

# UTVRĐIVANJE ENTEROTOKSOGENOGA POTENCIJALA SOJEVA BAKTERIJE *Staphylococcus aureus* IZ SVJEŽEGA SIRA

---

Ljevaković-Musladin, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:178:664497>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Ivana Ljevaković-Musladin

**UTVRĐIVANJE ENTEROTOKSOGENOGA  
POTENCIJALA SOJEVA BAKTERIJE  
*Staphylococcus aureus*  
IZ SVJEŽEGA SIRA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



University of Zagreb  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Ivana Ljevaković-Musladin

**DETERMINATION OF  
ENTEROTOXIGENIC POTENTIAL OF  
*Staphylococcus aureus*  
ISOLATES FROM FRESH CHEESE**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu  
VETERINARSKI FAKULTET

Ivana Ljevaković-Musladin

**UTVRĐIVANJE ENTEROTOKSOGENOGA  
POTENCIJALA SOJEVA BAKTERIJE  
*Staphylococcus aureus*  
IZ SVJEŽEGA SIRA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:  
Prof. dr. sc. Lidija Kozačinski

Zagreb, 2022.



University of Zagreb  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Ivana Ljevaković-Musladin

**DETERMINATION OF  
ENTEROTOXIGENIC POTENTIAL OF  
*Staphylococcus aureus*  
ISOLATES FROM FRESH CHEESE**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:  
Full prof. Lidija Kozačinski, PhD

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu  
VETERINARSKI FAKULTET

## IZJAVA

Ja, *Ivana Ljevaković-Musladin*, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima do onih navedenih u radu.

---

(potpis studenta)

Zagreb, 2022.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Lidiji Kozračinski na vodstvu, savjetima te stručnoj i znanstvenoj pomoći. Hvala Vam na podršci i povjerenju koje ste mi pružili tijekom doktorskog studija i izrade doktorskog rada.

Također se zahvaljujem ravnatelju Zavoda za javno zdravstvo Dubrovačko-neretvanske županije dr. med. Matu Lakiću, spec. epidemiolog., njegovoj zamjenici Jeli Škrabić, dipl. iur. i voditeljici Odjela za računovodstvo i financije Ines Tokić, univ. bacc. oec. na sveobuhvatnoj potpori tijekom doktorskog studija i prilikom izrade doktorskog rada.

Zahvaljujem se kolegama iz Odjela za mikrobiologiju Dubrovnik Zavoda za javno zdravstvo Dubrovačko-neretvanske županije na pomoći u određivanju antibiotske osjetljivosti. Posebno se zahvaljujem dr. med. Marini Vodnici-Martucci, spec. mikrobiolog. i dr. med. Mariji Krilanović, spec. mikrobiolog. te glavnoj tehničarki Luci Njirić koje su mi omogućile navedena određivanja te svojim sudjelovanjem značajno doprinijele rezultatima ovoga rada.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Beniaminu Cenci Goga i dr. sc. Luci Grispoldiju sa Sveučilišta u Perugi na otvorenosti za suradnju te vremenu, radu i znanju uloženom u potvrđivanju genotipa mojih izolata.

Veliko hvala svim mojim kolegama iz Službe za zdravstvenu ekologiju Zavoda za javno zdravstvo Dubrovačko-neretvanske županije na podršci i razumijevanju.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj obitelji; roditeljima Đurđici i Zlatku, suprugu Ilinku te sinu Luki i kćeri Petri, koji su s puno strpljenja i razumijevanja prihvaćali moju zauzetost i predanost izradi doktorskog rada. Hvala vam na tolikoj ljubavi i podršci. Ovaj rad posvećujem Vama.

## SAŽETAK

Bakterija *Staphylococcus aureus* je vrlo često prisutna u svježim sirevima uslijed zagađenja, pri čemu rizik za zdravlje predstavljaju enterotoksogeni sojevi. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi razinu onečišćenja domaćih svježih sireva s bakterijom *S. aureus*; utvrditi prisutnost stafilokoknih enterotoksina u sirevima; odrediti fenotipska svojstva izolata *S. aureus*, uključujući antibiotsku osjetljivost te odrediti njihov enterotoksogeni potencijal. Enterotoksogeni potencijal određen je kombinacijom imunoloških metoda (VIDAS SET2 i RPLA) s ciljem određivanja proizvodnje klasičnih enterotoksina *in vitro* i molekularnih metoda (PCR i Real-time PCR) s ciljem određivanja gena za navedene enterotoksine. Domaći svježi sirevi proizvedeni na području grada Dubrovnika visoko su onečišćeni bakterijom *S. aureus*, međutim niti jedan uzorak sireva nije sadržavao stafilokokne enterotoksine. Svi izdvojeni sojevi posjedovali su tipična fenotipska svojstva karakteristična bakteriji *S. aureus* (protein A, slobodna i vezana koagulaza, katalaza, Dnaza, morfologija pod mikroskopom). Varijacije su uočene u „egg-yolk“ reakciji na Baird-Parker agaru i hemolizi na krvnom agaru te pojedinim biokemijskim reakcijama. Većina sojeva (58,8 %) je imala sposobnost  $\beta$ -hemolize, a kod čak 36,6 % je uočena dvostruka zona  $\alpha$ - i  $\beta$ -hemolize. Suprotno očekivanjima antibiotska rezistencija je nađena u vrlo malom postotku izolata (1,1 %) i ograničena je isključivo na mupirocin. Sposobnost proizvodnje enterotoksina *in vitro* je utvrđena kod 34 (19,4 %) od 175 izolata i to isključivo stvaranje enterotoksina C. Proizvodnja ostalih enterotoksina nije nađena. Lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu potvrđeno je da 34 (19,4 %) sojeva *S. aureus* izdvojenih iz svježeg sira posjeduju gen za stafilokokni enterotoksin C. Međutim, većina izolata (80,6 %) nije posjedovala gene za stafilokokne enterotoksine. Rezultati su pokazali da su sirevi bili onečišćeni enterotoksogenim i ne-enterotoksogenim sojevima *S. aureus*, što ukazuje na heterogenost populacije *S. aureus* u istom uzorku. U ovom je istraživanju uspostavljena nova Real-time PCR metoda, koja se pokazala visoko učinkovitom, ponovljivom i diskriminatornom između pozitivnih i negativnih rezultata. Potpuna podudarnost svih triju metoda (VIDAS SET2, RPLA i Real-time PCR) je utvrđena kod 172 od ukupnih 175 izolata (98,3 %), što znači da je korelacija između fenotipske i genotipske identifikacije vrlo visoka. Prikazani rezultati ukazuju da se proizvodnja enterotoksina *in vivo* ne može isključiti.

Ključne riječi: *Staphylococcus aureus*, sir, enterotoksogenost, stafilokokni enterotoksini



## EXTENDED ABSTRACT

### INTRODUCTION

Staphylococcal food poisoning is one of the most common food-borne diseases worldwide. The causative agents are enterotoxins produced by enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* during its growth in favorable conditions in food. Epidemiological data show that *S. aureus* is often found in raw milk cheeses and as a result cheeses are often implicated in food poisoning outbreaks (DE BUYSER et al., 2001; DELMAS et al., 2006).

The monitoring of domestic cheeses from the markets of the city of Dubrovnik so far has shown very poor microbiological quality (LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN et al., 2014; LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN et al., 2016). The authors state that as many as 80% of the cheeses examined were of unsatisfactory microbiological quality, and 70% of the cheeses contained high levels of *S. aureus*. Although none of the cheese samples contained staphylococcal enterotoxins (SE) (LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN et al., 2016), the high frequency and high level of contamination with *S. aureus* indicated the need for further investigation of enterotoxigenicity of isolates and assessment of the real risk of staphylococcal poisoning. It should be emphasized that the absence of SE in cheeses does not exclude the possibility of their production since it has not been investigated whether *S. aureus* isolates possess SE genes (LITTLE et al., 2008; ROSENGREN et al., 2010; ROLA et al., 2016). Many studies have shown that although SE was not detected in cheeses, *S. aureus* isolates carried one or more SE genes (MORANDI et al., 2007; CREMONESI et al., 2007; NORMANNO et al., 2007a; CARFORA et al., 2015; ROLA et al., 2016). Numerous enterotoxigenicity studies of *S. aureus* strains isolated from cheeses have shown remarkable diversity in the prevalence of enterotoxin genes worldwide.

Since there are no data on the nature of *S. aureus* isolated from cheese produced in Croatia, the aim of this study is to determine: i) the occurrence of *S. aureus* and staphylococcal enterotoxins SEA-SEE in domestic fresh cheeses; ii) phenotypic characteristics of isolates, including antibiotic susceptibility; iii) the ability to produce SEA-SEE enterotoxins *in vitro* by immunological methods; iv) the presence of SEA-SEE enterotoxin genes by molecular methods; v) the efficiency of newly established Real-time PCR method, including a comparison with other methods used.

## MATERIAL AND METHODS

***Cheese samples.*** A total of 30 fresh cheese samples (26 bovine, two caprine, and two bovine/caprine) were collected from the Dubrovnik city markets during 2018 and 2019. Cheeses were produced by 17 small-scale unregistered domestic producers or small family farms, with a production size of 1.5-4 kg of cheese per week and 1-2 cows and/or goats. None of the samples were refrigerated during sales on the market and many were exposed to direct sunlight during warm months, being sold on the stand. Cheese temperature was measured with a probe thermometer immediately after collection and samples were transported to the laboratory in a cooler within 15 minutes.

***Microbiological analyses of cheese.*** All cheese samples were analyzed according to HRN EN ISO 6888-1:2004 using Baird-Parker agar for the enumeration of coagulase-positive staphylococci. Ten colonies per cheese sample were used in further examinations. Colonies were identified as *S. aureus* based on the coagulase test (Merck Bactident<sup>®</sup> Coagulase plasma EDTA) and latex agglutination test for detection of fibrinogen affinity antigen, protein A, and capsular polysaccharides (Bio-Rad Pastorex<sup>™</sup> Staph Plus test).

***Physico-chemical analyses of cheese.*** Besides temperature, for all cheese samples, water activity and pH were measured. Water activity was measured by HygroPalm23-AW (Rotronic, Switzerland) according to HRN EN ISO 21808:2005, while pH was measured by pH meter Schott Lab 850 with BlueLine 27 electrode.

***Bacterial strains.*** A total of 175 isolates were collected from 18 cheese samples. All *S. aureus* isolates were tested for enterotoxin production and antibiotic susceptibility and their phenotypic characteristics were determined.

***Determination of phenotypic characteristics.*** Included Dnase and catalase test, Gram staining, hemolysis test, “egg yolk” reaction on Baird-Parker agar, and biochemical identification by bioMerieux API STAPH<sup>™</sup>.

***Antibiotic susceptibility testing.*** It was conducted according to the EUCAST disk diffusion method on Mueller-Hinton agar. The following antibiotics were tested: azithromycin, cefoxitin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, moxifloxacin, mupirocin, oxacillin, and trimethoprim-sulphamethoxazole. The interpretation of the results was conducted according to the EUCAST manual and criteria.

***Enterotoxin detection in cheese samples.*** Detection was performed according to HRN EN ISO 19020:2017, which included extraction followed by a concentration based on dialysis principle, and an immunoenzymatic detection using bioMerieux VIDAS<sup>™</sup> SET2 method.

**Detection of enterotoxin production in vitro.** All *S. aureus* isolates were examined for the production of SEA-SEE enterotoxins. Over-night TSB culture of well-isolated colonies from the Baird-Parker agar was examined for the presence of SEA-SEE by VIDAS™ SET2 and Thermo Scientific™ Oxoid™ RPLA methods.

**Detection of SEA-SEE genes.** Gene detection was performed by Real-time PCR and confirmed by classical PCR at Department of Veterinary Medicine, Laboratorio di Ispezione degli alimenti di origine animale, University of Perugia, Italy. The Real-time PCR method was a modified method described by NAKAYAMA et al. (2006) for the detection of *sea-see* genes.

**Method comparison.** Results from all three methods (VIDAS SET2, RPLA, and Real-time PCR) were compared whether they were in a full, partial, or negative agreement.

**Determination of Real-time PCR efficiency.** It was determined based on the standard curves of target genes (*sea-see*). Real-time PCR was performed on serial dilutions 1:10 of each of the target gene DNA. Standard curve was constructed based on Ct values versus log values of DNA concentrations. Slope value was used for calculation of efficiency according to the equation  $Eff = (10^{(-1/slope)} - 1) \cdot 100 \%$ . The intercept of the Y-axis determined the limit of detection.

## RESULTS

Out of 30 analyzed cheese samples, 18 samples (60%) were highly contaminated with *S. aureus* strains. The contamination level ranged from  $8.7 \times 10^3$  cfu/g to  $1.8 \times 10^6$  cfu/g, with an average  $6.9 \times 10^5$  cfu/g. The temperature of cheese samples varied between 6 °C and 23.3 °C, with an average of 12.5 °C. In thirteen cheese samples (43.3%) *S. aureus* number was above legal safety criteria of  $10^5$  cfu/g, at which enterotoxin production occurs. Although highly contaminated, staphylococcal enterotoxins were not detected in any of the cheese samples.

A total of 180 coagulase-positive isolates were collected from 18 cheese samples, 175 of which were confirmed as *S. aureus* by latex agglutination test and API STAPH. All isolates possessed phenotypic characteristics typical for *S. aureus* (protein A, bound and free coagulase, catalase, Dnase, morphology). Variations were found in certain biochemical reactions, including the „egg-yolk“ reaction and hemolysis pattern. „Egg yolk“ reaction was characteristic of 94 (53.7%) out of 175 isolates, 32 (18.3%) isolates showed weak „egg yolk“ reaction, while in 49 (28%) isolates the reaction was completely absent. Beta-hemolysis was observed in 103 (58.8%) isolates, while 64 (36.6%) isolates produced a double hemolysis zone. On the other

hand, 8 (4.6 %) isolates were non-hemolytic. Antibiotic resistance was detected in 1.1% of isolates and to mupirocin only.

Enterotoxin production was detected in 37 isolates (21.1%) by VIDAS SET2, among which 34 (19.4%) isolates produced enterotoxin SEC as detected by RPLA. Other classical enterotoxins were not detected. Three isolates detected by VIDAS SET2 were considered false positives since neither RPLA nor PCR methods confirmed enterotoxigenicity.

The percentage of enterotoxin-producing strains within one sample varied between 10% and 100%, which indicates a heterogeneous population of *S. aureus* in cheese. Cheese samples with enterotoxigenic strains were from the same two cheese producers.

Real-time PCR detected 34 (19.4%) isolates positive for enterotoxin gene *sec* but most of the isolates (80.6%) were not enterotoxigenic. Other classical genes were not detected. The presence of the *sec* gene was confirmed by the conventional PCR method as well. All strains that carried the *sec* gene were detected as SEC-producers by the RPLA method.

The modified Real-time PCR method for five classical enterotoxins had efficiencies between 97.0% and 105.1%, which are in the optimal range. The method proved to be very efficient, reproducible, and discriminatory between positive and negative results.

Comparison of three methods (VIDAS SET2, RPLA, and Real-time PCR) showed very high (98.3%) agreement between results.

## CONCLUSIONS

Domestic cheese produced in the Dubrovnik area is highly contaminated with *S. aureus* as a result of inappropriate hygiene during production, as well as inappropriate temperature regime during market sales and possibly during storage altogether. Although highly contaminated, staphylococcal enterotoxins were not detected in any of the cheese samples. This is mainly because most *S. aureus* isolates from our study were not enterotoxigenic.

All isolates possessed typical phenotypic characteristics of *S. aureus*. Antibiotic resistance was surprisingly very low and to mupirocin (which is used in human medicine) only.

Enterotoxigenic potential was found in 19.4% of isolates. Based on their enterotoxigenicity all isolates could be divided into two phenotypes/genotypes: non-enterotoxigenic and toxigenic

SEC phenotype (*sec* genotype) since only SEC production and *sec* gene were detected. Cheese samples were contaminated with the mixture of both, non-enterotoxigenic and SEC-producing strains.

The modified Real-time PCR method proved to be highly efficient, reproducible, and discriminatory. The combined use of immunological and molecular methods is strongly recommended.

Although the enterotoxigenic potential of *S. aureus* isolates from fresh cheese was lower than expected, it could be significantly increased due to horizontal gene transfer between enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains in the cheese population. Since certain strains possessed the *sec* gene and also were able to produce SEC *in vitro*, enterotoxin production *in vivo* could not be ruled out.

Education of cheese manufacturers about good hygiene practices, refrigeration of cheese during market sales, alongside better sanitary control and surveillance, could significantly improve the microbiological quality and safety of cheese produced in the Dubrovnik area.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, cheese, enterotoxigenicity, staphylococcal enterotoxins

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA</b> .....	<b>3</b>
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
2.1.1. Opća svojstva.....	5
2.1.2. Kolonizacija.....	8
2.1.3. Genom.....	9
2.1.4. Patogeneza i čimbenici virulencije.....	10
2.1.5. Antimikrobna rezistencija.....	11
2.2. Stafilocokni enterotoksini (SE).....	13
2.2.1. Općenito.....	13
2.2.2. Lokacije gena za SE i SEI.....	15
2.2.3. Svojstva stafilocoknih enterotoksina.....	18
2.2.4. Filogenetski odnosi unutar SE obitelji.....	20
2.2.5. Čimbenici koji utječu na proizvodnju SE.....	23
2.2.6. Učestalost nalaza stafilocoknih enterotoksina u hrani.....	25
2.3. Stafilocokno trovanje.....	26
2.4. Sirevi i <i>Staphylococcus aureus</i> .....	29
2.5. Učestalost nalaza enterotoksogenih sojeva <i>Staphylococcus aureus</i> .....	31
<b>3. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>34</b>
<b>4. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>35</b>
4.1. Materijal.....	35
4.2. Metode.....	36
4.2.1. Analiza sireva.....	37
4.2.1.1. Određivanje broja koagulaza-pozitivnih stafilocoka u sirevima.....	37
4.2.1.2. Određivanje stafilocoknih enterotoksina SEA-SEE u sirevima.....	37
4.2.1.3. Određivanje fizikalno-kemijskih parametara sireva.....	42
4.2.2. Analiza izdvojenih sojeva <i>Staphylococcus aureus</i> iz sireva.....	43
4.2.2.1. Aglutinacijski test za identifikaciju <i>S. aureus</i> .....	43
4.2.2.2. Određivanje fenotipskih svojstava <i>S. aureus</i> .....	44
4.2.2.3. Određivanje antibiotske osjetljivosti izdvojenih sojeva <i>S. aureus</i> .....	48

4.2.3. Određivanje sposobnost stvaranja enterotoksina <i>in vitro</i> .....	49
4.2.3.1. Priprema bakterijske kulture i proizvodnja enterotoksina <i>in vitro</i> .....	49
4.2.3.2. Određivanje enterotoksina SEA-SEE VIDAS SET2 metodom .....	50
4.2.3.3. Određivanje enterotoksina SEA-SEE RPLA metodom .....	50
4.2.4. Određivanje gena za enterotoksine SEA-SEE molekularnim metodama .....	51
4.2.4.1. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (Real-time PCR) .....	51
4.2.4.1.1. Izdvajanje DNA iz izdvojenih sojeva <i>S. aureus</i> .....	54
4.2.4.1.2. Real-time PCR protokol .....	54
4.2.4.1.3. Analiza rezultata .....	56
4.2.4.2. Lančana reakcija polimerazom (klasični PCR) .....	56
4.2.5. Određivanje učinkovitosti Real-time PCR reakcija.....	59
4.2.6. Statistička obrada podataka .....	60
<b>5. REZULTATI .....</b>	<b>61</b>
5.1. Analiza sireva i razina onečišćenja sa <i>Staphylococcus aureus</i> .....	61
5.2. Fenotipska svojstva izdvojenih sojeva <i>S. aureus</i> .....	65
5.3. Antibiotiska osjetljivost izdvojenih sojeva <i>S. aureus</i> .....	69
5.4. Sposobnost stvaranja enterotoksina SEA-SEE <i>in vitro</i> .....	70
5.5. Određivanje gena za enterotoksine SEA-SEE .....	72
5.6. Učinkovitost Real-time PCR reakcija.....	76
5.7. Usporedba metoda .....	79
<b>6. RASPRAVA.....</b>	<b>81</b>
<b>7. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>103</b>
<b>8. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>104</b>
<b>9. PRILOZI.....</b>	<b>137</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA .....</b>	<b>143</b>

## 1. UVOD

Iako prema nekim studijama pripadaju skupini najsigurnijih prehrambenih proizvoda (JOHNSON i sur., 1990.; LITTLE i sur., 2008.), sirevi su često navedeni kao potencijalni izvori patogena poput *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* i enterotoksogenog *Staphylococcus aureus* (DE BUYSER i sur., 2001.; KOUSTA i sur., 2010.; HENNEKINNE i sur., 2012.). Trovanja mlijekom i mliječnim proizvodima u Francuskoj, koja ima višestoljetnu i vrlo jaku tradiciju proizvodnje i konzumacije sireva, najčešće je povezano s bakterijom *S. aureus* (DE BUYSER i sur., 2001.; DELMAS i sur., 2006.).

Stafilokokno trovanje je jedna od najčešćih bolesti podrijetlom iz hrane, a posljedica je ingestije stafilokoknih enterotoksina koje proizvode enterotoksogeni sojevi bakterije *S. aureus*. Do danas su opisana 24 stafilokokna enterotoksina (SE), koji se mogu podijeliti u dvije skupine: klasični (SEA-SEE) i noviji (SEG-SEIY) (ARGUDÍN i sur., 2010.; PINCHUK i sur., 2010.; FISHER i sur., 2018.). Kod njih 18 je dokazana emetička aktivnost zbog čega predstavljaju potencijalnu opasnost za zdravlje ljudi (HENNEKINNE i sur., 2012.). Značajno svojstvo SE je da biološku aktivnost zadržavaju i nakon toplinske obrade mlijeka i/ili sirnog gruša, a direktna opasnost za zdravlje čovjeka je njihova otpornost na većinu proteolitičkih enzima probavnog sustava i nizak pH želuca (SAMARŽIJA i sur., 2007.). SEA, bilo sam ili u kombinaciji s ostalim SE/SEL, najčešće je izoliran enterotoksin iz hrane i smatra se najčešćim uzročnikom stafilokoknog trovanja diljem svijeta (WIENEKE i sur., 1993.; BALABAN i RASOOLY, 2000.; KÉROUANTON i sur., 2007.; VERAS i sur., 2008.; PINCHUK i sur., 2010.; HENNEKINNE i sur., 2012.).

Dosadašnji monitoring domaćih sireva s tržnica grada Dubrovnika pokazao je vrlo lošu mikrobiološku kvalitetu (LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN i sur., 2014.; LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN i sur., 2016.). Autori navode da je čak 80 % pretraženih sireva bilo nezadovoljavajuće mikrobiološke kakvoće, a 70 % sireva je sadržavalo visoke razine bakterije *S. aureus*. Iako niti jedan uzorak sira nije sadržavao stafilokokne enterotoksine (LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN i sur., 2016.) visoka učestalost i visoka razina onečišćenja bakterijom *S. aureus* ukazale su na potrebu daljnjeg istraživanja enterotoksogenosti izolata i procjenu stvarnog rizika od stafilokoknog trovanja. Treba naglasiti da odsutnost SE u sirevima ne isključuje mogućnost njihovog stvaranja budući nije istraženo posjeduju li izolata *S. aureus* gene za stvaranje SE (LITTLE i sur., 2008.; ROSENGREN i sur., 2010.; ROLA i sur., 2016.). Mnoge studije su pokazale da iako u sirevima nisu dokazani SE, izolati *S. aureus* su posjedovali



jedan ili više SE gena (MORANDI i sur., 2007.; CREMONESI i sur., 2007.; NORMANNO i sur., 2007.a; CARFORA i sur., 2015.; ROLA i sur., 2016.). Brojne studije enterotoksogenosti sojeva *S. aureus* podrijetlom iz sireva pokazale su iznimnu raznolikost u prevalenciji gena za enterotoksine diljem svijeta. Prema nekim istraživanjima *sec* gen je najčešće nađeni klasični gen kod sojeva *S. aureus* iz mlijeka i sireva (SCHERRER i sur., 2004.; KATSUDA i sur., 2005.; AKINEDEN i sur., 2008.; ROSENGREN i sur., 2010.; KAV i sur., 2011.; CAVICCHIOLI i sur., 2015.). Druga su pak istraživanja istaknula gen *sed* kao najučestaliji u mlijeku i sirevima (MORANDI i sur., 2007.; NORMANNO i sur., 2007.a; PELISSER i sur., 2009.; OSTYN i sur., 2012.; CARFORA i sur., 2015.; ROLA i sur., 2016.). Navedena istraživanja navode i visoku učestalost gena za novije enterotoksine, naročito *seg*, *sei*, *sej* i *ser*, često u kombinaciji s klasičnim genima, posebno genom *sed*.

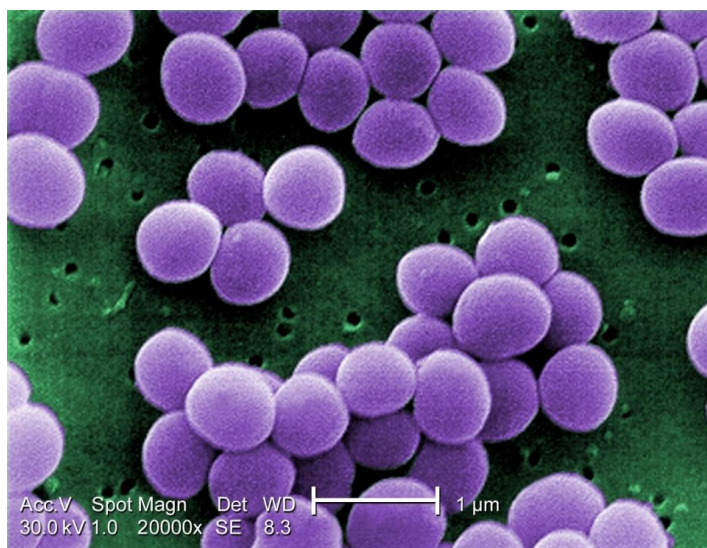
U Hrvatskoj dosad nije istražena enterotoksogenost izolata bakterije *S. aureus* iz hrane. Stoga je cilj ovog istraživanja utvrditi prisutnost bakterije *S. aureus* u domaćim svježim sirevima, odrediti fenotipska svojstva izolata, odrediti sposobnost stvaranja enterotoksina *in vitro* primjenom imunoloških metoda te primjenom molekularnih metoda (klasičnog PCR-a i PCR-a u stvarnom vremenu) utvrditi postojanje gena za enterotoksine.

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

### 2.1. *Staphylococcus aureus*

Stafilokoki su gram-pozitivni koki koji se mogu pojavljivati samostalno, u paru, tetradama, kratkim lancima ili kao karakteristične grozdaste nakupine. Rod pripada porodici *Staphylococcaceae* i sastoji se od više od 50 vrsta, od kojih tek desetak izaziva bolest u ljudi ili ih kolonizira. Najznačajnije su vrste *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis* i *Staphylococcus saprophyticus*. Klasifikacija unutar roda temelji se na sposobnosti stvaranja enzima koagulaze pa se tako razlikuju koagulaza-pozitivni (KPS) i koagulaza-negativni stafilokoki (KNS). Među KPS vrstama se nalaze i one koje se primjenjuje u prehrambenoj industriji jer su važne za fermentaciju mesa i mliječnih proizvoda. Određivanje stvaranja koagulaze je najčešće primjenjivana metoda diferencijacije unutar roda *Staphylococcus*. Koagulaza-pozitivne vrste se smatraju potencijalno patogenima za ljude i životinje i stvaraju je najvirulentniji sojevi (GRACE i FETSCH, 2018.). Vrsta *S. aureus* je najznačajniji i najvirulentniji predstavnik roda *Staphylococcus* i porodice *Staphylococcaceae*.

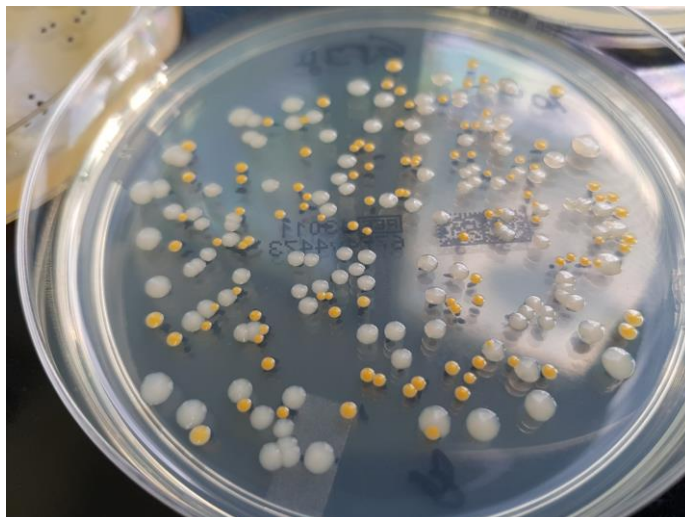
Stafilokoke je prvi put izolirao škotski kirurg Alexander Ogston 1880. godine iz gnojnog sadržaja u ljudi. Ime su dobili po izgledu preparata pod mikroskopom, a izvedeno je iz grčkih riječi *staphyle* što znači grozd i *kokkos* što znači bobica.



**Slika 1.** *Staphylococcus aureus* pod elektronskim mikroskopom (boja je dodana).

(izvor: CDC/Public Health Image Library, Matthew J. Arduino i Janice Haney Carr, ID #11157)

Šest godina kasnije, 1886. godine njemački kirurg Anton J. Rosenbach izolirao je čiste kulture dvije vrste stafilokoka, od koji je jedan bio *S. aureus*. Ime je dobio po zlatno-žutoj boji kolonija, koja je posljedica stvaranja pigmenta stafiloksantina.



**Slika 2.** Zlatno-žute kolonije bakterije *Staphylococcus aureus* na TSA agaru  
(foto: I. Lj. Musladin)

Taksonomija zlatnog stafilokoka prema Bergeyevu priručniku za sistematsku bakteriologiju (LUDWIG i sur., 2009.) je prikazana u tablici 1.

**Tablica 1.** Taksonomija *Staphylococcus aureus* (LUDWIG i sur., 2009.)

<b>Nadcarstvo (super-regnum)</b>	Procaryota
<b>Carstvo (regnum)</b>	<i>Monera</i>
<b>Koljeno (phylum)</b>	<i>Firmicutes</i>
<b>Razred (classis)</b>	<i>Bacilli</i>
<b>Red (ordo)</b>	<i>Bacillales</i>
<b>Porodica (familia)</b>	<i>Staphylococcaceae</i>
<b>Rod (genus)</b>	<i>Staphylococcus</i>
<b>Vrsta (species)</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>

Molekularne analize i patogeneza sugeriraju da je predak-domaćin ove bakterije upravo čovjek, te da se tisućljećima prenosi s čovjeka na čovjeka (GRACE i FETSCH, 2018.). Molekularna epidemiologija pak sugerira da je tijekom ljudske povijesti nekoliko puta došlo do prijenosa (skoka) bakterije s čovjeka na životinje i rjeđe do prijenosa sa životinja na ljude (SHEPHEARD i sur., 2013.). WEINERT i sur. (2012.) smatraju da je do prvog skoka s ljudi na životinje došlo prije 5500 godina u začecima stočarstva i prilikom pripitomljavanja stoke u Starom svijetu.

Kao i ostali stafilokoki *S. aureus* je prvenstveno komensal, međutim o njemu se najviše piše zbog njegove izražene oportunističke patogenosti. Patogenost ove bakterija proizlazi iz kombinacije invazivnosti, virulencije (posredovane toksinima i enzimima) i antibiotske rezistencije. Jedan je od glavnih patogena bilo kod bolničkih infekcija ili infekcija u zajednici (LOWY, 1998.). Osim kod ljudi, *S. aureus* je i životinjski patogen. Životinjski sojevi su obično specifični za pojedine životinje i normalno nisu prisutni kod ljudi. Osobito su značajni u mliječnoj industriji budući su najčešći uzročnici mastitisa kod muznih krava, ovaca i koza. *S. aureus* je značajan patogen podrijetlom iz hrane i stafilokokno trovanje hranom je jedna od najčešćih bolesti podrijetlom iz hrane diljem svijeta (GRACE i FETSCH, 2018.). S obzirom na spomenutu patogenost i otpornost na velik broj antibiotika, o fiziologiji upravo ove vrste je objavljen izuzetno velik broj radova.

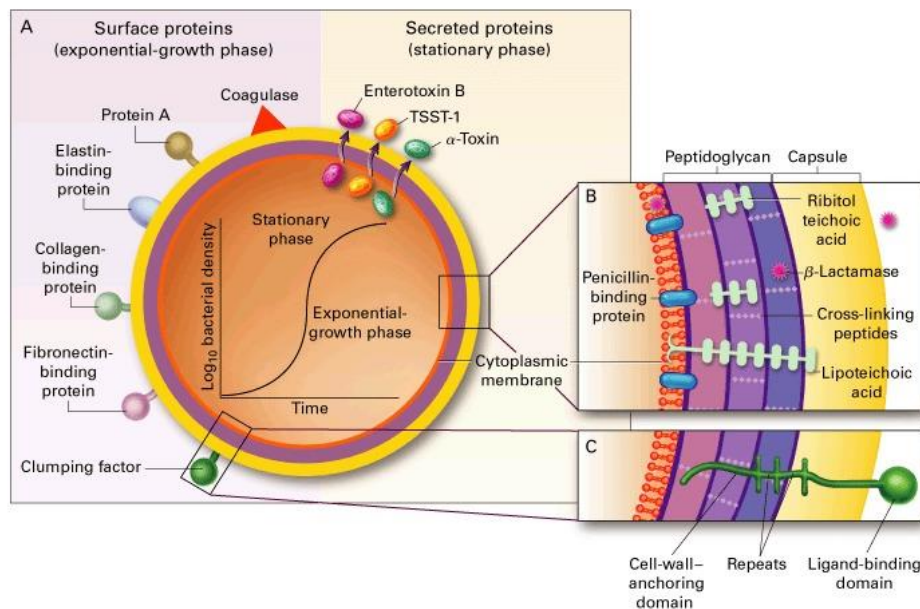
### 2.1.1. Opća svojstva

Zlatni stafilokok je nesporena nepokretna Gram-pozitivna bakterija. Iznimno je prilagodljiv okolišnim uvjetima i domaćinima te svestran u proizvodnji brojnih čimbenika virulencije, uključujući i antimikrobnu rezistenciju. Kako spada u aerobe i fakultativne anaerobe, ima respiratorni i fermentativni metabolizam, stoga je katalaza pozitivan i oksidaza negativan. Fermentira velik broj šećera, između ostalog glukozu, laktozu, maltozu i manitol u aerobnim i anaerobnim uvjetima stvarajući kiseline. Važno svojstvo *S. aureus* je stvaranje enzima koagulaze. Određivanje stvaranja ovog enzima spada u najvažniji dijagnostički postupak prilikom utvrđivanja/potvrđivanja identiteta. Enzim Dnaza (u literaturi se nalazi i pod nazivom termostabilna nukleaza) koju *S. aureus* stvara, je također važan dijagnostički parametar.

*S. aureus* ima tipičnu staničnu stijenku gram-pozitivnih bakterija, izgrađenu od peptidoglikana koja se sastoji od lanaca N-acetilmuraminske kiseline (NAM) i N-acetilglukozamina (NAG), međusobno umreženih pentaglicinskim mostovima koji su specifični za *S. aureus* (slika 3.).

NAM i NAG u naizmjeničnom rasporedu su međusobno povezani 1,4- $\beta$  vezama te uz pentaglicinske mostove dodatno su unakrsno vezane tetrapeptidnim lancima. Ovakva stanična stijenka je otporna na djelovanje lizozima, ali je osjetljiva na djelovanje lizostafina koji specifično cijepa pentaglicinski most. Smatra se da peptidoglikan djeluje poput endotoksina, stimulirajući oslobađanje citokina iz makrofaga, aktiviranje komplementa i agregaciju trombocita (LOWY, 1998.).

Većina stafilokoka stvara oko stijenke polisaharidnu kapsulu, koja imaju antifagocitnu ulogu (djeluje kao zaštitni antigen koji blokira fagocitozu). Temeljem razlika u mikrokapsularnim polisaharidima identificirano je 11 različitih serotipova. 70-80 % infekcija kod ljudi uzrokovano je sojevima koji posjeduju kapsule tipa 5 i 8 (BECKER, 2018.).



**Slika 3.** Strukturna građa bakterije *Staphylococcus aureus* (izvor: LOWY, 1998.)

Na površini stanice se nalaze površinski proteini, koji su također ključni čimbenici za adheziju bakterija na površine, što je prvi ključni korak u procesu kolonizacije i stvaranja biofilma. Primjer jednog takvog površinskog proteina je protein A, čija je uloga zaobilaznje imunološkog sustava. Komercijalni aglutinacijski testovi za identifikaciju *S. aureus* poput PASTOREX™ STAPH-PLUS kita koji je korišten u ovom istraživanju se temelje između ostalog na nalazu ovog proteina.

Ovakva umrežena stanična stijenka i kapsula osiguravaju stafilokokima čvrstu i otpornu strukturu, koja im omogućava otpornost i preživljavanje u različitim uvjetima okoliša. *S. aureus* raste u rasponu od 7 °C do 48 °C, s optimumom oko 37 °C (SCHMITT i sur., 1990.). Lako se uništava temperaturom pasterezacije, ali joj otpornost na temperaturu raste u suhoj hrani i hrani s visokim udjelom masti. Vrlo je otporna na zamrzavanje i odmrzavanje te dobro preživljava u hrani čuvanoj na temperaturi  $\leq -20$  °C (KADARYIA i sur., 2014.). Što se tiče aktiviteta vode ( $a_w$ ), *S. aureus* može rasti na nižim vrijednostima u odnosu na druge ne-halofilne bakterije. Minimalni  $a_w$  iznosi 0,83-0,86, što je ekvivalent 20% NaCl (TATINI, 1973.; TROLLER i STINSON, 1975.), dok je optimum  $a_w > 0,99$  (TATINI, 1973.; SMITH i sur., 1983.). Većina sojeva *S. aureus* raste između pH 4 i 10, s optimumom 6-7. Ukoliko ostali čimbenici postanu nepovoljni, raspon tolerancije pH se smanjuje (SMITH i sur., 1983.). *S. aureus* je fakultativno anaerobna bakterija koja najbolje raste uz prisutnost kisika. U anaerobnim uvjetima rast je usporen te i nakon nekoliko dana broj bakterija ne doseže broj koji bi se stvorio u aerobnim uvjetima. Razina otopljenog kisika ima vrlo važnu ulogu. U anaerobnim uvjetima na 37 °C generacijsko vrijeme je duže i iznosi 80 minuta, za razliku od aerobne inkubacije na 37 °C pri kojoj je generacijsko vrijeme 35 minuta (BELAY i RASOOLY, 2002.).

Ova bakterija ne raste dobro u prisutnosti kompetitivne flore. Do inhibicije rasta dolazi uglavnom zbog kiselih produkata, smanjenja pH, stvaranja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i ostalih inhibitornih supstanci poput antibiotika, organskih kiselina ili nutritivne kompeticije (HAINES i HARMON, 1973.; GENIGEORGIS, 1989.).

*S. aureus* je mikroorganizam koji je tolerantan na sušenje/isušivanje te stoga ima izrazitu sposobnosti preživljavanja u suhom i stresnom okolišu, kao što su ljudska koža ili nosna šupljina. Lako se raspršuje u zraku i prenosi različitim materijalima, tako su površine i odjeća također epidemiološki značajne za prijenos ove bakterije (CHAIBENJAWONG i FOSTER, 2011.).

Dio životnog stila *S. aureus* je stvaranje biofilma, sjedalačke zajednice mikroorganizama izgrađene od stanica vezanih na površinu, koje su ugrađene u vlastito proizvedeni izvanstanični matriks i s izmijenjenim fenotipskim i genotipskim osobinama koje im omogućavaju prilagodbu različitim okolišnim uvjetima. Biofilm *S. aureus* je nađen na različitim površinama poput ljudskih tkiva ili implantiranih medicinskih pomagala (katetera, umjetnih srčanih zalisaka, koštanih i zglobnih proteza). Stvaranje biofilma predstavlja posebnu opasnost u prehrambenoj industriji s obzirom da može biti stalni izvor patogenih mikroorganizama i

uzročnika kvarenja hrane te predstavljati stalni rizik križnog zagađenja (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ i RODRÍGUEZ-LÓPEZ, 2018.).

Sojevi *S. aureus* se mogu podijeliti na ekovare specifične za domaćine i biotipove koji nisu specifični za domaćine (engl. Non-Host Specific, NHS). Pojmom ekovar se označavaju biotipovi za koje je jasno da su specifični za jednu životinjsku vrstu ili povezane vrste (npr. ovce i koze). Ovisno o ljudskom ili životinjskom podrijetlu te biokemijskim svojstvima *S. aureus* se dijeli na pet ekovara: ljudski, ne- $\beta$ -hemolitički ljudski, ptičji, kravliji i ovčji te jedan NHS biotip (DEVRIESE, 1984.).

### **2.1.2. Kolonizacija**

Interakcije *S. aureus* s domaćinom uključuju jednu od tri mogućnosti: infekciju, kolonizaciju (kliconoštvo) ili kontaminaciju. Kao komensalna bakterija *S. aureus* kolonizira kožu i mukozne membrane (sluznice) ljudi širom svijeta. Ljudi koji su kolonizirani ovom bakterijom imaju povećani rizik od endogenih stafilokoknih infekcija (WERTHEIM i sur., 2005.), odnosno oni su izvor ove bakterije u zajednici, bolničkim okruženjima ili proizvodnji hrane.

Glavno stanište *S. aureus* jest nosna šupljina (WILLIAMS, 1963.), a dodatno mogu biti (manje učestalo) kolonizirani sluznica orofarinksa, koža, kosa, perineum, vagina, probavni sustav i aksile (KLUYTMANS i sur., 1997.). Nazalno kliconoštvo se smatra izvorom kolonizacije ostalih tjelesnih niša (MUENKS i sur., 2016.). Do prijenosa bakterije dolazi kapljičnim putem i dodirrom između domaćina. Ruke su glavni vektor prijenosa kojim *S. aureus* ulazi u nosnu šupljinu stoga do kolonizacije nosne šupljine dolazi kada se bakterija unese u nos onečišćenim rukama. Kliconoštvo u nosu usko je povezano s kliconoštvom na rukama (SOLBERG, 1965.).

Temeljem rezultata longitudinalnih studija nositelji bakterije *S. aureus* su se svrstavali u jednu od kategorija: trajni nositelji te ostali (KLUYTMANS i sur., 1997.; WERTHEIM i sur., 2005.; VAN BELKUM i sur., 2009.). Trajna kolonizacija nosne šupljine ustanovljena je kod 20-30 % ljudske populacije, dok je kod ostalih ustanovljen promjenjivi status kliconoštva (WERTHEIM i sur., 2005.; VAN BELKUM i sur., 2009.). Trajni nositelji imaju veće bakterijsko opterećenje, stoga i veći rizik od infekcije, a ujedno je i njihova disperzija bakterija znatno veća (WERTHEIM i sur., 2005.). Ostali nositelji su povremeni nositelji i većina osoba tijekom života biva povremeno i prolazno izložena bakteriji (MULCAHY i MCLOUGHLIN, 2016.).

Trajni nositelji mogu biti kolonizirani različitim sojevima *S. aureus* unutar iste anatomske niše što otvara mogućnost horizontalnog prijenosa gena rezistencije i/ili čimbenika virulencije (MUENKS i sur., 2016.). Više mehanizama dovodi do kolonizacije nosne šupljine, međutim ključna su tri čimbenika: domaćin, sami patogen i okoliš (MULCAHY i McLOUGHLIN, 2016.). Optimalno podudaranje između domaćina i bakterije je ključno za kolonizaciju, a za ne-nositelje se smatra da su sami po sebi otporni vjerojatno kao posljedica antagonizma između *S. aureus* i mikroflore prisutne u njihovoj nosnoj šupljini (NOUWEN i sur., 2004.).

Proteklih godina je velik broj studija o kolonizaciji *S. aureus* pokazao da je u općoj populaciji kliconoštvo u padu, najvjerojatnije zbog poboljšanja osobne higijene i uvjeta života (WERTHEIM i sur., 2005.; STROMMENGER i sur., 2018.). Prema STROMMENGERU i sur. (2018.) najnižu stopu kliconoštva od 20 do 30 % imaju Centralna Europa, SAD, Kina i Japan, dok je najviša stopa kliconoštva utvrđena u Južnoj Americi i kreće se između 30 % i 60 %.

### 2.1.3. Genom

Kao i kod svih prokariotskih stanica, genetski materijal *S. aureus* čini kružni kromosom (dvolančana DNA molekula) raspršen u citoplazmi, veličine otprilike 2.8 Mbp (mlijuna parova baza) s relativno malim sadržajem G+C nukleotida. LOWY (1998.) je prvi naveo da se genetski materijal *S. aureus* sastoji od kružnog kromosoma te profaga, plazmida i transpozona.

Sekvencioniranja cijelog genoma izolata *S. aureus* i njihove usporedbe ustanovile su da genomi imaju visoko klonsku strukturu, međusobno su kolinearni te se sastoje od stabilne stalne komponente (osnovni genom) koja sadrži gene u istom redoslijedu prisutne kod svih sojeva i vrlo varijabilne komponente (pomoćni genom) koja sadrži gene prisutne samo kod nekih sojeva (KURODA i sur., 2001.; BABA i sur., 2002.; HOLDEN i sur., 2004.; BABA i sur., 2008.). Osnovni genom *S. aureus*, koji je visoko sačuvan u nizu klonskih loza (engl. clonal lineages) čini ~75 % genetskog materijala. Osim gena zaduženih za centralni metabolizam i ostalih domaćinskih (engl. house-keeping) gena, na osnovnom genomu se nalaze i geni koji upravljaju čimbenicima virulencije poput proteina koji se vežu na površine, toksina, egzoenzima te biosintetičkih dijelova za kapsulu. Gen za enzim koagulazu, koja je karakteristična za *S. aureus* i temelj njegove dijagnostike nalazi se u sklopu osnovnog genoma na kromosomu. Međutim, neki od ovih gena ili varijante gena se nalaze i na mobilnim genetskim elementima (LINDSAY i HOLDEN, 2004.).



Pomoćni genom čini ~25 % genetskog materijala, a sastoji se uglavnom od mobilnih genetskih elemenata (MGE) koji se horizontalno prenose između sojeva i jedinstven je za pojedine sojeve. Mobilni genetski elementi su dvolančane molekule DNA, koje kodiraju čimbenike koji im omogućavaju kretanje unutar ili između genoma (LINDSAY i HOLDEN, 2006.; LINDSAY, 2010.). Kod *S. aureus* glavni MGE uključuju plazmide, bakteriofage, otoke patogenosti (SaPI), stafilokokne kazetne kromosome (engl. Staphylococcal cassette chromosome, SCCs) i transpozone. Mnogi MGE nose gene virulencije ili rezistencije na antibiotike, biocide, metale ili metaloide, stoga imaju vrlo značajne kliničke implikacije. Tako se geni za enterotoksine, koji su predmet ovog istraživanja, nalaze kao pomoćni geni na profagima, otocima patogenosti i plazmidima (LINDSAY i HOLDEN, 2004.). Geni virulencije su češće smješteni na fagima i otocima patogenosti, dok su geni rezistencije češći na plazmidima, SCC i transpozonima (LINDSAY i HOLDEN, 2006.).

Konzervirani osnovni geni su očuvani vertikalnim nasljeđivanjem, dok su varijabilni geni posljedica uglavnom horizontalnog prijenosa gena. Svaki soj *S. aureus* nosi vlastitu jedinstvenu kombinaciju MGE u kromosomu. MGE koji su kod nekih sojeva prisutni, a kod drugih odsutni dokaz su česte rekombinacije i razmjene genetskog materijala između sojeva, ali i gubitka pojedinog genetskog materijala (LINDSAY, 2010.). Prisutnost MGE može značajno promijeniti patogeni i rezistencijski potencijal soja. Horizontalni prijenos MGE ima ogroman utjecaj na zdravlje budući dovodi do pojave virulentnijih i rezistentnijih sojeva poput MRSA, VRSA (vankomicin-rezistentni *S. aureus*) i PV-toksin sojeva (Panton-Valentine toksin) (LINDSAY i HOLDEN, 2004.). Genetski elementi koji kodiraju stafilokokne enterotoksine koji su predmet ovoga istraživanja su opisani u poglavlju 2.2.2.

#### **2.1.4. Patogeneza i čimbenici virulencije**

*S. aureus* uzrokuje široki spektar akutnih i kroničnih infekcija (često s ozbiljnim posljedicama) te bolesti uzrokovane toksinima. Čimbenici virulencije koje proizvodi uključuju: patogene antigene, kapsulu, površinske proteine, sekretorne enzime (proteaze, kolagenaze, sfingomijelinaze, lipaze i nukleaze), toksine koji oštećuju membrane (hemolizine i leukocidine), toksin sindroma toksičnog šoka (Toxic Shock Syndrome Toxin, TSST), proteine koji napadaju ili izbjegavaju imunološki sustav te stafilokokne enterotoksine (SE) i toksine slične stafilokoknim enterotoksinima (SEI) (OTTO, 2014.).

Piogene i/ili sistemske infekcije koje uzrokuje *S. aureus* uključuju: infekcije epidermisa, infekcije površinskog i dubokog dermisa, infekcije subkutanog tkiva, infekcije rana, mastitis, meningitis, pneumonije, infekcije kosti i zglobova, primarni piomiozitis, endokarditis, te sindrom stafilokokne sepse (LOWY, 1998.). Bolesti uzrokovane toksinima uključuju stafilokokno trovanje i sindrom toksičnog šoka (SPAULDING i sur., 2013.).

Egzotoksini (toksini koji se izlučuju iz stanice) koje proizvodi *S. aureus* doprinose njegovoj sposobnosti kolonizacije i agresivnom potencijalu da uzrokuje bolest kod domaćina. Pretpostavlja se da je glavna funkcija ovih toksina pretvaranje lokalnog tkiva domaćina u nutrijente potrebne za bakterijski rast. Neki sojevi proizvode jedan ili više dodatnih egzoproteina, koji uključuju toksin sindroma toksičnog šoka (TSST-1), stafilokokne enterotoksine (SE), ekfolijativne toksine (ETA i ETB) i leukocidin (DINGES i sur., 2000.).

U dijagnostici *S. aureus* najznačajniji je enzim slobodna koagulaza, koja se još naziva stafilokoagulaza (CoA). Ovaj polipeptid se neenzimatski veže na protrombin u plazmi, formirajući stafilotrombin te katalizira pretvorbu fibrinogena u fibrin. Stvaranje fibrina rezultira stvaranjem ugrušaka na površini patogena s ciljem sprječavanja fagocitoze (CHENG i sur., 2010.). Osim ove koagulaze, *S. aureus* stvara i vezanu koagulazu, protein vWbp (von Willebrand factor), koja se direktno veže za fibrinogen i dovodi do njegovog prijelaza u fibrin. Vezana koagulaza preferencijalno aktivira humani protrombin, dok stafilokoagulaza bez razlike jednako zgrušava humanu, zečju i i mišju plazmu (BJERKETORP i sur., 2004.). Već prethodno spomenuti koagulaza test se temelji na određivanju slobodne koagulaze, dok se aglutinacijski test PASTOREX™ STAPH-PLUS koji je korišten u ovom istraživanju temelji na određivanju vezane koagulaze, proteina A i kapsularnog polisaharida. Određivanje enzima termostabilne nukleaze (DNaze), koja ima sposobnost razgradnje DNA je vrlo koristan dijagnostički alat u identifikaciji vrste *S. aureus*.

### **2.1.5. Antimikrobna rezistencija**

Bakterija *S. aureus* se odlikuje izuzetnom sposobnošću prilagodbe na sve vanjske uvjete pa tako i na djelovanje antimikrobnih lijekova. Dosad objavljeni radovi pokazali su da *S. aureus* može djelovati i kao donor i kao recipijent gena rezistencije, koji su smješteni na mobilnim genetičkim elementima. *S. aureus* vrlo lako razvija rezistenciju na sve klase antibiotika

mutacijom postojećeg gena ili horizontalnim prijenosom gena prilikom interakcije s ostalim bakterijama (FEßLER i sur., 2018).

Rezistencija na  $\beta$ -laktame, tetracikline, makrolide, trimetoprim ili aminoglikozide koji se već dugo vrijeme primjenjuju u humanoj i veterinarskoj medicini prisutna je i kod ljudskih i životinjskih izolata (FEßLER i sur., 2018). Istraživanja antimikrobne rezistencije *S. aureus* također se provode i kod izolata podrijetlom iz hrane životinjskog podrijetla. KLUYTMANS (2010.) navodi rezultate istraživanja provedenih u Nizozemskoj, SAD-u i Kanadi prema kojima je meticilin-rezistentni *S. aureus* (MRSA) podrijetlom od životinja prisutan u 11,9 % sirovog mesa u Nizozemskoj te 5 % u SAD-u i 7,7 % u Kanadi.

S obzirom na prisutnost MRSA-e u mesu, Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) je objavila znanstveno mišljenje o javnozdravstvenom značaju MRSA-e iz životinja i hrane (EFSA, 2009.). Službeni stav EFSA-e je da hrana teoretski može biti potencijalni vektor prijenosa MRSA-e na ljude te može predstavljati potencijalni rizik za ljudsko zdravlje. Međutim, zasad ne postoje dokazi koji upućuju na povećani rizik od stafilokokne intoksikacije, invazivne bolesti uzrokovane ingestijom kontaminirane hrane ili kolonizacije pri rukovanju ili konzumaciji hrane. Prema CUNYU i sur. (2015.), MRSA podrijetlom od životinja vrlo rijetko nosi gene za enterotoksine i dosad nije zabilježen niti jedan slučaj intoksikacije. Drugi mogući rizik od MRSA u hrani jest invazivna bolest uzorkovana ingestijom kontaminirane hrane. U literaturi je opisan jedan jedini takav slučaj kod teško imuno-kompromitiranog pacijenta te su autori zaključili da je ovakav ishod malo vjerojatan rizik za većinu ljudi (KLUYTMANS i sur., 1995.). Treći potencijalni rizik od MRSA-e iz hrane jest mogućnost kolonizacije tijekom pripreme ili konzumacije hrane. Iako dobra toplinska obrada uništava prisutnu MRSA-u, razina rizika značajno ovisi o higijenskim mjerama prilikom rukovanja svježim mesom, količini prisutne MRSA-e i sposobnosti same bakterije da kolonizira domaćina.

O prisutnosti rezistentnih sojeva *S. aureus* u sirevima izvijestilo je nekoliko autora (KÉROUANTON i sur., 2007.; NORMANNO i sur., 2007.a; ANDRÉ i sur., 2008.; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA i sur., 2014.; ROLA i sur., 2016.; RODRIGUES i sur., 2017.; PAPADOPOULOS i sur., 2019.).

## 2.2. Stafilokokni enterotoksini (SE)

### 2.2.1. Općenito

Stafilokokni enterotoksini (SE) su snažni gastrointestinalni egzotoksini bakterije *S. aureus*, koji uzrokuju stafilokokno trovanje. Iako su specifični za *S. aureus*, ove toksine mogu proizvoditi i neki drugi koagulaza-pozitivni stafilokoki poput *S. intermedius* (BECKER i sur., 2001.). Također postoje i radovi o enterotoksogenom potencijalu koagulaza-negativnih stafilokoka, čija enteropatogenost za čovjeka još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (PODKOWIK i sur., 2013.). SE proizvode enterotoksogeni sojevi *S. aureus* tijekom rasta u optimalnim uvjetima u hrani.

SE su super-obitelj od 24 sekretorna toksina, koji se smatraju jednim od glavnih virulencijskih čimbenika *S. aureus*, naročito u kontekstu sigurnosti hrane. Obitelj čine 18 SE i 6 toksina sličnih stafilokoknim enterotoksinima koji se označavaju akronimom SEI (Staphylococcal Enterotoxin-like). SE i SEI su multifunkcionalni proteini koji dijele strukturalna i funkcionalna svojstva. Osim što zbog svoje emetičke aktivnosti uzrokuju stafilokokno trovanje hranom, uzrokuju i pirogenost uslijed superantigene aktivnosti te mogu izazvati smrtonosnu hiperosjetljivost na endotoksin (HU i sur., 2018.). Mogu se svrstati u dvije skupine: klasične enterotoksine (SEA-SEE) i novije enterotoksine (SEG-SET, SEIU-SEIY). Novija istraživanja sugeriraju da SE imaju širu ulogu u manifestaciji brojnih bolesti poput astme, alergijskog rinitisa i KOBP te razvoja autoimunih bolesti poput multiple skleroze, reumatoidnog artritisa i sistemskog lupusa (FISHER i sur., 2018.). Za razliku od ostalih sekretornih toksina koje proizvodi *S. aureus*, potrebno su vrlo male količine SE kako bi bili toksični za ljude.

Prvi stafilokokni enterotoksin (SEA) iz sojeva koji su uzrokovali stafilokokna trovanja opisali su BERGDOLL i sur. (1959.a,b) te CSMAN (1960.), a nakon toga su opisana još četiri enterotoksina (SEB, SEC, SED i SEE), koja su se međusobno razlikovala u antigenosti. Stafilokokni enterotoksin C (SEC) podijeljen je u tri antigenske podgrupe SEC1, SEC2 i SEC3 (BALABAN i RASOOLY, 2000.). Tijekom devedesetih godina prošlog stoljeća utvrđena je prisutnost dodatnih SE, a nakon 2001. godine uslijedila je inflacija novih SE. Za prve enterotoksine (SEA, SEB i SEC) aminokiselinski slijed je bio dostupan prije nego nukleotidni slijed (HUANG i BERGDOLL, 1970.; SCHMIDT i SPERO, 1983.; HUANG i sur., 1987.). U posljednjih dvadesetak godina situacija se obrnula. Dok su klasični enterotoksini (SEA-SEE) te noviji SEG-SEI i SER-SET otkriveni temeljem njihovih antigenih svojstava, novije su generacije SE i SEI otkrivene modernim molekularnim analizama poput sekvencioniranja

genoma *S. aureus*, genetskom analizom plazmida ili otoka patogenosti ili pretraživanjem genomske DNA knjižnice. Njihovi aminokiselinski slijedovi su otkriveni temeljem nukleotidnih sekvenci.

Nomenklatura SE se temelji isključivo na emetičkoj aktivnosti, odnosno sposobnosti uzrokovanja emeze kod ljudi ili na modelu primata. Kako bi se neki stafilokokni superantigen uopće mogao nazvati SE prema predloženoj nomenklaturi prvo se mora dokazati njegova emetička aktivnost oralnom primjenom na modelu primata. Ukoliko superantigen pokazuje negativan emetički potencijal u eksperimentu ili eksperiment još nije proveden, superantigen se dodjeljuje naziv toksin sličan stafilokoknim enterotoksinima SEI, iako je strukturno i fizikalno-kemijski srodan SE (LINA i sur., 2004.).

Toksin kod kojeg je dokazano da ne posjeduje emetičku aktivnost jest SEIJ (MUNSON i sur., 1998.; ORWIN i sur., 2001.; ORWIN i sur., 2002.), dok se za SEIU, SEIV, SEIW, SELX i SEIY emetička aktivnost tek treba istražiti na modelu majmuna (FISHER i sur., 2018.). U istraživanju koju su proveli OMOE i sur. (2013.) testirana je emetička aktivnost novootkrivenih SEI toksina; SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SeIO, SEIP i SEIQ na majmunima. Emetička aktivnost je ustanovljena kod svih u dozi od 100 µg/kg, što je omogućilo preimenovanje u SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP i SEQ. ONO i sur. (2015.) su izvijestili o novom toksinu SEIY, koji je pokazao snažnu emetičku aktivnost u malom emetičkom modelu kućne rovke.

Jedino slovo abecede koje se više ne koristi kod imenovanja SE jest slovo F. Naime, toksin sindroma toksičnog šoka je početno bio svrstan u grupu enterotoksina zbog svoje strukturalne, superantigene i fizikalno-kemijske sličnosti s ostalim klasičnim SE te je bio nazvan SEF. Nakon što je utvrđeno da, iako sličan stafilokoknim enterotoksinima, ne posjeduje emetičku aktivnost (vjerojatno zbog toga što je manje stabilan), preimenovan je u toksin toksičnog šoka (Toxic Shock Syndrome Toxin, TSST-1) (BERGDOLL i sur., 1981.; REISER i sur., 1983.). Kako bi se izbjegla zbrka oko naziva u grupi stafilokoknih enterotoksina nema SEF enterotoksina (SPAULDING i sur., 2013.).

Za nove serološke tipove SEG, SEH, SEI, SEIJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SER, SES, SET, SEU, SEIV, SEIW, SEIX i SEIY uloga u stafilokoknim trovanjima još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, osim za SEH (SU i WONG 1995.). Različite studije su pokazale da su na primjer novootkriveni *seg*, *sei* i *selx* geni uobičajeno prisutni kod kliničkih izolata *S. aureus* i izolata iz trovanja hranom (JARRAUD i sur., 1999.; McLAUHLIN i sur., 2000.; OMOE i sur., 2002.; ROSEC i GIGAUD, 2002.) te da je njihova uloga vjerojatno podcijenjena.

Dva glavna svojstva koja razlikuju SE od ostalih čimbenika virulencije *S. aureus* su superantigena i emetička aktivnost.

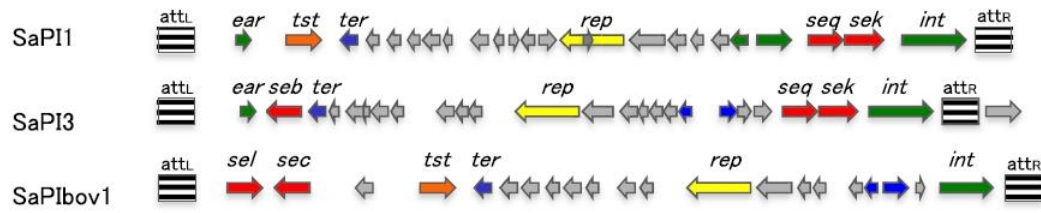
Superantigena aktivnost SE podrazumijeva da su pirogeni, uzrokuju imunosupresiju, pojačavaju endotoksični šok te induciraju otpuštanje citokina i nespecifičnu proliferaciju T-limfocita. Kao superantigeni SE imaju sposobnost induciranja osobite ekspanzije T limfocita (preko 20 % od svih stanica T limfocita) (MARRACK i KAPPLER, 1990). Proliferacija T limfocita dovodi do masovnog otpuštanja citokina iz T limfocita i makrofaga (poznato pod nazivom „citokinska oluja“) za koje se smatra da su odgovorni za kapilarno propuštanje što uzrokuje hipotenziju, šok, zatajenje više organa i smrt (MARRACK i KAPPLER., 1990; McCORMICK i sur, 2001.; SPAULDING i sur., 2013.).

### **2.2.2. Lokacije gena za SE i SEI**

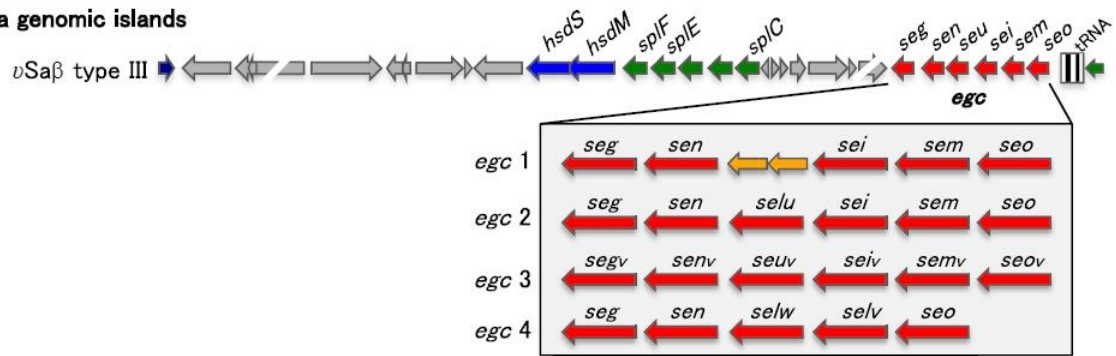
Izuzev gena *selx* i *sely*, koji su smješteni isključivo na kromosomu, ostali geni su smješteni sami ili u grupi na brojnim mobilnim genetičkim elementima. Ti elementi uključuju: otoke patogenosti (SaPIs), genomske otoke (vSa) – *egc* klaster, profage i plazmide (slika 4.). Lokacije gena i njihov raspored su potvrđeni i potpunim sekvencioniranjem genoma *S. aureus* (KURODA i sur., 2001.; BABA i sur., 2002; HOLDEN i sur., 2004; BABA i sur., 2008.). Pregled genetskih elemenata na kojima su kodirani stafilokokni enterotoksini nalazi se u tablici 2.

Od svih lokacija najzanimljiviji je tzv. *egc* lokus. WILLIAMS i sur. (2000.) su opisali novi genetski lokus unutar genoma *S. aureus*, koji kodira najmanje pet različitih egzotoksina koje su autori nazvali *set1* do *set5*. Kasnije su JARRAUD i sur. (2001.) taj lokus opisali kao *egc* klaster (engl. enterotoxin gene cluster), koji je organiziran kao operon i kodira velik broj novijih SE/SEI. Za klaster je utvrđeno da se javlja u velikom broju varijanti i vjerojatno ima ulogu repozitorija SE gena (JARRAUD i sur., 2001.; MONDAY i BOHACH, 2001.; LETERTRE i sur., 2003.a; OMOE i sur., 2005.a; THOMAS i sur., 2006.).

**S. aureus pathogenicity islands (SaPIs)**



**vSa genomic islands**



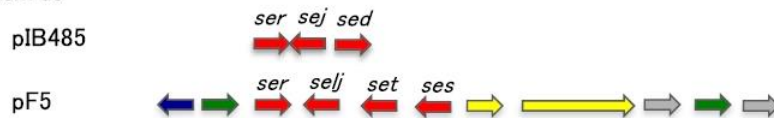
**se genes in the proximity of SCC**



**Prophages**



**Plasmids**



**Slika 4.** Geni za stafilokokne enterotoksine i SE-slične toksine koji se nalaze na otocima patogenosti (SaPI), genomskim otocima (vSa), profagima i plazmidima

(izvor: HU i sur., 2018.)

**Tablica 2.** Genetski elementi stafilokoknih enterotoksina (SE) i SE-sličnih toksina (SEI)

SEs/ SEIs	Genetski elementi	Referenca
SEA	Profag	Betley i Mekalanos (1985., 1988.)
SEB	Kromosom, Plazmid (pZA10), SaPI3	Shalita i sur. (1977.), Shafer i Iandolo (1978.), Altboum i sur. (1985.), Jones i Khan (1986.), Johns i Khan (1988.), Novick i Subedi (2007.)
SEC <sub>1-2-3</sub>	Plazmid, SaPI <sub>bov1</sub>	Altboum i sur. (1985.), Bohach i Schlievert (1987., 1989.), Hovde i sur. (1990.), Fitzgerald i sur. (2001.), Novick i Subedi (2007.)
SED	Plazmid (pIB485)	Chang i Bergdoll (1979.), Bayles i Iandolo (1989.)
SEE	Profag (Hipotetska lokacija)	Couch i sur. (1988.)
SEG	<i>egc1, egc2, egc3, egc4</i> , kromosom	Munson i sur. (1998.), Monday i Bohach (2001.), Jarraud i sur. (2001.)
SEH	Transposon (MGE <sub>mw2</sub> /mssa476 <i>seh/ seo</i> )	Noto i Archer (2006.)
SEI	<i>egc1, egc2, egc3</i> , kromosom	Munson i sur. (1998.), Monday i Bohach (2001.), Jarraud i sur. (2001.)
SEJ	Plazmid (pIB485)	Zhang i sur. (1998.)
SEK	SaPI1, SaPI3, SaPI5, SaPI <sub>bov1</sub>	Orwin i sur. (2001.), Novick i Subedi (2007.)
SEL	SaPI <sub>n1</sub> , SaPI <sub>m1</sub> , SaPI <sub>mw2</sub> , SaPI <sub>bov1</sub>	Fitzgerald i sur. (2001.), Orwin i sur. (2003.), Novick i Subedi (2007.)
SEM	<i>egc1, egc2</i> , kromosom	Monday i Bohach (2001.), Jarraud i sur. (2001.)
SEN	<i>egc1, egc2, egc3, egc4</i> , kromosom	Monday i Bohach (2001.), Jarraud i sur. (2001.)
SEO	<i>egc1, egc2, egc3, egc4</i> , Transposon	Monday i Bohach (2001.), Jarraud i sur. (2001.)
SEP	Profag (Sa3n)	Kuroda i sur. (2001.), Omoe i sur. (2005.b)
SEQ	SaPI1, SaPI3, SaPI5, Profag	Orwin i sur. (2002.), Novick i Subedi (2007.)
SER	Plazmid (pIB485, pF5)	Omoe i sur. (2003.)
SES	Plamid (pF5)	Ono i sur. (2008.)
SET	Plazmid (pF5)	Ono i sur. (2008.)
SEIU	<i>egc2, egc3</i> , kromosom	Letertre i sur. (2003.a)
SEIV	<i>egc4</i>	Thomas i sur. (2006.)
SEIW	<i>egc4</i>	Thomas i sur. (2006.)
SEIX	Kromosom	Wilson i sur. (2011.)
SEIY	Kromosom	Ono i sur. (2015.)



Ekspresija SE/SEI gena je pod utjecajem kompleksne mreže regulatornih puteva za kontrolu proizvodnje toksina. Najpoznatiji i najdominantniji je *agr* sustav regulacije, koji pozitivno regulira ekspresiju gena za egzotoksine i negativno regulira ekspresiju gena za površinske proteine (THOMAS i sur., 2007.). SE koji su kontrolirani *agr* sustavom stvaraju se u ranoj logaritamskoj i stacionarnoj fazi. Ovim sustavom su regulirani SEB (CZOP i BERGDOLL, 1974.; DERZELLE i sur., 2009.), SEC (OTERO i sur., 1990.; REGASSA i sur., 1991.) i SED (BAYLES i IANDOLO, 1989.), koji se sintetiziraju u najvećoj koncentraciji tijekom logaritamske faze rasta, između eksponencijalne i rane stacionarne faze. Kasnije je utvrđeno da je njihova proizvodnja indirektno kontrolirana i inhibicijom pomoću Rot regulatornog proteina (REGASSA i BETLEY, 1993.; TSENG i STEWART, 2005.). Proizvodnja SEA se odvija na način neovisno o *agr* sustavu (TREMINE i sur., 1993.) i vezana je uz životni ciklus faga na kojem je toksin kodiran (CAO i sur., 2012.). SEB i SEC se stvaraju u većoj količini nego ostali SE, često u količini 100 µg/mL, za razliku od SEA, SED i SEE koji se proizvode u koncentraciji manjoj od 1-10 µg/mL (BERGDOLL, 1979.).

Iz svega navedenoga može se zaključiti da su SE/SEI regulirani višestrukim regulatornim elementima koji reagiraju na različite okolišne uvjete. Ravnoteža u ekspresiji enterotoksina ima značajan učinak na komensalnu i patogenu prirodu *S. aureus*.

### **2.2.3. Svojstva stafilokoknih enterotoksina (SE/SEI)**

SE/SEI su jednostavni jednolančani globularni proteini, koji se sastoje od oko 168-251 aminokiseline, molekularne mase 19-29 kDa (tablica 3.). Topljivi su u vodi i slanim otopinama. Bogati su lizinom, aspartatnom i glutaminskom kiselinom te tirozinom. Većina posjeduje cistinsku petlju koja nastaje povezivanjem dvije cisteinske aminokiselinske jedinice, a koja im omogućava odgovarajuću konformaciju za koju se smatra(lo) da je vjerojatno uključena u emetičku aktivnost (LE LOIR i sur., 2003.).

Kristalografske studije su pokazale da SE imaju zajedničku osnovnu trodimenzionalnu strukturu, koja određuje njihova biološka svojstva (SWAMINATHAN i sur., 1992.; PAPAGEORGIOU i ACHARYA, 2000.).

**Tablica 3.** Svojstva stafilokoknih enterotoksina (SE) i SE-sličnih toksina (SEL)

SEs/ SEIs	Dužina (broj a.kis.)	Molekularna težina (kDa)	pI	Emetička aktivnost	Referenca
SEA	233	27,1	7,3	DA	Betley i Mekalanos (1985., 1988.), Huang i sur (1987.)
SEB	239	28,3	8,6	DA	Hibnick i Bergdoll (1959.), Huang i Bergdoll (1970.)
SEC1	239	27,5	8,6	DA	Avena i Bergdoll (1967.), Schmidt i Spero (1983.), Bohach i Schlievert (1987.)
SEC2	239	27,5	7,0	DA	Borja i Bergdoll (1967.), Bohach i Schlievert (1989.)
SEC3	239	27,5	8,1	DA	Reiser i sur. (1984.), Couch i Betley (1989.), Hovde i sur. (1990.)
SED	228	26,4	7,4	DA	Chang i Bergdoll (1979.), Bayles i Iandolo (1989.)
SEE	230	26,4	7,0	DA	Borja i sur. (1972.), Couch i sur. (1988.)
SEG	233	27,0	8,4	DA	Munson i sur. (1998.)
SEH	218	25,1	5,65	DA	Ren i sur. (1994.), Su i Wong (1995.)
SEI	218	24,9	8,7	DA	Munson i sur. (1998.)
SEJ	269	28,6	8,65	Nepoz.	Zhang i sur. (1998.)
SEK	219	25,5	7,0-7,5	DA	Orwin i sur. (2001.)
SEL	218	25,2	8,5	DA	Orwin i sur. (2003.)
SEM	217	24,8	6,24	DA	Jarraud i sur. (2001.)
SEN	227	26,1	6,97	DA	Jarraud i sur. (2001.)
SEO	232	26,8	6,55	DA	Jarraud i sur. (2001.)
SEP	230	26,4	6,6	DA	Omoe i sur. (2005b.)
SEQ	216	25,2	7,5-8,0	DA	Orwin i sur. (2002.)
SER	233	27,0	8,6	DA	Omoe i sur. (2003.), Omoe i sur. (2004.)
SES	257	26,2	-	DA	Ono i sur. (2008.)
SET	216	22,6	-	DA	Ono i sur. (2008.)
SEIU	261	27,2	6,2	N.I	Letertre i sur. (2003.a)
SE1V	239	27,6	-	N.I.	Thomas i sur. (2006.)
SE1W	256	26,7	-	N.I.	Thomas i sur. (2006.)
SE1X	168	19,3	-	N.I.	Wilson i sur. (2011.)
SE1Y	221	22,5	-	DA	Ono i sur. (2015.)

N. I. – nije istraženo

SE posjeduju izuzetnu otpornost na ekstremne denaturirajuće uvjete: otporni su na toplinu (TATINI, 1973.; REGENTHAL i sur., 2017.), smrzavanje, sušenje i nizak pH (HENNEKINNE i sur., 2012.) te visoko stabilni i otporni na djelovanje proteolitičkih enzima poput pepsina i tripsina, što objašnjava zadržavanje biološke aktivnosti u probavnom sustavu (REGENTHAL i sur., 2017.; MEDVED'OVÁ i sur., 2017.).

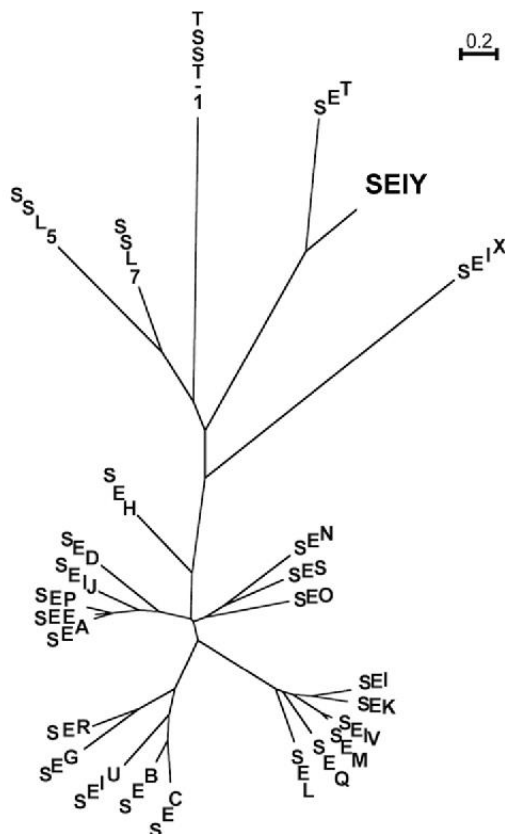
Za razliku od bakterijske stanice *S. aureus*, biološka i serološka svojstva SE pokazuju iznimnu termičku stabilnost/otpornost. SE preživljavanju toplinsku obradu na 100 °C/30 minuta, pri čemu zadržavaju svoju emetičku aktivnost. Na termičku stabilnost SE utječu priroda hrane, okolišni uvjeti koji utječu na denaturaciju toksina te tip enterotoksina (BALABAN i RASOOLY, 2000.; MEDVED'OVÁ i sur., 2017.). TATINI je objavio još 1976. godine da uobičajeni toplinski postupci koji se primjenjuju u proizvodnji hrane, poput pasterizacije (72 °C/15 sec) i UHT obrade (290 F/9 sec) mlijeka, dimljenja i sušenja kobasica na 70-100 °C ili zagrijavanje sira na 70-90 °C nisu učinkoviti za potpunu inaktivaciju toksina A ili D. Isti autor je demonstrirao da enterotoksini A i B zagrijavani na 100 °C kroz 25 minuta u puferskim sustavima zadržavaju svoju biološku aktivnost, uz uočenu povećanu biološku aktivnost nakon tretmana, naročito kod SEA. Potpuna inaktivacija SEA i SED postiže se tretmanom na 122 °C kroz 15 minuta (TATINI, 1976.). Toplinska inaktivacija SEA, SEB i SEC varira ovisno o matriksu hrane i pH. Toplinska obrada u kiselom mediju uzrokuje gubitak imunološke aktivnosti, a time i gubitak prateće biološke aktivnosti. U nekim slučajevima toplinska inaktivacija je spontano reverzibilna u alkalnom pH (SCHWABE i sur., 1990.). Novija studija NECIDOVE i sur. (2016.) je potvrdila da temperatura pasterizacije mlijeka tek djelomično inaktivira SE. Prema istom istraživanju čak i pasterizirano mlijeko bez *S. aureus* ili s malim brojem stafilokoka može biti izvorom stafilokoknog trovanja ukoliko su prisutni termostabilni SE. Hoće li pasterizacija inaktivirati prisutne SE ovisi o njihovoj količini (NECIDOVÁ i sur., 2016.).

#### **2.2.4. Filogenetski odnosi unutar SE obitelji**

Iako su strukturno homologni, SE/SEI se međusobno razlikuju u nukleotidnom i aminokiselinskom slijedu. Primarni slijed aminokiselina svih SE određen je izravno aminokiselinskim sekvencioniranjem ili previđanjem temeljem sekvencijske analize njihovih kloniranih strukturnih gena. Usporedba aminokiselinskih i nukleotidnih slijedova SE, SEI i ostalih superantigen toksina (Sag) je pokazala da postoji nekoliko dijelova linearnih slijedova

aminokiselina koji su homologni (McCORMICK i sur., 2001.). Oko 15 % aminokiselinskih jedinica je potpuno sačuvano kod SE i javljaju se u četiri poteza kroz primarnu strukturu, smještene centralno ili uz C-terminus (DINGES i sur., 2000.). Najveću sličnost u aminokiselinskom slijedu imaju SEA i SEE (90 %) (FRASER i PROFT, 2008.).

Temeljem tih usporedbi SE i SEI su dalje podijeljeni u evolucijske grupe. Prvo filogenetsko grupiranje su proveli VAN DEN BUSSCHE i sur. (1993.), koji su sve dotad poznate SAg svrstali u dvije klade; kladu I su činili SEA, SEE, SED i streptokokni toksin SPEC, dok su u kladi II bili SEB, SEC i streptokokni toksin SPEA. Novija filogenetska istraživanja su pokazala da se trenutno 24 poznata stafilokokna enterotoksina (i superantigeni) temeljem usporedbe nukleotidnih i aminokiselinskih slijedova mogu svrstati u pet evolucijskih grupa (slika 5.).



**Slika 5.** Filogenetsko stablo SE i SEI, uključujući novootkriveni SEIY i TSST-1.

(izvor: ONO i sur., 2015.)

SEA grupa uključuje SEA, SED, SEE, SEH, SEIJ, SEN, SEO, SEP i SES (McCORMICK i sur., 2001.).

SEB grupi pripadaju SEB, SEC, SEG, SER, SEIU i SEIW (SEIU2) (McCORMICK i sur., 2001.).

SEI grupu čine SEI, SEK, SEL, SEQ, SEM i SEIV. Ovi toksini posjeduju petlju od 15 aminokiselina koja je specifična samo za tu grupu toksina, a izgleda da je ključna za specifičnost interakcija superantigena s vlastitim receptorima na T-limfocitima (SPAULDING i sur., 2013.).

SEIX grupa uključuje novije enterotoksine SET, SEIX i SEIY te TSST-1 toksin i njemu slične varijante. Ovi toksini imaju jedinstveni primarni slijed aminokiselina u usporedbi s ostalim SAg, ali im nedostaje cistinska petlja te  $Zn^{2+}$  vezna domena (McCORMICK i sur., 2001.).

Posljednju petu grupu čine toksini *Streptococcus* vrste.

Prisutnost, odnosno odsutnost dviju specifičnih strukturalnih značajki pretežno definiraju superantigena i enterotoksična svojstva SE te objašnjavaju razlike između evolucijskih grupa. Prvo strukturalno svojstvo je vezno mjesto za MHC klasa II molekule. Enterotoksini iz grupa SEIX i SEB posjeduju samo jedno mjesto vezanja niskog afiniteta za  $\alpha$ -lance MCH II molekule, dok enterotoksini iz grupa SEA i SEI posjeduju jedno mjesto vezanja niskog afiniteta za  $\alpha$ -lance MCH II molekula i jedno vezno mjesto visokog afiniteta za  $\beta$ -lance MCH II molekula.  $Zn^{2+}$ -ovisno vezno mjesto visokog afiniteta povećava 10-100x sposobnost pobuđivanja proizvodnje i oslobađanja citokina iz T limfocita i APS, u odnosu na superantigene sa samo jednim veznim mjestom niskog afiniteta. Dva vezna mjesta znače superiorniju superantigenu aktivnost (KOZONO i sur., 1995.).

Drugo strukturalno svojstvo je već spomenuta cistinska petlja. Cistinska petlja je odvojena i specifična petlja koja se sastoji od 9-19 aminokiselina uz bočno formiranu disulfidnu vezu između dvije cisteinske aminokiseline. Smatra se da se petlja nalazi u dijelu molekule koji je važan za biološku aktivnost, a za samu petlju se prvo smatralo da je neophodna za emetičku aktivnost. Spomenuta veza i njena posljedična petlja su zadobile popriličnu pažnju budući su njena istraživanja dala konfliktne rezultate: prema nekim istraživanjima petlja je važna za emetičku aktivnost, dok su druga istraživanja pokazala da petlja nije neophodna za emetičku aktivnost niti je njezina prisutnost garancija aktivnosti (HOVDE i sur., 1994.). Neki autori smatraju da je konformacija SE proteina koju određuje slijed aminokiselina u cistinskoj petlji važnija za emetičku aktivnost nego prisutnost same petlje (SPAULDING i sur., 2013.).

Mutacijske analize petlje su pokazale da je jedino disulfidna veza važna za emezu, a ne sama petlja (HOVDE i sur., 1994.). Ovi rezultati su u suglasnosti s eksperimentima koji su pokazali da i SE koji nemaju petlju mogu izazvati emezu. Na primjer, SEI ne posjeduje cistinsku petlju, a ima i emetička i superantigena svojstva (MUNSON i sur., 1998.), iako je ta emetička aktivnost slabija nego kod drugih SE. SEL i SEK također ne posjeduju cistinsku petlju, a dokazano su emetički (OMOE i sur., 2013.). Iz svega navedenoga se može zaključiti da postoje dodatni neidentificirani strukturalni elementi koji su povezani s emezom.

Osim originalnih toksina sve se više pojavljuju njihove varijante, koje se od roditeljskih toksina razlikuju u aminokiselinskom sastavu. Tako su identificirane varijante SEB (KOHLENER i sur., 2012.), SEC (BOHACH i SCHLIEVERT, 1987.; COUCH i BETLEY, 1989.; MARR i sur., 1993.) i SED (JOHLER i sur., 2016.). Kod varijanti SEB i SEC je uočen izmijenjeni tropizam vrsta ili smanjena superantigena aktivnost (FISHER i sur., 2018.). Stvaranje ovakvih mutacija kod SE može biti dio šire strategije *S. aureus* da se prilagođava različitim domaćinima (MARR i sur., 1993.; JOHLER i sur., 2016.).

### 2.2.5. Čimbenici koji utječu na proizvodnju SE

Čimbenici koji utječu na proizvodnju enterotoksina su isti kao i za rast *S. aureus* (tablica 4.). Iako sama bakterija raste u širokom rasponu okolišnih uvjeta, proizvodnja SE se odvija u užem rasponu (TATINI, 1976.).

**Tablica 4.** Čimbenici koji utječu na rast i proizvodnju enterotoksina *S. aureus* (TATINI, 1973.)

Čimbenik	Bakterijski rast		Proizvodnja enterotoksina	
	Optimum	Raspon	Optimum	Raspon
Temperatura	37 °C	7-48 °C	37-45	10-45
pH	6-7	4-10	7-8	4-9,6
Aktivitet vode ( $a_w$ )	0,98	0,83 → 0,99*	0,98	0,85 → 0,99†
NaCl (%)	0	0-20	0	0-10
Redoks potencijal ( $E_h$ )	> +200 mV	< -200 mV do > +200 mV	> +200 mV	< -100 mV do > +200 mV
Atmosfera	Aerobna	Anaerobna-aerobna	Aerobna	Anaerobna-aerobna

\* Aerobno (anaerobno 0,90 → 0,99)

† Aerobno (anaerobno 0,92 → 0,99)

SEA i SED se proizvode u gotovo svim uvjetima  $a_w$  (min.  $a_w$  0,86) koji omogućavaju rast *S. aureus*, dokle god su ostali uvjeti optimalni (EWALD i NOTERMANS, 1988.), dok je proizvodnja SEB i SEC osjetljivija na učinak  $a_w$  i odvija se u uskom rasponu 0,99-0,97 (2-5 % NaCl) (NOTERMANS i HEUVELMAN, 1983.; QI i MILLER, 2000.; MEDVED'OVÁ i sur., 2017.). THOTA i sur. (1973.) su ustanovili da se SEE proizvodi u mediju koji sadrži 10% NaCl, što odgovara  $a_w$  0,92 (prema TROLLER, 1971.). REGASSA i BETLEY (1993.) su utvrdili da visoka koncentracija NaCl inhibira ekspresiju *sec* gena na nivou njegove mRNA.

Uvjeti proizvodnje SE s obzirom na pH su identični uvjetima rasta. Tvari koje se koriste za zakiseljavanje mogu imati negativan učinak na proizvodnju SE. Octena kiselina ima veći inhibitorni učinak na proizvodnju SE nego mliječna kiselina (MINOR i MARTH, 1970.; LE LOIR i sur., 2003.). Glukoza i niski pH, te alkalni pH imaju inhibitorni učinak na ekspresiju *agr* regulatora, koji pak regulira ekspresiju SE gena (REGASSA i sur., 1992.).

*S. aureus* je fakultativno anaerobna bakterija koja najbolje raste uz prisutnost kisika pa je i proizvodnja SE u takvim uvjetima bolja. U aeriranim kulturama proizvodnja SEB je i do 10 puta veća u odnosu na anaerobne uvjete (DIETRICH i sur., 1972.; WOODBURN i sur., 1973.).

SE se proizvode u rasponu 10-46 °C, s optimumom 37-45 °C. Proizvodnja se značajno smanjuje na 20-25 °C, a malo je vjerojatno da se proizvode na temperaturi ispod 10 °C (MEDVED'OVÁ i sur., 2017.). Za donji temperaturni limit od 15 °C proizvodnja malih količina toksina uočena je tek nakon 3-4 dana. TATINI (1973.) je jedini izvijestio o proizvodnji SE na 10 °C u anaerobnim uvjetima, ali tek nakon nekoliko tjedana skladištenja. Prema SCHMITT i sur. (1990.) čuvanje hrane u kućnim hladnjacima i hladnim prostorijama na 4-5 °C, odnosno u rashladnim vitrinama u trgovinama gdje temperatura vrlo često prelazi 10-12 °C predstavlja relativno mali rizik za stvaranje SE. Pravi rizik predstavlja hrana čuvana na 14-15 °C kroz nekoliko dana ili na sobnoj temperaturi od 18-25 °C nekoliko sati.

Za rast *S. aureus* i proizvodnju enterotoksina moraju biti zadovoljeni i određeni nutritivni zahtjevi u mediju u kojem se nalazi. Činjenica da su različite vrste hrane bile implicirane u brojna stafilokokna trovanja ukazuje da većina hrane ima odgovarajući nutritivni sastav. Iako raste u većini hrane, *S. aureus* se smatra zahtjevnom bakterijom u pogledu nutritivnih zahtjeva. Za rast mu je potreban valin, dok su arginin i cistein potrebni i za rast i za proizvodnju SEA, SEB i SEC. Prisutnost aspartata, glicina, treonina, glutamata i piruvata ima inhibitorni učinak na proizvodnju SEB (SMITH i sur., 1983.). Inhibitorni učinak glukoze na proizvodnju SE, naročito SEB i SEC, je vrlo ekstenzivno proučen. Inhibicija se pripisuje padu pH kao posljedica

metabolizma glukoze (MORSE i BALDWIN, 1973.; JARVIS i sur., 1975.; WOODBURN i sur., 1978.). Glukoza zajedno s niskim pH ima inhibitorni učinak na ekspresiju *agr* regulatora (REGASSA i sur., 1992.). Povećane koncentracije magnezija, kalija i anorganskog fosfata jako povećavaju proizvodnju SEB (KELLER i sur., 1978.).

## 2.2.6. Učestalost nalaza stafilocoknih enterotoksina u hrani

Nalaz stafilocoknih enterotoksina pri rutinskim kontrolama hrane se događa vrlo rijetko. Prema vanjskom znanstvenom izvješću koje je za potrebe EFSA-e izradio Tehnički fakultet u Danskoj, u Europskoj uniji u periodu od 2006. do 2009. godine stafilocokni enterotoksini su nađeni uglavnom u siru i to u vrlo malom postotku. Analizom podataka, koje su prijavile države članice, prisutnost stafilocoknih enterotoksina je istražena u 1 268 pojedinačnih uzoraka kravljeg sira (0,8 % pozitivnih), 204 pojedinačnih uzoraka kozjeg sira (1,5 % pozitivnih) te 276 pojedinačnih uzoraka ovčjeg sira (0,7 % pozitivnih). Rezultati za serije uzoraka pokazuju još nižu učestalost stafilocoknih enterotoksina u sirevima. U istraženih 7 992 kravljih sireva manje od 0,1 % je bilo pozitivno na prisutnost SE, kod 500 kozjih sireva svega 0,6 % je bilo pozitivno, a kod 4 204 ovčjih sireva 0,2 % je sadržavalo SE (Technical University of Denmark, 2012.). Službeni podaci iz godišnjih izvještaja EFSA-e o prisutnosti SE u hrani prikazani su u tablici 5. i također pokazuju nisku incidenciju stafilocoknih enterotoksina.

SE su uglavnom nađeni tijekom epidemioloških istraživanja slučajeva stafilocoknih trovanja (HENNEKINNE i sur., 2012.; KADARIYA i sur., 2014.).

**Tablica 5.** Stafilocokni enterotoksini u hrani u EU u periodu 2015.-2019. godine

God	Mlijeko i mliječni proizvodi		Ostala hrana		Referenca
	Broj istraženih uzoraka	Broj (%) pozitivnih	Broj istraženih uzoraka	Broj (%) pozitivnih	
2015.	2309	19 (0,82)	871	21 (2,41)	EFSA i ECDC (2016.)
2016.	2061	7 (0,34)	571	4 (0,70)	EFSA i ECDC (2017.)
2017.	1980 (120 <sup>1</sup> )	23 (1,16) (0)	645	40 (6,20)	EFSA i ECDC (2018.)
2018.	815	4 (0,25)	0	0	EFSA i ECDC (2019.)
2019.	1522	3 (0,20)	0	0	EFSA i ECDC (2021.)



### 2.3. Stafilokokno trovanje

Stafilokokno trovanje (SFP, Staphylococcal Food Poisoning) je jedno od najčešćih trovanja hranom (intoksikacija), koje je rezultat ingestije stafilokoknih enterotoksina putem hrane. Stafilokokne enterotoksine proizvode enterotoksogeni sojevi uglavnom koagulaza-pozitivnih stafilokoka (KPS). Između sedam vrsta koji pripadaju grupi KPS, *S. aureus* subsp. *aureus* je glavni uzročnik opisanih SFP. Povremena trovanja uzrokuju i druge stafilokokne vrste poput *S. intermedius* (GENIGEORGIS, 1989.; BECKER i sur., 2001.). Kod ovih vrsta enterotoksogeni potencijal, posebno proizvodnja enterotoksina C, je utvrđen kod sojeva *S. intermedius* podrijetlom od pasa (HIROOKA i sur., 1988.).

U znanstvenoj literaturi se mogu naći brojni radovi koji opisuju stafilokokna trovanja koja su se dogodila u periodu od Prvog svjetskog rata pa do danas. Od kraja 80-tih broj objavljenih radova o stafilokoknim trovanjima se znatno smanjio, iako broj prijavljenih slučajeva nije smanjen (CRETENET i sur., 2011.a). Prema DE BUYSER i sur. (2001.) *S. aureus* je glavni patogen vezan uz sireve od sirovog mlijeka, a prema DELMAS i sur. (2006.) prvi uzročnik bolesti podrijetlom iz mlijeka i mliječnih proizvoda. U literaturi prevladavaju podaci i studije iz SAD-a, Brazila, Francuske i Japana. Prema CRETENET i sur. (2011.a) francuski podaci čine 70 % svih prijavljenih slučajeva SFP u Europskoj uniji u 2007. godini.

Pravo breme bolesti stafilokoknog trovanja je teško odrediti iz nekoliko razloga. Niska incidencija SFP može biti uzrokovana: neprijavlivanjem sporadičnih slučajeva, krivom dijagnozom, netražanjem medicinske pomoći oboljelih, nepravilnim uzimanjem uzoraka inkriminirane hrane ili nepravilnim provođenjem laboratorijske analize. Nedostupnost hrane na koju se sumnja za laboratorijsku analizu dodatno komplicira i otežava utvrđivanje SFP (KADARIYA i sur., 2014.). Bez obzira na sve čimbenike koji smanjuju službenu stopu incidencije, stafilokokno trovanje je jedna od najčešćih bolesti podrijetlom iz hrane i jedan od glavnih javnozdravstvenih problema u svijetu (BALABAN i RASOOLY, 2000.; LE LOIR i sur., 2003.; ARGUDÍN i sur., 2010.; HENNEKINNE i sur., 2012.). Prema MEADU i sur. (1999.) broj prijavljenih slučajeva SFP je 1 % od onog procijenjenog broja.

Od svih stafilokoknih enterotoksina SEA najčešće uzorkuje SFP (oko 80 %) i nađen je u hrani češće nego ostali SE (BALABAN i RASOOLY, 2000.; PINCHUK i sur., 2010.; HENNEKINNE i sur., 2012.). Prvi je uzročnik trovanja u Ujedinjenom Kraljevstvu (WIENEKE i sur., 1993.), SAD-u (BALABAN i RASOOLY, 2000.), Japanu (IKEDA i sur., 2005.; SATO'O i sur., 2014.), Francuskoj (KÉROUANTON i sur., 2007.), Južnoj Koreji (CHA

i sur., 2006.) i Brazilu (VERAS i sur., 2008.). Drugi najčešće nađeni enterotoksin je SED (NORMANNO i sur., 2007.a,b; ROSENGREN i sur., 2010.), potom SEB i SEC, dok je SEE najrjeđe nađen od klasičnih enterotoksina (BALABAN i RASOOLY, 2000.; OSTYN i sur., 2010.). Nedavne su studije pokazale da i novije opisani SE poput SEG, SEH, SEI, SEM, SEN i SEO mogu uzrokovati stafilokokno trovanje (PEREIRA i sur., 1996.; IKEDA i sur., 2005.; JØRGENSEN i sur., 2005.a.; JOHLER i sur., 2015.; UMEDA i sur., 2017.). Prema WATTINGERU i sur. (2012.) osobe koje rade s hranom, a koje su inficirane ili kolonizirane sa *S. aureus*, su glavni izvor stafilokoknog trovanja.

U stafilokoknim trovanjima najčešće su bili upleteni meso i mesni proizvodi, piletina, proizvodi od jaja, mlijeko i mliječni proizvodi, salate, kremasti kolači, sendviči, odnosno sastojci sendviča (LE LOIR i sur., 2003.; ARGUDÍN i sur., 2010.; HENNEKINNE i sur., 2012.). Vrste hrane koje su uključene u SFP se razlikuju od zemlje do zemlje, najvjerojatnije ovisno o prehrambenim navikama, preferencijama i količini konzumacije (LE LOIR i sur., 2003.). U SAD-u i Ujedinjenom Kraljevstvu meso i mesni proizvodi su najčešće uključeni u SFP (GENIGEORGIS, 1989.). Francuska se pak posebno ističe po tome što su sirevi od sirovog mlijeka znatno češće izvor stafilokoknog trovanja nego drugdje u svijetu, s obzirom da je tamo konzumacija sireva znatno izraženija te važan dio tradicije i gastronomije (DE BUYSER i sur., 2001.). U Europskoj uniji je stafilokokno trovanje najčešće povezano s miješanom hranom, sirevima te mesom i mesni proizvodima (EFSA i ECDC, 2016.-2019.).

U svim slučajevima stafilokoknog trovanja, hrana ili neki njezin sastojak bila je kontaminirana sa sojem *S. aureus* koji proizvodi SE i barem neko vrijeme je bila izložena temperaturi koja je omogućila rast *S. aureus*. U većini slučajeva pogodna temperatura za rast postignuta je uslijed lošeg hlađenja ili jer je ta temperatura potrebna za proizvodnju hrane (npr. proizvodnja sireva) (HENNEKINNE i sur., 2012.).

Stafilokokno trovanje nastupa kada se u hrani stvori dovoljna količina enterotoksina da izazove simptome (toksična doza). Dovoljna količina SE se stvara pri određenoj razini rasta same bakterije u hrani i većina studija je utvrdila da broj stanica *S. aureus*  $>10^5$  po gramu kontaminirane hrane tipično stvara toksičnu dozu SE. Ovakav rast i stvaranje enterotoksina događa se pri nepoštivanju temperaturnog režima (TODD i sur., 2008.). Većina trovanja nastupa kao posljedica loše higijene tijekom pripreme (ASAO i sur., 2003.), kuhanja ili distribucije hrane (PEREIRA i sur., 1996.). Nakon kontaminacije, neodgovarajuće hlađenje dodatno pogoduje rastu *S. aureus* i stimulira proizvodnju enterotoksina. Pet uvjeta treba biti

ispunjeno da bi došlo do SFP (HENNEKINNE, 2018.): 1.) izvor kontaminacije koji sadrži sojeve *S. aureus* koji proizvode SE; 2.) prijenos bakterija s izvora na hranu (npr. preko nečistog pribora za pripremu hrane); 3.) hrana pogodnog kemijskog sastava i fizikalno-kemijskih svojstava za rast *S. aureus* i toksogenezu; 4.) pogodna temperatura i dovoljno vrijeme za bakterijski rast i proizvodnju toksina; 5.) ingestija hrane koja sadrži dovoljnu količinu toksina da mogu izazvati simptome.

Period inkubacije i težina simptoma ovise o vrsti i broju ingestiranih enterotoksina kao i o susceptibilnosti svake osobe. Tipično stafilokokno trovanje nastupa naglo. Početni simptomi, mučnina i nekontrolirano karakteristično povraćanje u naletima nastupaju 30 minuta do 8 sati (u prosjeku 3 sata) od ingestije kontaminirane hrane. Ostali uobičajeno prisutni simptomi uključuju bolove u trbuhu, proljev, vrtoglavicu, drhtavicu, opću slabost, ponekad povezanu s povišenom tjelesnom temperaturom. U težim slučajevima su prisutni glavobolja i nizak krvni tlak. Bolest je samo-ograničavajuća i u većini slučajeva simptomi prolaze unutar 24-48 sati, dok proljev i slabost mogu potrajati i koji dan duže (LE LOIR i sur., 2003.). Smrtnost je rijetka i iznosi 0,02 % te se javlja samo kod najosjetljivije populacije (MEAD i sur., 1999.).

Literaturni podaci navode toksične doze stafilokoknih enterotoksina u rasponu od 20-100 ng pa do 20 µg SE (EVENSON i sur., 1988.; MOSSEL i sur., 1995., ASAO i sur., 2003.; IKEDA i sur., 2005.; HENNEKINNE i sur., 2009.; OSTYN i sur., 2010.). Najnovija istraživanja navode da su u hrani koja je uzrokovala SFP nađene količine od < 3 ng SE /g hrane (ERCOLI i sur., 2017.; GUIDI i sur., 2018.). GUILLIER i sur. (2016.) su izračunali dozu koja izaziva simptome kod 10 % izložene populacije (BDM<sub>10</sub>), koja je za SEA iznosila 6,1 ng.

Glavni dijagnostički kriterij stafilokoknog trovanja temelji se na jednom od sljedećih rezultata: 1) nalazu SE u ostacima hrane; 2) utvrđivanju najmanje 10<sup>5</sup> cfu *S. aureus* u 1 g ostataka hrane ili 3) izolaciji istog soja *S. aureus* kod pacijenta i iz ostataka hrane (HENNEKINNE i sur., 2010.).

Imunološke metode su najčešće primjenjivane metode određivanja SE u hrani i za dokazivanje proizvodnje SE *in vitro*, a temelje se na uporabi anti-enterotoksin poliklonskih ili monoklonskih antitijela. Specifična reakcija između enterotoksina i anti-enterotoksin antitijela je osnova određivanja, a prema principu određivanja nastalog kompleksa razlikuju se dvije tehnike: i) enzimski imunotest (ELISA ili ELFA); te ii) reverzna pasivna lateks aglutinacija (RPLA).

Osim izravnog određivanja *S. aureus* mikrobiološkim metodama i stvorenih stafilokoknih enterotoksina imunološkim metodama, trenutačno su najkorištenije i najpopularnije molekularne metode. Pod pojmom molekularne metode podrazumijevaju se brojne verzije lančane reakcije polimerazom (PCR). PCR metodom se utvrđuje prisutnost gena koji kodiraju enterotoksine i na ovaj se način utvrđuje enterotoksogeni potencijal izoliranih sojeva *S. aureus*. Ostale molekularne metode (MLST, MLVA, *spa* tipizacija, SCC*mec* tipizacija i PFGE) se koriste za genetsku karakterizaciju *S. aureus*, a omogućavaju praćenje epidemiološki povezanih sojeva sve do izvora kontaminacije te utvrđivanja jesu li ljudskog ili životinjskog podrijetla (HENNEKINNE i sur., 2018.).

#### **2.4. Sirevi i *Staphylococcus aureus***

Sir je svježi ili zreli proizvod dobiven grušnjem mlijeka (sirutke, stepke, vrhnja ili njihove kombinacije) uz izdvajanje sirutke (tekućine nastale tijekom obrade grša, koja je sporedni proizvod) (TRATNIK, 1998.). Kakvoća sira ovisi o kakvoći mlijeka kao polazne sirovine.

Svježi sir se proizvodi postupkom sirenja (grušanja) mlijeka tijekom kojeg dolazi do koagulacije proteina kazeina. Koagulacija kazeina se može postići djelovanjem kiseline (mliječne, limunske, octene, fosforne, klorovodične) do pH 4,6 i/ili dodavanjem bakterija mliječne kiseline koje kiselost postižu vrenjem (fermentacijom laktoze) ili djelovanjem proteolitičkih enzima (sirilo). Na ovaj način nastaje kiseli gruš i postupak se koristi najviše u proizvodnji svježeg mekog sira. Često se zakiseljavanje provodi u kombinaciji s enzimskim pripravcima – sirilima, a najčešći kimozijski pripravak ili Renin, ekstrakt probavnih enzima kimozijsina (80-90 %) i pepsina (10-20 %) (TRATNIK, 1998.).

Sirenje se većinom provodi na temperaturi od približno 30 °C jer ta temperatura omogućava optimalno djelovanje bilo enzima bilo bakterijskih kultura mliječne kiseline. Nastali sirni gruš se oblikuje u sirno zrno, iz kojeg se izdvaja sirutka. U proizvodnji svježeg mekog sira kiselinskim sirenjem iz kiselog grša se sirutka izdvaja jednostavnim cijedenjem kroz maramu (samoprešanje djelovanjem vlastite mase). Tako dobiven svježi sir se može odmah konzumirati (eventualno se soli).

Proizvodnja sira na dubrovačkom području ima višestoljetnu tradiciju, tako da je sir dobio status autohtonog sira. Taj sir je poznatiji pod nazivom „sir iz ulja“. Proizvodnja mlijeka na dubrovačkom području temelji se na mliječnim kravama, ovcama i kozama. Kako je ovo krško

područje bez uvjeta za velike farme, uzgoj se odvija na malim gospodarstvima od 10-20 kravljih grla, 50-80 ovčjih te 60-100 kozjih grla (CAPUT i sur., 2003.). Iako se autohtonost odnosi na zreli ovčji sir koji se čuva u ulju princip proizvodnje svježeg sira je isti.

Prema originalnom receptu dubrovački sir se proizvodi iz sirovog mlijeka. Svježe pomuzeno mlijeko se prvo ocijedi kako bi se uklonila gruba nečistoća te mu se podesi temperatura na oko 30 °C. Kada se postigne ova temperatura dodaje se sirilo uz lagano miješanje. Prema originalnom receptu koristi se kupovno sirilo proizvedeno od telećeg želuca. Sirenje se odvija 45-60 minuta. Nakon što se stvorio gruš, ostavlja se da stoji kako bi se izdvojila sirutka. Nakon izdvajanja sirutke gruš se suši na temperaturi 40-42 °C/10-15 minuta. Po sušenju ručno se formiraju grude u obliku lopti i stavljaju se u sirarske krpe i potom u kalupe. Sir se već u ovoj fazi može konzumirati kao svježi sir, dok se za proizvodnju autohtonog dubrovačkog sira nastavlja proces sušenja 3-5 dana i zrenja u komori 3-4 tjedna. Za duže čuvanje sir se stavlja u ulje (miješano ulje 90 % suncokretovog i 10 % maslinovog ulja), u kojem može trajati 5-6 mjeseci (CAPUT i sur., 2003.).

Iako prema nekim studijama pripadaju skupini najsigurnijih prehrambenih proizvoda (JOHNSON i sur., 1990.; LITTLE i sur., 2008.) sirevi su često navedeni kao potencijalni izvori patogena poput *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* i enterotoksogenog *S. aureus* (DE BUYSER i sur, 2001.; KOUSTA i sur, 2010.; HENNEKINNE i sur, 2012.). Trovanja mlijekom i mliječnim proizvodima u Francuskoj, koja ima višestoljetnu i vrlo jaku tradiciju proizvodnje i konzumacije sireva, najčešće je povezano s bakterijom *S. aureus* (DE BUYSER i sur., 2001.; DELMAS i sur., 2006.). Prema oba autora *S. aureus* je glavni patogen vezan uz sireve od sirovog mlijeka. Sirevi su također na prvom ili drugom mjestu kao hrana koja je bila izvorom stafilokoknog trovanja u EU u periodu od 2015. do 2018. godine (EFSA i ECDC, 2016.-2019.).

Patogene se bakterije mogu iz različitih izvora unijeti u sirovo mlijeko. Kako su ljudi i životinje prirodni rezervoar stafilokoka (FISHER i sur., 2018.) tako su izvor onečišćenja sireva prvenstveno životinja koja daje mlijeko (krava, koza, ovca) i/ili osobe koje proizvode sir. Životinja s kliničkim ili subkliničkim mastitisom je najčešći izvor stafilokoka u mlijeku (KÉROUANTON i sur., 2007.; BIANCHI i sur., 2014.; HUMMERJOHAN i sur, 2014.; GRISPOLDI i sur., 2019.; ABRIL i sur., 2020.). Osim kontaminiranog mlijeka kao osnovne sirovine, čovjek može onečistiti mlijeko i/ili sir kapljičnim putem ukoliko je kliconoša i/ili rukama ukoliko su kolonizirane ili onečišćene. S obzirom da stafilokoki mogu kolonizirati i ostale površine, oprema i pribor koji se koriste u proizvodnji i skladištenju sireva također mogu

biti izvor kontaminacije (JØRGENSEN i sur., 2005.b; KÉROUANTON i sur., 2007.; KOUSTA i sur., 2010.). *S. aureus* na opremi i površinama lako stvara biofilm u kojem preživljava nakon čišćenja i dezinfekcije i u tom slučaju ga je vrlo teško ukloniti (YANG i sur., 2012.). Čimbenik koji dodatno značajno doprinosi rastu i razmnožavanju stafilokoka te proizvodnji SE u siru je čuvanje sireva na neodgovarajućim temperaturama (HENNEKINNE i sur., 2012.).

Rast i razmnožavanje *S. aureus* u svježim sirevima ovisi o ekstrinzičnim i intrinzičnim čimbenicima. Ekstrinzični čimbenici uključuju proizvodne postupke, vrstu pakiranja i uvjete čuvanja. Intrinzični čimbenici uključuju aktivitet vode, pH, sadržaj hranjivih tvari, prisutnost antimikrobnih tvari te prisutnost kompetitivne mikroflore. Prema tim čimbenicima svježi sir je povoljniji medij nego polutvrđi ili tvrdi sir (EC DG SANTE, 2003.). U tom se pogledu u proizvodnji mliječnih proizvoda sprečavanje rasta i razmnožavanja patogena provodi kombinacijom niskog pH, niskog aktiviteta vode i uporabom starter kultura (KOUSTA i sur., 2010.). Kompetitivna mikroflora u vidu starter kultura (bakterija mliječne kiseline) koje se koriste u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda mogu učinkovito prevenirati rast *S. aureus* i stvaranje SE. Što je veća koncentracija kompetitivnih mikroorganizama u mlijeku to je slabiji rast *S. aureus* i proizvodnja SE (OTERO i sur., 1988.; GENIGEORGIS, 1989.; VERNOSY-ROZAND i sur., 1998.). Nakon proizvodnje sirevi se ne podvrgavaju nikakvom daljnjem toplinskom postupku kojim bi se osigurala njihova sigurnost prije konzumacije.

Svojstvo svježih sireva je da im pH vrijednost brzo pada ispod 5,0, dok sadržaj vode (aktivitet vode) ostaje visok – 55 % ( $a_w = 0,95$  do  $0,97$ ). Postojeći podaci govore da je rast *S. aureus* u svježim sirevima ograničen ukoliko dolazi do mliječne fermentacije. Rast i proizvodnja toksina u sirevima je pod utjecajem početne koncentracije enterotoksogenih sojeva *S. aureus* u mlijeku, aktivnosti starter kulture, antagonističkog utjecaja prirodne flore, koncentracije soli, pH te temperature proizvodnje i čuvanja (MEYRAND i sur., 1998.).

## **2.5. Učestalost nalaza enterotoksogenih sojeva *Staphylococcus aureus***

U znanstvenoj literaturi je dostupan izuzetno velik broj radova koji su se bavili određivanjem gena za stafilokokne enterotoksine kod sojeva *S. aureus* izoliranih iz sirovog mlijeka, sireva, različite vrste hrane, izolata koji su uzrokovali stafilokokna trovanja, mastičnih životinja, kao i humanih izolata od zdravih nositelja ili iz određenih kliničkih stanja. Najveći je broj radova iz Italije, Brazila, Švedske, Norveške i Japana. Rezultati istraživanja pokazuju nevjerovatnu

diskrepanciju u prevalenciji gena (bilo u tipu gena ili njihovoj učestalosti), u rasponu od 0 % do gotovo 90 %. Mogući uzroci diskrepancije u rezultatima istraživanja uključuju: razlike u rezervoarima u različitim zemljama, ekološko podrijetlo izolata, osjetljivost metoda određivanja, različite metode određivanja gena (različite početnice) te broj i tipove uzoraka. Različitost utvrđenih genotipova ukazuje na mogućnost zagađenja sa *S. aureus* iz više različitih izvora. Prve genotipizacije izolata *S. aureus* su utvrdile prevalenciju *sec*, *sea* i *sed* gena. Međutim, otkrićem novijih SE/SEI istraživanja su proširena na novije gene, čime su značajno izmijenjeni rezultati istraživanja u korist prevalencije novijih enterotoksina.

Nekoliko istraživačkih timova je provelo određivanje gena za enterotoksine kod sojeva *S. aureus* koji su izolirani u slučajevima stafilokoknih trovanja. Tako su ROSEC i GIGAUD (2002.) istražujući sojeve koji su uzrokovali stafilokokna trovanja u Francuskoj utvrdili *se* gene kod 57 % sojeva, od čega je 30 % izolata nosilo gene za klasične enterotoksine SEA-SEE. Prema istoj studiji *seg* i *sei* geni su bili dominantni, nađeni kod čak 80,6 % izolata, a od klasičnih gena *sec* je bio najčešći. Prisutnost *se* gena kod sojeva *S. aureus* podrijetlom iz kravljih mliječnih proizvoda koji su uzrokovali trovanja nađena je kod 48 % sojeva, a kod 12 % su nađeni samo klasični *se* geni (ROSEC i GIGAUD, 2002.). Sličnu karakterizaciju sojeva *S. aureus* iz stafilokoknih trovanja u Francuskoj su proveli KÉROUANTON i sur. (2007.) nekoliko godina kasnije. Njihovo istraživanje je pokazalo da je 87,9 % izolata nosilo jedan ili više gena za enterotoksine, a dominantni gen je bio *sea*, koji je često u kombinaciji sa *sed* ili *seh* uzrokovao stafilokokna trovanja u Francuskoj. Ostale epidemiološke studije su pokazale da su izolati *S. aureus* iz slučajeva SFP posjedovali više gena za SE i SEI, pri čemu su najčešći bili geni *sea*, *seb*, *seh* i *seq* (OMOE i sur., 2005.a; SATO'Ō i sur., 2014.; CHAO i sur., 2015.).

Brojni autori su izvijestili o učestalosti SE gena preko 50 % kod sojeva *S. aureus* iz različitih vrsta hrane te humanih i veterinarskih uzoraka diljem svijeta (KATSUDA i sur., 2005.; LAWRYNOWICZ-PACIOREK i sur., 2007.; RALL i sur., 2008.; GONANO i sur., 2009.; PEREIRA i sur., 2009.; ARGUDÍN i sur., 2012.; GRISPOLDI i sur., 2019.). LAWRYNOWICZ-PACIOREK i sur. (2007.) su izvijestili da je učestalost novijih gena veća (60 %) u odnosu na klasične (33 %).

Oko 80 % izolata *S. aureus*, uključujući komensalne, kliničke i iz trovanja hranom, nose u prosjeku 5-6 SE gena (JARRAUD i sur., 2001.; BABA i sur., 2002.; BECKER i sur., 2003.; HOLTFRETER i sur., 2007.; LV i sur., 2014.; UMEDA i sur., 2017.). Studije prisutnosti SE/SEI gena kod izolata *S. aureus* podrijetlom od kliconoša su pokazale da 75 % - 100 %

istraženih izolata je nosilo jedan ili kombinaciju više SE/SEI gena, od kojih je 30 % - 67 % bilo pozitivno na klasične gene *sea – see*, dok su geni iz *egc* lokusa nađeni kod 38 % - 84 % od svih izolata. Dominantan gen za klasične enterotoksine varira od zemlje do zemlje (BECKER i sur., 2003.; OMOE i sur., 2005.a; BOEREMA i sur., 2006.; NASHEV i sur., 2007.; COLLERY i sur., 2008.; HO i sur., 2015.).

Istraživanja enterotoksogenosti sojeva *S. aureus* podrijetlom iz sireva ukazuju na visoku učestalost gena za klasične, ali i novije enterotoksine, s naglaskom na gene *seg*, *sei*, *sej* i *ser* (MORANDI i sur., 2007.; CREMONESI i sur., 2007.; NORMANNO i sur., 2007.a; PELISSER i sur., 2009.; HUMMERJOHANN i sur., 2014.; CARFORA i sur., 2015.; ROLA i sur., 2016.).

Sojevi *S. aureus* podrijetlom od ljudi uglavnom nose gen za SEA, dok životinjski sojevi nose gen za SEC (kod krava i koza) ili SED (kod krava) (ARGUDÍN i sur., 2012.; KADARIYA i sur., 2014.).



### 3. OBRAZLOŽENJE TEME

Dosadašnji monitoring domaćih sireva s tržnica grada Dubrovnika pokazao je vrlo lošu mikrobiološku kvalitetu. Iako niti jedan uzorak sira nije sadržavao stafilokokne enterotoksine (LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN i sur, 2016.) visoka učestalost i razina onečišćenja bakterijom *S. aureus* ukazuju na potrebu daljnjeg istraživanja enterotoksogenosti izolata i procjenu stvarnog rizika od stafilokoknog trovanja. Treba naglasiti da odsutnost SE u sirevima ne isključuje mogućnost njihovog stvaranja budući nije istraženo posjeduju li izolati *S. aureus* gene za stvaranje SE, odnosno imaju li sposobnost stvaranja enterotoksina. U Hrvatskoj dosad nije bilo objavljenih podataka o stafilokoknim enterotoksinima niti o enterotoksogenosti izolata *S. aureus* iz hrane.

Stoga će ciljevi ovog istraživanja biti: utvrditi razinu onečišćenja domaćih sireva s bakterijom *S. aureus*; utvrditi prisutnost stafilokoknih enterotoksina u sirevima; utvrditi fenotipska svojstva izolata *S. aureus* iz svježeg sira, uključujući antibiotsku osjetljivost; utvrditi sposobnost stvaranja stafilokoknih enterotoksina *in vitro* kod izolata *S. aureus* iz sireva primjenom imunoloških metoda; utvrditi gene za enterotoksine primjenom molekularnih metoda i usporediti upotrijebljene metode te utvrditi njihovu učinkovitost.

**Hipoteza:** Izolati *S. aureus* iz sireva domaće proizvodnje imaju sposobnost stvaranja enterotoksina. Pretpostavljamo da se enterotoksini mogu utvrditi i pri manjoj razini onečišćenja kada se u rutinskoj bakteriološkoj pretrazi ne utvrđuju pa sirevi mogu predstavljati rizik za zdravlje potrošača i u slučajevima negativnih bakterioloških nalaza.

Rezultati istraživanja omogućit će nam procjenu rizika od nalaza bakterije *S. aureus* u domaćim sirevima, odnosno procjenu kriterija Uredbe EZ br. 2073/2005 za stafilokokne enterotoksine. Kako u Hrvatskoj još nije provedeno sustavno istraživanje enterotoksogenosti *S. aureus* u ovoj vrsti hrane, rezultati ovog istraživanja omogućit će uvid u prevalenciju enterotoksogenih sojeva bakterije u domaćem siru koji pripada skupini hrane u kojoj je rast bakterije moguć i predstavlja rizik po zdravlje potrošača.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Materijal

#### Domaći svježi sirevi

Sirevi su kupljeni na tržnicama grada Dubrovnika u periodu od siječnja 2018. godine do prosinca 2019. godine. Od prodavača su prikupljene informacije o porijeklu, vrsti, načinu proizvodnje i skladištenju. Većina sireva (28) je proizvedena po „starom“ dubrovačkom receptu. Svježe pomuženo mlijeko je blago podgrijano ispod temperature pasterizacije te je sirenje provedeno dodatkom jabučnog octa i/ili domaćeg sirila (telećeg želuca). Sirevi su oblikovani kalupima i prodavani uglavnom u plastičnim vrećicama za domaćinstvo. Dva sira (S26 i S27) istog proizvođača (P15) su proizvedena od pasteriziranog mlijeka i kupovnog sirila.

Sirevi su označeni različitim šiframa radi sljedivosti rezultati. Uzorci su transportirani do laboratorija unutar 30 minuta od kupnje u prijenosnim hladnjacima s ulošcima za hlađenje na temperaturi 2-8 °C. Po dolasku u laboratorij odmah je napravljena mikrobiološka analiza, a potom su određeni fizikalno-kemijski parametri sireva.

Tijekom perioda od dvije godine prikupljeno je 30 uzoraka svježih domaćih sireva od kravljeg ili kozjeg mlijeka po principu svaki sir barem dva puta od istog proizvođača. Istraživanjem je obuhvaćeno 17 malih neregistriranih proizvođača s obiteljskih farmi, koji posjeduju 1-2 krave i/ili koze, a čija proizvodnja iznosi 1,5-4 kg sira tjedno.

Tijekom prodaje na tržnici niti jedan uzorak nije bio hlađen, a u toplijim mjesecima su bili i izloženi Sunčevoj svjetlosti budući tržnice nisu natkrivene niti zaštićene. Tržnice također nisu opremljene rashladnim uređajima (slika 6. i 7.).

Iz sireva koji su bili onečišćeni koagulaza-pozitivnim stafilokokima za daljnje analize je uzeto po 10 koagulaza-pozitivnih kolonija, ukupno 180 izolata, kojima su određena fenotipska svojstva, antibiotska osjetljivost, sposobnost stvaranja enterotoksina SEA-SEE *in vitro* primjenom imunoloških metoda i prisutnost gena za enterotoksine SEA-SEE primjenom molekularnih metoda.



**Slika 6. i 7.** Domaći svježi sirevi s dubrovačkih tržnica (foto: I. Lj. Musladin)

#### **4.2. Metode**

Eksperimentalni dio rada je podijeljen u dva osnovna dijela: analizu sireva i analizu sojeva *S. aureus* izdvojenih iz sireva s ciljem utvrđivanja njihovog enterotoksogenog potencijala.

Analiza sireva je uključivala mikrobiološku analizu, određivanje fizikalno-kemijskih parametara i određivanje prisutnosti stafilokoknih enterotoksina SEA-SEE. Mikrobiološkom analizom je određena razina onečišćenja koagulaza-pozitivnim stafilokokima. Od fizikalno-kemijskih parametara određeni su temperatura, pH i aktivitet vode, koji su važni za rast i

razmnožavanje *S. aureus* te stvaranje enterotoksina u sirevima. Prisutnost stafilokoknih enterotoksina u sirevima je određena imunoenzimskom metodom.

Analiza izdvojenih sojeva *S. aureus* iz sireva je uključivala aglutinacijski test za identifikaciju *S. aureus* te određivanje fenotipskih svojstava, uključujući i antibiotsku osjetljivosti. Enterotoksogeni potencijal izdvojenih sojeva je istražen određivanjem sposobnost stvaranja stafilokoknih enterotoksina SEA-SEE *in vitro* primjenom imunoloških metoda (VIDAS SET2 i RPLA) te određivanjem gena za enterotoksine SEA-SEE lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (Real-time PCR) i klasičnom PCR metodom.

#### **4.2.1. Analiza sireva**

##### **4.2.1.1. Određivanje broja koagulaza-pozitivnih stafilokoka u sirevima**

Određivanje broja koagulaza-pozitivnih stafilokoka (uključujući *S. aureus*) u sirevima je provedeno prema normi HRN EN ISO 6888-1:2004 primjenom Baird-Parker agara. Metoda se temelji na selektivnoj izolaciji stafilokoka iz sireva i potvrdi njihovog identiteta koagulaza testom. Baird-Parker agar s dodatkom teluritne emulzije žumanjka jajeta je selektivan i diferencijalni agar za izolaciju koagulaza pozitivnih stafilokoka. Međutim, sama izolacija i karakterističan izgled kolonija nisu dovoljan dijagnostički kriterij jer i neki koagulaza-negativni stafilokoki mogu slično rasti, dok neki koagulaza-pozitivni stafilokoki mogu imati nekarakteristične kolonije. Iz tog razloga se za sve karakteristične i nekarakteristične kolonije provodi potvrdni koagulaza test, koji se temelji na određivanju enzima slobodne koagulaze.

#### **Provedba metode**

Priprema uzoraka je provedena prema normi HRN EN ISO 6887-1:2017. U sterilnu vrećicu za homogenizaciju s filterom (ref. 6469, 3M<sup>TM</sup>, Neuss, Njemačka) aseptično je sterilnom žlicom odvagano 10 g sira te je dodano 90 mL puferirane peptonske vode (Buffered peptone water, Oxoid CM1049, Basingstoke, UK). Suspenzija je homogenizirana u Smasher homogenizatoru (Aes Laboratories) 30 sekundi. Iz te početne suspenzije (koja predstavlja razrjeđenje  $10^{-1}$ ) pripremljena su decimalna razrjeđenja  $10^{-2}$  i  $10^{-3}$  na sljedeći način: 1 mL početne suspenzije aseptično je otpipetiran automatskom pipetom sa sterilnim nastavkom u 9 mL puferirane peptonske vode i dobro homogeniziran vortex miješalicom. Sljedeće razrjeđenje je

pripremljeno tako da je 1 mL iz razrjeđenja  $10^{-2}$  aseptično otpipetiran automatskom pipetom u 9 mL puferirane peptonske vode i dobro homogeniziran vortex miješalicom.

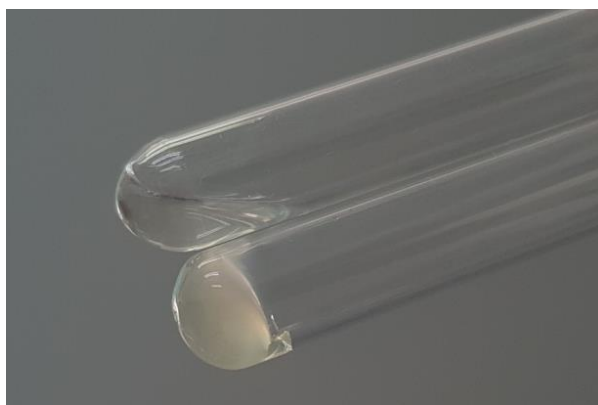
Nakon pripreme svih potrebnih razrjeđenja uzorci su nacijepljena na hranjivu podlogu Baird-Parker agar (Oxoid CM1127B, Basingstoke, UK) s dodatkom teluritne emulzije žumanjka (Egg Yolk Tellurite Emulsion supplement, Oxoid SR0054, Basingstoke, UK) sukladno normi HRN EN ISO 6888-1:2004. Nacijepljivanje je provedeno na sljedeći način. Automatskom pipetom sa sterilnim nastavkom je nacijepljeno po 0,1 mL iz svakog razrjeđenja na dvije prethodno osušene ploče Baird-Parker agara i sterilnim štapićem razmazano po površini. Nacijepljene ploče su ostavljene 15 minuta na sobnoj temperaturi da se sav volumen upije, a potom su inkubirane položene s poklopcem prema dolje na  $37\text{ °C}/24 \pm 2\text{ h}$ , odnosno još dodatnih  $24 \pm 2\text{ h}$ . Nakon 48-satne inkubacije prebrojane su sve karakteristične i nekarakteristične kolonije. Za brojanje su uzete ploče koje sadrže max. 300 kolonija s 150 karakterističnih i/ili nekarakterističnih kolonija i min. 15 kolonija u dva uzastopna razrjeđenja.

Karakteristične kolonije su crne ili sive, sjajne, konveksne, promjera 1-1,5 mm nakon 24 h, odnosno 1,5-2,5 mm nakon 48 h i okružene čistom zonom (slika 17.). Nakon 48 h inkubacije unutar čiste zone može se formirati prozirni prsten. Nekarakteristične kolonije su sive bez čiste zone ili sjajne crne sa ili bez uskog bijelog ruba, čiste zone, te bez prozirnog prstena ili je on slabo vidljiv. Sukladno normi HRN EN ISO 6888-1:2004 nakon brojenja poraslih kolonija proveden je potvrdni koagulaza test. Nakon potvrdnog testa za svaku ploču Baird-Paker agara izračunat je broj kolonija koagulaza-pozitivnih stafilokoka te krajnji rezultat jedinica koje tvore kolonije po gramu (cfu/g) uzorka sira prema formulama navedenim u normi HRN EN ISO 6888-1:2004.

### **Koagulaza test**

Za koagulaza test nasumično je odabrano 5 karakterističnih ili 5 nekarakterističnih kolonija (ako su samo one prisutne), odnosno 5 karakterističnih i 5 nekarakterističnih (ako su prisutne i jedne i druge). S površine svake odabrane kolonije sterilnom ezom je uzet dio i nacijepljen u Brain-Heart Infusion bujon (Oxoid CM1135, Basingstoke, UK). Bujon je inkubiran na  $37\text{ °C}/24 \pm 2\text{ h}$ . Nakon inkubacije, aseptično je u male sterilne epruvete dodano 0,3 mL plazme za koagulaza test (Bactident® Coagulase plasma, Merck, Darmstadt, Njemačka) i 0,1 mL svake kulture iz Brain-Heart Infusion bujona te je inkubirano na  $37\text{ °C}$ . Okretanjem epruveta

provjereno je dolazi li do zgrušavanja plazme nakon 4-6 h. Ako je reakcija bila negativna, inkubacija je nastavljena do 24 h. Reakcija je pozitivna ukoliko više od pola volumena koagulira (slika 8.). U svakom setu analize kolonija provedene su pozitivna kontrola s kontrolnim sojem *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC® 25923™ te negativna kontrola (0,3 mL plazme je aseptično dodano 0,1 mL sterilnog Brain-Heart Infusion bujona i inkubirano paralelno s uzorcima). Test se smatrao valjanim ukoliko je kod pozitivne kontrole došlo do vidljive koagulacije, a kod negativne kontrole nije bilo promjena.



**Slika 8.** Koagulaza test – epruveta dolje predstavlja pozitivnu reakciju  
(foto: I. Lj. Musladin)

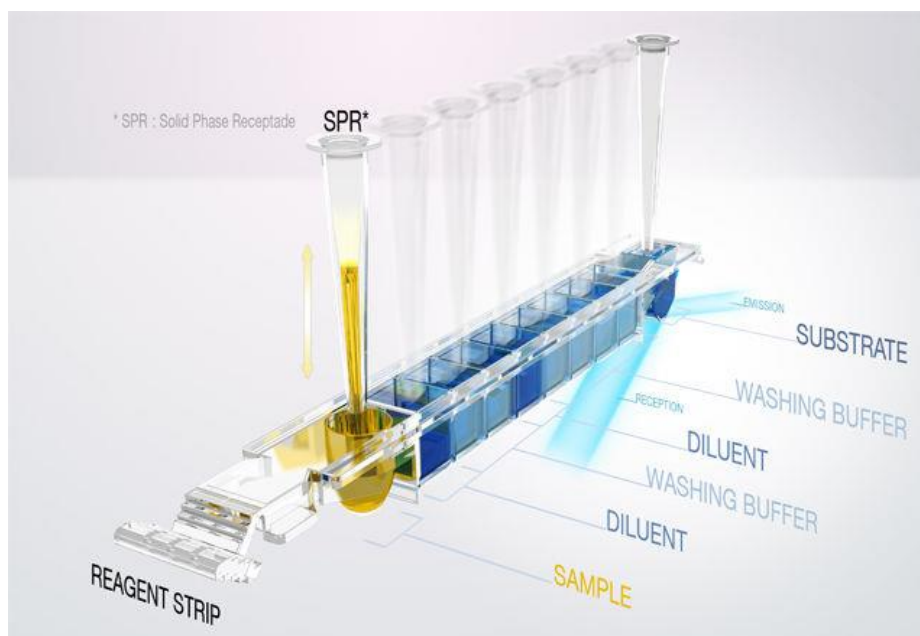
#### **4.2.1.2. Određivanje stafilokoknih enterotoksina SEA-SEE u sirevima**

Određivanje stafilokoknih enterotoksina u sirevima je provedena prema normi HRN EN ISO 19020:2017. Metoda se sastoji od dva koraka: i) ekstrakcije/koncentriranja SE iz uzoraka sireva te ii) određivanja enterotoksina imunoenzimskom metodom VIDAS® SET2.

Ekstrakcija SE se provodi u demineraliziranoj vodi, a ekstrakt se potom koncentrira membranskom dijalizom u koncentriranoj otopini polietilen-glikola (PEG). Nalaz SE u hrani najviše ovisi o učinkovitosti i razini ekstrakcije.

Kit za određivanje enterotoksina VIDAS® SET2 metodom se sastoji od stripa s 10 jažica i SPR® nastavka (Solid Phase Receptacle). Tijekom postupka SPR® automatizirano „vozi“ po stripu, ulazi u jažice stripa redoslijedom od 1. do 10., pri čemu svaka jažica sadrži određene reagense i predstavlja određeni korak u metodi (slika 9.). Unutrašnjost SPR® je obložena anti-enterotoksin antitijelom i u njemu se događaju specifične reakcije vezanja antijela i

enterotoksina. Prva jažica stripa je prazna i u nju se dodaje uzorak, standard ili pozitivna/negativna kontrola (500  $\mu$ L). Nakon što se VIDAS uređaj pokrene SPR<sup>®</sup> se automatizirano uroni u prvu jažicu da pokupi uzorak. Ukoliko je u uzorku prisutan SE u SPR<sup>®</sup> dolazi do specifične reakcije enterotoksina i antitijela. U drugom koraku SPR<sup>®</sup> ulazi u drugu po redu jažicu i tu se ispire višak nevezanog enterotoksina s otopinom za pred-ispiranje. U sljedećim jažicama 3-4-5 se provodi ispiranje. U jažici 6 se nalazi konjugat anti-enterotoksin antitijelo na koji je vezan enzim alkalna fosfataza i tu se događa vezanje konjugata na kompleks SE-antitijelo. U narednim jažicama 7-8-9 se ponovno odvija ispiranje i uklanja se višak nevezanog konjugata. Posljednja 10. jažica je kiveta u kojoj se očitava fluorescencija. Kiveta sadrži supstrat za enzim 4-metil-umbeliferil-fosfat. Kada se SPR<sup>®</sup> s nastalim sendvič kompleksom uroni u otopinu supstrata prisutni enzim hidrolizira supstrat na fluorescentni produkt 4-metil-umbeliferon, čija se fluorescencija mjeri na 450 nm. Fluorescentni signal je proporcionalan količini stvorenog produkta, a količina produkta je proporcionalna količini stvorenog sendvič kompleksa Antitijelo-SE-Antitijelo s enzimom. Osjetljivost metode je 0,25 ng/mL ekstrakta, identificira svih pet klasičnih enterotoksina (SEA-SEE) i analiza je gotova za 80 minuta. Metoda međutim ne omogućava razlikovanje enterotoksina.



**Slika 9.** bioMérieux VIDAS<sup>®</sup> Staph Enterotoxin 2 kit

(<https://www.biomerieux-diagnostics.com/vidas-solution>)

## **Ekstrakcija i koncentriranje enterotoksina**

Uzorak sira je prvo dobro homogeniziran miješanjem i usitnjavanjem sterilnom žlicom te je potom izvagano 25 g uzorka u sterilnu vrećicu za homogenizaciju s filterom (ref. 6469, 3M™, Neuss, Njemačka). Uzorku je dodano 40 mL demineralizirane vode prethodno ugrijane na  $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  i sve je homogenizirano u Smasheru 3 minute. Vrećica s uzorkom je potom ostavljena 30-60 minuta na laboratorijskoj tresilici na sobnoj temperaturi ( $18\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) kako bi se omogućila difuzija toksina. Uzorak je potom zakiseljen odgovarajućom količinom 5N klorovodične kiseline (Kemika, Zagreb, Hrvatska), kako bi se postigao pH između 3,5 i 4. Mjerenje ciljanog pH provedeno je Schott Lab 850 pH metrom s BlueLine 27 elektrodom. Zakiseljeni uzorak je potom prebačen u epruvete za centrifugu i centrifugiran na 3130g 15 minuta na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon centrifugiranja supernatant je prebačen u novu epruvetu za centrifugu te je neutraliziran 1N natrijevim hidroksidom (Kemika, Zagreb, Hrvatska) do pH 7,4 – 7,6 i ponovno centrifugiran na 3130g 15 minuta na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Koncentriranje ekstrakta je provedeno membranskom dijalizom. Za svaki uzorak je pripremljeno po 70 mL koncentrirane otopine polietilen-glikola PEG molekulske mase 20 000 g/mol (30 g PEG/70 mL vode). Za dijalizu je korištena membrana MWCO 6–8 kDa (Spectrum™ Labs Spectra/Por™ 1, Thermo Fisher Scientific, Göteborg, Švedska), koja je prethodno pripremljena prema uputi proizvođača (50-60 cm membrane je 30 minuta rehidrirano u demineraliziranoj vodi te potom isprana izvana i iznutra). Nakon pripreme jedan kraj membrane je zatvoren zatvaračem, dok je kroz drugi kraj membrana napunjena ekstraktom uzorka. U tu svrhu je korišten stakleni lijevka s filterom kako bi se uklonili eventualno zaostali komadići sira. Membrana je zatvorena i s drugim zatvaračem te položena i uronjena u otopinu PEG u plitkoj laboratorijskoj posudi. Ekstrakt je ostavljen da se koncentrira preko noći u hladnjaku na  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po završetku koncentriranja membrana je dobro isprana vodom izvana kako bi se uklonili ostaci PEG otopine. Membrana je potom otvorena s jedne strane i koncentrirani ekstrakt je prebačen u staklenu bočicu. Kako bi se dobila maksimalna količina koncentrata, membrana je iznutra isprana nekoliko puta malim volumenima (1-2 mL) PBS (engl. Phosphate Buffer saline) otopine pH  $7,3 \pm 0,2$  (NaCl/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 145 mM/10 mM, Kemika, Zagreb, Hrvatska). Krajnja količina koncentriranog ekstrakta treba iznositi 5 do 5,5 g. Koncentrirani ekstrakt se potom podvrgava određivanju SE imunoenzimskom metodom.



## **Određivanje enterotoksina VIDAS SET2 metodom**

Za određivanje SEA-SEE su korišteni mini VIDAS uređaj i VIDAS® SET2 test za određivanje stafilokoknih enterotoksina (oboje bioMérieux, Marcy-l’Etoile, Francuska).

Prije početka analize stripovi, SPR nastavci, uzorci i reagensi (standardi, pozitivna i negativna kontrola) su ugrijani na sobnu temperaturu. U uređaj su prema uputi proizvođača postavljeni stripovi i SPR nastavci (1 strip + 1 SPR po uzorku), koje uređaj prepoznaje po barkod oznakama. Prije uporabe svi reagensi i uzorci su dobro homogenizirani vortex miješalicom. Standard u duplikatu je obavezno korišten u svakoj seriji testiranja uzoraka, dok su negativna i pozitivna kontrola bile korištene pri svakoj prvoj primjeni nove serije (lota) SET2 kitova. U početne jažice prva dva stripa je automatskom pipetom dodano po 500 µL standarda, dok je u jažice ostalih stripova dodano po 500 µL pozitivne i negativne kontrole (ako su korištene) te 500 µL uzorka (koncentrata ekstrakta iz uzoraka sireva). U uređaj su uneseni podaci o standardima, kontrolama i uzorcima te je pritiskom tipke Start započet test. Po završetku testa uređaj analizira rezultate i računa relativnu vrijednost fluorescencije (RFV) i testnu vrijednost uzorka, koja je omjer RFV uzorka u odnosu na standard. Uređaj također tumači rezultat kao pozitivan ili negativan.

### **4.2.1.3. Određivanje fizikalno-kemijskih parametara sireva**

U sirevima su određeni fizikalno-kemijski parametri važni za rast i razmnožavanje *S. aureus*: temperatura, pH vrijednost i aktivitet vode ( $a_w$ ). Mjerenje temperature je provedeno odmah po kupnji, dok su pH vrijednost i aktivitet vode određeni u laboratoriju odmah po završetku mikrobiološke analize.

### **Mjerenje temperature u središtu sira**

Temperatura je izmjerena termometrom s ubodnom sondom Testo 106. Sonda je prije mjerenja dezinficirana 70 % etanolom.

## **Određivanje pH vrijednosti u sirevima**

Mjerenje pH vrijednosti u sirevima je provedeno pH metrom Schott Lab 850 s elektrodom BlueLine 27 (Schott) i sondom za kompenzaciju temperature. Prije uporabe pH metar je kalibriran sa standardima pH 4 (WTW) i pH 7 (WTW). Elektroda pH metra i temperaturna sonda uronjene su u uzorak sira, te ostavljene do stabilnog očitavanje pH. Za svaki sir su provedena dva mjerenja, a konačni rezultat je srednja vrijednost dva mjerenja.

## **Određivanje aktiviteta vode u sirevima**

Aktivitet vode je određen prema normi HRN EN ISO 21808:2005 uređajem za određivanje aktiviteta vode HygroPalm23-AW (Rotronic, Bassersdorf, Švicarska). Sir je usitnjen i njime je napunjena posudica za mjerenje do oznake. Posudica je potom zatvorena i uzorak je ostavljen 30 minuta da se aklimatizira na istu radnu temperaturu kao i sonda uređaja. Nakon aklimatizacije, na posudicu s uzorkom je namještena sonda uređaja te je mjerenje provedeno prema uputi proizvođača. Uređaj prikazuje izmjeren aktivitet vode.

### **4.2.2. Analiza izdvojenih sojeva *Staphylococcus aureus* iz sireva**

#### **4.2.2.1. Aglutinacijski test za identifikaciju *S. aureus***

Svih 180 koagulaza-pozitivnih izolata je podvrgnuto aglutinacijskom testu Pastorex™ STAPH-PLUS (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francuska). Izdvojeni sojevi s pozitivnim aglutinacijskim testom su smatrani potvrđenim *S. aureus* sojevima.

Pastorex™ STAPH-PLUS je brzi aglutinacijski test za identifikaciju *S. aureus*, koji istovremeno identificira njegova tri različita antigena: vezanu koagulazu (fibrinogenku aktivnost), protein A i kapsularni polisaharid. Reagens u testu su lateks čestice senzitivirane s fibrinogenom, IgG antitijelima za protein A i specifičnim monoklonskim antitijelima za kapsularne polisaharide (patent Instituta Pasteur). Specifične reakcije između antigena i antitijela dovode do umrežavanja lateks čestica i stvaranja vidljivih agregata (slika 16.) .

Prije uporabe reagensi su ugrižani na sobnu temperaturu i dobro homogenizirani vortex miješalicom. Unutar kruga na aglutinacijskoj kartici je dozirana kap lateks reagensa. Na isti način je u krug ispod dodana kap negativne kontrole. S površine svake odabrane kolonije

sterilnom ezom je uzet dio i razmućen u lateks reagensu kroz 10 sekundi. Isto je ponovljeno s negativnom kontrolom. Suspenzija je homogenizirana laganim horizontalnim kružnim pokretima i rezultat je očitun unutar 30 sekundi. Rezultati su tumačeni na sljedeći način. Stvaranje agregata vidljivih golim okom pod normalnim svjetlom unutar 30 sekundi se smatralo pozitivnom reakcijom. Ukoliko nakon 30 sekundi nije došlo do stvaranja agregata rezultat se smatrao negativnim. Stvaranje agregata u negativnoj kontroli je značilo da dolazi do autoaglutinacije te se test ne može protumačiti.

U svakom setu analize kolonija provedena je i pozitivna kontrola s kontrolnim sojem *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC® 25923™. Test se smatrao valjanim ukoliko je pozitivna kontrola pokazala vidljivu aglutinaciju, a negativna kontrola bila bez vidljivih agregata.

#### **4.2.2.2. Određivanje fenotipskih svojstava izdvojenih sojeva *S. aureus***

Kod izdvojenih sojeva su određena sljedeća svojstva: morfologija (izgled kolonija na Baird-Parker agaru i bojenje po Gram-u), prisutnost enzima Dnaze i katalaze te stvaranje hemolizina (hemolize). Također su provedeni i API STAPH® biokemijski testovi.

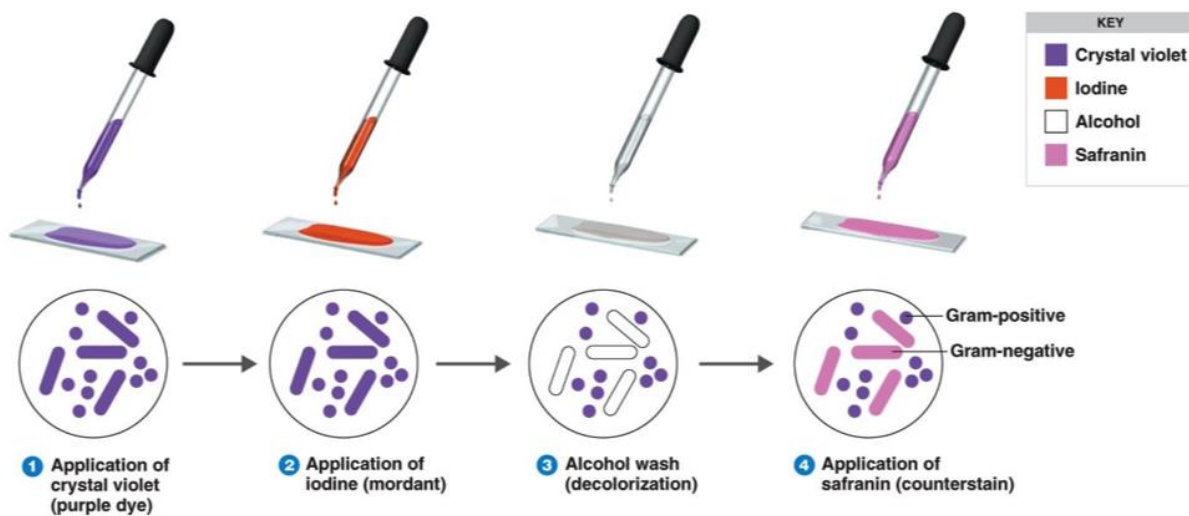
#### **Bojenje po Gram-u**

Bojenje je provedeno prema protokolu Američkog društva za mikrobiologiju (SMITH i HUSSEY, 2005.).

Priprema preparata: na čisto predmetno stakalce dodane su 1-2 kapi sterilne fiziološke otopine, u koju je potom mikrobiološkom ezom prenesena jedna kolonija izolata koji se želi mikroskopirati. Uzorak je potom ravnomjerno razmazan po površini predmetnog stakalca. Nakon sušenja na zraku, preparat je fiksiran iznad plamena Bunsenovog plamenika kratkim provlačenjem predmetnog stakalca preko konusa plamena 2-3 puta. Prije bojenja preparat je ohlađen na zraku.

Bojenje: za bojenje je korišten kit za bojenje preparata za mikroskopiranje (BioGram 4 kit, BioGnost, Zagreb, Hrvatska), koji sadrži otopine kristal-violeta, lugola, safranina i otopinu za odbojavanje. Preparat je prvo obojen otopinom kristal violeta (1 minuta). Nakon 1 minute višak boje je uklonjen odlijevanjem sa stakalca, ispran lugolovom otopinom te fiksiran istom

otopinom 1 minutu. Nakon 1 minute preparat je ispran demineraliziranom vodom (5 sekundi), zatim tretiran Gram dekolorizator otopinom (10-15 sekundi) i potom ponovno ispran demineraliziranom vodom (5 sekundi). U završnom koraku preparat je tretiran otopinom safranina (1 minuta) i potom ispran demineraliziranom vodom (5 sekundi). Preparat je osušen na zraku (slika 10.). Mikroskopiranje je provedeno pod najvećim povećanjem (100x) uz uporabu imerzijskog ulja za mikroskopiranje (1 kap) na mikroskopu Olympus BX41. *S. aureus* su Gram pozitivni koki (ljubičasta boja preparata) u grozdastim nakupinama (slika 18.).



**Slika 10.** Shematski prikaz bojenja po Gram-u (izvor: laboratoryinfo.com)

## Dnaza test

Test se provodi s ciljem razlikovanja *S. aureus* od ostalih stafilkoknih vrsta. *S. aureus* stvara Dnazu, enzim koji razgrađuje DNA molekulu na oligonukleotide i fosfate.

S površine svake odabrane kolonije sterilnom ezom je uzet dio i nacijepljen u jednom potezu na Dnaza agar (Dnase agar, Oxoid CM0321, Basingstoke, UK). Agar je inkubiran na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}/24 \pm 2\text{ h}$ . Nakon inkubacije ploče su zalivene s 2 mL 1 M HCl. Stvaranje široke prozirne zone oko kolonija predstavlja pozitivnu reakciju (slika 11.). Bakterija *S. aureus* daje pozitivnu reakciju.

U svakom setu analize kolonija provedena je i pozitivna kontrola s kontrolnim sojem *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC<sup>®</sup> 25923<sup>™</sup>. Test se smatrao valjanim ukoliko je pozitivna kontrola dala urednu pozitivnu reakciju.



**Slika 11.** Pozitivan Dnaza test (foto: I. Lj. Musladin).

### **Katalaza test**

S površine svake odabrane kolonije sterilnom ezom je uzet dio i uronjen u otprilike 300  $\mu$ L 3%  $H_2O_2$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska). Stvaranje mjehurića kisika uslijed enzimske razgradnje vodikovog peroksida na vodu i kisik predstavlja pozitivnu reakciju (slika 12.). Bakterija *S. aureus* stvara enzim katalazu, stoga daje pozitivnu reakciju.

U svakom setu analize kolonija provedena je i pozitivna kontrola s kontrolnim sojem *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC<sup>®</sup> 25923<sup>™</sup>. Test se smatrao valjanim ukoliko je pozitivna kontrola dala urednu pozitivnu reakciju.



**Slika 12.** Pozitivan katalaza test (foto: I. Lj. Musladin).

## Test hemolize

S površine svake odabrane kolonije sterilnom ezom je uzet dio i naciepljen u jednom potezu na krvni agar (Blood agar base No. 2, Oxoid CM 0271, Basingstoke, UK) s dodatkom defibrinirane ovčje krvi (Biognost, Zagreb, Hrvatska). Agar je inkubiran na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}/24 \pm 2\text{ h}$ . Nakon inkubacije prati se prisutnost zone hemolize uslijed razgradnje eritrocita u krvnom agaru. Stvaranje široke prozirne zone oko kolonija ukazuje na  $\beta$ -hemolizu, koja je karakteristična za bakteriju *S. aureus*. Stvaranje dvostruke zone oko kolonija ukazuje na  $\alpha$ - i  $\beta$ -hemolizu (slike 19. i 20.).

## Biokemijski testovi

Biokemijski testovi su provedeni pomoću API STAPH<sup>®</sup>, standardiziranog sustava za identifikaciju rodova *Staphylococcus*, *Micrococcus* i *Kocuria*, a koji se temelji na minijaturiziranim biokemijskim testovima i specijalno prilagođenoj bazi podataka. Test se sastoji od 20 mikrojažica koje sadrže dehidrirane supstrate. Mikrojažice se inokuliraju bakterijskim suspenzijama pripremljenim u posebnom API STAPH mediju, a koje rekonstituiraju supstrate. Tijekom inkubacije bakterijski metabolizma iskorištava supstrate u jažicama što uzrokuje promjenu boje koja je vidljiva spontano ili dodatkom određenog reagensa. U jednom stripu je provedeno 18 različitih biokemijskih testova, koji uključuju: fermentaciju šećera fruktoze, manoze, maltoze, laktoze, trehaloze, manitola, ksilitola, melibioze, rafinoze, ksiloze, saharoze, metil- $\alpha$ D-glukopiranozida i N-acetil-glukozamina, redukciju nitrata u nitrite, određivanje alkalne fosfataze, stvaranje acetil-metil-karbinola (Voges-Proskauer reakcija) te određivanje arginin dihidrolaze i ureaze (slika 21.).

Test je proveden na sljedeći način. U API STAPH mediju (ref. 20 500, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francuska) je pripremljena suspenzija čistog izolata *S. aureus* gustoće 0,5 McFarlanda (izmjereno bioMérieux denzimetrom) te su sa suspenzijom inokulirane jažice testa prema uputi proizvođača. Prve dvije jažice predstavljaju negativnu kontrolu (bez supstrata) i pozitivnu kontrolu (glukoza). Test je inkubiran na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}/18\text{-}24\text{ h}$ . Nakon inkubacije u određene jažice (NIT, PAL, VP) dodani su potrebni reagensi; NIT1 + NIT2 u NIT, ZYM A + ZYM B u PAL te VP1 + VP2 u VP (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francuska), kako bi se utvrdilo stvaranje produkata metabolizma. Reakcije su tumačene usporedbom boja u jažicama s negativnom i pozitivnom kontrolom te im je ovisno o tome dodijeljen određeni broj prema uputi proizvođača.

Dobiveni numerički profil izolata je uspoređen s bazom podataka u aplikaciji apiweb™ (bioMérieux, Marcy-l’Etoile, Francuska) i ovisno o statističkoj podudarnosti izolat je identificiran kao *S. aureus* ili neka druga vrsta stafilokoka. Rezultati testa su se smatrali valjanima ukoliko je apiweb™ statističku podudarnost ocijenjenio najmanje kao prihvatljivu (86,7 %).

#### **4.2.2.3. Određivanje antibiotske osjetljivosti izdvojenih sojeva *S. aureus***

U određivanju antibiotske osjetljivosti primjenjena je EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) standardizirana disk difuzijska metoda na Mueller-Hinton agaru (EUCAST, 2020.).

Čista kultura koagulaza-pozitivnih stafilokoka s krvnog agara (iz testa hemolize) je suspendirana u sterilnoj fiziološkoj otopini (0,85 % NaCl u destiliranoj vodi) do gustoće 0,5 McFarland standarda (izmjereno na denzimetru Biosan DEN-1B, Latvija).

Suspenzija je ravnomjerno inokulirana na površinu Mueller-Hinton agara (CM0337, Oxoid, Basingstoke, UK) te je unutar 15 minuta na površinu svake ploče aplicirano po 7 antibiotskih diskova (Biorad, Marnes-la-Coquette, Francuska), koji su prethodno ugrižani na sobnu temperaturu. Popis antibiotika se nalazi u tablici 6. Ploče su inkubirane položene s poklopcem prema dolje na  $35 \pm 1$  °C/16-20 h. Nakon inkubacije inhibicijske zone su očitane pomoću ravnala do točke gdje više nema rasta (slika 22.). Rezultati osjetljivosti su analizirani prema EUCAST priručniku (ver. 8.0) i kriterijima (Ver. 7.0.) koji su bili važeći u vrijeme testiranja (2020.).

**Tablica 6.** Popis antibiotičkih diskova koji su korišteni u testiranju antibiotičke osjetljivosti

Antibiotik	Koncentracija	Zona inhibicije*	
		S ** $\geq$	R** <
Azithromycin (AZM)	15 $\mu$ g	21	21
Cefoxitin (FOX)	30 $\mu$ g	22	22
Clindamicin (CM)	2 $\mu$ g	22	22
Erythromycin (E)	15 $\mu$ g	21	21
Gentamicin (GM)	10 $\mu$ g	18	18
Moxifloxacin (MXF)	5 $\mu$ g	25	25
Mupirocin (MUP)	5 $\mu$ g	30	30
Oxacilin (OX)	5 $\mu$ g	22	22
Trimethoprim-Sulphamethoxazole (SXT)	1,25/23,75 $\mu$ g	17	17

\* promjer u mm; S – osjetljiv (sensitive); R - rezistentan

\*\* prema EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 11.0., važeće 01-01-2021

#### 4.2.3. Određivanje sposobnost stvaranja enterotoksina *in vitro*

Određivanje sposobnosti izolata *S. aureus* da stvaraju enterotoksine SEA-SEE *in vitro* je provedeno primjenom imunoloških metoda. U ovom su istraživanju primjenjeni imunoenzimski test VIDAS SET2 i RPLA. Dok VIDAS SET2 može utvrditi prisutnost SEA-SEE bez mogućnosti identifikacije enterotoksina, RPLA može odrediti točan tip enterotoksina SEA-SED. Princip VIDAS SET2 metode je opisan u poglavlju 4.2.1.2.

##### 4.2.3.1. Priprema bakterijske kulture i proizvodnja enterotoksina *in vitro*

Sposobnost stvaranja enterotoksina testirana je na izolatima koji su potvrđeni kao koagulaza pozitivni stafilokoki. Izolat čija se sposobnost stvaranja SE određuje, inokulira se u hranjiv bujon. Ukoliko izolat ima sposobnost stvaranja toksina tijekom inkubacije na 37 °C/24 doći će do stvaranja detektabilne količine SE. Za ova određivanja su korištene iste kulture u Brain-Heart Infusion bujonu kao i za koagulaza test.



Priprema bakterijskih kultura za određivanje proizvodnje SE *in vitro* su pripremljene na način da je sterilnom ezom uzeta po jedna kolonija čiste kulture s Baird-Parker agara i inokulirana u 5 mL Brain-Heart Infusion bujona (Oxoid CM1135, Basingstoke, UK). Testirano je po 10 koagulaza pozitivnih kolonija po uzorku sira. Bujoni su inkubirani na 37 °C/24 ± 2 h. Nakon inkubacije, po 1 mL kulture je sterilno otpipetiran u epruvete za mikrocentrifugu te je centrifugirano na 3000 g 15 minuta. Supernatanti su potom korišteni za određivanje prisutnosti stafilokoknih enterotoksina VIDAS SET2 i RPLA metodama.

#### **4.2.3.2. Određivanje enterotoksina SEA-SEE VIDAS SET2 metodom**

Provedeno je na identičan način kako je opisano u 4.2.1.2., iz supernatanta bakterijske kulture.

#### **4.2.3.3. Određivanje enterotoksina SEA-SEE RPLA metodom**

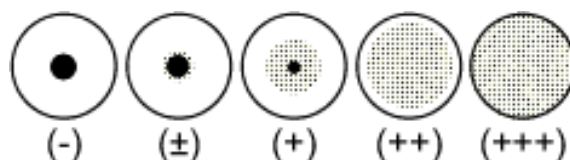
Anti-serumi za RPLA su zasad komercijalno dostupni samo za klasične enterotoksine SEA, SEB, SEC, SED i SEE.

RPLA metoda je provedena na sljedeći način:

Sve bočice anti-seruma i pozitivnih kontrola (ref. TD0900A, Basingstoke, UK) su prije uporabe ugrijane na sobnu temperaturu i dobro homogenizirane vortex miješalicom. Mikrotitarska pločica je postavljena tako da svaka kolona sadrži 8 jažica. Kolone su potom obilježene slovima A, B, C, D i L, što označava enterotoksine i lateks kontrolu za provjeru autoaglutinacije. Po uzorku je korišteno pet takvih kolona. U sve jažice obilježenih kolona je potom otpipetirano po 25 µL diluenta iz RPLA kita. U prve jažice svake kolone dodano je po 25 µL supernatanta uzorka. Potom je pipetom provedeno razrjeđivanje uzoraka na način da se iz prvog reda uzelo 25 µL i prebacilo u sljedeću jažicu u koloni i tako dalje do posljednje jažice u koloni. Nakon razrjeđivanja uzorka, u svaku jažicu kolone A je dodano 25 µL anti-enterotoksin A seruma. Na identičan način je u jažice sljedećih kolona dodano po 25 µL anti-enterotoksin seruma B, C i D. U jažicu kolone L je dodano 25 µL lateks seruma. Pozitivne kontrole sa standardima enterotoksina A, B, C i D su provedene pri svakom prvom otvaranju RPLA kita. Nakon dodavanja svih reagensa za test, pločice su pokrivene poklopcem i sadržaj je 15 minuta promiješan na tresilici za mikrotitarske pločice. Pločice su ostavljene na sobnoj temperaturi 20-24 sata, bez daljnje trešnje i pomicanja. Nakon 20-24 sata pločice su pregledane pod povećalom.

Rezultati su tumačeni prema uputi proizvođača. Pozitivnu reakciju predstavlja pojava mrežaste/zrnaste strukture na dnu jažice (slika 13.). U jažicama kolone L ne smije biti znakova aglutinacije.

Ovom metodom, osim što smo potvrdili sposobnost stvaranja enterotoksina kod izolata bakterije *S. aureus*, ujedno smo odredili i grupu enterotoksina koju izolat stvara.



**Slika 13.** Analiza rezultata RPLA testa (izvor: oxoid.com)

#### **4.2.4. Određivanje gena za enterotoksine SEA-SEE molekularnim metodama**

Određivanje gena za stafilokokne enterotoksine *sea-see* je provedena primjenom dvije molekularne metode: lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (Real-time PCR) i klasičnom lančanom reakcijom polimeraze (PCR). Klasični PCR je proveden u Laboratoriju za inspekciju hrane Zavoda za veterinarsku medicinu Sveučilišta u Perugi, gdje su izdvojeni sojevi poslani na potvrdu.

##### **4.2.4.1. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (Real-time PCR)**

Molekularna metoda za određivanje gena za enterotoksine SEA-SEE koja je korištena u ovom istraživanju temelji se na 5' nukleaznom Real-time simplex PCR-u, u kojem su korištene patentirane MGB fluorogene probe. Probe su oligonukleotidi specifični za SE gene, koji su na 5' kraju obilježeni fluorogenom bojom 6-karboksi-fluoresceinom (FAM), a na 3' kraju s patentiranim MGB spojem (Minor Groove Binder) i nefluorescirajućim prigušivačem (NFQ). Svrha MGB spoja je da stabilizira hibridizaciju probe i time pojačava njenu specifičnost. Prisutnost NFQ smanjuje pozadinski signal što rezultira boljom spektralnom izvedbom testa. Tijekom PCR reakcije, početnice i proba se vežu na specifična mjesta na DNA predlošku. Proba se lijepi na komplementarni nukleotidni slijed između mjesta vezanja F-početnice i R-početnice. DNA polimeraza produžuje lanac početnice uzvodno od probe. Ukoliko je proba

vezana na pravom mjestu 5' nukleazna aktivnost cijepa probu otpuštajući fragment koji sadrži FAM boju. Onog trena kada se otpusti, fluorescencija FAM boje više nije potisnuta i dolazi do porasta signala fluorescencije. Porast fluorescencijskog signala se uočava samo ako je proba vezana na ciljani komplementarni DNA slijed, koji se tijekom reakcije amplificira. Količina fluorescencije, koja se povećava nakon svakog ciklusa je proporcionalna količini specifičnog PCR produkta. Tijekom amplifikacije, PCR uređaj prati amplifikaciju u stvarnom vremenu analizirajući emisiju fluorescencije FAM boje. Ciklus u kojem fluorescencijski signal prelazi prag naziva se Ct ciklus ili ciklus praga (engl. threshold cycle). Ct vrijednost je obrnuto proporcionalna početnoj količini ciljane DNA, odnosno što je ciljane DNA u uzorku više, to je Ct vrijednost manja.

Za potrebe ovog istraživanja izrađene su po narudžbi početnice (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, SAD) i fluorogene probe (Applied Biosystems, UK) prema nukleotidnim sljedovima koje su objavili NAKAYAMA i sur. (2006.). Popis početnica i proba koje su korištene u ovom istraživanju nalazi se u tablici 7. Početnice i probe su čuvane na -20 °C.

Primjenjeni postupak Real-time PCR-a je modifikacija metode koje su opisali NAKAYAMA i sur. (2006.). Protokol za određivanje gena *sea*, *seb*, *sec*, *sed* i *see* je prilagođen uređaju PikoReal 24 (Thermo Fisher Scientific, Finska), a preinake se odnose na reakcijski volumen (20 µL), komponente reakcijske smjese (Master mix) i manji broj ciklusa (40). U postupku je korišten Luminaris Probe qPCR Master Mix (ref. #K0952, Thermo Scientific Baltics, Vilnius, Litva), otopina spremna za uporabu i optimizirana za Real-time PCR. Master mix uključuje Hot Start *Taq* DNA polimerazu, uracil-DNA glikozilazu (UDG) i deoksinukleotide (dNTP) u optimiziranom PCR puferu. Hot Start *Taq* DNA polimeraza je kemijski modificirana *Taq* DNA polimeraza, koja je inaktivna na sobnoj temperaturi kako bi se spriječilo produživanje nespecifično vezanih početnica tijekom pripreme reakcijske smjese za analizu, a aktivira je početna denaturacija tijekom PCR postupka. Svrha UDG i dodanih dUTP je sprječavanje „carry-over“ kontaminacije između PCR reakcija. Do „carry-over“ zagađenja dolazi uslijed stvaranja velikog broja PCR produkata, čiji tragovi mogu biti preneseni u sljedeće reakcije i uzrokovati lažno-pozitivne rezultate zbog re-amplifikacije. Pred-tretman UDG-om (50 °C/2 min) uklanja sve amplikone koji sadrže deoksiuracil umjesto timina koji su preneseni iz prethodnih reakcija (LONGO i sur., 1990.). Pufer je posebno optimiziran za PCR reakcije koje koriste proba specifične za određene nukleotidne sljedove.

Geni *sea*, *seb*, *sec*, *sed* i *see* su istraženi zasebnim PCR reakcijama, što znači da je za svaki izolat provedeno 5 pojedinačnih PCR reakcija.

**Tablica 7.** Početnice i MGB probe korištene u PCR reakciji određivanja SEA-SEE gena

<b>Gen</b>	<b>Proba</b>	<b>Nukleotidni sljed (5'-3')*</b>	<b>Položaj**</b>	<b>GenBank accession no.</b>
<i>sea</i>	<b>eta-F</b>	TTTGAAACGGTTAAAACGAATAAG	489-513	M18970
	<b>eta-R</b>	TTTCCTGTAAATAACGTCTTGCTTGA	543-568	
	<b>eta-T</b>	FAM-CTGTTTCAGGAGTTGGATC-MGB	524-541	
<i>seb</i>	<b>etb-F</b>	AGGTGACTGCTCAAGAATTAGATTACC	785-811	M11118
	<b>etb-R</b>	AAGGCGAGTTGTTAAATTCATAGAGTT	842-868	
	<b>etb-T</b>	FAM-AACTCGTCACTATTTGGTG-MGB	813-831	
<i>sec</i>	<b>etc-F</b>	GGCGATAAGTTTGACCAATCTAAATAT	811-837	X05815
	<b>etc-R</b>	AAGGTGGACTTCTATCTTCACACTTTT	864-900	
	<b>etc-T</b>	FAM-TGTACAACGACAATAAAA-MGB	845-861	
<i>sed</i>	<b>etd-F</b>	CACAAGCAAGGCGCTATTTG	836-855	M28521
	<b>etd-R</b>	TCGGGAAAATCACCCCTTAACA	966-986	
	<b>etd-T</b>	FAM-ATACAGCGCGGAAA-MGB	901-914	
<i>see</i>	<b>ete-F</b>	CTTTGGCGGTAAGGTGCAA	594-612	M21319
	<b>ete-R</b>	ACCGTGGACCCTTCAGAAGA	634-653	
	<b>ete-T</b>	FAM-AGGCTTGATTGTGTTTCA-MGB	615-632	

\* prema Nakayama i sur., 2006.

F – forward početnica; R – reverse početnica

FAM – 6-karboksi-fluorescein; MGB - minor groove binder

\*\* položaj odgovara nukleotidnim brojevima nizvodno od ATG početnog kodona odgovarajućeg gena

#### **4.2.4.1.1. Izdvajanje DNA iz izdvojenih sojeva *S. aureus***

Izdvajanje je provedeno prema protokolu EU-RL metode „Detection of genes encoding staphylococcal enterotoxins Multiplex PCR for sea to see and ser“ (DE BUYSER i sur., 2009.). Sterilnom ezom je uzeta jedna kolonija izolata koji se istražuje i razmućena je u 100  $\mu$ L InstaGene<sup>TM</sup> Matrix reagensa (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francuska) u mikroepruveti od 200  $\mu$ L. Suspenzija je pomiješana na vortex miješalici 15-20 sekundi te inkubirana u suhom inkubatoru na 56 °C/60 minuta (Boekel, SAD). Nakon inkubacije suspenzija je pomiješana na vortex miješalici 15-20 sekundi i potom inkubirana u suhom inkubatoru na 95 °C/45 minuta. Nakon inkubacije suspenzija je ponovno pomiješana vortex miješalicom 15-20 sekundi te centrifugirana 5 minuta na 13200 rpm nakon čega je uzorak DNA spreman za primjenu. Izdvojena DNA se do PCR analize čuvala na +4 °C (max. 24 sata), odnosno dugotrajno na -20 °C. Ukoliko je bila zamrznuta, otapanje je provedeno na sobnoj temperaturi (17-25 °C), zaštićeno od Sunčeve svjetlosti. Nakon otapanja DNA uzorak je obavezno promiješan vortex miješalicom i centrifugiran 5 minuta na 13200 rpm prije uporabe.

#### **4.2.4.1.2. Real-time PCR protokol**

U PCR reakcijama su korištene 10  $\mu$ M radne otopine početnica i MGB proba. MGB probe dolaze kao suspenzije koncentracije 100  $\mu$ M, dok su početnice u liofiliziranom obliku i potrebno ih je rekonstituirani u odgovarajućem volumena TE pufera (1 mM Tris-HCL pH 8,0/0,01 mM EDTA, Invitrogen, Carlsbad, SAD). Radne otopine su pripravljene razrjeđivanjem originalnih 100  $\mu$ M otopina sa ultra-čistom destiliranom vodom namjenjenom za molekularne metode (Dnase/RNase free) (Invitrogen, Paisley, UK) u omjeru 1:10.

Svi potrebni reagensi su prije pripreme reakcijske mješavine lagano promiješani vortex miješalicom i kratko centrifugirani. Reakcijska mješavina za N PCR reakcija je pripravljena prema tablici 8. i dobro promiješana vortex miješalicom te kratko centrifugirana kako bi se izbjegao gubitak reagensa.

**Tablica 8.** Priprema PCR reakcijske mješavine

<b>Reagens (redosljedom dodavanja)</b>	<b>Volumen reagensa po reakciji</b>
Luminaris Master mix (2X)	N x 10 $\mu$ L
F-početnica (10 $\mu$ M)	N x 0,6 10 $\mu$ L
R-početnica (10 $\mu$ M)	N x 0,6 10 $\mu$ L
MGB proba (10 $\mu$ M)	N x 0,4 10 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O (nukleaza-slobodna)	N x 6,4 $\mu$ L
Ukupni volumen	N x 18 $\mu$ L

N – broj PCR reakcija

U jažice PCR stripova dodano je 18  $\mu$ L PCR reakcijske mješavine i 2  $\mu$ L izdvojene DNA iz bakterijskih izolata koji se istražuje te su lagano promiješane i po potrebi kratko centrifugirane. U smjesi ne smije biti mjehurića zraka jer ometaju očitavanje fluorescencije. PCR stripovi s uzorcima DNA su uložene u uređaju PikoReal 24 i pokrenut je PCR program prema uvjetima prikazanim u tablici 9. Uvjeti Real-time PCR reakcije su podešeni prema uputama proizvođača Luminaris Master Mix-a, a odgovaraju uvjetima koje su opisali KLOTZ i sur. (2003.) te NAKAYAMA i sur. (2006.).

**Tablica 9.** Uvjeti PCR protokola za uređaj Piko Real 24

UDG pred-tretman	50 °C/2 min
Početna denaturacija	95 °C/10 min
PCR amplifikacija (40 ciklusa)	95 °C/15 s
	60 °C/60 s

Po svakoj izdvojenoj DNA provedeno je 5 pojedinačnih PCR reakcija za određivanja 5 gena *sea-see*, u duplikatu.

Uz svaku seriju PCR reakcija provedena je negativna kontrola No template control (NTC), uzorak koji ne sadrži ciljani gen kako bi se provjerila kontaminacija reagensa ili stvaranje dimera početnica. Kao NTC je korištena nukleaza-slobodna H<sub>2</sub>O (2  $\mu$ L). Uspješnost PCR

reakcija provjerena je pozitivnim kontrolama. U tu svrhu korišteni su enterotoksogeni sojevi iz međulaboratorijskih usporedbi iz zbirke Public Health England.

#### **4.2.4.1.3. Analiza rezultata**

Nakon završetka PCR postupka ukoliko je ciljani gen nađen rezultati su prikazani kao krivulja fluorescencije, koju karakterizira Ct vrijednost (ciklus u kojem dolazi do značajnog porasta fluorescencije kao posljedica umnažanja ciljanog gena).

PCR reakcija se smatrala valjanom ukoliko kod negativne kontrole nije utvrđena amplifikacija, a pozitivne kontrole su dale krivulju amplifikacije u očekivanom ciklusu.

Rezultati su analizirani na sljedeći način:

- Uzorci koji imaju Ct vrijednost < 30 su se smatrali pozitivnima, odnosno da je određeni gen kod kojeg je došlo do amplifikacije prisutan u izdvojenoj DNA.
- Uzorci sa Ct vrijednosti između 30-35 i s oblikom krivulje koji je sigmoidan/logaritamski su se smatrali slabo pozitivnima, ali se još uvijek smatralo da je gen prisutan u izdvojenoj DNA.
- Temeljem rezultata određivanja učinkovitosti PCR reakcija kao „Cut-off“ vrijednost je postavljen 35. ciklus, te su sve amplifikacije nakon tog ciklusa smatrane negativnima.

#### **4.2.4.2. Lančana reakcija polimerazom (klasični PCR)**

Klasični PCR je proveden prema sljedećem protokolu:

Izolati *S. aureus* su aerobno kultivirani u Brain Heart Infusion Broth (BHI, Oxoid) na 37 °C kroz 48 sati. Ekstrakcija DNA je provedena primjenom HiPurATM DNA Purification Kit-a (Qiagen, Hiden, Njemačka). DNA amplifikacija je izvedena na reakcijskoj smjesi od 25 µL, koja je sadržavala: 12,5 µL RED Taq (10 mM Tris HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,001 % želatine, 0,2 mM svakog deoksiribonukleozid trifosfata), 0,5 µL (1 µM) svake početnice, 5 µL ekstrahirane DNA i 6,5 µL H<sub>2</sub>O. Početnice i uvjeti amplifikacije su prikazani u tablici 10.

PCR reakcija je provedena u uređaju Thermocycler Gene Amp, PCR System, 9700 Gold (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). PCR produkti su analizirani elektroforezom na 1,5 % agaroznom gelu, koji je sadržavao etidij bromid (0,5 $\mu$ g / ml). 10  $\mu$ L svakog PCR produkta je nanoseno na agar s 2  $\mu$ L 6X pufera za nanošenje (Fermentas, VWR Italija), zajedno s 5  $\mu$ L marker-PCR kao referentne DNA (Fermentas, VWR, Italija). Elektroforeza je provedena pri naponu od 100V otprilike jedan sat u TBE 10X (Trizma baza, borna kiselina, EDTA 0,5M pH 8). Na kraju svakog elektroforetskog niza dobivene vrpce su vizualizirane pomoću UV transiluminatora (Fotodine 3-3102 Celbio, Milan, Italija).



**Tablica 10.** Početnice i uvjeti amplifikacije korišteni u klasičnoj PCR metodi

Gen	Nukleotidni sljed (5'-3')	Amplikon (bp)	Reakcijska smjesa (25 µl)	Amplifikacijski program	Referenca
<i>sea</i>	AAAGTCCCGATCAATTTATGGCTA GTAATTAACCGAAGGTTCTGTAGA	218 bp	DNA: 5 µL H <sub>2</sub> O: 6,5 µL početnica F-R: 0,5 µL MixTaq: 12,5 µL	94°C 5'; 94°C 3' 58°C 30'' 72°C 5'' 30 ciklusa 72°C 10'	Salasia i sur., 2004.
<i>seb</i>	TCGCATCAAACGACAAACG GCAGGTACTCTATAAGTGCC	436 bp	DNA: 5 µL H <sub>2</sub> O: 6,5 µL početnica F-R: 0,5 µL MixTaq: 12,5 µL	94°C 5'; 94°C 2' 55°C 2'; 72°C 1'; 30 ciklusa 72°C 10'	Salasia i sur., 2004.
<i>sec</i>	GACATAAAAGCTAGGAATTT AAATCGGATTAACATTATCC	256 bp	DNA: 5 µL H <sub>2</sub> O: 6,5 µL početnica F-R: 0,5 µL MixTaq: 12,5 µL	94°C 5'; 94°C 2' 55°C 2'; 72°C 1'; 30 ciklusa 72°C 10'	Salasia i sur., 2004.
<i>sed</i>	CTAGTTTGGTAATATCTCCT TAATGCTATATCTTATAGGG	317 bp	DNA: 5 µL H <sub>2</sub> O: 6,5 µL početnica F-R: 0,5 µL MixTaq: 12,5 µL	94°C 5'; 94°C 2' 55°C 2'; 72°C 1'; 30 ciklusa 72°C 10'	Salasia i sur., 2004.
<i>see</i>	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	209 bp	DNA: 5 µL H <sub>2</sub> O: 6,5 µL početnica F-R: 0,5 µL MixTaq: 12,5 µL	94°C 5'; 94°C 2' 57°C 2'; 72°C 1'; 35 ciklusa 72°C 7'	Mehrotra i sur., 2000.

#### 4.2.5. Određivanje učinkovitosti Real-time PCR reakcija

Učinkovitost je određena izradom standardne krivulje za svaki gen. U tu su svrhu pripremljena decimalna razrjeđenja do  $10^{-7}$  izdvojene DNA iz pozitivnih kontrola koje je laboratorij tijekom godina pribavio sudjelovanjem u međulaboratorijskim usporedbama u organizaciji Public Health England.

Nerazrjeđena genomska DNA, njena razrjeđenja  $10^{-1}$  –  $10^{-7}$  i NTC su provedeni kroz Real-time PCR protokol u tri zasebna eksperimenta. Za svako razrjeđenje DNA dobivena je krivulja fluorescencije s određenom Ct vrijednosti. Standardna krivulja je izrađena postavljenjem logaritamskih vrijednosti koncentracije DNA u odnosu na Ct vrijednosti (srednja vrijednost iz tri eksperimenta).

Iz standardne krivulje su očitani i određeni parametri izvedbe Real-time PCR reakcija za svaki gen *sea-see*; nagib krivulje, odsječak na osi Y i korelacijski koeficijent. Temeljem tih parametara je određeno koliko je modificirana Real-time PCR metoda učinkovita, odnosno koliko je dobra izvedba metode.

Nagib standardne krivulje predstavlja učinkovitost reakcije. Korelacijski koeficijent ( $R^2$ ) je mjera linearnosti standardne krivulje, odnosno koliko se dobro rezultati uklapaju u standardnu krivulju. Y-odrezak odgovara teoretskom limitu detekcije (limit of detection, LOD) odnosno Ct ciklusu u kojem se očekuje nalaz najmanjeg broja kopija ciljane DNA (Thermo Fisher Scientific Real-time PCR Handbook, 2016).

Za izradu standardne krivulje je korišten Microsoft Excel program, koji odmah uz graf računa i jednadžbu pravca (nagib i odsječak) te  $R^2$  koeficijent. Učinkovitost (Eff) je izračunata prema formuli (Thermo Fisher Scientific Real-time PCR Handbook, 2016):

$$Eff = (10^{(-1/nagib)} - 1) \times 100 \%$$

Reproducibilnost rezultata je procijenjena preko srednje vrijednosti Ct, standardne devijacije i koeficijenta varijacije između testova (inter-assay CV).

#### **4.2.6. Statistička obrada podataka**

U istraživanju je korištena deskriptivna statistika za izračunavanje srednje vrijednosti, maksimalne i minimalne vrijednosti, raspona, standardne devijacije (SD) i koeficijenta varijacije (CV). U tu svrhu je korišten program Microsoft Excel.

Hi-kvadrat test je primijenjen za određivanje statističkog značaja razlike između različitih skupova. Rezultati s p vrijednostima manjim ili jednakim od 0,05 ( $\leq 0,05$ ) smatrani su statistički značajnima.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Analiza sireva i razina onečišćenja sa *Staphylococcus aureus*

Uzorkovani svježi sirevi (n=30) na dubrovačkim tržnicama bili su proizvedeni od kravljeg (26 sireva), kozjeg (2 sira) i miješanog kravljeg i kozjeg mlijeka (2 sira). Rezultati mikrobiološke pretrage sireva na nalaz *S. aureus* prikazani su u tablici 11. Od ukupno istraženih uzoraka kod 18 (60,0 %) je utvrđena prisutnost bakterije *S. aureus*. Prosječna razina onečišćenja je iznosila  $6,9 \times 10^5$  cfu/g, a kretala se u rasponu od  $8,7 \times 10^3$  cfu/g do  $1,8 \times 10^6$  cfu/g.

Kod 17 sireva (56,7 % od ukupnog broja uzoraka, odnosno 94,4 % uzoraka s pozitivnim nalazom na *S. aureus*) razina je bila iznad zakonski propisane granične vrijednosti ( $10^4$  cfu/g), a kod njih 13 (43,3 %, od ukupnog broja uzoraka, odnosno 72,2 % uzoraka s pozitivnim nalazom na *S. aureus*) je razina prelazila  $10^5$  cfu/g za koju se smatra da je potrebna za stvaranje detektabilne količine enterotoksina.

Iako je razina onečišćenja sa *S. aureus* bila visoka, stafilokokni enterotoksini nisu nađeni niti u jednom uzorku sireva.

Najveći broj sireva je bio proizveden u neposrednoj okolini grada Dubrovnika – Župi dubrovačkoj i pridruženim naseljima (17 uzoraka), dok je sedam sireva bilo iz Konavala i pet iz Hercegovine. Za razliku od sireva iz Župe, svi konavoski i hercegovački sirevi su bili pozitivni na nalaz *S. aureus*.

Kod kravljih sireva je ustanovljena incidencija *S. aureus* od 38,5 % (10/26 sireva), dok je kod kozjih i miješanih sireva iznosila 50 %, iako treba uzeti u obzir da je uzet mali broj uzoraka (po dva od svakoga).

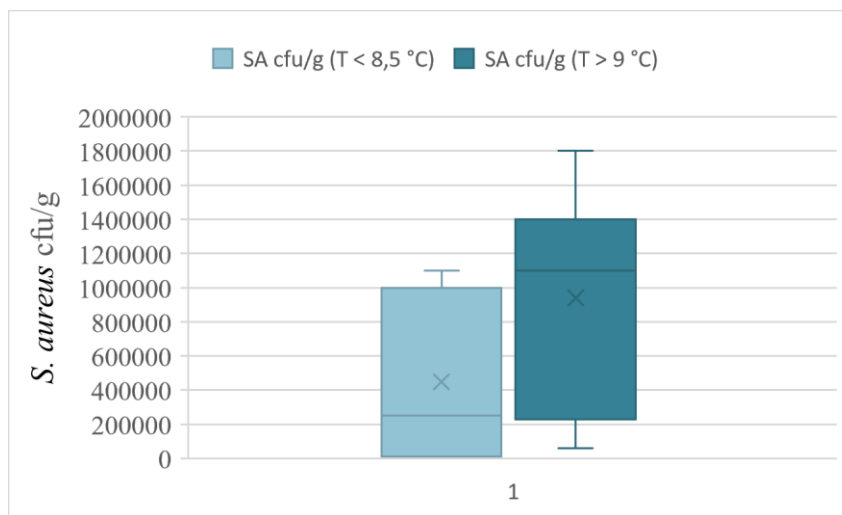
Dva sira (S26 i S27) istog proizvođača (P15) su proizvedena od pasteriziranog mlijeka i kupovnog sirila i očekivano su dala negativan nalaz na *S. aureus*.

**Tablica 11.** Rezultati mikrobiološke analize domaćih svježih sireva

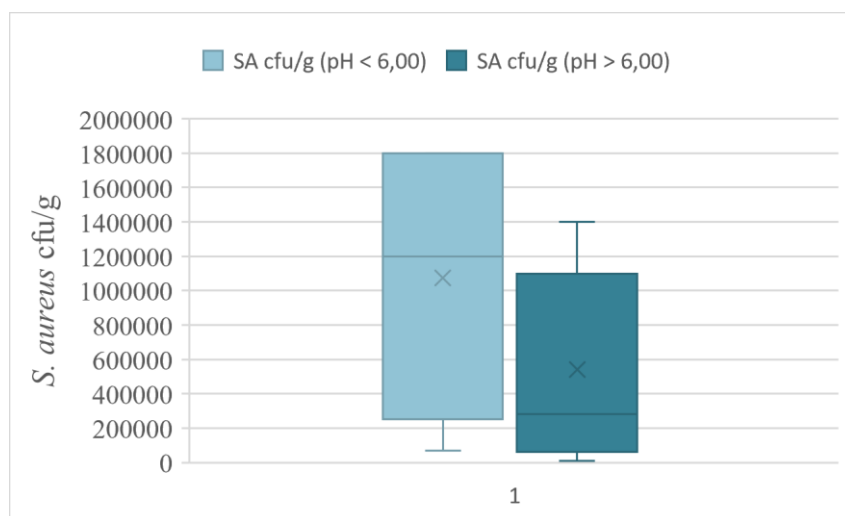
Uzorak	Proizvođač	Vrsta	Mjesto proizvodnje	<i>S. aureus</i> cfu/g	SE/25 g
S1	P1	Kravlji	Konavle	<b>1,3x10<sup>4</sup></b>	N.N.
S2	P1	Kravlji	Konavle	<b>1,1x10<sup>4</sup></b>	N.N.
S3	P2	Kravlji	Župa dubrovačka	<b>1,8x10<sup>6</sup></b>	N.N.
S4	P3	Kravlji	Orašac (Dbk)	<b>1,4x10<sup>6</sup></b>	N.N.
S5	P4	Kravlji	Postranje (Župa Dbk)	< 10	N.N.
S6	P4	Kozji	Postranje (Župa Dbk)	< 10	N.N.
S7	P5	Kravlji	Dbk. Primorje	< 10	N.N.
S8	P6	Kravlji	Konavle	<b>1,1x10<sup>6</sup></b>	N.N.
S9	P2	Kravlji/kozji	Župa dubrovačka	< 10	N.N.
S10	P3	Kravlji	Orašac (Dbk)	< 10	N.N.
S11	P7	Kozji	Hercegovina	<b>1,5x10<sup>5</sup></b>	N.N.
S12	P6	Kravlji	Konavle	<b>2,3x10<sup>5</sup></b>	N.N.
S13	P8	Kravlji	Ljubač (Dbk)	<b>8,7x10<sup>3</sup></b>	N.N.
S14	P9	Kravlji	Župa dubrovačka	<b>2,5x10<sup>5</sup></b>	N.N.
S15	P10	Kravlji	Brgat (Župa Dbk)	<b>1x10<sup>6</sup></b>	N.N.
S16	P1	Kravlji	Konavle	<b>1x10<sup>6</sup></b>	N.N.
S17	P7	Kravlji/kozji	Hercegovina	<b>6x10<sup>4</sup></b>	N.N.
S18	P11	Kravlji	Župa dubrovačka	< 10	N.N.
S19	P12	Kravlji	Gromača (Dbk)	< 10	N.N.
S20	P10	Kravlji	Brgat (Župa Dbk)	< 10	N.N.
S21	P9	Kravlji	Župa dubrovačka	<b>6,2x10<sup>5</sup></b>	N.N.
S22	P1	Kravlji	Konavle	<b>1,8x10<sup>6</sup></b>	N.N.
S23	P1	Kravlji	Konavle	<b>1,4x10<sup>6</sup></b>	N.N.
S24	P13	Kravlji	Osojnik (Dbk)	< 10	N.N.
S25	P14	Kravlji	Župa dubrovačka	< 10	N.N.
S26	P15	Kravlji	Župa dubrovačka	< 10	N.N.
S27	P15	Kravlji	Župa dubrovačka	< 10	N.N.
S28	P16	Kravlji	Hercegovina	<b>2,8x10<sup>5</sup></b>	N.N.
S29	P17	Kravlji	Hercegovina	<b>1,2x10<sup>6</sup></b>	N.N.
S30	P17	Kravlji	Hercegovina	<b>7x10<sup>4</sup></b>	N.N.
Srednja vrijednost <i>S. aureus</i> cfu/g				<b>6,9x10<sup>5</sup></b>	
Raspon vrijednosti <i>S. aureus</i> cfu/g				<b>8,7x10<sup>3</sup> - 1,8x10<sup>6</sup></b>	

N. N. – nije nađeno

Fizikalno-kemijski parametri sireva su prikazani u tablici 12. Odmah po kupnji sirevima je izmjerena temperatura u dubini. Temperatura sireva se kretala u rasponu 6 - 23,3 °C, s prosječnom vrijednosti 12,5 °C. Kod 19 (63,3 %) sireva je izmjerena temperatura bila iznad 8 °C, kod tri (10,0 %) sira je iznosila graničnih 8 °C, dok je kod ostalih osam (26,7 %) sireva temperatura bila ispod 8 °C. Prosječna pH vrijednost sireva je iznosila 5,95, a kretala se između minimalne 4,73 i maksimalne 6,88. Aktivitet vode je iznosio 0,98 kod svih uzoraka, a kretao se u rasponu 0,975 – 0,984. Usporedba rezultata ovisno o temperaturi i pH sireva je prikazan na slikama 14. i 15. Iz slike 14. je vidljivo da je kod sireva s temperaturom iznad 8 °C razina onečišćenja bila veća, dok je suprotno očekivanjima kod sireva s nižom pH vrijednosti utvrđeno veće onečišćenje nego kod sireva s neutralnijim pH (slika 15.).



**Slika 14.** Usporedba razine onečišćenja sa *S. aureus* ovisno o temperaturi sireva



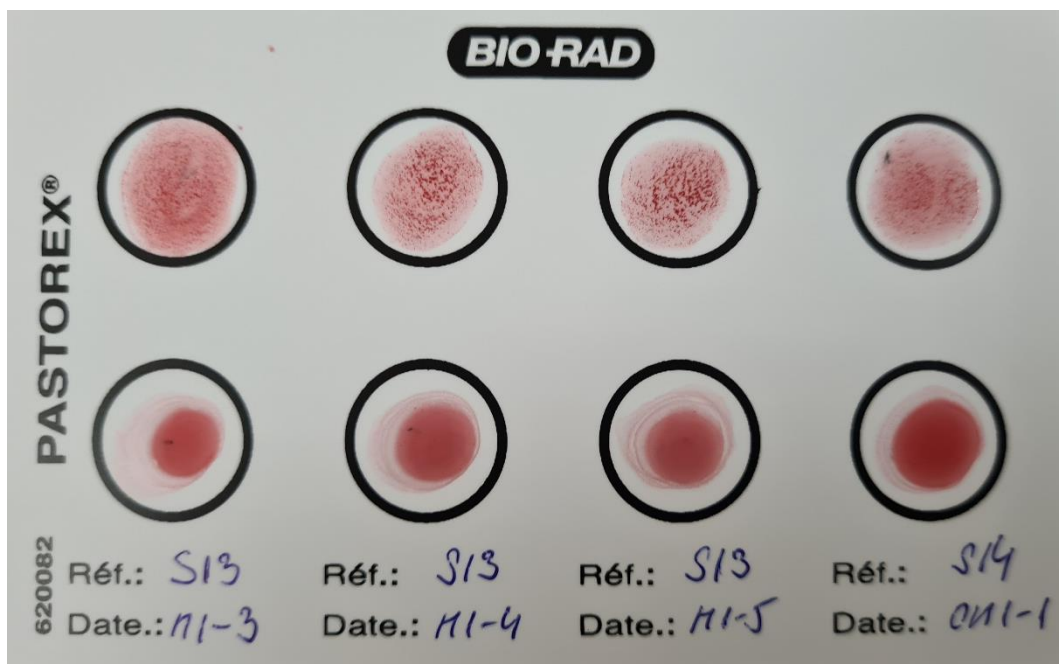
**Slika 15.** Usporedba razine onečišćenja sa *S. aureus* ovisno o pH sireva

**Tablica 12.** Fizikalno-kemijski parametri domaćih svježih sireva

Uzorak	Proizvođač	Temperature (°C)	Aktivitet vode ( $a_w$ )	pH	<i>S. aureus</i> cfu/g
S1	P1	7,3	0,981	6,21	<b>1,3x10<sup>4</sup></b>
S2	P1	7,6	0,981	6,40	<b>1,1x10<sup>4</sup></b>
S3	P2	13,0	0,978	5,58	<b>1,8x10<sup>6</sup></b>
S4	P3	11,9	0,982	6,34	<b>1,4x10<sup>6</sup></b>
S5	P4	11,8	0,978	5,94	< 10
S6	P4	11,9	0,983	5,53	< 10
S7	P5	22,0	0,983	5,93	< 10
S8	P6	13,1	0,982	6,88	<b>1,1x10<sup>6</sup></b>
S9	P2	19,8	0,976	5,23	< 10
S10	P3	23,1	0,979	5,56	< 10
S11	P7	6,8	0,983	6,22	<b>1,5x10<sup>5</sup></b>
S12	P6	13,3	0,978	6,53	<b>2,3x10<sup>5</sup></b>
S13	P8	8,4	0,976	6,80	<b>8,7x10<sup>3</sup></b>
S14	P9	8,5	0,978	4,73	<b>2,5x10<sup>5</sup></b>
S15	P10	12,4	0,984	6,37	<b>1x10<sup>6</sup></b>
S16	P1	7,4	0,983	5,60	<b>1x10<sup>6</sup></b>
S17	P7	14,2	0,982	6,55	<b>6x10<sup>4</sup></b>
S18	P11	10,0	0,981	6,06	< 10
S19	P12	6,5	0,981	6,49	< 10
S20	P10	6,0	0,984	6,60	< 10
S21	P9	8,4	0,978	6,61	<b>6,2x10<sup>5</sup></b>
S22	P1	23,3	0,983	5,06	<b>1,8x10<sup>6</sup></b>
S23	P1	21,8	0,980	5,07	<b>1,4x10<sup>6</sup></b>
S24	P13	17,5	0,975	5,09	< 10
S25	P14	12,9	0,979	6,69	< 10
S26	P15	7,4	0,976	5,39	< 10
S27	P15	6,2	0,984	5,70	< 10
S28	P16	12,7	0,979	6,39	<b>2,8x10<sup>5</sup></b>
S29	P17	13,8	0,981	5,69	<b>1,2x10<sup>6</sup></b>
S30	P17	17,3	0,984	5,11	<b>7x10<sup>4</sup></b>
Srednja vrijednost		12,5	0,980	5,95	<b>6,9x10<sup>5</sup></b>

## 5.2. Fenotipska svojstva izdvojenih sojeva *S. aureus*

Iz 18 onečišćenih sireva uzeto je po 10 koagulaza-pozitivnih kolonija za aglutinacijski test, u svrhu identifikacije *S. aureus*. Od 180 koagulaza-pozitivnih stafilokoka njih 175 je potvrđeno aglutinacijskim testom kao *S. aureus*, koji su uzeti u daljnje analize. Pet izolata koji nisu *S. aureus* potjecala su iz uzoraka S1 (3), S2 (1) i S15 (1). Iz rezultata aglutinacijskog testa se može zaključiti da su ti sirevi bili onečišćeni različitim vrstama koagulaza-pozitivnih stafilokoka.

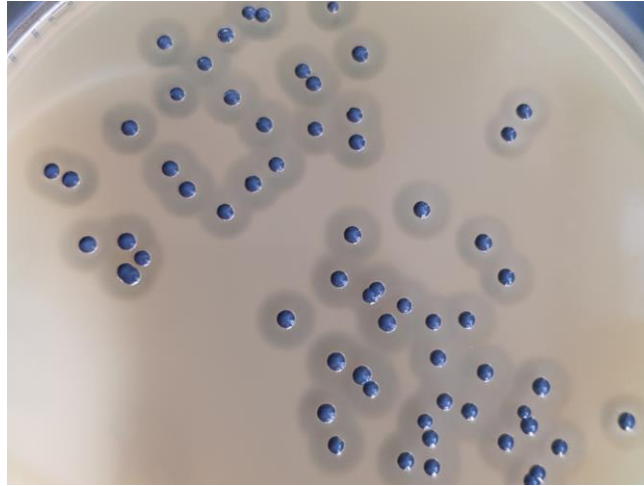


**Slika 16.** Pozitivni lateks aglutinacijski testovi za identifikaciju *S. aureus*  
(foto: I. Lj. Musladin)

### Morfološka svojstva

Stafilokoki reduciraju telurit iz Baird-Parker podloge zbog čega rastu kao sjajne crne/sive kolonije. Morfološko svojstvo koagulaza-pozitivnih stafilokoka je stvaranje dvostruke zone oko kolonija jer proizvode lipazu i lecitinazu koje razgrađuju lipide i lecitin iz žumanjka jajeta, koji je sastavna komponenta Baird-Parker podloge. Stvaranje čiste zone i mutnog prstena oko kolonija se u stručnom rječniku naziva „egg yolk reakcija“ (slika 17.). Međutim, ne stvaraju svi koagulaza-pozitivni stafilokoki obje zone. Izolati *S. aureus* iz pojedinih vrsta hrane (naročito sireva) mogu rasti kao sjajne crne/sive kolonije bez „egg yolk reakcije“.

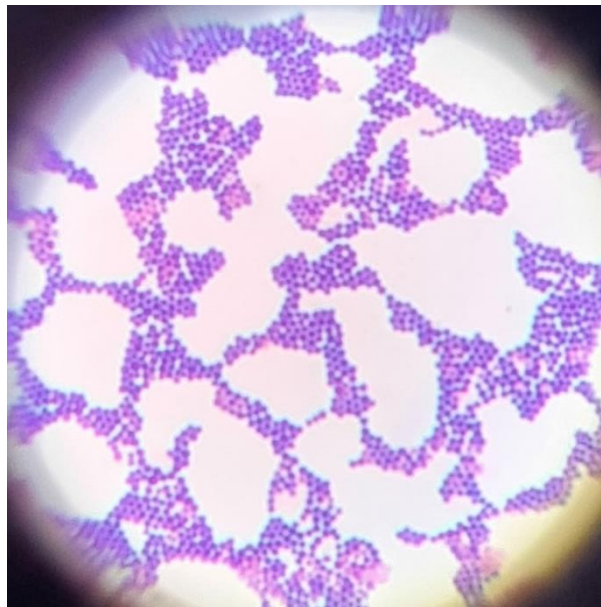




**Slika 17.** Kolonije *S. aureus* na Baird-Parker agaru (foto: I. Lj. Musladin)

Od ukupno 175 izdvojenih sojeva kod njih 94 (53,7 %) su kolonije imale tipičan izgled uz vidljivu „egg yolk“ reakciju. Kod 32 (18,3 %) izolata kolonije su imale slabu „egg yolk“ reakciju (prisutan mali prsten, bez čiste zone), dok su kod njih 49 (28 %) ova morfološka svojstva potpuno izostala.

Pod svjetlosnim mikroskopom svi su izolati imali karakterističnu grozdastu morfologiju Gram pozitivnih koka (slika 18.).



**Slika 18.** Gram preparat *S. aureus* pod svjetlosnim mikroskopom Olympus BX41 (foto: I. Lj. Musladin)

## Biokemijska svojstava

Od ključnih enzima svi izdvojeni sojevi su proizvodili koagulazu, katalazu i Dnazu, ali su se razlikovali po sposobnosti stvaranja hemolizina (tablica 13.). Beta-hemoliza je uočena kod 103 (58,8 %) izolata (slika 19.), dok je 8 (4,6 %) izolata bilo ne-hemolitičko. Kod 64 (36,6 %) izolata je uočena dvostruka zona  $\alpha$ - i  $\beta$ -hemolize (slika 20.).

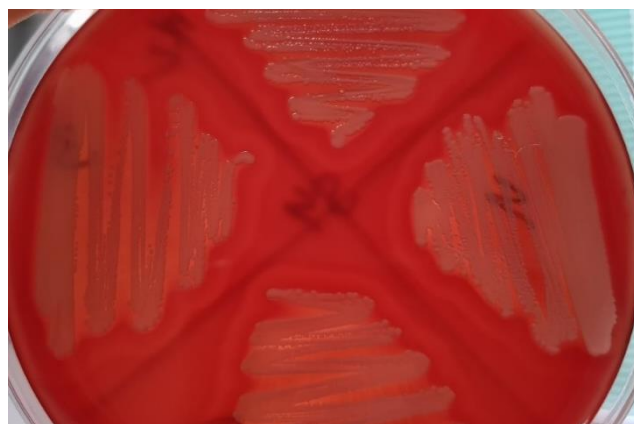
**Tablica 13.** Fenotipska svojstva izdvojenih sojeva *S. aureus* iz sireva

	Koagulaza	LA	Egg yolk	Gram	Katalaza	Dnaza	Hemoliza
Pozitivno	175	175	94 <sup>a</sup> + 32 <sup>b</sup>	175	175	175	103 <sup>c</sup> + 64 <sup>d</sup>
Negativno	0	0	49	0	0	0	8

<sup>a</sup> potpuna egg yolk reakcija; <sup>b</sup> - slaba egg yolk reakcija; <sup>c</sup> –  $\beta$ -hemoliza; <sup>d</sup> – dvostruka hemoliza ( $\alpha$ + $\beta$ )



**Slika 19.** Zona  $\beta$ -hemolize na krvnom agaru (foto: I. Lj. Musladin)



**Slika 20.** Dvostruka zona hemolize na krvnom agaru (foto: I. Lj. Musladin)

Identifikacija izdvojenih sojeva API STAPH<sup>®</sup> testom potvrdila je identitet svih sojeva, uz manje varijacije u pojedinim biokemijskim reakcijama. Svih 175 izolata je očekivano fermentiralo šećere glukozu, fruktozu, manozu, maltozu, laktozu, manitol i saharozu, dok istovremeno nisu fermentirali ksilitol, melibiozu, rafinozu i ksilozu. Velika većina izolata (85 %) pokazala je u potpunosti identične biokemijske reakcije kao i kontrolni sojevi *S. aureus* ATCC 6538 i ATCC 25923.

Varijabilne biokemijske reakcije su uočene kod: fermentacije trehaloze, N-acetil-glukozamina i metil- $\alpha$ -D-glukopiranozida, posjedovanja enzima arginin dihidrolaze i ureaze te redukcije nitrata. Većina je izolata pokazala pozitivnu reakciju fermentacije trehaloze (78,6 %) i N-acetil-glukozamina (85,7 %) te negativnu reakciju fermentacije metil- $\alpha$ -D-glukopiranozida (96,4 %). Pozitivna reakcija redukcije nitrata utvrđena je kod 96,4 % izolata. Prisutnost enzima arginin dihidrolaze i ureaze je nađena kod istog postotka izolata, 92,9 %.



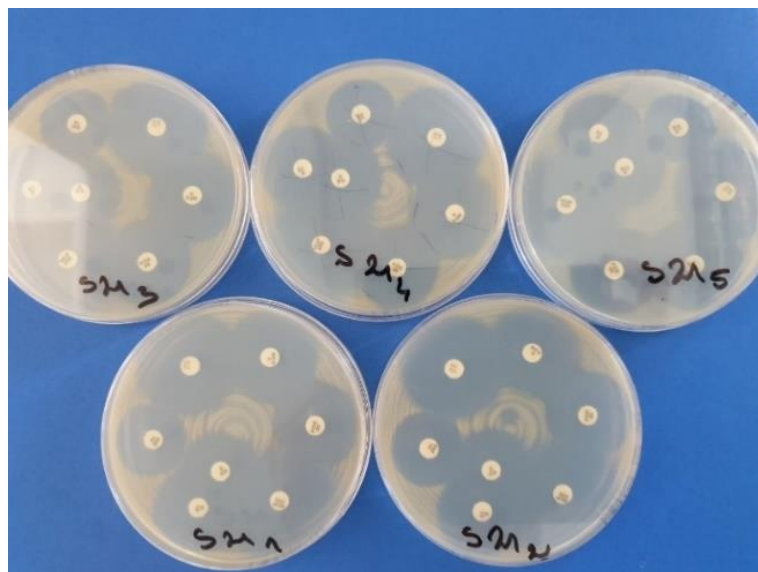
**Slika 21.** API STAPH<sup>®</sup> test izolata bakterije *S. aureus* (foto: I. Lj. Musladin).

Detaljna fenotipska svojstva prikazana su u tablici 19. u prilogu.

### 5.3. Antibiotička osjetljivost izdvojenih sojeva *S. aureus*

Rezultati određivanja antibiotičke osjetljivosti prikazani su u tablici 20. u prilogu.

Od ukupno 175 izdvojenih sojeva *S. aureus* njih 173 (98,9 %) je pokazalo visoku osjetljivost na testirane antibiotike, što je uočljivo iz širokih zona inhibicije (tablica 20. u prilogu, slika 22.). U većini slučajeva promjeri zona inhibicije su bili značajno iznad propisanih kliničkih kriterija (EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 11.0., važeće od 01-01-2021). Kod dva soja *S. aureus* izdvojena iz istog uzorka S8 utvrđena je zona inhibicije promjera 28 mm, što je po kliničkim kriterijima ispod granice od 30 mm i stoga se smatraju rezistentnima. Za razliku od ostalih antibiotika, kod mupirocina je ustanovljen najveći broj izolata (34; 19,4 %) koji su točno na granici propisanog kliničkog kriterija (tablica 20. u prilogu). Usporedbom rezultata može se zaključiti da izdvojeni sojevi *S. aureus* iz domaćih svježih sireva pripadaju istom fenotipu.



**Slika 22.** Testiranje antibiotičke osjetljivosti disk difuzijskom metodom – široka zona inhibicije ukazuje na visoku osjetljivost istraženih sojeva (foto: I. Lj. Musladin)

#### 5.4. Sposobnost stvaranja enterotoksina SEA-SEE *in vitro*

Sposobnost stvaranja enterotoksina SEA-SEE *in vitro* je određena dvjema imunološkim metodama, imunoenzimskim testom VIDAS SET2 i reverznom pasivnom lateks aglutinacijom (RPLA). Od ukupno 175 istraženih sojeva *S. aureus* sposobnost stvaranja enterotoksina SEA-SEE *in vitro* je dokazana kod 37 (21,1 %) izolata VIDAS SET2 metodom, dok je RPLA metoda potvrdila stvaranje enterotoksina C kod 34 (19,4 %) izolata (slika 23.). Ostali klasični enterotoksini nisu nađeni RPLA metodom. Rezultati su prikazani u tablici 14. i za svaki pojedinačni izolat u tablici 19. u prilogu. Udio enterotoksogenih sojeva unutar istog uzorka se kretao od 10 % do 100 % (broj pozitivnih izolata/ukupan broj izolata po uzorku). Udio proizvođača iz čijih su sireva izolirani sojevi *S. aureus* koji proizvode enterotoksine iznosi 11,8 % (2/17 proizvođača).

Enterotoksogeni izolati su nađeni i potvrđeni kod osam (26,7 %) sireva, koji su potjecali od dva proizvođača: 24 sojeva od proizvođača P1 (S1, S2, S16, S22 i S23) i 8 sojeva od proizvođača P9 (S14, S21). Kod tri izolata iz uzorka S15 je utvrđeno stvaranje enterotoksina VIDAS SET2 metodom, ali oni nisu nađeni RPLA metodom. Ova tri izolata su ujedno imali i značajno nižu vrijednost fluorescencije u odnosu na ostale producirajuće izolate.

Sirevi kod kojih su bili utvrđeni enterotoksogeni sojevi ujedno su bili onečišćeni i sojevima *S. aureus* koji nisu imali sposobnost stvaranja enterotoksina *in vitro*.



**Slika 23.** Pozitivna RPLA reakcija soja *S. aureus* koji stvara enterotoksin C

(foto: I. Lj. Musladin)

**Tablica 14.** Rezultati određivanja stvaranja SEA-SEE *in vitro* imunološkim metodama

Uzorak	Broj SA izolata	SET2 SEA-SEE	RPLA SEA	RPLA SEB	RPLA SEC	RPLA SED
S1*	7	5 +	-	-	5 +	-
S2*	9	9 +	-	-	9 +	-
S3	10	-	-	-	-	-
S4	10	-	-	-	-	-
S8	10	-	-	-	-	-
S11	10	-	-	-	-	-
S12	10	-	-	-	-	-
S13	10	-	-	-	-	-
S14**	10	7 +	-	-	7 +	-
S15	9	3 +	-	-	-	-
S16*	10	8 +	-	-	8 +	-
S17	10	-	-	-	-	-
S21**	10	1 +	-	-	1 +	-
S22*	10	1 +	-	-	1 +	-
S23*	10	3 +	-	-	3 +	-
S28	10	-	-	-	-	-
S29	10	-	-	-	-	-
S30	10	-	-	-	-	-
UKUPNO	175	37	0	0	34	0

\* sir od proizvođača P1

\*\* sir od proizvođača P9

## 5.5. Određivanje gena za enterotoksine SEA-SEE

Lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu utvrđeno je da 34 (19,4 %) sojeva *S. aureus* izdvojenih iz svježeg sira posjeduju gene za klasične stafilokokne enterotoksine. Kod izdvojenih sojeva su utvrđena dva različita genotipa (tablica 15.). Rezultati za svaki pojedinačni izolat prikazani su u tablici 19. u prilogu.

Većina izolata (80,6 %) nije posjedovala gene za stafilokokne enterotoksine (ne-enterotoksogeni genotip). Kod 34 (19,4 %) pozitivnih izolata nađen je isključivo gen *sec*, dok ostali geni nisu nađeni.

Udio enterotoksogenih izolata unutar istog uzorka kretao se od 10 % (1 enterotoksogeni izolat na ukupnih 10 izolata iz istog uzorka sira) do 100 %. Najveći udio (80-100 %) enterotoksogenih izolata nađen je kod uzoraka S2 i S16, koji su bili istog podrijetla (kravlji sirevi istog proizvođača). Prisutnost gena *sec* je nađena isključivo kod izolata *S. aureus* iz uzoraka kravljih sireva.

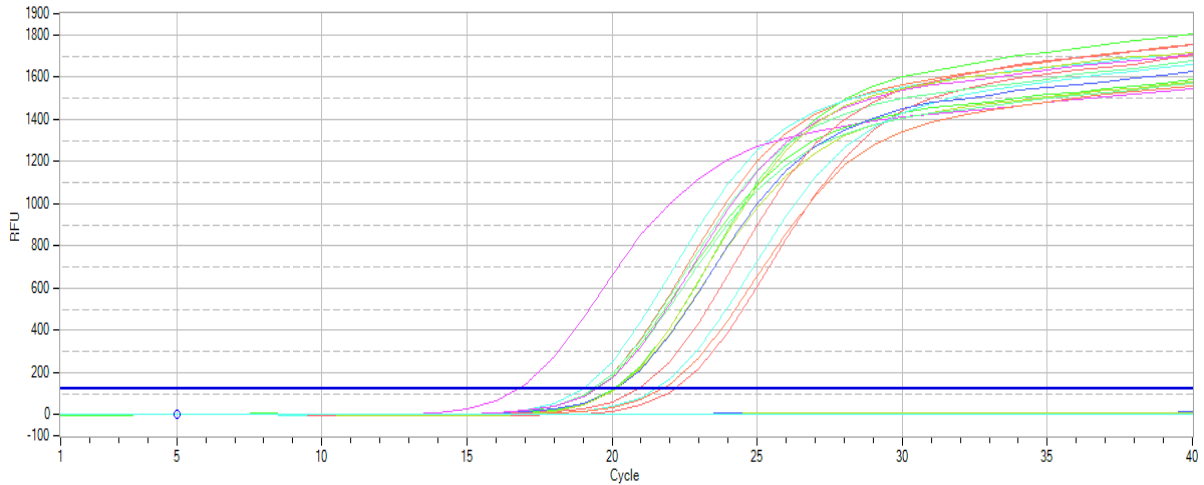
Klasična PCR metoda provedena u Laboratoriju za inspekciju hrane pri Sveučilištu u Perugi služila je za potvrdu pozitivnih rezultata Real-time PCR metode. Metoda je potvrdila rezultate kod 31 izolata iz našeg istraživanja, dok kod tri izolata nije uspjela utvrditi prisutnost *sec* gen.

Svi SEC-producirajući izolati (34) nađeni RPLA metodom su potvrđeni Real-time PCR i klasičnom PCR metodom kao nositelji *sec* gena (slike 24. - 27.).

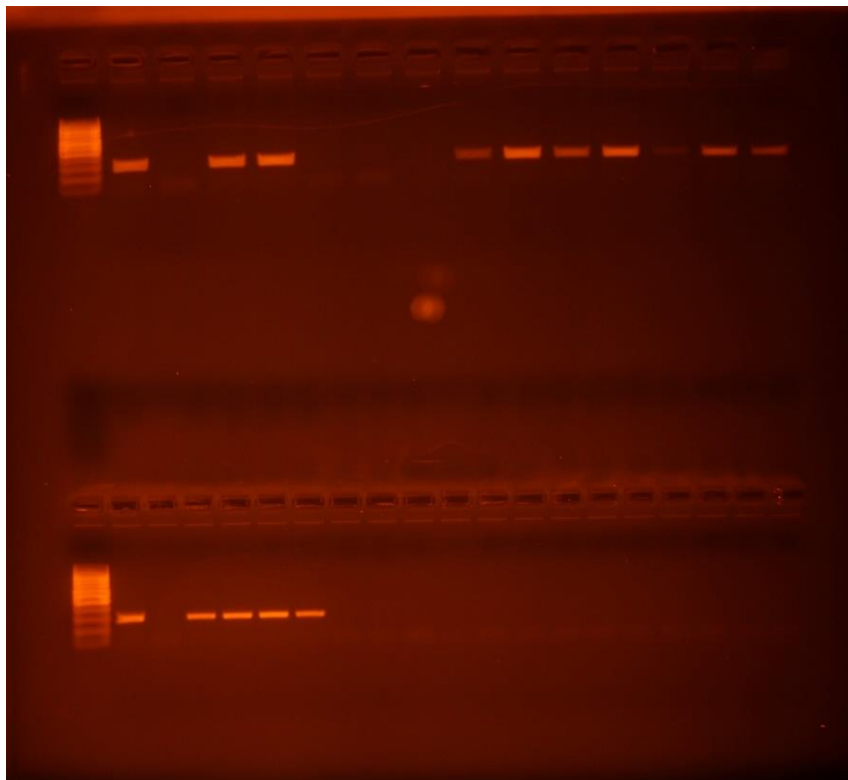
**Tablica 15.** Rezultati određivanja gena SEA-SEE primjenom Real-time PCR metode

Uzorak	Proizvođač	Vrsta sira	Broj izolata	VIDAS SET2	Fenotip (RPLA)	Genotip (Real-time PCR)	Genotip (klasični PCR)
S1	P1	Kravlji	7	5+	SEC (5)	<i>sec</i> (5)	<i>sec</i> (4)
S2	P1	Kravlji	9	9+	SEC (9)	<i>sec</i> (9)	<i>sec</i> (9)
S3	P2	Kravlji	10	Negativno	Negativno	Negativno	-
S4	P3	Kravlji	10	Negativno	Negativno	Negativno	-
S8	P6	Kravlji	10	Negativno	Negativno	Negativno	-
S11	P7	Kozji	10	Negativno	Negativno	Negativno	-
S12	P6	Kravlji	10	Negativno	Negativno	Negativno	-
S13	P8	Kravlji	10	Negativno	Negativno	Negativno	-
S14	P9	Kravlji	10	7+	SEC (7)	<i>sec</i> (7)	<i>sec</i> (5)
S15	P10	Kravlji	9	3+	Negativno	Negativno	-
S16	P1	Kravlji	10	8+	SEC (8)	<i>sec</i> (8)	<i>sec</i> (8)
S17	P7	Kravlji/kozji	10	Negativno	Negativno	Negativno	-
S21	P9	Kravlji	10	1+	SEC (1)	<i>sec</i> (1)	<i>sec</i> (1)
S22	P1	Kravlji	10	1+	SEC (1)	<i>sec</i> (1)	<i>sec</i> (1)
S23	P1	Kravlji	10	3+	SEC (3)	<i>sec</i> (3)	<i>sec</i> (3)
S28	P16	Kravlji	10	Negativno	Negativno	Negativno	-
S29	P17	Kravlji	10	Negativno	Negativno	Negativno	-
S30	P17	Kravlji	10	Negativno	Negativno	Negativno	-
		UKUPNO	175	37	34	34	31

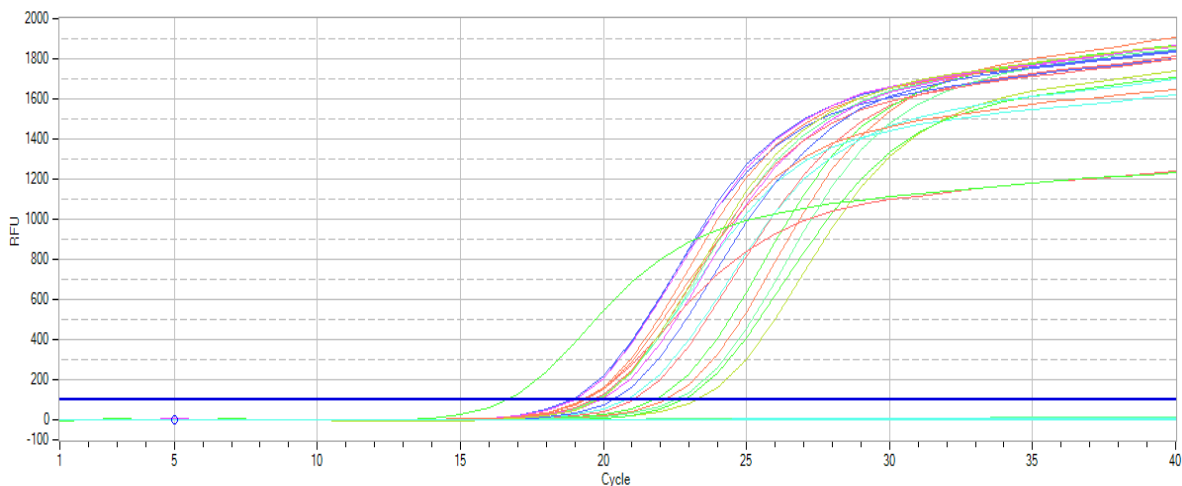




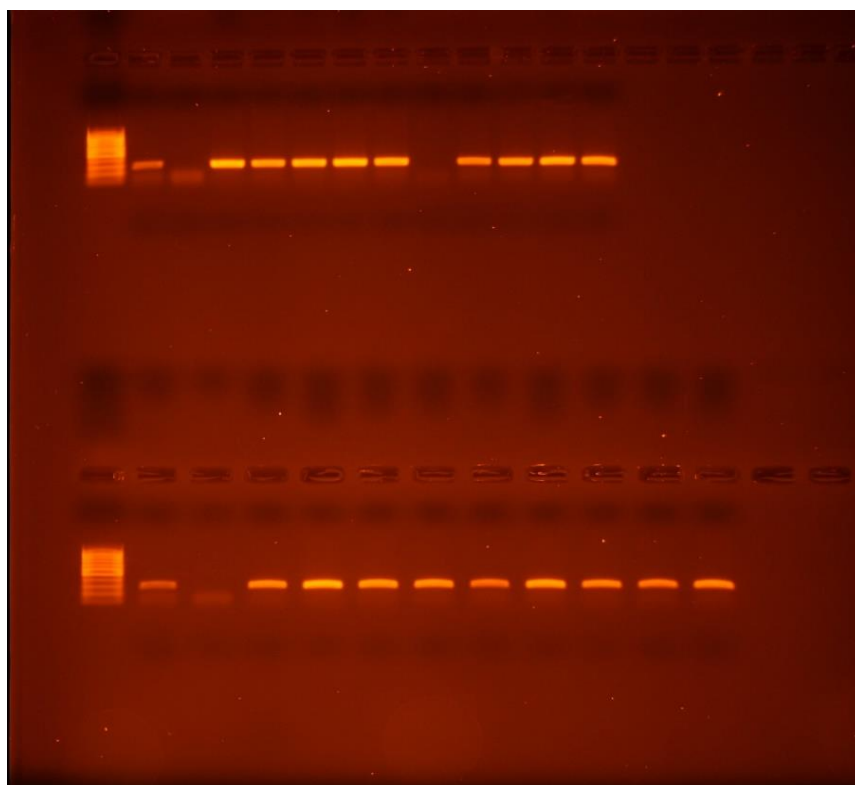
**Slika 24.** Krivulje amplifikacije *sec* gena kod izolata: 1-3, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10. Prva krivulja je pozitivna kontrola *sec* gena.



**Slika 25.** Gel-elektroforeza s etidij bromidom vizualizirana pod UV lampom, za *sec* gen. Gornji red s lijeva na desno: ladder 1000 bp, pozitivna kontrola, negativna kontrola, izolati: 1-3, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5. Donji red s lijeva na desno: ladder 1000 bp, pozitivna kontrola, negativna kontrola, izolati: 2-7, 2-8, 2-9, 2-10.



**Slika 26.** Krivulje amplifikacije *sec* gena kod izolata: 14-1, 14-2, 14-3, 14-4, 14-5, 14-6, 14-7, 16-2, 16-4, 16-5, 16-6, 16-7, 16-8, 16-9, 16-10, 21-10, 22-7, 23-4, 23-6, 23-8. Prva krivulja je pozitivna kontrola *sec* gena.

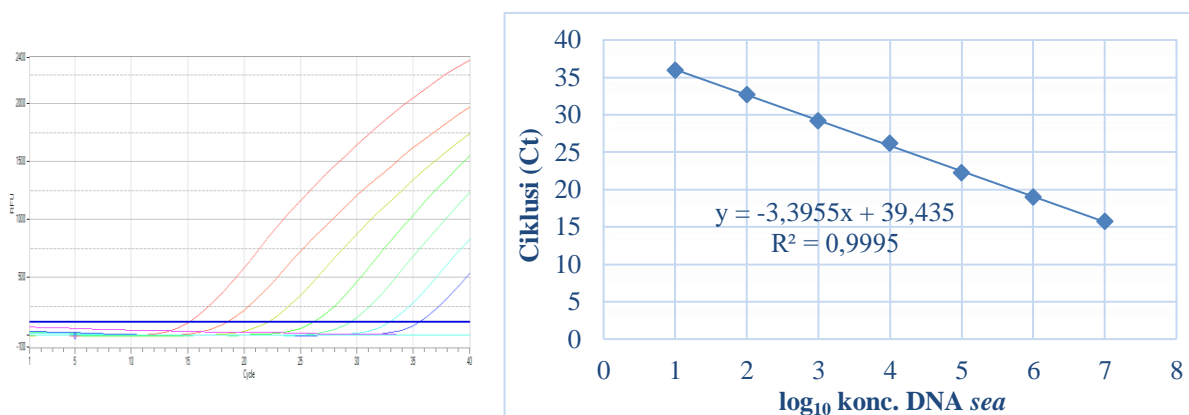


**Slika 27.** Gel-elektroforeza s etidij bromidom vizualizirana pod UV lampom, za *sec* gen. Gornji red s lijeva na desno: ladder 1000 bp, pozitivna kontrola, negativna kontrola, izolati: 14-2, 14-3, 14-4, 14-5, 14-6, 14-7, 16-2, 16-4, 16-5, 16-6. Donji red s lijeva na desno: ladder 1000 bp, pozitivna kontrola, negativna kontrola, izolati: 16-7, 16-8, 16-9, 16-10, 21-10, 22-7, 23-4, 23-6, 23-8.

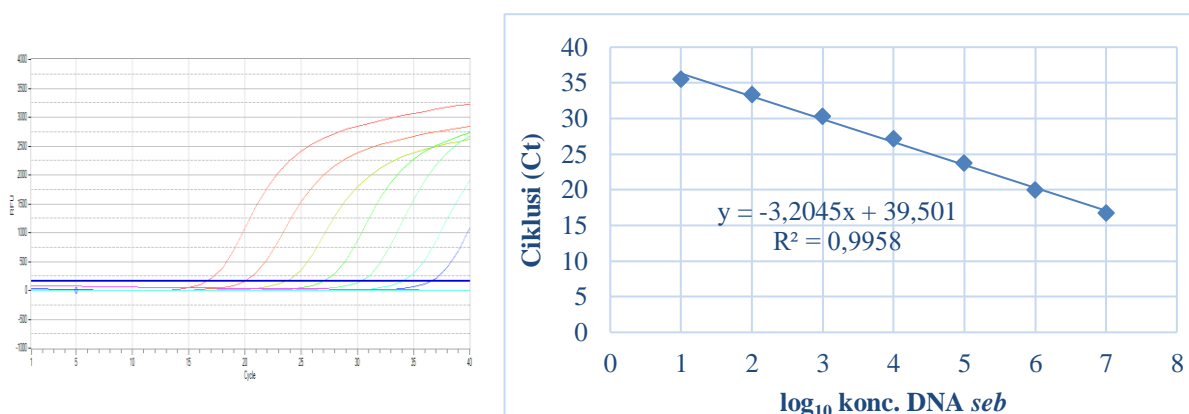
## 5.6. Učinkovitost Real-time PCR reakcija

Uvjeti PCR reakcije su postavljeni prema uputama proizvođača Luminaris master miksa, a koji su u skladu s uvjetima koje su opisali KLOTZ i sur. (2003.) i NAKAYAMA i sur. (2006.).

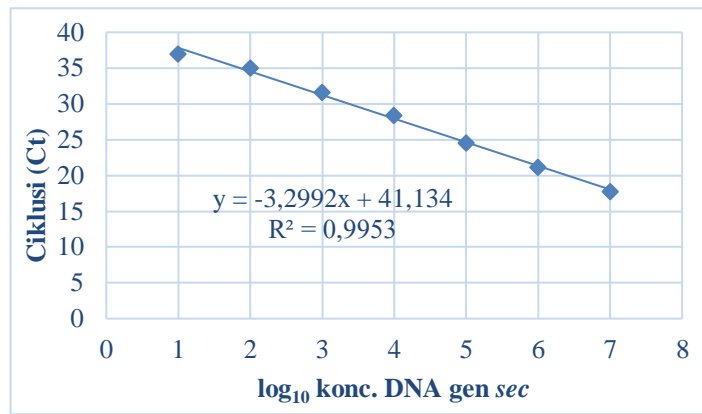
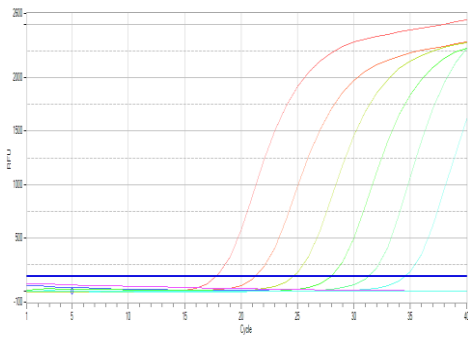
Izvedbene značajke i učinkovitost Real-time PCR metode su određeni preko standardnih krivulja za svaki pojedinačni gen, a koje su izvedene iz krivulja amplifikacije decimalnih razrjeđenja ciljane DNA (slike 28. – 32.). Parametri izvedbe su pokazatelji valjanosti Real-time PCR metode za određivanje gena za klasične stafilokokne enterotoksine.



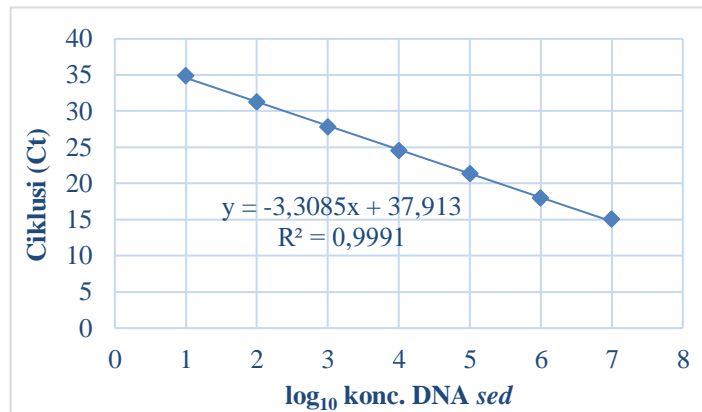
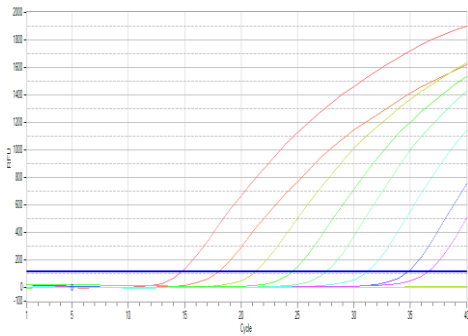
**Slika 28.** Krivulje amplifikacije i standardna krivulja Real-time PCR reakcije za gen *sea*



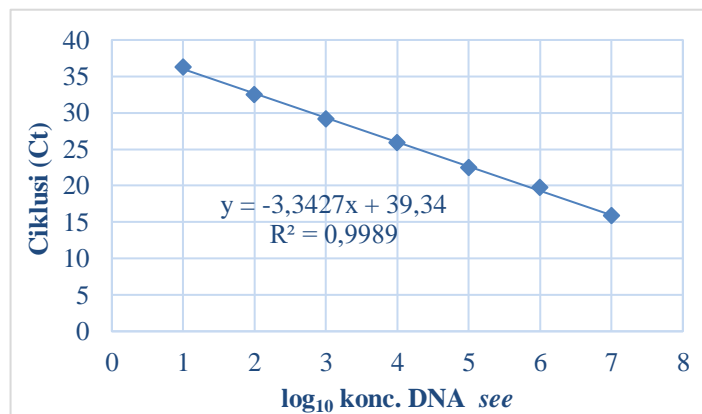
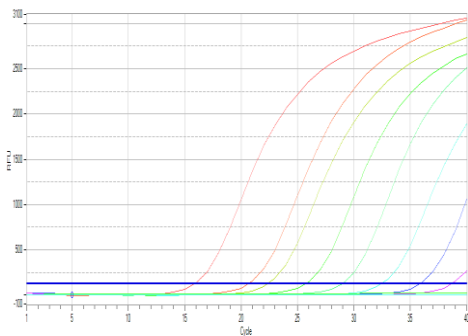
**Slika 29.** Krivulje amplifikacije i standardna krivulja Real-time PCR reakcije za gen *seb*



**Slika 30.** Krivulje amplifikacije i standardna krivulja Real-time PCR reakcije za gen *sec*



**Slika 31.** Krivulje amplifikacije i standardna krivulja Real-time PCR reakcije za gen *sed*



**Slika 32.** Krivulje amplifikacije i standardna krivulja Real-time PCR reakcije za gen *see*

Iz nagiba pravca je određena učinkovitost reakcije, dok je limit detekcije određen iz Y-odsječka. Sve reakcije su imale učinkovitost unutar raspona 90-110 % i nagibe pravaca između -3,58 i -3,10 što su parametri dobre učinkovitosti (tablica 16.). Izuzev za gen *sed*, limiti detekcije su nakon 39. ciklusa, ali je vrijednost 4-5 ciklusa manja od limita detekcije postavljen kao „Cut-off“ vrijednost (35. ciklus).

**Tablica 16.** Izvedbene značajke standardnih krivulja Real-time PCR metoda za određivanje *sea-see* gena

Gen	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>
Učinkovitost (%)	97,0	105,1	101,0	100,6	99,1
Nagib pravca	-3,40	-3,20	-3,30	-3,31	-3,34
Limit detekcije (Ct)	39,4	39,5	41,1	37,9	39,3
Korelac. koeficijent R <sup>2</sup>	0,999	0,996	0,995	0,999	0,999

Nalazi gena su ustanovljeni u rasponu između 14. i 33. ciklusa, što ukazuje na široki raspon određivanja ciklusa u kojem dolazi do statistički značajnog porasta fluorescencije (slike 24. i 25.). Kako nema preklapanja između pozitivnog nalaza gena i nespecifičnih amplifikacija nakon 35. ciklusa može se zaključiti da je metoda dovoljno diskriminatorna između pozitivnih i negativnih rezultata.

Reproducibilnost rezultata je procijenjena preko srednje vrijednosti Ct, standardne devijacije i koeficijenta varijacije između testova (inter-assay CV) iz tri različita eksperimenta za svaki pojedinačni gen. Koeficijent varijacije između testova se kretao između 0,24 i 4,38 %, a rezultati su prikazani u tablici 21. u prilogu.

## 5.7. Usporedba metoda

Usporedba rezultata imunoloških metoda i Real-time PCR metode prikazana je u tablici 17. U svrhu utvrđivanja korelacije rezultata triju različitih metoda primijenjena je metodologija koju su opisali OSTYN i sur. (2012.). Prema toj metodologiji korelacija između rezultata triju metoda je ocijenjena kao: i) potpuna podudarnost (PP), koja podrazumijeva potpunu korelaciju fenotipskih i genotipskih profila (isti SE i isti *se* geni); ii) djelomična podudarnost (DP), koja podrazumijeva nalaz različitih SE i *se* gena; iii) negativna podudarnost (NP), koja odgovara nalazu SE bez nalaza gena i obrnuto.

**Tablica 17.** Usporedba određivanja stvaranja SEA-SEE *in vitro* i Real-time PCR metode

Uzorak	Broj izolata	VIDAS SET2	RPLA	PCR	Podudarnost toksina/gena
S1	7	5+	SEC (5)	<i>sec</i> (5)	PP (7)
S2	9	9+	SEC (9)	<i>sec</i> (9)	PP (9)
S3	10	N.N.	N.N.	N.N.	PP (10)
S4	10	N.N.	N.N.	N.N.	PP (10)
S8	10	N.N.	N.N.	N.N.	PP (10)
S11	10	N.N.	N.N.	N.N.	PP (10)
S12	10	N.N.	N.N.	N.N.	PP (10)
S13	10	N.N.	N.N.	N.N.	PP (10)
S14	10	7+	SEC (7)	<i>sec</i> (7)	PP (10)
S15	9	3+	N.N.	N.N.	PP (6) + NP (3)
S16	10	8+	SEC (8)	<i>sec</i> (8)	PP (10)
S17	10	N.N.	N.N.	N.N.	PP (10)
S21	10	1+	SEC (1)	<i>sec</i> (1)	PP (10)
S22	10	1+	SEC (1)	<i>sec</i> (1)	PP (10)
S23	10	3+	SEC (3)	<i>sec</i> (3)	PP (10)
S28	10	N.N.	N.N.	N.N.	PP (10)
S29	10	N.N.	N.N.	N.N.	PP (10)
S30	10	N.N.	N.N.	N.N.	PP (10)
UKUPNO	175	37	34	34	PP = 172 NP = 3

N.N. – nije nađeno

PP – potpuna podudarnost, DP – djelomična podudarnost, NP – negativna podudarnost

Potpuna podudarnost metoda je utvrđena kod 172 izolata od ukupnih 175, što znači da je korelacija između fenotipske i genotipske identifikacije vrlo visoka i iznosi 98,3 % (172/175). Negativna podudarnost je utvrđena kod tri (1,7 %) izolata. Kod tri izolata je VIDAS SET2 metoda dala pozitivne rezultate, koje RPLA i Real-time PCR rezultati nisu potvrdili. Djelomična podudarnost nije ustanovljena.

Svi SEC-producirajući izolati (34) utvrđeni RPLA metodom su potvrđeni i Real-time PCR metodom kao nositelji *sec* gena (tablica 18.).

**Tablica 18.** SE nađeni RPLA i/ili Real-time PCR metodom

SE	Broj nađenih SE/gena	
	RPLA	PCR
SEA	0	0
SEB	0	0
SEC	34	34
SED	0	0
SEE	0	0
UKUPNO	34	34

## 6. RASPRAVA

### Analiza sireva i razina onečišćenja sa *S. aureus*

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je utvrditi razinu onečišćenja domaćih svježih sireva proizvedenih na području grada Dubrovnika bakterijom *S. aureus*. Kako prethodno nije bilo podataka o mikrobiološkoj kvaliteti domaćih sireva s dubrovačkih tržnica, Zavod za javno zdravstvo Dubrovačko-neretvanske županije je proveo prvo takvo istraživanje 2014. godine. Prikupljeni podaci su pokazali vrlo lošu mikrobiološku kvalitetu: 24 (80 %) od 30 uzoraka sireva je bilo nezadovoljavajuće zbog visokog onečišćenja bakterijama *S. aureus* i/ili *E. coli*. *S. aureus* je bio prisutan u 20 (66 %) uzoraka (LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN i sur., 2014.). Isto istraživanje je ponovljeno 2015. godine s gotovo istim rezultatima. Onečišćenje sa *S. aureus* je nađeno kod 22 (73 %) od 30 uzoraka sireva (LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN i sur., 2016.). Niti jedno istraživanje nije uključivalo daljnja određivanja izolata *S. aureus*, poput određivanja enterotoksogenog potencijala ili antibiotske rezistencije. Rezultati ovog istraživanja s odmakom od četiri godine od prvog istraživanja identični su prethodnim rezultatima, što ukazuje na konzistentnu lošu mikrobiološku kvalitetu domaćih svježih sireva. Od ukupno istraženih 30 uzoraka sireva kod 18 (60,0 %) je utvrđeno onečišćenje bakterijom *S. aureus* (prikazano u tablici 11.). Prosječna razina onečišćenja je bila vrlo visoka i iznosila je  $6,9 \times 10^5$  cfu/g, a kretala se u rasponu od  $8,7 \times 10^3$  cfu/g do  $1,8 \times 10^6$  cfu/g. Između rezultata sva tri istraživanja nije ustanovljena statistički značajna razlika ( $\chi^2 = 3,0288$ ,  $p = 0,219935$ ,  $p < 0,05$ ).

Primjenom zakonski propisanih kriterija higijene hrane (Uredba EZ br. 2073/2005) od svih 18 sireva s pozitivnim nalazom na *S. aureus*, samo jedan sir je udovoljavao propisanim kriterijima, dok se 17 sireva (56,7 % od ukupnog broja sireva, odnosno 94,4 % s pozitivnim nalazom na *S. aureus*) smatralo nezadovoljavajućima (tablica 11.). Utjecaj temperature na broj koagulaza-pozitivnih stafilokoka u sirevima bio je uočljiv u ljetnim mjesecima kada je ustanovljeno gotovo za  $2 \log_{10}$  cfu/g veća razina *S. aureus*.

Rezultati našeg istraživanja su značajno drugačiji od rezultata studije koju je provela Hrvatska agencija za hranu (HAA) 2014. godine, čiji je cilj bio dobiti uvid u mikrobiološku sliku tradicionalno proizvedenih sireva koji se prodaju na tržnicama velikih gradova u RH (Zagreb, Rijeka, Split i Osijek). Rezultati studije su pokazali vrlo nisku razinu prisutnog *S. aureus*. Prosječna kontaminacija svježeg sira s bakterijom *S. aureus* iznosila je  $1,21 \times 10^1$  cfu/g, a prevalencija onečišćenja 13,46 %, što su autori smatrali odrazom zadovoljavajućeg stanja i niske mikrobiološke kategorije rizika (HAA, 2016.).



Druge studije u Hrvatskoj su pokazale varijabilne rezultate. SAMARŽIJA i sur. (2007.) su utvrdili da je 13 % tradicionalnih tvrdih ovčjih sireva proizvedenih od sirovog mlijeka s otoka Paga i 7 % istarskih sireva sadržavalo *S. aureus* u razini iznad  $10^4$  cfu/g. MARKOV i sur. (2009.) su utvrdili onečišćenje tradicionalnih svježih sireva s područja grada Zagreba s bakterijom *S. aureus* u 10 (16,66 %) od 66 uzoraka, u rasponu od  $5,2 \times 10^2$  do  $2,3 \times 10^3$  cfu/g. Studija FRECE i sur. (2016.) je pokazala da su dvije trećine od 39 uzoraka mlijeka, skute i sireva imale povećan broj stafilocoka (i enterobakterija) iznad zakonski dopuštenih granica, u rasponu  $1,9 \log_{10}$  cfu/g do  $6,3 \log_{10}$  cfu/g. U najnovijoj studiji LANDEKA i sur. (2019.) su istraživali i uspoređivali mikrobiološku kvalitetu svježih kravljih sireva koji se prodaju na tržnicama Zagreba i Sarajeva. Srednja vrijednost onečišćenja sa *S. aureus* u svježim sirevima prikupljenim s tržnica grada Zagreba iznosila je  $1,13 \pm 1,37 \log_{10}$  cfu/g, dok je u gradu Sarajevu bila nešto viša  $1,94 \pm 1,59 \log_{10}$  cfu/g.

Usporedbom rezultata našeg istraživanja s ostalim istraživanjima u Hrvatskoj, očito je da postoje značajne regionalne razlike u mikrobiološkoj kvaliteti sireva. Ovakvi rezultati se mogu objasniti klimatskim razlikama te razlikama u stočarskoj praksi, kao što su zaključili JØRGENSEN i sur. (2005.c) za regionalne razlike u prevalenciji *S. aureus* u kravljem mlijeku u Norveškoj. Imajući u vidu i rezultate prethodnih istraživanja dubrovačkih sireva također se može zaključiti da je loša mikrobiološka kvaliteta svježih domaćih sireva s područja grada Dubrovnika posljedica značajnog nedostatka dobre higijenske prakse tijekom proizvodnje i skladištenja, kao i nedostatne edukacije i svijesti proizvođača o zdravstvenim rizicima povezanim s nehigijenskim uvjetima proizvodnje. Iz razgovora s proizvođačima prilikom kupnje bilo je evidentno da ih higijena ne zabrinjava kao ni nedostatak hlađenja sireva tijekom prodaje. Potrebno je istaknuti da proizvodnja i prodaja domaćih sireva u Dubrovniku nisu pod sanitarnom niti veterinarskom kontrolom jer proizvođači nisu registrirani. Uzmemo li u obzir i činjenicu da na tržnicama nisu osigurani uvjeti za prodaju u hladnom lancu, onda ovakvi rezultati nisu iznenađujući.

Kao i u našem istraživanju, *S. aureus* je najčešći kontaminant u sirevima i u drugim međunarodnim studijama. U istraživanju sireva iz maloprodaje u Ujedinjenom Kraljevstvu LITTLE i sur. (2008.) su utvrdili prevalenciju *S. aureus* u sirevima od sirovog mlijeka od 30 %, vrlo često s enterotoksogenom populacijom koja je prelazila preporuke Uredbe EU br. 2073/2005. U Škotskoj je *S. aureus* najčešće nađeni patogen u sirevima, nađen u 40 % uzoraka sireva od sirovog mlijeka proizvedenih na farmama (WILLIAMS i WITHERS, 2010.). Lošije rezultate u odnosu na naše je pokazala brazilska studija tradicionalnog Canastra sira u kojoj je

70 % sireva je bilo onečišćeno s populacijom do  $6,3 \log_{10}$  cfu/g (BORELLI i sur., 2006.). Novija brazilska studija je također utvrdila visoku razinu onečišćenja (srednja vrijednost  $5,2 \log_{10}$  cfu/g) sireva sa *S. aureus* (ANDRETTA i sur., 2019.). Studija koju su proveli ROSENGREN i sur. (2010.) u Švedskoj je pokazala da je *S. aureus* nađen u 69 % sireva od sirovog mlijeka i 6 % sireva od pasteriziranog mlijeka. U Italiji je prisutnost *S. aureus* ustanovljena kod 61 % kravljih i 100 % kozjih sireva od sirovog mlijeka (CREMONESI i sur., 2007.), odnosno u novijoj studiji čak 80 % sireva od sirovog mlijeka proizvedenih u malim obrtima je bilo onečišćeno sa *S. aureus* (JOHLER i sur., 2018.). ROLA i sur. (2016.) su izvijestili da je 69,2 % sireva proizvedenih na malim farmama u Poljskoj onečišćeno sa *S. aureus* do čak  $7,41 \log_{10}$  cfu/g.

S druge strane, studija iz SAD-a je pokazala vrlo nisku prevalenciju *S. aureus* u sirevima iz sirovog mlijeka. Svega tri od 41 istraženog uzorka je sadržavalo detektabilne količine *S. aureus*, što je najvjerojatnije zbog zakonskog propisa prema kojemu je prodaja i distribucija sirovog mlijeka zabranjena. Proizvodnja sireva iz nepasteriziranog mlijeka je dozvoljena isključivo ako je sir sazrio u skladu s federalnim smjernicama (BROOKS i sur., 2012.).

Prema DE BUYSERU i sur. (2001.) te DELMASU i sur. (2006.) *S. aureus* je glavni patogen vezan uz sireve od sirovog mlijeka. Sirevi su također na prvom ili drugom mjestu kao hrana koja je bila izvorom stafilokoknog trovanja u EU u periodu od 2015. do 2018. godine (EFSA i ECDC, 2016.-2019.). Jednaka epidemiološka situacija je utvrđena i u Švicarskoj (BAUMGARTNER, 2008.). Za Dubrovačko-neretvansku županiju, kao ni za Hrvatsku ne postoje epidemiološki podaci o povezanosti sireva i stafilokoknih trovanja.

Kod sireva proizvedenih od sirovog mlijeka do onečišćenja sa *S. aureus* najčešće dolazi preko sirovog mlijeka životinja s kliničkim ili subkliničkim mastitisom (KÉROUANTON i sur., 2007.; ANDRÉ i sur., 2008.; CALLON i sur., 2008.; BIANCHI i sur., 2014.; HUMMERJOHAN i sur, 2014.; GRISPOLDI i sur., 2019.; ABRIL i sur., 2020.) ili osoba koje proizvode sir (kapljičnim putem ili rukama), a koje su nositelji *S. aureus* (ROBERSON i sur., 1994.; KÉROUANTON i sur., 2007.; CALLON i sur., 2008.). Prema navedenim autorima onečišćenje sireva humanim sojevima *S. aureus* je moguća pojava, koja nije primarni izvor onečišćenja. Međutim, okoliš i loša higijenska praksa također doprinose onečišćenju jer se stafilokok može prenositi i onečišćenom opremom, posuđem i priborom (JØRGENSEN i sur., 2005.c; KOUSTA i sur., 2010.). Temeljem cjelokupnih rezultata ovog istraživanja pretpostavljamo da je mlijeko kao sirovina uzrok onečišćenja sireva kao krajnjih proizvoda.

*S. aureus* je najčešći uzročnik mastitisa kod mlječnih životinja i izgleda da je češći u kozjem i ovčjem mlijeku nego u kravljem (LITTLE i DE LOUVOIS, 1999.; DA SILVA i sur., 2005.). Prema JØRGENSEN i sur. (2005.c) *S. aureus* je nađen kod 75 % kravljeg i 96 % kozjeg mlijeka s mlječnih farmi u Norveškoj. Postoje objavljeni podaci da visoki udio sojeva *S. aureus* izoliranih iz kozjeg i ovčjeg mlijeka stvara enterotoksine (VALLE i sur., 1990.; AKINEDEN i sur., 2001.; JØRGENSEN i sur., 2005.c; CAVICCHIOLI i sur., 2015.).

Većina sireva iz ovog istraživanja (93 %) je proizvedena po „starom“ dubrovačkom receptu, iz sirovog mlijeka. Međutim, utjecaj toplinske obrade (uporaba pasterizirnog mlijeka), kupovnog sirila i starter kultura očit je na rezultatima dva sira (S26 i S27) od istog proizvođača (P15), kod kojih su rezultati brojenja *S. aureus* bili ispod limita detekcije ( $< 10$  cfu/g) (tablica 11.). Ovakvi rezultati su posljedica smanjenja broja eventualno prisutnog *S. aureus* u mlijeku toplinskom obradom, ali i zaštitne uloge starter kultura, koje inhibiraju rast i razmnožavanje *S. aureus* (ALJASIR i D'AMICO, 2020.).

Kao što je vidljivo iz tablice 11., kod 13 (43,3 %, od ukupnog broja uzoraka, odnosno 72,2 % uzoraka s pozitivnim nalazom na *S. aureus*) sireva je razina onečišćenja prelazila  $10^5$  cfu/g za koju se smatra da je potrebna za stvaranje detektibilne količine enterotoksina (EC, 2003.). Prema Uredbi EZ br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu svi uzorci sireva kod kojih je utvrđeno onečišćenje s  $> 10^5$  cfu/g *S. aureus* se moraju analizirati na prisutnost stafilokoknih enterotoksina. Broj *S. aureus* u sirevima se s vremenom smanjuje, međutim koncentracija stvorenih enterotoksina ostaje ista što znači da sirevi i dalje mogu uzrokovati trovanje.

Iako su bili visoko onečišćeni, niti jedan uzorak sireva iz ovog istraživanja nije sadržavao stafilokokne enterotoksine. Ovi rezultati su u skladu s ostalim studijama (CREMONESI i sur., 2007.; LITTLE i sur., 2008.; O'BRIEN i sur., 2009.; ROSENGREN i sur., 2010.; ROLA i sur., 2016.; ANDRETTA i sur., 2019.). Izuzev studije FRECE i sur. (2016.), u kojoj je enterotoksin C nađen u dva uzorka sira, u Hrvatskoj nema podataka niti istraživanja o prisutnosti stafilokoknih enterotoksina u sirevima, niti u hrani općenito.

Istraživanja koja su se bavila određivanjem SE u sirevima koji su bili inokulirani enterotoksogenim sojevima *S. aureus* su pokazala da se detektibilne količine enterotoksina stvaraju ovisno o soju i tek kad populacija dosegne  $> 10^8$  cfu/g (TATINI i sur., 1971.; TATINI i sur., 1973.; OTERO i sur., 1988.). Novija istraživanja su pokazala da populacija u sirevima treba doseći  $> 10^6$  cfu/g kako bi se utvrdilo stvaranje SE (MEYRAND i sur., 1998.;

VERNOZY-ROZAND i sur., 1998.; NECIDOVÁ i sur., 2009.). Međutim, naše istraživanje nije potvrdilo te navode kod sireva s preko  $10^6$  cfu/g *S. aureus*, dok populaciju preko  $10^8$  cfu/g nije imao niti jedan sir. Iz navedenog se može zaključiti da je kriterij Uredbe EZ br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu za stafilokokne enterotoksine dovoljno racionalan u svrhu osiguravanja sigurnosti sireva i zaštite zdravlja potrošača.

Sir je vrlo složen, dinamičan i promjenjiv medij u kojem se fizikalno-kemijska svojstva značajno mijenjaju tijekom procesa proizvodnje. Intrinzični čimbenici poput pH, temperature, aktiviteta vode, sadržaja soli i prisutnosti kompetitivne flore utječu na rast *S. aureus* i proizvodnju SE u sirevima. S obzirom na utvrđena fizikalno-kemijska svojstva *S. aureus* je imao povoljne uvjete za rast i razmnožavanje u domaćim svježim sirevima iz našeg istraživanja (tablica 12., slike 15. i 16.). Temperatura sireva se kretala u rasponu 6 - 23,3 °C, s prosječnom vrijednosti 12,5 °C. Kod 19 (63,3 %) sireva je izmjerena temperatura iznad 8 °C, što znači da je temperatura bila u rasponu u kojem dolazi do rasta *S. aureus* (TATINI, 1973.). Usporedbom razine onečišćenja u odnosu na temperaturu sireva vidljivo je da su pri temperaturama iznad 9 °C veće razine onečišćenja te širi raspon onečišćenja (slika 14.). Jedanaest (36,7 %) sireva je imalo temperaturu iznad 10 °C, koja predstavlja minimalnu temperaturu za stvaranje enterotoksina u sirevima. Prema HENNEKINNE i sur. (2012.) čimbenik koji dodatno značajno doprinosi rastu i razmnožavanju stafilokoka te proizvodnji SE u siru je čuvanje sireva na neodgovarajućim temperaturama.

Svi sirevi su imali povoljan aktivitet vode (0,98) za rast *S. aureus* i stvaranje enterotoksina (TATINI, 1973.). Prosječna pH vrijednost sireva je iznosila 5,95, a kretala se u rasponu 4,73-6,88 (tablica 12.), što opet predstavlja raspon u kojem *S. aureus* raste i razmnožava se te može stvarati enterotoksine. Usporedba razine onečišćenja sireva sa *S. aureus* u odnosu na njegovu pH vrijednost pokazala je, suprotno očekivanjima, puno veći raspon onečišćenja za pH vrijednosti < 6 nego kod pH > 6 (slika 15.). Pretpostavlja se da je kod sireva s nižim pH i visokom razinom onečišćenja mlijeko kao početna sirovina bilo visoko kontaminirano, a pad pH nije uspio smanjiti broj stafilokoka u sirevima. Dodatno je rastu i razmnožavanju doprinijela i visoka temperatura sireva. Općenito se smatra da je smanjenje pH do kojeg dolazi tijekom fermentacije mlijeka glavni čimbenik koji nepovoljno utječe na rast *S. aureus* i stvaranje enterotoksina. Zakiseljavanje mlijeka s octenom kiselinom kao što je praksa u proizvodnji dubrovačkih sireva negativno utječe na rast i razmnožavanje *S. aureus*, a postizanje pH 5,0 u potpunosti inhibira rast *S. aureus* (MINOR i MARTH, 1970.). Međutim, *S. aureus* može dobro rasti u početnoj fazi proizvodnje sireva dok nije postignut dovoljno kiseli pH. Niski pH ima

inhibitorni učinak na ekspresiju *agr* regulatora, koji pak regulira ekspresiju SE gena (REGASSA i sur., 1992.).

TATINI i sur. (1971.; 1973.) su demonstrirali da okolišni uvjeti u sirevima značajno utječu na proizvodnju enterotoksina, međutim u određenim okolnostima poput neučinkovite ili odsutne starter kulture može doći do stvaranja enterotoksina. Starter kulture i/ili mikroflora sirovog mlijeka inhibiraju sintezu enterotoksina (OTERO i sur., 1988.; GENIGEORGIS, 1989.; VERNOZY-ROZAND i sur., 1998.). Osim dva sira koji su proizvedeni pomoću kupovnog sirila i starter kultura, ostali sirevi iz našeg istraživanja nisu sadržavali starter kulturu, što je dodatno doprinijelo velikom broj *S. aureus*.

Iako je imao povoljne uvjete za rast i razmnožavanje te stvaranje enterotoksina, *S. aureus* u sirevima iz našeg istraživanja nije proizveo detektabilne količine SE, prvenstveno jer je većina izolata bila ne-enterotoksogena. Međutim, kod sireva koji su bili onečišćeni enterotoksogenim sojevima stvaranje enterotoksina je moglo biti inhibirano niskom temperaturom kao na primjer kod uzoraka S16 i S21 ili niskim pH kod uzoraka S14, S22 i S23 (tablica 12.).

### **Fenotipska svojstva izdvojenih sojeva *S. aureus***

Kod izdvojenih sojeva koji su bili koagulaza-pozitivni i lateks aglutinacijom identificirani kao *S. aureus* su određena sljedeća svojstva: morfologija (izgled kolonija na Baird-Parker agaru i bojenje po Gram-u), prisutnost enzima Dnaze i katalaze te stvaranje hemolizina. Također je proveden i niz biokemijskih testova (API STAPH®).

Određivanje fenotipskih svojstava izdvojenih sojeva je pokazalo da su svi sojevi katalaza- i Dnaza-pozitivni, imaju tipičnu morfologiju pod mikroskopom (Gram pozitivni koki u grozdastim nakupinama) te posjeduju protein A, slobodnu i vezanu koagulazu. Sve kolonije fenotipski identificirane kao *S. aureus* su dodatno podvrgnute lateks aglutinacijskom testu (Pastorex™ STAPH-PLUS), koji utvrđuje prisutnost vezane koagulaze, proteina A i polisaharidne kapsule karakteristične za *S. aureus*. Svi izolati s pozitivnim rezultatom Pastorex™ STAPH-PLUS testova ujedno su potvrđeni i API STAPH biokemijskim testovima.

Razlike između izolata su uočene u „egg-yolk“ reakciji i hemolizi na krvnom agaru s dodatkom ovčje krvi te pojedinim biokemijskim reakcijama (tablica 13., tablica 19. u prilogu).

U ovom istraživanju je kod većine izdvojenih sojeva uočena „egg yolk“ reakcija, međutim 28 % sojeva je pokazalo negativnu „egg yolk“ reakciju (tablica 13., tablica 19. u prilogu), iako je njihov identitet dokazan kao *S. aureus*. Iz navedenog je vidljivo da se *S. aureus* ne može pouzdano identificirati temeljem morfoloških svojstava kolonija na Baird-Parker agaru. Za razliku od naših rezultata, istraživanja sojeva *S. aureus* podrijetlom iz mlijeka mastičnih krava (STEPHAN i sur., 2001.), kozjeg i ovčjeg mlijeka (SCHERRER i sur., 2004.), kozjih sireva (AKINEDEN i sur., 2008.) te mlječnih proizvoda (GONANO i sur., 2009.) su utvrdila negativnu „egg yolk“ reakciju kod više od 50 % izolata.

Prema DEVRIESE i HÁJEK (1980.) izrazita DNaza-pozitivna reakcija i  $\beta$ -hemoliza pigmentiranih kolonija su fenotipsko svojstvo isključivo *S. aureus*. Isti autori navode da pigmentirani sojevi *S. aureus* proizvode ne-pigmentirane varijante kada se pohranjuju, što je u skladu i s opažanjima u ovom istraživanju.

Beta hemoliza je značajno fenotipsko svojstvo sojeva *S. aureus*, kojom se bavio velik broj autora. Većina izdvojenih sojeva *S. aureus* iz ovog istraživanja su pokazivali  $\beta$ -hemolizu na krvnom agaru (58,8 %), a kod čak 36,6 % je uočena dvostruka zona  $\alpha$ - i  $\beta$ -hemolize što ukazuje na ekspresiju oba hemolizina (slike 19. i 20.). Mali udio (4,6 %) izolata je bio ne-hemolitički. Slične rezultate objavili su MORANDI i sur. (2009.), koji su utvrdili prevalenciju od 62 %  $\beta$ -hemolitičkih izolata *S. aureus* iz kravljih mlječnih proizvoda u Italiji te dvostruku hemolizu kod 36 % izolata. I drugi autori su izvijestili o sličnoj prevalenciji  $\beta$ -hemolitičkih sojeva *S. aureus* podrijetlom iz sireva. Prema KAV i sur. (2011.) većina (67,5 %) izolata *S. aureus* iz turskog Urfa sira su bili  $\beta$ -hemolitički, a 20 % izolata je bilo ne-hemolitičko. Tek manji broj izolata je pokazivao  $\alpha$ - i delta-hemolizu. ROLA i sur. (2016.) su uočili  $\beta$ -hemolizu kod 88,5 % izolata *S. aureus* iz sireva od sirovog mlijeka u Poljskoj. Za razliku od naših rezultata, JØRGENSEN i sur. (2005.b) su izvijestili da je  $\beta$ -hemoliza svojstvo svih izolati *S. aureus* iz proizvodnje sireva u Norveškoj. AKINEDEN i sur. (2008.) su u istraživanju izolata *S. aureus* iz kozjih sireva u Njemačkoj utvrdili da je 50 % izolata pokazivalo dvostruku hemolizu, 20,3 % je pokazivalo  $\alpha$ -hemolizu, 15,6 %  $\beta$ -hemolizu, a tek 6,4 % izolata je bilo ne-hemolitičko.

Prema HÁJEK i MARŠALEK (1969.; 1971.) te DEVRIESE (1984.)  $\beta$ -hemoliza je svojstvo sojeva *S. aureus* životinjskog podrijetla, dok humane varijante *S. aureus* ne proizvode  $\beta$ -hemolizin. Stoga se pretpostavlja da su hemolitički sojevi iz ovog istraživanja kravljeg podrijetla.

Razlike u biokemijskim testovima su uočene kod fermentacije trehaloze, N-acetil-glukozamina (određivanje enzima  $\beta$ -galaktozidaze) i metil- $\alpha$ D-glukopiranozida (određivanje enzima  $\beta$ -glukuronidaze), sposobnosti redukcije nitrata te nalaz enzima arginin dihidrolaze (iskorištavanje arginina) i ureaze (iskorištavanje uree). Velika većina izolata (85 %) pokazala je u potpunosti identične biokemijske reakcije kao i kontrolni sojevi *S. aureus* ATCC 6538 i ATCC 25923.

### **Antibiotska osjetljivost izdvojenih sojeva *S. aureus***

Osim enterotoksičnosti, određeni rizik predstavlja i antimikrobna rezistencija kod izolata *S. aureus* podrijetlom iz hrane. Određivanje antimikrobne osjetljivosti, odnosno rezistencije, spada u uobičajeno određivanje fenotipskih svojstava sojeva *S. aureus* iz kliničkih i životinjskih uzoraka te uzoraka hrane.

Suprotno očekivanom, u ovom istraživanju je nađena vrlo niska incidencija (1,1 %) antimikrobne rezistencije i ograničena je isključivo na mupirocin (tablica 20. u prilogu). Temeljem rezultata se također može zaključiti da izdvojeni sojevi *S. aureus* iz domaćih svježih sireva s područja grada Dubrovnika pripadaju istom fenotipu te da kod životinja od čijeg su mlijeka proizvedeni sirevi nije bilo prekomjerne primjene antibiotika.

Mupirocin se uobičajeno koristi za liječenje kožnih infekcija i nazalnu dekolonizaciju *S. aureus* kod odraslih pacijenata i medicinskog osoblja (PATEL i sur., 2009.). Iskorijenjivanje ili suzbijanje nazalne kolonizacije *S. aureus* je dio strategije prevencije infekcija i transmisije, a temelji se na objašnjenju da je kolonizacija glavni čimbenik rizika za posljedične infekcije te da je većina stafilokoknih infekcija uzrokovana endogenim sojevima (WERTHEIM i sur., 2005.). Iz navedenog se može prepostaviti da su sojevi iz našeg istraživanja kod kojih je uočena rezistencija na mupirocin ljudskog podrijetla, s obzirom da se mupirocin ne primjenjuje u liječenju životinja. Istraživanja rezistencije na mupirocin uglavnom se odnose na kliničke izolate.

Prema našim saznanjima trenutačno u Hrvatskoj nema podataka o antimikrobnoj rezistenciji sojeva *S. aureus* podrijetlom iz sira. Studija koju su proveli ZDOLEC i sur. (2016.) istražila je antimikrobnu osjetljivost bakterija iz sirovog mlijeka, uključujući i stafilokoke. Autori su izvijestili da su rezistentni stafilokoki nađeni u uzorcima mlijeka krava zdravih vimena, s najčešćom rezistencijom na penicilin, eritromicin i kanamicin. S druge strane, kod stafilokoka

krava liječenih vimena ustanovljena je rezistencija najčešće na klindamicin, penicilin, ampicilin, linezolid i eritromicin (ZDOLEC i sur., 2016.).

Iako u našem istraživanju nismo utvrdili rezistenciju kod izolata *S. aureus* podrijetlom iz domaćih svježih sireva, multi-rezistentni stafilocoki su često nađeni u hrani, uključujući i sireve (CHAJEĆKA-WIERZCHOWSKA i sur., 2014.). Ostala istraživanja antimikrobne osjetljivosti sojeva *S. aureus* podrijetlom iz mlijeka i sireva su dala varijabilne rezultate, prema kojima se rezistencija kretala u rasponu od niske (STEPHAN i sur., 2001.) do osobito visoke (NORMANNO i sur., 2007.a; ANDRÉ i sur., 2008.; ROLA i sur., 2016.; GRISPOLDI i sur., 2019.; PAPADOPOULOS i sur., 2019.).

Za razliku od naših rezultata, ostala istraživanja su utvrdila visoku rezistenciju na penicilin kod izolata *S. aureus* podrijetlom iz mesa i mliječnih proizvoda u Italiji (NORMANNO i sur., 2007.a), Minas Frescal sireva u Brazilu (ANDRÉ i sur., 2008.) te sireva od sirovog mlijeka u Poljskoj (ROLA i sur., 2016.). Novija studija karakterizacije enterotoksogenih sojeva *S. aureus* iz mlijeka mastitičnih krava u Italiji je pokazala da je 52,94 % izolata bilo rezistentno na ampicilin, a čak 70,59 % na nalidiksičnu kiselinu (GRISPOLDI i sur., 2019.). Rezistencija sojeva *S. aureus* iz mliječne industrije u Grčkoj doseže nevjerojatnih 99 %, pri čemu je 22 % izolata bilo rezistentno na više antibiotika (PAPADOPOULOS i sur., 2019.). Brazilska studija antibiotske osjetljivosti *S. aureus* iz sirana je pokazala da je 52 % izolata rezistentno, uglavnom na penicilin, a 27 % je bilo multi-rezistentno (RODRIGUES i sur., 2017.). Karakterizacija sojeva *S. aureus* koji su uzrokovali stafilokokna trovanja u Francuskoj pokazala je da je 63,6 % sojeva bilo rezistentno na dva ili više antibiotika (KÉROUANTON i sur., 2007.). Portugalsko je istraživanje pokazalo da je 70-73 % izolata *S. aureus* iz različite vrste hrane rezistentno na ampicilin i penicilin (PEREIRA i sur., 2009.).

MRSA nije utvrđena u ovom istraživanju. Međutim, nekoliko autora je izvijestilo o prisutnosti MRSA-e u sirevima u Italiji (NORMANNO i sur., 2007.b; CARFORA i sur., 2015.; BASANISI i sur., 2017.), Škotskoj (WILLIAMS i WITHERS, 2010.), Turskoj (KAV i sur., 2011.) i Grčkoj (PAPADOPOULOS i sur., 2019.). Iako je incidencija MRSA sojeva u navedenim istraživanjima bila izuzetno niska njihova prisutnost u hrani može predstavljati rizik za potrošače, naročito imuno-kompromitirane osobe (EFSA, 2009.). Ingestija MRSA sojeva putem hrane može dovesti i do smrtnog ishoda kod imuno-kompromitiranih osoba (KLUYTMANS i sur., 1995.).



Nekoliko autora je istodobno istraživalo AMR i sposobnosti stvaranja SE i pokušali su utvrditi korelaciju između antibiotske rezistencije i enterotokogenosti sojeva *S. aureus*. Prema ORTEGA i sur. (2010.) dosad objavljeni radovi nisu jasno podržali navedenu korelaciju, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. S obzirom da su svi izolati iz našeg istraživanja bili osjetljivi na sve testirane antibiotike zaključeno je da rezistencije na antibiotike i sposobnosti stvaranja enterotoksina kod sojeva *S. aureus* iz domaćih svježih sireva s područja grada Dubrovnika nisu međusobno povezani. Za razliku od naših rezultata, NORMANNO i sur. (2007.b) su utvrdili sposobnost stvaranja enterotoksina kod četiri MRSA izolata iz mlijeka i sireva, dok su PEREIRA i sur. (2009.) izvijestili da je 19 % istraženih sojeva *S. aureus* iz različitih vrsta hrane bilo enterotoksogeno i rezistentno na oksacilin. ARGUDÍN i sur. (2012.) su izolirali dva MRSA soja podrijetlom iz hamburgera, koji su imali sposobnost stvaranja enterotoksina SED te SEA/SED. U istraživanju PAPADOPOULOS i sur. (2019.) je ustanovljeno da 91 % MRSA izolata posjeduju gene za enterotoksine, naročito *sec* gen.

NORMANNO i sur. (2007.a; 2007.b) ističu da hrana može biti pogodan okoliš za širenje antimikrobne rezistencije u lancu hrane te između okoliša i ljudi. Činjenica da sve veći broj istraživanja pokazuje da MRSA sojevi mogu stvarati stafilokokne enterotoksine ili su nositelji gena za iste ukazuje da sojevi *S. aureus* podrijetlom iz hrane mogu istovremeno predstavljati dvostruku opasnost – od stafilokoknog trovanja i prijenosa rezistencije.

### **Sposobnost stvaranja enterotoksina SEA-SEE *in vitro***

Enterotoksogeni potencijal sojeva *S. aureus* podrijetlom iz hrane u Hrvatskoj nije istražen. Pod pojmom enterotoksogenog potencijala sojeva *S. aureus* podrazumijevaju se sposobnost stvaranja enterotoksina *in vitro* (fenotipsko svojstvo) i/ili posjedovanje gena koji kodiraju stafilokokne enterotoksine (genotipsko svojstvo). Brojna istraživanja su pokazala da sojevi *S. aureus* kod kojih nije utvrđena proizvodnja enterotoksina *in vitro* posjeduju gene za enterotoksine. Iz tog razloga je u ovom istraživanju enterotoksogeni potencijal određen kombinacijom imunoloških metoda s ciljem određivanja proizvodnje klasičnih enterotoksina *in vitro* i genotipizacije molekularnim metodama (Real-time PCR tehnikom i klasičnom PCR tehnikom) s ciljem utvrđivanja posjeduju li izdvojeni sojevi gene za navedene enterotoksine.

Sposobnost stvaranja SEA-SEE *in vitro* kod sojeva *S. aureus* iz našeg istraživanja je istraženo dvjema imunološkim metodama, VIDAS SET2 i RPLA. Kao što je prikazano u tablici 14.

sposobnost proizvodnje enterotoksina je utvrđena kod 37 (21,1 %) od 175 izolata, dok je RPLA metoda utvrdila stvaranje enterotoksina C kod 34 (19,4 %) izolata. Proizvodnja ostalih enterotoksina nije nađena. Dok VIDAS SET2 metoda utvrđuje stvaranje enterotoksina bez mogućnosti razlikovanja, RPLA metoda omogućava razlikovanje stvorenih enterotoksina pri čemu razlikuje enterotoksine SEA-SED. Prvi zaključak koji se nametnuo temeljem rezultata imunoloških metoda je da tri izolata kod kojih je VIDAS SET2 utvrdio proizvodnju enterotoksina stvaraju SEE, koji RPLA metoda nije u mogućnosti identificirati ili da je riječ o lažno-pozitivnim rezultatima VIDAS SET2 metode. Krajnji zaključak je izveden nakon molekularne analize određivanja gena koji kodiraju klasične enterotoksine SEA-SEE.

Temeljem sposobnosti stvaranja enterotoksina *in vitro* izolati *S. aureus* iz domaćih sireva u našem istraživanju se mogu podijeliti u dva fenotipa: sojeve koji stvaraju SEC enterotoksin i sojeve koji ne proizvode klasične enterotoksine (tablica 14.).

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je osam (26,7 %) od 30 uzoraka sireva onečišćeno sojevima *S. aureus* koji proizvode enterotoksine i sojevima koji ne proizvode enterotoksine, što ukazuje na heterogenu prirodu populacije *S. aureus* u istom uzorku (tablica 14. i tablica 19. u prilogu). Činjenica da su sirevi bili onečišćeni SE-pozitivnim i SE-negativnim sojevima ukazuje na potrebu testiranja više od jedne, odnosno više od pet kolonija iz istog uzorka. Ovakvi rezultati su u skladu s istraživanjem koje su proveli LONCAREVIC i sur. (2005.), u kojem su autori utvrdili značajnu raznolikost *S. aureus* izolata između uzoraka i u pojedinačnim uzorcima. Isto istraživanje je preporučilo analize do 10 kolonija *S. aureus* kako bi se povećala šansa identifikacije potencijalnog izvora stafilokoknog trovanja, što je u ovom istraživanju i učinjeno.

Dominantna sposobnost proizvodnje SEC enterotoksina kod sojeva *S. aureus* podrijetlom iz domaćih svježih sireva u ovom istraživanju u skladu je s nalazima velikog broja istraživanja. Slične rezultate dala su istraživanja provedena u Francuskoj (ROSEC i sur., 1997.), SAD-u (TAMARAPU i sur., 2001.), Španjolskoj (FUEYO i sur., 2001.), Švicarskoj (STEPHAN i sur., 2001.), Norveškoj (LONCAREVIC i sur., 2005.; JØRGENSEN i sur., 2005.b,c), Japanu (KATSUDA i sur., 2005.), Italiji (NORMANNO i sur., 2005.; NORMANNO i sur., 2007.a), Njemačkoj (AKINEDEN i sur., 2008.), Austriji (GONANO i sur., 2009.), Turskoj (KAV i sur., 2011.) i Irskoj (HUNT i sur., 2012.). Prema navedenim autorima enterotoksin C je najčešći SE koji proizvode kravli i kozji sojevi *S. aureus* i najčešće je nađen u kravljem i kozjem mlijeku te sirevima od sirovog mlijeka krava i koza. Opisano je nekoliko varijanti enterotoksina C

(BERGDOLL i sur., 1965.; BORJA i BERGDOLL, 1967.; AVENA i BERGDOLL, 1967.; REISER i sur., 1984.; JOHLER i sur., 2016.; ETTER i sur., 2020.), koje su obično specifične za određene domaćine (MARR i sur., 1993.; JOHLER i sur., 2016.). Iz prije navedenih istraživanja nekoliko autora (HÁJEK, 1978.; GUTIÉRREZ i sur., 1982.; OTERO i sur., 1990.) je povezivalo enterotoksin C sa sojevima *S. aureus* životinjskog (kravljeg ili ovčjeg) podrijetla. Temeljem svega navedenog pretpostavlja se da su izolati iz našeg istraživanja animalnog (kravljeg) podrijetla, naročito s obzirom da su istog podrijetla od dva ista proizvođača. Ta je pretpostavka dodatno podržana činjenicom da je većina izolata (28/32 izolata; 87,5 %)  $\beta$ -hemolitička, što je svojstvo kravljih i kozjih sojeva.

U usporedbi učestalosti sojeva koji proizvode enterotoksine od 19,4 %, koju smo utvrdili u našem istraživanju domaćih sireva, učestalost ovih sojeva u mlijeku, sirevima i drugoj vrsti hrane začajno varira diljem svijeta. Tako su HUNT i sur. (2012.) dobili slične rezultate, izvijestili su da je svega 17 % sojeva *S. aureus* izoliranih iz sireva od sirovog mlijeka u Irskoj bilo enterotoksogeno (sadržavalo *se* gene ili produciralo SE). ROSEC i sur. (1997.) su utvrdili da 30,5 % izolata *S. aureus* iz različite vrste hrane u Francuskoj proizvodi barem jedan od klasičnih enterotoksina, a kod sirevi od sirovog mlijeka je utvrđena enterotoksogenost kod 15,9 % izolata, koji su prvenstveno bili životinjski biovari *S. aureus*, a SEC je bio dominantni tip enterotoksina. U istraživanju koje su proveli FUEYO i sur. (2001.) 28 % sojeva podrijetlom iz hrane i od zdravih ljudi je bilo enterotoksogeno, pri čemu je SEC utvrđen kod 44 % enterotoksogenih sojeva, a drugi najčešće nađeni enterotoksin je SEA iz humanih izolata. Istraživanje u Austriji je pokazalo da je proizvodnja stafilokoknih enterotoksina prisutna kod 15,5 % (60 od ukupnih 386) sojeva *S. aureus* izoliranih iz kliničkih, veterinarskih i mliječnih uzoraka, pri čemu je najveći broj (41,7 %) enterotoksogenih sojeva bio iz kliničkih uzoraka.

S druge strane, većina istraživanja diljem svijeta je pokazala veću učestalost enterotoksogenih sojeva u odnosu na naše rezultate. LONCAREVIC i sur. (2005.) su izvijestili da je učestalost enterotoksogenih sojeva u sirovom mlijeku u Norveškoj iznosila 48 %, a u mliječnim proizvodima 51 %, dok su JØRGENSEN i sur. (2005.c) utvrdili učestalost enterotoksogenih sojeva *S. aureus* u kravljem mlijeku od 22,1 %, a u kozjem 57,3 %. Studija koju su u Italiji proveli NORMANNO i sur. (2005.) je pokazala da 55,5 % sojeva *S. aureus* izoliranih iz različite vrste hrane producira enterotoksine, pri čemu je stvaranje enterotoksina SEC nađeno kod 51,5 % izolata (uglavnom iz mliječnih proizvoda), SEA kod 30,3 % izolata, dok su ostali klasični enterotoksini nađeni kod manje od 10 % izolata.

Krajnje rezultate su dala istraživanja u Brazilu i Turskoj. BORELLI i sur. (2006.) su izvijestili da je čak 93,3 % sojeva izoliranih iz brazilskih Canastra sireva stvaralo SE. S druge strane, ERTAS i sur. (2010.) su izvijestili o vrlo niskoj prevalenciji (2,3 %) SEA-SED producirajućih sojeva u ovčjim sirevima u Turskoj.

Za razliku od našeg istraživanja u kojem je utvrđena sposobnost proizvodnje jedino SEC enterotoksina, u brazilskim su sirevima vrlo često nađeni sojevi *S. aureus* koji proizvode enterotoksine A, B i C (CARMO i sur., 2002.; BORELLI i sur., 2006.). GONANO i sur. (2009.) su utvrdili da za razliku od humanih i veterinarskih sojeva, koji su proizvodili isključivo samo jednu vrstu SE, dio sojeva iz mliječnih proizvoda su bili sposobni stvarati dva (SEA/SED) ili čak tri (SEA/SEB/SEC) enterotoksina. Istraživanje u Slovačkoj je pokazalo da je prevalencija enterotoksogenih sojeva *S. aureus* u kozjim sirevima 47,4 %, od čega je SEB bio najčešće nađen (36,8 %) (HOLEČKOVÁ i sur., 2002.). U Francuskoj, koja ima bogatu tradiciju proizvodnje i konzumacije sireva, najčešće nađen SE u sirevima je u prvim istraživanjima bio SEC (ROSEC i sur., 1997), dok su kasnija istraživanja pokazala da je SED najčešće nađen enterotoksin (LAMPRELL i sur., 2004.; OSTYN i sur., 2012.). Italija se posebno ističe po broju radova o enterotoksogenosti sojeva *S. aureus*. MORANDI i sur. (2009.) su izvijestili o visokoj učestalosti SEA, SED i SEC producirajućih sojeva *S. aureus* u sirovom mlijeku i mliječnim proizvodima u Italiji. Istraživanje enterotoksogenih sojeva *S. aureus* iz mesnih i mliječnih proizvoda u Italiji je pokazalo da je SED najčešći (55,5 %), a zatim SEA (22,2 %) te SEB i SEC (11,1 %) (NORMANNO i sur., 2007.a). Slične rezultate su objavili POLI i sur. (2007.), prema kojima je SED najčešće nađen enterotoksin u Monte Veronese sirevima zaštićenog geografskog podrijetla. SED je, nakon SEA, drugi najčešći uzročnik SFP podrijetlom iz mliječnih proizvoda (MORANDI i sur., 2009.). Prema GRISPOLDIJU i sur., (2019.) sojevi *S. aureus* iz mlijeka mastičnih krava u Italiji najčešće proizvode enterotoksin SEA (41,18 %), SEE (35,29 %), SED (29,41 %), a potom SEB i SEC (5,88 %).

S obzirom da postoji velika diskrepancija podataka o prevalenciji i raznolikosti enterotoksogenih sojeva *S. aureus* FUEYO i sur. (2001.) su zaključili da je ova razlika vjerojatno uvjetovana podrijetlom sojeva (humani, animalni ili iz hrane) te brojem i tipom uzoraka koji su istraženi u studijama.

Nekoliko autora je pretpostavilo regionalnu distribuciju različitih SE fenotipova/genotipova (ROSEC i sur., 1997.; STEPHAN i sur., 2001.; ROLA i sur., 2016.). JØRGENSEN i sur. (2005.c) su izvijestili o regionalnim razlikama u prevalenciji SE gena i toksina, sugerirajući da

unutar određenih geografskih regija postoji raširenost određenih sojeva *S. aureus*. Tako su na primjer rezultati istraživanja sojeva *S. aureus* izoliranih od mliječnih krava u susjednoj Srbiji identični rezultatima našeg istraživanja. Enterotoksogeni sojevi su proizveli jedino SEC i to kod svega 5 (6,67 %) od 75 izolata (PAJIĆ i sur., 2016.). Podudarnost rezultata može ukazivati na istu geografsku distribuciju enterotoksogenih sojeva *S. aureus*. Nažalost, ne postoje podaci o enterotoksogenosti sojeva *S. aureus* iz ostalih dijelova Hrvatske, tako da nije moguće utvrditi geografsku distribuciju, iako visoka razina onečišćenja bakterijom *S. aureus* u sirevima u odnosu na ostatak Hrvatske može upućivati na određene geografske specifičnosti.

Neki autori smatraju da je enterotoksin SEC manje važan s obzirom da je rijetko impliciran u stafilokokna trovanja (PINCHUK i sur., 2010.). Prema BALABAN i RASOOLY (2000.) te DE BUYSER i sur. (2001.) dominantni tip enterotoksina kod humanih izolata i najčešći uzročnik stafilokoknog trovanja je SEA, a potom SED i SEB. Za razliku od ostalih SE, enterotoksin E se vrlo rijetko nađen u hrani i vrlo je rijetko uzročnik stafilokoknih trovanja (OSTYN i sur., 2010.). Prema dostupnim epidemiološkim podacima u Hrvatskoj nije zabilježen niti jedan slučaj stafilokoknog trovanja povezan s konzumacijom sireva ili uzrokovan stafilokoknim enterotoksinom C.

### **Određivanje gena za enterotoksine SEA-SEE**

Istraživanje prisutnosti gena za stafilokokne enterotoksine kod sojeva *S. aureus* podrijetlom iz hrane dosad nije provedeno u Hrvatskoj. Prisutnost gena za enterotoksine je određena dvjema molekularnim metodama; PCR metodom u stvarnom vremenu i klasičnom PCR metodom kao dodatnom potvrdnom metodom.

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da većina (80,6 %) izolata *S. aureus* izdvojenih iz svježih sireva nije posjedovala gene za stafilokokne enterotoksine (ne-enterotoksogeni genotip) (prikazano u tablici 15.). Kod 34 (19,4 %) pozitivna izolata utvrđen je isključivo *sec* gen, dok geni za ostale enterotoksine nisu nađeni. Nalaz *sec* gena je izvrsno korelirao s nalazom *in vitro* proizvodnje enterotoksina SEC. Svi SEC-producirajući izolati (34) utvrđeni RPLA metodom su potvrđeni i Real-time PCR metodom kao nositelji *sec* gena.

Jedina diskrepancija u rezultatima je uočena kod tri izolata iz uzorka S15, kod kojih je VIDAS SET2 metoda identificirala proizvodnju enterotoksina, koju RPLA metoda nije identificirala, a Real-time PCR nije utvrdio gene za enterotoksine. Objašnjenje za ovo odstupanje obuhvaća

dvije mogućnosti; lažno pozitivne rezultate ili postojanje varijacija u nukleotidnom slijedu gena zbog čega korištene početnice i probe nisu utvrdile izmijenjene gene.

Jedino slično istraživanje u Hrvatskoj je provela JAKI TKALEC (2013.) i to u sklopu istraživanja čimbenika virulencije sojeva *S. aureus* izdvojenih u rutinskoj dijagnostici mastitisa krava, odnosno iz mlijeka krava s mastitisom. Rezultati tog istraživanja su pokazali da su geni *seg* i *sei* nađeni kod 42 (89,4 %), odnosno 43 soja (91,5 %). Gen *sec* je nađen kod 21 soja (44,7 %), dok ostali geni nisu nađeni. Iako u našem istraživanju nismo istražili prisutnost gena *seg* i *sei*, enterotoksogenost izolata *S. aureus* iz mastitisa krava u skladu je s našim rezultatima prema kojima je *sec* gen prevladavajući. Rezultati istraživanja JAKI TKALEC (2013.) dodatno učvršćuju naš zaključak da su sojevi *S. aureus* iz našeg istraživanja životinjskog, odnosno kravljeg podrijetla.

O sličnim rezultatima je izvijestilo nekoliko skupina autora. HUNT i sur. (2012.) su u svom istraživanju prisutnosti gena za klasične enterotoksine kod sojeva *S. aureus* iz sirovog mlijeka i sireva od sirovog mlijeka u Irskoj utvrdili da 83,2 % izolata ne posjeduje gene niti ima enterotoksogeni potencijal. Autori su također utvrdili enterotoksogene sojeve *S. aureus* koji sadrže jedino *sec* gen, a potječu iz sireva istog proizvođača, kao što je bio slučaj i u našem istraživanju. AKINEDEN i sur. (2008.) su izvijestili o incidenciji gena za enterotoksine kod 29,7 % sojeva *S. aureus* izoliranih iz kozjih sireva u Njemačkoj, pri čemu je *sec* gen nađen kod 18 od ukupno 19 enterotoksogenih izolata. KAV i sur. (2011.) su utvrdili incidenciju gena za enterotoksine od 35 % u turskom Urfa siru, od kojih je *sec* bio najčešći. Gotovo identičan udio (18,9 %) enterotoksogenih sojeva u kozjim i ovčjim sirevima u južnoj Italiji je pokazalo istraživanje BASANISI i sur. (2016.), koji su također najčešće utvrdili gen *sec*, a potom gene *seh*, *sea* i *see*. CREMONESI i sur. (2007.) su izvijestili da 52 % sojeva *S. aureus* izoliranih iz sireva od kozjeg mlijeka posjeduje gene za enterotoksine, uglavnom *sec* i *sel*. CARFORA i sur. (2015.) su također utvrdili da je *sec* gen najčešći u mlijeku i mliječnim proizvodima u Centralnoj Italiji.

Prisutnost *sec* gena u našem istraživanju je nađena kod izolata iz uzoraka kravljih sireva, što je u skladu s brojnim autorima koji su izvijestili da je *sec* gen najčešći kod izolata *S. aureus* iz kravljeg, kozjeg i ovčjeg mlijeka te sireva, stoga se najčešće povezuje s ovom vrstom hrane (HÁJEK, 1978.; GUTIÉRREZ i sur., 1982.; DE BUYSER i sur., 1987.; VALLE i sur., 1990.; KENNY i sur., 1993.; SCHERRER i sur., 2004.; KATSUDA i sur., 2005.; JØRGENSEN i sur., 2005.b; ROSENGREN i sur., 2010.; CAVICCHIOLI i sur., 2015.).

Geni *sea* i *seb* nisu nađeni kod izolata *S. aureus* iz našeg istraživanja. Prema brojnim autorima ova dva gena su najčešće utvrđena kod sojeva *S. aureus* izoliranih iz hrane koja je uzrokovala stafilokokna trovanja (OMOE i sur., 2005.a; KÉROUANTON i sur., 2007.; SATO'Ō i sur., 2014.; CHAO i sur., 2015.). Gen *sea* se ujedno pripisuje izolatima humanog podrijetla (ARGUDÍN i sur., 2012.; KADARIYA i sur., 2014.). O prevalenciji gena *sea* (zajedno sa *sed* i *sej*) kod izolata *S. aureus* izoliranih iz kravljih sireva od sirovog mlijeka u Italiji je izvijestilo nekoliko autora (NORMANNO i sur., 2005.; CREMONESI i sur., 2007.; MORANDI i sur., 2007.). ERTAS i sur. (2010.) su utvrdili gene *sea* i *seb* (i *sed*) u ovčjim sirevima u Turskoj, a RALL i sur. (2008.) te PELISSER i sur. (2009.) u Brazilu.

Iako u našem istraživanju nismo utvrdili prisutnost gena *sed*, o njegovoj visokoj učestalosti često u kombinaciji sa *sej*, *sea* i *ser* genima izvijestilo je nekoliko studija (MORANDI i sur., 2007.; CREMONESI i sur., 2007.; NORMANNO i sur., 2007.a; PELISSER i sur., 2009.; OSTYN i sur., 2012.; HUMMERJOHANN i sur., 2014.; CARFORA i sur., 2015.; ROLA i sur., 2016.). Kombinacija gena *sed* i *sej* je očekivana budući su oba gena locirana na istom plazmidu (ZHANG i sur., 1998.).

Gen *see* također nije nađen kod izolata iz našeg istraživanja što je u skladu s rezultatima drugih studija (ARCURI i sur., 2010.; BIANCHI i sur., 2014.; CARFORA i sur., 2015.). Prema KÉROUANTON i sur. (2007.) te OSTYN i sur. (2010.) enterotoksin SEE i njegov gen su najrjeđe nađeni. Vrlo je mali broj radova u kojima se navodi nalaz *see* gena ili enterotoksina SEE, među kojima se ističu istraživanja BASANISI i sur. (2016.) koji su gen *see* utvrdili kod 14,3 % izolata *S. aureus* podrijetlom iz kozjih i ovčjih sireva u Italiji, te GRISPOLDIJA i sur. (2019.) koji navode visoku prevalenciju (47,06 %) gena *see* kod izolata iz mlijeka mastičnih krava.

Međutim za razliku od našeg istraživanja, druga istraživanja su pokazala visoku prevalenciju drugih gena kod sojeva *S. aureus* izdvojenih iz sireva. Istraživanje genotipske raznolikosti sojeva *S. aureus* iz Monte Veronese sireva zaštićenog geografskog podrijetla iz Italije je pokazalo da su geni *ser*, *sed*, *seg* i *sem* najčešće prisutni (POLI i sur., 2007.). Prema MORANDI i sur. (2007.; 2009.) najčešći geni u mliječnim proizvodima u Italiji su bili *sed* i *sea*. BIANCHI i sur. (2014.) su utvrdili da su kod izolata *S. aureus* iz sirovog mlijeka i sireva od sirovog mlijeka s područja Torina u Italiji najčešći geni bili *ser*, *sed* i *selj*. Istraživanje gena za enterotoksine kod sojeva *S. aureus* izdvojenih iz mlijeka i mliječnih proizvoda u Centralnoj Italiji je pokazalo da prevladavaju geni *sed*, *sec*, *sea*, *selj* i *ser* (CARFORA i sur., 2015.). Norveško istraživanje

izolata *S. aureus* iz sireva od sirovog mlijeka je utvrdilo rijetku prisutnost SE gena i jedino su nađeni *seg* i *sei* geni (JØRGENSEN i sur., 2005.b). HUMMERJOHANN i sur. (2014.) su ustanovili da u švicarskim sirevima od sirovog mlijeka dominiraju izolati *S. aureus* s istom kombinacijom gena *sed*, *sej* i *ser*. Brazilska istraživanja su utvrdila da u Minas Frescal sirevima prevladavaju geni za novije enterotoksine, naročito geni *seg-sei* (ARCURI i sur., 2010.; CÂNDIDO i sur., 2019.) dok su kod istih sireva prema FERREIRA i sur. (2016.) najčešće nađeni gen *seh*, a potom gen *seo*.

Nalaz gena za enterotoksine kod 34 (19,4 %) od ukupnih 175 izolata iz našeg istraživanja predstavlja niži udio od očekivanog u usporedbi s rezultatima drugih istraživanja. LONCAREVIC i sur. (2005.) su utvrdili gene za enterotoksine kod 51 % sojeva *S. aureus* iz mliječnih proizvoda u Norveškoj. ROSENGREN i sur. (2010.) su izvijestili o učestalosti SE gena u mlijeku krava i koza te u sirevima u Švedskoj koja je iznosila 70 %. Autori brazilskog istraživanja sojeva *S. aureus* iz kravljeg mlijeka i Minas Frescal sireva izvijestili su da je 37,5 % sojeva bilo pozitivno na najmanje jedan gen za enterotoksine (ARCURI i sur., 2010.). Studija sirovog mlijeka i sireva od sirovog mlijeka s područja Torina u Italiji je pokazala da je 53 % izolata posjedovalo jedan ili više gena za enterotoksine (BIANCHI i sur., 2014.). Slično istraživanje u Centralnoj Italiji je pokazalo da je 45,7 % izolata je nosilo samo po jedan gen, dok je 54,3 % izolata nosilo više od jednog gena (CARFORA i sur., 2015.). Poljsko istraživanje sojeva *S. aureus* koji nose gene za enterotoksine u sirevima iz male proizvodnje je utvrdilo prevalenciju od 45,1 % (ROLA i sur., 2016.). Prema JOHLER i sur. (2018.), koji su istraživali sojeve *S. aureus* podrijetlom iz sireva iz obrtničke proizvodnje u Italiji, 56 % izolata iz sireva je nosilo najmanje jedan gen, većina izolata je nosila gene za klasične (*sea-see*) te novije enterotoksine (*ser*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selp*).

Za razliku od naših rezultata i rezultata ostalih istraživanja neka istraživanja nisu utvrdila enterotoksigenost niti kod jednog izolata *S. aureus* iz sireva, dok su druga utvrdila vrlo nisku učestalost gena za enterotoksine. Istražujući mikrobiološku sigurnost Serro sireva, koji se proizvode u Minas Gerais pokrajini u Brazilu, ANDRETTA i sur. (2019.) su utvrdili da niti jedan od 116 koagulaza-pozitivnih izolata iz 53 uzoraka sira nisu posjedovali gene za stafilokokne enterotoksine niti su ih proizvodili. YILDIRIM i sur. (2019.) su istražili 110 uzoraka (60 sireva i 50 sirovog mlijeka) na prisutnost enterotoksogenih *S. aureus* te su utvrdili da od 97 izolata koagulaza-pozitivnih stafilokoka, odnosno 50 izolata *S. aureus*, niti jedan ne posjeduje gene za enterotoksine. JØRGENSEN i sur. (2005.b) su utvrdili gene za enterotoksine kod 14,7 % izolata *S. aureus* iz sireva od sirovog mlijeka u Norveškoj i to jedino gene *seg/sei*.



ERTAS i sur. (2010.) su izvijestili o vrlo niskoj prisutnosti gena (*sea*, *seb* i *sed*) kod svega 2,6 % izolata iz ovčjih sireva u Turskoj.

Geni utvrđeni u našem istraživanju mogu se klasificirati u dva genotipa, od kojih je najčešći bio ne-enterotoksogeni tip. Od enterotoksogenih genotipova jedino je nađen *sec* genotip (tablica 15.). Za razliku od našeg istraživanja, ostale studije su utvrdile veći broj genotipova jer je određivanje bilo usmjereno i na gene za novije enterotoksine. Tako su AKINEDEN i sur. (2008.) utvrdili 18 različitih genotipova kod sojeva *S. aureus* podrijetlom iz kozjih sireva, pri čemu su geni *sec* i *sea* nađeni kao pojedinačni genotipovi, dok su ostale genotipove činile različite grupe i kombinacije gena za novije enterotoksine. ARCURI i sur. (2010.) su ustanovili 23 različita genotipa sojeva *S. aureus* podrijetlom iz brazilskih Minas Frescal sireva. HUMMERJOHANN i sur. (2014.) su izvijestili o 20 različitih genotipova iz švicarskim sireva od sirovog mlijeka, a čak pet različitih genotipova su pronašli u jednom uzorku. BIANCHI i sur. (2014.) su utvrdili 35 različitih genotipova kod sojeva *S. aureus* izoliranih ih mlijeka i mliječnih proizvoda u Italiji, a CARFORA i sur. (2015.) 15 različitih toksinotipova ih mlijeka i mliječnih proizvoda u Centralnoj Italiji.

Različitosti u rezultatima istraživanja prevalencije *se* gena proizlaze iz razlike u rezervoarima u različitim zemljama, ekološkog podrijetla izolata, osjetljivosti metoda određivanja, različitih metode određivanja gena (različite početnice) te broja i tipova uzoraka. Različitost nađenih genotipova ukazuje na mogućnost zagađenja sa *S. aureus* iz više različitih izvora. Prve genotipizacije izolata *S. aureus* su utvrdile prevalenciju *sec*, *sea* i *sed* gena. Međutim, otkrićem novijih SE/SEI istraživanja su proširena na novije gene, čime su značajno izmijenjeni rezultati istraživanja u korist prevalencije novijih enterotoksina. S obzirom na navedeno, istraživanje sojeva *S. aureus* izdvojenih iz domaćih svježih sireva iz našeg istraživanja bi trebalo proširiti na određivanje gena za novije enterotoksine, naročito na gene *seg* i *sei* s obzirom da su u Hrvatskoj nađeni u mastitičnom mlijeku krava (JAKI TKALEC, 2013.).

Sirevi iz ovog istraživanja koji su bili zagađeni enterotoksogenim sojevima *S. aureus* su bili istog podrijetla, od dva ista proizvođača i utvrđeni su u nekoliko rundi uzorkovanja, svaki put s različitim udjelom enterotoksogenih sojeva koji je varirao od 10 % do 100 %. Ovakvi nalazi ukazuju na potrebu češćeg uzorkovanja sireva istog proizvođača kako bi se „uhvatili“ enterotoksogeni sojevi. Rizik od sireva zagađenih sojevima *S. aureus* koji su sposobni stvarati enterotoksine je utvrđen kod 11,8 % proizvođača (2 od 17 proizvođača) (tablica 14.). Iako je

riječ o malom broju rizičnih proizvođača, rizik nije zanemariv jer konkretno proizvođač P1 ima najveću i najustaljeniju ponudu sireva.

S obzirom da su geni za klasične enterotoksine smješteni na mobilnim genetičkim elementima, prisutnost samo jednog enterotoksogenog soja može dovesti do horizontalnog prijenosa gena unutar većinski ne-enterotoksogene populacije u našim sirevima i time povećati njihov enterotoksogeni potencijal.

Činjenica da enterotoksini nisu nađeni u sirevima koji su bili visoko zagađeni enterotoksogenim sojevima *S. aureus* može se objasniti prvenstveno činjenicom da većina sojeva nije posjedovala enterotoksogeni potencijal. Dodatni razlog može biti što su uvjeti za enterotoksogenezu restriktivniji nego uvjeti za bakterijski rast (TATINI, 1973.; SCHMITT i sur., 1990.) te su u sirevima bili sub-optimalni za proizvodnju enterotoksina. CRETENET i sur. (2011.b) su demonstrirali da utjecaj sira kao matriksa varira ovisno o tipu enterotoksina. Prema istim autorima ekspresija *sec* gena u sirevima je smanjena te sirevi značajno mijenjaju dinamiku i razinu ekspresije gena. Neuspjeh nalaza stvaranja SEC u sirevima, iako sojevi nose gene i proizvode SEC u laboratorijskim uvjetima su već prethodno opisali POLI i sur. (2007.) te OTERO i sur. (1990.), što je u skladu s našim rezultatima.

Bez obzira na navedeno, zbog činjenice da izolati *S. aureus* posjeduju gene za enterotoksine i imaju sposobnost proizvodnje *in vitro* smatraju se potencijalnim proizvođačima jer se *in vivo* proizvodnja enterotoksina ne može isključiti (SCHMITZ i sur., 1998.)

### **Učinkovitost Real-time PCR reakcija**

Protokol Real-time PCR-a koji je korišten u ovom istraživanju je modifikacija metode koje su opisali NAKAYAMA i sur. (2006.). Iako su korištene iste početnice i probe te isti uvjeti PCR reakcije, metoda je provedena na drugom tipu uređaja (Thermo Fisher Scientific Piko Real24), primjenom druge master miks otopine koja je kompatibilna s probama i uređajem te uz manji broj ciklusa (40).

Kako je metoda modificirana u odnosu na originalnu (NAKAYAMA i sur., 2006.) i prvi put korištena u laboratoriju određeni su joj učinkovitost, parametri izvedbe i reproducibilnost rezultata u svrhu potvrde da se metoda primjenjuje na ispravan i zadovoljavajući način te da je ponovljiva. Analizom serijskih razrjeđenja DNA predložka izrađene su standardne krivulje za

svih pet gena (slike 28. - 32.). Iz standardne krivulje su određeni nagib pravca (učinkovitost), Y-odrezak (limit detekcije) i korelacijski koeficijent (tablica 16.). Dobra reakcija ima učinkovitost između 90 % i 110 %, što odgovara nagibu između -3,58 i -3,10 (učinkovitost od 100 % odgovara nagibu -3,32) (Thermo Fisher Scientific Real-time PCR Handbook, 2016.). S obzirom da su utvrđene učinkovitosti iznosile 97,0 % (*sea*), 105,1 % (*seb*), 101,0 % (*sec*), 100,6 % (*sed*) i 99,1 % (*see*) može se zaključiti da modifikacija metode omogućuje visoko učinkovite PCR reakcije i daje zadovoljavajuće rezultate. Naša modificirana metoda je čak i učinkovitija nego originalna metoda. NAKAYAMA i sur. (2006.) su naveli nagibe pravaca za svaki od gena u rasponu od -2,94 do -3,50, što odgovara vrijednostima učinkovitosti 93,4–118,8 %. Za usporedbu, učinkovitost multiplex Real-time PCR reakcija za gene *sea-see* koju su uspostavili LETERTRE i sur. (2003.b) kretala se u rasponu 85,6-99,2 %, dok su POLI i sur. (2007.) izvijestili da je za njihovu multiplex PCR tehniku nagib pravca bio -3,06 što predstavlja učinkovitost od 112,2 %.

Tijekom određivanja učinkovitosti PCR reakcija određeni su i limiti detekcije, odnosno ciklusi u kojima se određuje najmanji broj kopija stafilokoknih gena *sea-see*. Za gene *sea*, *seb*, *sec* i *see* limiti detekcije su bili iznad 39. ciklusa, dok je za gen *sed* limit iznad 37. ciklusa, što potvrđuje da je 40 ciklusa sasvim dovoljno za određivanje *sea-see* gena ovom metodom (tablica 16.). Iste limite detekcije (između 37. i 39. ciklusa) su utvrdili i NAKAYAMA i sur. (2006.) za originalnu metodu.

R<sup>2</sup> vrijednosti su iznosile 0,995-0,999 što ukazuje na dobro uklapanje rezultata. Za usporedbu, NAKAYAMA i sur. (2006.) su dobili R<sup>2</sup> vrijednosti u rasponu od 0,9736 do 0,9894.

Optimalna PCR reakcija je ona koja postiže maksimalni prinos, uz minimalne Ct vrijednosti, minimalne koncentracije početnica i proba, a koje postižu prethodno navedeno te uredne negativne kontrole bez stvaranja nespecifičnih PCR produkata. PCR reakcije za određivanje gena *sea-see* iz ovog istraživanja su temeljem utvrđenih parametara izvedbe i učinkovitosti ocjenjene kao optimalne.

Metoda se također pokazala kao visoko reproducibilna, s koeficijentom varijacije između eksperimenata (inter-assay CV) ispod 5 % (raspon 0,24 % – 4,38 %) (tablica 21. u prilogu). NAKAYAMA i sur. (2006.) su utvrdili reproducibilnost od 0,31 % - 1,21 %. Prema Thermo Fisher Scientific (proizvođača Real-time PCR uređaja) CV 11 % se smatra maksimalnom prihvatljivom varijacijom (<https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/pcr/Real->

[time-pcr/Real-time-pcr-learning-center/gene-expression-analysis-Real-time-pcr-information/precision-qpcr.html](http://time-pcr/Real-time-pcr-learning-center/gene-expression-analysis-Real-time-pcr-information/precision-qpcr.html)).

Temeljem rezultata određivanja učinkovitosti PCR reakcija Ct vrijednosti iznad 38. ciklusa su se smatrale negativnima, odnosno da su rezultat nespecifičnih amplifikacija. Kao „Cut-off“ vrijednost je postavljena Ct 35, što je u prosjeku za 4,4 ciklusa ispod limita detekcije.

Nalaz gena je ustanovljen u rasponu između 14. i 33. ciklusa, što ukazuje na široki raspon određivanja ciklusa u kojem dolazi do statistički značajnog porasta fluorescencije. Kako nema preklapanja između pozitivnog nalaza gena i nespecifične amplifikacije (Ct vrijednosti nakon 35. ciklusa) može se zaključiti da je metoda dovoljno diskriminatorna između pozitivnih i negativnih rezultata (KLOTZ i sur., 2003.).

### **Usporedba metoda za određivanje SE**

Usporedbom dviju imunoloških metoda ustanovljena je njihova visoka podudarnost (91,9 %). VIDAS metoda je utvrdila stvaranje SE kod 37 izolata *S. aureus*, dok je RPLA utvrdila stvaranje enterotoksina C kod 34 izolata (tablica 17.).

Ustanovljena je potpuna podudarnost RPLA metode koja određuje vrstu proizvedenog enterotoksina i Real-time PCR metode koja određuje prisutnost gena za enterotoksine (tablica 18.).

Potpuna podudarnost svih triju metoda (VIDAS SET2, RPLA i Real-time PCR) je utvrđena kod 172 od ukupnih 175 izolata (tablica 17.), što znači da je korelacija između fenotipske i genotipske identifikacije vrlo visoka i iznosi 98,3 % (172/175). Negativna podudarnost metoda (prisutan gen, ali nema proizvodnje SE) je utvrđena kod 3 (1,7 %) izolata. Djelomična podudarnost nije ustanovljena. Konfliktni rezultati su ustanovljeni kod tri izolata iz istog uzorka sira (S15), kod kojih je VIDAS SET2 metoda dala pozitivne rezultate, koje RPLA i Real-time PCR rezultati nisu potvrdili. Zaključak nekoliko istraživanja je da je VIDAS® SET2 metoda uspješnija, specifičnija i osjetljivija nego druge imunološke metode (WIENEKE, 1988.; VERNZOY-ROZAND i sur., 2004.). WIENEKE (1991.) preporuča paralelnu primjenu EIA i RPLA testova i navodi da je RPLA metoda dovoljno osjetljiva za određivanje SE-producirajućih izolata jer izolati *S. aureus* u Brain-Heart Infusion bujonu stvaraju mnoge veće količine enterotoksina nego u hrani. Naša opažanja govore u prilogu tim navodima, a paralelna

primjena dviju imunoloških metoda se pokazala kao dobar alat za potvrdu pouzdanosti rezultata. Prema HENNEKINNE i sur. (2007.) tijekom validacije EIA metoda je utvrđeno da dolazi do proturječnih rezultata između EIA metoda (uključujući VIDAS SET2) i PCR metoda, što su autori objasnili dvjema mogućnostima. Jedna mogućnost je da je pozitivan rezultat posljedica unakrsne reaktivnosti s novijim SE, koji su slični klasičnim enterotoksinima. Druga je mogućnost da početnice korištene za određivanje gena u PCR metodi nisu prepoznale varijante klasičnih *se* gena. S obzirom da su tri konfliktna rezultata imala značajno manju fluorescenciju u odnosu na ostale pozitivne izolate ipak smo pretpostavili da je riječ o lažno pozitivnim rezultatima. Poznato je da prisutnost endogene alkalne fosfataze u sirevima od sirovog mlijeka može interferirati s rezultatima VIDAS SET2 metode (HENNEKINNE i sur., 2012.; OSTYN i sur., 2012.).

Naši rezultati su u suglasju s istraživanjima nekoliko autora koji su izvijestili o vrlo visokoj korelaciji (preko 95 %) rezultata PCR i RPLA metoda (McLAUHLIN i sur., 2000.; FUEYO i sur., 2001.; KLOTZ i sur., 2003.; LETERTRE i sur., 2003.c; LONCAREVIC i sur., 2005.; CREMONESI i sur., 2005.). JØRGENSEN i sur. (2005.c) su ustanovili podudarnost RPLA i multiplex PCR metode kod 95,6 % izolata, dok su HUNT i sur. (2012.) utvrdili čak 100 %-tnu podudarnost. AKINEDEN i sur. (2008.) su izvijestili o potpunoj podudarnosti ELISA rezultata s rezultatima PCR metode. JOHNSON i sur. (1991.) su utvrdili 97,7 % konkordancije između fenotipske i genotipske identifikacije. OSTYN i sur. (2012.) su utvrdili potpunu podudarnost VIDAS SET2 metode s PCR metodom kod 71,2 % uzoraka, djelomičnu podudarnost kod 9,6 %, a negativnu podudarnost kod 19,2 % uzoraka.

Svi pozitivni izolati poslani su na potvrđivanje u Laboratorij za inspekciju hrane pri Sveučilištu u Perugi. Podudarnost rezultata dviju metoda iznosila je 91,2 % (31/34). Kod tri izolata klasični PCR nije utvrdio *sec* gen, iako izolati proizvode enterotoksin SEC. Razlike u rezultatima se temelje na činjenici da su u metodama korištene različite početnice (i probe), što znači da su ciljani različiti nukleotidni slijedovi u klasičnim *se* genima, zbog čega je diskriminatorna moć metoda različita.

OSTYN i sur. (2012.) smatraju da je paralelna primjena imunoloških i molekularnih metoda vrlo korisna i preporučuju je u svrhu utvrđivanja enterotoksogenog potencijala izolata *S. aureus*. Uzevši u obzir svojstva metoda i njihovu međusobnu visoku podudarnost naše istraživanje u potpunosti podržava ovakvu preporuku.

## 7. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata istraživanja sojeva bakterije *S. aureus* u sirevima domaće proizvodnje te utvrđivanja njihovog enterotoksogenog potencijala mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Pretraženi uzorci domaćeg svježeg sira bili su visoko onečišćeni bakterijom *S. aureus*, a kod većine je razina onečišćenja prelazila  $10^5$  cfu/g. Iako stafilokokni enterotoksini u sirevima nisu utvrđeni, u izdvojenim izolatima *S. aureus* utvrđena je sposobnost proizvodnje enterotoksina SEC *in vitro*.
2. Temeljem utvrđenih fenotipskih svojstava i s obzirom da se SEC najčešće povezuje sa sojevima preživača možemo smatrati da su sirevi najvjerojatnije bili zagađeni kravljim sojevima *S. aureus*. Rezultati također ukazuju na onečišćenje sireva enterotoksin-pozitivnim i enterotoksin-negativnim sojevima *S. aureus* te na heterogenu prirodu populacije *S. aureus* u istom uzorku.
3. Lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu potvrđena je prisutnost *sec* gena kod izolata koji imaju sposobnost stvaranja enterotoksina C *in vitro* (*sec* genotip), a navedeni geni potvrđeni su i klasičnom PCR metodom u drugom laboratoriju. Rezultati su ukazali na enterotoksogeni potencijal sojeva bakterije *S. aureus* izolirane iz sireva. S obzirom da enterotoksogeni sojevi *S. aureus* proizvode enterotoksine *in vitro*, proizvodnja enterotoksina *in vivo* se ne može isključiti.
4. U ovom je istraživanju uspostavljena nova Real-time PCR metoda, koja se pokazala visoko učinkovitom i ponovljivom te dovoljno diskriminatornom između pozitivnih i negativnih rezultata.
5. Naše istraživanje je pokazalo vrlo visoku korelaciju između fenotipske i genotipske identifikacije s obzirom da je potpuna podudarnost svih triju metoda (VIDAS SET2, RPLA i Real-time PCR) utvrđena kod gotovo svih izolata. Paralelna primjena svih triju metoda za utvrđivanje enterotoksogenog potencijala *S. aureus* se pokazala vrlo korisnom i stoga se preporuča njihova kombinirana primjena.

## 8. POPIS LITERATURE

ABRIL, A. G., T. G. VILLA, J. BARROS-VELÁZQUEZ, B. CAÑAS, A. SÁNCHEZ-PÉREZ, P. CALO-MATA, M. CARRERA (2020): *Staphylococcus aureus* Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis. *Toxins* 12, 537.

AKINEDEN, Ö., C. ANNEMÜLLER, A. A. HASSAN, C. LÄMMLER, W. WOLTER, M. ZSCHÖCK (2001): Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 959–964.

AKINEDEN, Ö., A. A. HASSAN, E. SCHNEIDER, E. USLEBEER (2008): Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goat's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 124, 211-216.

ALJASIR, S. F., D. J. D'AMICO (2020): The effect of protective cultures on *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production. *Food Microbiol.* 91, 103541.

ALTBOUM, Z., I. HERTMAN, S. SARID (1985): Penicillinase plasmid linked genetic determinants for enterotoxins B and C1 production in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 47, 514–521.

ANDRÉ, M. C. D. P. B., M. R. H. CAMPOS, L. J. BORGES, A. KIPNIS, F. C. PIMENTA, A. I. B. SERAFINI, (2008): Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed field gel electrophoresis following SmaI digestion. *Food Control* 19, 200–207.

ANDRETTA, M., T. T. ALMEIDA, L. R. FERREIRA, A. F. CARVALHO, R. S. YAMATOGLI, L. A. NERO (2019): Microbial safety status of Serro artisanal cheese produced in Brazil. *J. Dairy Sci.* 102, 10790-10798.

ARCURI, E. F., F. F. ANGELO, M. F. GUIMARÃES, R. TALON, M. DE F. BORGES, S. LEROY, G. LOISEAU, C. C. LANGE, N. J. ANDRADE, D. MONTET (2010): Toxigenic status of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk and Minas frescal cheese in Brazil. *J. Food Prot.* 73, 2225-2231.

ARGUDÍN, M. A., M. C. MENDOZA, M. R. RODISIO (2010): Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins* 2, 1751-1773.

ARGUDÍN, M. A., M. C. MENDOZA, M. A. GONZÁLEZ-HEVIA, M. BANCES, B. GUERRA, M. R. RODICIO (2012): Genotypes, exotoxin gene content, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains recovered from foods and food handlers. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2930-295.

ASAO, T., Y. KUMEDA, T. KAWAI, T. SHIBATA, H. ODA, K. HARUKI, H. NAKAZAWA, S. KOZAKI (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.

AVENA, R. M., M. S. BERGDOLL (1967): Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus aureus* strain 361. *Biochemistry* 6, 1474–1480.

BABA, T., F. TAKEUCHI, M. KURODA, H. YUZAWA, K. AOKI, A. OGUCHI, Y. NAGAI, N. IWAMA, K. ASANO, T. NAIMI, H. KURODA, L. CUI, K. YAMAMOTO, K. HIRAMATSU (2002): Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 359, 1819–1827.

BABA, T., T. BAE, O. SCHNEEWIND, F. TAKEUCHI, K. HIRAMATSU (2008): Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Strain Newman and Comparative Analysis of Staphylococcal Genomes: Polymorphism and Evolution of Two Major Pathogenicity Islands. *J. Bacteriol.* 190, 300-310.

BALABAN, N., A. RASOOLY (2000): Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 1–10.

BASANISI, M. G., G. NOBILI, G. LA BELLA, R. RUSSO, G. SPANO, G. NORMANNO, G. LA SALANDRA (2016): Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep and goat cheeses in southern Italy. *Small Ruminant Research* 135, 17-19.

BASANISI, M.G., G. LA BELLA, G. NOBILI, I. FRANCONIERI, G. LA SALANDRA (2017): Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy. *Food Microbiol.* 62, 141-146.

BAUMGARTNER, A. (2008): Outbreaks with microbial contaminated foodstuffs in Switzerland 1994-2006. *Bull. Swiss Federal Off. Public Health* 32, 562-568.



- BAYLES, K. W., J. J. LANDOLO (1989): Genetic and molecular analysis of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J. Bacteriol.* 171, 4799-4806.
- BECKER, K., B. KELLER, C. VON EIFF, M. BRUCK, G. LUBRITZ, J. ETIENNE, G. PETERS (2001): Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (12), 5551–5557.
- BECKER, K., A. W. FRIEDRICH, G. LUBRITZ, M. WEILERT, G. PETERS, C. VON EIFF (2003): Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1434–1439.
- BECKER, K. (2018): Pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. U: *Staphylococcus aureus*, A. Fetsch (Ed), Academic Press, Elsevier Inc.
- BELAY, N., A. RASOOLY (2002): *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production in an anaerobic environment. *J. Food Prot.* 65, 199–204.
- BERGDOLL, M. S., M. J. SURGALLA, G. M. DACK (1959a): Staphylococcal enterotoxin: identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property. *J. Immunol.* 83, 334–338.
- BERGDOLL, M. S., M. J. SURGALLA, G. M. DACK (1959b): Staphylococcal enterotoxin. I. Purification. *Arch. Biochem. Biophys.* 86, 62-69.
- BERGDOLL, M. S., C. R. BORJA, R. M. AVENA (1965): Identification of a New Enterotoxin as Enterotoxin C. *J. Bacteriol.* 90, 1481-1485.
- BERGDOLL, M. S. (1979): Staphylococcal intoxications. U: Riemann, H., Bryan, F.L. (Eds.), *Foodborne Infections and Intoxications*. Academic Press, New York, pp. 443-493.
- BERGDOLL, M. S., B. A. CRASS, R. F. REISER, R. N. ROBBINS, J. P. DAVIS (1981): A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet* i:1017–1021.
- BETLEY, M. J., J. J. MEKALANOS (1985): Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science* 229, 185–187.

- BETLEY, M. J., J. J. MEKALANOS (1988): Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.* 170, 34-41.
- BIANCHI, D. M., S. GALLINA, A. BELLIO, F. CHIESA, T. CIVERA, L. DECASTELLI (2014): Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy. *Lett. Appl. Microbiol.* 58, 190–196.
- BJERKETORP, J., K. JACOBSSON, L. FRYKBERG (2004): The von Willebrand factor-binding protein (vWbp) of *Staphylococcus aureus* is a coagulase. *FEMS Microbiol. Lett.* 234, 309–314.
- BOEREMA, J. A., R. CLEMENS, G. BRIGHTWELL (2006): Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.* 107, 192–201.
- BOHACH, G. A., P. M. SCHLIEVERT (1987): Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Mol. Gen. Genet.* 209, 15–20.
- BOHACH, G. A., P. M. SCHLIEVERT (1989): Conservation of the biologically active portions of staphylococcal enterotoxins C1 and C2. *Infect. Immun.* 57, 2249–2252.
- BORELLI, B. M., E. G. FERREIRA, I. C. A. LACERDA, D. A. SANTOS, L. S. CARMO, R. S. DIAS, M. C. C. SILVA (2006): Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37, 545-550.
- BORJA, C. R., M. S. BERGDOLL (1967): Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by *Staphylococcus aureus* strain 137. *Biochemistry* 6, 1467–1473.
- BORJA, C. R., E. FANNING, I.-Y. HUANG, M. S. BERGDOLL (1972): Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin E. *J. Biol. Chem.* 247, 2456–2463.
- BROOKS, J. C., B. MARTINEZ, J. STRATTON, A. BIANCHINI, R. KROKSTROMB, R. HUTKINS (2012): Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. *Food Microbiol.* 31, 154-158.
- CALLON, C., F. B. GILBERT, R. D. CREMOUX, M. C. MONTEL (2008): Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of *S. aureus* contamination from milk to cheese in goat cheese farms. *Food Control* 19, 143–150.

- CÂNDIDO, T., S. ANDERSON, L. MATOS, M. NASCIMENTO, C. CAMARGO, R. ZANELLA, V. RALL, N. SILVA (2019): Enterotoxigenic potential and molecular typing of *Staphylococcus* sp. isolated from organic and conventional fresh Minas Cheese in the State of São Paulo, Brazil. *Int. Dairy J.* 102, 104605.
- CAO, R., N. ZEAKI, N. WALLIN-CARLQUIST, P. N. SKANDAMIS, J. SCHELIN, P. RÅDSTRÖM (2012): Elevated enterotoxin A expression and formation in *Staphylococcus aureus* and its association with prophage induction. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4942–4948.
- CAPUT, P., A. IVANKOVIĆ, M. ČAČIĆ, Z. PUŠIĆ (2003): Dubrovački sir. Celeber d.o.o., Zagreb, ISBN 953-6825-40-6, 38 str.
- CARFORA, V., A. CAPRIOLI, N. MARRI, D. SAGRAFOLI, C. BOSELLI, G. GIACINTI, G. GIANGOLINI, L. SORBARA, S. DOTTARELLI, A. BATTISTI, S. AMATISTE (2015): Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. *Int. Dairy J.* 42, 12-15.
- CARMO, L., D. R. SOUZA, V. R. LINARDI, M. SENA, D. SANTOS, M. FARIA, E. C. PENA, M. JETT, L. G. HENEINE (2002): Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas Cheese and raw milk in Brasil. *Food Microbiology*, 19, 9-14.
- CASMAN, E. P. (1960): Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. *J. Bacteriol.* 79, 849-856.
- CAVICCHIOLI, V. Q., T. M. SCATAMBURLO, A. K. YAMAZI, F. A. PIERI, L. A. NERO. (2015): Occurrence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and enterotoxigenic *Staphylococcus* in goat milk from small and medium-sized farms located in Minas Gerais State, Brazil. *J. Dairy Sci.* 98, 8386-8390.
- CHA, J. O., J. K. LEE, Y. H. JUNG, J. I. YOO, Y. K. PARK, B. S. KIM, Y. S. LEE (2006): Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *J. Appl. Microbiol.* 101, 864–871.
- CHAIBENJAWONG, P., S. J. FOSTER (2011): Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Arch. Microbiol.* 193 (2), pp. 125–135.
- CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W., A. ZADERNOWSKA, B. NALEPA, M. SIERPIŃSKA, L. LANIEWSKA-TROKENHEIM (2014): Retail ready-to-eat food as a

potential vehicle for *Staphylococcus* spp. harboring antibiotic resistance genes. J. Food Protect. 77, 993-998.

CHANG, H.-C., M. S. BERGDOLL (1979): Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin D. Biochemistry 18, 1937–1942.

CHAO, G., G. BAO, Y. CAO, W. YAN, Y. WANG, X. ZHANG, L. ZHOU, Y. WU (2015): Prevalence and diversity of enterotoxin genes with genetic background of *Staphylococcus aureus* isolates from different origins in China. Int. J. Food Microbiol. 211, 142-147.

CHENG, A. G., M. MCADOW, H. K. KIM, T. BAE, D. M. MISSIAKAS, O. SCHNEEWIND (2010): Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. PLoS Pathog. 6, e1001036.

COLLERY, M. M., D. S. SMYTH, J. M. TWOHIG, A. C. SHORE, D. C. COLEMAN, C. J. SMYTH (2008): Molecular typing of nasal carriage isolates of *Staphylococcus aureus* from an Irish university student population based on toxin gene PCR, agr locus types and multiple locus, variable number tandem repeat analysis. J. Med. Microbiol. 57, 348–358.

COUCH, J. L., M. T. SOLTIS, M. J. BETLEY (1988): Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. J. Bacteriol. 170, 2954–2960.

COUCH, J. L., M. J. BETLEY (1989): Nucleotide sequence of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. J. Bacteriol. 171, 4507–4510.

CREMONESI, P., M. LUZZANA, M. BRASCA, S. MORANDI, R. LODI, C. VIMERCATI, D. AGNELLINI, G. CARAMENTI, P. MORONI, B. CASTIGLIONI (2005): Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Mol. Cell. Probes 19, 299-305.

CREMONESI, P., G. PEREZ, G. PISONI, P. MORONI, S. MORANDI, M. LUZZANA, M. BRASCA, B. CASTIGLIONI (2007): Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. Lett. Appl. Microbiol. 45, 586–591.

CRETENET, M., S. EVEN, Y. LE LOIR (2011a): Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: A review of recent advances to face new challenges. Dairy Sci. Technol. 91, 127-150.

CRETENET, M., S. NOUAILLE, J. THOUIN, L. RAULT, L. STENZ, P. FRANÇOIS, J. A. HENNEKINNE, M. PIOT, M. B. MAILLARD, J. FAUQUANT, P. LOUBIÈRE, Y. LE LOIR, S. EVEN (2011b): *Staphylococcus aureus* virulence and metabolism are dramatically affected by *Lactococcus lactis* in cheese matrix. Environ. Microbiol. Rep. 3, 340-351.

CUNY, C., L. H. WIELER, W. WITTE (2015): Livestock-associated MRSA: the impact on humans. U: Woodward, M.J. (Ed.), Antibiotics, vol. 4 (4), pp. 521–543.

CZOP, J. K., M. S. BERGDOLL (1974): Staphylococcal enterotoxin synthesis during the exponential, transitional, and stationary growth phases. Infect. Immun. 9, 229-235.

DA SILVA, E. R., L. S. DO CARMO, N. DA SILVA (2005): Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. Vet. Microbiol. 106, 103-7.

DE BUYSER, M. L., F. DILASSER, R. HUMMEL, M.S. BERGDOLL (1987): Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production by staphylococci isolated from goat's milk. Int. J. Food Microbiol. 5, 301-309.

DE BUYSER, M. L., B. DUFOUR, M. MAIRE, V. LAFARGE (2001): Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and indifferent industrialized countries. Int. J. Food Microbiol. 67, 1–17.

DE BUYSER, M. L., J. GROUT, A. BRISABOIS (2009): Detection of genes encoding staphylococcal enterotoxins Multiplex PCR for *sea* to *see* and *ser*. Method of the CRL for Coagulase Positive Staphylococci, including *Staphylococcus aureus*. Maisons-Alfort, Francuska.

DELMAS, G., A. GALLAY, E. ESPIÉ, S. HAEGHEBAERT, N. PIHIER, F. X. WEILL, H. DE VALK, V. VAILLANT, J. C. DESENCLOS (2006): Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005, Bull. Epidemio. Hebd.,418–422.

DERZELLE, S., F. DILASSER, M. DUQUENNE, V. DEPERROIS (2009): Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. Food Microbiol. 26, 896–904.

DEVRIESE, L. A., V. HÁJEK (1980): Identification of pathogenic staphylococci isolated from animals and foods derived from animals. J. Appl. Bacteriol. 49, 1-11.

DEVRIESE, L. A. (1984): A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. J. Appl. Bacteriol. 56(2), 215–220.

DIETRICH, G. G., R. J. WATSON, G. J. SILVENNAN (1972): Effect of shaking speed on the secretion of enterotoxin B by *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol. 24:561-566.

DINGES, M. M., P. M. ORWIN, P. M. SCHLIEVERT (2000): Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev. 13 (1), 16-34.

EC HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL DG-SANTE (2003): Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses. Dostupno na: [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com\\_scv\\_out61\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scv_out61_en.pdf) (pristupljeno 16.03.2021.)

EC – European Commission (2005): Uredba Komisije (EZ) No. 2073/2005 od 15. studenog 2005. godine o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Dostupno na: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20140601&from=EN>

EFSA (European Food Safety Authority) (2009): Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on Assessment of the Public Health significance of meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. The EFSA Journal 993, 1-73.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2016): The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA J. 14 (12), 4634. 231 pp.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2017): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA Journal 2017;15(12):5077, 228 pp.

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2018): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA Journal 2018;16(12):5500, 262 pp.

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2019): The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. EFSA Journal 2019; 17(12):5926, 276 pp.

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA Journal 2021; 19(2):6406, 286 pp.

ERCOLI, L., S. GALLINA, N. YACINE, F. AUVRAY, S. PRIMAVILLA, F. GUIDI, B. PIERUCCI, C. GRAZIOTTI, L. DECASTELLI, S. SCUOTA (2017): Investigation of a Staphylococcal Food Poisoning Outbreak from a Chantilly Cream Dessert, in Umbria (Italy). Foodborne Pathog. Dis. 14, 407-413.

ERTAS, N., Z. GONULALAN, Y. YILDIRIM, E. KUM (2010): Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. Int. J. Food Microbiol. 142(1-2), 74-77.

ETTER, D., J. SCHELIN, M. SCHUPPLER, S. JOHLER (2020): Staphylococcal Enterotoxin C-An Update on SEC Variants, Their Structure and Properties, and Their Role in Foodborne Intoxications. Toxins 12, 584.

EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing Manual Version 8.0 (January 2020). Dostupno na:

[https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/disk\\_diffusion\\_methodology/](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/)

EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing Reading Guide Version 7.0 (January 2020). Dostupno na:

[https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/disk\\_diffusion\\_methodology/](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/)

EVENSON, M. L., M. W. HINDS, R. S. BERNSTEIN, M. S. BERGDOLL (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 (4), 311-316.

EWALD, S., S. NOTERMANS (1988): Effect of water activity on growth and enterotoxin D production of *Staphylococcus aureus*. Int. J. Food Microbiol 6, 25–30.

- FERREIRA, M., L. BERNARDO, L. NEVES, M. CAMPOS, J. LAMARO-CARDOSO, M. ANDRÉ (2016): Virulence profile and genetic variability of *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal cheese. *J. Dairy Sci.* 99, 8589-8597.
- FEßLER, A. T., L. JUN, K. KADLEC, Y. WANG, S. SCHWARZ (2018): Antimicrobial resistance properties of *Staphylococcus aureus*. U: *Staphylococcus aureus*, A. Fetsch (Ed), American Press, Elsevier Inc. p. 57-85.
- FISHER, E. L., M. OTTO, G. CHEUNG (2018): Basis of Virulence in Enterotoxin-Mediated Staphylococcal Food Poisoning. *Frontiers in Microbiology* 9, 436.
- FITZGERALD, J. R., S. R. MONDAY, T. J. FOSTER, G. A. BOHACH, P.J. HARTIGAN, W. J. MEANEY, C. J. SMYTH (2001): Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J. Bacteriol.* 183 (1), 63-70.
- FRASER, J. D., T. PROFT (2008): The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol. Rev.* 225, 226-43.
- FRECE, J., M. VRDOLJAK, M. FILIPČIĆ, M. JELIĆ, I. ČANAK, Ž. JAKOPOVIĆ, J. PLEADIN, I. GOBIN, T. LANDEKA DRAGIČEVIĆ, K. MARKOV (2016): Microbiological Quality and Variability of Natural Microbiota in Croatian Cheese Maturing in Lambskin Sacks. *Food Technol. Biotechnol.* 54 (2), 129–134.
- FUEYO, J. M., M. C. MARTÍN, M. A. GONZÁLEZ-HEVIA, M. C. MENDOZA (2001): Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples: Relations between genetic types and enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 139-145.
- GENIGEORGIS C. A. (1989): Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *Int. J. Food Microbiol* 9, 327–360.
- GONANO, M., I. HEIN, P. ZANGERL, A. RAMMELMAYR, M. WAGNER (2009): Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains of veterinary, dairy and human origin. *Epidemiol. Infect.* 137, 688-699.
- GRACE, D., A. FETSCH (2018): *Staphylococcus aureus* - a foodborne pathogen: epidemiology, detection, characterization, prevention, and control: an overview. U: *Staphylococcus aureus*, A. Fetsch (Ed), Academic Press, Elsevier Inc. p. 3-10.



- GRISPOLDI, L., L. MASSETTI, P. SECHI, M. F. IULIETTO, M. CECCARELLI, M. KARAMA, P. A. POPESCU, F. PANDOLFI, B. T. CENCI-GOGA (2019): Short communication: Characterization of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *J. Dairy Sci.* 102(2), 1059-1065.
- GUIDI, F., A. DURANTI, S. GALLINA, Y. NIA, A. PETRUZZELLI, A. ROMANO, V. TRAVAGLINI, A. OLIVASTRI, V. CALVARESI, L. DECASTELLI, G. BLASI (2018): Characterization of A Staphylococcal Food Poisoning Outbreak in A Workplace Canteen during the Post-Earthquake Reconstruction of Central Italy. *Toxins*, 10(12), 523.
- GUILIER, L., H. BERGIS, F. GUILIER, V. NOEL, F. AUVRAY, J. A. HENNEKINNE (2016): Dose-response Modelling of Staphylococcal Enterotoxins Using Outbreak Data. *Procedia Food Science* 7, 129-132.
- GUTIÉRREZ, L. M., I. MENES, M. L. GARCIA, B. MORENO, M. S. BERGDOLL (1982): Characterization and enterotoxigenicity of staphylococci isolated from ovine mastitic milk in Spain. *J. Food Prot.* 45, 1282-1286.
- HAINES, W. C., L. G. HARMON (1973): Effect of selected lactic acid bacteria on growth of and production of enterotoxin. *Appl. Microbiol.* 25, 436–441.
- HÁJEK, V., E. MARSÁLEK (1969): A study of staphylococci of bovine origin *Staphylococcus aureus* var. *bovis*. *Zentralbl. Bakteriol.* 209, 154-160.
- HÁJEK, V., E. MARSÁLEK (1971): Differenzierung pathogener Staphylokokken und Vorschlag für ihre taxonomische Klassifikation [The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification]. *Zentralbl. Bakteriol. Orig. A.* 217, 176--82. German.
- HÁJEK, V. (1978): Identification of enterotoxigenic staphylococci from sheep and sheep cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 264-268.
- HENNEKINNE, J. A., F. GUILIER, S. PERELLE, M. L. DE BUYSER, S. DRAGACCI, S. KRYS, B. LOMBARD (2007): Intralaboratory validation according to the EN ISO 16 140 Standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1261-72.

HENNEKINNE, J. A., V. BRUN, M. L. DE BUYSER, A. DUPUIS, A. OSTYN, S. DRAGACCI (2009): Innovative contribution of mass spectrometry to characterise staphylococcal enterotoxins involved in food outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 882–884.

HENNEKINNE, J. A., A. OSTYN, F. GUILLIER, S. HERBIN, A. L. PRUFER, S. DRAGACCI (2010): How Should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized?. *Toxins* 2, 2106-16.

HENNEKINNE, J. A. , M. L. DE BUYSER, S. DRAGACCI (2012): *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 815–836.

HENNEKINNE, J.A. (2018): *Staphylococcus aureus* as a leading cause of foodborne outbreaks worldwide. U: *Staphylococcus aureus*, A. Fetsch (Ed), American Press, Elsevier Inc. p. 129-146.

HIBNICK, H. E., M. S. BERGDOLL, (1959): Staphylococcal enterotoxin. II. Chemistry. *Arch. Biochem. Biophys.* 85, 70-73.

HIROOKA, E. Y., E. E. MULLER, J. C. FREITAS, E. VICENTE, Y. YOSHIMOTO, M. S. BERGDOLL (1988): Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. *Int. J. Food Microbiol.* 7, 185–191.

HO, J., M. BOOST, M. O'DONOGHUE (2015): Prevalence of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* colonising food handlers: does nasal carriage status matter? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 2177–2181.

HOLDEN, M. T., E. J. FEIL, J. A. LINDSAY, S. J. PEACOCK, N. P. DAY, M. C. ENRIGHT, T. J. FOSTER, C. E. MOORE, L. HURST, R. ATKIN, A. BARRON, N. BASON, S. D. BENTLEY, C. CHILLINGWORTH, T. CHILLINGWORTH, C. CHURCHER, L. CLARK, C. CORTON, A. CRONIN, J. DOGGETT, L. DOWD, T. FELTWELL, Z. HANCE, B. HARRIS, H. HAUSER, S. HOLROYD, K. JAGELS, K. D. JAMES, N. LENNARD, A. LINE, R. MAYES, S. MOULE, K. MUNGALL, D. ORMOND, M. A. QUAIL, E. RABBINOWITSCH, K. RUTHERFORD, M. SANDERS, S. SHARP, M. SIMMONDS, K. STEVENS, S. WHITEHEAD, B. G. BARRELL, B. G. SPRATT, J. PARKHILL (2004): Complete genomes

of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 9786-9791.

HOLEČKOVÁ, B., E. HOLODA, M. FOTTA, V. KALINÁČOVA, J. GONDOL', J. GROLMUS (2002): Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. Ann. Agric. Environ. Med. 9, 179-182.

HOLTFRETER, S., D. GRUMANN, M. SCHMUDDE, H. T. NGUYEN, P. EICHLER, B. STROMMINGER, K. KOPRON, J. KOLATA, S. GIEDRYS-KALEMBA, I. STEINMETZ, W. WITTE, B. M. BRÖKER (2007): Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol. 45, 2669–2680.

HOVDE, C. J., S. P. HACKETT, G.A. BOHACH (1990): Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C3 gene: sequence comparison of all three type C staphylococcal enterotoxins. Mol. Gen. Genet. 220, 329–333.

HOVDE, C. J., J. C. MARR, M. L. HOFFMANN, S. P. HACKETT, Y. I. CHI, K. K. CRUM, D. L. STEVENS, C. V. STAUFFACHER, G. A. BOHACH (1994): Investigation of the role of the disulphide bond in the activity and structure of staphylococcal enterotoxin C1. Mol. Microbiol. 13, 897–909.

HRN EN ISO 6887-1:2017: Mikrobiologija u lancu hrane – Priprema ispitnih uzoraka, osnovnog i ostalih decimalnih razrjeđenja za mikrobiološko ispitane – 1. dio: Opća pravila za pripremu osnovnog i ostalih decimalnih razrjeđenja (ISO 6887-1:2017; EN ISO 6887-1:2017)

HRN EN ISO 6888-1:2004: Mikrobiologija hrane i stočne hrane – Vodoravni postupak brojenja koagulaza-pozitivnih stafilocoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste) – 1. Dio: Postupak primjene Baird-Parker podloge na agaru (ISO 6888-1:1999+Amd 1:2003; EN ISO 6888-1:1999+A1:2003)

HRN EN ISO 19020:2017: Horizontalna metoda za imunoenzimsko dokazivanje prisutnosti stafilocoknih enterotoksina (ISO 19020:2017; EN ISO 19020:2017)

HRN ISO 21807:2005: Mikrobiologija hrane i stočne hrane - Određivanje aktiviteta vode (ISO 21807:2004)

HRVATSKA AGENCIJA ZA HRANU (HAA) (2016): Znanstveno mišljenje o mikrobiološkim opasnostima u svježim i polutvrđim sirevima na tržnicama RH i njihovim

kemijskim parametrima. Dostupno na: <https://www.hah.hr/wp-content/uploads/2015/10/ZM-o-mikrobioloskim-opasnostima-u-svjezim-i-polutvrdim-sirevima.pdf>

HU, D. L., L. WANG, R. FANG, M. OKAMURA, H. K. ONO (2018): *Staphylococcus aureus* enterotoxins. U: *Staphylococcus aureus*, A. Fetsch (Ed), Academic Press, Elsevier Inc. p. 3-10.

HUANG, I. Y., M. S. BERGDOLL (1970): The primary structure of staphylococcal enterotoxin B. *J. Biol. Chem.* 245, 3518-3525.

HUANG, I. Y., J. L. HUGHES, M. S. BERGDOLL, E. J. SCHANTZ (1987): Complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin A. *J. Biol. Chem.* 262, 7006–7013.

HUMMERJOHANN, J., J. NASKOVA, A. BAUMGARTNER, H. U. GRABER (2014): Enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* genotype B as a major contaminant in Swiss raw milk cheese. *J. Dairy Sci.* 97(3), 1305-1312.

HUNT, K., J. SCHELIN, P. RÅDSTRÖM, F. BUTLER, K. JORDAN (2012): Classical enterotoxins of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk and raw milk cheese production in Ireland. *Dairy Sci. Technol.* 92, 487-499.

IKEDA, T., N. TAMATE, K. YAMAGUCHI, S. MAKINO (2005): Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2793-2795.

JAKI TAKLEC, V. (2013): Dokazivanje gena za virulenciju i *mecA* gena sojeva vrste *Staphylococcus aureus* izdvojenih u rutinskoj dijagnostici mastitisa krava, doktorska disertacija, Veterinarski fakultet, Zagreb.

JARRAUD, S., G. COZON, F. VANDENESCH, M. BES, J. ETIENNE, G. LINA (1999): Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2446.

JARRAUD, S., M. A. PEYRAT, A. LIM, A. TRISTAN, M. BES, C. MOUGEL, J. ETIENNE, F. VANDENESCH, M. BONNEVILLE, G. LINA (2001): *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 166, 669–677.

- JARVIS, A. W., R. C. LAWRENCE, G. G. PRITCHARD (1975): Glucose repression of enterotoxins A, B and C and other extracellular proteins in staphylococci in batch and continuous culture. *J. Gen. Microbiol* 86, 75–87.
- JOHLER, S., P. GIANNINI, M. JERMINI, J. HUMMERJOHANN, A. BAUMGARTNER, R. STEPHAN (2015): Further Evidence for Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Caused by *egc*-Encoded Enterotoxins. *Toxins* 7(3), 997-1004.
- JOHLER, S., H. M. SIHTO, G. MACORI, R. STEPHAN (2016): Sequence variability in staphylococcal enterotoxin genes *seb*, *sec*, and *sed*. *Toxins*. 8, 169.
- JOHLER, S., G. MACOR, A. BELLIO, P. L. ACUTIS, S. GALLINA, L. DECASTELLI (2018): Short communication: Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated along the raw milk cheese production process in artisan dairies in Italy. *J. Dairy Sci.* 101, 2915-2920.
- JOHNS, JR. M. B., S. A. KHAN (1988): Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with a discrete genetic element. *J. Bacteriol.* 170 (9), 4033-4039.
- JOHNSON, E. A., J. H. NELSON, M. JOHNSON (1990): Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk, Part II, Microbiology. *J. Food Prot.* 53, 519–540.
- JOHNSON, W. M., S. D. TYLER, E. P. EWAN, F. E. ASHTON, D. R. POLLARD, K. R., ROZEE (1991): Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29, 426–430.
- JONES, C. L., S. A. KHAN (1986): Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 166, 29-33.
- JØRGENSEN, H., T. MATHISEN, A. LØVSETH, K. OMOE, K. QVALE, S. LONCAREVIC (2005a): An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiol. Lett.* 252, 267-72.
- JØRGENSEN, H. J., T. MØRK, L. M. RØRVIK (2005b): The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *J. Dairy Sci.* 88(11), 3810-3817.
- JØRGENSEN, H. J., T. MØRK, H. R. HØGÅSEN, L. M. RØRVIK (2005c): Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *J. Appl. Microbiol.* 99(1), 158-166.

- KADARIYA, J., SMITH, T.C., THAPALIYA, D. (2014): *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *Biomed. Res. Int.* 2014:827965.
- KATSUDA, K., E. HATA, H. KOBAYASHI, M. KOHMOTO, K. KAWASHIMA, H. TSUNEMITSU, M. EGUCHI (2005): Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. *Vet. Microbiol.* 105, 301–305.
- KAV, K., R. COL, M. ARDIC (2011): Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from white-brined Urfa cheese. *J. Food Prot.* 74, 1788-1796.
- KELLER, G. M., R. S. HANSON, M. S. BERGDOLL (1978): Effect of minerals on staphylococcal enterotoxin B production. *Infect. Immun.* 20, 158–160.
- KENNY, K., R. F. REISER, F. D. BASTIDA-CORCUERA, N. L. NORCROSS (1993): Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 31:706–707.
- KÉROUANTON, A., J. A. HENNEKINNE, C. LETERTRE, L. PETIT, O. CHESNEAU, A. BRISABOIS, M. L. DE BUYSER (2007): Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 369–375.
- KLOTZ, M., S. OPPER, K. HEEG, S. ZIMMERMANN (2003): Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by Real-time fluorescence PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41(10), 4683-4687.
- KLUYTMANS, J., W. VAN LEEUWEN, W. GOESSENS, R. HOLLIS, S. MESSER, L. HERWALDT, H. BRUINING, M. HECK, J. ROST, N. VAN LEEUWEN, A. VAN BELKUM, H. VERBRUGH (1995): Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 33 (5), 1121-1128.
- KLUYTMANS, J., A. VAN BELKUM, H. VERBRUGH (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 505–520.
- KLUYTMANS, J. A. J. W. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 11–15.

KOHLER, P. L., S. D. GREENWOOD, S. NOOKALA, M. KOTB, D. M. KRANZ, P. M. SCHLIEVERT (2012): *Staphylococcus aureus* isolates encode variant staphylococcal enterotoxin B proteins that are diverse in superantigenicity and lethality. PLoS ONE 7:e41157.

KOUSTA, M., M. MATARAGAS, P. SKANDAMIS, E. H. DROSINOS (2010): Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. Food Control 21, 805-815.

KOZONO, H., D. PARKER, J. WHITE, P. MARRACK, J. KAPPLER (1995): Multiple binding sites for bacterial superantigens on soluble class II MHC molecules. Immunity 3, 187–196.

KURODA, M., T. OHTA, I. UCHIYAMA, T. BABA, H. YUZAWA, I. KOBAYASHI, L. CUI, A. OGUCHI, K. AOKI, Y. NAGAI, J. LIAN, T., ITO, M. KANAMORI, H. MATSUMARU, A. MARUYAMA, H. MURAKAMI, A. HOSOYAMA, Y. MIZUTANI-UI, N. K. TAKAHASHI, T. SAWANO, R. INOUE, C. KAITO, K. SEKIMIZU, H. HIRAKAWA, S. KUHARA, S. GOTO, J. YABUZAKI, M. KANEHISA, A. YAMASHITA, K. OSHIMA, K. FURUYA, C. YOSHINO, T. SHIBA, M. HATTORI, N. OGASAWARA, H. HAYASHI, K. HIRAMATSU (2001): Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet, 357(9264), 1225-1240.

LAMPRELL, H., L. VILLARD, J.-F. CHAMBA, E. BEUVIER, E. BORGES, F. MAURIN, G. MAZEROLLES, Y. NOEL, A. KODJO (2004): Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened French raw milk cheeses and their in vitro ability to produce enterotoxins. Revue de Médecine Vétérinaire, 155, pp.92-96. {hal-02669313}

LANDEKA, V., M. ALJIČEVIĆ, A. SESAR, L. KOZAČINSKI (2019): Microbiological quality of fresh cow's milk cheese sold at Sarajevo and Zagreb farmers' markets. Vet. stn. 50, 435-443.

LAWRYNOWICZ-PACIOREK, M., M. KOCHMAN, K. PIEKARSKA, A. GROCHOWSKA, B. WINDYGA (2007): The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. Int. J. Food Microbiol. 117, 319-323.

LE LOIR Y., F. BARON, M. GAUTIER (2003): *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet. Mol. Res. 2, 63–76.

- LETERTRE, C., S. PERELLE, F. DILASSER, P. FACH (2003a): Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 95, 38–43.
- LETERTRE, C., S. PERELLE, F. DILASSER, P. FACH (2003b): A strategy based on 5' nuclease multiplex PCR to detect enterotoxin genes *sea* to *sej* of *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell Probes* 17(5), 227-235.
- LETERTRE, C., S. PERELLE, F. DILASSER, P. FACH (2003c): Detection and genotyping by Real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej*. *Mol. Cell Probes* 17(4), 139-147.
- LINA, G., G. A. BOHACH, S. P. NAIR, K. .HIRAMATSU, E. JOUVIN-MARCHE, R. MARIUZZA (2004): International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigens, Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J. Infect. Dis.* 189, 2334–2336.
- LINDSAY, J. A., M. T. G. HOLDEN (2004): *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol.* 12, 378–385.
- LINDSAY, J. A., M. T. G. HOLDEN (2006): Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct. Integrat. Genomics* 6, 186–201.
- LINDSAY, J. A. (2010): Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 98–103.
- LITTLE, C. L., J. DE LOUVOIS (1999): Health Risks Associated with Unpasteurized Goats' and Ewes' Milk on Retail Sale in England and Wales. A PHLS Dairy Products Working Group Study. *Epidemiol. Infect.* 122, 403-408.
- LITTLE, C. L., J. R. RHOADES, S. K. SAGOO, J. HARRIS, M. GREENWOOD, V. MITHANI, K. GRANT, J. McLAUHLIN (2008): Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in UK. *Food Microbiol.* 25, 304-312.
- LONCAREVIC, S., H. J. JØRGENSEN, A. LØVSETH, T. MATHISEN, L. M. RØRVIK (2005): Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *J. Appl. Microbiol.* 98, 344–350.



LONGO, M. C., M. S. BERNINGER, J. L. HARTLEY (1990): Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93, 125-8.

LOWY, M.D. (1998): *Staphylococcus aureus* infections. *N. Eng. J. Med.* 339 (8), 520-532.

LUDWIG, W., K. H. SCHLEIFER, W. B. WHITMAN (2009): Revised Road Map to the Phylum *Firmicutes*. In: De Vos P. et al. (eds) *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer, New York, NY.

LV, G., B. XU, P. WEI, J. SONG, H. ZHANG, C. ZHAO, L. QIN, B. ZHAO (2014): Molecular characterization of foodborne-associated *Staphylococcus aureus* strains isolated in Shijiazhuang, China, from 2010 to 2012. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 78, 462–468.

LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN, I., M. LAKIĆ, M., A. DŽONO-BOBAN (2014): Mikrobiološka ispravnost sireva s dubrovačkih tržnica. 3. Kongres Preventivne medicine i promicanja zdravlja, Vinkovci, 09-12.10.2014.

LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN, I., M. LAKIĆ, S. LEVAK, L. KOZAČINSKI (2016): Microbiological quality of domestic cheese in Dubrovnik Croatia region, Zbornik prednášok a posterov *Hygiena alimentorum XXXVII. Bezpečnosť a kvalita mliečnych a rastlinných komodít / Mała, P.* (ur.). Košice: University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice Department of Food Hygiene and Technology, Pp 228-233.

MARKOV, K., J. FRECE, D. ČVEK, F. DELAŠ (2009): *Listeria monocytogenes* i drugi kontaminanti u svježem siru i vrhnju domaće proizvodnje s područja grada Zagreba. *Mljekarstvo* 59, 225–31.

MARR, J.C., J. D. LYON, J. R. ROBERSON, M. LUPHER, W. C. DAVIS, G. A. BOHACH (1993): Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. *Infect. Immun.* 61, 4254–4262.

MARRACK, P., J. KAPPLER (1990): The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248, 705–711.

McCORMICK, J. K., J. M. YARWOOD, P. M. SCHLIEVERT (2001): Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 77–104.

- McLAUHLIN, J., G. L. NARAYANAN, V. MITHANI, G. O'NEILL (2000): The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* 63(4), 479-488.
- MEAD, P. S., L. SLUTSKER, V. DIETZ, L. F. MCCAIG, J. S. BRESEE, C. SHAPIRO, P. M. GRIFFIN, R. V. TAUXE (1999): Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 607–625.
- MEDVED'OVÁ, A., A. HAVLÍKOVÁ, Ľ VALÍK (2017): *Staphylococcus aureus* Enterotoxin Production in Relation to Environmental Factors. U: The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. Intech, Slovačka, 145-167.
- MEHROTRA, M., G. WANG, W. M. JOHNSON (2000): Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.* 38(3), 1032-5.
- MEYRAND, A., S. BOUTRAND-LOEI, S. RAY-GUENIOT, C. MAZUY, C. GASPARD, G. JAUBERT, G. PERRIN, C. LAPEYRE, C. VERNZOZY-ROZAND (1998): Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. *J. Appl. Microbiol.* 85, 537-544.
- MINOR, T. E., E. H. MARTH (1970): Growth of *Staphylococcus aureus* in acidified pasteurized milk. *J. Milk Food Technol.* 33:516–520.
- MONDAY, S. R., G. A. BOHACH (2001): Genes encoding staphylococcal enterotoxins G and I are linked and separated by DNA related to other staphylococcal enterotoxins. *J. Nat. Toxins* 10, 1–8.
- MORANDI, S., M. BRASCA, R. LODI, P. CREMONESI, B. CASTIGLIONI (2007): Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Vet. Microbiol.* 124, 66-72.
- MORANDI, S., M. BRASCA, C. ANDRIGHETTO, A. LOMBARDI, R. LODI (2009): Phenotypic and Genotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains from Italian Dairy Products. *Int. J. Microbiol.* 501362.
- MORSE, S. A., J. N. BALDWIN (1973): Factors affecting the regulation of staphylococcal enterotoxin B. *Infect. Immun.* 7, 839-846.

- MOSSEL, D. A. A., J. E. L. CORRY, C. B. STRUIJK, R. M. BAIRD (1995): Essentials of the Microbiology of Foods. A Textbook for Advanced Studies. Wiley John & Sons, Chichester, England, pp. 146–150.
- MUENKS, C. E., P. G. HOGAN, J. W. WANG, K. A. EISENSTEIN, C. A. BURNHAM, S. A. FRITZ (2016): Diversity of *Staphylococcus aureus* strains colonizing various niches of the human body. *J. Infect.* 72, 698–705.
- MULCAHY, M. E., R. M. McLOUGHLIN (2016): Host-bacterial crosstalk determines *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *Trends Microbiol.* 24, 872–886.
- MUNSON, S. H., M. T. TREMAINE, M. J. BETLEY, R. A. WELCH (1998): Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 66, 3337–3348.
- NAKAYAMA, A., A. OKAYAMA, M. HASHIDA, Y. YAMAMOTO, H. TAKEBE, T. OHNAKA, T. TANAKA, S. IMAI (2006): Development of a routine laboratory direct detection system of staphylococcal enterotoxin genes. *J. Med. Microbiol.* 55, 273-277.
- NASHEV, D., K. TOSHKOVA, L. BIZEVA, O. AKINEDEN, C. LAMMLER, M., ZSCHOCK (2007): Distribution of enterotoxin genes among carriage- and infection-associated isolates of *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 681–685.
- NECIDOVÁ, L., Z. ŠŤÁSTKOVÁ., M. POSPÍŠILOVÁ, B. JANŠTOVÁ, J. STREJČEK, M. DUŠKOVÁ, R. KARPÍŠKOVÁ (2009): Influence of soft cheese technology on the growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. *Czech J. Food Sci.* 27, 127-133.
- NECIDOVÁ, L., K. BOGDANOVICOVA, D. HARUSTIAKOVA, K. BARTOVA (2016): Short communication: Pasteurization as a means of inactivating staphylococcal enterotoxins A, B, and C in milk. *J. Dairy Sci.* 99, 8638-8643.
- NORMANNO, G., A. FIRINU, S. VIRGILIO, G. MULA, A. DAMBROSIO, A. POGGIU, L. DECASTELLI, R. MIONI, S. SCUOTA, G. BOLZONI, E. DI GIANNATALE, A. P. SALINETTI, G. LA SALANDRA, M. BARTOLI, F. ZUCCON, T. PIRINO, S. SIAS, A. PARISI, N. C. QUAGLIA, G. V. CELANO (2005): Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 73-79.

- NORMANNO, G., G. LASALANDRA, A. DAMBROSIO, N. C. QUAGLIA, M. CORRENTE, A. PARISI, G. SANTAGADA, A. FIRINU, E. CRISSETTI, G. V. CELANO (2007a): Occurrence, characterisation and antimicrobial resistance of enterotoxinogenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 290–296.
- NORMANNO, G., G. CORRENTE, G. LA SALANDRA, A. DAMBROSIO, N.C., QUAGLIA, A. PARISI, G. GRECO, A. L. BELLACICCO, S. VIRGILIO, G. V. CELANO (2007b): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 219–222.
- NOTERMANS, S., C. J. HEUVELMAN (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.
- NOTO, M. J., G. L. ARCHER (2006): A subset of *Staphylococcus aureus* strains harboring staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type IV is deficient in CcrAB-mediated SCCmec excision. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2782–2788.
- NOUWEN, J., H. BOELEN, A. VAN BELKUM, H. VERBRUGH (2004): Human factor in *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Infect. Immun.* 72, 6685–88.
- NOVICK, R. P., A. SUBEDI (2007): The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*. *Chem. Immunol. Allergy* 93, 42–57.
- O'BRIEN, M., K. HUNT, S. McSWEENEY, K. JORDAN (2009): Occurrence of foodborne pathogens in Irish farmhouse cheese. *Food Microbiol.* 26, 910–914.
- OMOE, K., M. ISHIKAWA, Y. SHIMODA, D.-L. HU, S. UEDA, K. SHINAGAWA (2002): Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.* 40, 857–862.
- OMOE, K., D.-L. HU, H. TAKAHASHI-OMOE, A. NAKANE, K. SHINAGAWA (2003): Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect. Immun.* 71, 6088–6094.

OMOE, K., K. IMANISHI, D.-L. HU, H. KATO, H. TAKAHASHI-OMOE, A. NAKANE, T. UCHIYAMA, K. SHINAGAWA (2004): Biological properties of staphylococcal enterotoxin-like toxin R. *Infect. Immun.* 72(6), 3664–3667.

OMOE, K., D.-L. HU, H. TAKAHASHI-OMOE, A. NAKANE, K. SHINAGAWA (2005a): Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 246, 191–198.

OMOE, K., K. IMANISHI, D.-L., HU, H. KATO, Y. FUGANE, Y. ABE, S. HAMAOKA, Y. WATANABE, A. NAKANE, T. UCHIYAMA, K. SHINAGAWA (2005b): Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin P. *Infect. Immun.* 73(9), 5540-5546.

OMOE, K., D.-L. HU, H. K. ONO, S. SHIMIZU, H. TAKAHASHI-OMOE, A. NAKANE, T. UCHIYAMA, K. SHINAGAWA, K. IMANISHI (2013): Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. *Infect. Immun.* 81, 3627–3631.

ONO, H. K., K. OMOE, K. IMANISHI, Y. IWAKABE, D.-L. HU, H. KATO, N. SAITO, A. NAKANE, T. UCHIYAMA, K. SHINAGAWA (2008): Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infect. Immun.* 76, 4999–5005.

ONO, H. K., Y. SATO'O, K. NARITA, I. NAITO, S. HIROSE, J. HISATSUNE, K. ASANO, D.-L. HU, K. OMOE, M. SUGAI, A. NAKANE (2015): Identification and characterization of a novel staphylococcal emetic toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 8, 7034–7040.

ORTEGA, E., H. ABRIOUEL, R. LUCAS, A. GÁLVEZ (2010): Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. *Toxins*, 2, 2117–2131.

ORWIN, P. M., D. Y. LEUNG, H. L. DONAHUE, R. P. NOVICK, P. M. SCHLIEVERT (2001): Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect. Immun.* 69, 360–366.

ORWIN, P. M., D. Y. LEUNG, T. J. TRIPP, G. A. BOHACH, C. A. EARHART, D. H. OHLENDORF, P. M. SCHLIEVERT (2002): Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. *Biochemistry* 41, 14033–14040.

- ORWIN, P. M., J. R. FITZGERALD, D. Y. LEUNG, J. A. GUTIERREZ, G. A. BOHACH, P. M. SCHLIEVERT (2003): Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. Infect. Immun. 71, 2916–2919.
- OSTYN, A., M. L. DE BUYSER, F. GUILLIER, J. GROULT, B. FÉLIX, S. SALAH, G. DELMAS, J.-A. HENNEKINNE (2010): First evidence of a food-poisoning due to staphylococcal enterotoxin type E in France. Eurosurveillance 15, 19528.
- OSTYN, A., M. L. DE BUYSER, F. GUILLIER, S. KRYS, J. A. HENNEKINNE (2012): Benefits of the Combined Use of Immunological- and PCR-Based Methods for Determination of Staphylococcal Enterotoxin Food Safety Criteria in Cheeses. Food Anal. Methods 5, 173–178.
- OTERO, A., M. C. GARCÍA, M. L. GARCÍA, M. PRIETO, B. MORENO (1988): Behaviour of *Staphylococcus aureus* strains, producers of enterotoxins C1 or C2, during the manufacture and storage of Burgos cheese. J. Appl. Bacteriol. 64, 117-22.
- OTERO, A., M. L. GARCÍA, M. C. GARCÍA, B. MORENO, M. S. BERGDOLL (1990): Production of staphylococcal enterotoxins C1 and C2 and thermonuclease throughout the growth cycle. Appl. Environ. Microbiol. 56, 555-559..
- OTTO, M. (2014): *Staphylococcus aureus* toxins. Curr. Opin. Microbiol. 17, 32–37.
- PAJIĆ, M., S. BOBOŠ, B. VELEBIT, Z. RAŠIĆ, V. KATIĆ, M. RADINOVIĆ, A. NIKOLIĆ, D. SIMONOVIĆ, M. BABIĆ (2016): Prevalence and Molecular Characterization of Enterotoxin-Producing Strains of *Staphylococcus Aureus* Isolated from Serbian Dairy Cows. Acta veterinaria 66, 466-477.
- PAPADOPOULOS, P., T. PAPADOPOULOS, A. S. ANGELIDIS, C. KOTZAMANIDIS, A. ZDRAGAS, A. PAPA, G. FILIOUSSIS, D. SERGELIDIS (2019): Prevalence, antimicrobial susceptibility and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dairy industries in north-central and north-eastern Greece. Int. J. Food Microbiol. 291, 35-41.
- PAPAGEORGIU, A. C., K. R. ACHARYA (2000): Microbial superantigens: from structure to function. Trends Microbiol. 8, 369–375.

- PATEL, J. B., R. J. GORWITZ, J. A. JERNIGAN (2009): Mupirocin resistance. *Clin. Infect. Dis.* 49(6), 935-41.
- 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 classical enterotoxin genes in cheese and meat products. *Braz. J. Microbiol.* 40, 145-148.
- PEREIRA, M. L., L. DO CARMO, E. J. DOS SANTOS, J. L. PEREIRA, M. S. BERGDOLL (1996): Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. *J. Food Prot.* 59, 559–561.
- PEREIRA, V., C. LOPES, A. CASTRO, J. SILVA, P. GIBBS, P. TEIXEIRA (2009): Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiol.* 26, 278-82.
- PINCHUK, I. V., E. J. BESWICK, V. E. REYES (2010): Staphylococcal enterotoxins. *Toxins* 2(8), 2177-97.
- PODKOWIK, M., J. Y. PARK, K. S. SEO, J. BYSTRONÍ, J. BANIA (2013): Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *Int. J. Food Microbiol.* 163(1), 34-40.
- POLI, A., E. GUGLIELMINI, S. SEMBENI, M. SPIAZZI, F. DELLAGLIO, F. ROSSI, S. TORRIANI (2007): Detection of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin genotype diversity in Monte Veronese, a Protected Designation of Origin Italian cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 529-534.
- QI, Y., K. J. MILLER (2000): Effect of low water activity on staphylococcal enterotoxin A and B biosynthesis. *J. Food Prot.* 63, 473–478.
- RALL, V. L., F. P. VIEIRA, R. RALL, R. L. VIEITIS, A. JR. FERNANDES, J. M. CANDEIAS, K. F. CARDOSO, J. P. JR. ARAÚJO (2008): PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Vet. Microbiol.* 132, 408-413.
- REGASSA, L. B., J. L. COUCH, M. J. BETLEY (1991): Steady-state staphylococcal enterotoxin type C mRNA is affected by a product of the accessory gene regulator (*agr*) and by glucose. *Infect. Immun.* 59, 955-962.

- REGASSA, L. B., R. P. NOVICK, M. J. BETLEY (1992): Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 60, 3381–3388.
- REGASSA, L. B., BETLEY, M. J. (1993): High sodium chloride concentrations inhibit staphylococcal enterotoxin C gene (*sec*) expression at the level of *sec* mRNA. *Infect. Immun.* 61, 1581–1585.
- REGENTHAL, P., J. S. HANSEN, I. ANDRE, K. LINDKVIST-PETERSSON (2017): Thermal stability and structural changes in bacterial toxins responsible for food poisoning. *PLoS ONE* 12:e0172445.
- REISER, R. F., R. N. ROBBINS, G. P. KHOE, M. S. BERGDOLL (1983): Purification and some physicochemical properties of toxic-shock toxin. *Biochemistry* 22, 3907–3912.
- REISER, R. F., R. N. ROBBINS, A. L. NOLETO, G. P. KHOE, M. S. BERGDOLL (1984): Identification, purification, and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C3. *Infect. Immun.* 45, 625–630.
- REN, K., J. D. BANNAN, V. PANCHOLI, A. L. CHEUNG, J. C. ROBBINS, V. A. FISCHETTI, J. B. ZABRISKIE (1994): Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. *J. Exp. Med.* 180, 1675–1683.
- ROBERSON, J. R., L. K. FOX, D. D. HANCOCK, J. M. GAY, T. E. BESSER (1994): Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 77, 3354-3364.
- RODRIGUES, M., N. SILVA, J. TREVILIN, M. BRAVO, S. TSAI, F. DUARTE, C. CONTRERAS-CASTILLO, S. CANNIATTI-BRAZACA, E. PORTO (2017): Molecular characterization and antibiotic resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from cheese processing plants. *J. Dairy Sci.* 100, 5167–5175.
- ROLA, J. G., A. CZUBKOWSKA, W. KORPYSA-DZIRBA, J. OSEK (2016): Occurrence of *Staphylococcus aureus* on Farms with Small Scale Production of Raw Milk Cheeses in Poland. *Toxins* 8, 62.
- ROSEC, J. P., J. P. GUIRAUD, C. DALET, N. RICHARD (1997): Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *Int. J. Food Microbiol.* 35, 213-221.



- ROSEC, J. P., O. GIGAUD (2002): Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int. J. Food Microbiol.* 77, 61–70.
- ROSENGREN, Å., A. FABRICIUS, B. GUSS, S. SYLVÉN, R. LINDQVIST (2010): Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 263–269.
- SALASIA, S. I., Z. KHUSNAN, C. LAMMLER, M. ZSCHOCK (2004): Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *J. Vet. Sci.* 5, 103-109.
- SAMARŽIJA, D., S. DAMJANOVIĆ, T. POGAČIĆ (2007): *Staphylococcus aureus* u siru. *Mljekarstvo* 5, 31-48.
- SATO'O, Y., K. OMOE, I. NAITO, H. K. ONO, A. NAKANE, M. SUGAI, N. YAMAGISHI, D.-L. HU (2014): Molecular epidemiology and identification of a *Staphylococcus aureus* clone causing food poisoning outbreaks in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 52, 2637–2640.
- SCHERRER, D., S. CORTI, J. E. MUEHLHERR, C. ZWEIFEL, R. STEPHAN (2004): Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Vet. Microbiol.* 101, 101-7.
- SCHMIDT, J. J., L. SPERO (1983): The complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin Cl. *J. Biol. Chem* 258, 6300-6306.
- SCHMITT, M., U. SCHULER-SCHMIDT, W. SCHMIDT-LORENZ (1990): Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Int. J. Food Microbiol* 11, 1–20.
- SCHMITZ, F.J., M. STEIERT, B. HOFMANN, J. VERHOEF, U. HADDING, H. P. HEINZ, K. KÖHRER (1998): Development of a multiplex-PCR for direct detection of the genes for enterotoxin B and C, and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Med. Microbiol.* 47(4), 335-40.
- SCHWABE, M., S. NOTERMANS, R. BOOT, S. R. TATINI, J. KRÄMER (1990): Inactivation of staphylococcal enterotoxins by heat and reactivation by high pH treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 10, 33-42.

SHAFER, W. M., J. J. IANDOLO (1978): Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. *Infect. Immun.* 20, 273–278.

SHALITA, Z., I. HERTMAN, S. SAND (1977): Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 129, 317–325.

SHEPHEARD, M. A., V. M. FLEMING, T. R. CONNOR, J. CORANDER, E. J. FEIL, C. FRASER, W. P. HANAGE (2013): Historical Zoonoses and other changes in host tropism of *Staphylococcus aureus*, identified by phylogenetic analysis of a population dataset. *PLoS One* 8(5), e62369.

SMITH, J. L., R. L. BUCHANAN, S. A. PALUMBO (1983): Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. *J. Food Prot.* 46, 545–555.

SMITH, A. C., A. M. HUSSEY (2005): *Gram Stain Protocols*. American Society for Microbiology. Dostupno na: <https://asm.org/getattachment/5c95a063-326b-4b2f-98ce-001de9a5ece3/gram-stain-protocol-2886.pdf>

SOLBERG, C. O. (1965): A study of carriers of *Staphylococcus aureus* with special regard to quantitative bacterial estimations. *Acta Med. Scand. Suppl* 436, 1–96.

SPAULDING, A. R., W. SALGADO-PABÓN, P. L. KOHLER, A. R. HORSWILL, D. Y. LEUNG, P. M. SCHLIEVERT (2013): Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 26(3), 422–447.

STEPHAN, R., C. ANNEMÜLLER, A. A. HASSAN, C. LÄMMLER (2001): Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet. Microbiol.* 78, 373–382.

STROMMENDER, B., F. LAYER, G. WERNER (2018): *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Workers in the Food Industry. U: *Staphylococcus aureus*, A. Fetsch (Ed), American Press, Elsevier Inc. p. 163–188.

SU, Y. C., A. C. WONG (1995): Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1438–1443.

SWAMINATHAN, S., W. FUREY, J. PLETCHER, M. SAX (1992): Crystal structure of staphylococcal enterotoxin B, a superantigen. *Nature* 359, 801–806.

TAMARAPU, S., J. L. MCKILLIP, M. DRAKE (2001): Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. J. Food Prot. 64, 664–668.

TATINI, S. R., J. J. JEZESKI, H. A. MORRIS, J. C. OLSON, JR., E. P. CASMAN (1971): Production of staphylococcal enterotoxin A in cheddar and Colby cheeses. J. Dairy Sci. 54, 815-825.

TATINI S. R. (1973): Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. J. Milk Food. Technol. 36, 559–563.

TATINI S.R. (1976): Thermal stability of enterotoxins in food. J. Milk Food. Technol. 39, 432–438.

TATINI, S. R., W. D. WESALA, J. J. JEZESKI, H. A. MORRIS (1973): Production of staphylococcal enterotoxin A in blue, brick, mozzarella, and Swiss cheeses. J. Dairy Sci. 56, 429-435.

Technical University of Denmark (2012): Microbiological contaminants in food in the European Union in 2004-2009. Supporting Publications 2012:EN-249. [259 pp.]. Dostupno na: <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-249> (pristupljeno 03.01.2021.)

Thermo Fisher Scientific Luminaris Probe qPCR Master Mix product information (2013). Dostupno na: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0951#/K0951>.

Thermo Fisher Scientific: Real-time PCR Handbook (2016). Dostupno na: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/Real-time-pcr-handbook.pdf>.

THOMAS, D. Y., S. JARRAUD, B. LEMERCIER, G. COZON, K. ECHASSERIEAU, J. ETIENNE, M. L. GOUGEON, G. LINA, F. VANDENESCH (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.

THOMAS, D., S. CHOU, O. DAUWALDER, G. LINA (2007): Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Chem. Immunol. Allergy 93, 24–41.

- THOTA, H., S. R. TATINI, R. W. BENNETT (1973): Effects of temperature, pH and NaCl on production of staphylococcal enterotoxins E and F. Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol, 1: 11.
- TODD, E. C., J. D. GREIG, C. A. BARTLESON, B. S. MICHAELS (2008): Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 4. Infective doses and pathogen carriage. J. Food Prot. 71, 2339–2373.
- TRATNIK, Lj. (1998): Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, ISBN 953 96089-4-5, 392 str.
- TREMAINE, M. T., D. K. BROCKMAN, M. J. BETLEY (1993): Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). Infect. Immun. 61, 356–359.
- TROLLER, J. A., J. V. STINSON (1975): Influence of water activity on growth and enterotoxin formation by *Staphylococcus aureus* in foods. J. Food Sci. 40, 802–804.
- TROLLER, J. A. (1971): Effect of water activity on enterotoxin B production and growth of *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol. 21, 435-439.
- TSENG, C. W., G. C. STEWART (2005): Rot repression of enterotoxin B expression in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 187, 5301–5309.
- UMEDA, K., H. NAKAMURA, K. YAMAMOTO, N. NISHINA, K. YASUFUKU, Y. HIRAI, T. HIRAYAMA, K. GOTO, A. HASE, J. OGASAWARA (2017): Molecular and epidemiological characterization of staphylococcal foodborne outbreak of *Staphylococcus aureus* harboring *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, and *selu* genes without production of classical enterotoxins. Int. J. Food Microbiol. 256, 30-35.
- VALLE, J., E. GOMEZ-LUCIA, S. PIRIZ, J. GOYACHE, J.A. ORDEN, S. VADILLO (1990): Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. Appl. Environ. Microbiol. 56(5), 1323-1326.
- VAN BELKUM, A., N. J. VERKAIK, C. P. DE VOGEL, H. A. BOELEN, J. VERVEER, J. L. NOUWEN, H. A. VERBRUGH, H. F. WERTHEIM (2009): Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. J. Infect. Dis. 199, 1820–1826.

VAN DEN BUSSCHE, R. A., J. D. LYON, G. A. BOHACH (1993): Molecular evolution of the staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxin gene family. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2, 281–292.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D., P. RODRÍGUEZ-LÓPEZ (2018): Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus*. U: *Staphylococcus aureus*, A. Fetsch (Ed), American Press, Elsevier Inc. p. 87-103.

VERAS, J. F., L. S. DO CARMO, L. C. TONG, J. W. SHUPP, C. CUMMINGS, D. A. DOS SANTOS, M. M. CERQUEIRA, A. CANTINI, J. R. NICOLI, M. JETT (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(4), 410-415.

VERNOZY-ROZAND, C., A. MEYRAND, C. MAZUY, M. L. DELIGNETTE-MULLER, G. JAUBERT, G. PERRIN, C. LAPEYRE, Y. RICHARD (1998): Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goats' milk lactic cheeses. *J. Dairy Res.* 65(2), 273-81.

VERNOZY-ROZAND, C., C. MAZUY-CRUCHAUDET, C. BAVAI, Y. RICHARD (2004): Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. *Lett. Appl. Microbiol.* 39(6), 490-494.

WATTINGER, L., R. STEPHAN, F. LAYER, S. JOHLER (2012): Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates associated with food intoxication with isolates from human nasal carriers and human infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 455–464.

WEINERT, L. A., J. J. WELCH, M. A. SUCHARD, P. LEMEY, A. RAMBAUT, J. R. FITZGERALD (2012): Molecular dating of human-to-bovid host jumps by *Staphylococcus aureus* reveals an association with the spread of domestication. *Biol. Lett.* 8, 829–832.

WERTHEIM, H. F. L., D. C. MELLES, M. C. VOS, W. VAN LEEUWEN, A. VAN BELKUM, H. A. VERBRUGH, J. L. NOUWEN (2005): The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* 5, 751–762.

WIENEKE, A.A. (1988): The detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production by strains of *Staphylococcus aureus* with commercial RPLA kits. *Int. J. Food Microbiol.* 7, 25-30.

- WIENEKE, A.A. (1991): Comparison of four kits for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 14, 305-12.
- WIENEKE, A. A., D. ROBERTS, R. J. GILBERT (1993): Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. *Epidemiol Infect.* 110, 519-531.
- WILLIAMS, R.E. (1963): Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol. Rev.* 27, 56–71.
- WILLIAMS, R. J., J. M. WARD, B. HENDERSON, S. POOLE, B. P. O'HARA, M. WILSON, S. P. NAIR (2000): Identification of a novel gene cluster encoding staphylococcal exotoxin-like proteins: characterization of the prototypic gene and its protein product, SET1. *Infect. Immun.* 68, 4407–4415.
- WILLIAMS, A. G., S. E. WITHERS, (2010): Microbiological characterisation of artisanal farm house cheeses manufactured in Scotland. *Int. J. Dairy Technol.* 63, 356–369.
- WILSON, G. J., K. S. SEO, R. A. CARTWRIGHT, T. CONNELLEY, O. N. CHUANG-SMITH, J. A. MERRIMAN, C. M. GUINANE, J. Y. PARK, G. A. BOHACH, P. M. SCHLIEVERT, W. I. MORRISON, J. R. FITZGERALD (2011): A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community associated MRSA necrotizing pneumonia. *PLoS Pathog.* 7:e1002271.
- WOODBURN, M., T. N. MORITA, S. Z. VENN (1973): Production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C in colloidal dispersions. *Appl. Microbiol.* 25, 825-833.
- WOODBURN, M. J., T. N. MORITA, K. ROWE K, S. S. PARK (1978): Staphylococcal enterotoxin A and C production with various sugars as energy source. *J. Food Prot.* 41, 643–646.
- YANG, L., Y. LIU, H. WU, Z. SONG, N. HØIBY, S. MOLIN, M. GIVSKOV (2012): Combating biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65, 146-57.
- YILDIRIM, T., F. SADATI, B. KOCAMAN, B. SIRIKEN (2019): *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxin detection in raw milk and cheese origin coagulase positive isolates. *IJSL* 1, 30-41.
- ZDOLEC, N., V. DOBRANIĆ, I. BUTKOVIĆ, A. KOTURIĆ, I. FILIPOVIĆ, V. MEDVID (2016): Antimicrobial susceptibility of milk bacteria from healthy and antimicrobial

susceptibility of milk bacteria from healthy and drug-treated cow udder rug-treated cow udder. Vet. Arh. 86, 163-172.

ZHANG, S., J. J. IANDOLO, G. C. STEWART (1998): The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). FEMS Microbiol. Lett. 168, 227–233.

## 9. PRILOZI

**Tablica 19.** Fenotipska i genotipska svojstva izolata *S. aureus* (n = 175)

Izolat	CoA	Latex aglut.	Dnaza	Katal.	Hemoliza	Gram bojenje	Egg yolk reakcija	VIDAS SET2	RPLA	Real-time PCR
S1-1	+	-	+	+	-	G+ koki	-	-	-	-
S1-2	+	-	+	+	-	G+ koki	-	-	-	-
S1-3	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	+	SEC	sec
S1-4	+	-	+	+	-	G+ koki	-	-	-	-
S1-5	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	+	SEC	sec
S1-6	+	+	+	+	-	G+ koki	-	-	-	-
S1-7	+	+	+	+	-	G+ koki	-	-	-	-
S1-8	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	+	SEC	sec
S1-9	+	+	+	+	-	G+ koki	-	+	SEC	sec
S1-10	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	+	SEC	sec
S2-1	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	-	+	SEC	sec
S2-2	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	-	+	SEC	sec
S2-3	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	-	+	SEC	sec
S2-4	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	-	+	SEC	sec
S2-5	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	-	+	SEC	sec
S2-6	+	-	+	+	-	G+ koki	-	-	-	-
S2-7	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	-	+	SEC	sec
S2-8	+	+	+	+	-	G+ koki	-	+	SEC	sec
S2-9	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	-	+	SEC	sec
S2-10	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	-	+	SEC	sec
S3-1	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S3-2	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S3-3	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S3-4	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S3-5	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S3-6	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S3-7	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S3-8	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S3-9	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S3-10	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S4-1	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	-	-	-
S4-2	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	-	-	-
S4-3	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	-	-	-
S4-4	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	-	-	-
S4-5	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	-	-	-
S4-6	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	-	-	-
S4-7	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	-	-	-
S4-8	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	-	-	-
S4-9	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	-	-	-
S4-10	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	-	-	-
S8-1	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S8-2	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-



S8-3	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S8-4	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S8-5	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S8-6	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S8-7	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S8-8	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S8-9	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S8-10	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S11-1	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S11-2	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S11-3	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S11-4	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S11-5	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S11-6	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S11-7	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S11-8	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S11-9	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S11-10	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S12-1	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S12-2	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S12-3	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	+	-	-	-
S12-4	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	-	-	-
S12-5	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S12-6	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S12-7	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S12-8	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S12-9	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S12-10	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S13-1	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S13-2	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S13-3	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S13-4	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S13-5	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S13-6	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S13-7	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S13-8	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S13-9	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S13-10	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S14-1	+	+	+	+	-	G+ koki	++	+	SEC	sec
S14-2	+	+	+	+	-	G+ koki	++	+	SEC	sec
S14-3	+	+	+	+	-	G+ koki	++	+	SEC	sec
S14-4	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	+	SEC	sec
S14-5	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	+	SEC	sec
S14-6	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	+	SEC	sec
S14-7	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	+	SEC	sec
S14-8	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S14-9	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-

S14-10	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S15-1	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	+	-	-
S15-2	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S15-3	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	+	-	-
S15-4	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S15-5	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	+	-	-
S15-6	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S15-7	+	-	-	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S15-8	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S15-9	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S15-10	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S16-1	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	-	-	-
S16-2	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	+	SEC	sec
S16-3	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	-	-	-
S16-4	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	+	SEC	sec
S16-5	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	+	SEC	sec
S16-6	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	+	SEC	sec
S16-7	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	+	SEC	sec
S16-8	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	+	SEC	sec
S16-9	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	+	SEC	sec
S16-10	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	+	+	SEC	sec
S17-1	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S17-2	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S17-3	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S17-4	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S17-5	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S17-6	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S17-7	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S17-8	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S17-9	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S17-10	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S21-1	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S21-2	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S21-3	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S21-4	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S21-5	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	+	SEC	sec
S21-6	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S21-7	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S21-8	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S21-9	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S21-10	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	++	-	-	-
S22-1	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S22-2	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S22-3	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S22-4	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S22-5	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S22-6	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-

S22-7	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	-	+	SEC	<i>sec</i>
S22-8	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S22-9	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S22-10	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S23-1	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S23-2	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S23-3	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S23-4	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	+	SEC	<i>sec</i>
S23-5	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S23-6	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	-	+	SEC	<i>sec</i>
S23-7	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S23-8	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	-	+	SEC	<i>sec</i>
S23-9	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S23-10	+	+	+	+	$\alpha + \beta$	G+ koki	++	-	-	-
S28-1	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	+	-	-	-
S28-2	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	+	-	-	-
S28-3	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	+	-	-	-
S28-4	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	+	-	-	-
S28-5	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	+	-	-	-
S28-6	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	+	-	-	-
S28-7	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	+	-	-	-
S28-8	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	+	-	-	-
S28-9	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	+	-	-	-
S28-10	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	+	-	-	-
S29-1	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S29-2	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S29-3	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S29-4	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S29-5	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S29-6	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S29-7	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S29-8	+	+	+	+	-	G+ koki	-	-	-	-
S29-9	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S29-10	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S30-1	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S30-2	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S30-3	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S30-4	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S30-5	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S30-6	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S30-7	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S30-8	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S30-9	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-
S30-10	+	+	+	+	$\beta$	G+ koki	-	-	-	-

**Tablica 20.** Rezultati određivanja antibiotske osjetljivosti – zone inhibicije (mm)

Uzorak	FOX/ OX	SXT	GM	E/ AZM	CM	MXF	MUP
S1	28-39	32-34	22-28	28-32	24-30	29-34	32-44
S2	27-30	28-33	22-23	24-26	25-27	30-33	30-33
S3	28-30	30-33	23-25	24-27	25-29	27-31	30-34
S4	27-29	28-32	22-24	23-26	24-27	28-30	30-32
S8	26-30	30-31	22-23	24-26	28-30	30-32	<b>28-32</b>
S11	28-30	31-32	22-24	23-25	25-27	29-32	32-33
S12	29-31	29-32	22-24	26-28	27-30	29-32	30-32
S13	27-30	30-34	23-25	24-28	26-27	28-32	30-34
S14	27-29	30-32	22-24	23-27	25-27	28-31	30-33
S15	28-32	28-34	23-25	26-30	23-30	31-33	32-38
S16	28-29	30-32	22-23	24-26	25-26	29-32	30-32
S17	26-29	28-30	21-23	23-25	24-26	29-31	30-32
S21	27-30	29-33	21-24	24-27	23-26	26-30	30-33
S22	25-26	30-32	21-23	24-29	24-28	25-29	31-33
S23	29-30	30-34	22-23	27-28	24-26	28-30	32-33
S28	27-30	29-33	22-25	23-28	24-26	29-32	30-35
S29	27-30	29-33	21-24	24-28	24-27	30-34	30-33
S30	27-30	29-33	22-24	23-27	23-27	28-32	30-33
Osjetljivost	S $\geq$ 22	S $\geq$ 17	S $\geq$ 18	S $\geq$ 21	S $\geq$ 22	S $\geq$ 25	S $\geq$ 30
Rezistencija	R < 22	R < 17	R < 18	R < 21	R < 22	R < 25	R < 30

**Tablica 21.** Reproducibilnost rezultata Real-time PCR metoda za određivanje gena *sea-see*

	<b>Razrjedenje</b>	<b>Ct (1)</b>	<b>Ct (2)</b>	<b>Ct (3)</b>	<b>Sred. vrijed. Ct</b>	<b>SD</b>	<b>CV (%)</b>
<i>sea</i>	10 <sup>0</sup>	16,16	15,87	15,12	15,72	0,54	3,41
	10 <sup>-1</sup>	19,25	19,24	18,54	19,01	0,41	2,14
	10 <sup>-2</sup>	22,51	22,16	22,12	22,26	0,21	0,96
	10 <sup>-3</sup>	26,79	25,43	26,22	26,15	0,68	2,61
	10 <sup>-4</sup>	29,12	28,95	29,37	29,15	0,21	0,72
	10 <sup>-5</sup>	32,87	32,37	32,87	32,70	0,29	0,88
	10 <sup>-6</sup>	36,41	-	35,56	35,99	0,60	1,67
<i>seb</i>	10 <sup>0</sup>	16,66	16,63	16,92	16,74	0,16	0,95
	10 <sup>-1</sup>	20,05	19,85	20,13	20,01	0,14	0,72
	10 <sup>-2</sup>	23,66	23,42	24,05	23,71	0,32	1,34
	10 <sup>-3</sup>	27,1	26,56	27,71	27,12	0,58	2,12
	10 <sup>-4</sup>	30,29	30,03	30,58	30,30	0,28	0,91
	10 <sup>-5</sup>	34,11	33,36	32,56	33,34	0,78	2,32
	10 <sup>-6</sup>	36,53	35,61	34,54	35,56	1,00	2,80
<i>sec</i>	10 <sup>0</sup>	17,95	17,8	17,67	17,81	0,14	0,79
	10 <sup>-1</sup>	21,09	21,26	21,1	21,15	0,10	0,45
	10 <sup>-2</sup>	24,54	24,65	24,5	24,56	0,08	0,32
	10 <sup>-3</sup>	28,9	28,01	28,25	28,39	0,46	1,62
	10 <sup>-4</sup>	31,7	31,29	31,89	31,63	0,31	0,97
	10 <sup>-5</sup>	35,21	34,52	35,41	35,05	0,47	1,33
	10 <sup>-6</sup>	36,54	-	37,42	36,98	0,62	1,68
<i>sed</i>	10 <sup>0</sup>	15,24	15,19	14,69	15,04	0,30	2,02
	10 <sup>-1</sup>	18,01	18,02	17,94	17,99	0,04	0,24
	10 <sup>-2</sup>	21,4	21,25	21,22	21,29	0,10	0,45
	10 <sup>-3</sup>	24,62	24,36	24,46	24,48	0,13	0,54
	10 <sup>-4</sup>	28,09	27,74	27,5	27,78	0,30	1,07
	10 <sup>-5</sup>	31,54	31,14	31,16	31,28	0,23	0,72
	10 <sup>-6</sup>	34,92	35,02	34,75	34,90	0,14	0,39
<i>see</i>	10 <sup>0</sup>	15,96	15,87	15,75	15,86	0,11	0,66
	10 <sup>-1</sup>	20,68	19,24	19,14	19,69	0,86	4,38
	10 <sup>-2</sup>	22,41	22,16	22,69	22,42	0,27	1,18
	10 <sup>-3</sup>	25,78	25,43	26,54	25,92	0,57	2,19
	10 <sup>-4</sup>	28,99	28,95	29,41	29,12	0,25	0,88
	10 <sup>-5</sup>	32,47	32,37	32,68	32,51	0,16	0,49
	10 <sup>-6</sup>	35,97	35,95	36,92	36,28	0,55	1,53

## 10. ŽIVOTOPIS S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

Ivana Ljevaković-Musladin rođena je 30. kolovoza 1975. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu i IV. Gimnaziju. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu je upisala 1994. godine, gdje je 1999. godine diplomirala kemiju. Specijalistički poslijediplomski studij na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu upisala je 2001. godine, a magistrirala je 2004. godine te stekla zvanje magistar analitike i mikrobiologije namirnica. Poslijediplomski doktorski studij na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu upisala je 2014./2015. godine.

Od listopada 2000. godine volontirala je u Higijensko-analitičkom laboratoriju Zavoda za javno zdravstvo Dubrovačko-neretvanske županije, gdje je stalno zaposlena od ožujka 2001. godine. U periodu od 2002. do 2003. godine bila je na stručnom usavršavanju u Odsjeku za mikrobiologiju hrane Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo. Na mjesto Voditelja Odjela za hranu u Službi za zdravstvenu ekologiju Zavoda za javno zdravstvo Dubrovačko-neretvanske županije imenovana je 2008. godine, kada je istovremeno imenovana i Voditeljem za kvalitetu prema sustavu upravljanja kvalitetom za ispitne laboratorije HRN EN ISO/IEC 17025.

U periodu 2003./2004., 2005./2006. te 2010./2011. godine radila je kao vanjski stručni suradnik Medicinske škole Dubrovnik, gdje je predavala stručni predmet Higijena i tehnologija namirnica u sklopu obrazovnog programa sanitarnog tehničara. Od 2004. godine do danas je edukator i član ispitne komisije u sklopu programa zdravstvenog odgoja za osobe koje rukuju hranom, tzv. „Higijenskog minimuma“.

U svojih 21 godinu radnog staža sudjelovala je na preko 70 različitih edukacija, seminara, kongresa, konferencija i radionica. U ožujku 2019. godine kao predstavnik Republike Hrvatske sudjelovala je u radionici „Better Training for Safer Food Course on Antimicrobial Resistance ‘One Health’ approach“ Initiative of the European Union u Madridu.

Dugogodišnji je član Hrvatskog mikrobiološkog društva i Hrvatskog mjeriteljskog društva, a od 2021. godine i član Tehničkoga odbora za mjerenja u ispitivanjima, inspekciji i certifikaciji Međunarodne mjeriteljske konfederacije (IMEKO TC11). Od 2021. godine je predavač Hrvatskog mjeriteljskog društva, u čijoj je organizaciji održala seminare pod naslovom „Verifikacija mikrobioloških metoda u lancu hrane“ i „Mjerna nesigurnost mikrobioloških metoda u lancu hrane“.

## POPIS OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA:

LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN, I., M. VODNICA-MARTUCCI, M. KRILANOVIĆ, L. KOZAČINSKI (2022): Occurrence, enterotoxin production and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from domestic cheeses in the Dubrovnik area. *Vet. Stn.* 53, 141-153. <https://doi.org/10.46419/vs.53.2.3>.

LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN, I. (2021): Točnost i preciznost ispitivanja kao zahtjev za osposobljenost analitičara. Zbornik radova 8. savjetovanje "Iskustva laboratorija u primjeni HRN EN ISO/IEC 17025", Crikvenica, Hrvatska, 16.-18. lipnja 2021., digitalno izdanje.

LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN, I. (2020): Measurement Uncertainty According to ISO 19036:2019. Proceedings of the 17th IMEKO TC 10 and EUROLAB Virtual Conference: "Global Trends in Testing, Diagnostics & Inspection for 2030", Hrvatska, 20.-22. listopada 2020., str. 302-308.

LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN, I., M. LAKIĆ, L. KOZAČINSKI (2019): Microbiological Quality Assessment of Ready-to-eat Vegetables in Dubrovnik-Neretva County, Croatia. *Univers. J. Agric. Res.* 7, 1-6. <https://doi.org/10.13189/ujar.2019.070101>.

LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN, I., M. LAKIĆ (2018): Tourism and food safety from perspective of the city of Dubrovnik: a five-year field study. Zbornik radova 2nd International Congress on Food Safety and Quality, Opatija, Hrvatska, 13.-16. studeni 2018., objavljeno u: *Arh Hig Rada Toksikol* 2018; 69 (Suppl. 1), str. 34-34.

JADRUŠIĆ, M., D. GRILEC, I. LJEVAKOVIĆ- MUSLADIN, I. MATIJAŠEVIĆ, M. LAKIĆ (2018): Microbiological assessment of ice from ice making machines in Dubrovnik area. Zbornik radova 2nd International Congress on Food Safety and Quality, Opatija, Hrvatska, 13.-16. studeni 2018., objavljeno u: *Arh Hig Rada Toksikol* 2018; 69 (Suppl. 1), str. 42-42.

LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN, I. (2018): Procjena mjerne nesigurnosti u mikrobiologiji hrane. Zbornik radova 7. Savjetovanje "Iskustva laboratorija u primjeni HRN EN ISO/IEC 17025". Crikvenica, Hrvatska, 14.-16. lipnja 2018., str. 1-7.

LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN, I. (2018): Verifikacija metoda u mikrobiologiji hrane - iskustva akreditiranog laboratorija. Zbornik radova 7. Savjetovanje "Iskustva laboratorija u primjeni HRN EN ISO/IEC 17025". Crikvenica, Hrvatska, 14.-16. lipnja 2018., str. 1-6.

LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN, I., M. LAKIĆ (2017): Microbiological Assessment of „ready-to-eat“ Vegetables in Dubrovnik-Neretva County. Zbornik radova 1st International Congress on Food Safety and Quality, Opatija, Hrvatska, 21.-24. studeni 2017., objavljeno u: Arh Hig Rada Toksikol 2017; 68 (Suppl. 1), str. 26-26.

LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN, I., M. LAKIĆ, S. LEVAK, L. KOZAČINSKI (2016): Microbiological quality of domestic cheese in Dubrovnik Croatia region, Zbornik prednášok a posterov Hygiene alimentorum XXXVII. Bezpečnosť a kvalita mliečnych a rastlinných komodít. Štrbske Pleso, Slovačka, 18.-20. svibanj 2016., Pp 228-233.

LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN, I., M. LAKIĆ, S. LEVAK (2016): Microbiological Quality of Food in Dubrovnik- Neretva County between 2011 and 2015. Zbornik radova 6th Croatian Congress of Microbiology with International Participation, Sveti Martin na Muri, Hrvatska, 15.-18. lipanj 2016., str. 42-42.

LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN, I., M. LAKIĆ, S. LEVAK (2016): Food Handlers' Hand Hygiene in Dubrovnik Area between 2011 and 2015. Zbornik radova 6th Croatian Congress of Microbiology with International Participation, Sveti Martin na Muri, Hrvatska, 15.-18. lipanj, 2016., str. 86-86.

ALAGIĆ, D., M. SMAJLOVIĆ, E. ČLANJAK, K. ČAKLOVICA, A. SMAJLOVIĆ, Z. MAKSIMOVIĆ, M. RIFATBEGOVIĆ, S. TANKOVIĆ, E. VELJOVIĆ, I. LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN (2016): Učestalost onečišćenja mesa brojlera s bakterijama roda *Campylobacter*. Meso XVIII, 4, 335-341.

LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN, I., M. LAKIĆ, A. DŽONO BOBAN (2014): Mikrobiološka ispravnost domaćih sireva s dubrovačkih tržnica. Zbornik radova 3. hrvatski kongres preventivne medicine i unapređenja zdravlja: "Hrana i prehrana", Vinkovci, Hrvatska, 09.-12. listopad 2014., Hrvatski časopis za javno zdravstvo, str. 1-1.

BENUSSI-SKUKAN, A., B. BOŽOVIĆ, D. BRLEK-GORSKI, L. BUJAS, B. UNIĆ-KLARIN, M. DEVČIĆ, LJ. JARČOV, B. FURJANIĆ, S. HRASTOVČAK, V. HRASTAR-KOSTEŠIĆ, A. HUMSKI, A. PREMZL, T. IHAROŠ, B. KOLAROVIĆ, A. KONČURAT, L. KOZAČINSKI, N. PINTIĆ, I. LJEVAKOVIĆ-MUSLADIN, A. PALIJAN, B. HOMAN-KRTIĆ, S. PAVIĆ, D. LAŠTRE, B. PRUŽINEC-POPOVIĆ, I. SARŠON-ŽARKOVAC, B. PUCAR, J. OŠTRIĆ-KAČAR, A. ŠUŠKOVIĆ, S. UHITIL, S. ZAGORŠČAK, V. MIHALJEVIĆ-HERMAN, N. ZDOLEC, A. DUNAJ (2004): Mikrobna kontaminacija svježeg



povrća. Zbornik radova Treći hrvatski mikrobiološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Poreč, Hrvatska, 04.-07. listopad 2004., str. 26-27.