0,01	3,48	64,31

Iz prikazanih rezultata se vidi da se broj koagulaza pozitivnih stafilokoka u uzorcima sireva proizvedenih od kuvanog i nekuvanog mleka kretao od 1 do 5,79 log cfu/g (srednja vrednost 3,60±1,19 log cfu/g), a da je koeficijent varijacije bio 33,27%.

Broj *Lactococcus* spp. u istim uzorcima se kretao od 7,02 do 9,80 log cfu/g sira (srednja vrednost 8,33±0,55) sa koeficijentom varijacije od 6,58%. Broj *Lactobacillus* spp. se kretao u rasponu od 6 do 9,19 log cfu/g (srednja vrednost 6,62±0,95) sa koeficijentom varijacije od 14,43%.

Izmerena pH vrednost u sirevima se kretala od 4,30 do 6,25 (srednja vrednost 4,98) sa koeficijentom varijacije od 10,16%. Vrednost za aktivnost vode u ispitanim uzorcima mekih sireva proizvedenim od nekuvanog i kuvanog mleka se kretala od 0,82 do 0,977 (srednja vrednost 0,95±0,02) sa koeficijentom varijacije od 2,42%. Sadržaj NaCl se kretao od 0,01 do 3,48 (srednja vrednost 1,10±0,71) sa koeficijentom varijacije od 64,31%.

5.3. Rezultati identifikacije odabranih izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz mekih sireva

5.3.1. Rezultati ispitivanja sposobnosti koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz mekih sireva da stvaraju hemolizu

U identifikaciji koagulaza pozitivnih stafilokoka korišćeno je ispitivanje sposobnosti izolata da stvaraju hemolizu. Ispitano je 102 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka poreklom iz sireva različite starosti proizvedenih od kuvanog i nekuvanog mleka. Rezultati ispitivanja hemolize na krvnom agaru prikazani su u Tabeli 5.3.1.

Tabela 5.3.1. Rezultati ispitivanja odabranih izolata koagulaza pozitivnih stafilokokada stvaraju hemolizine na krvnom agaru

Vrsta hemolize	Broj izolata	%
α	5	4,90
β	52	50,98
δ	3	2,94
$\alpha + \beta$	23	22,55
$\delta + \beta$	3	2,94
Odsustvo hemolize	16	15,69
Ukupno	102	100

Iz prikazanih rezultata može se videti da je od 102 izolata najveći broj koagulaza pozitivnih stafilokoka iz sireva proizvedenih od kuvanog i nekuvanog mleka na krvnom agaru davao β hemolizu (50,98%), zatim $\alpha + \beta$ hemolizu (22,55%), α hemolizu (4,90%), a najmanji broj izolata δ (2,94%) i $\delta + \beta$ (2,94%). Odsustvo hemolize je zapaženo kod 15,69% izolata.

5.3.2. Rezultati biohemijske identifikacije odabranih izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz sireva proizvedenih od kuvanog i nekuvanog mleka

Na osnovu karakterističnih makromorfoloških osobina, mikromorfoloških osobina, katalaza testa, hemolize, koagulza testa i broja stafilokoka u siru od 76 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz 83 uzorka sira odabrano je 18 izolata u

toku prvog dela ispitivanja, koji su ispitani BBL Crystal Identifikacionim sistemom-BD. Rezultati tih ispitivanja prikazani su u tabeli 5.3.2.1.

Tabela 5.3.2.1. Rezultati identifikacije izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka do vrsteprimenom BBL Crystal Identifikacioni sistema-BD

Vrsta stafilocoka	Broj izolata	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	17	94,44
<i>S. cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>	1	5,56
Ukupno	18	100

Rezultati prikazani u tabeli 5.3.2.1. pokazuju da je od 18 izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka iz uzoraka sireva identifikovano kao *Staphylococcus* spp., najčešće kao *S. aureus* (94,44% izolata), zatim *S. cohnii* ssp.*cohnii* (5,56%).

5.4. Rezultati ispitivanja sposobnosti koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz mekih sireva da stvaraju enterotoksine

Za ispitivanje sposobnosti stvaranja enterotoksina odabrano je 85 izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz sireva različite starosti.

Nalaz koagulaza pozitivnih stafilocoka, koje su stvarale enterotoksine u mekim sirevima bez zrenja proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka dat je u Tabeli 5.4.1.

Tabela 5.4.1. Nalaz koagulaza pozitivnih stafilocoka, koje su stvarale enterotoksine u mekim sirevima bez zrenja proizvedenim od kuvanog ili nekuvanog mleka

Vrsta sira	Broj uzoraka sira	Dokazane koagulaza pozitivne stafilocoke, koje stvaraju enterotoksine u uzorcima sira			
		Kuvano mleko		Nekuvano mleko	
		Broj	%	Broj	%
Kiselo-koagulišući	19	1	5,26	5	26,32
Slatko-koagulišući	66	5	7,58	15	22,73
Ukupno	85	6	7,06	20	23,53

Primenom skrining metoda VIDAS SET2 (BioMerieux, Francuska) dokazano je da od 85 izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka 26 (30,59%) izolata stvaralo enterotoksine.

Od ukupno 85 ispitanih uzoraka sira različite starosti, koji su proizvedeni od kuvanog i nekuvanog mleka 19 uzoraka sireva su bili kiselko-koagulišući, a 66 uzoraka sireva su bili slatko-koagulišući. Koagulaza pozitivne stafilokoke, koje su stvarale enterotoksine su najčešće izolovane iz uzoraka slatko-koagulišućih sireva, 15 (22,73%) uzoraka slatko-koagulišućih sireva proizvedenih od nekuvanog mleka i 5 (7,58%) uzoraka slatko-koagulišućih sireva proizvedenih od kuvanog mleka. U 5 (26,32%) uzoraka kiselko-koagulišućih sireva proizvedenih od nekuvanog mleka i jednom uzorku (5,26%) kiselko-koagulišućeg sira od kuvanog mleka dokazane su koagulaza pozitivne stafilokoke sa sposobnošću da stvaraju enterotoksine (Tabela 5.4.1.).

Tabela 5.4.2. Poreklo izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, koje su stvarale enterotoksine u mekim sirevima bez zrenja

Vrsta sira	Broj uzoraka	Poreklo koagulaza pozitivnih stafilokoka, koje stvaraju enterotoksine			
		Kuvano mleko		Nekuvano mleko	
		Broj	%	Broj	%
Kiselko-koagulišući	6	1	16,67	5	83,33
Slatko-koagulišući	20	5	20,00	15	80,00
Ukupno	26	6	23,08	20	76,92

Od 26 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, koji su stvarali enterotoksine, 20 (76,92%) izolata je bilo poreklom iz sireva proizvedenih od nekuvanog mleka, dok je 6 (23,08%) izolata bilo poreklom iz sireva proizvedenih od kuvanog mleka.

Od 20 uzoraka slatko-koagulišućih sireva u 15 (80%) uzoraka proizvedenog od nekuvanog mleka i 5 (20%) uzoraka proizvedenog od kuvanog mleka dokazano je prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka koje stvaraju enterotoksine. Od 6 uzoraka kiselko-koagulišućih sireva, prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka koje stvaraju enterotoksine dokazano je u 5 (83,33%) uzoraka proizvedenih od nekuvanog mleka i 1 (16,67%) uzorku proizvedenog od kuvanog mleka (Tabela 5.4.2).

5.4.1. Fenotipska karakterizacija entroksogenih koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz mekih sireva

Fenotipska karakterizacija izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, koje su stvarale enterotoksine, urađena je primenom ID 32 STAPH (BioMerieux, Francuska) testa. Rezultati tih ispitivanja prikazani su u tabeli 5.4.1.1.

Tabela 5.4.1.1. Rezultati identifikacije izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka do vrsta primenom ID 32 STAPH (BioMerieux, Francuska)

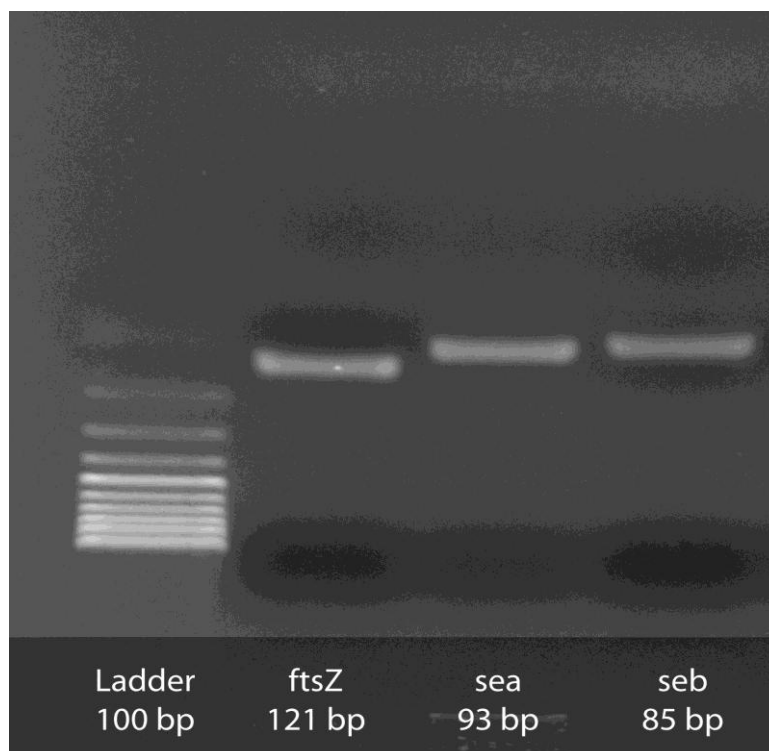
Vrsta stafilokoka	Broj izolata	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	61,54
<i>S. xylosus</i>	4	15,38
<i>S. sciuri</i>	3	11,54
<i>S. lentus</i>	3	11,54
Ukupno	26	100

Rezultati prikazani u tabeli 5.4.1.1. pokazuju da je od 26 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, za koje je ELFA tehnikom dokazano da stvaraju enterotoksine, identifikovano kao *S. aureus* (61,54% izolata), *S. xylosus* (15,38 % izolata), *S. sciuri* (11,54 % izolata), *S. lentus* (11,54% izolata).

5.5. Rezultati identifikacije gena za sintezu enterotoksina u koagulaza pozitivnim stafilokokama izolovanim iz mekih sireva

Obzirom da korišćena ELFA tehnika u eksperimentu enterotoksine detektuje grupno (SEA-SEE), bilo je neophodno da se identifikuju geni koji kodiraju sintezu jednog, ili više toksina. Za identifikaciju gena za sintezu enterotoksina u koagulaza pozitivnim stafilokokama izolovanih iz mekih sireva odabrano je 26 izolata za koje je prethodno ELFA tehnikom dokazano da stvaraju enterotoksine (SE). Za ispitivanje je korišćena DNK stafilokoka ekstrahovana iz 26 izolata, koja je amplifikovana primenom konvencionalne multipleks PCR tehnike za gene *sea* i *seb*, odnosno tehnikom Real-Time PCR za gene *sec*, *sed* i *see*.

Validacija konvencionalne multipleks PCR tehnike za ispitivanje gena *sea* i *seb* za sintezu enterotoksina A (SEA) i enterotoksina B (SEB) korišćenjem monotoskičnih referentnih sojeva, prikazana je na slici 5.5.1. Sa slike se jasno vidi da su trake amplifikovanih fragmenata gena za sintezu enterotoksina, jasno diferencirane, te da ne postoji unakrsna reakcija (lažno pozitivna) amplifikacije ispitivanih gena.



Slika 5.5.1. Rezultati elektroforeze PCR proizvoda monospecifičnih referentnih sojeva dobijenih pomoću prajmera, specifičnih za *ftsZ*, *sea* i *seb* gen.

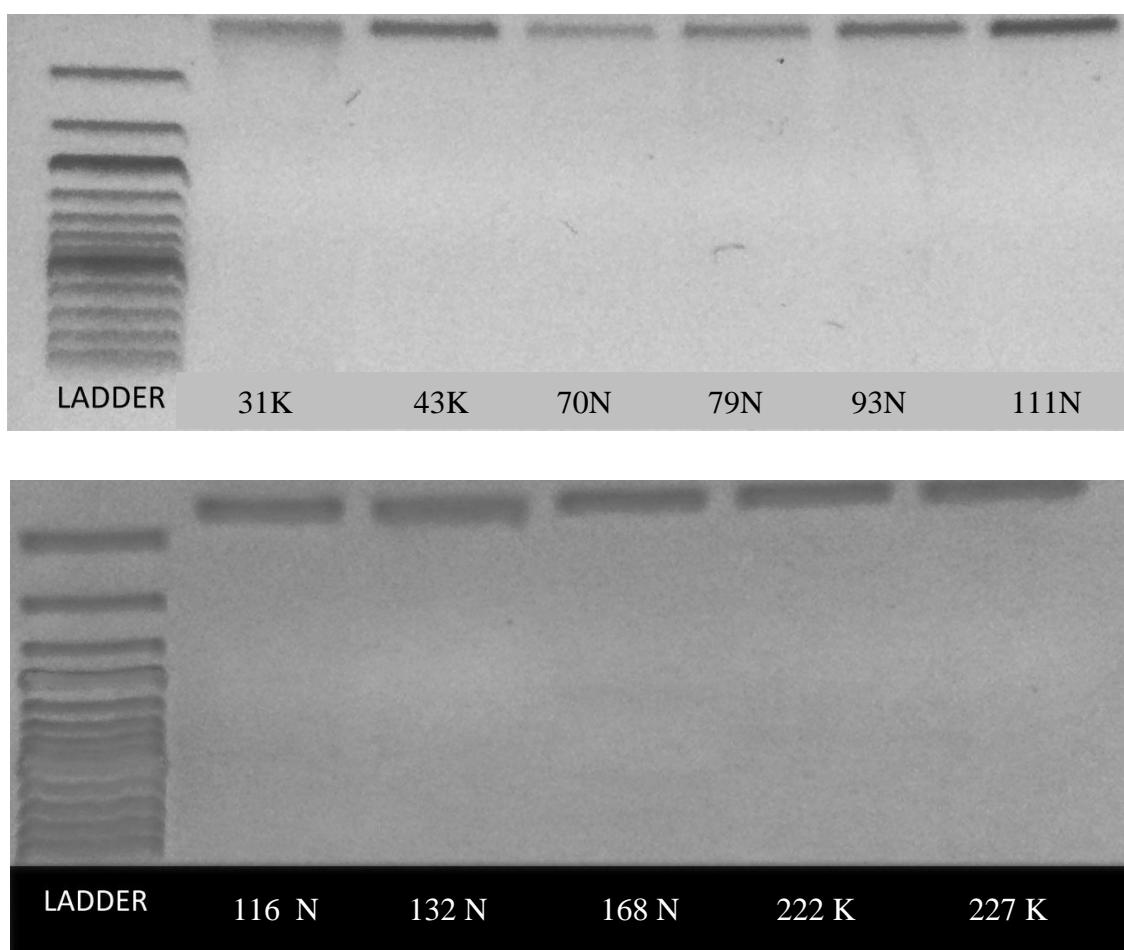
Rezultati ispitivanja prisustva gena za stvaranje enterotoksina su prikazani u tabeli 5.5.1.

Tabela 5.5.1. Rezultati ispitivanja prisustva gena za sintezu enterotoksina u izolatima koagulaza pozitivnih stafilokoka iz mekih sireva

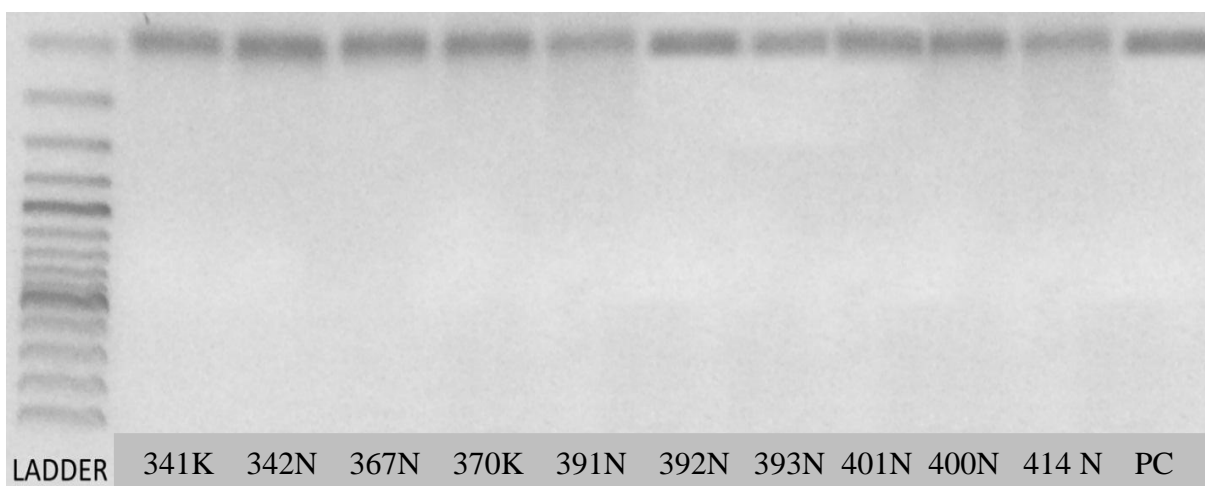
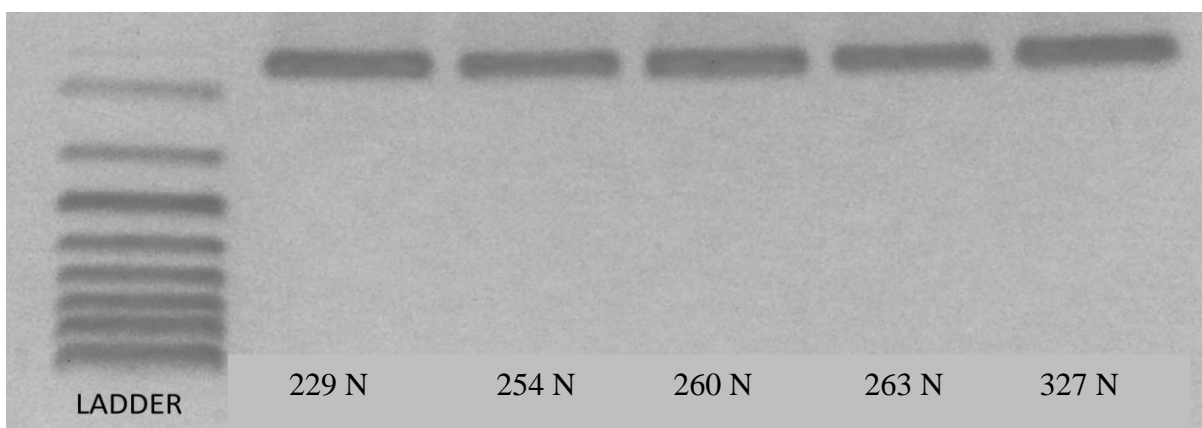
Vrsta stafilokoka	Brouj izolata	<i>sea</i> gen		<i>seb</i> gen		<i>sec</i> gen		<i>sed</i> gen		<i>see</i> gen	
		Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%
<i>S. aureus</i>	26	26	100	24	92,31	0	0	0	0	0	0

Rezultati prikazani u tabeli 5.5.1. pokazuju da je kod svih primoizolata, za koje je ELFA tehnikom utvrđeno da stvaraju klasične enterotoksine (SEA-SEE), utvrđeno prisustvo *sea* gena, a kod 92,31% izolata je dokazan i *seb* gen. Ni kod jednog od 26 ispitanih primoizolata nisu dokazani geni za sintezu enterotoksina C (*sec*), D (*sed*) i E (*see*).

Rezultati elektroforeze PCR proizvoda dobijenih pomoću prajmera za *sea* sa izolatima koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz mekih sireva (izolati sa oznakama 31K, 43K, 70N, 79N, 93N, 111N, 116N, 132N, 168N, 222K, 227K, 229N, 254N, 260N, 263N, 327N, 342N, 367N, 370K, 391N, 392N, 393N, 400N, 401N i 414N) prikazani su na slikama 5.5.2a i 5.5.2b

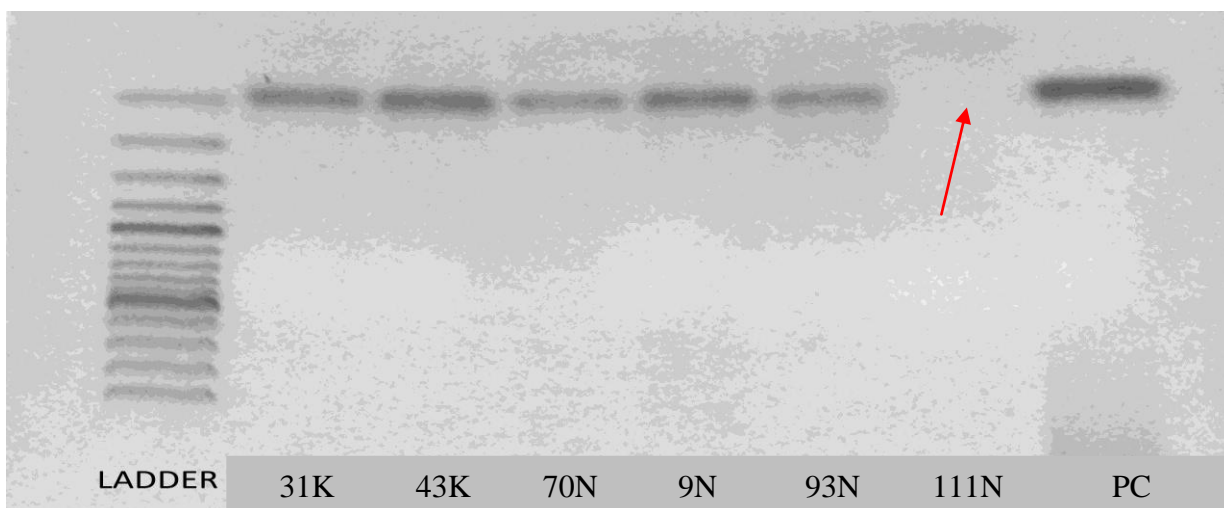


Slika 5.5.2.a. Rezultati elektroforeze PCR proizvoda dobijenih pomoću prajmera za *sea* gen. M marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder). Izolati iz sira: 31K, 43K, 70N, 79N, 93N, 111N, 116N, 132N, 168N, 222K, 227K,

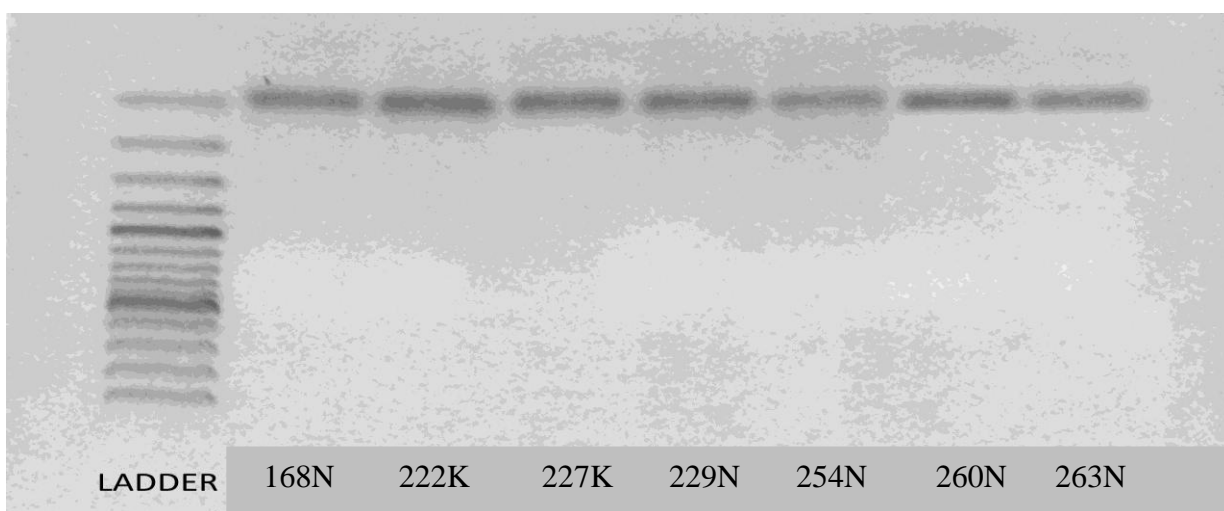


Slika 5.5.2.b. Rezultati elektroforeze PCR proizvoda dobijenih pomoću prajmera za *sea* gen. M marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder). Izolati iz sira: 229N, 254N, 260N, 263N, 327N, 341K, 342N, 367N, 370K, 391N, 392N, 393N, 401N, 400N, 414N, PC

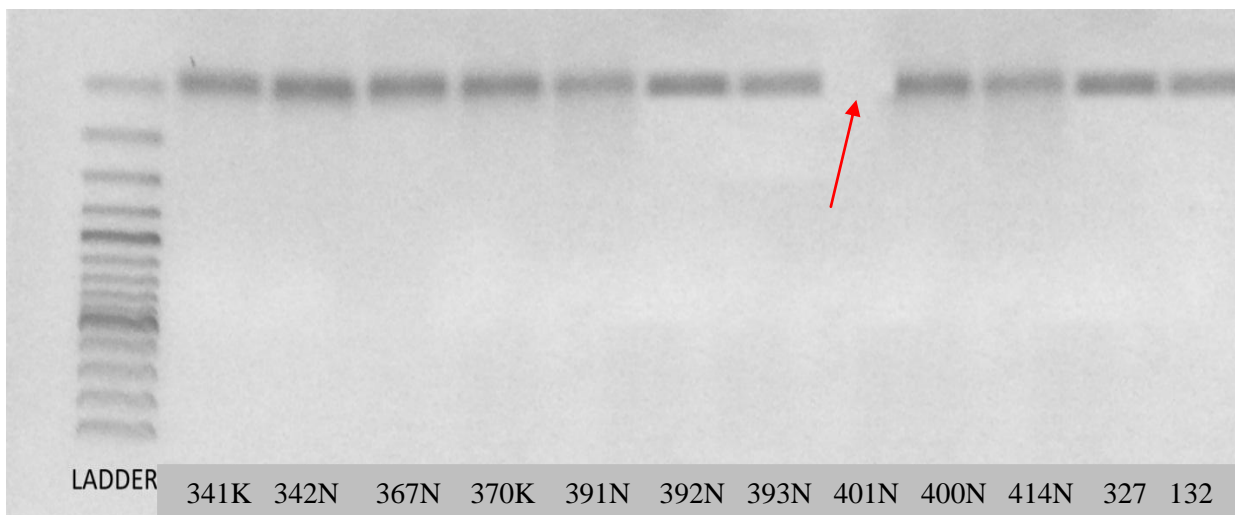
Rezultati elektroforeze PCR proizvoda dobijenih pomoću prajmera za *seb* sa primoizolatima koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz mekih sireva (izolati sa oznakama 31K, 43K, 70N, 79N, 93N, 111N, 116N, 132N, 168N, 222K, 227K, 229N, 254N, 260N, 263N, 327N, 342N, 367N, 370K, 391N, 392N, 393N, 400N, 401N i 414N) prikazani su na slikama 5.5.3a i 5.5.3b.



Slika 5.5.3.a. Rezultati elektroforeze PCR proizvoda dobijenih pomoću prajmera za *seb* gen. M marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder). Izolati iz sira: 31K, 43K, 70N, 79N, 93N, 111N i pozitivna kontrola (PC)



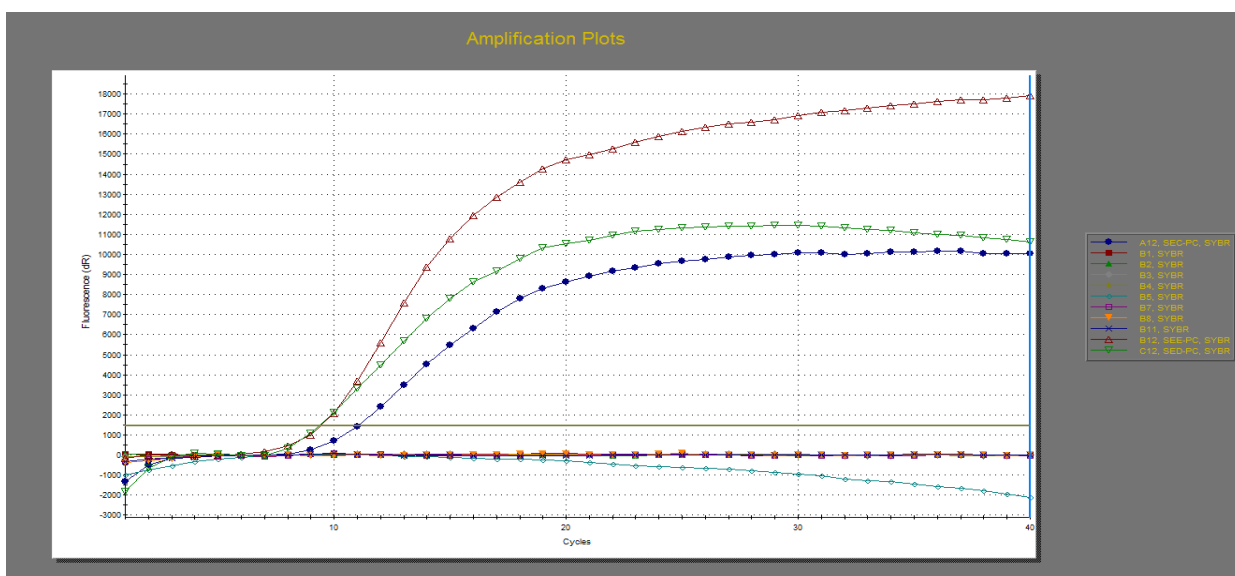
Slika 5.5.3.b. Rezultati elektroforeze PCR proizvoda dobijenih pomoću prajmera za *seb* gen. M marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder). Izolati iz sira: 168N, 222K, 227N, 229N, 254N, 260N, 263N



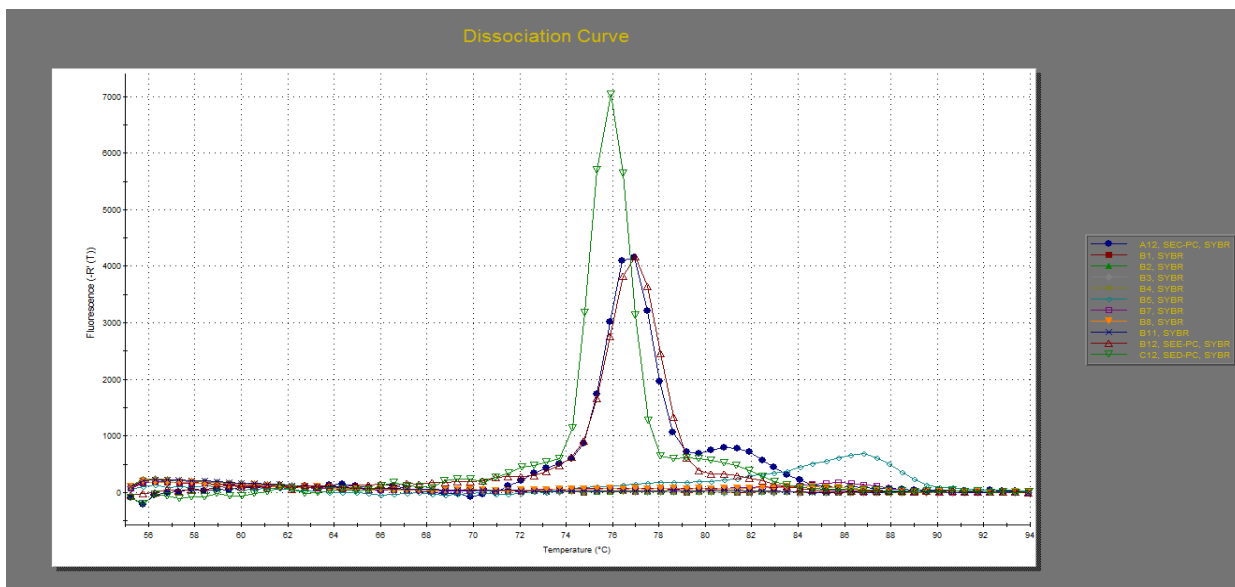
Slika 5.5.3.b. Rezultati elektroforeze PCR proizvoda dobijenih pomoću prajmera za *seb* gen. M marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder). Izolati iz sira: 341K, 342N, 367N, 370K, 391N, 392N, 393N, 401N, 400N, 414N, 327 i 132.

Ni kog jednog od 26 ispitivanih primoizolata koagulaza pozitivnih stafilokoka nisu dokazani geni za sintezu enterotoksina C (*sec*), D (*sed*) i E (*see*).

Posmatranjem amplifikacionih signala iz DNK izolata, nedvosmisleno se zaključuje da genom ovih izolata ne sadrži *sec*, *sed* odnosno *see* gen.



Grafikon 5.5.1. Amplifikaciona kriva gena za sintezu SEC, SED i SEE za uzorke i pozitivne kontrole



Grafikon 5.5.2. Disocijaciona kriva gena za sintezu SEC, SED i SEE za uzorke i pozitivne kontrole

Sa grafikona 5.5.1. i 5.5.2. vidi se da su pozitivne kontrole za gene *sec* i *see* dale pozitivan signal pri Ct vrednosti od 10-12, što ukazuje da je amplifikacija uspešna. Pored toga, negativna kontrola nije dala signal, što ukazuje da u ispitivanom sistemu reagenasa nije bilo kontaminacije koja bi odavala sliku lažno pozitivnog signala.

5.6. Rezultati ispitivanja prisustva enterotoksina u sirevima proizvedenim od kuvanog ili nekuvanog mleka

Za ispitivanje prisutva enterotoksina u sirevima odabrano je 26 uzoraka sireva, koji su proizvedeni od kuvanog i nekuvanog mleka, a kojima su dokazane koagulaza pozitivne stafilocoke za koje je dokazano da stvaraju enterotoksine i utvrđeno je prisustvo gena za sintezu enterotoksina A i B (*sea* i *seb*). Svih 26 izolata kod kojih je dokazano prisustvo gena za sintezu enterotoksina su identifikovani kao *Staphylococcus aureus*, što potvrđuje prisustvo *ftsZ* gena (slika 5.5.1.). Gen *ftsZ* funkcionalno učestvuje u deobi bakterijske ćelije, jer kodira sintezu proteina kontraktilnog prstena (Z prsten) na mestu razdvajanja buduće dve ćelije. Gen je visoko očuvan tokom evolucije *Staphylococcus aureus* i služi kao stabilan identifikacioni marker za pripadnost vrsti *Staphylococcus aureus*.

Broj koagulaza pozitivnih stafilokoka u sirevima kretao se od 1,00 do 5,97 log cfu/g. Rezultati određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilokoka, koje su stvarale enterotoksine, *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., hemijskih parametara (pH, aktivnost vode, sadržaj NaCl) i nalaz enterotoksina u sirevima proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka dat je u Tabeli 5.6.1 i 5.6.2.

Dobijeni rezultati pokazuju da je od 26 ispitanih uzoraka sira enterotoksin dokazan u 2 (7,69%) uzorka slatko-koagulišuća sira proizvedena od nekuvanog mleka (sirevi sa oznakom 263 i 393). U ova 2 uzorka sira je prethodno dokazano prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka, koje imaju sposobnost da stvaraju enterotoksine i izolati (263N i 393N) iz oba uzorka sira su bili nosioci gena za sintezu enterotoksina SEA i SEB. (*sea* i *seb*).

Sirevi u kojima je dokazano prisustvo enterotoksina bili su starosti 3-4 dana, odnosno 7 dana, a broj koagulaza pozitivnih stafilokoka bio više od 5 log cfu/g (Tabela 5.6.1. i 5.6.2.). Izolati 263N i 393N su ispitivanjem biohemijskih osobina identifikovani kao *Staphylococcus aureus*.

Tabela 5.6.1. Rezultati određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilocoka, koje su stvarale enterotoksine, *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., hemijskih parametara (pH, a_w , sadržaj NaCl) i nalaz enterotoksina u sirevima proizvedenim od nekuvanog mleka

Redni broj	Oznaka sira	Starost sira (dani)	Oznaka izolata stafilocoka	Broj koagulaza pozitivnih stafilocoka (logcfu/g)	pH sira	a_w	NaCl (%)	Broj <i>Lactococcus</i> spp. (log cfu/g)	Broj <i>Lactobacillus</i> spp. (log cfu/g)	Nalaz enterotoksina u siru
1.	70	3	70N	3,90	4,62	0,965	0,117	8,33	6,58	-
2.	79	7	79N	4,02	4,69	0,960	0,351	8,74	7,41	-
3.	93	4	93N	5,20	4,59	0,960	0,241	8,81	7,72	-
4.	111	7	111N	5,78	5,40	0,940	1,433	8,45	6,78	-
5.	116	3	116N	5,79	5,01	0,977	1,346	8,48	5,48	-
6.	132	2	132N	2,48	4,52	0,942	2,194	8,60	7,32	-
7.	168	2	168N	3,40	4,95	0,920	0,907	8,32	6,02	-
8.	229	3-4	229N	3,63	4,42	0,950	0,613	7,78	6,49	-
9.	254	1	254N	2,30	5,07	0,965	1,580	8,29	4,30	-
10.	260	12 h	260N	4,36	4,84	0,970	1,492	7,02	4,90	-
11.	263	3-4	263N	5,08	4,83	0,960	1,872	7,84	5,32	+
12.	327	7	327N	2,48	4,55	0,946	1,726	8,02	6,26	-
13.	342	7	342N	2,30	5,78	0,940	2,779	7,19	6,99	-
14.	367	4-5	367N	3,30	4,73	0,956	0,965	8,36	7,26	-
15.	391	3-4	391N	2,95	5,15	0,951	1,463	8,45	7,09	-
16.	392	7	392N	2,60	4,81	0,953	0,995	8,32	6,99	-
17.	393	7	393N	5,35	4,76	0,962	0,497	8,23	6,73	+
18.	400	7	400N	5,38	4,65	0,955	1,082	8,19	6,91	-
19.	401	7	401N	3,52	4,77	0,960	0,468	7,29	6,18	-
20.	414	3	414N	2,78	4,36	0,969	0,497	8,32	6,38	-

N-izolat iz sira proizvedenog od nekuvanog mleka

Tabela 5.6.2. Rezultati određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilocoka, koje su stvarale enterotoksine, *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., hemijskih parametara (pH, a_w , sadržaj NaCl) i nalaz enterotoksina u sirevima proizvedenim od kuvanog mleka

Redni broj	Oznaka sira	Starost sira (dani)	Oznaka izolata stafilocoka	Broj koagulaza pozitivnih stafilocoka (logcfu/g)	pH sira	a_w	NaCl (%)	Broj <i>Lactococcus</i> spp. (log cfu/g)	Broj <i>Lactobacillus</i> spp. (log cfu/g)	Nalaz enterotoksina u siru
1.	31	4	31K	4,20	5,11	0,955	1,170	8,71	6,00	-
2.	43	3	43K	2,48	5,20	0,940	1,320	8,84	7,33	-
3.	222	7	222K	1,00	4,76	0,935	2,135	8,23	6,16	-
4.	227	3-4	227K	1,00	4,50	0,960	0,731	7,68	6,07	-
5.	341	2	341K	4,94	5,79	0,945	1,784	7,85	7,04	-
6.	370	3-4	370K	3,00	5,63	0,956	0,848	8,30	7,21	-

K-izolat iz sira proizvedenog od kuvanog mleka

6. DISKUSIJA

Meki sirevi, a posebno meki sirevi bez zrenja proizvedeni slatkom koagulacijom zbog sastava i fizičko-hemijskih karakteristika predstavljaju dobar medijum za razmnožavanje *S. aureus* i stvaranje enterotoksina. Prema podacima iz literature trovanja enterotoksinima stafilokoka su na trećem, a po nekim autorima na drugom mestu najčešćih trovanja hranom. U zemljama EU u 2009. godini registrovano je 293 epidemije izazvane enterotoksinima stafilokoka što predstavlja 5,3% od svih zabeleženih epidemija. Prema izveštajima iz 15 evropskih zemalja mleko i proizvodi od mleka su u 1-9% (prosečno 4-8%) epidemija intoksikacija utvrđeni kao izvor enterotoksina stafilokoka. Prema izveštaju EFSA-e iz 2014. godine od ukupnog broja zabeleženih alimentarnih oboljenja 346 je bilo izazvano enterotoksinima stafilokoka od kojih je u 20% slučajeva sir bio izvor enterotoksina. Iako su meki sirevi, proizvedeni u domaćinstvu od nekuvanog ili kuvanog mleka, zastupljeni na tržištu u Republici Srbiji u velikom broju, u naučnoj i stručnoj literaturi nema dovoljno podataka o riziku koji ta vrsta sireva, kada su u pitanju intoksikacije enterotoksinima stafilokoka, predstavlja po zdravlje ljudi. Stoga smo smatrali da bi bilo korisno izvršiti procenu rizika od nalaza enterotoksina stafilokoka u mekim sirevima proizvedenim u individualnim domaćinstvima.

Bakteriološkim ispitivanjem, kojim je obuhvaćeno 555 uzoraka mekih sireva proizvedenih od kuvanog ili nekuvanog mleka, uzetih sa 17 pijaca, dokazano je prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka u 168 (30,27%) uzoraka mekih sireva (Tabela 5.1.1). Ovaj nalaz se slaže sa nalazom, koji su dobili **Moraes Mendoca i sar. (2009)** koji su dokazali koagulaza pozitivne stafilokoke u 30,9% pregledanih uzoraka sireva proizvedenih od sirovog mleka. Za razliku od rezultata dobijenih u našim istraživanjima **De Luca (1997)**, **El-Sharound i Spano (2008)** i **Akineden i sar. (2008)** su *S. aureus* dokazali u 0-25% ispitanih uzoraka različitih vrsta sireva. Naši rezultati su pokazali da je od 168 uzoraka sireva, u kojima su dokazane koagulaza pozitivne stafilokoke, najveći broj 140 (83,33%) uzorka sira proizvedeno od nekuvanog mleka a 28 (16,67%) uzoraka sira je proizvedeno od kuvanog mleka. Nalaz koagulaza pozitivnih stafilokoka u uzorcima mekog sira proizvedenog od nekuvanog mleka od 5,05% je manji u odnosu na vrednost od 25% koju su dobili **De Luca i sar. (1997)** ispitivanjem sireva proizvedenih od pasterizovanog mleka. Prisustvo koagulaza pozitivnih

stafilokoka u uzorcima sireva proizvedenih od nekuvanog mleka je poreklom iz mleka. U mleku koje se dobija pravilnom mužom broj *S. aureus* se kreće od 100-200 cfu/ml, a u slučaju infekcije mlečne žlezde ovaj broj se povećava do 10^4 cfu/ml (**Asperger i Zangerl, 2003**). Broj koagulaza pozitivnih stafilokoka veći od 10^4 cfu/g sira proizvedenog od nekuvanog mleka je posledica primarne kontaminacije mleka ovim mikroorganizmom usled latentne infekcije ili supkliničkoih mastitisa. U prilog poreklu koagulaza pozitivnih stafilokoka nam govore podaci iz leiterature o čestom nalazu koagulaza pozitivnih stafilokoka u mleku (**Medvedova i sar. 2014; Rajić, 2014; Boynukara i sar. 2008; Mork i sar. 2010, Pelisser i sar. 2008, Rall i sar. 2008, Jorgensen i sar. 2005a; Hant i sar. 2012; Korpysa-Dzirba i Osek, 2011**).

Nalaz koagulaza pozitivnih stafilokoka u sirevima proizvedenim od kuvanog mleka se može objasniti naknadnom kontaminacijom iz spoljne sredine, sa ruku radnika i opreme za proizvodnju sira, a visoka aktivnost vode (0,94-0,96) i visoka pH vrednost (6,0-6,2) u siru omogućavaju njihovo razmnožavanje. U prilog kontaminaciji poreklom od ljudi govore podaci da je učestalost nalaza enterotoksogenih stafilokoka kod ljudi 40-60% (**Medvedova i Valik, 2012**).

Proces proizvodnje sireva je kompleksan proces. Ponašanje *S. aureus* u siru zavisi od procesa proizvodnje i kapaciteta mikroorganizma da preživi stres u matriksu sira (**Cretenet i sar. 2011**). Meki sirevi se na teritoriji Republike Srbije u individualnim domaćinstvima proizvode od kuvanog ili nekuvanog mleka. U nekim geografskim područjima sir se isključivo proizvodi od kuvanog mleka, a u nekim od nekuvanog mleka. Za proizvodnju mekih sireva od nekuvanog mleka u individualnim domaćinstvima koristi se mleko jutarnje, večernje, ili mešano mleko jutarnje i večernje muže. Ako se sir proizvodi mešanjem mleka obe muže, mleko večernje muže se tokom noći čuva u rashlađenom stanju, ali često se čuva i u ambijetalnim uslovima što pogoduje razmnožavanju koagulaza pozitivnih stafilokoka. Po spajanju sa mlekom jutarnje muže dodaje se komercijalno sirilo prema uputstvu proizvođača, bez dodavanja starter kultura. Mleko sa dodatim sirilom se ostavi da stoji 2-4 h da bi se formirao gruš. Kada dođe do koagulacije, gruš se seče da bi se izdvojila surutka i prebacuje u cedilo. U cedilu stoji 2-4 h u ambijetalnim uslovima, a potom se cedilo, zateže i formira gruda, koja se presuje da bi se preostala surutka iscedila. Sir pod presom se čuva u frižideru. Neki proizvođači dodaju so u mleko, a većina soli pre, ili za vreme sečenja sira u kriške.

Meki sirevi od kuvanog mleka se proizvode takođe od mleka jutarnje, večernje, ili mešanjem mleka jutarnje i večernje muže. Posle termičke obrade, mleko se ostavi da se ohladi i čuva u rashlađenom stanju, u frižideru 24 h. Posle skidanja kajmaka sa površine, mleko se zagreva do 25°C i dodaje sirilo, bez dodavanja komercijalnih starter kultura. Da bi se formirao gruš potrebno je 3-4 h. Gruš se prebacije u cedilo i cedi 3-4 h. Ceđenje se odvija u ambijetalnim uslovima pri temperaturi 20-25°C, a zatim se zategne cedilo i formira gruda. Soljenje se vrši na isti način kao i sirevi proizvedeni od nekuvanog mleka. Ne postoji standard po kojem proizvođači sole sir, već svaki proizvođač na osnovu svog iskustva soli sir. Sagledavanjem procesa proizvodnje mekih sireva, može se zaključiti da postoje uslovi za rast *S. aureus*, naročito u ranim fazama, kada su visoke pH vrednost i temperatura. Rast mikroorganizma je moguć sve dok fizičko-hemijski parametri (pH, aktivnost vode, sadržaj NaCl) i prisustvo kompetitivne mikroflore ne počnu da utiču na rast *S. aureus*.

Naši rezultati pokazuju da je od 168 uzoraka sireva, u kojima su dokazane koagulaza pozitivne stafilocoke, 129 (76,78%) uzoraka sireva pripadalo grupi slatko-koagulišućih sireva, a 39 (23,21%) uzoraka grupi kiselo-koagulišućih.

Ambijentalni uslovi u kojima se proizvode sirevi, naročito tokom toplih meseci godine pogoduju razmnožavanju koagulaza pozitivnih stafilocoka, tako da tokom proizvodnje i skladištenja mekog sira koagulaza pozitivne stafilocoke mogu da se razmnožavaju i stvaraju enterotoksine, posebno ako u proizvodnji sira nije uključena mlečnokiselinska fermentacija, kao što je to kod slatko-koagulišućih sireva. Uslovi tokom proizvodnje mekih sireva slatkom koagulacijom, kada je pH sira iznad 4,6 pogodovali su rastu i razmnožavanju koagulaza pozitivnih stafilocoka. Prema podacima iz literature (**ICMSF, 1996**) rast ovog mikroorganizma je moguć pri rasponu pH od 4 do 10, dok je optimalno pri pH 6-7.

U zavisnosti od starosti sireva od 168 uzoraka sireva, u kojima su dokazane koagulaza pozitivne stafilocoke, najveći broj 157 (93,45%) uzoraka je pripadalo grupi mekih sireva bez zrenja, a 11 (6,55%) uzorka je pripadalo grupi sireva sa zrenjem (Tabela 5.1.3).

Najveći nivo kontaminacije sireva koagulaza pozitivnim stafilokokama (>4 log cfu/g) je dokazan u 54 uzorka slatko-koagulišućih sireva od kojih je 44 (81,48%) uzorka proizvedeno od nekuvanog mleka i 10 (18,52%) uzoraka od kuvanog mleka (Tabela

5.1.2.). U najvećem broju uzoraka (n=63), od kojih je 51 (80,95%) uzorak pripadao grupi slatko-koagulušućih sireva proizvedenih od nekuvanog mleka, a 12 (19,05%) uzoraka je pripadalo grupi slatko-koagulišućih sireva proizvedenih od kuvanog mleka, nivo kontaminacije nivo kontaminacije koagulaza pozitivnim stafilokokama se kretao od 2 do 4 log cfu/g. Naši rezultati se slažu sa nalazima **Polli i sar. (2007)**, koji su dokazali da je populacija *S. aureus* u 78% uzoraka Monte Veronese sira proizvedenog od sirovog kravljeg mleka veća od 10^3 cfu/g. Za razliku od rezultata dobijenih u našim ispitivanjima **Borelli i sar. (2006)**, su dokazali veći nivo kontaminacije *S. aureus* (<4,8 do 6,3 log cfu/g) u 70% uzoraka Canastra sira. U prilog našim rezultatima su rezultati **Rosengren (2012)**, koja je dokazala koagulaza pozitivne stafilokoke u 69% (38/55) uzoraka sireva proizvedenih od sirovog mleka i 6% (6/96) uzoraka sira proizvedenim od pasterizovanog mleka. Veći broj koagulaza pozitivnih stafilokoka je dokazan u siru proizvedenom od sirovog mleka, naročito onim bez dodatka starter kultura. Nivo >5 log cfu/g je dokazan kod 16% (6/39) uzoraka sireva proizvedenih od sirovog mleka, a najveći broj, 6,56 log cfu/g **Rosengren (2012)** je dokazala u uzorku sira proizvedenom od sirovog mleka bez dodataka starter kultura.

Naši rezultati pokazuju da je broj koagulaza pozitivnih stafilokoka u sirevima proizvedenim od kuvanog i nekuvanog mleka bio od 1,0 do 5,9 log cfu/g. Najveći broj ovog mikroorganizma je dokazan u slatko-koagulišućem siru starosti 4 dana, koji je proizveden od nekuvanog mleka (Prilog 3.). Veliki sadržaj vode u bezmasnoj materiji 82,34% i pH 4,76 su pogodovali rastu koagulaza pozitivnih stafilokoka u siru. Iako u literaturi postoje podaci da *S. aureus* raste u manjem broju u proizvodima od mleka sa većim sadržajem masti (**Halpin-Dohnalek i Marth, 1989**) naš rezultat pokazuje da sadržaj masti u suvoj materiji sira nije uticao na rast *S. aureus*, jer je ovaj mikroorganizam mogao da se umnoži do vrednosti više od 5 log cfu/g. U 3 uzorka sira u kojima je utvrđen najmanji broj koagulaza pozitivnih stafilokoka (1 log cfu/g) sadržaj masti u suvoj materiji je bio 30,03%, 59,61% i 66,57%. Sva tri uzorka sira su na osnovu ove vrednosti mogla da se kategorišu kao masni, punomasni i ekstramasni sirevi. Na broj koagulaza pozitivnih stafilokoka nije imala uticaja pH vrednost, jer je u sva tri uzorka izmerena visoka pH vrednost (5,50; 5,97 i 6,50). Budući da je starost dva uzorka sira bila jedan dan visoka pH vrednost se može objasniti činjenicom da nije bilo dovoljno vremena za mlečno-kiselinsku fermentaciju i snižavanja pH. U uzorku sira

(17f/n), čija je starost bila 15 dana, fermentacija se odvijala sporije i u tom uzorku sira izmeren je pH 5,97.

Preko 5 log cfu/g koagulaza pozitivnih stafilokoka je utvrđeno u 2 uzorka kiselokoagulišućeg sira (3/n i 72/n) starosti 2 i 15 dana, koji su proizvedeni od nekuvanog mleka (Prilog 5.). Iako je u siru došlo do snižavanja pH vrednosti do 4,39, odnosno 4,41 to nije imalo uticaja na rast koagulaza pozitivnih stafilokoka. Međutim, u 2 uzorka sira (oznaka 71/n i 94/n) u kojima je izmeren pH 4,22 odnosno 4,25 broj koagulaza pozitivnih stafilokoka je bio 1,0 log cfu/g. Manji broj mikroorganizma se može objasniti združenim uticajem pH i sadržaja masti, jer je u ovim uzorcima sadržaj masti u suvo materiji bio visok (oko 60%) (Prilog 5).

Rezultati koje smo dobili određivanjem broja *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. u mekim sirevima pokazuju da je broj *Lactococcus* spp. u uzorcima slatko-koagulišućih sireva proizvedenih od kuvanog, ili nekuvanog mleka približno isti oko 8 log cfu/g. Broj *Lactobacillus* spp. je bio približno isti u slatko-koagulišućim sirevima sa zrenjem i bez zrenja (6,60 log cfu/g), a najveći broj, 6,96 log cfu/g je utvrđen u uzorku slatko-koagulišućeg sira sa zrenjem proizvedenog od nekuvanog mleka. (Tabela 5.1.4.) Naši rezultati se slažu sa rezultatima **Akkaya i Sancak (2007)**, koji su odredili broj bakterija mlečne kiseline u Herby siru. Veće vrednosti za broj bakterija mlečne kiseline, oko 9 log cfu/g ovi autori su utvrdili u sirevima proizvedenim od nekuvanog mleka. Populacija *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. u broju, koji smo mi utvrdili u sirevima je doprinela razvijanju mlečno-kiselinske fermentacije i posledično tome snižavanju pH vrednosti u uzorcima mekih sireva. Bakterije mlečne kiseline imaju ključnu ulogu u proizvodnji fermentisanih proizvoda kao što je sir i veliki broj literaturnih podataka govori u prilog inhibitornom delovanju, koje pokazuju *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. prema **S. aureus (Fang i sar. 1993, Ortolani i sar. 2010, Pereira i sar. 2009, Radovanović i Katić 2009)**. Inhibitorno delovanje bakterija mlečne kiseline nije samo posledica snižavanja pH, već i mehanizma kompeticije, smanjenja količine esencijalnih hranljivih materija i stvaranja produkata (vodonik peroksid, orhanske kiseline, bakterocini, nizin).

*

*

*

Rezultati određivanja pH vrednosti u uzorcima mekih sireva, u kojima su dokazane koagulaza pozitivne stafilocoke, proizvedenih od kuvanog mleka pokazuju da se u uzorcima kiselo-koagulišućih sireva pH vrednost kretala od 4,10 do 4,60, a u uzorcima slatko-koagulišućih sireva od 4,61-6,94 (Tabela 5.2.3.). Pri ovim vrednostima pH je bio moguć rast koagulaza pozitivnih stafilocoka i njihov broj se kretao od 1 do 5,79 log cfu/g. Prema **ICMSF (1996)** *S. aureus* može da raste u rasponu pH 4 do 10, dok je stvaranje enterotoksina u aerobnim uslovima moguće pri pH vrednosti 4,5 do 9,6. Naši rezultati se slažu sa nalazima **Jakobsen i sar. (2011)** koji su dokazali značajno smišavanje pH vrednosti u sirevima proizvedenim od sirovog mleka posle 5-6 h fermentacije. Posle 24 h u sirevima su izmerili pH vrednost nižu od 5,5 i utvrdili najveći broj *S. aureus* u uzorcima starosti 5-6 h kada je broj bio preko 4 log cfu/g. Početni broj *S. aureus* u mleku značajno utiče na broj ovog mikroorganizma tokom prvih faza proizvodnje sira. Rezultate slične našim su dobili **Akkaya i Sancak (2007)** koji su u sira Herby proizvedenom od pasterizovanog mleka izmerili pH vrednost 4,25 do 5,24, a u siru proizvedenom od sirovog mleka 4,28 do 6,41.

Bitna karakteristika stafilocoka je da ovaj mikroorganizam može da raste pri širokom rasponu aktivnosti vode u odnosu na druge mikroorganizme. Najniža vrednost a_w pri kojoj mogu da rastu koagulaza pozitivne stafilocoke je 0,83-0,86, što je ekvivalentno koncentraciji od 20% NaCl (**Hennekinne i sar. 2012**). Naši rezultati određivanja aktivnosti vode pokazuju da se a_w u mekom siru proizvedenom od nekuvanog mleka kretala od 0,92 do 0,98, a u siru proizveom od kuvanog mleka od 0,87 do 0,98 (Tabela 5.2.1). Pri ovim vrednostima jaktivnosti vode bio je moguć rast koagulaza pozitivnih stafilocoka. Približno iste vrednosti su dokazali **Akkaya i Sancak (2007)** u Herby siru starosti od 1 do 90 dana. U sirevima proizvedenim od pasterizovanog mleka a_w se kretala od 0,91 do 0,97, a u sirevima proizvedenim od sirovog mleka od 0,89 do 0,97.

Naši rezultati određivanja sadržaja NaCl u mekim sirevima pokazuju da je najveća dokazana vrednost bila 3,48. Iako je *S. aureus* halotolerantan mikroorganizam u poređenju sa drugim mikroorganizmima i bakterijama mlečne kiseline NaCl zajedno sa drugim faktorima u siru može da inhibiše rast *S. aureus*. Rast je moguć pri koncentraciji NaCl 2,5-20% (**Cretenet i sar. 2011**), a kako smo u uzorcima mekih sireva dokazali sadžaj NaCl do 3,48%, ovaj fizičko-hemijski parametar nije uticao na rast koagulaza pozitivnih stafilocoka. Prema mišljenju (**Cretenet i sar. 2011**) snižavanje aktivnosti

vode može da utiče na stvaranje enterotoksina. Opadanje aktivnosti vode manje utiče na stvaranje enterotoksina A i H (SEA i SEH) u odnosu na enterotoksine B i C (SEB i SEC). Stvaranje SEA je moguće pri vrednostima a_w od 0,87 do 0,89, dok je stvaranje SEB moguće pri aktivnosti vode od 0,97 do 0,99 (Jay, 2000).

Ispitivanjem fizičko-hemijskog parametara, vode u bezmasnoj materiji 83 uzorka mekog sira, proizvedenih od kuvanog ili nekuvanog mleka, u kojima su dokazane koagulaza pozitivne stafilocoke prema Pravilniku o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura (Službeni glasnik RS 33/10) se može svrstati u kategoriju mekih sireva na osnovu sadržaja vode u bezmasnoj materiji sira, koja je u svim uzorcima bila viša od 67%.

Na osnovu rezultata određivanja sadržaja masti u suvoj materiji sira prema Pravilniku o izmenama i dopuni pravilnika o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura (Službeni glasnik RS 34/14) ispitani sirevi se mogu svrstati u polumasne sireve, jer je najmanja vrednost utvrđena u uzorcima sireva bila 16,47%, što je u kategoriji ≥ 10 do $< 25\%$. Uzorci sireva koji su sadržavali ≥ 25 do $< 45\%$ masti u suvoj materiji sira su svrstani u masne sireve, uzorci sireva koji su sadržavali ≥ 45 do $< 60\%$ masti u punomasne i uzorci sireva, koji su sadržavali $> 60\%$ masti kategorisani su kao ekstra masni sirevi. (Prilog 3,4,5,6).

*

*

*

Hemoliza je značajna karakteristika patogenih stafilocoka, pa je u fenotipskoj identifikaciji izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka korišćena ta njihova osobina. Naši rezultati pokazuju da je najveći broj izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka iz sira najčešće stvarao beta hemolizu (50,98%), zatim alfa plus beta hemolizu (22,55%), alfa hemolizu (4,90%), a najređe delta hemolizu i delta plus beta hemolizu (2,94%). Hemolizu na krvnom agaru nije stvaralo 15,69% izolata (Tabela 5.3.1). Naši rezultati se slažu sa rezultatima, koje je dobila **Rajić (2014)** ispitujući izolate koagulaza pozitivnih stafilocoka iz vimena krava i dokazala da je najčešće daju beta hemolizu (50% izolata), zatim alfa plus beta hemolizu (36% izolata), beta plus delta hemolizu (8% izolata), delta hemolizu (4% izolata) i alfa hemolizin (2% izolata). Naši rezultati su u skladu sa rezultatima **Morandi i sar. (2009)**, koji su utvrdili da 54% izolata, koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih u slučajevima mastitisa krava, na krvnom agaru stvara

beta hemolizu, a 40% izolata stvara alfa plus hemolizu. Naši rezultati se slažu i sa rezultatima **Akineden i sar. (2001)** koji su dokazali da od 103 izolata *S. aureus* beta hemolizu na krvnom agaru stvara 50 izolata. Za stafilokoke koje izazivaju mastitise je karakteristično da najčešće na krvnom agaru daju beta hemolizu, alfa i beta hemolizu, ili samo alfa hemolizu, pa naš nalaz može da ukaže da su izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka iz sira poreklom iz vimena.

Ispitivanjem biohemijskih osobina 26 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka za koje je ELFA tehnikom dokazano da stvaraju enterotoksine, identifikovano kao *S. aureus* (61,54% izolata), *S. xylosus* (15,38 % izolata), *S. sciuri* (11,54 % izolata), *S. lentus* (11,54% izolata) (Tabela 5.4.1.1.). Naši rezultati su slični rezultatima **El-Sharoud i Spano (2008)** koji su od 15 izolata *Staphylococcus* spp. iz Domiati sireva 2 identifikovali kao *S. aureus*, 4 izolata kao *S. xylosus*, ali i 4 izolata kao *S. caprae* i 5 izolata kao *S. chromogenes*, koje mi nismo dokazali. U najvećem broju, 40 izolata od 46 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka iz mleka i tradicionalnih frementisanih proizvoda su identifikovali kao *S. aureus* **Bendahou i sar. (2009)**. **Morandi i sar. (2009)** su svih 122 izolata iz različitih proizvoda od mleka indentifikovali kao *S. aureus* primenom PCR tehnike, međutim primenom Bilog GP identifikacije bila je moguća identifikacija za 78% izolata *S. aureus*, dok je za preostalih 22% izolata bila potrebna primena PCR tehnike. Za razliku od naših rezultata **Rajić (2014)** je u većem procentu izolate koagulaza pozitivnih stafilokoka iz melaka identifikovala kao *S. aureus* (88%), zatim *S. chromogenes* (4%), *S. intermedius* (2%), *S. xylosus* (2%), *S. sciuri* (2%) i *S. lentus* (2%). **Rosengren (2012)** je od 156 izolata iz sira 152 (97%) izolata identifikovala kao *S. aureus*. **Medvedova i sar. (2014)** su ispitivanjem biohemijskih osobina API Staph testom od 64 izolata poreklom iz mleka i tradicionalnih sireva 52 (81,3%) izolata identifikovali kao *S. aureus*. Preostale izolate su identifikovali kao *S. caprae* (4), *S. lentus* (2), *S. epidermidis* (2), *S. hominis* (2) i *S. xylosus* (2).

Kod svih 26 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, kod kojih smo dokazali sposobnost sinteze enterotoksina, PCR metodom je potvrđeno prisustvo 16S rRNK karakteristične za stafilokoke.

Izolati *S. aureus* različitog porekla, koji imaju sposobnost da stvaraju eneterotoksine se često razlikuju po broju mobilnih genetskih elemenata, genima za sintezu enterotoksina (*se*), kao i enterotoksinima i enterotoksinima sličnim proteini koje stvaraju (**Argudin i**

sar. 2010). Izolati *S. aureus*, koji stvaraju enterotoksine nose različite gene za sintezu enterotoksina (*se* geni) i ponekad mogu da budu nosioci više različitih gena. Geni-*se* se nalaze na različitim mobilnim genetskim elementima, kao što su plazmidi, profagi, *egc* (enterotoxin genetic cluster) klasteri, *S. aureus* ostrvcima patogenosti (SaPIs) hromozomskim kasetama stafilokoka (**Hennekinne i sar. 2010; Schelin i sar. 2011**). Enterotoksin A (SEA), pojedinačno, ili u kombinaciji sa drugim enterotoksinima i enterotoksinima sličnim toksinima je najčešće dokazan enterotoksin u hrani i navodi se kao uzročnik alimentarnih itoksikacija ljudi. Predominantni nalaz enterotoksina A (SEA) u hrani se može objasniti izuzetno visokom otpornošću ovog toksina na proteolitičke enzime (**Balaban i Rasooly, 2000; Bergdoll, 1988; Holmberg i Blake, 1984**).

Naši rezultai su pokazali da je od 85 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka 26 (30,59%) izolata imalo sposobnost da stvara enterotoksine. Primenom skrining metoda VIDAS SET 2 (BioMerieux, Francuska) klasični enterotoksini (SEA-SEE) dokazuju se grupno. Budući da nismo mogli da utvrdimo koje od pet klasičnih enterotoksina stvaraju izolati koagulaza pozitivnih stafilkokoka odlučili smo se da izvršimo identifikaciju gena za sintezu enterotoksina.

U toku našeg istraživanja izolate koagulaza pozitivnih stafilokoka, kod kojih je ELFA tehnikom potvrđena sposobnost sinteze enterotoksina, analizirali smo PCR metodom na prisutvo gena za sintezu klasičnih enterotoksina A, B, C, D i E (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* i *see*). Od 85 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, koje u stvarale enterotoksine 26 (30,59%) izolata je nosilo gene za sintezu enterotoksina A (*sea*), dok je kod 24 izolata utvrđeno istovremeno prisustvo gena za sintezu enterotoksina A (*sea*) i enterotoksina B (*seb*). Naši rezultati se slažu sa rezultatima **Medvedova i sar. (2014)**, koji su dokazali da 32% izolata *S. aureus* iz mleka i proizvoda od mleka nosi *se* gene za sintezu enterotoksina (SEA-AEE). Od 9 izolata, koji su stvarali enterotoksine 5 izolata je nosilo jedan gen (*se*), a 4 izolata dva gena za sintezu enterotoksina. Najveći broj, 4 izolata je nosilo *sea* gen, što se slaže sa našim rezultatima, a 3 izolata su nosila *sea* i *sec* gen i po jedan izolat *see*, ili kombinaciju *sea/see*. Autori nisu dokazali *seb* i *sed* gen.

Naši rezultati se slažu sa podacima iz literature o predominaciji nalaza enterotoksina A (SEA), koji su zabeleženi u različitim zemljama sveta. U Velikoj Britaniji u toku opsežnog praćenja epidemija u periodu od 1969-1990.godine 79% izolata *S. aureus* je

stvaralo enterotoksin A (SEA) (**Wieneke i sar. 1993**). U Francuskoj se enterotoksin A (SEA) navodi kao najčešći uzročnik trovanja (69,7%) u 31 epidemiji zabeleženoj tokom perioda od 1981-2002. godine, a bila su izazvana različitom hranom kao što su mleko, proizvodi od mleka, meso i salate (**Kerouanton i sar. 2007**). Najčešće dokazan gen je bio *sea*, zatim *sed*, *seg*, *sei* i *seh*. U manjem broju su dokazani *seb* i *sec*, dok *see* gen nije uopšte dokazan. Naš nlaaz se slaže sa nalazom **Kerouantona i sar. (2007)** u pogledu nalaza *sea* gena, ali se razlikuje u pogledu nalazu drugih gena, jer našim ispitivanjem nisu dokazani *sec* i *sed* geni.

Našim nalazima govore u prilog i literaturni podaci o epidemijama izazvanim enterotoksinima stafilokoka, nalazu gena za sintezu enterotoksina (*se*). U Austriji je 2007. godine zabeležena epidemija u kojoj je obolelo 40 dece, a bila je izazvana proizvodima od mleka. Izolati *S. aureus* su stvarali enterotoksine SEA i SED, a muzne životinje su predstavljale rezorvoar ovog mikroorganizma (**Schmid i sar. 2009**). U SAD enterotoksin A (SEA) se najčešće dovodi u vezu sa trovanjima hranom (77,8%), a prate ga SED i SEB (**Casman, 1965**). Naši rezultati se u potpunosti slažu sa rezultatima (**Veras i sar. 2008**) koji su kod izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka poreklom iz proizvoda od mleka dokazali *sea* i *seb* gen. Izolati, koji su poticali od pacijenata obolelih u toku epidemija izazvanih hranom 2001-2003. godine u Tajvanu su bili najčešće nosioci *sea* gena, a zatim *seb* i *sec* gena (**Chiang i sar. 2008**). Prema **Cha i sar. (2006)** oko 90% izolata, koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz hrane u slučaju epidemije trovanja, su nosioci *sea* gena. Enterotoksin A (SEA) je enterotoksin, koji je nejčešće izazvao stafilokokna trovanja hranom u Japanu u periodu od 1980-1995. godine (**Shimizu i sar. 2000**). Velika epidemija u Japanu je zabeležena 2000. godine, koja je izazvana pasterizovanim mlekom sa smanjenim sadržajem masti u kojem je dokazan SEA (**Asao i sar. 2003**), dok je je epidemija zabeležena 2009. godine bila izazvana palačinkama u kojima su dokazani SEA i SEC (**Kitamoto i sar. 2009**).

Čest nalaz enetrotoksina A (SEA) se može objaniti uticajem aktivnosti vode. Vrednosti aktivnosti vode (a_w) pri kojim može da se razmnožava *S. aureus* se razlikuju od vrednosti pri kojim može da se stvara enterotoksin. Minimalna vrednost a_w pri kojoj mikroorganizam može da raste je 0,83-0,86, što je ekvivalentno koncentraciji od 20% NaCl. Optimalna vrednost za rast *S. aureus* je $>0,99$. Međutim, stvaranje enterotoksina A i D (SEA i SED) je manje podložno uticaju i moguće pri približno istim vrednostima

aktivnosti vode, koje omogućavaju rast *S. aureus* kada su drugi uslovi optimalni. Nasuprot tome, stvaranje enterotoksina B (SEB) je vrlo osetljivo na snižavanje vrednosti za aktivnosti vode i teško da SEB može da se stvara pri vrednosti od 0,93, uprkos intenzivnom rastu mikroorganizma (**Hennekinne i sar. 2012**). Sličan uticaj a_w ima na stvaranje enterotoksina C (SEC). Pored a_w , nizak pH može da izazove indukciju profaga, koja ima za posledicu povećanje ekspresije *sea* gena (**Schelin i sar. 2011**).

Rezultati **Rola i sar. (2013)** se razlikuju od naših, jer su dokazali prisustvo *sed* gena kod 28 izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka poreklom iz sireva proizvedenih od nekuvanog mleka. Nasuprot našim rezultatima su i rezultati **Bianchi i sar. (2013a)**, koji su kod 255 izolata *S. aureus* poreklom iz mleka i proizvoda od mleka dokazali prisustvo gena za sintezu enterotoksina *ser* (28%), *sed* (25%) i *selj* (25%).

U Irskoj **Hant i sar. (2012)** su dokazali da 83,2% izolata *S. aureus* iz sirovog mleka i proizvoda od mleka ne nosi gene za sintezu enterotoksina (*se*). Od 26 izolata poreklom iz uzoraka od jednog proizvođača je dokazan *sec* i potvrđeno da izolati *S. aureus* imaju sposobnost da stvaraju enterotoksin C (SEC). Naši rezultati se razlikuju od rezultata **Morandi i sar. (2009)**, koji su od 122 izolata poreklom iz različitih proizvoda od mleka u Italiji prisutvo jednog, ili više gena dokazali kod 79 (65%) izolata. Za razliku od nas dokazali su najčešće *sed* gen (40 izolata), *sea* gen i gene *sej*, *sec*, *sel*, *sei* i *seh*, koje mi nismo dokazali. Od naših rezultat se razlikuju i rezultati **Rosengren (2012)**, koja je primenom PCR tehnike kod izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka poreklom iz sireva u Švedskoj najčešće dokazala *sec* gen i to kod 44% (67/152) izolata. Gen *sec* je u ovom istraživanju dokazan pojedinačno i biotip je bio poreklom od ovaca. Za razliku od 26% (40/152) izolata drugog *se*-profila, koji su nosili kombinaciju *sea*, *seg* i *sei*, ili *sea* i *seh* gena bili su biotipa poreklom od ljudi i nespecifičnog domaćina. Kod 29% (40/152) nije dokazano prisustvo *se* gena. Naši rezultati se razlikuju od nalaza **Vicosa i sar. (2013)**, koji su najčešće dokazali *sei* gen kod izolata *S. aureus* poreklom iz sirovog mleka i sireva.

U literaturi ima podataka da su enterotoksini SEB, SEC i SED izazvali alimentarne intoksikacije širom sveta (**Wieneke i sar. 1993; K rouanton i sar. 2007; Veras i sar. 2008**).

Naši rezultati ispitivanja prisustva enterotoksina u 26 uzoraka sireva, iz kojih su izolovane stafilokoke koje stvaraju enterotoksine, primenom ELFA tehnike (Tabela

5.6.1. i 5.6.2.) su pokazali da je enterotoksin stafilokoka dokazan u dva uzorka sira (oznake 263 i 393) proizvedena od nekuvanog mleka u kojima je broj koagulaza pozitivnih stafilokoka bio veći od 5 log cfu/g (Tabela 5.6.1.). Izolati koagulaza pozitivnih stafilokoka (263N i 393N) iz ova dva sira su stvarali enterotoksine i kod njih je dokazano prisustvo gena za sintezu enterotoksina A i B (*sea* i *seb*). Oba izolata su ispitivanjem biohemijkih osobina identifikovana kao *Staphylococcus aureus*. Vrednost pH u oba sira je bila 5,08 i 5,35, a vrednost za aktivnost vode je bila 0,960 i 0,962. Pri ovim vrednostima je moguć rast *S. aureus*, a s obzirom da je temperatura za rast bila optimalna u uslovima dobijanja sira, mikroorganizam je imao dovoljno vremena i povoljne uslove da se umnoži do vrednosti iznad 5 log cfu/g i stvori dovoljnu količinu enterotoksina, koja je detektovana. Sadržaj NaCl u 2 uzorka sira u kojima su dokazani enterotoksini je bio 0,497 i 1,872%. Budući da je *S. aureus* halotolerantan mikroorganizam i može da raste pri sadržaju NaCl od 20%, izmerene vrednosti nisu inhibitorno uticale na rast i razmnožavanje ovog mikroorganizma. Iako je broj *Lactococcus* spp. bio 7,84 i 8,23 log cfu/g u uzorcima sira nije uticao na smanjenje broja *S. aureus*. Broj *Lactobacillus* spp. u uzorku sira sa oznakom 263 je bio 5,32 log cfu/g što je bilo manje u odnosu na broj utvrđen u drugom uzorku (oznaka 393)-6,73 log cfu/g. Manji broj *Lactobacillus* spp. u uzorcima sireva u kojima su dokazani enterotoksini je imao za posledicu sporije odvijanje mlečno-kiselinska fermentacije, a time sporije snižavanje pH vrednosti pri čemu je bilo moguće da se *S. aureus* umnoži iznad 5 log cfu/g. Niska vrednost pH može da izazove indukciju profaga dovodeći do ekspresije *sea* gena (**Schelin i sar. 2011**) što objašnjava učestaliji nalaz *sea* gena i SEA toksina. **Cretenet i sar. (2011)** su dokazali da *Lc. lactis* može pozitivno ili negativno da moduliše ekspresiju *se* gena u matriksu sira. Ekspresija *sea* gena je blago povećana u prisustvu *Lc. lactis*, dok je jaka supresija *sec4* zapažena u matriksu sira u odsustvu *Lc. lactis*. U prisustvu *Lc. lactis* je smanjena regulacija *agr* sistema u vezi sa snižavanjem pH vrednosti.

Nasuprot našim rezultatima su rezultati **Rola i sar. (2013)**, koji su dokazali prisustvo *S. aureus* u 56% uzoraka sireva proizvedenih od sirovog mleka. Iako je broj *S. aureus* bio $\geq 10^5$ log cfu/g, a najveća vrednost $2,6 \times 10^7$ log cfu/g autori nisu dokazali prisustvo enterotoksina ni u jednom uzorku sira. Prisustvo enterotoksina u 33 uzorka sira nisu dokazali ni **Cremonesi i sar. (2007)**. Takođe, **Rosengren (2012)** nije dokazala

enterotoksine (SEA-SEE) u uzorcima sireva proizvedenim od sirovog mleka bez starter kultura u kojima je broj *Staphylococcus aureus* bio 5-6,5 log cfu/g i za koji je dokazano da stvara enterotoksin C (SEC).

Procena rizika od nalaza enterotoksina stafilokoka predstavlja kompleksan proces u kojem pored broja koagulaza pozitivnih stafilokokavažno neophodno poznavanje faktora sredine, minimalnih i maksimalnih vrednosti pri kojima je moguć rast *S. aureus* i stvaranje enterotoksina. U proceni rizika treba ispitati da li *S. aureus* stvara enterotoksine, jer nisu svi izolati nosioci gena za sintezu enterotoksina, vrstu enterotoksina i korelaciju između broja *S. aureus* i stvaranja enterotoksina.

Korelacija između prisutva gena za sintezu enterotoksina (*se*) i sinteze enterotoksina je 70-80%, što se može objasniti nepotpunom ekspresijom gena za sintezu enterotoksina. Na korelaciju utiču faktori sredine kao što su temperatura i aktivnost vode (a_w), prisustvo drugih kompetitivnih mikroorganizama, koji su važni podjednako za rast i stvaranje enterotoksina (**Medvedova i Valik, 2012**).

Budući da su naši rezultati pokazali da je od 26 uzorka mekih sireva u kojima su dokazane koagulaza pozitivne stafilokoke, koje stvaraju enterotoksine 15 (76,92%) uzoraka pripadalo grupi slatko-koagulišućih sireva proizvedenih od nekuvanog mleka i 5 (23,08%) uzoraka grupi slatko-koagulišućih sireva proizvedenih od kuvanog mleka (Tabela 5.4.2), ova vrsta sira može da predstavlja rizik, zbog potencijalne mogućnosti nalaza enterotoksina. Nalaz enterotoksina u dva uzorka slatko-koagulišućeg sira proizvedenog od nekuvanog mleka ukazuje da posebnu opasnost mogu da predstavljaju ovi sirevi u kojima je pH veći od 5,0. Manji rizik predstavljaju kiselo-koagulišući sirevi, jer je od 26 izolata *S. aureus* u 5 (19,23%) izolata poreklom iz sira proizvedenog od nekuvanog mleka i jednom (3,85%) izolatu poreklom iz kiselo-koagulišućeg sira proizvedenog od kuvanog mleka dokazano prisustvo gena za stvaranje enterotoksina.

Naši rezultai su potvrdili neophodnost dokazivanje enterotoksina stafilokoka u sirevima u kojima je dokazan broj koagulaza pozitivnih stafilokoka veći od 10^5 log cfu/g, što je predviđeno našom i evropskom zakonskom regulativom.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ispitivanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Od ukupno 555 uzoraka sireva, koagulaza pozitivne stafilocoke dokazane su u 168 (30,27%) uzoraka sira. Od 168 uzoraka sira koagulaza pozitivne stafilocoke su dokazane u 140 (83,33%) uzoraka sira proizvedenog od nekuvanog mleka i 28 (16,67%) uzoraka sira proizvedenog od kuvanog mleka.
2. Broj koagulaza pozitivnih stafilocoka u 83 uzorka sira kretao se od 1 do 5,90 log cfu/g. Najveći broj koagulaza pozitivnih stafilocoka (5,90 log cfu/g) utvrđen je u uzorku slatko-koagulišućeg sira.
3. Koagulaza pozitivne stafilocoke izolovane iz sira najčešće su stvarale beta hemolizu (50,98%), zatim alfa plus beta hemolizu (22,55%), alfa hemolizu (4,90%), najređe delta hemolizu i delta plus beta hemolizu (2,94%), a hemolizu na krvnom agaru nije stvaralo 15,69% izolata.
5. Koagulaza pozitivne stafilocoke izolovane iz sira, za koje je utvrđeno da stvaraju enterotoksine, na osnovu biohemijskih osobina identifikovane su kao *S. aureus* (61,54%), *S. xylosus* (15,38%), *S. sciuri* (11,54%) i *S. lentus* (11,54%).
6. ELFA tehnikom utvrđeno je da 26 (30,59%) izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka stvaraju klasične enterotoksine (SEA-SEE).
7. Kod svih 26 izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka, izolovanih iz uzorka sira za koje je ELFA tehnikom utvrđeno da stvaraju enterotoksin, dokazan je gen za enterotoksin A (*sea*), a kod 24 izolata je pored *sea* gena dokazan i gen za sintezu enterotoksina B (*seb*). Nijedan izolat nije posedovao gene za sintezu enterotoksina C (*sec*), D (*sed*) i E (*see*).

8. Enterotoksin je dokazan u dva uzorka sira u kojima je broj koagulaza pozitivnih stafilocoka bio iznad 5 log cfu/g .

9. Slatko-koagulišući sirevi proizvedeni od nekuvanog mleka, u kojima je broj koagulaza pozitivnih stafilocoka veći od 5 log cfu/g, mogu da sadrže enterotoksine u količinama koje izazivaju intoksikacije i predstavljaju rizik po zdravlje ljudi.

8. LITERATURA

1. Adesiyun A A, Stoute S and David B. 2007: Pre-processed bovine milk quality in Trinidad: Prevalence and characteristics of bacterial pathogens and occurrence of antimicrobial residues in milk from collection centres. *Food Control*, 18:312-320.
2. Adwan G, Abu-Shanab B, Adwan K. 2005: Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in a raw milk in the north of Palestine. *Turk J Biol*, 29, 229-232.
3. Ahmed AA-H, Moustafa MK, Marth EH. 1983: Growth and survival of *Staphylococcus aureus* in Egyptian Domiati cheese. *Journal of Food Protection*, 46:412-415.
4. Akineden Ö, C. Annemüller, A. A. Hassan, C. Lämmle, W. Wolter, and M. Zschöck. 2001: Toxin Genes and Other Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Cows with Mastitis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 September; 8(5): 959–964.
5. Akineden O, Hassan A, Scheider E, Usleber. 2008: Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated goats' milk cheese. *Int J Food Microbiol*, 124: 211- 216.
6. Akkaya L and Sancak YC. 2007: Growth abilities and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains in herby cheese. *Bulletin of the Veterinary Institute of Pulawy*; 51:401-406.
7. Alemida G, Figueiredo A, Rola Marta, Baross R.M, Gibbs P, Hogg T, Teixeira Paula. 2007: Microbiological characterization of randomly selected Portuguese raw milk cheese with reference to food safety. *J Food Prot*, 70 (7), 1710-1716
8. Angelotti R, Foter MJ and Lewis KH. 1961: Time-temperature effects on salmonellae and staphylococci in foods. *American Journal of Public Health*, 51:76-83.
9. Aoyama K, Takahashi C, Yamauchi Y, Sakai F, Igarashi H, Yanahira S and Konishi H. 2008: Examination of *Staphylococcus aureus* survival and growth during cheese-making process. *Journal of the Hygienic Society of Japan*, 49:116-120.

10. Arbuthnott J, Coleman D, De Azavedo J. 1990: Staphylococcal toxins in human disease. *J Appl Bacteriol Symp. suppl.* 101S-107S.
11. Arcuri Edna Froeder, Fabiola Fonseca Angelo, Marta Fonseca Martins Guimarães, Régine Talon, Maria de Fatima Borges, Sabine Leroy, Gérard Loiseau, Carla Christine Lange, Nélio José de Andrade, Didier Montet. 2010: Toxigenic status of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk and Minas frescal cheese in Brazil. *J Food Prot*, 73(12): 2225-2231.
12. Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR. 2010: Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2(7): 1751–1773.
13. Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H, Kozaki S. 2003: An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol Infect*, 130, 33–40.
14. Asperger H, Zangerl P: *Staphylococcus aureus*. In: Roginski H, Fuquay J, Fox P, editors. *Encyclopedia of Dairy Science*. San Diego: Academic Press, 2003, 2563-2569.
15. Aydin A, Sudagidan M, Muratoglu K. 2011: Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara region of Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, 148: 99–106.
16. Baird-Parker AC: 1990. The staphylococci: an introduction. Pg 1S-8S In: *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement Series 19*. D. Jones, R G Board, and M Sussman, ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
17. Baird-Parker T: *Staphylococcus aureus*. In: Lund B, Baird-Parker T, Gould G, editors. *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000, 1317-1330.
18. Baker-Austin C, Dopson M: Life in acid. 2007: pH homeostasis in acidophiles. *Trends microbiol*, 15: 165-171
19. Balaban N, Rasooly A. 2000: Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol*, 61, 1–10.

20. Bania J, Dubrowska A, Bystron J, Korzekova K, Chtazanowska J, Molenda J. 2006: Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. *Int J of Food Micro*, 10,36-41.
21. Barber MA. 1914: Milk poisoning due to a type of *Staphylococcus albus* occurring in the udder of a healthy cow. *Philipp J Sci* **9**:515–519.
22. Bayles, KW, Iandolo JJ. 2002: Genetic and molecular analysis of gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol*, 1989, 171, 4799–4806.
23. Belay N. and Rasooly A: *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production in an anaerobic environment. *Journal of Food Protection*, 65:199-204.
24. Bennett SD, Walsh KA, Gould LH. 2013: Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*—United States, 1998–2008. *Clinical Infectious Diseases*, 57, 425–433.
25. Bendahou Abdrezzak, Abid Mohammed, Bouteldoun Nadine, Carelejine Dierick, Lebbardi Mariam. 2009: Enterotoxigenic coagulase positive *Staphylococcus* in milk and milk products, Iben and jben, in Northern Morocco. *J Infect developing countries*, 3, 169-176.
26. Bergdoll, M.S. 1988: Monkey feeding test for staphylococcal enterotoxin. *Meth. Enzymol.* 165, 324–333.
27. Bergdoll MS and Lee Wong AC: Staphylococcal intoxications. In: *Foodborne Infections and Intoxications*, Ed: H. P. Reimann and D. O. Cliver, Elsevier, 2006, 523-562.
28. Bergdoll MS. 1979: Staphylococcal intoxications. In *Foodborne Infections and Intoxications*. Reimann H, Bryan FL (Eds), Academic Press Inc, New York, USA, 6.
29. Bergdoll MS. 1989: *Staphylococcus aureus*. In: *Foodborne Bacterial Pathogens* (Doyle, M.P., ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA, pp. 463-523.
30. Betley MJ, Borst DW, Regassa LB. 1992: Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. *Chem Immunol*, 55, 1–35.

31. Betley MJ, Mekalanos JJ. 1985: Staphylococcal enterotoxin A is encoded by a phage. *Science*, 229, 185–187.
32. Beveridge TJ. 2000: The gram-positive cell wall. In: *Gram-positive pathogens*. Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JJ (Eds.) Washington, DC, American Society for Microbiology Press, 3 – 10.
33. Bianchi DM, Gallina S, Bellio A, Chiesa F, Civera T, Decastelli L. 2013a: Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy. *Letters in Applied Microbiology*, 2013, 58, 190-196.
34. Bianchi DM, Gallina S, Macori G, Bassi P, Merlo P, Vencia W, Hennekinne JA, Decastelli L. 2013b: Enterotoxigenic strain of *Staphylococcus aureus* causing food-borne outbreak. *Italian Journal of Food Safety*, 113-116, 2:e32.
35. Bohach GA i Foster TJ: *Staphylococcus aureus* exotoxins. In: *Gram-positive pathogens*. Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ et al.(Eds.), ASM Press, 2000, 367-368.
36. Boynukara B, Gulhan T, Alisarli M, Gurturk K, Solmaz H. 2008: Classical enterotoxinogenic characteristics of *S. aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 209–211.
37. Borelli Beatriz M, Elaine G Ferreira, Inayara CA Lacerda, Deise A Santos, Luiz S Carmo, Ricardo S Dias, Maria Crisolita C Silva, Carlos A Rosa. 2006: Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37:545-550.
38. Bremer P, Fletcher G, Osborne C: *Staphylococcus aureus*. Christchurch: New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited, 2004, 6.
39. Brisabois A, Lafarge V, Brouillaud A, de Buyser ML, Collette C, Garin-Bastuji B. and Thorel MF. 1997: Pathogenic organisms in milk and milk products: the situation in France and in Europe. *Reviews Science. & Technology*, 16: 452-71.
40. Brooks JC, Martinez B, Stratton J, Bianchini A, Krokstrom R, Hudkins R. 2012: Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. *Food Microbiology*, 31, 154-158.

41. Bryan FL, Guzewich JJ, Todd ECD. 1997: Surveillance of foodborne disease II. Summary and presentation of descriptive data and epidemiologic patterns; their value and limitations. *J. Food Prot*, 160, 567–578.
42. Carić Marija, Milanović Spasenija, Vucelja Dragica: Standardne metode analize mleka i mlečnih proizvoda. Prometej, Novi Sad, 2000, 137-138.
43. Carlton L Gyles, John F Prescott, J Glenn Songer, Charles O Thoen, Hermans K, Devriese LA, Haesebrouck F. 1976: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Chapter 4. *Staphylococcus*. Third Edition, 2008, Wiley-Blackwell.
44. Carpenter DF and Silverman GJ: Synthesis of staphylococcal enterotoxin A and nuclease under controlled fermentor conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 31:243-248.
45. Casman EP. 1965: Staphylococcal enterotoxin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 128, 124–131.
46. Cebrián G, Sagarzazu N, Pagán R, Condón S and Mañas P, 2010: Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*; 140:26-33.
47. Cenci-Goga BT, Karama M, Rossitto PV, Morgante RA, Cullor JS: Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *J Food Prot*, 2003, 66 (9), 1693-1696.
48. Cha JO, Lee JK, Jung YH, Yoo JI, Park YK, Kim BS, Lee YS. 2006: Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *J Appl Microbiol*, 101, 864–871.
49. Charlier C, Cretenet M, Even S, LeLoir Y. 2009: Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *Int J Food Microbiol*, 131: 30-39.
50. Cheung AL, Koomey JM, Butler CA. 1992: Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 6462–6466.
51. Chiang YC, Liao WW, Fan CM, Pai WY, Chiou CS, Tsen HY. 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.
52. Cifrian, E, Guidry A.J, Bramley AJ, Norcross NL, Bastida Corcuera FD, Marquardt WW. 1996: Effect of staphylococcal beta toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol*, 48:187–198.
 53. Cremonesi P, Perez G, Pisoni G, Moroni P, Morandi S, Luyyana M, Brasca M. 2007: Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 45, (6), 586-591.
 54. Cretenet Marina, Even Sergine, Le Loir Yves. 2011: Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Sci. & Technol.* 91:127–150, DOI 10.1007/s13594-011-0014-9.
 55. Cretenet M, Nouaille S, Thouin J, Rault L, Francois P, Hennekine JA, Piot M, Maillard MB, Fauquant J, Loubiere P, Loir YL, Even S. 2011: *Staphylococcus aureus* virulence and metabolism are dramatically affected by *Lactococcus lactis* in cheese matrix. *Environ Microbiol Rep*, 3 (3), 340-351.
 56. Czop JK, Bergdoll MS 1974: Staphylococcal enterotoxin synthesis during the exponential, transitional, and stationary growth phases. *Infect Immun*, 9, 229–235.
 57. D'Amico DJ, Groves E, Donnelly CW. 2008: Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *J Food Prot*, 71 (8), 1580-1589.
 58. De Buyser M L, Dufour B, Maire M, Lafarge V. 2001: Implication of milk and milk products in foodborne diseases in France and in different industrialised countries, *Int. J. Food Microbiol.*, 67, 1-17.
 59. De Reu K, Grijspeerdt K, Herman L. 2004: A Belgian survey of hygiene indicator bacteria and pathogenic bacteria in raw milk and direct marketing of raw milk farm products. *Journal of Food Safety* 24, 17-36.
 60. Derzelle S, Dilasser F, Duquenne M, Deperrois V. 2009: Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. *Food Microbiol*, 26, 896–904.

61. Delbes C, Alomar J, Chougui N, Martin JF, Montel MC. 2006: *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows raw milk. J Food Prot, 69 (9), 2161-2167.
62. Deurenberg R, Nieuwenhuis R, Driessen C et al. 2005: The prevalence of the *Staphylococcus aureus* *tst* gene among community- and hospital-acquired strains and isolates from Wegener's Granulomatosis patients. FEMS microbiol. lett. 245: 185-189.
63. Devriese LA. 1990: Staphylococci in healthy and diseased animals. J. Appl. Bact. Symposium Supplement, 71S–80S.
64. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. 2000: Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev. 13:16–34.
65. Do Carmo LS, Cummings C, Linardi VR, Dias RS, De Souza JM, De Sena MJ, Dos Santos DA, Shupp JW, Pereira RK, Jett M. 2004: A case of a massive staphylococcal food poisoning incident. Foodborne Pathog Dis, 1(4), 241-246
66. Dudříková E, Pořáková L, Pukáčová J. 2010: Health and hygienic conditions of ewes' milk processeing from the aspect of food safety. Potravinarstvo, 4: 14-18.
67. El-Sharoud WM, Spano G. 2008: Diversity and eneterotoxigenicity of *Staphylococcus* spp. associated with domiaty cheese. J Food Prot, 71 (12), 2567-2571.
68. Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Kum E. 2010: Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. Int J Food microbiol, 142: 74-77.
69. Euzéby JP. 2012: List of procaryotic names with standing in nomenclature: - Genus *Staphylococcus*. <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>.
70. Evenson ML, Ward Hinds M, Bernstein RS and Bergdoll MS. 1988: Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. Int J Food Microbiol, 7, 311–316.
71. Farrell GM and Upton ME. 1978: The effect of low temperature on the growth and survival of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* when inoculated onto bacon. Journal of Food Technology, 13:15-23.

72. Farrell AM, Taylor D, Holland KT. 1995: Cloning, nucleotide sequence determination and expression of the *Staphylococcus aureus* hyaluronate lyase gene. FEMS Microbiol Lett, 130 : 81 – 85.
73. Ferrari P, Tiberti D, Rossi MV, Vencia W, Costa A, Magliola R, Demicheli V, Biorci F. 2011: [Il sistema di sorveglianza dei focolai epidemici di malattie trasmesse da alimenti della regione Piemonte. Rapporto 2010 Centro M.T.A]. [Book in Italian]. Regione Piemonte ed., Torino, Italy
74. Fitzgerald JR, Monday SR, Foster TJ, Bohach GA, Hartigan PJ, Meaney WJ, Smyth CJ. 2001: Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. J Bacteriol, 183:63–70.
75. Fooladi Imani AA., Tavakoli HR, Naderi A. 2010: Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in domestic dairy products. Iranian Journal of Microbiology, 2 (3), 135-140.
76. Freney J, Kloos WE, Hajek V and JA. 1999: Webster, for the Subcommittee on the taxonomy of staphylococci and streptococci of the International Committee on Systematic Bacteriology, with the help of M. Bes' Y Brunl and Vernozy-Rozand C: Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. International Journal of Systematic Bacteriology, 49, 489-502.
77. Garzoni C, Kelley W. 2009: *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. Trends Microbiol, 17: 59-65.
78. Genigeorgis C, Foda MS, Mantis A and Sadler WW. 1971: Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production. Applied and Environmental Microbiology, 21:862-866.
79. Genigeorgis CA. 1989: Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. Int J Food Microbiol 9: 327–360.
80. Giezendanner N, Meyer B, Gort M, Muller P. et Zweifel C. 2009: [Raw milk-associated *Staphylococcus aureus* intoxication in children]. Schweiz Arch Tierheilkd 151 (7), 329-31.
81. Gillaspay AF, Lee CY, Sau S, Cheung AL, and Smeltzer MS. 1998: Factors affecting the collagen binding capacity of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun, 66: 3170 – 3178 .

82. Grov A. 1973: Studies on the interaction between staphylococcal protein A and the Fc region of immunoglobulin G . Acta Pathol Microbiol Scand, Suppl. 236 : 77 – 83 .
83. Haeghebaert S, Le Querrec F, Gallay A, Bouvet P, Gomez M. and Vaillant V. 2002: Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000. *Bull. Epidémiol. Hebdo.* 23: 105-109.
84. Halpin-Dohnalek M, Marth E. 1989: *Staphylococcus aureus*: Production of extracellular compounds and behaviour in foods - a review. *J Food Prot*, 52: 267-282.
85. Hassani S, Doust HR, Mobarez AM. 2014: Enterotoxin A gene barrier *Staphylococcus aureus* within traditionally dairy products of Tehran. *Int J Enteric Pathog*, 2(4):e2096.
86. Hennekinne, JA, Ostyn Florence Guillier, Sabine Herbin, Anne-Laure Pruffer, Sylviane Dragacci. 2010: How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? *Toxins*, 2, 2106-2016.
87. Hennekinne JA, De Buyser Marie-Laure, Dragacci Sylviane. 2012: *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev*, 36, 815–836.
88. Hermans K, Devriese LA and Haesebrouck F: *Staphylococcus*. In: Gyles CL, John F, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO editors. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals Fourth Edition*, Blackwell Publishing ISBN-13: 978-0-8138-1237-3/2010 Ames, Iowa, USA, 2010, 75-89.
89. Holečková Beáta, Holoda E, Fotta M, Kalináčová Viera, Gondol J, Grolmus. 2002: Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. *Ann Agric Environ Med.* 2002; 9:179–182.
90. Holmberg SD, Blake PA. 1984: Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. *JAMA*, 251, 487–489.
91. Howard P. 2006: Mastitis pathogens present in bulk tank milk from seven dairy herds in the Waikato region, New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 54, 41-43,
92. Hunt Karen, Jenny Schelin, Peter Rådström, Francis Butler, Kieran Jordan. 2012: Classical enterotoxins of coagulase-positive *Staphylococcus aureus*

- isolates from raw milk and products for raw milk cheese production in Ireland. *Dairy Sci and Technol*, 92,5, 487-499.
93. Ikeda T, Naoto T, Yamaguchi K, Makino S. 2005: Mass Outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5, 2793-2795.
 94. Ikeda T., Morimoto Y., Makino S., Yamaguchi K. 2006: Surveillance of *Staphylococcus aureus* in cheese produced in Hokkaido. *J Food Prot*, 69 (3), 516-519.
 95. International Commission on Microbiological Specifications for Foods: *Staphylococcus aureus*. In: *Microorganisms in foods: Microbiological specifications of food pathogens*, Ed: T. A. Roberts, A. C. Baird-Parker and R. B. Tompkin, 299-333. Blackie Academic, 1996, London.
 96. ISO 8261:2001. Milk and milk products — General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination.
 97. Jablonski LM & Bohach G: *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (Eds.), *Food microbiology fundamentals and frontiers* 2nd ed, Washington, DC, USA: ASM Press, 1997, 353–357.
 98. Jablonski L, Bohach GA: *Staphylococcus aureus*. In *Food microbiology fundamentals and frontiers*, Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (Eds): American society of Microbiology Press: Washington, DC, USA, 2001, 411–434.
 99. Jakobsen RA, Heggebo R, Sunde EB, Skjervheim M. 2011: *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. *Food Microbiology*, 28(3), 492-6.
 100. Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougél C, Etienne J, Vandenesch F, Bonneville M, Lina G. 2001: egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*, 166: 669–677.
 101. Jay J. 2000: Staphylococcal gastroenteritis. In: Jay J, editor. *Modern Food Microbiology*. Gaithersburg, Aspen Publishers, 441-459.

102. Jayarao BM, Pillai SR, Sawant AA, Wolfgang DR, Hegde NV. 2004: Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. *Journal of Dairy Science* 87, 3561-3573.
103. Jørgensen HJ, Mørk LM, Rørvik LM. 2005a: The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm of small-scale production of raw milk cheese. *J Dairy Sci* 88 (11), 3810-3817.
104. Jørgensen HJ, Mathisen T, Løvseth A, Omoe K, Qvale KS, Lonarevic S. 2005b: An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiol Lett*, 15, 252(2):267-72.
105. Kérouanton A, Hennekinne JA, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A, De Buyser ML.: Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiol*, 2007,115, 369–375.
106. Kitamoto M, Kito K, Niimi Y, Shoda S, Takamura A, Hiramatsu T, Akashi T, Yokoi Y, Hirano H, Hosokawa M, Yamamoto A, Agata N, Hamajima N. 2009: Food poisoning by *Staphylococcus aureus* at a university festival. *Jpn. J. Infect. Dis*, 62, 242–243.
107. Kloos WE and Schleifer KH. 1986: Genus IV. *Staphylococcus*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (Eds.). Baltimore:Williams and Wilkins, Vo 2, 1013-1035.
108. Kluytmans, JAJW, Wertheim HFL. 2005: Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. *Infection*, 33, 3–8.
109. Kornblum J, Kreiswirth B, Projan SJ, Ross H and Novick RP. 1990: Agr : a polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*. In *Molecular Biology of the Staphylococci*. Novick, R.P. (ed.). New York: VCH Publishers, pp. 373–402.
110. Korpysa-Dzirba Weronika and Osek Jacek. 2011: Identification of genes encoding classical staphylococcal enterotoxins in *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. *Bull Vet Inst Pulawy*, 55-58.
111. Kousta M, Mataragas M, Skandamis P, Drosinos HE. 2010: Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*, 21: 805-815.

112. Larkin EA, Carman RJ, Krakauer T, Stiles BG: *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. *Curr Med Chem*, 2009, 16, 4003–4019.
113. Lawrinowitz-Paciorek M, Kochman M, Piekarska K, Grochowska A, Windyga B. 2007: The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 319-323.
114. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. 2003: *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2, 7–28
115. Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P. 2003: Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 95, 38–43.
116. Lindblad M, Karnehed N, Lindqvist R, Hjertqvist M. 2010: Rapporterade misstänkta matförgiftningar 2009: National Food Agency. www.slv.se.
117. Lindblad M, Westöö A, Lindqvist R, Hjertqvist M, Andersson Y. 2008: Rapporterade misstänkta matförgiftningar 2007: www.slv.se.
118. Lindblad M, Westöö A, Lindqvist R, Hjertqvist M, Andersson Y. 2009: Matförgiftningar i Sverige - analys av rapporterade matförgiftningar 2003-2007 (Foodborne disease in Sweden - analysis of reported incidents in 2003-2007). Uppsala: National Food Administration. www.slv.se.
119. Lindqvist, R., A. Westöö, M. Hjertqvist and Y. Andersson. 2004: Rapporterad misstänkta matförgiftningar 2003. www.slv.se.
120. Lindqvist R, Westöö A, Hjertqvist M. and Andersson Y. 2005: Rapporterade misstänkta matförgiftningar 2004. www.slv.se.
121. Lindqvist R, Westöö A, Hjertqvist M, Andersson Y. [Reported suspected food poisonings 2005]. 12 oktober 2006 {In Swedish}. Available from: http://www.slv.se/upload/dokument/rapporter/matforgiftning_mathantering/200_Rapporterade_Matforgiftningar_2005.pdf.
122. Little CL, Rhoades JR, Sagoo SK, Harris J, Greenwood M, Mithani V, et al. 2008: Microbial quality of retail cheese made from raw, thermised or pasteurized milk in UK. *Food Microbiology*, 25, 304–312.

123. Mamo W, Froman G, Wadstrom T. 1988: Interaction of sub-epithelial connective tissue components with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *Vet Microbio*, 18 : 163 – 176 .
124. Mc Gavin MJ, Zahradka C, Rice K., Scott JE. 1997: Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease. *Infect Immun*, 65 : 2621 – 2628.
125. Medvedova Alžibeta, Valik L, Studeničová A. 2009: The effect of temperature and water activity on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Czech Journal of Food Science*, Special Issue 2: S2-28-S2-35.
126. Medvedova A, Studenicova A, Valik L, Horvathova Z. 2014: Prevalence and growth dynamics of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in Slovakian dairy products. *Czech J Food Sci*, Vol 32, No 4, 337-341.
127. Medvedova A, Valik L. 2012: *Staphylococcus aureus*: Characterization and quantitative growth description in milk and artisanal raw milk production. Chapter 4, Licensee InTech <http://dx.doi.org/10.5772/48175>
128. Montville TJ, Matthews KR. 2008: *Food microbiology*: 2nd ed, ASM Press, Washington D.C.
129. Meyrand A, Boutrand-Loei S, Ray-Gueniot S, Mazuy C, Gaspard C E, Jaubert G, Perrin G, Lapeyre C and Vernozy-Rozand C. 1998: Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. *Journal of Applied Microbiology*, 85:537-544.
130. Moraes Mendonca Paula, Vicoso Gabriela Nogueira, Yamazi KA, Ortolani Tassinari Maria Beatriz, Nero AL. 2009: Food borne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6 (2), 245-249.
131. 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. *Veter Microbiol*. 124:66–72.
132. Murray RJ. 2005: Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Internal Medicine Journal*, 35, supplement 2, S106–S119.

133. Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, Decastelli V, Mioni R, Scuota S, Bolzoni G, Di Giannatale E, Salinetti AP, La Salandra G, Bartoli M, Zuccon F, Pirino T, Sias S, Parisi A, Quaglia NC, Celano GV. 2005: Coagulase positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Int J of Food Micro*, 98, 73-79.
134. Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A, Santagada G, Firinu A, Crisetti E, Celano GV. 2007: Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 115:290–296.
135. Notermans S, Heuvelman CJ. 1983: Combined effect of water activity, pH and sub-optimal temperature on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. *J Food Sci*, 48:1832-1840.
136. Novick RP, Schlievert P, Ruzin A. 2001: Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes Infect*, 3: 585–594.
137. O'Brien M, Hunt K, McSweeney S, & Jordan K. 2009: Occurrence of foodborne pathogens in Iris farmhouse cheese. *Food Microbiology*, 26, 910-914.
138. Oh SK, Lee N, Cho YS, Shin DB, Choi SY, Koo M. 2007: Occurrence of toxigenic *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat food in Korea. *J Food Prot*, 7(5), 1153-1158.
139. Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K. 2003: Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect Immun*, 71, 6088–6094.
140. Omoe K, Imanishi K, Hu DL, Kato H, Fugane Y, Abe Y, Hamaoka S, Watanabe Y, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K. 2005: Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. *Infect. Immun*, 73, 5540–5546.
141. Ono HK, Omoe K, Imanishi K, Iwakabe Y, Hu DL, Kato H, Saito N, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K. 2008: Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins types S and T. *Infect Immun*, 76, 4999–5005.
142. Orwin PM, Leung DY, Donahue HL, Novick RP, Schlievert PM. 2001: Biochemical and Biological Properties of Staphylococcal Enterotoxin K. *Infect Immun*, 69, 360–366.

143. Orwin PM, Leung DYM, Tripp TJ, Bohach GA, Earhart CA, Ohlendorf DH, Schlievert PM. 2002: Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. *Biochemistry*, 41, 14033–14040.
144. Ostyn A, De Buyser ML, Guillier F, Groult J, Felix B, Salah S, Delmas G, Hennekinne JA. 2009: First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, *Euro Surveill* 15:1–4.
145. Ote I, Taminau B, Duprez JN, Dizier I, Mainil JG. 2011: Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates with bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 153: 285-292.
146. Otero A, García ML, García MC, Moreno B, Bergdoll MS. 1990: Production of staphylococcal enterotoxins C1 and C2 and thermonuclease throughout the growth cycle. *Appl Environ Microbiol*, 56, 555–559.
147. Park JK, Lim JH, Seo YD, Kim NY, Lim DY, Yoon SJ, Choi JS, Koh HB. 2000: Studies on the enterotoxin-production and coagulase serotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from cows in Chonnam province. *Korean J Vet Serv*, 23(4), 313-320.
148. Paullin Susan, Beverley Horn, John Andrew Hudson. 2012: Factors influencing staphylococcal enterotoxin production in Dairy Products. Prepared for the Ministry of Agriculture and Forestry under project MFS/10/10, Client report no. FW 11034.
149. Peles F, Wagner M, Varga L, Hein I, Rieck P, Gutser K, Kereszturi P, Kardos G, Turcsanyi I, Beri B, Szabo A. 2007: Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *Int J of Food Micro*, 118, 186-193.
150. Pelisser M, Klein C, Ascoli KR, Zotti TR, Arisi ACM. 2008: Occurrence of *S. aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40: 145–148.
151. Pereira V, Lopes C, Castro J, Silva J, Gibbs PM, Teixeira P. 2009: Characterization for enterotoxin production, virulence factors and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiology*, 26, 278-282.

152. Poli A, Guglielmini E, Sembeni S, Spiazzi M, Dellaglio F, Rossi F, Torriani S. 2007: Detection of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin genotype diversity in Monte-Veronese, a protected designation of origin Italian cheese. Letters in Appl Micro, 45, 529-534.
153. Post D. 1999: *S. aureus*. Food-borne pathogens. Basingstoke, Oxoid, 6 p.
154. Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa. Službeni glasnik RS 72/10.
155. Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura. Službeni glasnik RS 33/10.
156. Pravilnik o izmenama i dopuni pravilnika o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura. Službeni glasnik RS 34/14.
157. Pedonese Francesca, D'ascenzi C, Torracca Beatrice, Zingoni Clizia, Turchi Barbara, Fratini F, Rnuvaloni Roberta. 2014: *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in Italian caciotta cheese. Turk J Vet Anim Sci (2014) 38: 318-324. doi:10.3906/vet-1307-2.
158. Projan SJ and Novick RP. 1997: The molecular basis of pathogenicity. In The staphylococci in human disease . Crossley KB and Archer GL (eds.). New York, Churchill Livingstone Inc, 55 – 81.
159. Qi Y and Miller KJ. 2000: Effect of low water activity on staphylococcal enterotoxin A and B biosynthesis. Journal of Food Protection, 63:473-478.
160. Radovanovic SR and Katic V. 2009: Influence of lactic acid bacteria isolates on *Staphylococcus aureus* growth in skimmed milk. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 15:196-203.
161. Radovanovic SR: Identifikacija mehanizama koji utiču na destrukciju zajednice *Staphylococcus aureus* u sirevima. Magistrska teza. Veterinarski fakultet, 2000, Beograd.
162. Raj HD and Bergdoll MS. 1969: Effect of enterotoxin B on human volunteers. J Bacteriol, 98, 833–834.
163. Rajić SN: Fenotipske i genotipske karakteristike koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz vimena krava. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, 2013, Beograd.

164. Rall VL, Vieira FP, Rall R, Vieitis RL, Fernandes JrA, Candeias JMG, Cardoso KFG, Araujo JrJP. 2008: PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Veterinary Microbiology*, 132, 408-413.
165. Rola JG, Korpysa-Dzirba W, Osek J. 2013: Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins at different stages of production of raw milk cheeses - preliminary results. *Bull Vet Inst Pulawy*, 57, 341-345.
166. Rosengren A, Fabricius A, Guss B, Sylvén, S, Lindqvist R. 2010: Occurrence of food-borne pathogens and characterizations of *Staphylococcus aureus* in cheese produced in farm-dairies. *Int J Food Microbiol*, 144: 263-269.
167. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. 2011: Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1):7–11.
168. Schelin J, Crlquist-Wailin N, Cohn Thorup M, Lindquist R, Barker CG, Radstrom P. 2001: The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, 2(6), 580-592.
169. Schleifer KH and Kandler O. 1972: Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36:407–477.
170. Schmid D, Gschiel E, Mann M, Huhulescu S, Ruppitsch W, Boehm G, Pichler J, Lederer I, Hoeger G, Heuberger S, Allerberger F. 2007: Outbreak of acute gastroenteritis in an Austrian boarding school, September 2006. *Eurosurveillance*, 12(3):5.
171. Schmid D, Fretz R, Winter P, Mann M, Höger G, Stöger A, Ruppitsch W, Ladstätter J, Mayer N, de Martin A, Allerberger F. 2009: Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. *Wien. Klin. Wochenschr.* 121, 125–131.
172. Schmitt M, Schuler-Schmid U. and Schmidt-Lorenz W. 1990: Temperature limits of growth, TNase, and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Int. J. Food Microbiol.* 11: 1-19
173. Schmitz FJ, Veldkamp KE, Van Kessel KPM, Verhoef J, Van Strijp JAG. 1997: Delta-toxin from *Staphylococcus aureus* a costimulator of human neutrophil oxidative burst. *J Infect Dis*, 176:1531 – 1537.

174. Shafer WM & Iandolo JJ. 1978: Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. *Infect Immun*, 20: 273–278.
175. Shalita Z, Hertman, Sarid S. 1977: Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 129: 317–325.
176. Shimizu A, Fujita M, Igarashi H, Takagi M, Nagase N, Sasaki A, Kawano J. 2000: Characterization of *Staphylococcus aureus* coagulase type VII isolates from staphylococcal food poisoning outbreaks (1980–1995) in Tokyo, Japan, by pulsed field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3746–3749.
177. Smith JL, Buchanan RL, Palumbo SA. 1983: Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: A review. *Journal of Food Prot*, 46:545-555.
178. Soell M, Diab M, Haan-Archipoff G, Beretz A, Herbelin C, Poutrel B, and Klein JP. 1995: Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. *Infect. Immun.* 63: 1380–1386.
179. Soriano JM, Font G, Rico H, Molto JC, Manes J. 2002: Incidence of enterotoxigenic staphylococci and their toxins in food. *J of Food Prot*, 65 (5), 857-860.
180. Soell M, Diab M., Haan AG, Beretz A, Herbelin C, Poutrel B, Klein JP. 1995: Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines . *Infect. Immun*, 63 : 1380 – 1386.
181. Sospedra I, Rubert VJ, Soler C, Soriano MJ, Manes J. 2009: Microbial contamination of milk and dairy products from restaurants in Spain. *Foodborne Pathogens and disease*, 6 (10), 1269-1272.
182. SRPS EN ISO 6888-2, Mikrobiologija hrane i hrane za životinje-Horizontalnom metodom za određivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste)-Deo 1: Tehnika upotrebom agara po Baird-Parkeru.
183. Stephan R, Buehler K, Lutz C. 2002: Prevalence of genes encoding enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus*

- strains isolated from bulk-tank milk samples in Switzerland. *Milchwissenschaft* 57, 502–504.
184. Tatini SR. 1973: Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. *Journal of Milk and Food Technology*, 36:559-563.
 185. Tatini SR. 1976: Thermal stability of enterotoxins in food. *J of Milk Technology*, 39,432-438
 186. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Foodborne Outbreaks in 2009. *EFSA J*, 2011, 9: 378.
 187. Thomas DV, Jarraud S, Lemerrier B, Cozon G, Echasserieau K, Etienne J, Gougeon MI, Lina G. and Vandensch F. 2006: Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infect. Immun.* 74: 4724-4734.
 188. Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G. 2007: Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chem Immunol Allergy*, 93, 24–41.
 189. Tkacikova L, Tesfaye A, Mykula I. 2003: Detection of the genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxin by PCR. *Acta Vet Brunensis.* 72:627–630.
 190. Tremaine MT, Brockman DK, Betley MJ. 1993: Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). *Infect Immun*, 61: 356–359.
 191. Uchiyama T, Imanishi K, Miyoshi-Akiyama T, Kato H. 2006: Staphylococcal superantigens and the diseases they cause. In *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, 3rd ed, Alouf JE, Popoff MR, Eds. Academic Press, Burlington, VT, USA, 830–843.
 192. Urachimeg T, Giovanni N, Marit P, Karel K. 2007: Occurrence of enterotoxic *Staphylococcus aureus* in raw milk from Yaks and Cattle in Mongolia, *J of Food Prot*, 70(7), 1726-1729.
 193. Valero A, Rodriguez-Perez F, Carrasco E, Alventosa-Fuentes JM, Gimeno-Garcia RM, Zurera G. 2009: Modelling the growth boundaries of

- Staphylococcus aureus* effect of temperature, pH and water activity. Int J of Food Micro, 133, 186-194.
194. Varaldo PE, Kilpper-Balz R, Biavasco F, Satta G, Schleifer KH. 1988: *Staphylococcus delphini* sp. nov. a Coagulase-Positive Species Isolated from Dolphins Int J of Systemic Bacteriology, 38, 436-439.
 195. Veras JF, do Carmo LS, Tong LC, Shupp JW, Cummings C. Dos Santos DA, Cerqueira MM, Cantini A, Nicoli JR, Jett M. 2008: A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. Int. J. Infect. Dis. 12, 410–415.
 196. Vicoso NG, Le Loir A, Le Loir Y, de Cavalho AF, Nero LA. 2013: egc characterisation of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates obtained from raw milk and cheese. International Journal of Food Microbiology, 165, 227-230.
 197. Vojtov N, Ross HF, Novick RP. 2002: Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. P Natl Acad Sci USA, 99: 10102–10107.
 198. Wieneke AA, Roberts D, Gilbert RJ: Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969–90. Epidemiol Infect, 1993, 110, 519–531.
 199. Yang SE, Yu RC and Chou CC. 2001: Influence of holding temperature on the growth and survival of *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* and the production of staphylococcal toxin in egg products. International Journal of Food Microbiology, 63:99-107.
 200. Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, Orwin PM, Kapur V, Schlievert PM. 2002: Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. Biol Chem, 277, 13138–13147.
 201. Zhang S, Iandolo JJ, Stewart GC. 1998: The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). FEMS Microbiol Lett, 168: 227–233.
 202. Zhang S, Maddox CW. 2000: Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. Infect Immun, 68(3), 1102-1108.

203. Zigo F, Vasil' M, Kadáši M, Elečko J, Earkašova Z. 2011: Bacteria *Staphylococcus* spp. isolated from from mastitis of sheep and their enterotoxigenic properties. *Potravinarstvo*, 5: 70-72.
204. Zocche F, Bastos CP, da Silva WP. 2010: Detection of genes of *egc* cluster in *Staphylococcus aureus* isoalated from foods of animala origin. *Ciencia rural*, Santa Maria, 40 (5), 1134-1140.

9. PRILOZI

Prilog 1. Broj uzoraka sireva uzorkovanih na pijacama u toku ispitivanja

Redni broj	Pijaca	Broj sireva		Ukupno
		Od kuvanog mleka	Od nekuvanog mleka	
1	Novi Beograd-blok 44	31	39	70
2	Banjica	27	34	61
3	Zemun	9	38	47
4	Kalenić	6	26	32
5	Zeleni venac	12	22	34
6	Skadarlija	9	27	36
7	Cvetko	27	18	45
8	Banovo brdo	10	26	36
9	Novi Beograd-Merkator	4	4	8
10	Lazarevac	21	-	21
11	Palilula	11	14	25
12	Guča	16	-	16
13	Vidikovac	16	13	29
14	Bele vode	8	7	15
15	Železnik	14	6	20
16	Sremčica	17	6	23
17	Đeram	15	22	37
	Ukupno	253	302	555

Prilog 2. Broj i vrsta uzoraka sireva koji su korišćeni za ispitivanja na osnovu dokazanog prisustva koagulaza pozitivnih stafilokoka

Vrsta sira	Od kuvanog mleka		Od nekuvanog mleka		Ukupno
	Bez zrenja	Sa zrenjem	Bez zrenja	Sa zrenjem	
Kiselo-koagulišući	2	-	36	1	39
Slatko-koagulišući	24	2	98	5	129
Ukupno	26	2	134	6	168

Prilog 3. Rezultati određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilocoka i hemijskih parametara (pH, sadržaj masti u suvoj materiji, sadržaj vode i vode u bezmasnoj materiji)u slatko-koagulišućim sirevima proizvedenim od nekuvanog mleka

Redni broj	Oznaka uzorka	Poreklo (mesto)	Starost sira	Broj koagulaza pozitivnih stafilocoka (log cfu/g)	pH	Mast u SM (%)	Voda u bezmasnoj materiji (%)
1.	5a/n	Ub	12 h	1,00	5,27	50,98	76,89
2.	9b/n	Ub	12 h	2,30	5,77	75,47	86,07
3.	21/n	Ub	2-3 dana	2,84	5,96	36,43	72,77
4.	23/n	Sopot-Kosmaj	7 dana	5,57	4,77	72,08	78,95
5.	25/n	Selevac-Smed.Palanka	2 dana	3,00	5,37	59,38	85,49
6.	26/n	Brankovina-Valjevo	3 dana	4,56	5,80	40,60	67,89
7.	34/n	Kosmaj	7 dana	3,04	4,77	43,45	75,21
8.	36/n	Sjenica	30 dana	4,12	4,82	63,23	73,87
9.	11c/n	Veliki Mokri lug	12h	3,00	5,32	52,48	74,30
10.	12d/n	Zuce	4h	3,52	6,65	49,88	82,27
11.	13d/n	Zuce	1-2 dana	5,77	4,79	57,32	76,88
12.	13e/n	Zuce	4 dana	5,90	4,76	57,06	82,34
13.	17f/n	Ub	1 dan	1,00	5,97	66,57	83,70
14.	37/n	Banja Trepča-Čačak	15 dana	1,00	5,50	59,61	74,94
15.	38/n	Užice	7 dana	5,29	5,83	25,29	77,76
16.	40/n	Valjevo	5 dana	5,17	5,15	57,04	81,17

Redni broj	Oznaka uzorka	Poreklo (mesto)	Starost sira	Broj koagulaza pozitivnih stafilocoka (log cfu/g)	pH	Mast u SM (%)	Voda u bezmasnoj materiji (%)
17.	41/n	Trlič-Ub	7 dana	2,90	5,11	54,92	75,48
18.	42/n	Trlič-Ub	1 dan	4,34	5,58	46,74	71,51
19.	44/n	Trlič-Ub	1 dan	3,93	5,18	62,83	80,28
20.	45/n	Trlič-Ub	4-5 dana	4,81	5,69	63,99	80,74
21.	46/n	Ub	12 h	5,32	5,46	46,35	72,85
22.	51/n	Orašac-Obrenovac	7 dana	5,19	4,91	52,26	72,60
23.	52/n	Orašac-Obrenovac	3 dana	3,84	6,15	63,98	78,1s1
24.	55/n	Ranilović-Arandelovac	15 dana	3,00	5,12	63,57	75,44
25.	58/n	Pričević-Valjevo	1-2 dana	4,48	6,52	43,09	78,50
26.	59/n	Pričević-Valjevo	3 dana	3,90	6,25	57,77	79,38
27.	62/n	Jagnjilo-Mladenovac	12h	5,66	6,03	62,89	84,32
28.	64/n	Banjani-Ub	1 dan	2,48	5,83	54,52	77,82
29.	65/n	Banjani-Ub	3 dana	3,00	5,73	66,45	81,33
30.	66/n	Banjani-Ub	7 dana	2,00	4,78	76,84	84,44
31.	73/n	Ovča	1 dan	1,00	6,30	30,03	74,12
32.	75/n	Vranić-Barajevo	1 dan	5,68	6,10	63,17	74,36
33.	76/n	Krnješevci-Stara Pazova	1 dan	2,30	5,89	76,68	84,95
34.	84/n	Stubline-Ub	7 dana	5,67	4,95	57,32	81,39
35.	85/n	Čedovo-Sjenica	do 1m.	3,18	4,79	74,05	83,51
36.	88/n	Trlič-Ub	1-2 dana	2,00	5,42	64,65	82,74

Redni broj	Oznaka uzorka	Poreklo (mesto)	Starost sira	Broj koagulaza pozitivnih stafilokoka (log cfu/g)	pH	Mast u SM (%)	Voda u bezmasnoj materiji (%)
37.	89/n	Trlič-Ub	15 dana	3,00	5,11	69,99	88,42
38.	93/n	Vojka-Stara Pazova	1 dan	2,48	4,90	56,74	78,50
39.	95/n	Vojka-Stara Pazova	5 dana	4,70	5,29	36,28	69,01
40.	104/n	Liplje-Ljig	12h	4,60	6,42	40,31	77,87
41.	105/n	Kosmaj-Rogačevo	12h	4,58	5,09	55,34	77,24
42.	107/n	Kosmaj-Nemenikuće	1-2 dana	2,30	5,34	61,01	81,97
43.	111/n	Sopot-Nemenikuće	2 dana	5,46	5,15	61,56	79,18
44.	115/n	Sopot-Nemenikuće	3 dana	5,37	5,66	61,21	82,50
45.	116/n	Sopot	7 dana	4,39	5,30	56,89	78,63
46.	118/n	Valjevo	5 dana	4,60	5,33	51,32	74,02
47.	120/n	Valjevo	7 dana	3,90	5,04	55,80	80,20
48.	121/n	Orašac-Obrenovac	7 dana	3,69	5,62	62,19	80,80
49.	122/n	Crvenka-Ub	12h	4,30	6,60	59,09	80,47
50.	123/n	Crvenka-Ub	7 dana	3,52	4,73	51,03	78,22
51.	124/n	Bajevac-Valjevo	7 dana	4,14	4,69	59,61	78,60
52.	125/n	Arnajevo-Kosmaj	12h	4,60	5,92	50,69	74,92
53.	127/n	Bajevac-Valjevo	3-5 dana	3,04	4,73	61,58	72,62
54.	130/n	Drlupa-Kosmaj	12h	3,69	5,63	46,24	69,10
55.	131/n	Drlupa-Kosmaj	7 dana	2,30	4,77	68,00	74,66

Redni broj	Oznaka uzorka	Poreklo (mesto)	Starost sira	Broj koagulaza pozitivnih stafilokoka (log cfu/g)	pH	Mast u SM (%)	Voda u bezmasnoj materiji (%)
56.	132/n	Drlupa-Kosmaj	1 dan	4,30	5,86	60,96	81,93
57.	133/n	Drlupa-Kosmaj	3-5 dana	3,30	4,89	64,19	80,40
58.	134/n	Drlupa-Kosmaj	1 dan	3,48	6,31	54,76	81,86
59.	135/n	Stubline-Obrenovac	1 dan	3,74	6,94	37,55	77,32
60.	137/n	Stubline Obrenovac	12h	3,86	6,31	53,80	77,18

Prilog 4. Rezultati određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilokoka i hemijskih parametara (pH,sadržaj masti u suvoj materiji,sadržaj vode i vode u bezmasnoj materiji) u slatko-koagulišućim sirevima proizvedenim od kuvanog mleka

Redni broj	Oznaka uzorka	Poreklo (mesto)	Starost sira	Broj koagulaza pozitivnih stafilokoka (log cfu/g)	pH	Mast u SM (%)	Voda u bezmasnoj materiji (%)
1.	82/k	Belanovica -Ljig	7 dana	2,00	5,55	48,33	76,54
2.	91/k	radnja	7 dana	5,19	5,08	16,47	67,63
3.	92/k	radnja	5 dana	3,84	5,82	55,25	73,00

Prilog 5. Rezultati određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilocoka i hemijskih parametara (pH, sadržaj masti u suvoj materiji vode u bezmasnoj materiji) u kiselo-koagulišućim sirevima proizvedenim od nekuvanog mleka

Redni broj	Oznaka uzorka	Poreklo (mesto)	Starost sira	Broj koagulaza pozitivnih stafilocoka (log cfu/g)	pH	Mast u SM (%)	Voda u bezmasnoj materiji (%)
1.	3/n	Valjevo-Lukavac	15 dana	5,46	4,39	48,42	75,01
2.	32/n	Ub	3 dana	2,00	4,10	43,72	81,61
3.	43/n	Trlič-Ub	7 dana	2,00	4,59	63,07	80,48
4.	53/n	Kusadak	4 dana	3,70	4,31	60,55	82,15
5.	67/n	Resnik	7 dana	2,78	4,45	53,75	79,15
6.	70/n	Trlič-Ub	7 dana	4,63	4,61	59,67	73,72
7.	71/n	Ovča	3 dana	1,00	4,22	65,21	88,20
8.	72/n	Jagnjilo-Mladenovac	2 dana	5,54	4,41	52,17	87,02
9.	74/n	Jagnjilo-Mladenovac	2 dana	4,08	4,30	66,66	86,71
10.	78/n	Jagnjilo-Mladenovac	5-6 dana	2,00	4,30	69,51	82,94
11.	81/n	Zuce-Avala	2 dana	3,95	4,30	62,44	84,01
12.	94/n	Vojka-Stara Pazova	2 dana	1,00	4,25	59,19	85,88
13.	96/n	Sopot-Nemenikuće	2 dana	2,00	4,39	48,81	82,93
14.	102/n	Vojka	4 dana	2,00	4,28	57,34	83,64
15.	103/n	Belegiš	3 dana	4,30	4,25	64,49	88,72
16.	109/n	Krnješevci	12h	2,00	4,44	59,46	86,04
17.	112/n	Vojka	2 dana	3,00	4,13	69,86	87,83
18.	114/n	Krnješevci	1 dan	2,60	4,12	58,46	84,46
19.	98/m	Ugrinovci	1 dan	3,04	4,25	55,27	84,01

Prilog 6. Rezultati određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilokoka i hemijskih parametara (pH, sadržaj masti u suvoj materiji vode u bezmasnoj materiji) u kiselo-koagulišućim sirevima proizvedenim od kuvanog mleka

Redni broj	Oznaka uzorka	Poreklo (mesto)	Starost sira	Broj koagulaza pozitivnih stafilokoka (log cfu/g)	pH	Mast u SM (%)	Voda u bezmasnoj materiji (%)
1.	99/k	Pljevlja	30 dana	2,84	4,50	50,46	70,67

Prilog 7. Rezultati određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilokoka, fizičko-hemijskih parametara (pH, a_w , sadržaj NaCl), broja *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. u slatko-koagulišućim sirevima proizvedenim od nekuvanog mleka

Redni br.	Oznaka uzorka	Poreklo	Starost sira	pH	a_w	Sadržaj NaCl (%)	Broj koagulaza pozitivnih stafilokoka (log cfu/g)	Broj <i>Lactococcus</i> spp. (log cfu/g)	Broj <i>Lactobacillus</i> spp. (log cfu/g)
1.	4	Rogača-Sopot	1 dan	6,05	0,970	1,316	5,60	8,70	7,04
2.	17	Gornja Bukovica	2-3 dana	4,66	0,965	0,527	4,23	9,54	9,20
3.	20	Belosavac-Topola	7 dana	5,65	0,940	1,404	2,90	8,90	6,90
4.	45	Kusadak	3 dana	4,68	0,970	0,263	4,49	9,17	8,25
5.	47	Kusadak	6 dana	5,03	0,945	1,697	2,21	8,55	7,43
6.	50	Jagnjilo	2 dana	4,62	0,940	1,199	2,70	8,52	6,20
7.	70	Nemenikuće-Sopot	3 dana	4,62	0,972	0,117	3,90	8,33	6,58
8.	79	Nemenikuće-Sopot	7 dana	4,69	0,963	0,351	4,02	8,74	7,41
9.	90	Zuce-Avala	12 h	5,01	0,940	1,433	2,90	9,17	5,23
10.	92	Lazarevac	7 dana	4,96	0,930	1,989	5,59	8,58	6,93
11.	95	Vrelo-Ub	4-5 dana	4,96	0,928	1,989	4,54	8,48	6,83
12.	98	Zuce-Avala	1 dan	5,15	0,950	0,234	5,29	8,64	7,35
13.	111	Čačak	7 dana	5,40	0,961	1,433	5,78	8,45	6,78
14.	116	Požega	3 dana	5,01	0,965	1,346	5,79	8,48	5,48
15.	124	Ripanj	2 dana	5,56	0,956	1,521	3,90	8,56	5,18
16.	125	Ripanj	7 dana	4,95	0,970	0,322	3,26	8,45	6,70
17.	148	Ub	2-3 dana	4,64	0,977	1,141	5,60	8,67	5,93
18.	156	Vranić	7 dana	4,66	0,925	1,404	2,00	9,29	7,45

Redni br.	Oznaka uzorka	Poreklo	Starost sira	pH	a _w	Sadržaj NaCl (%)	Broj koagulaza pozitivnih stafilokoka (log cfu/g)	Broj <i>Lactococcus</i> spp. (log cfu/g)	Broj <i>Lactobacillus</i> spp. (log cfu/g)
19.	168	Jagnjilo-Mladenovac	2 dana	4,95	0,920	0,907	3,40	8,32	6,02
20.	181	Beli Potok	12 h	4,93	0,920	0,907	2,60	8,60	4,00
21.	182	Beli Potok	2 dana	4,90	0,930	0,878	2,00	8,48	5,08
22.	188	Jagnjilo-Mladenovac	2 dana	5,54	0,961	1,814	5,09	8,34	7,85
23.	189	Jagnjilo-Mladenovac	12 h	5,07	0,965	0,416	3,43	8,56	6,53
24.	225	Brović,Obrenovac	3-4 dana	4,96	0,928	0,731	4,32	7,74	5,59
25.	237	Brović,Obrenovac	3-4 dana	5,28	0,950	0,585	4,60	7,51	5,15
26.	242	Kusadak	7 dana	4,82	0,935	1,667	2,78	7,23	6,18
27.	254	Rabrovac-Mladenovac	1 dan	5,07	0,930	1,580	2,30	8,29	4,30
28.	259	Trlič-Ub	5-6 dana	4,81	0,950	0,965	3,90	8,29	6,03
29.	260	Jagnjilo-Mladenovac	12 h	4,84	0,935	1,492	4,36	7,02	4,90
30.	263	Jagnjilo-Mladenovac	3-4 dana	4,83	0,962	1,872	5,08	7,84	5,32
31.	271	Kusadak	12 h	5,44	0,961	1,492	3,00	7,99	6,51
32.	272	Kusadak	7 dana	5,05	0,940	1,609	4,77	7,99	7,11
33.	302	Joševa-Ub	10 dana	5,17	0,954	1,901	3,57	8,17	7,39
34.	315	Veliki Borak-Barajevo	3 nedelje	4,65	0,957	1,404	2,85	8,28	6,96
35.	342	Takovo-Ub	7 dana	5,78	0,940	2,779	2,30	7,19	6,99
36.	357	Planinica-Divčibare	7 dana	5,63	0,948	1,784	2,60	7,38	6,27
37.	367	Velika Moštanica	4-5 dana	4,73	0,956	0,965	3,30	8,36	7,26
38.	391	Kusadak	3-4 dana	5,15	0,951	1,463	2,95	8,45	7,09
39.	392	Kusadak	7 dana	4,81	0,953	0,995	2,60	8,32	6,99

Redni br.	Oznaka uzorka	Poreklo	Starost sira	pH	a _w	Sadržaj NaCl (%)	Broj koagulaza pozitivnih stafilokoka (log cfu/g)	Broj <i>Lactococcus</i> spp. (log cfu/g)	Broj <i>Lactobacillus</i> spp. (log cfu/g)
40.	393	Kusadak	7 dana	4,76	0,962	0,497	5,35	8,23	6,73
41.	400	Azanja	7 dana	4,65	0,955	1,082	5,38	8,19	6,91
42.	401	Kusadak	7 dana	4,77	0,960	0,468	3,52	7,29	6,18
43.	65	Krnješevci	3 dana	4,69	0,962	0,205	3,62	8,63	7,64

Prilog 8. Rezultati određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilokoka, fizičko-hemijskih parametara (pH, a_w, sadržaj NaCl), broja *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. u slatko-koagulišućim sirevima proizvedenim od kuvanog mleka

Redni br.	Oznaka uzorka	Poreklo	Starost sira	pH	a _w	Sadržaj NaCl (%)	Broj koagulaza pozitivnih stafilokoka (log cfu/g)	Broj <i>Lactococcus</i> spp. (log cfu/g)	Broj <i>Lactobacillus</i> spp. (log cfu/g)
1.	5	Ugrinovci	1 dan	5,23	0,965	1,521	4,27	9,00	8,39
2.	31	Zlatarić-Valjevo	4 dana	5,11	0,962	1,170	4,20	8,71	6,00
3.	43	Ranilović-Arandelovac	3 dana	5,20	0,96	1,316	2,48	8,84	7,33
4.	44	Ranilović-Arandelovac	10 dana	4,83	0,956	0,731	3,74	8,51	7,09
5.	53	Ključ-Mionica	4-5 dana	5,32	0,963	0,526	5,39	9,57	6,71

Redni br.	Oznaka uzorka	Poreklo	Starost sira	pH	a _w	Sadržaj NaCl (%)	Broj koagulaza pozitivnih stafilokoka (log cfu/g)	Broj <i>Lactococcus</i> spp. (log cfu/g)	Broj <i>Lactobacillus</i> spp. (log cfu/g)
6.	57	Ljubić-Čačak	1 dan	5,91	0,976	0,087	5,30	8,50	7,11
7.	110	Čačak	7 dana	5,26	0,965	1,404	5,18	8,56	5,04
8.	112	Čačak	50 dana	4,67	0,934	3,481	2,00	8,41	7,02
9.	164	Gornja Bukovica	1 dan	6,25	0,869	0,614	2,95	8,19	5,54
10.	186	Zagorica-Topola	2 dana	5,53	0,932	1,696	3,83	8,30	6,93
11.	187	Zagorica-Topola	7 dana	5,57	0,93	0,117	3,56	8,38	6,60
12.	202	Bistrica-Lazarevac	12 h	5,86	0,938	0,029	3,60	7,43	6,13
13.	207	Ba,Suvobor	3-4 dana	5,73	0,932	1,813	2,60	7,56	5,40
14.	222	Brović-Obrenovac	7 dana	4,76	0,935	2,135	1,00	8,23	6,16
15.	243	Piroman,Obrenovac	7 dana	4,82	0,93	1,667	2,78	7,23	6,18
16.	245	Pambukovica-Ub	15 dana	4,95	0,905	1,199	2,48	7,72	6,15
17.	248	Gornja Bukovica-Valjevo	2 dana	5,66	0,97	0,322	3,60	8,29	4,30
18.	299	Baćevec-Barajevo	2-3 dana	4,95	0,965	1,492	4,39	8,21	7,29
19.	301	Jasenak-Obrenovac	3 dana	6,21	0,975	0,322	2,00	7,73	7,27
20.	341	Takovo,Ub	2 dana	5,79	0,945	1,784	4,94	7,85	7,04
21.	353	Lukavac,Valjevo	4 dana	5,60	0,955	1,375	2,00	8,02	7,21
22.	370	Zvizdar,Ub	3-4 dana	5,63	0,956	0,848	3,00	8,30	7,21
23.	371	Zvizdar-Ub	7 dana	5,63	0,952	0,907	2,84	8,15	7,29

Prilog 9. Rezultati određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilocoka, fizičko-hemijskih parametara (pH, a_w , sadržaj NaCl), broja *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. u kiselu-koagulišućim sirevima proizvedenim od nekuvanog mleka

Redni br.	Oznaka uzorka	Poreklo	Starost sira	pH	a_w	Sadržaj NaCl (%)	Broj koagulaza pozitivnih stafilocoka (log cfu/g)	Broj <i>Lactococcus</i> spp. (log cfu/g)	Broj <i>Lactobacillus</i> spp. (log cfu/g)
1.	11	Vojka-Srem	1 dan	4,32	0,959	1,316	2,84	9,81	8,83
2.	41	Gvozdrenović-Valjevo	3-4 dana	4,46	0,96	0,292	4,38	8,83	6,43
3.	42	Kraljevo	7 dana	4,43	0,946	1,609	2,00	8,38	7,53
4.	64	Nemenikuće-Sopot	1 dan	4,32	0,969	0,205	5,51	8,93	7,17
5.	93	Lazarevac	4 dana	4,59	0,967	0,241	5,20	8,81	7,72
6.	97	Zuce-Avala	3 dana	4,30	0,97	0,001	4,83	9,36	6,23
7.	132	Jagnjilo	2 dana	4,52	0,945	2,194	2,48	8,60	7,32
8.	195	Vojka-Stara Pazova	2 dana	4,45	0,92	0,322	2,84	8,64	6,81
9.	229	Zuce	3-4 dana	4,42	0,95	0,613	3,63	7,78	6,49
10.	230	Zuce	2-3 dana	4,38	0,925	0,351	5,51	8,11	5,54
11.	231	Zuce	2 dana	4,59	0,96	3,042	3,20	7,68	6,93
12.	239	Gvozdrenović-Ub	7 dana	4,56	0,92	1,091	3,39	7,81	6,78
13.	327	Milorci-Ub	7 dana	4,55	0,946	1,726	2,48	8,02	6,25
14.	388	Kusadak	4 dana	4,50	0,964	0,760	3,88	8,45	7,27
15.	389	Kusadak	6 dana	4,60	0,961	1,024	2,00	8,56	6,99
16.	414	Šimanovci	3 dana	4,36	0,969	0,497	2,78	8,32	6,38
17.	60	Vojka-Srem	4 dana	4,57	0,96	0,585	2,48	8,78	7,53
18.	80	Vojka-Srem	12 h	4,35	0,965	0,001	3,00	8,20	7,56

Prilog 10. Rezultati određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilocoka, fizičko-hemijskih parametara (pH, a_w , sadržaj NaCl), broja *Lactococcus* spp. i *Lactobacillus* spp. u kiselu-koagulišućim sirevima proizvedenim od kuvanog mleka

Redni br.	Oznaka uzorka	Poreklo	Starost sira	pH	a_w	Sadržaj NaCl (%)	Broj koagulaza pozitivnih stafilocoka (log cfu/g)	Broj <i>Lactococcus</i> spp. (log cfu/g)	Broj <i>Lactobacillus</i> spp. (log cfu/g)
1.	227	Brović-Obrenovac	3-4 dana	4,50	0,957	0,73125	1,00	7,68	6,07

BIOGRAFIJA AUTORA

Mr Radoslava Savić Radovanović je rođena 23.7.1968. godine u Beogradu. Osnovnu školu i Poljoprivrednu školu-smer veterinarski tehničar završila je Beogradu. Na Veterinarski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala se 1987/1988. školske godine, a diplomirala 1993. godine sa prosečnom ocenom 8,57. Kao stipendista Vlade Republike Srbije upisala je 1992/1994.god. posledidiplomske studije i magistarku tezu pod naslovom: „Identifikacija mehanizama koji utiču na destrukciju zajednice *Staphylococcus aureus* u sirevima“ odbranila je 2000. godine. Posle volontiranja i položenog stručnog ispita angažovana je za ispomoć u izvođenju praktične nastave na Katedri za higijenu i tehnologiju mleka. Za asistenta pripravnika na predmetu Higijena mleka izabrana je 1996. godine, za asistenta na istom predmetu prvi put je izabrana 2001. godine, ponovo je izabrana 2005. i 2008. i 2013. godine. U periodu od izbora u zvanje asistenta pripravnika bila je dva puta na porodiljskom odsustvu.

Kao istraživač učestvovala je u realizaciji zadataka iz projekata koje je finansiralo Ministarstvo za nauku i tehnologiju:

Od diplomiranja do danas Mr Radoslava Savić Radovanović objavila je u zajednici sa drugim autorima 20 radova.

Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Потписани-а Mr Radoslava Savić Radovanović

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Procena rizika od nalaza enterotoksina stafilokoka u mekim sirevima

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 28.1.2015.

Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ
ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА**

Име и презиме аутора Mr Radoslava Savić Radovanović

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада Procena rizika od nalaza enterotoksina stafilokoka u mekim sirevima

Ментор Prof. Dr Vera Katić

Потписани _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 28.1.2015.

Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Procena rizika od nalaza enterotoksina stafilokoka u mekim sirevima

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 28.1.2015.

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.