

Izabela Steinka

Akademia Morska w Gdyni

SZYBKA METODA IDENTYFIKACJI ANTYBIOTYKOOPORNYCH BAKTERII RODZAJU *STAPHYLOCOCCUS SPP.* W SERACH TWAROGOWYCH

*Celem pracy było wyznaczenie stopnia zanieczyszczenia twarogów mikroorganizmami metycylinoopornymi za pomocą szybkiej metody oznaczania. Analizie mikrobiologicznej poddano 27 asortymentów kwasowych serów twarogowych. Z badanych twarogów izolowano metycylinooporne koagulazododatnie i koagulazoujemne bakterie rodzaju *Staphylococcus spp.* Ich łączna liczba przekraczała $3 \log_{10}$ jtk/g w ponad 2% badanych twarogów. Stwierdzono zależność między zawartością tłuszczu a obecnością metycylinoopornych gronkowców w tych produktach. Rodzaj i hermetryka opakowań twarogów wykazywały wpływ na liczbę metycylinoopornych, koagulazoujemnych i koagulazododatnich bakterii rodzaju *Staphylococcus spp.**

Słowa kluczowe: gronkowce, metycylinooporność, szybka metoda.

WSTĘP

Jakość kwasowych serów twarogowych jest ściśle uzależniona od rodzaju i liczby mikroorganizmów obecnych w surowcach i podczas procesu wytwarzania. Nie bez wpływu pozostaje wybór technologii wytwarzania, higiena produkcji oraz system pakowania [8, 9, 10, 11]. Rodzaj mikroflory obecnej w twarogach zależy ściśle od jakości surowca pozyskiwanego do ich produkcji. Wśród mikroorganizmów na szczególną uwagę zasługują gronkowce, których źródłem może być zarówno surowiec, jak i personel uczestniczący w procesie wytwarzania. Istotne znaczenie w kształtowaniu jakości higienicznej twarogów wykazują gronkowce antybiotykooporne. Ich obecność w różnych rodzajach surowca mlecznego znajduje swoje odzwierciedlenie w literaturze przedmiotu [1, 2, 7, 15]. Specyficzne właściwości toksyn wytwarzanych przez *Staphylococcus aureus* w połączeniu z ich antybiotykoopornością oraz brak znacznej wrażliwości na temperaturę chłodniczą powodują, że należy podjąć badania dotyczące oceny wielkości ich populacji w fermentowanych przetworach mlecznych, a szczególnie w twarogach.

Celem niniejszej pracy była ocena stopnia zanieczyszczenia twarogów gronkowcami metycylinoopornymi, a także próba oceny przydatności szybkiej metody identyfikacji tych bakterii.

1. METODY I MATERIAŁ BADAWCZY

Materiał badany stanowiły kwasowe sery twarogowe pochodzące z różnych sieci handlowych. Analizie mikrobiologicznej poddano 27 asortymentów twarogów o zróżnicowanej zawartości tłuszczu od 0,3 do 13%.

Tabela 1. Zawartość tłuszczu w twarogach

Table 1. Fat content in cottage cheese

Zawartość tłuszczu [g/100 g]	Odsetek próbek [%]
0–0,5	10,5
4–5	57,9
8–13	31,6

Próbki do badań pobierano i rozcieńczano zgodnie z normą EN ISO 6887-1:1999. Produkty przechowywane były w zróżnicowanych warunkach temperatury od 4 do 8°C. Liczbę MRSA (w modyfikacji Steinka 2015), oznaczono na pożywce chromogennej do izolacji i szybkiej identyfikacji *Staphylococcus* opornych na metycylinę firmy Biotech Grosso.

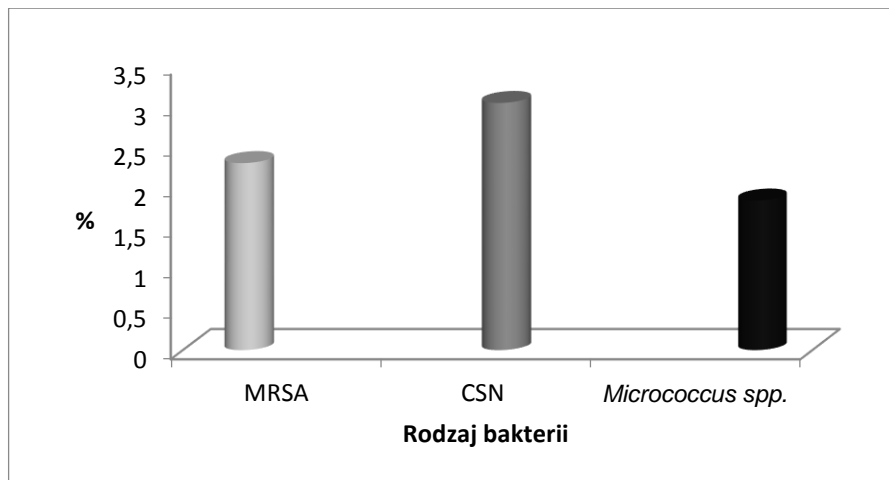
Na płytki z podłożem chromogennym wprowadzano po 1 ml kolejnych rozcieńczeń próbek twarogów, a następnie kolistymi ruchami rozprowadzano starannie badany materiał po powierzchni. Inkubację prowadzono przez 48 h w temperaturze 37°C. Kolonie o barwie różowej kwalifikowano jako *Staphylococcus aureus* metycylinooporne, niebieskie jako metycylinooporne *Staphylococcus spp.*, białe jako *Micrococcus spp.*, izolowane kolonie testowano za pomocą testów na antybiotykooporność.

Badane twarogi przechowywane były w pięciu rodzajach opakowań:

- zewnętrzna torebka PA/PE + pergamin owijający twarogi – 5,3%;
- twarogi owinięte pergaminem – 13,1%;
- polistyrenowy pojemnik + zgrzewane wieczko z PA/PE – 15,8%;
- tacka z twarogiem owijana folią PE – 2,6%;
- torebki wykonane z PA/PE – 63,2%.

2. WYNIKI BADAŃ

Badania twarogów wykazywały obecność *Staphylococcus aureus* metycylinoopornych (MRSA), koagulazoujemnych opornych na metycylinę (CNSMR) oraz niewrażliwych na ten antybiotyk bakterii rodzaju *Micrococcus spp.* Liczba gronkowców MRSA w twarogach wahała się od 1,0 do 2,3 log₁₀ jtk/g. Liczba 1,84 log₁₀ jtk/g *Micrococcus spp.* wzrastających na podłożu z metycyliną określała maksymalny poziom tych bakterii w twarogach. Maksymalna wielkość populacji CNSMR, obserwowana w badanych produktach, przekraczała dziesięciokrotnie poziom obserwowany dla *Staphylococcus aureus* MRSA (rys. 1).

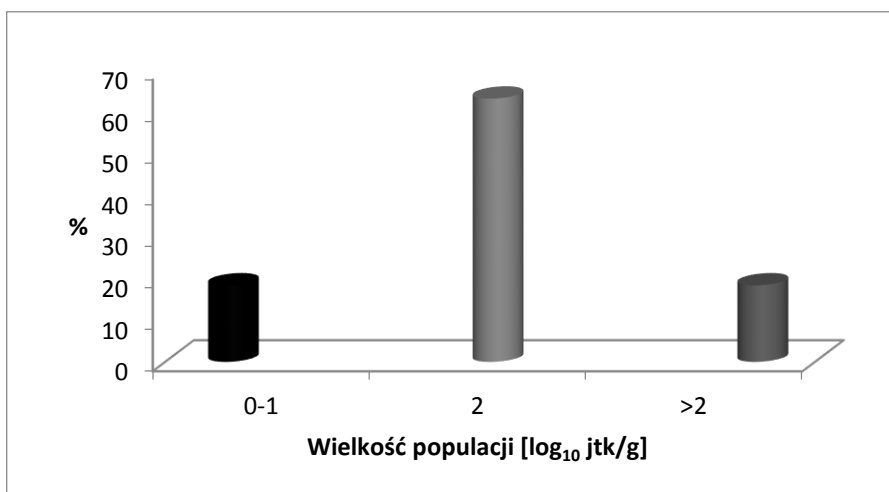


Rys. 1. Maksymalna liczba bakterii metycylinoopornych w twarogach

Rys. 1. *Maximum Methicillin – resistant bacteria population size in cottage cheese*

Z 18,4% badanych próbek produktów wyizolowano średnio ponad 2 log jtk/g gronkowców koagulazododatnich MRSA (rys. 2). Ich obecność stwierdzono zwłaszcza w twarogach hermetycznie pakowanych w PA/PE. 63,2% próbek wykazywało zanieczyszczenie na poziomie od 10 do 100 komórek gronkowców metycylinoopornych w gramie produktów.

85,7% próbek twarogów zawierających nieznaczną (< 10 komórek) liczbę MRSA pochodziło z twarogów pakowanych hermetycznie, a tylko 14,3% z produktów owijanych pergaminem.



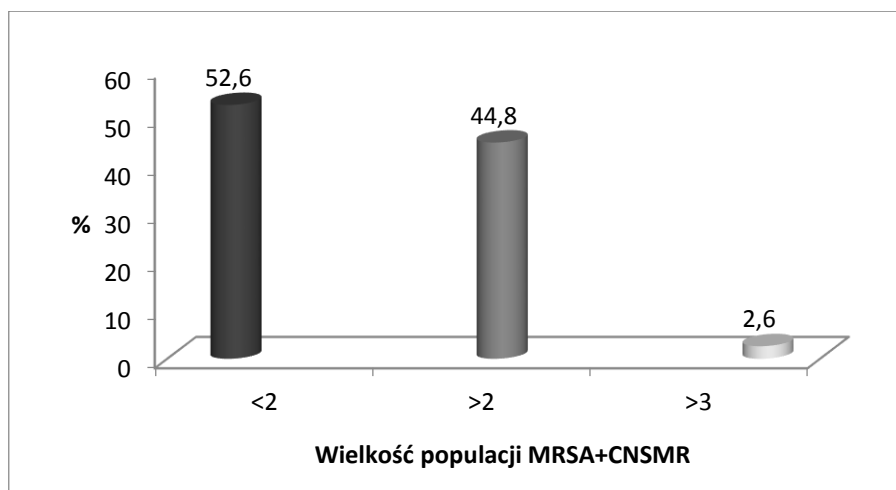
Rys. 2. Odsetek twarogów wykazujących obecność MRSA

Fig. 2. *Percentage of cottage cheese showing MRSA*

Spośród badanych twarogów najwyższą liczbą *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę (MRSA) charakteryzowały się twarogi wytwarzane z mleka koziego.

W twarogach stwierdzono także obecność koagulazujemnych *Staphylococcus spp.* (CNSMR). Średnia liczba tych bakterii wahała się od 1,0 do 3,04 \log_{10} jtk/g.

Suma liczby *S. aureus* metycylinoopornych i CNS niewrażliwych na metycylinę w 1 gramie w badanych twarogach była zróżnicowana, natomiast sumaryczna wielkość populacji złożonej z obu gatunków opornych na metycylinę w ponad 2% twarogów przekraczała 3 \log_{10} jtk/g (rys. 3).

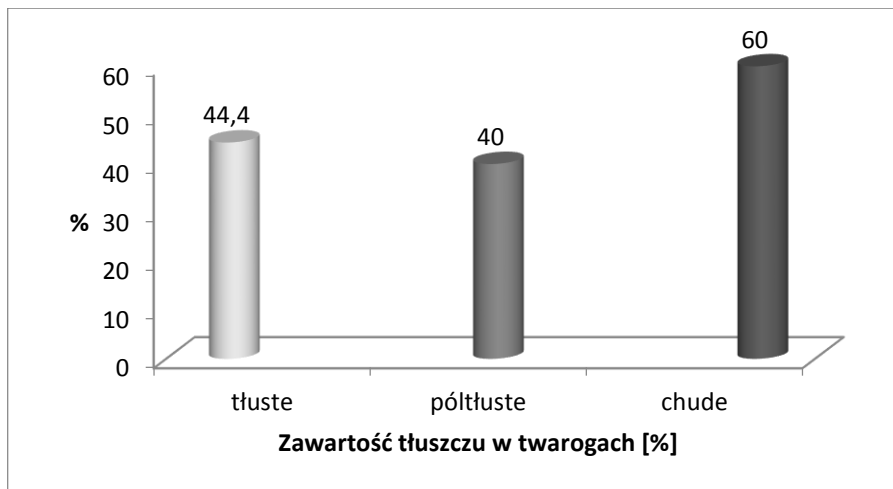


Rys. 3. Liczba opornych na metycylinę gronkowców koagulazododatnich i koagulazujemnych w twarogach

Fig. 3. Number of Methicillin-resistant staphylococci MRSA and CNSMR in cottage cheese

Stwierdzono, że odsetek produktów, w których łączna liczba antybiotykoopornych koagulazododatnich i koagulazujemnych gronkowców przekraczała 2 \log_{10} jtk/g, wynosił aż 44,8% (rys. 3). Największą liczbę próbek przekraczających 100 komórek w gramie produktów stwierdzano w twarogach chudych (rys. 4). Ponad 2% próbek badanych twarogów wykazywało ponad 3 \log_{10} jtk/g opornych gronkowców należących do różnych gatunków gronkowców.

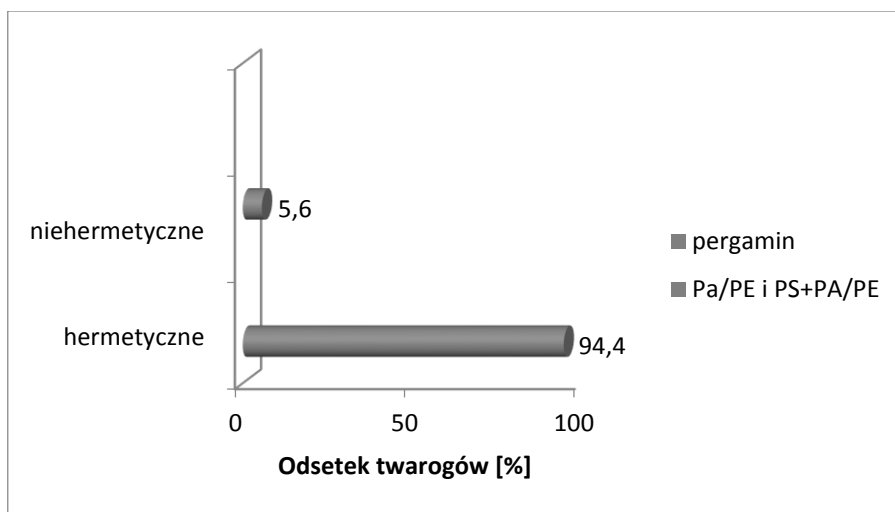
Twarogi pakowane w pergamin wykazywały niższą liczbę MRSA i CNS metycylinoopornych w porównaniu z twarogami pakowanymi hermetycznie w opakowania z tworzyw sztucznych. Liczba *S. aureus* i *Staphylococcus spp.* w produktach owijanych pergaminem nie przekroczyła 70 komórek w 1 g.



Rys. 4. Odsetek próbek wykazujących obecność MRSA i CNSMR w zależności od zawartości tłuszczu w twarogach

Fig. 4. Percentage of samples showing MRSA and CNSMR depending on the fat content

W połowie badanych produktów stwierdzono, że populacja metycylinoopornych koagulazujemnych i koagulazododatnich gronkowców wahała się od 2–3 log jtk/g. Obserwowano wysoką liczbę metycylinoopornych gronkowców koagulazujemnych i koagulazododatnich w twarogach pakowanych hermetycznie (rys. 5).



Rys. 5. Wpływ hermetryki opakowania na odsetek twarogów zawierających metycylinooporne gronkowce

Fig. 5. Influence of package hermetic on the percentage of samples with Methicillin-resistant staphylococci

Dane literaturowe świadczą o znacznym zainteresowaniu antybiotykoopornością gronkowców izolowanych z mleka i produktów mlecznych [5]. Natomiast niewiele jest badań dotyczących obecności MRSA w fermentowanych przetworach mlecznych [13]. Z informacji dostępnych w literaturze przedmiotu wynika, że np. jogurty analizowane w kierunku obecności metycylinoopornych *S. aureus*. (MRSA) nie stanowią dobrego podłoża do rozwoju gronkowców.

Badania wykazały, że surowiec do produkcji przetworów mlecznych może być istotnym źródłem MRSA [15]. Niektóre badania potwierdzały obecność nawet 15,9% próbek mleka surowego, wykazujących obecność opornych na metycylinę *S. aureus*. Przyczyną takiego stanu higienicznego analizowanego surowca może być brak karencji po leczeniu stanów *mastitis* u zwierząt mlecznych, powodujący w następstwie przeżywalność tych bakterii w twarogach. Autorzy innych badań komunikowali wysoką częstotliwość izolowania gronkowców opornych na różne antybiotyki z mleka surowego i lodów [5].

W literaturze przedmiotowej jest niewiele informacji na temat obecności MRSA w kwasowych serach twarogowych. Dane z lat 2003–2007 świadczą o niewielkim udziale mleka i serów jako źródła MRSA, sugerując jednocześnie, że próbki wykazujące obecność metycylinoopornych gronkowców stanowiły zaledwie 1 procent spośród badanej żywności [4, 6].

Zaprezentowane wyniki niniejszych badań świadczą o tym, że w twarogach występują zarówno koagulazododatnie, jak i koagulazoujemne bakterie rodzaju *Staphylococcus spp.* Jest to istotne ze względu na to, że sumaryczna liczebność populacji bakterii, należących do rodzaju *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus spp.*, jest znacznie wyższa, co może być powodem nie tyle zatruć pokarmowych z uwagi na toksyny, które są syntetyzowane przy odpowiedniej wielkości populacji gronkowców koagulazododatnich, ile na obecność w produktach także innych metabolitów i enzymów niebezpiecznych dla zdrowia konsumentów. W badanych twarogach można również stwierdzić obecność niewielkiej liczby *Micrococcus spp.* wykazujących oporność na metycylinę. Obecność tych ostatnich powiększa populację bakterii antybiotykoopornych w badanych produktach.

Istotnym efektem niniejszych badań jest też zwrócenie uwagi na wysoki stopień przeżywalności MRSA i *Staphylococcus spp.* metycylinoopornych w twarogach produkowanych z mleka koziego. Możliwość obecności genu *Mec A* w komórkach *S. aureus* obecnych w mleku kozim była cytowana przez kilka źródeł literaturowych [7, 12, 14]. Niektórzy badacze identyfikowali MRSA aż w 2% próbek pobieranych z surowego mleka koziego [2]. Z dostępnych badań wynikało też, że 4,1–18% opornych na antybiotyki gronkowców stanowi *S. aureus*, a 44,7–95,9% są to bakterie należące do gatunków gronkowców koagulazoujemnych – CNSMR [14].

Dane prezentowane przez niektórych autorów wskazywały, że szczepy izolowane z mleka określane jako MDR (*Multidrug Resistance*) obejmowały oprócz *Staphylococcus aureus* także *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus epidermidis* [12]. Badania te potwierdziły też że wśród testowanych wobec tych bakterii antybiotyków, nieskuteczne w swojej aktywności biostatycznej okazywały się m.in. oksacylina i cefoksym [12].

Podczas prowadzonej analizy surowca do produkcji przetworów mlecznych uzyskano wyniki wskazujące, że próbki mleka koziego mogą wykazywać poza wymienianymi wyżej gronkowcami także obecność koagulazoujemnych *Staphylococcus fleurettii*, *Staphylococcus haemolyticus* i *Staphylococcus xylosus*, będących nośnikami genu odpowiedzialnego za oporność na metycylinę [3].

Niniejsze badania pozwoliły na potwierdzenie braku wrażliwości gronkowców na temperaturę chłodniczą, a także na ocenę wpływu rodzaju opakowań oraz zawartości tłuszczu na poziom metycylinoopornych gronkowców w twarogach.

WNIOSKI

1. Kwasowe sery twarogowe wykazują obecność metycylinoopornych koagulazododatnich *Staphylococcus aureus* i koagulazoujemnych bakterii rodzaju *Staphylococcus spp.*
2. Potwierdzono przydatność stosowanego podłoża chromogenne do szybkiej identyfikacji metycylinoopornych gronkowców w badaniach twarogów.
3. W badanych produktach sumaryczna liczba populacji obu rodzajów gronkowców przekraczała 3 log₁₀ jtk/g w ponad 2% badanych twarogów.
4. Stwierdzono znacząco większy odsetek próbek o niskiej zawartości tłuszczu, charakteryzujących się obecnością metycylinoopornych gronkowców *S. aureus* (MRSA) w porównaniu z próbkami pochodzącymi z twarogów tłustych i półtłustych.
5. Wyniki badań wskazywały na wpływ rodzaju i hermetyki opakowań twarogów na poziom metycylinoopornych, koagulazoujemnych i koagulazododatnich bakterii rodzaju *Staphylococcus spp.*, pozostających w produktach po okresie długotrwałego ich przechowywania.
6. Obecność tych drobnoustrojów w twarogach budzi zaniepokojenie, dlatego istnieje potrzeba prowadzenia dalszych badań w kierunku oceny zachowania metycylinoopornych gronkowców w tych produktach.

LITERATURA

1. Abo-Shama U.H., *Prevalence and antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus from cattle, buffalo, and goats raws milk in sohag goveronorate*, Egypt, Assiut Vet. Med. J, 2014, 60, 141, p. 63–72.
2. Cortimiglia C., Bianchini V., Franco A., Caprioli A., Battisti A. et al., *Prevelence of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus in bulk tank milk from dairy goat farms in Northern Italy*, J. Dairy Sci., 2015, No. 98(4), p. 2307–2311.
3. Frey Y., Rodriguez J.P., Thomann A., *Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk*, J. Dairy Sci., 2013, No. 96, p. 1–11.
4. Lee J.H., *Methicillin (oxacillin)-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans*, Appl. Environ. Microbiol., 2003, No. 69, p. 6489–6494.

5. Mirzeai H., Farhoudi H., Tavassoli H., Farali M., Monadi A., *Presence and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Raw and pasteurized milk and ice cream in Tabriz by culture and PCR techniques*, African J. Microbiol. Res., 2012, No. 6(32), p. 6224–6229.
6. Normanno G., Corrente M., La Salandra G. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in food animal origin produced in Italy*, Int. J. Food Microbiol., 2007, No. 117(2), p. 219–222.
7. Stastkova Z., Karpiskova S., Karpisova R., *Occurrence of methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus at a goat breeding farm*, Vet. Med., 2009, No. 54(9), p. 419–426.
8. Steinka I., *The influence of interactions occurring between micro-organisms on predicting the safety of lactic acid cheese*, Focus on Food Engineering Research and Developments, Nova Science Publishers, Inc, 2007, p. 165–237.
9. Steinka I., Blokus-Roszkowska A., *Application of tertiary mathematical models for evaluating the presence of staphylococcal in lactic acid cheese*, Safety, Reliability and Risk Analysis, Theory Methods and Applications, Vol. 3, CRC Press Taylor&Francis Group, London-New York 2009, p. 2269–2273.
10. Steinka I., Kukułowicz A., *Zmiany jakości serów twarogowych dostępnych w sieciach handlowych w okresie ostatnich kilkunastu lat*, „Przegląd Mleczarski”, 2011, nr 11, s. 14–18.
11. Steinka I., Parisi S., *The influence of cottage cheese manufacturing technology and packing method on the behaviour of micro-flora*, Joint Proceedings, Gdynia-Bremenhaven, 2006, No. 19, p. 30–37.
12. Suwito W., Nugroho W.S., Wahyuni A.E., Sumiarto Y.V., Pramuditya Y.V. et al., *Determination of mecA gene in Staphylococcus spp., isolate subclinical mastitis ettawa crossbred goat milk in Sleman Regency*, Animal Prod. 2014, No. 16(2), p. 133–139.
13. Umaru G.A., Kabir J., Umoh V.J., Bello M., Kwaga J.P., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in fresh and fermented milk in Zaria and Kaduna, Nigeria*, 2013, Int. J. Drug Res., No. 3(3), p. 67–75.
14. Viridis S., Scarano C., Cossu F., Spanu V., Spanu C. et al., *Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus and coagulase negative staphylococci isolated from goats with subclinical mastitis*, Veterinary Med. Int., 2010, p. 1–6.
15. Zauharova M., Rysanek D., *Multiplex PCR and RPLA Identification of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains from bulk tank milk*, Zoonoses and Public Health, 2008, No. 55, p. 313–319.

FAST METHOD OF IDENTIFYING METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCI IN COTTAGE CHEESE

Summary

The aim of the study was the determination of the degree of contamination cottage cheese with methicillin-resistant microorganisms belonged to staphylococci genera by the quick methods. Microbiological analysis were 27 selections of the cottage cheese. Methicillin-resistant coagulase positive and coagulase negative *Staphylococcus* spp. were isolated from cheese. Their total number exceeded $3 \log_{10}$ cfu / g in more than 2% lactic acid cheese. It was the relationship between fat content and the presence of methicillin-resistant staphylococci in these products. Hermetic packaging cottage cheese showed an impact on the number of methicillin-resistant, coagulase and coagulase positive staphylococci.

Keywords: *Staphylococci, methicillin-resistant, fast method.*