

# Nalaz rezistentnih koagulaza - pozitivnih stafilokoka u mlijeku iz mljekomata

---

**Kolačko, Ivana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:984679>

*Rights / Prava:* [In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-02**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET**

Ivana Kolačko

**NALAZ REZISTENTNIH KOAGULAZA - POZITIVNIH  
STAFILOKOKA U MLIJEKU IZ MLJEKOMATA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2019.**

VETERINARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU  
ZAVOD ZA HIGIJENU, TEHNOLOGIJU I SIGURNOST HRANE

Predstojnik: izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Mentor: izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Članovi povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Lidija Kozačinski
2. prof. dr. sc. Željka Cvrtila
3. izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec
4. Izv. prof. dr. sc. Nino Maćešić (zamjena)

## Zahvala

Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Neviju Zdolecu na razumijevanju, uloženom trudu, vodstvu i savjetima prilikom izrade diplomskog rada te Ani Konjević na pomoći u laboratoriju.

Najveća hvala mojim roditeljima na pruženoj podršci i strpljenju kroz cijelo studiranje. Zahvaljujem se i sestrama na motivaciji i savjetima kako “preživjeti faks“.

Od srca veliko hvala svim mojim prijateljima i kolegama što su učinili ovaj studentski period nezaboravnim i bili uz mene za svaki ispit, bez obzira bio pad ili prolaz.

## SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	3
2.1.	Sirovo mlijeko	3
2.2.	Higijena mužnje	3
2.3.	Mljekomat	4
2.4.	Koagulaza-pozitivni stafilokoki	6
2.5.	Otpornost stafilokoka iz mlijeka na antibiotike	7
3.	MATERIJAL I METODE	10
3.1.	Uzorci mlijeka	10
3.2.	Mikrobiološka analiza	10
3.2.1.	Koagulaza test	10
3.3.	Testiranje osjetljivosti koagulaza-pozitivnih stafilokoka na antimikrobne tvari	11
4.	REZULTATI	13
5.	RASPRAVA	15
6.	ZAKLJUČAK	18
7.	LITERATURA	19
8.	SAŽETAK	25
9.	SUMMARY	26
10.	ŽIVOTOPIS	27

## 1. UVOD

Antimikrobna rezistencija je jedno od vodećih javnozdravstvenih pitanja koje je usko povezano s interakcijama životinja na farmi, poljoprivrednika, okoliša i hrane životinjskog podrijetla (GARIPCIN i SEKER, 2015.). Posebna je zabrinutost mogućnost da rezistentni organizmi životinjskog podrijetla postanu izravno patogeni za čovjeka ili da prenesu svoje gene otpornosti na patogene od medicinskog značaja (TEUBER, 2001.). Zbog intenzivnog korištenja antibiotika u javnom zdravstvu i stočarstvu, otpornost na antibiotike kod patogena je posljednjih desetljeća sve veći medicinski problem (SHARMA i sur., 2014.).

Animalni proizvodi mogu biti onečišćeni rezistentnim bakterijama koje se tako prenose do potrošača. Poseban problem može predstavljati gotova hrana spremna za konzumaciju. Primjerice, mlijeko iz mljekomata sirov je proizvod kojeg potrošači, unatoč drugačijim preporukama, konzumiraju sirovo, bez prokuhavanja, pa ga uvjetno i možemo smatrati gotovom hranom. Poznato je da mlijeko uvijek sadrži određen broj mikroorganizama, te je rast mikrobne populacije određen uvjetima skladištenja. Razumljivo je da se mlijeko može onečistiti i štetnim bakterijama, tzv. uzročnicima zoonoza, koje istovremeno mogu biti i otporne na antibiotike. Određeni štetni mikroorganizmi poput stafilokoka vezani su uz samu životinju, odnosno vime te izravno ulaze u mlijeko, dok drugi u mlijeko dopijevaju onečišćenjem iz okoliša životinje poput enterokoka, salmonela, *E. coli*, ili pak zaostaju na opremi za mužnju i čuvanje mlijeka (PEHAR, 2019.).

Prije desetak godina antibiotici su se više koristili kao promotori rasta nego u terapijske svrhe. To je doprinijelo pojavi otpornosti bakterija prema antibioticima (zbog stalne izloženosti, niskih doza i dr.), što je danas vrlo važan problem (veterinarskog) javnog zdravstva. Nadležne institucije vremenom su donosile preporuke o zabrani primjene nekih antibiotika u hrani za životinje i podržavale samo njihovo davanje u terapijske svrhe tj. liječenje ljudi i životinja. Najveći problem nastao je pojavom otpornosti bakterija prema antibioticima koji se koriste u terapiji ljudi, a uzrok je neminovno bila primjena sličnih (analognih) preparata u veterinarskoj medicini. Jedan od mogućih načina širenja ovakve otpornosti bakterija prema antibioticima s životinja na ljude je preko životinjskih proizvoda uključujući mlijeko i mliječne proizvode (ZDOLEC, 2005.)

Koagulaza-pozitivni stafilokoki, primarno *Staphylococcus aureus* uzročnici su mastitisa, a u higijeni mlijeka (i hrane općenito) su važni jer uzrokuju alimentarnu intoksikaciju ljudi. Otpornost stafilokoka uzročnika mastitisa na antimikrobne tvari tijekom godina se

značajno povećavala zbog njihove nekritičke primjene. Ograničenja trenutno prisutnih antibiotskih preparata vidljiva su i iz činjenice da se potpuno izlječenje mastitisa uzrokovanog bakterijom *S. aureus* postiže tek u 10 % slučajeva. S gledišta higijene mlijeka i veterinarskog javnog zdravstva, prisutnost koagulaza pozitivnih stafilokoka u sirovom mlijeku namijenjenog javnoj potrošnji nije prihvatljiva, poglavito ako su i otporni na antimikrobne tvari. Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio istražiti prisutnost, odnosno broj koagulaza pozitivnih stafilokoka u mlijeku iz mljekomata te testirati njihovu otpornost na različite skupine antimikrobnih tvari (antibiotika).

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Sirovo mlijeko

Svježe pomuženo mlijeko osim primarne mikroflore koja potječe iz unutrašnjosti vimena sadrži i mikroorganizme iz okoliša. Većinu primarne mikroflore čine stafilocoki/mikrokoki, streptokoki te korinebakterije. Sekundarnu mikrofloru mlijeka uglavnom čine bakterije, rjeđe kvasci, a samo ponekad plijesni (TRATNIK, 1998.). Mlijeko ne smije sadržavati patogene mikroorganizme koji mogu uzrokovati bolesti kod ljudi niti ostatke lijekova, druge kemijske kontaminante ni toksine mikroorganizama (HADŽIOSMANOVIĆ, 2001.).

Kravlje mlijeko standardne kakvoće sadrži manje od 100.000 mikroorganizama imanje od 400.000 somatskih stanica u jednom mililitru. Inače, u mlijeku zdravih četvrti vimena sadrži manje od 200.000 somatskih stanica u mililitru, a čine ih epitelne stanice i leukociti (polimorfonuklearni neutrofili, limfociti, makrofagi i ostale stanice) (ANTUNAC i sur., 1997.; KELLY, 2002.). Somatske stanice su prirodan sastojak mlijeka, a njihov se broj mijenja pod utjecajem različitih genetskih i okolišnih čimbenika. Najveći utjecaj na broj somatskih stanica ima infekcija mliječne žlijezde. Stoga su somatske stanice indikator zdravlja vimena krava. S povećanjem broja somatskih stanica proizvodnja mlijeka se smanjuje, a povećavaju se troškovi liječenja i obnove stada (ČAČIĆ i sur., 2003.). Prema broju mikroorganizama i broju somatskih stanica mlijeko se razvrstava u razrede (tablica 1).

Tablica 1: Razvrstavanje sirovog mlijeka u razrede (Pravilnik, 2017)

Vrsta mlijeka	Razred	Geometrijski prosjek	
		Mikroorganizmi (u 1 mL)	Somatske stanice (u 1 mL)
Mlijeko	I	$\leq 100.000$	$\leq 400.000$
	II	$> 100.000$	$> 400.000$

### 2.2. Higijena mužnje

Higijena mužnje je skup rutinskih postupaka bez kojih se ne može dobiti mlijeko propisane kakvoće. Važnost zoohigijenskog kompleksa u dobivanju kvalitetnog mlijeka



naglašava činjenica da je ono, ukoliko potječe od zdrave krave, odnosno zdravog vimena sterilno (TOPOLKO, 2001.). Na higijensku kvalitetu mlijeka posredno i neposredno utječu zdravlje životinje, postupak prema životinji, hranidba, postupci tijekom mužnje, higijena mužnje, postupak s mlijekom neposredno nakon mužnje, temperatura i brzina hlađenja mlijeka, higijena staje i izmuzišta, funkcionalno-tehnička ispravnost i higijena muznog uređaja (REKSEN i sur., 2006.; RIEKERINK i sur., 2008.; JURMANOVIĆ i sur., 2012.). Također na količinu i kvalitetu proizvedenoga mlijeka utječu: genetski (pasmina, odnosno genotip) i fiziološki čimbenici (dob, stadij i redosljed laktacije, zdravstveno stanje i tjelesna masa krave) (RAJČEVIĆ i sur., 2003.). Prilikom transporta mlijeka u kantama ili cisternama bez hlađenja vrlo brzo raste broj mezofilnih bakterija. Tako da mlijeko i prije nego se transportira u mljekaru, može sadržavati brojne vrste bakterija iz rodova: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus* i brojne vrste enterobakterija (TRATNIK, 1998.).

Mastitis je najčešće oboljenje mliječne žlijezde a nastaje kao posljedica ulaska i štetnog djelovanja patogenih mikroorganizama u mliječnoj žlijezdi. Upala će biti izazvana ako je neki od navedenih čimbenika (nepravilna mužnja, stres...) smanjio lokalnu otpornost mliječne žlijezde ili čitavog organizma. Do sada je poznato oko 150 različitih vrsta mikroorganizama koje su u stanju uzrokovati mastitis. Najčešći uzročnici mastitisa su bakterije *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus uberis* (REKSEN i sur., 2006.; RIEKERINK i sur., 2008.; JURMANOVIĆ i sur., 2012.), dok se sporadično pojavljuju i drugi uzročnici poput *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. itd. Svaka kontaminacija mlijeka i broj somatskih stanica iznad fiziološke granice mijenja kemijski sastav i fizikalna svojstva mlijeka (KITCHEN, 1981.; MUIR, 1996.).

### **2.3. Mljekomat**

Mljekomat je samoposlužni aparat koji korisnicima omogućuje nabavu svježeg mlijeka. Takvo mlijeko izloženo je različitim utjecajima koji mijenjaju kvalitetu i ispravnost za prehranu ljudi. Zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti, neutralnog pH i visokog aktiviteta vode, sirovo mlijeko predstavlja odličan medij za rast različitih mikroorganizama, čije razmnožavanje uglavnom ovisi o temperaturi i kompetitivnim mikroorganizmima i njihovim metaboličkim proizvodima u mlijeku (CLAEYS i sur., 2013., DE BUYSER i sur. (2001.).

Mlijeko u mljekomatu treba biti samo od jednog proizvođača s registrirane farme koja redovito kontrolira uzorak mlijeka na ukupni broj baterija, somatske stanice, rezidue i kemijski

sastav. Dopusšteno je da mlijeko bude u mljekomatu 24 sati od mužnje i mora biti hlađeno. Ako se mlijeko kontrolira u skladu s propisima i udovoljava propisanim kriterijima, kriteriji bi trebali biti ispunjeni. U slučaju da se mlijeko u mljekomatu nalazi duže od 24 sata i u uvjetima dobrog hlađenja, prisutni je veliki broj psihotrofnih bakterija. Iz sirovog kravljeg mlijeka mogu se izolirati mnogi za ljude patogeni mikroorganizmi kao što su *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., verotoksikogena *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *S. aureus*, *M. bovis*, *Brucella* spp., *C. burnettii* i drugi. Neki od ovih patogena nalaze se na samim životinjama, na njihovoj koži ili u gastrointestinalnom traktu, ali isto tako i u njihovom okolišu, na farmi (OLIVER i sur., 2009.). Njihova prisutnost u mlijeku je varijabilna, ali potvrđena u mnogim studijama (VILTROP i ROASTO, 2013.). Rijetko će doći do porasta broja patogenih vrsta do infektivnih doza zbog brze potrošnje mlijeka ili zbog kiseljenja u uvjetima produženog skladištenja. Europske institucije (EFSA) provele su procjenu rizika u vezi konzumacije sirovog mlijeka i indentificirale biološke opasnosti: *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *E. coli* (STEC), *Brucella melitensis*, *Mycobacterium bovis* i virus krpeljnog encefalitisa. Mikrobiološke opasnosti, koje se mogu naći u sirovom kravljem mlijeku, posljedica su infekcija samih životinja ili naknadne fekalne kontaminacije i/ili kontaminacije iz okoliša. Prema Uredbi EZ 853/2004 sirovo mlijeko mora biti sukladno mikrobiološkim kriterijima u smislu ukupnog broja bakterija od <100.000/ml (ZDOLEC, 2018.).

Tablica 2: Preporučeni mikrobiološki kriteriji za sirovo mlijeko, namijenjeno konzumaciji bez prethodne toplinske obrade (Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, Ministarstvo poljoprivrede, 2011.)

Bakterije	Plan uzorkovanja		Kriteriji
	N	c	
<i>Salmonella</i> spp.	5	0	n.n. u 25 ml
Koagulaza-pozitivni stafilokoki ( <i>S. aureus</i> )	5	1	m= 10 cfu/ml M=10 <sup>2</sup> cfu/ml
<i>Enterobacteriaceae</i>	5	1	m= 10 cfu/ml M=10 <sup>2</sup> cfu/ml
Sulfitreducirajuće klostridije	5	2	m= 10 cfu/ml M=10 <sup>2</sup> cfu/ml
Aerobne mezofilne bakterije	5	1	m= 10 <sup>4</sup> cfu/ml M=10 <sup>5</sup> cfu/ml

Pravilnik o registraciji subjekata i odobravanju objekata u poslovanju s hranom koji se odnosi na izravnu prodaju sirovog mlijeka mljekomatima propisuje:

- a) Obvezu registriranja mljekomata u Upravi za veterinarstvo i sigurnost hrane MP, a službene kontrole provodi veterinarska inspekcija u roku od godinu dana od registracije,
- b) Spomenute zdravstvene i higijenske uvjete za sirovo mlijeko (iz europskih uredbi),
- c) Obvezu održavanja temperature pri prijevozu mlijeka krajnjem potrošaču,
- d) Hlađenje mlijeka prije otpreme s gospodarstva na temperaturu 6-8 °C,
- e) Održavanje temperature mlijeka u mljekomatu od 0-4 °C, što mora biti vidljivo na ekranu mljekomata,
- f) Sirovo mlijeko u mljekomatu ne smije biti starije od 24 sata od mužnje,
- g) Potrebu čišćenja i dezinfekcije spremnika kojim se mlijeko prevozi do mljekomata,
- h) Oznake koje moraju biti vidljive na mljekomatu: oznaku mlijeka „sirovo mlijeko“ i preporuku o toplinskoj obradi prije konzumacije, podatke o proizvođaču i broj mljekomata iz upisnika, datum mužnje, datum i sat punjenja mljekomata,
- i) Zabranu punjenja mljekomata mlijekom s više gospodarstava.

Na mljekomate se odnose dinamika uzorkovanja kao i za proizvođače u otkupu mlijeka mljekarama (najmanje 2 uzorka mjesečno za broj mikroorganizama, 1 za somatske stanice).

#### 2.4. Koagulaza pozitivni stafilokoki

Bakterije roda *Staphylococcus* (grč. staphyle, grozd; kokkos, zrno) su gram-pozitivne, nepokretne, nesorotivne i fakultativno anaerobne kuglaste bakterije. Stafilokoki tvore mnoge ekstracelularne enzime i toksine koji uvjetuju patogenost vrsta ili čak virulenciju pojedinih sojeva. Stafilokoki su dio normalne mikroflore organizma, ali neke vrste uzrokuju infekcije i intoksikacije, pa se ubrajaju u uvjetno patogene bakterije. Od tridesetak vrsta koje spadaju u rod *Staphylococcus*, neke tvore enzim koagulazu (*S. aureus* i dr.) a zajednički imenom se nazivaju **koagulaza-pozitivnim stafilokokima**. *S. epidermidis* i ostale nepatogene ili slabije patogene vrste ne tvore taj bakterijski enzim te stoga pripadaju koagulaza-negativnim stafilokokima (NAGLIĆ i sur., 2005.). *S. aureus* najbolje raste i proizvodi enterotoksin uz prisustvo kisika, ali može rasti i u anaerobnim uvjetima. Odgovara mu temperatura 37 °C, (raspon 6-48 °C), pH 7-7,5 (raspon od 4,2 do 9,3). Uništavaju ga uobičajene temperature kuhanja i pasterizacije (PELISSER i sur., 2009.). Najvažniji enzimi i toksini što ih sojevi tvore jesu koagulaza, dezoksiribonukleaza, stafilokinaza, fosfataza, hijaluronidaza, β-laktamaza te

hemolizini, enterotoksini, leukcidi, dermonekrotoksin i letalni toksin. Koagulaza (plazmokoagulaza) je enzim koji prevodi fibrinogen u fibrin i tako uzrokuje grušanje krvne plazme. Kad u organizmu koagulaza djeluje oko bakterijske stanice stvara se fibrinska ovojnica koja je zaštićuje od djelovanja enzima kada su stanice stafilokoka fagocitirane.  $\beta$ -laktamaze su inducibilni enzimi koji razgrađuju penicilinske antibiotike i zbog njihove tvorbe prisutna je otpornost sojeva prema tim antibioticima (NAGLIĆ i sur., 2005.). To su termostabilni toksini čija se svojstva ne mijenjaju nakon termičke obrade hrane i nisu osjetljivi na gastrointestinalne proteaze poput pepsina (PELISSER i sur., 2009.). Sojevi *S. aureus* se razlikuju na temelju toksigenih i biokemijskih osobina te prema domaćinu od kojeg potječu. Sojevi bakterije *S. aureus* u načelu su osjetljivi prema  $\beta$ -laktamskim antibioticima, cefalosporinima i kloramfenikolu te često postanu rezistentni prema tim antibioticima, ali i drugim antimikrobnim lijekovima. U slučaju neadekvatne higijene za vrijeme proizvodnog procesa, posebno u slučajevima neposrednog rukovanja s hranom u proizvodnji, otvaraju se mogućnosti za kontaminaciju s bakterijom *S. aureus*, te se ona može očekivati i u mliječnim proizvodima od pasteriziranog i nepasteriziranog mlijeka (MEDVEDOVA i sur., 2014.). Preboljenjem stafilokokne infekcije stječe se vrlo slaba imunost. Imunoprofilaksa postoji, a najbolji rezultati imunizacije postižu se uporabom autovakcina ili stajskih vakcina (NAGLIĆ i sur., 2005.).

## **2.5. Otpornost stafilokoka iz mlijeka na antibiotike**

LESKOVEC i sur. (2015.) navode da su izolati *S. aureus* iz mlijeka u najvećem broju uzoraka osjetljive na amoksicilin s klavulanskom kiselinom (79,3 %) i cefoperazon (75,1 %), dok na ampicilin i penicilin nisu bile osjetljive. U sličnim istraživanjima također je utvrđeno da je veliki udio pripadnika ove vrste izdvojenih iz sekreta vimena neosjetljiv na penicilin i ampicilin (MALINOWSKI i sur., 2002.; KALMUS i sur., 2011.; KLIMIENÉ i sur., 2011.) dok su JURMANOVIĆ i sur., (2012.) utvrdili postotak sojeva (od 93,85 do 95,65 %) osjetljivih na amoksicilin s klavulanskom kiselinom. U istraživanju provedenom u Njemačkoj utvrđeno je kako prevalencija sojeva bakterije *S. aureus* raste s dobi i stadijem laktacije (TENHAGEN i sur., 2006.). WILSON i sur. (1997.) ističu kako je *S. aureus* dominantan uzročnik mastitisa te da je odgovoran pojavi 47 % kliničkih oblika mastitisa. U dosadašnjim istraživanjima osjetljivosti stafilokoka prema antibioticima provedenim u Hrvatskoj, najučinkovitije tvari bile su cefoperazon i kombinacija amoksicilina s klavulanskom kiselinom, a učinkovitost je bila 97

%, odnosno 100 % (JURMANOVIĆ i sur., 2012.). KALMUS i sur. (2011.) tvrde kako izolati bakterije *S. aureus* imaju visoku razinu otpornosti na penicilin (61,4%) i ampicilin (59,5 %). Visok stupanj rezistencije stafilokoka prema penicilinu zabilježen je i u istraživanjima drugih autora. Tako TEALE i DAVID (1999.) navode da je gotovo 50 % pretraženih sojeva bakterije *S. aureus* bilo rezistentno na penicilin i ampicilin. U istraživanju BENIĆA i sur., (2003.) svega je 15 % pretraženih sojeva bilo osjetljivo prema penicilinu.

ZDOLEC i sur. (2016.a) su istraživali uvjetovanost pojave rezistencije stafilokoka u mlijeku krava s obzirom na zdrvlje vimena odnosno prethodno liječenje vimena antibioticima. Stafilokoki izolirani iz uzoraka mlijeka liječenih krava, najčešće su bili otporni na klindamicin, penicilin, ampicilin, linezolid i eritromicin. Manji udio rezistentnih stafilokoka nađen je u uzorcima mlijeka iz zdravog vimena gdje je nađena najčešća rezistencija na penicilin (14,6%), eritromicin i kanamicin (12,2%). Nije bilo razlike u prisutnosti rezistencije na kloramfenikol, kanamicin ili sulfonamide u stafilokokima između dviju skupina. FREY i sur. (2013.) izvijestili su o koagulaza-negativnim stafilokokima krava s mastitisom uglavnom otpornih na oksacilin, fusidinsku kiselinu, tiamulin, penicilin, tetraciklin, streptomycin, eritromicin, sulfonamidi, trimetoprim, klindamicin, kanamicin i gentamicin.

Nadalje, rezultati istraživanja na industrijskim proizvedenim mliječnim proizvodima ukazuju na značajan udio rezistentnih stafilokoka, poglavito svježim sirevima od pasteriziranog mlijeka (44,87 %; n=78) što može predstavljati potencijalni rizik za potrošače u smislu prijenosa gena rezistencije kroz prehrambeni lanac (ZDOLEC i sur., 2013.). U predmetnom istraživanju svi izolati bili su osjetljivi na klindamicin, amikacin, amoksicilin + klavulansku kiselinu, enrofloksacin, vankomicin, kloramfenikol i ciprofloksacin. Najviše izolata bilo je otporno na eritromicin, potom penicilin i tetraciklin, pa su za njih određivane MIC. Drugi autori također nalaze stafilokoke iz hrane životinjskog podrijetla na eritromicin, tetracikline i peniciline (SIMEONI i sur., 2008.; RESCH i sur., 2008.; EVEN i sur., 2011.). Nalaz izolata otpornih na penicilin u mliječnim proizvodima vjerojatno je posljedica njihove prisutnosti u sirovini tj. svježem mlijeku na što upućuju neka istraživanja (KALMUS i sur., 2011.). Pojava i nalaz rezistentnih sojeva stafilokoka u mlijeku i mliječnim proizvodima može se očekivati uslijed (nekritičke) primjene penicilinskih i tetraciklinskih antibiotika u terapiji i prevenciji mastitisa krava (ZDOLEC i sur., 2006.; VRAGOVIĆ i sur., 2012.). S druge strane, spomenuti rezultati govore o dominaciji otpornosti stafilokoka na eritromicin, antibiotik koji se pak ne koristi intramamarno. Stoga je prisutnost stafilokoka otpornih na eritromicin u

pretraženim mliječnim proizvodima najvjerojatnije rezultat naknadnog onečišćenja mlijeka i/ili proizvoda ili horizontalnog prijenosa gena za rezistenciju.

Bakterija *S. aureus* vrlo često postaje rezistentna na meticilin (MRSA, meticilin rezistentni *S. aureus*), a genetska podloga rezistencije posredovana je *mecA* genom koji kodira proizvodnju promijenjenog proteina PBP2a koji veže penicilin pa se niti jedan antibiotik iz skupine beta-laktamskih antibiotika ne može vezati na odgovarajuće mjesto na bakterijskoj stanici i spriječiti sintezu stanične stijenke bakterija (KALENIĆ i sur., 2008.; LI i sur., 2009.; FEßLER i sur., 2010.). Prilikom kolonizacije MRSA sojevima postoji mogućnost potencijalne opasnosti infekcije ostalih životinjskih vrsta i ljudi, a ujedno je i “rezervoar” gena odgovornih za rezistenciju koji se vrlo lako i brzo mogu prenijeti na druge, nesrodne bakterijske vrste (WEESE i sur., 2006.). Da bi spriječili daljnje širenje MRSA sojeva u mliječnim krava neophodno je kontinuirano pratiti pojavu novih izolata i njihovu rezistenciju. Također, potrebno je educirati vlasnike životinja kao i sve one koji skrbe o kravama o važnosti opravdane i razumne uporabe antimikrobnih lijekova kako bi se spriječila pojava novih rezistentnih sojeva. Od 29 meticilin-rezistentnih sojeva na amoksisicilin s klavulanskom kiselinom bila su rezistentna 15 (51,7 %), a osjetljiva 14 sojeva (48,3 %). Podatak da su ti sojevi bili osjetljivi na amoksisicilin s klavulanskom kiselinom ne isključuje rezistenciju na meticilin jer je poznato da MRSA sojevi mogu in vitro biti osjetljivi na taj antibiotik iako posjeduju gen *mecA*. Na cefoperazon, neomicin i tetraciklin rezistentno je bilo 15 sojeva (51,7 %), a na linkomicin 10 sojeva (34,5 %) MRSA. Svi meticilin-rezistentni sojevi bili su osjetljivi na sulfametaksazol/trimetoprim. Mogući razlog tome je to što se taj lijek ne koristi često ili se uopće ne koristi u terapiji mastitisa u krava u Hrvatskoj (JAKI TKALEC, 2015.). Slične rezultate dobili su HUBER i sur. (2010.) u Švicarskoj, od 16 sojeva izoliranih iz mlijeka krava s mastitisom, svi su bili rezistentni na beta-laktamske antibiotike (penicilin, ampicilin, cefoksitin, oksacilin) i tetraciklin.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Uzorci mlijeka

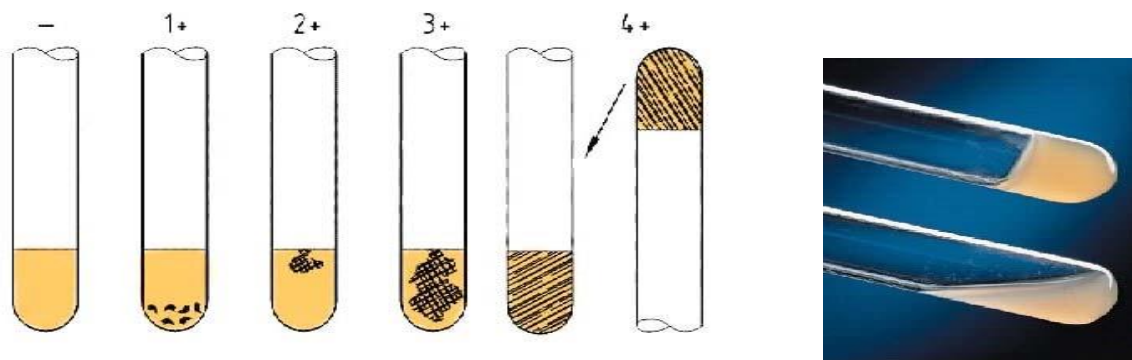
Uzorci mlijeka (n=319) uzimani su iz mljekomata (n=36) na području Zagreba, Zagrebačke županije i Siska u razdoblju prosinac 2015. do siječnja 2017. godine. Sirovo mlijeko iz automata uzorkovano je u sterilnu bocu (1 L) i transportovano u prijenosnom hladnjaku na temperaturi od + 4 ° C. Svi su uzorci čuvani u hladnjaku na temperaturi od + 4 ° C do vremena analize. Analiza mlijeka provedena je u roku od 12 sati od vremena uzorkovanja.

#### 3.2. Mikrobiološka analiza

Testni uzorci mlijeka za mikrobiološku analizu (25 ml) uzeti su na sterilan način te su načinjena serijska razrjeđenja radi određivanja broja stafilokoka u 1 ml uzorka. Inokulum od 0,1 ml ili 0,33 ml odabranih razrjeđenja je površinski nasaden na Baird-Parker agar (Merck, Darmstadt, Njemačka) te inkubiran na 37 ° C tijekom 48 sati. Nakon inkubacije određen je broj presumptivnih stafilokoka, temeljem morfologije kolonija i potvrdnog testa koagulaze.

##### 3.2.1. Koagulaza test

Odabrana kolonija (crna, prozirni halo uokolo kolonije) prebacuje se u epruvetu s Brain Heart Infusion bujon (Merck, Darmstadt, Njemačka) i inkubira 20 – 24 sata na 37 ° C. Potom se 0.3 mL otopine zečje plazme (EDTA rabbit plasma) ulije u epruvetu i dodaje 0.1 mL kulture (BHI s namnoženim sojem) i inkubira na 37 ° C. Svakih sat vremena provjerava se epruveta laganim nagnjanjem bez miješanja. Koagulaza test se smatra pozitivnim ukoliko je  $\frac{3}{4}$  sadržaja epruvete čvrsto.



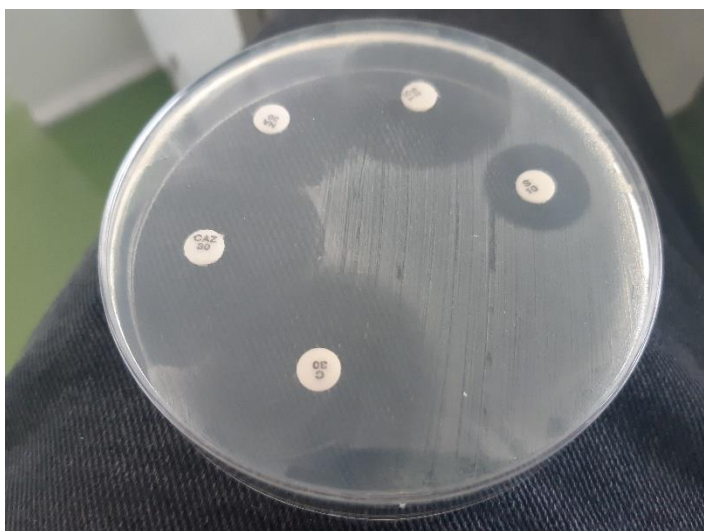
Slika 1. Koagulaza test

### 3.3. Testiranje osjetljivosti koagulaza-pozitivnih stafilokoka na antimikrobne tvari

Osjetljivost izolata koagulaza-pozitivnih stafilokoka ispitana je na 14 antimikrobnih tvari (tablica 3) primjenom Kirby-Bauer disk difuzijskog testa.

Tablica 3. Antimikrobne tvari i koncentracije ATB diskova korištene u istraživanju

Antimikrobna tvar	Koncentracija
penicilin	10IU
ampicilin	10 µg
ciprofloksacin	5
linezolid	30
ceftazidim	30
kanamicin	30
levofloksacin	5
eritromicin	15
trimetoprim/sulfametoksazol	25
tetraciklin	30
kloramfenikol	30
nitrofurantoin	300
teicoplanin	30
cefotaksim	30



Slika 2. Detalj disk difuzijskog testa (snimio N. Zdolec)



Načinjena je otopina bakterijskih stanica gustoće 0,5 McFarlanda (Denzimat, bioMerieux, Francuska) i nanesena sterilnim brisom trosmjerno na površinu Muller-Hintonovog agara (Biorad, Francuska). Potom je naneseno 6 antibiotskih diskova/ploči (Mastdisk) automatskim uređajem (slika 3). Nakon inkubacije od 18-20 h na 35 °C provjerena je pojava zona inhibicije rasta bakterije, i izmjerena širina zona u milimetrima (mm). Interpretacija rezultata provedena je prema kriterijima CLSI-a za stafilokoke (tablica)



Slika 3. Detalj agar difuzijskog testa (snimio: N. Zdolec)

Tablica 4. Kriteriji otpornosti stafilokoka na antimikrobne tvari (CLSI)

<b>Antimikrobna tvar</b>	<b>Zona (mm)</b>	<b>Antimikrobna tvar</b>	<b>Zona (mm)</b>
penicilin	< 28	tetraciklin	< 14
ampicilin	< 28	kloramfenikol	< 12
ciprofloksacin	< 15	nitrofurantoin	< 14
linezolid	< 20	teicoplanin	< 10
ceftazidim	< 14	cefotaksim	< 14
kanamicin	< 13	eritromicin	< 13
levofloksacin	< 15	trimetoprim/sulfametoksazol	< 10

#### 4. REZULTATI

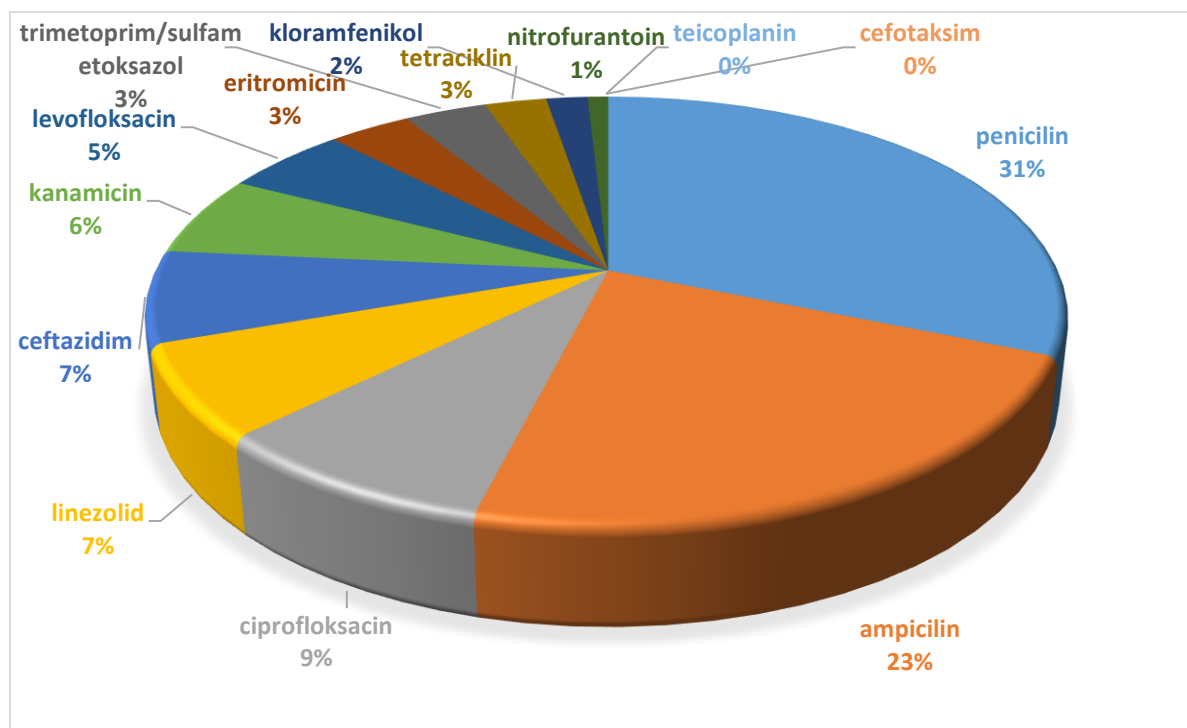
Tablica 5. Prikaz rezultata određivanja broja koagulaza-pozitivnih stafilokoka (KPS) u mlijeku iz mljekomata i nalaza rezistentnih KPS

Mjesec i godina uzorkovanja	prosinac 2015	siječanj 2016	veljača 2016	ožujak-travanj 2016	svibanj 2016	lipanj 2016	srpanj 2016	rujan 2016	listopad 2016	studenj 2016	prosinac 2016	siječanj 2017
Broj uzorkovanih mljekomata	26	25	25	32	27	26	25	25	27	28	26	27
Broj (%) mljekomata s KPS	4 (15,4)	10 (40)	5 (20)	13 (40,6)	6 (22,2)	5 (19,2)	13 (52)	8 (32)	7 (25,9)	6 (21,4)	4 (15,4)	7 (25,9)
Prosječni broj KPS (log cfu/ml)	3,09	2,47	2,65	2,51	2,31	2,76	2,04	2,65	2,73	2,81	3,09	3,27
Broj testiranih KPS na ATB*	4	10	5	9	4	5	-	8	-	6	3	6
Broj rezistentnih KPS (%)	4 (100)	7 (70)	4 (80)	4 (44,4)	3 (75)	4 (80)	-	6 (75)		2 (33,3)	2 (66,6)	5 (83,3)

\*kanamicin, eritromicin, nitrofurantoin, ampicilin, levofloksacin, teicoplanin, ciprofloksacin, penicilin, cefotaksim, tetraciklin, trimetoprim/sulfametoksazol, linezolid, kloramfenikol, ceftazidim

Tablica 6. Rezultati testiranja osjetljivosti KPS iz mlijeka na antimikrobne tvari

Antimikrobna tvar	Broj rezistentnih izolata	Broj osjetljivih izolata	% rezistentnih izolata
penicilin	36	24	60,0
ampicilin	26	34	56,6
ciprofloksacin	10	50	16,6
linezolid	8	52	13,3
ceftazidim	8	52	13,3
kanamicin	7	53	11,6
levofloksacin	6	54	10,0
eritromicin	4	56	6,6
trimetoprim/sulfametoksazol	4	56	6,6
tetraciklin	3	57	5,0
kloramfenikol	2	58	3,3
nitrofurantoin	1	59	1,6
teicoplanin	0	60	0
cefotaksim	0	60	0



Slika 4. Postotni udjel rezistentnih KPS (n=60)

## 5. RASPRAVA

Brojni čimbenici koji utječu na zdravlje i proizvodnost muznih životinja mogu se odraziti i na kakvoću i zdravstvenu ispravnost proizvedenog mlijeka. Spomenimo samo patogene mikroorganizme i njihove toksine koji putem mlijeka mogu završiti u organizmu potrošača i izazvati infekcije i intoksikacije većih razmjera, imajući na umu da je mlijeko namirnica široke potrošnje. U osnovi treba razlikovati primarnu mikrofloru tj. mikroorganizme koji su dospjeli u mlijeko iz vimena te sekundarnu mikrofloru koja naknadno onečišćuje mlijeko iz okoline (muzna oprema, posude za mlijeko, ruke mužača, spremnici za mlijeko, transport itd.).

U pogledu primarne mikroflore, treba naglasiti da mlijeko i u najhigijenskim uvjetima mužnje uvijek sadrži određen broj (500-1000 ili više u ml) mikroorganizama podrijetlom iz zdravog vimena, a radi se većinom o nepatogenim saprofitskim bakterijama (mikrokoki i dr.). Međutim, kod pojave različitih bolesti muznih životinja, posebice oboljenja vimena, u mlijeku se mogu naći i patogeni mikroorganizmi koji mogu ugroziti i zdravlje ljudi poput bakterija *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium bovis*, *Listeria monocytogenes* i drugih (ZDOLEC, 2011.). Istraživanja mikroflore sirovog mlijeka u Hrvatskoj ukazuju na povremen nalaz bakterije *L. monocytogenes* (ZDOLEC i sur., 2019.) te koagulaza pozitivnih stafilokoka. ZDOLEC i sur. (2016.b) su izolirali koagulaza pozitivne stafilokoke u 56 uzoraka u prosječnom broju od 3,39 log cfu/mL, a *E. coli* u 61 uzorku s prosječnim brojem od 2,54 log cfu/mL. Prosječan broj bakterija mliječne kiseline, *Pseudomonas* spp. i enterokokoka iznosio je 5,54 log cfu/mL, 5,55 log cfu/mL, odnosno 4,78 log cfu/mL *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolitica* te *Campylobacter* spp. nisu izolirane, što nije bio slučaj u drugim studijama (BIANCHI i sur., 2013.; GIACOMETTI i sur., 2013.), no u takvim usporedbama treba uzeti u obzir opseg studija i broj analiziranih uzoraka.

U pogledu prisutnosti koagulaza-pozitivnih stafilokoka u mlijeku, primarno *S. aureus* neupitno je da primarno potječu iz (oboljelog) vimena. Njihov nalaz u mlijeku iz mljekomata u velikom broju (npr. > 100.000/ml može biti rizičan za potrošače, jer se u takvoj razini kontaminacije može očekivati i sinteza enterotoksina. Sastav mikroflore mlijeka općenito je ovisan o brojnim čimbenicima pa i varijabilan s obzirom na primijenjenju farmsku i mljekarsku praksu, a pogotovo liječenje vimena. Navedimo samo istraživanje DOBRANIĆ i suradnika (2016.) koji su istražiti sastav mikroflore mlijeka krava s obzirom na zdravlje njihova vimena. Mlijeko je bilo uzorkovano od krava koje nisu nikada pokazivale znakove mastitisa (n=17) te krava koje su bile terapirane i pokazivale neki od oblika mastitisa (n=19), a potjecale su s 4

različite farme. Normiranim mikrobiološkim metodama određivan je broj aerobnih mezofilnih bakterija, psihrofilnih bakterija, bakterija mliječne kiseline, stafilokoka, *Escherichia coli*, enterokoka, enterobakterija, *Listeria* spp. te sulfitreducirajućih klostridija. U mlijeku zdravih krava broj aerobnih mezofilnih bakterija kretao se od 3- 3, 69 log cfu/ml, enterobakterija 0 – 3 log cfu/ml, enterokoka 0 – 3, 6 log cfu/ml, *E. coli* 0 – 3, 23 log cfu/ml, stafilokoka 0 – 4 log cfu/ml, psihrofilnih bakterija 0 – 3, 77 log cfu/ml te bakterija mliječne kiseline 0 – 3, 65 log cfu/ml. U mlijeku terapiраниh krava broj aerobnih mezofilnih bakterija kretao se od 3- 7 log cfu/ml, enterobakterija 0 – 4, 69 log cfu/ml, enterokoka 0 – 5 log cfu/ml, *E. coli* 0 – 3, 3 log cfu/ml, stafilokoka 2 – 3, 87 log cfu/ml, psihrofilnih bakterija 0 – 5, 17 log cfu/ml te bakterija mliječne kiseline 0 – 4, 77 log cfu/ml. Općenito autori su utvrdili brojniju mikrobnu populaciju različitih bakterijskih rodova u mlijeku krava koje su prethodno bile liječene antibioticima (mastitis), dok se broj stafilokoka nije značajno razlikovao s obzirom na status zdravlja vimena. Nastavno na to istraživanje, ZDOLEC i sur. (2016.a) su ispitali uvjetovanost pojave rezistencije stafilokoka u mlijeku krava s obzirom na zdravlje vimena odnosno prethodno liječenje vimena antibioticima. Stafilokoki izolirani iz uzoraka mlijeka liječenih krava, najčešće su bili otporni na klindamicin, penicilin, ampicilin, linezolid i eritromicin. Manji udio rezistentnih stafilokoka nađen je u uzorcima mlijeka iz zdravog vimena gdje je nađena najčešća rezistencija na penicilin (14,6 %), eritromicin i kanamicin (12,2 %). Nije bilo razlike u prisutnosti rezistencije na kloramfenikol, kanamicin ili sulfonamide u stafilokokima između dviju skupina. Promatrajući naše rezultate iz ovog rada, broj se koagulaza pozitivnih stafilokoka u mlijeku iz mljekomata između 2,04 do 3,09 log cfu/ml. S obzirom na rizik za potrošače, taj broj nije relevantan, jer se smatra da tek populacija stafilokoka iznad 100.000 cfu/ml može sintetizirati enterotoksine i uzrokovati intoksikaciju potrošača. Međutim, sukladno preporučenim mikrobiološkim kriterijima, ove srednje vrijednosti broja koagulaza-pozitivnih stafilokoka u mlijeku čine uzorke nesukladnima, jer nadvisuju najveću dopuštenu količinu bakterije od 10<sup>2</sup> cfu/ml (2 log cfu/ml).

U pogledu nalaza koagulaza pozitivnih stafilokoka s obzirom na broj pretraživanih mljekomata odnosno uzoraka (n=319), ukupno je 88 uzoraka sadržavalo ove bakterije, što čini 27,58 %. Osjetljivost na antimikrobne tvari testirana je kod 60 izolata, a postotak rezistentnih se ovisno o mjesecu uzorkovanja kretao od 33,3 do 100 %. Ukupno je 41 izolat bio otporan na najmanje jednu antimikrobnu tvar (68,33 %). Sukladno tablici 6 vidljivo je da je najveći broj izolata koagulaza-pozitivnih stafilokoka bio dominantno otporan na penicilin i ampicilin te ciprofloksacin, a potom linezolid, ceftazidim, kanamicin, levofloksacin itd. Naši su rezultati

sukladni nalazima drugih autora poput LESKOVEC i sur. (2015.). KALMUS i sur. (2011.) također nalaze da izolati bakterije *S. aureus* imaju visoku razinu otpornosti na penicilin (61,4%) i ampicilin (59,5 %). Međutim, u prijašnjim istraživanjima zabilježen je manji stupanj otpornosti prema penicilinu (BENIĆA i sur., 2003.) gdje je pronađeno samo 15 % rezistentnih. To pokazuje da se tijekom vremena povećava udio rezistentnih stafilokoka u mlijeku u RH kada usporedimo naše rezultate s rezultatima istraživanja početkom 21. stoljeća.

## **6. ZAKLJUČAK**

Koagulaza pozitivni stafilokoki prisutni su u gotovo trećini uzoraka mlijeka iz mljekomata, što je potencijalni rizik za potrošače sirovog mlijeka. Rizik se još više povećava s obzirom daje gotovo 70 % izolata rezistentno na antimikrobne tvari, pri čemu dominira rezistencija na penicilin i ampicilin.

## 7. LITERATURA

1. ANTUNAC, N., J. LUKAČ-HAVRANEK, D.SAMARŽIJA (1997.): Somatske stanice i njihov utjecaj na kakvoću i preradu mlijeka. *Mljekarstvo* 47 (3), 183-193.
2. BENIĆ, M., M. LOJKIĆ, D. MAJNARIĆ, Ž. MIHALJEVIĆ (2003.): In vitro osjetljivost uzročnika mastitisa na antimikrobne tvari. *Zbornik radova. IV srednjoeuropski bujatrički kongres, Lovran, 23.-27.04.*, 125-130.
3. BIANCHI, D. M., A. BARBARO, S. GALLINA, N. VITALE, L. CHIAVACCI, M. CARAMELLI, L. DECASTELLI, (2013.): Monitoring of foodborne pathogenic bacteria in vending machine raw milk in Piedmont. *Food Control*, 32, 435–439. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.004>
4. CLAEYS, W., S. CARDOEN, G. DAUBE, J. DE BLOCK, K. DEWETTINCK, K. DIERICK, L. DE ZUTTER, A. HUYGHEBAERT, H. IMBERECHTS, P. THIANGE, Y. VANDENPLAS, L. HERMAN (2013.): Raw or heated cow milk consumption: review of risks and benefits. *Food Control*, 31(1):251-263.
5. DOBRANIĆ, V., S. KAZAZIĆ, I. FILIPOVIĆ, N. MIKULEC, N. ZDOLEC (2016.): Composition of raw cow's milk microbiota and identification of enterococci by MALDI-TOF MS – short communication. *Vet. arhiv*, 86, 581-590.
6. ČAČIĆ, Z., S. KALIT, N. ANTUNAC, M. ČAČIĆ (2003.): Somatske stanice i čimbenici koji utječu na njihov broj u mlijeku. *Mljekarstvo* 53 (1), 23-36.
7. DE BUYSER, ML., B. DUFOUR, M. MAIRE, V. LAFARGE (2001.): Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 1-17.
8. EVEN, S., S. LEROY, C. CHARLIER, N.B. ZAKOUR, J.P. CHACORNAC, I. LEBERT, E. JAMET, M.H. DESMONTS, E. COTON, S. POCHET, P.Y. DONNIO, M. GAUTIER, R. TALON, Y. LELOIR (2010.): Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 87-95.
9. FEBLER, A., C. SCOTT, K. KADLEC, R. EHRICHT, S. MONECKE, S. SCHWARZ (2010.): Characterization of *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis, *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 619-625.



10. FREY, Y., J. P. RODRIGUEZ, A. THOMANN, S. SCHWENDENER, V. PERRETTEN (2013.): Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk. *J. Dairy Sci.* 96, 2247-2257.
11. GARIPCIN, M. E. SEKER (2015.): Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cattle and farm workers in Turkey. *Vet. arhiv* 85, 117-129.
12. GIACOMETTI, F., P. BONILAURI, A. SERRAINO, A. PELI, S. AMATISTE, N. ARRIGONI, M. BIANCHI, S. BILEI, G. CASCONI, D. COMIN, P. DAMINELLI, L. DECASTELLI, M. FUSTINI, R. MION, A. PETRUZZELLI, R. ROSMINI, G. RUGNA, M. TAMBA, F. TONUCCI, G. BOLZONI (2013.): Four-year monitoring of foodborne pathogens in raw milk sold by vending machines in Italy. *J. Food Protect.* 76 (11), 1902-1907. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-13-213
13. HADŽIOSMANOVIĆ, M. (2001.): Ocjena higijenske kakvoće mlijeka. Tečaj mastitisi. Projekt: Razvitak službi za potporu obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima. Zagreb
14. HUBER, H., S. KOLLER, N. GIEZENDANNER, R. STEPHAN, C. ZWEIFEL (2010.): Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin. Switzerland, 2009., *Euro Surveill.* 15 (16), pii=19542.
15. JAKI TKALEC, V., D. MAJNARIĆ, J. JURMANOVIĆ, B. HABRUN, Ž. CVETNIĆ, M. ZADRAVEC, B. ŠEOL MARTINEC (2015.): Meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*. *Mljekarstvo* 65 (4), 259-268.
16. JURMANOVIĆ, J., B. BAČANEK, I. PAVLJAK, T. SUKALIĆ, V. JAKI, D. MAJNARIĆ, A. KONČURAT, J. SOKOLIVIĆ (2012.): Susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections to different antimicrobial agents. *Medical Sciences* 37, 105-111.
17. KALENIĆ, S., M. PAYERL PAL, V. VLAHOVIĆ PALČEVSKI, J. HORVATIĆ, T. MEŠTROVIĆ, B. BARŠIĆ, V. STAMENIĆ, B. ALERAJ, M. BULJAN, N. GRŽALJA, I. BURCAR, A. KORUŠIĆ, M. VUČIĆ, R. ČIVLJAK, M. STANČIĆ, A. BUDIMIR (2008.): Smjernice za prevenciju, kontrolu i liječenje infekcija koje uzrokuje meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Liječ. Vjesn.* 130, 7-32.

18. KALMUS, P, B. AASMÄE, A. KÄRSSIN, T. ORRO, K. KASK (2011.): Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet. Scand.* 53 (4), 1-7.
19. KELLY, A.L. (2002.): Test methods and standards. *Encyclopedia of Dairy Sciences.* Academic Press. Vol 3., 1995 - 2002.
20. KITCHEN, B.J. (1981.): Review of the progress of Dairy Science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *J Dairy Res* 48, 167-188.
21. KLIMIENĖ, I., M. RUŽAUSKAS, V. ŠPAKAUSKAS, R. MOCKELIŪNAS, A. PERECKIENĖ, Č. BUTRIMAITĖ-AMBROZEVIČIENĖ (2011.): Prevalence of gram positive bacteria in cow mastitis and their susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Veterinary Medicine and Zootechnics* 56 (78), 65-72.
22. LESKOVEC, P., D. BENDELJA LJOLJIĆ, M. BENIĆ, A. KOSTELIĆ, Ž. CVETNIĆ, N. ANTUNAC (2005.): Uzročnici mastitisa i antimikrobne tvari. *Mljekarstvo* 65 (3), 149-158.
23. LI, J., H. ZHOU, L. YUAN, T. HE, S. HU. (2009.): Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang province, China, *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 10, 753-760.
24. MALINOWSKI, E., A. KŁOSSOWSKA, M. KACZMAROWSKI, H. LASSA, K. KUŹMA (2002.): Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from affected with mastitis cows. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 46, 289-294.
25. MEDVEĎOVÁ, A., A. STUDENIČOVÁ, L. VALÍK, Z. HORVÁTHOVÁ (2014.): Prevalence and growth dynamics of enterotoxinogenic *Staphylococcus aureus* isolates in Slovakian dairy products. *Czech J. Food Sci.* 32(4), 337-341.
26. MUIR, D.D. (1996.): The shelf-life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. *Int. J. Dairy Technol.* 49 (1) 24-32.
27. NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ, LJ. PINTER (2005.): Veterinarska mikrobiologija, Specijalna bakteriologija i mikologija, 195-199.
28. OLIVER, S.P., K.J. BOOR, S.C. MURPHY, S.E. MURINDA (2009.): Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Path. Dis.* 6(7), 792-806.

29. PEHAR, Z. (2019.): Molekularna detekcija bakterije *Listeria monocytogenes* u sirovom mlijeku. Diplomski rad, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
30. PELISSER, M.R., C.S. KLEIN, K.R. ASCOLI, T.R. ZOTTI, A.C.M. ARISIL (2009.): Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Braz. J. Microbiol.*, 40, 145-148.
31. RAJČEVIĆ, M., K. POTOČNIK, J. LEVSTEK (2003.): Correlations Between Somatic Cells Count and Milk Composition with Regard to the Season. *ACS* 68 (3), 221-226.
32. REKSEN, O., L. SØLVERØD, A.J. BRANSCUM, O. ØSTERAS (2006.): Relationships between milk culture results and treatment for clinical mastitis or culling in Norwegian dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89, 2928-2937.
33. RESCH, M., V. NAGEL, C. HERTEL (2008.): Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 99-104.
34. SHARMA, P., S. K. TOMAR, P. GOSWAMI, V. SANGWAN, R. SINGH (2014.): Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Res. Int.* 57, 176-195.
35. SIMEONI, D., L. RIZZOTTI, P. COCCONCELLI, S. GAZZOLA, F. DELLAGLIO, S. TORRIANI (2008.): Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci collected from the production chain of swine meat commodities. *Food Microbiol.* 25, 196-201.
36. TEALE, C.J., G.P. DAVID (1999.): Antibiotic resistance in mastitis bacteria. *Proceedings of the British Mastitis Conference*, 24-29.
37. TENHAGEN, B.A., G. KÖSTER, J. WALLMANN, O.W. HEUWIESER (2006.): Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci.* 89 (7), 2542-2551.
38. TEUBER, M. (2001.): Veterinary use and antimicrobial resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 493-499.
39. TOPOLKO, S. (2001.): Utjecaj hranidbe na zdravlje krava, sekreciju vimena i kakvoću sirovog mlijeka u obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima. *Mastitisi (tečaj - Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva RH i Svjetska banka)*, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, 67-83.

40. TRATNIK, LJ. (1998.): Mlijeko-tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 392.
41. VILTROP, A., M. ROASTO (2013.): Microbial risks to humans in Estonia in association with non-pasteurised milk consumption. Risk profile. Estonian University of Life Sciences, Tartu.
42. VRAGOVIĆ, N., D. BAŽULIĆ, N. ZDOLEC (2012.): Dietary exposure assessment of  $\beta$ -lactam antibiotic residues in milk on Croatian market. Croatian Journal of Food Science and Technology 4, 81-84.
43. VUČEMILO, M., B. VINKOVIĆ (2005.): Higijena mužnje. Krmiva 47, Zagreb, 327-332.
44. WEESE, J.S., H. DICK, B. WILLEY, A. MCGEER, B. KREISWIRTH, B. INNIS, D. LOW (2006.): Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household, *Vet. Microbiol.* 115, 148-155.
45. WILSON, D.J., R.N. GONZALES, H.H. DAS (1997.): Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J. Dairy Sci.* 80, 2592-2598
46. ZDOLEC, N. (2005.): Antibiotici - štetne tvari? *Mljekarski list* 6, 16 – 18.
47. ZDOLEC, N., M. HADŽIOSMANOVIĆ, L. KOZAČINSKI, Ž. CVRTILA, I. FILIPOVIĆ (2006.): Ostatci biološki štetnih tvari u mlijeku. *Mljekarstvo* 56, 191-202.
48. ZDOLEC, N. (2011.): Pravila higijenske mužnje. *Mljekarski list* 48, 5, 2 – 5.
49. ZDOLEC, N., V. DOBRANIĆ, G. ZDOLEC, D. ĐURIČIĆ (2013.): Koagulaza-negativni stafilokoki i bakterije mliječne kiseline, *Mljekarstvo* 63 (1), 30-35
50. ZDOLEC, N., V. DOBRANIĆ, I. BUTKOVIĆ, A. KOTURIĆ, I. FILIPOVIĆ, V. MEDVID (2016.a): Antimicrobial susceptibility of milk bacteria from healthy and drug-treated cow udder. *Vet. arhiv*, 86, 163-172
51. ZDOLEC, N., V. DOBRANIĆ, I. FILIPOVIĆ, M. KRGA, N. MIKULEC (2016.b): Nalaz patogenih bakterija i bakterija kvarenja u mlijeku iz mljekomata. Zbornik radova 6. Hrvatski Veterinarski Kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Harapin, Ivica (ur.), str. 155-160.
52. ZDOLEC, N. (2018.): Uvjeti kvalitete mlijeka iz mljekomata. *Gospodarski kalendar 2018*, *Gospodarski list*, Zagreb, 105-109.

53. ZDOLEC, N., D. JANKULOSKI, M. KIŠ, B. HENGL, N. MIKULEC (2019.):  
Detection and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of *Listeria*  
*monocytogenes* Isolates from Milk Vending Machines in Croatia. *Beverages*, 5,  
3, 46, 6.

## 8. SAŽETAK

Potrošnja mlijeka iz mljekomata popularna je u Hrvatskoj no potrebno je poznavati potencijalne rizike za potrošače u pogledu mikrobiološke sigurnosti. U radu je cilj bio ispitati prisutnost i brojnost koagulaza pozitivnih stafilocoka u mlijeku iz mljekomata (n=319), te testirati osjetljivost izolata na antimikrobne tvari tijekom jednogodišnjeg razdoblja. Broj koagulaza pozitivnih stafilocoka određen je prema HRN EN ISO 6888, a procjena otpornosti na kanamicin, eritromicin, nitrofurantoin, ampicilin, levofloksacin, teicoplanin, ciprofloksacin, penicilin, cefotaksim, tetraciklin, trimetoprim/sulfametoksazol, linezolid, kloramfenikol i ceftazidim pomoću disk difuzijskog testa. Prosječni broj koagulaza pozitivnih stafilocoka prema mjesecima uzorkovanja se kretao između 2,04 do 3,09 log cfu/ml. Ukupno je 88 uzoraka sadržavalo ove bakterije, što čini 27,58 %. Osjetljivost na antimikrobne tvari testirana je kod 60 izolata, a postotak rezistentnih se ovisno o mjesecu uzorkovanja kretao od 33,3 do 100 %. Ukupno je 41 izolat bio otporan na najmanje jednu antimikrobnu tvar (68,33 %). Najveći broj izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka bio je otporan na penicilin i ampicilin te ciprofloksacin, a potom linezolid, ceftazidim, kanamicin i levofloksacin.

Ključne riječi: mljekomat, mlijeko, koagulaza pozitivni stafilocoki, antimikrobna rezistencija

## 8. SUMMARY

### OCCURENCE OF RESISTANT COAGULASE POSITIVE STAPHYLOCOCCI IN MILK FROM VENDING MACHINES

Consumption of milk from vending machines is popular in Croatia, but it is necessary to evaluate the potential risks to consumers in terms of microbiological safety. The aim of this study was to examine the presence and counts of coagulase-positive staphylococci in raw milk from vending machines (n = 319), and to test the susceptibility of isolates to antimicrobials over a one-year period. The number of coagulase-positive staphylococci was determined according to HRN EN ISO 6888, and the assessment of resistance to kanamycin, erythromycin, nitrofurantoin, ampicillin, levofloxacin, teicoplanin, ciprofloxacin, penicillin, cefotaxime, tetracycline, trimethoprim / sulfamethoxidolol, linezolid, chloramphenicol and ceftazidim by disk diffusion method. The average number of coagulase-positive staphylococci by months of sampling ranged from 2.04 to 3.09 log cfu / ml. A total of 88 samples contained these bacteria (27.58 %). Sensitivity to antimicrobials was tested in 60 isolates and the percentage of resistant isolates varied from 33.3 to 100 % depending on the sampling month. A total of 41 isolates were resistant to at least one antimicrobial agent (68.33 %). The majority of coagulase-positive staphylococci were resistant to penicillin, ampicillin and ciprofloxacin, followed by linezolid, ceftazidime, kanamycin and levofloxacin.

Key words: vending machine, milk, coagulase-positive staphylococci, antimicrobial resistance

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 27. kolovoza 1993. godine u Varaždinu. Osnovnu školu grofa Janka Draškovića u Klenovniku završila sam 2008. godine. 2012. godine završila sam srednju školu Ivanec, smjer opća gimnazija te iste godine upisala integrirani preddiplomski i diplomski studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tokom studiranja volontirala sam na odjelu za konje Klinike za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju te Klinike za unutarnje bolesti. Također bila sam član studentske udruge „IVSA Croatia“ i u sklopu navedene udruge bila dio studentskih razmjena.