



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU

Milijana Babić, DVM

**ISPITIVANJE EKSPRESIJE GENA ZA SINTEZU
STAFILOKOKNOG ENTEROTOKSINA A I TSST-1 KOD *S.*
AUREUS U MLEKU**

doktorska disertacija

Novi Sad, 2018.



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU

**ISPITIVANJE EKSPRESIJE GENA ZA SINTEZU
STAFILOKOKNOG ENTERETOKSINA A I TOKSINA
TSST-1 KOD *S. AUREUS* U MLEKU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:
Dr Marija Pajić, docent
Dr Branko Velebit, viši naučni saradnik

Kandidat:
Milijana Babić, dr vet.

Novi Sad, 2018. godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Milijana Babić, dr vet.
Mentori: MN	Dr Marija Pajić, docent Dr Branko Velebit, viši naučni saradnik
Naslov rada: NR	Ispitivanje ekspresije gena za sintezu stafilokoknog enterotoksina A i toksina TSST-1 kod <i>S. aureus</i> u mleku
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Autonomna Pokrajina Vojvodina
Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8.
Fizički opis rada: FO	8 poglavlja / 97 strana / 17 slika / 8 tabela / 10 grafikona / 146 referenci / 1 prilog
Naučna oblast: NO	Veterinarska medicina
Naučna disciplina: ND	Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Mleko, <i>S. aureus</i> , ekspresija <i>sea</i> gena, ekspresija <i>tst</i> gena, sinteza enterotoksina A

UDK	636.09:637.1:575(043.3)
Čuva se: ČU	U biblioteci Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu 21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obadovića 8
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p><i>S. aureus</i> je ubikvitaran mikroorganizam, široko rasprostranjen u životnoj sredini. Glavni je uzročnik mastitisa kod mlečnih krava, pa tako uzrokuje velike zdravstvene i ekonomske probleme. Može biti prisutan u mleku i proizvodima od mleka koji se termički ne obrađuju, ali i u termički obrađenim proizvodima naknadnom kontaminacijom od strane čoveka. Bitna karakteristika ovog mikroorganizma je sposobnost stvaranja ekstracelularnih enzima i toksina koji predstavljaju glavni uzrok trovanja hranom. Da bi se sintetisala dovoljna količina enterotoksina koja može izazvati intoksikacije kod ljudi, potrebno je da u hrani bude prisutno više od 10^5 CFU <i>S. aureus</i>/mL.</p> <p><i>S. aureus</i> sintetiše više vrsta toksina koji izazivaju različite efekte na ćelije čoveka i drugih sisara. Sinteza toksina zavisi od aktivnosti gena za regulaciju ekspresije stafilokoknih enterotoksina (SEs) i TSST-1. Postoji više faktora koji sprečavaju ili stimulišu sintezu enterotoksina kao što su: temperatura, pH, aw, kiseonik, redoks potencijal i dr. Enterotoksini se sintetišu pri temperaturama od 10°C do 46°C, pri pH od 5 do 9,6, aktivnosti vode od 0,86 do 0,99 i koncentraciji NaCl do 12%.</p> <p>Nalaz enterotoksogenih stafilokoka u hrani ne znači da će doći do trovanja, jer uslovi matriksa hrane i sredine određuju preživljavanje, rast populacije stafilokoka i stvaranje dovoljne količine enterotoksina koja može izazvati oboljenje kod ljudi.</p> <p>Cilj ovog istraživanja bio je da se ispita uticaj različitih temperatura, vremena čuvanja i matriksa na stepen ekspresije gena za sintezu enterotoksina A i toksina TSST-1, kako bi se došlo do novih saznanja o uticaju paragenetskih faktora na rizik nastanka stafilokokne alimentarne intoksikacije.</p> <p>Materijal za eksperimentalnu inokulaciju predstavljalo je kratkotrajno sterilizovano (UHT) i pasterizovano kravlje mleko sa 3,2% mlečne masti i referentni sojevi <i>S. aureus</i> koji sintetišu stafilokokni enterotoksin A i toksin 1 toksičnog šok sindroma. Eksperimentalni rad odvijao se u dve faze. U prvoj fazi eksperimenta, hrana animalnog porekla (pasterizovano i UHT mleko) koja simulira najčešće izvore toksoinfekcije <i>S. aureus</i> kontaminirana je određenom količinom prekonoćne bujonske suspenzije referentnog soja <i>S. aureus</i>, u kojoj je prethodno utvrđen inicijalni broj. Uzorci su čuvani pri temperaturama od 15°C i 22°C tokom 24, 48 i 72 časa, simulirajući neadekvatne uslove koji nastaju akcidentalnim narušavanjem hladnog lanca. Nakon 24, 48, odnosno 72 časa kontaminirano mleko inokulisano je na <i>Baird-Parker</i> agar (SRPS ISO 6888-1:2009), a nakon inkubacije podloga utvrđen je broj izraslih kolonija <i>S. aureus</i> i upoređen sa inicijalnim brojem. Paralelno sa inokulacijom ove podloge, uzeta je određena količina mleka koja je potom tretirana tečnim azotom da bi se konzervisala iRNK tj. da bi se „zamrznuo“ ekspresioni genetski profil <i>S. aureus</i>. Iz zamrznutih uzoraka ekstrahovana je ukupna RNK, koja je potom metodom reverzne transkripcije - <i>Real Time PCR</i> prevedena u odgovarajuću cDNK svakog od ispitivanih gena. Da bi se ispitala korelacija između ekspresije gena za sintezu stafilokoknog enterotoksina i njegove količine u uzorcima, a na taj način isključila i eventualna posttranslaciona promena u sintezi, stafilokoni enterotoksin A je kvantifikovan pomoću dijalizne koncentracije i ELFA metode.</p> <p>Kao rezultat istraživanja sprovednih u ovoj disertaciji može se uočiti statistički značajna razlika između stepena ekspresije <i>sea</i> gena u pasterizovanom mleku čuvanom pri</p>

temperaturi od 22°C tokom 24 sata u odnosu na kalibrator (*S. aureus* u mleku čuvanom pri 8°C), što se poklapa sa postignutim brojem *S. aureus* od 10⁵ CFU/mL i imunohromatografski detektovanom količinom enterotoksina A. Stepem ekspresije enterotoksina A u pasterizovanom mleku čuvanom pri temperaturi od 15°C tokom 72 sata statistički se značajno razlikuje u odnosu na kalibrator, što se takođe podudara sa detektovanom količinom enterotoksina A. U UHT mleku čuvanom tokom 24 sata pri temperaturi od 22°C, odnosno tokom 48 sati pri temperaturi od 15°C utvrđena je statistički značajna razlika u stepenu ekspresije u odnosu na kalibrator, što se podudara sa detektovanom količinom enterotoksina A i dinamikom promene broja *S. aureus*. Na osnovu ovih podataka možemo zaključiti da intezitet ekspresije *sea* gena odgovara količini fizički „*de novo*“ sintetisanog enterotoksina A. Stepem ekspresije *tst* gena pokazao je statistički značajnu razliku u odnosu na kalibrator u pasterizovanom i UHT mleku nakon 24 sata pri temperaturi od 22°C, i 48 sati pri temperaturi od 15°C, dok je broj *S. aureus* pozitivan na TSST-1 prelazio 10⁵ CFU/mL u pasterizovanom i UHT mleku nakon 24 sata čuvanom pri 15°C, odnosno 22°C.

Obzirom na mali broj literaturnih podataka o uticaju sastava hrane, temperature i vremena čuvanja kao i drugih paragenetskih faktora na regulaciju patogenosti *S. aureus*, dobijeni rezultati mogu predstavljati polaznu osnovu za ispitivanje značaja genetskog profila patogenosti *S. aureus* u hrani na razvoj infekcije kod potrošača.

Datum prihvatanja teme
od strane NN veća:
DP

Datum odbrane:
DO

Članovi komisije:
(ime i prezime / titula /
zvanje / naziv organizacije
/ status)
KO

Predsednik: _____

Dr Stanko Boboš, redovni profesor,
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad;

Mentor: _____

Dr Marija Pajić, docent,
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad;

Mentor: _____

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

Član: _____

Dr Miodrag Radinović, docent,
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad;

Član: _____

Dr Anka Popović Vranješ, redovni profesor,
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph. D. Thesis
Author: AU	Milijana Babić, DVM
Mentor: MN	Marija Pajić, Ph.D. Assistant Professor Branko Velebit, Ph.D. Senior Research Associate
Title: TI	Investigation of expression of staphylococcal enterotoxin A and TSST-1 toxin genes of <i>S. aureus</i> in milk
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2018
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Republic of Serbia, Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8
Physical description: PD	8 chapters / 97 pages / 17 figures / 8 tables / 10 graphs / 146 references / 1 annex
Scientific field SF	Veterinary Medicine
Scientific discipline SD	Animal diseases and hygiene of animal production
Subject, Key words SKW	Milk, <i>S. aureus</i> , expression of <i>sea</i> gene, expression of <i>tst</i> gene, synthesis of enterotoxin A
UDC	636.09:637.1:575(043.3)

Holding data: HD	Library of The Faculty of Agriculture 21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, Serbia
Note: N	None
<p>Abstract: AB</p> <p><i>S. aureus</i> is an ubiquitous microorganism, widely distributed in the environment. It is the main cause of mastitis in dairy cows so it causes major health and economic problems. It can be present in milk and milk products that are not thermally treated, but also in thermally processed products by subsequent contamination by humans. An important feature of this microorganism is the ability to produce extracellular enzymes and toxins that are the major cause of food poisoning. In order to synthesize a sufficient amount of enterotoxin that can induce intoxication in humans, more than 10^5 CFU of <i>S. aureus</i> / mL should be present in the food.</p> <p><i>S. aureus</i> synthesizes several types of toxins that cause different effects on the human cells and cells of other mammals. The synthesis of toxin depends on the activity of the gene regulating the expression of staphylococcal enterotoxins (SEs) and toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1). There are several factors that prevent or stimulate the synthesis of enterotoxins such as temperature, pH, water activity, oxygen, redox potential, etc. Enterotoxins are synthesized at temperatures from 10°C to 46°C, at pH 5 to 9.6, water activities ranging from 0.86 to 0.99 and a concentration of NaCl to 12%.</p> <p>Finding enterotoxigenic staphylococci in food does not mean that there will come to poisoning, because the conditions of the food and environment matrix determine their survival, the growth of the staphylococci population and the creation of a sufficient amount of enterotoxins that can cause disease in humans.</p> <p>The aim of this study was to investigate the influence of different temperatures, storage times and matrix on the degree of gene expression for the synthesis of enterotoxin A and toxin TSST-1 in order to gain new insights about the effect of paragenetic factors on the risk of staphylococcal alimentary intoxication.</p> <p>The material for experimental inoculation was short-time sterilized (UHT) and pasteurized cow milk with 3.2% milk fat and reference strains of <i>S. aureus</i> which synthesizes staphylococcal enterotoxin A and TSST-1. Experimental work took place in two phases. In the first stage of the experiment, pasteurized and UHT milk, which simulates the most common sources of <i>S. aureus</i> toxoinfection, were contaminated by a certain amount of overnight broth suspension of the reference strain <i>S. aureus</i>, in which the initial number was previously determined. Samples were stored at temperatures of 15°C and 22°C for 24, 48 and 72 hours, simulating inadequate conditions resulting from accidental cold chain disturbance. After 24, 48, and 72 hours, contaminated milk was inoculated to Baird-Parker agar (SRPS ISO 6888-1: 2009), and after the incubation of the substrate, the number of grown <i>S. aureus</i> colonies was compared with the initial number that was determined in beginning of the experiment. At the time this substrate was inoculated, certain amount of milk was taken, which was then treated with liquid nitrogen to conserve iRNA, i.e. in order to "freeze" the expression genetic profile of <i>S. aureus</i>. From frozen samples, the total RNA was extracted, which was then converted by the reverse transcription method - <i>Real Time</i> PCR into the corresponding cDNA of each of the examined genes. In order to investigate the correlation between gene expression for the synthesis of staphylococcal enterotoxin and its amount in the samples, and thereby exclude the possible posttranslational change in synthesis, staphylococcal enterotoxin A was quantified by dialysis and ELFA methods.</p>	

As a result of the investigations carried out in this thesis, a significant difference between the degree of expression of the *sea* gene in pasteurized milk stored at 22°C during 24 hours in relation to the calibrator (*S. aureus* in milk stored at 8°C) can be observed, which matches the achieved *S. aureus* number of 10⁵ CFU / mL and an immunochromatographically detectable amount of enterotoxin A. The degree of expression of enterotoxin A in pasteurized milk stored at a temperature of 15°C for 72 hours significantly differs from the results of the calibrator, which also match the detected amount of enterotoxin A. In UHT milk stored for 24 hours at a temperature of 22°C, and for 48 hours at a temperature of 15°C, a significant difference in the degree of expression of *sea* gene relative to the calibrator was found, which matches the detected amount of enterotoxin A and the dynamics of the change in the number of *S. aureus*. Based on these data, it can be concluded that the intensity of expression of the *sea* gene corresponds to the amount of physically "de novo" synthesized enterotoxin A. The degree of expression of the *tst* gene showed a significant difference from the calibrator value in pasteurized and UHT milk after 24 hours at a temperature of 22°C and 48 hours at a temperature of 15°C, while the number of *S. aureus* positive for TSST-1 exceeded 10⁵ CFU / mL in pasteurized and UHT milk after 24 hours stored at 15°C and 22°C.

Given the small number of literature data on the effect of food composition, temperature and storage time, as well as other paragenetic factors on the regulation of *S. aureus* pathogenicity, the obtained results can be the starting point for examining the significance of the genetic profile of *S. aureus* pathogenicity in the development of the infection in consumers.

Accepted on Scientific Board on: AS	
Defended: DE	
Thesis Defence Board: DB	<p>President: _____ Stanko Boboš, Ph.D. Full Professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad;</p> <p>Mentor: _____ Marija Pajić, Ph.D. Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad;</p> <p>Mentor: _____ Branko Velebit, Ph.D. Senior Research Associate Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade;</p> <p>Member: _____ Miodrag Radinović, Ph.D. Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad;</p> <p>Member: _____ Anka Popović-Vranješ Ph.D. Full Professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad;</p>

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. <i>S. aureus</i>	3
2.1.1. Osobine <i>S. aureus</i>	3
2.1.2. Biohemijske osobine <i>S. aureus</i>	6
2.2. Patogenost <i>S. aureus</i>	6
2.3. Ekspresija gena	7
2.4. Faktori koji utiču na rast <i>S. aureus</i> i na sintezu enterotoksina	10
2.5. Toksin 1 toksičnog šok sindroma (TSST-1)	16
2.6. Hrana kao izvor trovanja stafilokoknim enterotoksinima	17
2.7. Prisustvo gena za enterotoksine <i>S. aureus</i> u mleku i proizvodima od mleka	20
2.8. ELFA metoda	24
2.9. Lančana reakcija polimeraze (PCR)	25
2.9.1. Istorija nastanka metode	25
2.9.2. Princip metode PCR	25
2.9.3. Razvoj kvantitativnog PCR-a	30
2.9.4. <i>Real Time</i> PCR	31
2.9.5. Kvantifikacija u <i>Real Time</i> PCR sistemu	39
2.9.6. Reverzna transkripcija – <i>Real Time</i> PCR	41
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA	43
4. MATERIJAL I METODE	44
4.1. Materijal	44
4.1.1. Mikroorganizmi	44
4.1.2. Podloge	44
4.1.3. Reagensi i oprema za dokazivanje enterotoksina	45
4.1.4. Reagensi i oprema za ekstrakciju RNK	46
4.1.5. Reagensi za ispitivanje prisustva gena za sintezu enterotoksina stafilokoka (SEA i TSST-1)	46
4.2. Metode	47
4.2.1. Eksperimentalna procedura	47
4.2.2. Određivanje inicijalnog broja referentnog soja <i>S. aureus</i> koji sintetiše enterotoksin SEA	48

4.2.3. Određivanje inicijalnog broja referentnog soja <i>S. aureus</i> koji sintetiše enterotoksin TSST-1	48
4.2.4. Određivanje broja <i>S. aureus</i> u mleku.....	49
4.2.5. Dokazivanje enterotoksina.....	49
4.2.6. Ekstrakcija RNK	50
4.2.7. Purifikacija RNK na RNEASY kolonama sa DNase digestijom na koloni.....	51
4.2.8. Ispitivanje ekspresije gena za sintezu SEA i TSST-1 kod referentnih sojeva <i>S. aureus</i>	51
4.2.9. Obrada rezultata rada	53
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	54
5.1. Rezultati ispitivanja inicijalnog broja referentnog soja <i>S. aureus</i> koji sintetiše SEA....	54
5.2. Rezultati ispitivanja inicijalnog broja referentnog soja <i>S. aureus</i> koji sintetiše TSST-1.....	55
5.3. Rezultati ispitivanja promene broja <i>S. aureus</i> koji sintetiše SEA u pasterizovanom mleku.....	56
5.4. Rezultati ispitivanja promene broja <i>S. aureus</i> koji sintetiše SEA u UHT mleku	56
5.5. Rezultati ispitivanja promene broja <i>S. aureus</i> koji sintetiše TSST-1 u pasterizovanom mleku.....	57
5.6. Rezultati ispitivanja promene broja <i>S. aureus</i> koji sintetiše TSST-1 u UHT mleku.....	57
5.7. Rezultati ispitivanja sinteze stafilokoknog enterotoksina A u pasterizovanom mleku..	58
5.8. Rezultati ispitivanja sinteze stafilokoknog enterotoksina A u UHT mleku	58
5.9. Rezultati ispitivanja stepena ekspresije gena za sintezu stafilokoknog enterotoksina A <i>S. aureus</i> u pasterizovanom mleku.....	59
5.10. Rezultati ispitivanja stepena ekspresije gena za sintezu stafilokoknog enterotoksina A <i>S. aureus</i> u UHT mleku	59
5.11. Rezultati ispitivanja stepena ekspresije gena za sintezu TSST-1 <i>S. aureus</i> u pasterizovanom mleku	60
5.12. Rezultati ispitivanja stepena ekspresije gena za sintezu TSST-1 <i>S. aureus</i> u UHT mleku.....	60
6. DISKUSIJA	61
7. ZAKLJUČAK	69
8. LITERATURA	71
9. PRILOZI.....	84
10. BIOGRAFSKI PODACI.....	97

1. UVOD

Stafilokoke su mikroorganizmi koji su široko rasprostranjeni u životnoj sredini. Na osnovu sposobnosti da stvaraju enzim koagulazu, razlikujemo koagulaza pozitivne i koagulaza negativne stafilokoke. Glavni predstavnik koagulaza pozitivnih stafilokoka je *S. aureus* subsp. *aureus*. *S. aureus* je ubikvitaran mikroorganizam koji živi na koži ljudi i životinja, a često kolonizuje *ductus papillaris* mlečne žlezde krava i može da prouzrokuje supkliničke mastitise. Kao glavni uzročnik mastitisa kod mlečnih krava, uzrokuje značajne zdravstvene i ekonomske probleme. *S. aureus* može biti prisutan u mleku kao i u proizvodima od mleka koji se termički ne obrađuju, ali i u termički obrađenim proizvodima naknadno kontaminiranim od strane čoveka. Bitna karakteristika ovog mikroorganizma je sposobnost stvaranja ekstracelularnih enzima i toksina koji predstavljaju glavni uzrok trovanja hranom. Konzumiranjem hrane koja sadrži dovoljnu količinu (<1 µg/kg telesne mase) jednog ili više enterotoksina koje sintetiše *S. aureus* kod ljudi nastaju stafilokokna trovanja.

Trovanja izazvana enterotoksinima stafilokoka na drugom su mestu po broju oboljenja izazvanih hranom. Hrana koja se dovodi u vezu sa trovanjima enterotoksinima stafilokoka obično je hrana bogata proteinima u kombinaciji sa neadekvatnom termičkom obradom i načinom čuvanja hrane. Za nastajanje dovoljne količine enterotoksina koja može izazvati intoksikacije kod ljudi, potrebno je da u hrani bude prisutno više od 10^5 cfu *S. aureus*/g.

S. aureus sintetiše više vrsta toksina koji izazivaju različite biološke efekte na ćelije čoveka i drugih sisara. Do danas su opisana 23 različita stafilokokna enterotoksina koji uključuju stafilokokne enterotoksine (SE - staphylococcal enterotoxin) i toksine slične stafilokoknim enterotoksinima (SEI–staphylococcal enterotoxin-like) od SEA do SEIV. Nastaju vrlo brzo tokom umnožavanja bakterija u kontaminiranoj hrani. Količina sintetisanih enterotoksina zavisi od uslova rasta bakterijskih ćelija u matriksu hrane (temperatura, pH, prisustvo ili odsustvo kiseonika). *S. aureus* može da raste pri pH vrednosti u rasponu od 4,5 do 9,0 i koncentraciji NaCl do 9%. Zbog svoje strukture otporni su na toplotu i na crevne

enzime (proteaze). Mogu zadržati biološka svojstva duže od 30 minuta pri temperaturi od 100°C, tako da se prilikom termičke obrade hrane žive ćelije stafilokoka uništavaju, a toksini ostaju neoštećeni.

Najčešće uključeni u trovanja hranom su enterotoksini SEA i SED, pojedinačno ili u kombinaciji. Za enterotoksin A vezano je oko 75% slučajeva trovanja prouzrokovanih stafilokokama. Jedan enterotoksičan soj stafilokoka može da produkuje više različitih tipova enterotoksina. Pojedini sojevi proizvode dodatne egzoproteine koji mogu biti odgovorni za određene kliničke manifestacije. Tu spadaju toksin-1 toksičnog šok sindroma (TSST-1), eksfolijativni toksin i Panton-Valentin leukocidin. Ovi egzoproteini imaju različite efekte na ćelije imunog sistema. Stafilokokni enterotoksini imaju emetički efekat, dok toksin TSST-1 toksičnog šok sindroma ima sposobnost prolaska kroz sluzokožu i dovodi do nastanka artritisa, deluje na vaskularni sistem izazivajući inflamacije, groznice i toksični šok.

S. aureus poseduje gene za regulaciju ekspresije stafilokoknih enterotoksina (SE) i TSST-1. Ovi toksini se sekretuju u postekspencijalnoj fazi rasta stafilokoka. Geni koji kodiraju sintezu TSST-1 i enterotoksina nalaze se na plazmidima, bakteriofagama ili posebnim genskim elementima koji se nazivaju patogena ostrvca. Ekspresiju *tst* gena koji je odgovoran za virulentnost *S. aureus*-a reguliše *agr* sistem (accessory gene regulator), a geni *sea* i *see* kodirani su profagom. Rast *S. aureus* neophodan je za proizvodnju enterotoksina, iako stvaranje enterotoksina ne mora uvek da prati rast bakterije. Postoji više parametra koji sprečavaju ili stimulišu proizvodnju enterotoksina kao što su: temperatura, pH, a_w , kiseonik, redoks potencijal i dr. Sinteza enterotoksina može se odvijati pri temperaturama u rasponu od 10 do 46°C, pri pH vrednosti od 5 do 9.6, pri aktivnosti vode od 0,86 do 0,99 i koncentraciji NaCl do 12%.

Pored opsežnih istraživanja koja se provode dugi niz godina ostaje još pitanja koja treba razjasniti sa aspekta objektivne procene rizika. Poznato je da sve koagulaza pozitivne stafilokoke nisu i enterotoksične. Nalaz enterotoksogenih stafilokoka u hrani takođe ne znači da će doći do trovanja, jer uslovi matriksa hrane i sredine određuju preživljavanje, rast populacije stafilokoka i stvaranje dovoljnih količina enterotoksina koje mogu izazvati oboljenje ljudi. Pored toga, ne postoji saglasnost o količini enterotoksina koja može izazvati oboljenje ljudi. Neophodno je ispitati uticaj različite temperature, vremena čuvanja i matriksa na stepen ekspresije gena za sintezu toksina, kako bi se sprovela što objektivnija analiza rizika.

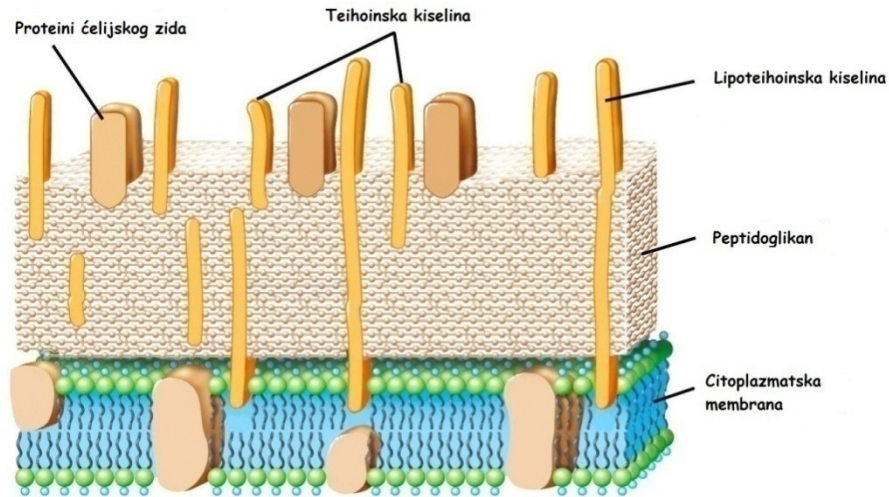
2. PREGLED LITERATURE

2.1. *S. aureus*

S. aureus subsp. *aureus* pripada rodu *Staphylococcus* i familiji *Staphylococcaceae* [1]. Prvi put opisao ga je Sir Aleksandar Ogston, a dve godine kasnije Rozenbah je izolovao iz čiste kulture i dao ime *S. aureus*, što potiče od grčke reči *staphyle* (grozd) i *kokkos* (bobice).

2.1.1. Osobine *S. aureus*

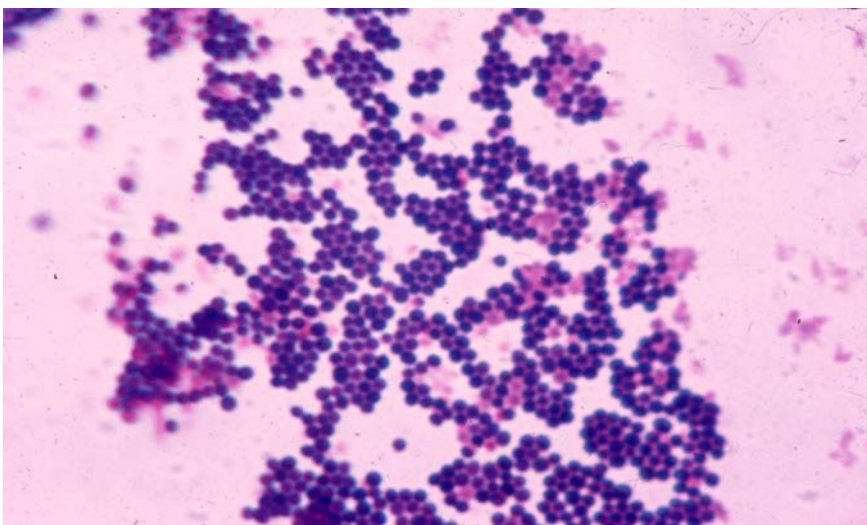
S. aureus je fakultativno anaerobni mikroorganizam, nepokretna gram-pozitivna koka, koagulaza i katalaza pozitivan. Koke su sferičnog oblika pojedinačne ili u paru, ili u grozdastim formama. Na krvnom agaru formiraju kolonije zlatno-žute boje (latinski *aureus*-zlatno), po čemu je poznat kao “zlatni stafilokok”. Umnožava se bespolno, binarnom deobom i to u dve ravni. Ćelijski zid *S. aureus* sastoji se od: peptidoglikana, polisaharida, teihoinse kiseline i proteina, a najvažniji protein je stafilokokni protein A (SpA), koga neki sojevi *S. aureus* proizvode u velikim količinama. Svi delovi ćelijskog zida pokazuju antigensku aktivnost. Zid stafilokokne ćelije rezistentan je na lizozime, a osetljiv na lizostafine, koji posebno cepaju veze pentaglicina u ćelijskom zidu stafilokoka. Ćelijski zid gram-pozitivne bakterije prikazan je na slici 2.1.1a



Slika 2.1.1a. Ćelijski zid Gram pozitivne bakterije. [2]

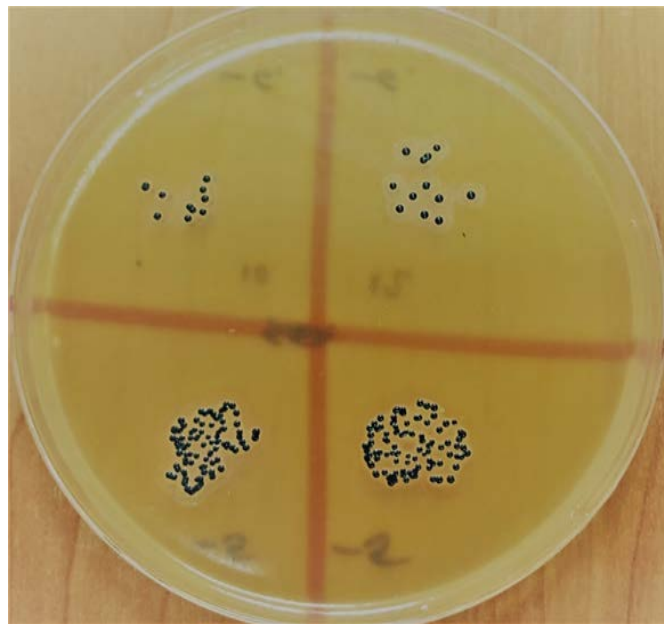
S. aureus ubikvitaran je u prirodi i može se naći u vazduhu, prašini, vodi, na raznim površinama u okruženju, na sluzokoži nosa ljudi, koži i dlaci toplokrvnih životinja. Utvrđeno je da 30 – 50% ljudske populacije predstavlja kliconoše. Može da raste pri pH vrednosti u rasponu od 4,5 do 9,0 i koncentraciji NaCl do 12%. Otpornost na toplotu zavisi od sredine koja ga okružuje. Ovo, kao i njegova ekološka niša, može lako objasniti njegovu učestalost u hrani koja zahteva manipulaciju tokom procesa, uključujući fermentaciju mleka, kao što su sirevi.

Na mikroskopskom preparatu bakterijske ćelije su sferičnog oblika, pojedinačne koke, ili u parovima, koje formiraju klastere u vidu grozda, plavo-ljubičaste boje.



Slika 2.1.1b. Mikroskopski preparat *S. aureus* [3]

Na čvrstim podlogama raste u vidu okruglih, glatkih, ispupčenih i sjajnih kolonija od belo-sive do zlatno-žute boje, prečnika 0,5-1,5 μm . Na krvnom agaru najčešće daju β tip hemolize. Procena *S. aureus* u hrani oslanja se na klasičnu mikrobiološku detekciju i kvantitativno određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka kultivacijom na Baird-Parker podlozi [4, 5]. Limit detekcije standardnih metoda ispitivanja je oko 10 cfu/g *S. aureus* za čvrstu hranu, odnosno 1 cfu/g za tečnu hranu. Nizak stepen kontaminacije namirnica sa *S. aureus* (do 10^3 cfu/g) ne smatra se rizičnim po zdravlje ljudi. Baird-Parker je selektivna podloga za izolaciju i identifikaciju koagulaza pozitivnih stafilokoka. Litijum hlorid i kalijum telurit deluju kao selektivni agensi, dok je žumance supstrat koji detektuje sintezu lecitinaze i aktivnost lipaze. Stafilokoke na Baird-Parker-u rastu u vidu tamno sivih do crnih kolonija zbog redukcije telurita, a da sintetišu lecitinazu pokazuje jasna zona prosvetljenja oko kolonije. Rast *S. aureus* na Baird-Parkeru prikazan je na slici 2.1.1c.



Slika 2.1.1c. Rast *S. aureus* na Baird-Parker

Vitamini B kompleksa (tiamin i nikotinska kiselina) su neophodni za rast *S. aureus*, zatim neorganske soli i amino kiseline kao izvor azota, naročito arginin, cistein, prolin i valin. Prisustvo glutaminske kiseline, leucina i tirozina nije neophodno za rast bakterije, ali su važni za sintezu enterotoksina. Nedostatak bilo koje amino kiseline više utiče na sintezu enterotoksina A, nego na sintezu enterotoksina B i C [6, 7, 8]. Neke vrste stafilokoka mogu da

hidrolizuju prirodne životinjske proteine (kazein, želatin, fibrin), masti, fosfolipoproteine i polisorbate. Enzimaska aktivnost *S. aureus* dovodi do stvaranja koagulaze, alkalne fosfataze, proteaze, lipaze i kod nekih sojeva lecitinaze [6, 7, 8].

2.1.2. Biohemijske osobine *S. aureus*

S. aureus je katalaza-pozitivan (stvara enzim katalazu), pa tako pretvara vodonik peroksid (H_2O_2) u vodu i kiseonik, što se ponekad koristi za razlikovanje stafilokoka od enterokoka i streptokoka.

Na osnovu sposobnosti stvaranja enzima koagulaze, razlikujemo koagulaza pozitivne (KPS) i koagulaza negativne stafilokoke (KNS). Od sedam opisanih vrsta, koje pripadaju grupi koagulaza pozitivnih stafilokoka [9], kao glavni uzročnik trovanja hranom navodi se *S. aureus* subsp. *aureus*.

2.2. Patogenost *S. aureus*

Patogenost predstavlja sposobnost mikroorganizma da izazove bolest kod ljudi. Faktori virulencije mogu biti vezani za strukturu bakterijske ćelije (peptidoglikan, teihonska kiselina, površinski proteini) i ekstracelularne proizvode bakterijskog metabolizma (toksini i enzimi). *S. aureus* poseduje veliki broj faktora virulencije koje sekretuju u spoljašnju sredinu ili mogu biti vezani za ćelijsku membranu kao deo bakterijske ćelije [10, 11]. Faktori virulencije mogu biti kodirani genima koji se nalaze na bakterijskim hromozomima, plazmidima, bakteriofagima i transpozonima. Sposobnost mikroorganizma da reguliše ekspresiju i sintezu faktora virulencije od velikog je značaja, jer omogućava uštedu energije u situaciji kada ekspresija ovih faktora nije potrebna bakteriji. U zavisnosti od uloge u patogenezi faktori virulencije mogu se podeliti na one koje uzrokuju adherenciju, invazivnost i one koje produkuju toksine. Invazivne bakterije sintetišu enzime koji im omogućavaju širenje i/ili imaju strukture koje deluju kao antifagocitni faktori (protein A). Protein A je površinski protein, koji vezuje molekule IgG preko Fc regiona. U serumu, mikroorganizam vezuje molekule IgG u pogrešnom smeru što onemogućava opsonizaciju fagocita [12].

S. aureus sintetiše koagulazu koja pretvara fibrinogen u fibrin koji sa jedne strane oblaže površinu mikroorganizma i štiti ga od fagocitoze, a sa druge strane fibrinske naslage ograničavaju leziju nastalu u tkivu. Takođe, sintetiše citotoksične molekule, kao što su hemolizini (α , β , γ i δ) koji dovode do formiranja pora na ćelijskoj membrani i leukocidin [13]. Toksini koji formiraju pore u ćelijskoj membrani dovode do povećanja njene permeabilnosti, a nazivaju se litički faktori ili lizini. Obzirom da se eritrociti najčešće koriste

za proveru aktivnosti lizina, oni se nazivaju i hemolizinima. Da bi toksini formirali pore i kanale u ćelijskoj membrani moraju da poseduju hidrofilni i hidrofobni deo koji interferira sa odgovarajućim strukturama membrane. Povećana propustljivost plazma membrane na kraju dovodi do smrti ćelije, a tokom samog procesa dolazi do promena koje podrazumevaju oslobađanje citokina, aktivaciju intracelularnih proteaza i indukciju apoptoze. Na osnovu dimenzije pore koju formiraju na membrani i interakcije s receptorima na eukariotskoj ćeliji, toksini se mogu podeliti na one koje formiraju velike i one koje formiraju male pore. Toksini koji formiraju male pore, veličine 1-1,5 nm dovode do selektivnog izlaska rastvorenih supstanci mase do 2000 Da. Ovoj grupi pripada α -toksin koji produkuje *S. aureus*, hemolizin II koji produkuje *B. cereus* i leukocidin (Panton-Valentin toksin).

Toksini koji deluju kao superantigeni dovode do poliklonske aktivacije velikog broja limfocita. U ovoj grupi nalaze se enterotoksini, eksfolijantini i TSST-1 koji produkuje *S. aureus*, eritrogeni ili pirogeni koje produkuje *Streptococcus pyogenes*. Prekomernom poliklonskom aktivacijom T-ćelija određenim toksinima bakterija dolazi do stvaranja velike količine inflamatornih citokina koji izazivaju sindrom sličan septičkom šoku. Superantigeni se simultano vezuju za nevarijabilne delove T-ćelijskih receptora i MHC II molekule i time dovode do nespecifične aktivacije T-ćelija. Kliničke i patološke promene pod dejstvom superantigena su groznica i šok koji nastaju zbog sistemskog oslobađanja velikih količina inflamatornih citokina kao što su IL-1 i IL-2.

2.3. Ekspresija gena

Bakterije tokom svog životnog ciklusa u povoljnim uslovima sredine povećavaju masu svojih ćelija, da bi se na kraju binarnom deobom podelile na dve nove ćelije. Rast i deoba bakterijskih ćelija odvija se pod genetičkom kontrolom. Ispoljavanje gena regulisano je: transkripcijom, obradom iRNK, translacijom i posttranslacionom modifikacijom proteina. Regulacija transkripcije najvažniji je način regulacije genske aktivnosti. Neki geni stalno su aktivni u svim ćelijama, kao što su geni za vitalne procese poput replikacije, reparacije, transkripcije, dok neki geni mogu da menjaju aktivnost u skladu sa trenutnim promenama. Regulacija aktivnosti gena odnosi se na stimulaciju ili inhibiciju dejstva gena u skladu sa trenutnim fiziološkim potrebama u ćeliji ili organizmu. Bakterije mogu da regulišu ekspresiju određenih gena kao odgovor na signale iz spoljašnje sredine, pa će pojedini geni da se aktiviraju ili isključe u zavisnosti od potreba bakterije u datom okruženju. Potrebno je razlikovati, s jedne strane, gene čija se aktivnost kontroliše u skladu sa potrebama u ćeliji ili

organizmu (inducibilni geni), a s druge strane, gene koji su od vitalnog značaja za funkcionisanje ćelije bez obzira na to u kojim se uslovima ona nalazi. Geni koji su uvek aktivni nazivaju se „geni čuvarkeće“ (engl. housekeeping genes) ili konstitutivni geni. Proces stimulacije aktivnosti gena pod uticajem signala iz sredine naziva se indukcijom, a geni čija se ekspresija reguliše na ovaj način označeni su kao inducibilni geni. Supstanca koja dovodi do indukcije naziva se induktor. Proces zaustavljanja ekspresije gena naziva se represija.

Genom *S. aureus* je hromozom koga čini kružni molekul dvolančane DNK, veličine oko $2,8 \times 10^6$ baznih parova (bp). Pored njega, u citoplazmi se mogu naći i plazmidi koji nose različite gene, kao što su geni za sopstvenu replikaciju, za prenošenje genetskog materijala u drugu bakterijsku ćeliju, za rezistenciju na antibiotike, rezistenciju na sredstva za dezinfekciju, sintezu toksina i drugih faktora virulencije. Pomoću plazmida i procesa konjugacije ovi genetički elementi mogu lako preći iz jedne u drugu bakterijsku ćeliju. Na ovaj način bakterije između sebe razmenjuju i šire gene za rezistenciju i virulenciju.

Ranije se mislilo da se ekspresija gena kontroliše na nivou transkripcije iniciranjem represije ili aktivacije proteina. Postoje podaci koji pokazuju da drugi mehanizmi mogu kontrolisati ekspresiju gena a uključuje RNK i mogu delovati kao antigens RNK, *sequestering* molekuli ili termosenzori [14]. Da bi došlo do infekcije, patogene bakterije kontrolišu ispoljavanje svojih virulentnih gena kao odgovor na signale iz sredine u kojoj se nalaze. Ovi signali informišu bakteriju da je postignuta odgovarajuća niša za početak njene virulencije. Što se tiče sinteze i regulacije stafilokoknih enterotoksina (SE), *S. aureus* poseduje gene za regulaciju ekspresije i SE i TSST-1. Ovi toksini sekretuju se u postekspencijalnoj fazi rasta stafilokoka. Geni koji kodiraju sintezu TSST-1 i enterotoksina nalaze se na plazmidima, bakteriofagama ili posebnim genskim elementima koji se nazivaju patogena ostrvca [15, 16, 17, 18, 19]. *S. aureus* izolovan iz mleka, može da ima sposobnost sinteze ili da bude nosilac gena za sintezu jednog klasičnog enterotoksina [20, 19] ili kombinacije više klasičnih enterotoksina.

Ekspresiju većine gena koji su odgovorni za virulentnost kod *S. aureus* reguliše *agr* sistem (accessory gene regulator). Ovaj lokus kodira dvokomponentni signalni transdukcioni sistem koji dovodi do *down* regulacije površinskih proteina i *up* regulacije gena koji kodiraju sekretorne ekstracelularne proteine, kao što su SEB, SEC, SED i TSST-1. Međutim, to ne važi za sintezu svih SE, zato što je ekspresija SEA kod *S. aureus* konstitutivna, dok do sinteze SEG i SEI dolazi samo pri malom broju bakterija [21].

Agr quorum-sensing sistem smatra se glavnim regulatorom ekspresije gena kod *S. aureus*. Ovaj regulatorni sistem uključuje se kada bakterijska populacija dostigne određenu

gustinu i reguliše ekspresiju gena koji kodiraju sintezu toksina i ostalih faktora virulencije. *Agr* genski lokus kodira dva primarna RNK transkripta (RNK II i RNK III) koji imaju ulogu u sintezi signalnih i efektorskih proteina. Na *agr* lokusu P2 operon sadrži četiri strukturalna gena: *agrB*, *agrC*, *agrD* i *agrA* koji preko RNK II transkripta kodiraju *agr* signalni mehanizam [22]. Transmembranski protein *agrB* ima ulogu u postranslacionoj modifikaciji *agrD* primarnog transkripta u oktapeptid [23, 24] i njegov aktivni oblik prstenaste forme [25]. Ovako nastali autoinduktorski peptid (AIP) aktivira dvokomponentni *agrC-agrA* sistem. Aktiviran *agrA* dovodi do značajnog povećanja transkripcije P2 i P3 operona tokom kasne log-faze rasta stafilokoka. Transkripcija P3 operona preko RNK III transkripta dovodi do sinteze δ -toksina i drugih sekretornih faktora virulencije, kao što su TSST-1 i α -hemolizin [22, 26, 27, 28] i vrši inhibiciju sinteze proteina A [29]. Tokom eksponencijalne faze rasta stafilokoka, sinteza enterotoksina A i K nije pod uticajem RNK III, a sinteza enterotoksina B, C i D samo je delimično regulisana preko RNK III transkripta [30].

Geni *sea* i *see* kodirani su profagom. *sea* gen prenosi bakteriofag iz familije polimorfa. Bakteriofag je ubačen u bakterijski hromozom kao profag i ponaša se kao deo bakterijskog genoma [31]. Međutim, pri određenim uslovima stresa, kao što je čuvanje hrane, profag može ponovo indukovati genom-faga i osloboditi nove bakteriofage [32]. Danas je poznato najmanje šest sekvenci sojeva *S. aureus* koje sadrže različite profage koje nose *sea* gen, a to su: Φ 252B, Φ Mu3, Φ Mu50A, Φ NM3, Φ Sa3ms i Φ Sa3mw [33, 34, 35, 36]. Nedavno je dokazano da je transkripcija *sea* gena do određene mere povezana sa životnim ciklusom profaga koji kodira SEA, za razliku od mnogih drugih gena koji nisu kodirani profagom kao što su *seb*, *sec* i *sed*. [37]. Polimorfna priroda profaga utiče na količinu proizvedenog SEA toksina koji proizvodi bakterijski soj koji nosi profag [38]. Analize sekvence *sea* gena i susjednog genomskog regiona kroz dalja ispitivanja dodatno pokazuju da se sojevi koji proizvode SEA toksine mogu grupisati u dve velike grupe: SEA1 i SEA2 [32]. Region endogenog promotora, P1, neposredno uz *sea* gen, pronađen je u obe grupe [38]. Pored toga, mogu postojati drugi fag-vezani latentni promotori, P2, koji su odgovorni za ekspresiju *sea* gena posle indukcije profaga [37]. Zapaženo je da sojevi *S. aureus* sintetišu velike količine SEA toksina koje pripadaju SEA1 grupi, a vrlo malu količinu SEA toksina koje pripadaju SEA2 grupi. Pored toga, podgrupa SEA1 proizvodi toksine SEA tako što je povezana sa indukovanim stresom i sa aktivnošću promotora P2. Enterotoksin E najbliži je toksinu SEA, poseduje 90% identičnih amino-kiselina [39].

2.4. Faktori koji utiču na rast *S. aureus* i na sintezu enterotoksina

Stafilokokna trovanja hranom (SFP) često su povezana sa rastom stafilokoka u hrani bogatoj proteinima kao što su meso, mleko i mlečni proizvodi. Ova hrana ima znatno složeniji sastav u poređenju sa bujonom, a mikroorganizmima odgovara takav sadržaj soli, pH, prisustvo hranljivih materija, dostupnost kiseonika i temperature. Rast *S. aureus* neophodan je za proizvodnju enterotoksina, iako stvaranje enterotoksina ne mora uvek da prati rast bakterije, a u nekoliko slučajeva sinteza toksina primećena je u nerepliciranim ćelijskim kulturama u proizvodima od šunke [32].

Istraživači su ispitivali ključne parametre koji sprečavaju ili stimulišu proizvodnju enterotoksina u laboratorijskim uslovima i u različitoj hrani, kao i uticaj sredine i genetskih faktora. Neki od identifikovanih faktora sredine koji utiču na proizvodnju enterotoksina navedeni su u tabeli 2.4.

S. aureus ima sposobnost da raste pri različitim uslovima sredine, a aktivnost vode (a_w) ima veliki značaj, jer može da raste u mnogo širem opsegu a_w vrednosti nego druge patogene bakterije u hrani. Bakterije mogu da rastu pri minimalnoj aktivnosti vode od 0,83 – 0,86, pod uslovom da su svi drugi parametri optimalni, a optimalna vrednost a_w je $>0,99$ [40]. Vrednosti a_w za sintezu stafilokoknih enterotoksina nešto su drugačiji od onih za rast *S. aureus*, u zavisnosti od vrste toksina. Sinteza SEA i SED odvija se pod gotovo svim vrednostima a_w koji omogućavaju rast *S. aureus*, a drugi parametri moraju biti optimalni. Sinteza SEB veoma je osetljiva na smanjenje vrednosti a_w . Pri a_w vrednosti od 0,93 sinteza ovog enterotoksina je niska, uprkos intenzivnom rastu SEB pozitivnog soja *S. aureus*. Takođe, aktivnost vode ima isti uticaj i na sintezu SEC [41]. Rast tri soja *S. aureus* pri 37°C i stvaranje enterotoksina A i B (SEA i SEB) zabeleženi su pri a_w 0,95. Količina enterotoksina A, koja je stvorena pri a_w 0,996 i 0,95 bila je približno ista, dok je sinteza enterotoksina B bila smanjena pri nižim vrednostima [42]. Sinteza enterotoksina A (SEA) zabeležena je u svinjskom mesu pri 35°C i aktivnosti vode od 0,86, ali ne i pri aktivnosti vode od 0,83. U govedem mesu stvaranje enterotoksina je bilo pri a_w 0,88 [43]. Na osnovu napred navedenog, rast *S. aureus* moguć je u širem rasponu a_w vrednosti u odnosu na stvaranje enterotoksina.

S. aureus je mezofilni mikroorganizam sa optimalnom temperaturom rasta pri 37°C, a može da raste pri temperaturama u rasponu od 7°C do 48°C. Minimalna temperatura pri kojoj je ovaj mikroorganizam izolovan iz slanine je 5°C [44], dok je u UHT mleku zabeležen rast pri 7°C [45]. U bujonu sa mešanom kulturom kod pet enterotoksogenih izolata *S. aureus* nije bilo rasta pri 7,5°C, dok je rast bio zabeležen pri 8°C kada su pH i a_w bili optimalni [46]. Maksimalna temperatura pri kojoj je moguć rast *S. aureus* u obranom mleku iznosi 48,9°C

[47]. Medved'ová A. i saradnici [45] nisu utvrdili rast jednog izolata pri 51°C, ali je utvrđen pri temperaturi 46°C. U istraživanjima Schmitt M. i saradnici [48] kod 77 sojeva izolovanih iz različite vrste hrane, optimalna temperatura rasta uglavnom je bila između 35-40°C. Minimalna temperatura rasta bila je između 7°C i 13°C, a maksimalna između 40°C i 48°C. Minimalna temperatura za proizvodnju SE varira u širokom opsegu između 15°C i 38°C, a maksimalne temperature za sintezu SE od 35°C do 45°C. Na niskim temperaturama sinteza SE primećena je tek nakon 3-4 dana. Minimalna i maksimalna temperatura pri kojoj *S. aureus* može da stvara enterotoksine su 10°C i 45°C [49] sa optimalnom temperaturom 35-40°C. Aoyama K. i sar. [50] dokazali su enterotoksin u BHI bujonu posle 5 dana inkubacije pri temperaturi od 10,8°C, ali ne i pri temperaturi od 8,7°C posle 10 dana inkubacije. Iako mikroorganizam raste pri temperaturama ispod 10°C ne znači da će stvarati enterotoksine. Dva enterotoksigena soja *S. aureus* nisu stvarala enterotoksin posle inkubacije od 36 h pri temperaturi od 18°C kada je broj *S. aureus* iznosio 10⁹ cfu/g [51]. Termička stabilnost enterotoksina zavisi od vrste hrane, pH, sadržaja NaCl i od same vrste enterotoksina. Enterotoksin A (SEA) otporniji je na delovanje temperature pri pH 6,0 i višim vrednostima, nego pri pH 4,5-5,5 dok je enterotoksin D (SED) više stabilan pri pH 4,5-5,5 nego pri 6,0. Ukoliko enterotoksin nije u potpunosti inaktivisan delovanjem temperature, može doći do reaktivacije tokom kuvanja, čuvanja i inkubacije [52]. Tsutsuura S. i Murata M. [53] ispitivali su sintezu SEA toksina u različitim vrstama hrane kao što su mleko, kajmak, jaja i šampinjoni pri različitim temperaturama inkubacije. Kako je temperatura rasla, tako je i koncentracija SEA toksina bila veća. Ispitivali su uticaj temperature inkubacije pri 10, 15, 20 i 37°C na sintezu SEA, koristeći različite sojeve *S. aureus* koji stvaraju toksin SEA. Maksimalno dobijena koncentracija SEA pri različitim temperaturama inkubacije nije se značajno menjala, što ukazuje da pored temperature postoje i drugi faktori koji utiču na sintezu SEA toksina. Ovi rezultati ukazuju da je sinteza SEA toksina pod snažnim uticajem soja *S. aureus* - *per se*, kao i faktora sredine kao što su temperatura i hranljivi sastojci odnosno matriksa u kom se nalazi.

Većina izolata *S. aureus* raste u rasponu pH od 4,5 do 9,3 [49], sa optimalnim rastom pri pH 6-7 [54, 55, 8]. Na rast pri niskim vrednostima pH utiču i drugi faktori sredine. Rast je inhibisan u 0,1% rastvoru sirćetne kiseline i u prisustvu kratkolančanih masnih kiselina (C₁-C₄) [56]. *S. aureus* je više osetljiv na acidifikaciju kada je koncentracija soli povećana, iako je halotolerantan mikroorganizam. U mešanoj kulturi pet enterotoksogenih izolata *S. aureus* rastao je pri pH 4,5 [46]. Slične rezultate su dobili Charlier C. i saradnici [57] u eksperimentu u kojem je pH vrednost podešavana sa mlečnom kiselinom. Prethodno izlaganje *S. aureus*-a

tokom dva sata pri pH 4,5 odnosno pH 9,5 tokom 30 minuta, povećalo je preživljavanje ove bakterije pri pH 2,5 i 12,0 [58]. Stvaranje enterotoksina moguće je u rasponu pH od 4,5 do 9,6 [59]. Optimalna pH vrednost za sintezu enterotoksina je 5,0. Rast *S. aureus* moguć je pri 12% NaCl, ali ne dolazi do sinteze enterotoksina. Genigeorgis C. i sar. [60] dokazali su sintezu enterotoksina pri rasponu pH od 4,0 do 9,83, nakon eksperimentalne inokulacije sa 10^8 cfu *S. aureus*/mL bez dodavanja soli. Zabeleženo je stvaranje SEA pri pH 6,5-7,0 u kulturi sa kontrolisanom koncentracijom kiseonika [61]. Najniža vrednost pH koja omogućava rast bakterije i stvaranje enterotoksina u aerobnim uslovima je pH 4,0, dok je najniža pH vrednost koja podržava rast i stvaranje enterotoksina u anaerobnim uslovima pH 4,6 i 5,3 [40]. Minimalna vrednost pH pri kojoj može da se stvara enterotoksin zavisi da li je rast u aerobnim ili anaerobnim uslovima. Osam sojeva *S. aureus* stvarali su enterotoksin A, pri minimalnoj vrednosti pH od 4,9 do 5,9 u aerobnim uslovima, dok u anaerobnim uslovima nema sinteze enterotoksina B i C pri pH 5,7.

Uticaj organskih kiselina na rast *S. aureus* zavisi od koncentracije njihovih nedisosovanih jona. Konstanta disocijacije (pK_a) je vrednost pH pri kojoj je odnos disosovanih i nedisosovanih oblika 50:50. Sirćetna kiselina i propionska kiselina čije su pK_a 4,8 i 4,9 predstavljaju jače inhibitore od mlečne kiseline čija je pK_a 3,9 [54, 57]. Otpornost *S. aureus* na pH vrednosti veće od 5,5 objašnjava se održavanjem intracelularne pH vrednosti disocijacijom, ili otpuštanjem protona iz citoplazme, a takođe i ekspresijom gena odgovornih za puferski kapacitet citoplazme. Ovi geni obuhvataju gene koji kodiraju intracelularni šaperoni, ureaza operon i geni za metabolizam i transport aminokiselina (histidin, lizin, arginin), ugljenih hidrata i fosforne kiseline [57, 62]. Potpuna inhibicija postiže se pri pH ispod 5,0. Snižavanje intracelularnog pH i stres oštećuju strukturu zida bakterijske ćelije i dovodi do smanjene aktivnosti enzima, koji su osetljivi na pH. Nedisosovani oblici kiselina učestvuju u respiratornom lancu. Protonski oblici difunduju u ćeliju pri niskim pH što je praćeno disocijacijom protona. Rast mikroorganizama je tada jako ugrožen, jer se onda raspoloživa energija u ćeliji tada koristi za deacidifikaciju citoplazme aktivacijom proton gradijenta duž cele citoplazmatične membrane [62]. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) sirćetne i mlečne kiseline za *S. aureus* je 0,6 i 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ [63]. Pokazalo se da mlečna kiselina ispoljava veći efekat u kontroli patogenih bakterija u mesnom bujonu kada je dodata u količini koja se navodi kao minimalna inhibitorna koncentracija. Rast *S. aureus* u rekonstituisanom mleku bio je moguć pri pH 4,5 i temperaturi od 37°C kada je pH podešen sa HCl, ali je izostao pri istom pH podešenom sa mlečnom kiselinom.

Iako je *S. aureus* halotolerantan mikroorganizam u poređenju sa drugim mikroorganizmima, so u koncentracijama preko 20% inhibiše rast *S. aureus*. Valero A. i saradnici [46] dokazali su da je pet enterotoksogenih sojeva stafilokoka raslo u mešanoj kulturi pri a_w 0,867 kada je kao humektant korišćena so. Rast izolata *S. aureus* dokazan je pri a_w 0,893 (15,25% NaCl), ali ne i pri a_w 0,869 (18,17% NaCl) [45]. Rast *S. aureus* zabeležen je u mesu pri koncentraciji NaCl od 20% [43]. Kreisman L. i Labuza T. [64] dokazali su da *S. aureus* može da raste u siru pri a_w 0,94 i pH oko 5,7, ali ne i pri a_w 0,91. Snižavanje vrednosti za a_w od 0,993 do 0,95 uticalo je na produženje lag faze, stopu rasta i maksimalnu koncentraciju, a efekat je bio izraženiji pri snižavanju temperature.

S. aureus fakultativno je anaerobni mikroorganizam koji najbolje raste u prisustvu kiseonika. Rast *S. aureus* u bujonu bio je brži a maksimalna gustina populacije je veća u aerobnim u odnosu na anaerobne uslove [65]. Pod anaerobnim uslovima rast bakterije mnogo je sporiji, pa čak ni posle nekoliko dana ne postignu rast kao pri aerobnim uslovima. Tako je u aerobnim uslovima produkcija SEB deset puta intenzivnija nego u atmosferi sa 95% N₂ + 5% CO₂. Sinteza SEA bila je smanjena pod anaerobnim uslovima u odnosu na aerobne uslove, ali je u oba slučaja, toksin SEA bio detektovan nakon 120 minuta inkubacije [65]. Izvori ugljenika utiču na stvaranje enterotoksina [40]. Dodavanje glukoze inhibisalo je stvaranje SEA, SEB i SEC toksina, što se objašnjava snižavanjem pH vrednosti kao rezultat metabolizma šećera. Dodavanje amino kiselina utiče na stvaranje SEB toksina. Oksigenacija, tokom sabiranja mleka posle muže ili tokom procesa proizvodnje sira, može da favorizuje umnožavanje ovog mikroorganizma, dok mikro-anaerobni uslovi u siru mogu da budu nepovoljni za stvaranje enterotoksina [66].

Stvaranje enterotoksina zavisi od vrste mikroorganizama, koji su u kompeticiji sa *S. aureus*. Bakterije mlečne kiseline (*Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Leuconostoc*) delimično su razgradile prečišćen enterotoksin A. Opšte je prihvaćeno da se enterotoksin manje stvara kada je *S. aureus* u prisustvu drugih mikroorganizama i da je potreban veći broj ovog mikroorganizma da bi se stvorio enterotoksin [43].

Pitt W. i saradnici [67] proučili su kinetiku rasta *S. aureus* u sirovom i pasterizovanom mleku pri 37°C koja je bila ista u prvih 16 h inkubacije. Nakon dostignute maksimalne gustine populacije smanjenje broja ovog mikroorganizma bilo je brže u sirovom mleku, a broj je bio za oko 2 log cfu/mL manji nego u pasterizovanom mleku posle 72 h inkubacije. Ovi podaci ukazuju nam da je, u sirovom i pasterizovanom mleku u ranim fazama proizvodnje sireva, rast sličnog intenziteta. U sirevima proizvedenim od sirovog mleka bakterije mlečne kiseline, kao i kompetitivna mikroflora pokazuju inhibitorno delovanje prema patogenim

mikroorganizmima [68]. Pereira V. i saradnici [69] ispitali su uticaj izolata tri vrste bakterija mlečne kiseline tokom proizvodnje portugalskog sira. Izolat *Lactococcus lactis* pokazao je efikasno inhibitorno delovanje na *S. aureus*, dok su *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus plantarum* pokazali slabiju inhibiciju. Radovanović R. i Katić V. [70] dokazale su da mešana kultura *Lb. lactis* i *Lb. plantarum* usporava rast *S. aureus* u sterilnom obranom mleku pri temperaturi od 30°C.

Postoje dokazi da *S. aureus* raste u manjem broju u proizvodima od mleka sa većim sadržajem masti, ali to zavisi od soja [71]. Ova pojava može se dovesti u vezu sa osobinama da stvara lipaze i inhibicijom rasta, koja nastaje zbog slobodnih masnih kiselina. Slobodne masne kiseline oslobađaju se usled lipolitičke aktivnosti *S. aureus* i na taj način deluju autoinhibitorno.

Wallin-Carlquist N. i saradnici [32] istraživali su stvaranje SEA i SED u kuvanoj i dimljenoj šunki. Opažena je produžena ekspresija *sea* gena, formiranje SEA toksina tokom jedne nedelje, umesto očekivane kratkoročne ekspresije *sea* gena. Pored toga, neočekivano je došlo i do ekspresije *sed* gena, iako su geni različito regulisani. Razlike u ekspresiji enterotoksina posmatrano za *S. aureus* u proizvodima šunke i tečnoj kulturi verovatno su povezane sa fiziološkim stanjem stafilokoka. U šunki *S. aureus* formira biofilm, dok su u bujonskoj kulturi bakterije plaktoni. Poznato je da aktivan *agr quorum-sensing* ograničava formiranje biofilma koji stvara *S. aureus*, a aktiviranje *agr* sistema može biti povezano sa rasturanjem *S. aureus* iz formiranog biofilma uz utrošak glukoze. Drugi pik ekspresije *sed* gena koji je primećen u kuvanoj i dimljenoj šunki može biti posledica niskog nivoa glukoze u mesu. Aktiviran *agr* sistem pokrenut od strane *S. aureus* iz biofilma dovodi do ekspresije *sed* gena. Pored toga, novije studije pokazuju da zreli biofilmovi imaju kiselu sredinu. Nizak pH može prouzokovati indukciju profaga, što dovodi do ekspresije *sea* gena, a to objašnjava produženu ekspresiju *sea* gena posmatranu u kuvanoj i suvoj šunki.

Cretenet M i saradnici [66] koristili su transkripte za ispitivanje ekspresije virulentnih gena u siru kao matriksu pod uticajem *Lactococcus lactis* i pokazali da je ekspresija *sea* gena bila neznatno povećana u kiseloj sredini. Drugo objašnjenje za povećanje ekspresije *sea* gena može biti umerena aktivacija faga oksidativnim stresom preko RecA-posredovane reakcije. Nivo ekspresije bio je znatno niži u matriksu sira negu u hemijski definisanom medijumu (CDM), a posteksponencijalna indukcija, karakteristična *agr*-regulacija gena, nije utvrđena.

Tabela 2.4. Faktori koji utiču na rast *S. aureus* i sintezu enterotoksina

Faktori	Optimalne vrednosti rasta <i>S. aureus</i>	Granične vrednosti rasta <i>S. aureus</i>	Optimalne vrednosti za sintezu SE	Granične vrednosti za sintezu SE	Efekat na enterotoksine	Efekat na sintezu enterotoksina	Hrana	Reference
Temperatura	35 – 41°C	6 - 48°C	34 - 40°C	10 - 46°C	SEA, SEB, SEC, SED	Temperatura ima veći uticaj na sintezu enterotoksina nego na rast <i>S. aureus</i>	Mleko, Šunka, proizvodi od jaja	[51, 43, 72, 73]
pH	6-7	4-10	7 - 8	5 – 9,6	SEA, SEB, SEC, SED, SEE	Veća tolerancija je u aerobnim uslovima, Mlečna kiselina posebno sprečava sintezu enterotoksina – agr zavisna regulacija.	Šunka, Kobasice	[74, 75, 76, 77]
a_w	0.99	0.83≥0.99	0.99	0.86≥0.99	SEA, SEB, SEC, SEH	SEB i SEC su više osetljivi na aktivnost vode od SEA i SEH	Proizvodi od mesa	[78, 79, 80, 81, 41]
NaCl	0%	0 – 20%	0%	< 12%	SEA, SEB, SEC	Porast temperature ograničava sintezu SEA, a niska osmolarnost povećava sintezu enterotoksina enteretoksina	Šunka Kobasice	[82, 83]
Kiseonik	aerobno	anaerobno-aerobno	aerobno	anerobno-aerobno	SEA, SEB, SEC, SEH	10% rastvor kiseonika je optimalan za sintezu SEB i prisustvo kiseonika povećava sintezu SEB i do 10 puta	Šunka Kobasica	[84, 65, 85, 86]
Redoks potencijal (Eh)	>+200 mV	≥200 to > +200 mv	>+200 mV	≥100 to > +200 mv	-	-	-	
<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	-	-	<i>sec, sel (sek, seg, seh)</i>	Dolazi do redukcije transkripcije <i>sec</i> i <i>sel</i> kao i <i>sek, seg, seh</i>	Sir	[66, 87, 88]
					<i>sea</i>	Mogu da održavaju <i>sea</i> u stacionarnoj fazi		

2.5. Toksin 1 toksičnog šok sindroma (TSST-1)

Skoro svi sojevi *S. aureus* luče grupu enzima i citotoksina koji obuhvata četiri hemolizina (α , β , γ , δ), nukleaze, proteaze, lipaze, hijaluronidaze i kolagenaze. Stafilokokni toksin TSST-1 poznat je kao pirogeni superantigeni toksin (PTSAgs). Ovaj toksin ranije se nazivao stafilokokni pirogeni egzotoksin C i stafilokokni enterotoksin F. Pirogeni superantigeni toksini (PTSAgs) pripadaju grupi egzotoksina koje stvaraju *S. aureus* i *Streptococcus pyogenes*. Stafilokokni enterotoksini imaju emetičko delovanje, a TSST-1 ima sposobnost prolaska kroz sluzokožu i jedini koji pobuđuje procese u ćelijskom zidu bakterije i dovodi do nastanka artritisa. Klinički se manifestuje kao hipotenzija, hipoalbuminemija i pojava edema. TSST-1 je protein sa 234 amino-kiseline i luči se posle cepanja 40-amino kiseline signalne sekvence koja se nalazi na amino terminusu polipeptidnog lanca. Zreo protein je polipeptidni lanac molekulske težine 22.000 i izolektrične tačke (pI) 7,2, dobro rastvorljiv u vodenim i slanim rastvorima. Toksin je otporan na toplotu i proteolitičke enzime [13], tako da zadržava svoju aktivnost u digestivnom traktu nakon ingestije [89]. Istraživanja koja su radili Li i saradnici [90] pokazuje da TSST-1 toksin ima snažnu otpornost na toplotni tretman, pepsin i tripsin u toku varenja na superantigenu aktivnost. TSST-1 toksin brzo se degradira na manje fragmente posle tretmana sa pepsinom ili tripsinom, zadržava superantigenu i smrtonosnu aktivnost šoka u odnosu na SEA toksin. Ovi rezultati pokazuju da različita otpornost SEA i TSST-1 toksina učestvuje u različitim patogenim aktivnostima superantigenih toksina usled trovanja hranom i TSS. Enterotoksini mogu da izazovu trovanja ljudi hranom, a TSST-1 modulira imunološki odgovor domaćina [91]. Oslobođanje TSST-1 u krvotok može da dovede do pojave ozbiljnih kliničkih komplikacija, kao što su toksični šok sindrom, iznenadne smrti novorođenčadi i Kawasaki sindrom [92].

Farahmand-Azar S. i saradnici [93] ispitali su izolate *S. aureus* dobijenih sa devet farmi mlečnih krava obolelih od mastitisa u istočnom i zapadnom Azerbejdžanu (pokrajina Irana) na prisustvo TSST-1 kodiranjem gena *tst* koristeći PCR tehniku. Izolati *S. aureus* identifikovani su na osnovu rasta na kulturi i biohemijskih osobina kao i amplifikacijom *aroA* gena, specifičnog za *S. aureus*. Od ukupno 58 izolata detektovano je u 9 (15,5%) izolata *tst* gen 350 bp (baznih parova).

Baniardalan S. i saradnici [94] otkrili su jedan izolat *S. aureus* (1,3%) koji je nosio gen za enterotoksin TSST-1 od ukupno 76 izolata *S. aureus* izolovanih iz mleka sakupljenih sa 7 farmi mlečnih krava u Hamedanu u Iranu. Izolati su identifikovani na osnovu biohemijskih i molekularnih metoda koristeći PCR amplifikacijom *femA* gena. Rezultati pokazuju da *S.*

aureus koji izaziva mastitise kod mlečnih krava može nositi gen za TSST-1 toksin, a samim tim može potencijano biti uzročnik toksin šok sindroma kod potrošača.

U Španiji su ispitivali 53 izolata *S. aureus* izolovanih iz hrane na prisustvo toksičnog šok sindroma (TSST-1) i dokazali ga samo u jednom uzorku hrane koji je bio u kontaktu sa rukama radnika [95].

Fueyo JM. [15] ispitivali su 269 izolata *S. aureus* izolovanih iz hrane koja je bila u kontaktu sa rukama radnika na prostorima Španije na prisustvo gena za enterotoksine i toksin šok sindrom. Rezultati su pokazali da je 57 izolata sintetisalo najmanje jedan od četiri enterotoksina (SEA, SEB, SEC, SED), 10 izolata sintetisalo samo TSST-1 toksin, i 10 izolata sintetiše oba tipa toksina.

2.6. Hrana kao izvor trovanja stafilokoknim enterotoksinima

Za nastanak stafilokoknih intoksikacija neophodno je da postoje sledeći uslovi:

1. Izvor koji sadrži enterotoksogene sojeve stafilokoka – npr. sirovo mleko, sirovo meso, zdrave ili inficirane kliconoše;
2. Preživljavanje i opstanak stafilokoka kroz proces proizvodnje (proizvodnja sireva od nekuvanog mleka, primenom tradicionalne tehnologije gde izostaje inhibitorski učinak startera), ili transfer kao posledica unakrsne kontaminacije usled nehigijenskih uslova proizvodnje;
3. Sastav hrane u odnosu na fizičko-hemijske karakteristike takav da podržava rast stafilokoka i produkciju toksina;
4. Povoljna temperatura i dovoljno vremena za uspostavljanje kritične populacije stafilokoka i sintezu hazardne količine enterotoksina;
5. Ingestija hrane koja sadrži dovoljnu količinu toksina da izazove simptome trovanja [9].

Različite kategorije hrane kao i navike u ishrani mogu izazvati trovanja enterotoksinima stafilokoka. Hrana je dobar medijum za razvoj *S. aureus*, pa tako postoje podaci da su mleko, kremovi, kolači filovani kremom, maslac, šunka, sirevi, kobasica, meso u konzervama, salate, kuvana jela i nadevi za sendviče izvori enterotoksina u slučajevima intoksikacije ljudi. Incidencija trovanja enterotoksinima stafilokoka sezonske je prirode, jer najveći broj intoksikacija nastaje krajem leta, kada je temperatura visoka, a hrana se ne čuva na temperaturama frižidera [96].

Prema izveštaju EFSA [97], tokom 2010. godine u Evropi prijavljene su 274 epidemije izazvane enterotoksinima stafilokoka. Najčešće inkriminisana hrana u trovanjima stafilokoknim enterotoksinima razlikuje se od zemlje do zemlje. U Velikoj Britaniji 53% trovanja izazvanih stafilokokama, zabeleženih od 1969-1990. godine, bilo je izazvano proizvodima od mesa, naročito šunkom; 7% ribom i školjkama i 3,5% jajima. Mleko i proizvodi od mleka su imali udeo od 8% do 53% trovanja izazvanih enterotoksinima stafilokoka. Dokazano je da 79% izolata *S. aureus* stvara samo enterotoksin A (SEA), ili u kombinaciji sa još nekim od enterotoksina [98].

U Evropskoj uniji 2011 zabeleženo je 345 epidemija izazvanih konzumiranjem hrane u kojoj su bili prisutni stafilokokni enterotoksini. Hrana u kojoj su enterotoksini bili prisutni uključila je: jela od testa, salate, meso i mesne preradevine, jaja i proizvodi od jaja, povrće, pekarski proizvodi i sirevi [99].

CDC (Centers for Disease Control) procenjuje da se svake godine u SAD pojavi 240.000 slučajeva stafilokoknih trovanja hranom (SFP), što dovodi do hospitalizacije u 1000 slučajeva i do 6 smrtnih slučajeva [100]. Dok u EU, broj SFP raste sa 386 prijavljenih epidemija u 2013 godini [101].

Prema izveštaju EFSA [102] za 2015 godinu, Belgija, Bugarska, Hrvatska, Kipar, Češka Republika, Nemačka, Grčka, Italija, Portugal, Slovenija, Španija i Švajcarska prikupile su podatke o stafilokoknim enterotoksinima u mleku i mlečnim proizvodima. Od 2309 testiranih uzoraka, 19 (0,8%) uzoraka bilo je pozitivno na stafilokokne enterotoksine. Od ukupno 871 ispitanog uzorka druge vrste hrane, 21 (2,4%) ispitanih uzoraka bilo je pozitivno na stafilokokne enterotoksine.

U Francuskoj, među prijavljenim slučajevima trovanja enterotoksinima stafilokoka tokom dve godine (1999-2000), mleko i proizvodi od mleka bili su najčešći uzrok trovanja (32%), potom meso (22%), kobasice i pite (15%), riba i morski plodovi (11%), jaja i proizvodi od jaja (11%) i živinsko meso (9,5%) [103]. Značajan broj proizvoda od mleka, dokazanih kao izvor enterotoksina u slučajevima trovanja, objašnjava se velikom potrošnjom sireva proizvedeno od sirovog mleka. U periodu od 1981-2002. godine u 31 epidemiji izazvanoj hranom u Francuskoj najčešće je dokazan enterotoksin A (SEA) (69,7%) [104].

U Italiji, u periodu od 2002. do 2010. godine, 181 osoba je obolela u epidemijama izazvanim *S. aureus* i njegovim enterotoksinima [105]. Postoje podaci o slučaju četvoročlane porodice koja je obolela nakon konzumiranja njihovog tradicionalnog jela "arancini", koje se priprema od kuvanog pirinča i mesa. Utvrđeno je da je broj stafilokoka iznosio $>10^5$ CFU/g i prisustvo enterotoksina SEA i SEC [106]. U Švedskoj u periodu od 2003-2009. godine,

zabeleženo je 111 slučajeva i 30 epidemija, što je predstavljalo 1%, odnosno 2% ukupno prijavljenih slučajeva i epidemija nastalih nakon konzumiranja hrane [107, 108, 109, 110, 111, 112].

U Austriji, 2007. godine zabeležena je epidemija u kojoj je 30 dece obolelo nakon konzumiranja proizvoda od mleka u kojima su dokazane stafilokoke, koje su stvarale enterotoksine A i D (SEA i SED) [113].

U Italiji zabeležen je slučaj trovanja hranom dve osobe iz iste porodice nakon konzumiranja ovčijeg sira Primosale proizvedenog na Siciliji. *S. aureus* koji je izolovan iz sira sintetisao je enterotoksin C (SEC) a nosio je dva gena: enterotoksin C (*sec*) i za toksični šok sindrom (*tst*). Nakon toga, sprovedena su detaljna istraživanja na 971 uzorak hrane (sirovo mleka, meso, sirevi, prehrambeni proizvodi) [114]. *S. aureus* je detektovan u 102 uzorka hrane, a *tst* gen bio je prisutan u 42% sojeva *S. aureus*, bilo da je sam ili u kombinaciji sa drugim toksin genima. Gen za enterotoksin C bio je najzastupljeniji enterotoksin, ali samo u mlečnim proizvodima. Šest izolata *S. aureus* nosilo je samo *sea* gen, dva izolata nosila su *sea* i *seb* gena i jedan izolat nosio je *sea* i *sec* gena.

Podaci o dozi enterotoksina potrebnoj za ispoljavanje simptoma intoksikacije su veoma različiti. Mossel DAA. i saradnici [115] navode da je za nastajanje simptoma trovanja kod odraslih osoba potrebno da se hranom unese u organizam 10 – 20 µg stafilokoknih enterotoksina po kg telesne mase. Drugi autori smatraju da manje od 1 µg stafilokoknih enterotoksina može izazvati simptome trovanja kod osetljivih osoba [116]. Za razliku od navednih autora, Balaban N. i Rasooly A. [117] i Omoe K. i saradnici [118] smatraju da je minimalna toksična doza za enterotoksin A (SEA) 100 ng.

Prilikom trovanja stafilokoknim enterotoksinima u Japanu registrovano je 13.420 slučajeva, gde su mleko i jogurti napici proizvedeni od mleka u prahu predstavljali inkriminisanu hranu, ukupan unos enterotoksina A po potrošaču bio je 0,02 do 0,1 µg [119]. U ovom slučaju, u inkriminiranoj hrani nisu dokazane stafilokoke, ali je utvrđeno prisustvo enterotoksina u količini od 0,05 do 1,6 ng/mL. U 95% slučajeva stafilokoknih trovanja ustanovljeni su klasični enterotoksini (A, B, C, D i E), s tim da je u najvećem broju slučajeva dokazan enterotoksin A (8,21). Prema sadašnjem konsenzusu, količina enterotoksina potrebna za ispoljavanje tipičnih simptoma trovanja u korelaciji je sa približnim brojem stafilokoka od 10⁵ CFU/g hrane. Ova vrednost se, prema evropskim (European Commission Regulation (EC) No. 1441/2007) i domaćim propisima (Sl. glasnik RS, br. 72/10), smatra kao granična vrednost u procesu proizvodnje mlečnih proizvoda, te zahteva od proizvođača da u sumnjivim proizvodima izvrše ispitivanje na prisustvo stafilokoknih enterotoksina.

2.7. Prisustvo gena za enterotoksine *S. aureus* u mleku i proizvodima od mleka

U Teheranu 2010, 32% proizvoda od mleka imalo je prisustvo *S. aureus* i to: 18% u pavlaci, 10% u siru i 4% u mleku. Multipleks PCR metodom istraživači su detektovali gene za sintezu toksina (SEA, SEB). U izolatima *S. aureus* najviše je bio prisutan gen za SEA 15,6%, zatim gen za SEB 9,3%, a 6,2% imali su prisustvo oba gena [120].

Pajić M. [121] ispitala je filogenetske srodnosti izolata *S. aureus* poreklom iz mleka i sekreta vimena krava sa 48 farmi na teritoriji Vojvodine i centralne Srbije, kao i izolata *S. aureus* poreklom od ljudi. Od 62 izolata *S. aureus* poreklom iz četvrti vimena krava sa poremećenom sekrecijom, kod 5 (8,06%) izolata dokazano je prisustvo gena za sintezu enterotoksina SEC, a kod 6 (54,54%) od 11 izolata *S. aureus* poreklom od ljudi, dokazano je prisustvo gena za sintezu enterotoksina SEC i SEB, dok kod 13 izolata *S. aureus* poreklom od krava sa kliničkim mastitisom nije dokazano prisustvo gena za sintezu enterotoksina. Na osnovu ispitivanja filogenetske srodnosti nukleotidnih sekvenci gena za sintezu stafilokoknog proteina A, kod 75 izolata poreklom iz vimena krava i 11 izolata poreklom od ljudi – u smislu broja mutacija koje su se dogodile u tom vremenu, 2 izolata *S. aureus* poreklom od ljudi mogu da se smatraju precima svih ostalih izolata.

Tkacikova L. i saradnici [122] ispitali su prisustvo gena za enterotoksine, primenom multipleks PCR tehnike, na 87 izolata *S. aureus* iz 53 uzorka ovčijeg sirovog mleka, 21 uzorka sirovog kravljeg mleka, jednog uzorka kozijeg mleka sa farmi u istočnoj Slovačkoj i 12 uzoraka sira od ovčijeg mleka. Dokazali su gene za 4 tipa enterotoksina. Tri tipa gena za enterotoksine (SEA, SEC i SED) dokazana su kod *S. aureus* izolovanih iz ovčijeg sirovog mleka. Tri tipa (SEB, SEC i SED) dokazana su kod izolata iz uzoraka sireva od ovčijeg mleka. Gen za enterotoksin C (SEC) dokazan je kod izolata iz uzorka kozijeg sirovog mleka i dva gena (SEC i SED) dokazana su kod izolata iz kravljeg sirovog mleka. Najveći broj enterotoksigenih stafilokoka (98,8%) izolovan je iz kravljeg sirovog mleka i autori su zaključili da su dobijeni rezultati verovatno u direktnoj korelaciji sa zdravstvenim stanjem mlečne žlezde životinje.

Neki autori su ispitali prisustvo enterotoksogenih *S. aureus* u ukupno 205 uzoraka sirovog mleka, koji su poticali sa farmi u severnoj Palestini od klinički zdravih krava (130) i ovaca (120). Od 100 izolata *S. aureus*, kod 37 (37%) je dokazan gen za sintezu enterotoksina. Od tog broja, kod 20 izolata (54,1%) dokazan je *seb*, zatim *sea* gen kod 4 izolata (10,8%), *sec*

gen kod 4 izolata (10,8%) i *see* gen kod 3 izolata (8,19%). Nijedan od enterotoksogenih izolata nije bio nosilac više od jednog gena [123].

Morandi S. i saradnici [124] su pregledom mleka (krava, koza, ovaca i bivolice) i proizvoda od mleka (gruš, sirevi stari 1-2 meseca, maslac i surutka) iz različitih regiona u Italiji izolovali 112 izolata *S. aureus* od kojih je 86 izolata izolovano iz uzoraka sirovog mleka i 26 izolata iz uzoraka proizvoda od mleka. Primenom metode reverzne pasivne lateks aglutinacije, dokazano je da *S. aureus* izolovan iz mleka stvara klasične enterotoksine (SEA-SED). Prisustvo gena za sintezu enterotoksina (*sea*, *sec*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* i *sel*) ispitali su multiplex-PCR tehnikom. Prisustvo gena za sintezu enterotoksina (*se*) dokazali su kod 67% izolata. Izolati stafilokoka iz mleka krava češće su stvarali SEA, SED i nosile *sej* gen, a stafilokoke izolovane iz mleka koza i ovaca češće su stvarale SEC i nosile *sel* gen.

U Brazilu su Rall V. [125] ispitali ukupno 162 uzorka mleka sa pet farmi i po 54 uzorka sirovog mleka iz glavnih tankova za mleko pre pasterizacije, posle pasterizacije i na dan isticanja roka trajanja pasterizovanog mleka. *S. aureus* dokazali su u 38 (70,4%) od 54 uzoraka sirovog mleka, u 8 (14,7%) uzoraka mleka odmah posle pasterizacije i 11 (20,4%) uzoraka pasterizovanog mleka na dan isticanja roka upotrebe. Nalaz *S. aureus* u mleku posle pasterizacije, prema mišljenju autora, posledica je neadekvatno sprovedene pasterizacije. Genotipizacijom izolata *S. aureus* utvrdili su 12 genotipova. Najčešće su dokazali *sea* gen, kod 16 (41%) izolata, zatim *seg* gen kod 11 izolata (28,2%), gen *sec* kod 2 (5,1%) izolata, *sed* gen kod 5 (12,8%) izolata, *seb* gen kod 3 (7,7%) izolata i *see* gen kod 2 (5,1%) izolata.

Arcuri EF. i saradnici [126] su u Brazilu iz 125 uzoraka mleka poreklom od krava sa mastitisom, 96 uzoraka sirovog mleka iz tankova i 70 uzoraka Minas svežih sireva, izolovali 291 izolat *S. aureus*. Prisustvo gena za sintezu enterotoksina stafilokoka (SE) (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *she*, *sei*, *selj* i *sell*) i *tst* gen ispitali su primenom PCR tehnike. Kod 109 (37,5%) izolata dokazano je prisustvo bar jednog od 11 gena. Najčešće su dokazali gene za sintezu enterotoksina kod izolata poreklom iz Minas sira (72,9%), zatim kod izolata poreklom iz uzoraka mleka iz tanka (41,7%) i kod izolata poreklom iz mleka krava sa subkliničkim mastitisom (13,6%). Kod 8 izolata dokazan je *tst* gen, ali nijedan nije bio poreklom iz mleka krava sa supkliničkim mastitisom. Veliki genotipski diverzitet potencijalno toksičnih izolata *S. aureus*, naročito iz Minas sireva, ukazuje na različite izvore kontaminacije.

Bendahou A. i saradnici [127] ispitali su 81 uzorak mleka i proizvoda od mleka, Iben (fermentisano mleko) i Jben (tradicionalni sir) u severnom Maroku na prisustvo *S. aureus*. Na sposobnost stvaranja enterotoksina (SEA-SED) i prisustvo SE gena ispitali su 44 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka. Od 44 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, 40 izolata

identifikovano je kao *S. aureus*, 2 izolata kao *Staphylococcus hyicus* i 2 izolata kao *Staphylococcus intermedius*. Rezultati su pokazali da je 18 (38%) izolata *S. aureus* stvaralo jedan ili više klasičnih enterotoksina (SEA, SEB, SEC i SED). Najveći broj izolata 11 (24%) stvarao je SEA, zatim SED 3 (6,5%) izolata. Primenom PCR tehnike dokazali su da 39 od 44 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka ima jedan od gena za stvaranje enterotoksina (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* i *seh*).

Prema literaturnim podacima hrana spremna za konzumiranje, koja je kontaminirana toksogenim *S. aureus* navodi se kao najčešći uzročnik oboljenja izazvanih hranom u Koreji. Tako su Oh SK. i saradnici [128] ispitali ukupno 332 uzoraka hrane spremne za konzumiranje. U 285 (8,6%) uzoraka dokazan je *S. aureus*, od toga u 31,6% krem kolača, 19,8% sirove ribe i 19,3% kolača od pirinča sa punjenjem. Dokazano je da 47% izolata iz hrane stvara enterotoksine. Fenotipska ispitivanja pokazala su da je 48% izolata stvaralo jedan, ili više toksina, kao što su stafilokokni enterotoksini A, B, C (SEA, SEB i SEC). Preko 90% izolata stvaralo je SEA. Dokazani su i drugi enterotoksini SEB, SEC, SED, SEA+SEC i SEC+SED. Za 13 izolata iz hrane dokazano je da stvaraju TSST-1 toksin. Genotipizacijom je dokazano prisustvo gena za toksine kod 22 izolata, kod kojih nije dokazano da stvaraju enterotoksine. Najčešće je bio zastupljen genotip *sea+seh* (34,4%), zatim *sea* (18,8%) i *sea+seg+sei* (15,6%). Gen *tst*, koji kodira TSST-1 dokazan je kod 13 (13,5%) izolata.

Bianchi DM. i saradnici [129] su, u periodu od januara 2010. do jula 2011. godine, analizirali ukupno 1245 uzoraka (848 uzoraka sirovog mleka i 397 uzoraka proizvoda od mleka) na prisustvo 11 enterotoksina stafilokoka i enterotoksinima sličnih toksina (SEA, SEB, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SER, SEIJ i SEIP). Iz 481 izolata *S. aureus* prisustvo jednog ili više gena dokazano je kod 255 (53%) izolata, a utvrđeno je 35 različitih profila gena za sintezu enterotoksina. Nije dokazano prisustvo *seb* i *sec* gena, dok je najčešće bio dokazan *ser* gen kod 134 (28%) izolata, zatim *sed* (25%) i *selj* (25%).

Ispitivanjem 220 uzoraka mleka i proizvoda od mleka Hassani S. i saradnici [130] su dokazali *S. aureus* u 58 (26,36%) uzoraka. Gen *sea* dokazali su kod 25% izolata poreklom iz mleka i 18% izolata poreklom iz sireva.

Pedonese F. i saradnici [131] proučili su rast *S. aureus* i stvaranje enterotoksina posle eksperimentalne kontaminacije u toku proizvodnje Caciotta (Ricota) italijanskog mekog sira proizvedenog od sirovog mleka sa i bez dodavanja komercijalnih starter kultura. Za eksperimentalnu kontaminaciju korišćena su dva različita inokuluma (5,03 i 3,22 log cfu/mL) *S. aureus*, koji ima sposobnost da stvara enterotoksine. U eksperimentu je ispitan sir proizveden od sirovog mleka kontaminiranog sa 2,15 log cfu/mL koagulaza pozitivnih

stafilokoka. U siru proizvedenom bez starter kulture sa većim inokulumom broj koagulaza pozitivnih stafilokoka je dostigao 7,57 log cfu/g i veće vrednosti posle faze acidifikacije, nego u siru proizvedenom sa starter kulturom (manje od 6,5 log cfu/g). Enterotoksini su dokazani u sirevima proizvedenim sa i bez starter kultura. U siru sa manjim inokulumom i bez starter kultura broj koagulaza pozitivnih stafilokoka bio je 5 do 6 log cfu/g i nije dokazano stvaranje enterotoksina.

Aydin A. i saradnici [132] analizirali su 1070 uzoraka hrane dobijene sa maloprodajnih tržišta i sa farmi mlečnih krava u regionu Marmara u Turskoj na prisustvo *S. aureus*. Od 147 izolata, 92 (62,6%) su bili enterotoksogeni. PCR je korišćen da se ispita prisustvo gena za stafilokokne enterotoksine (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq* i *seu*), ekfolijativni toksini (*eta* i *etb*) i gen za toksin šok sindrom *tst*. Rezultati PCR analize pokazali su da 53,3% izolata sadrže enterotoxin-like gene (*seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq* i *seu*) i bili su učestaliji od gena za sintezu klasičnih enterotoksina (*sea* do *see*). *tst* gen je bio detektovan i potvrđen DNA sekvenciranjem u 9 izolata. Prisustvo *sea* i *seb* nije utvrđeno u izolatima. Enterotoksogeni *S. aureus* izolati produkovali su jedan ili tri enterotoksina, a najviše su proizvodili enterotoksine A i C.

Radovanović SR. [133] ispitala je 555 uzoraka sira proizvedenog od kuvanog i nekuvanog mleka, i dokazala 168 (30,27%) koagulaza pozitivnih stafilokoka. ELFA tehnikom utvrđeno je da 26 (30,59%) izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka stvara klasične enterotoksine (SEA-SEE). Kod svih 26 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, izolovanih iz uzorka sira za koje je ELFA tehnikom utvrđeno da stvaraju enterotoksin, dokazan je gen za enterotoksin A (*sea*), a kod 24 izolata je pored *sea* gena dokazan i gen za sintezu enterotoksina B (*seb*). Nijedan izolat nije posedovao gene za sintezu enterotoksina C (*sec*), D (*sed*) i E (*see*).

Günaydın B. i saradnici [134] za cilj su imali da ispitaju prisustvo gena koji kodiraju enterotoksine (*sea-sej*) i toksin šok sindrom toksin - 1 (*tst*) na 130 sojeva *S. aureus* izolovanih iz subkliničkih mastitisa krava u Turskoj pomoću polimeraze lančane reakcije (PCR). Rezultati su pokazali da 61 (46,9%) izolat sadrži jedan ili više gena za sintezu toksina. Najčešći geni bili su *seg* (16,2%) i *sei* (16,2%), zatim *sec* (15,4%), *sed* (10,8%) i *sej* (10,8%). Gen *tst* bio je prisutan u 7 (5,4%) izolata. Nijedan soj *S. aureus* nije imao gene *sea*, *seb*, *see* i *seh*.

2.8. ELFA metoda

ELFA metoda (enzyme-linked fluorescent assay) zasniva se na povezivanju dvostrukog imunoenzimskog testa sa finalnom fluorescentnom detekcijom. Ova metoda slična je ELISA metodi, razlika je u supstratu koji se koristi, koji cepa enzim na fluorescentni proizvod. Dobijene hemijske promene detektuju se korišćenjem fotodiode fluorimetra. ELFA metoda primenjuje se u praksi u VIDAS sistemu, koji se široko koristi u kliničkoj mikrobiologiji: prilikom testiranja na hepatitis, AIDS, alergije, anemije, tiroidne hormone. U mikrobiologiji hrane razvijeni su VIDAS kompleti za određivanje *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria spp*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157 i stafilokoknih enterotoksina.

Vernozy-Rozand C. i saradnici [135] ustanovili su da VIDAS SET2 ima veću specifičnost (100%) i osetljivost u odnosu na VIDAS SET i ELISA metod – TRANSIA PLATE Staphylococcal Enterotoxins. VIDAS SET2 može da detektuje manje od 0,5 ng/g od toksina SEA i SEB, manje od 1 ng/g toksina SEC i SEE i blizu 1 ng/g toksina SED.

Stafilokokne intoksikacije koje su posledica ingestije niskog nivoa stafilokoknih enterotoksina, jedna je od najčešćih oblika oboljenja izazvana konzumiranjem hrane, pa postoji potreba za specifičnim i osetljivim metodama za otkrivanje tih enterotoksina. VIDAS SET2 je pogodan za otkrivanje stafilokoknih enterotoksina u uzorcima hrane (Slika 2.8.).



Slika 2.8. VIDAS[®] aparat

2.9. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

2.9.1. Istorija nastanka metode

Metodu PCR osmislio je Kary Mullis aprila 1983. godine. Mullis je, ustvari, razmišljao o novim načinima analize mutacija u DNK kada je shvatio da je slučajno otkrio metod za amplifikaciju bilo kog regiona DNK. Godine 1993. dobio je Nobelovu nagradu za svoja otkrića. Njegova ideja bila je da razvije proces kojim bi se omogućila veštačka multiplikacija DNK ponovljenim ciklusima i uz pomoć DNK polimeraze.

U prirodi, DNK polimeraza se nalazi u svim živim organizmima. Njena funkcija je da udvostručuje količinu DNK prilikom deobe ćelije u mitozu i/ili mejozi i to tako što se veže za jedan lanac DNK i stvara drugi komplementarni lanac. U Mullis-ovom originalnom procesu ovaj enzim koristio se u uslovima *in vitro*. Dvolančana DNK se zagrevala do 94°C, a onda su se lanci međusobno razdvojili. Međutim, u toku ovog postupka DNK polimeraza bila je uništena toplotom, tako da se u svakom ciklusu morala dodavati određena količina svežeg enzima. Prvobitni proces nije bio efikasan, budući da je zahtevao utrošak vremena, utrošak velike količine skupog enzima kao i kontinuiranu pažnju tokom postupka.

Kasnije je originalni proces značajno poboljšan dodavanjem DNK polimeraze izolovane iz termofilnih bakterija koje rastu u gejzirima pri temperaturama većim od 110°C. Izolovana DNK polimeraza iz ovih mikroorganizama stabilna je na visokim temperaturama i ne razgrađuje se tokom zagrevanja smeše prilikom koje dolazi do reverzibilne separacije lanaca DNK molekula. Prva termostabilna DNK polimeraza dobijena je iz bakterije *Thermus aquaticus*, pa je i dobila skraćenicu *Taq* polimeraza. Nedostatak ovog enzima je da, ponekad, pogrešno kopira DNK što dovodi do mutacija u DNK sekvenci. Uzrok pogrešnog kopiranja je što *Taq* polimeraza ne poseduje 3'→5' egzonukleaznu aktivnost (mehanizme koji proveravaju eventualne greške u nosintetisanom lancu DNK). Zato se danas koristi kombinacija *Taq* polimeraze (velika brzina polimerizacije) i *Pwo* ili *Pfu* polimeraze (poreklom od *Archaea*) koje imaju 3'→5' egzonukleaznu aktivnost, ali same veoma sporo polimerizuju nukleotidne molekule u lanac.

2.9.2. Princip metode PCR

Metoda PCR se u uslovima *in vitro* koristi za enzimsku replikaciju DNK, za razliku od drugih metoda kod kojih se upotrebljavaju živi organizmi (*E. coli* ili kvasci). Ova metoda koristi se za amplifikaciju kratkih, dobro definisanih delova DNK lanca. Kada se nakon određenog broja ciklusa nakupi dovoljno amplifikata, može se izvršiti adekvatna

identifikacija ciljane DNK, tj. utvrditi kojoj vrsti ciljane DNK pripada. Nasuprot živim organizmima, PCR metodom mogu se kopirati fragmenti DNK veličine obično do 10 kb što je mnogo manje od hromozomalne DNK eukariotskih ćelija koja sadrži 3×10^9 baznih parova.

Osnovne komponente PCR-a su:

- **DNK templat (šablon)**, koji sadrži region DNK fragmenta koji se treba amplifikovati;
- **Dva prajmera**, koja određuju početak i kraj DNK sekvence koja se amplifikuje;
- **Taq polimeraza**, DNK polimeraza koja kopira sekvencu koja se amplifikuje;
- **Dezoksinukleotid-trifosfate (dNTP-adenin, timin, citozin i gvanin)**, koji služe kao gradivni materijal za sintezu novih kopija;
- **Pufer**, koji obezbeđuje povoljnu hemijsku sredinu za enzimsko delovanje Taq polimeraze.

Metoda PCR izvodi se u „*thermocycler-u*“. Ovaj uređaj ima sposobnost brzog zagrevanja i hlađenja reakcionih epruvetica (tubica) na precizno određenu temperaturu koja je neophodna za svaki korak u reakciji. Da bi se sprečila evaporacija reakcione smeše (uobičajeni volumen smeše je od 15-100 μ L) na gornju stranu tubica postavlja se zagrejan poklopac ili se na površinu same smeše dodaje sloj ulja.



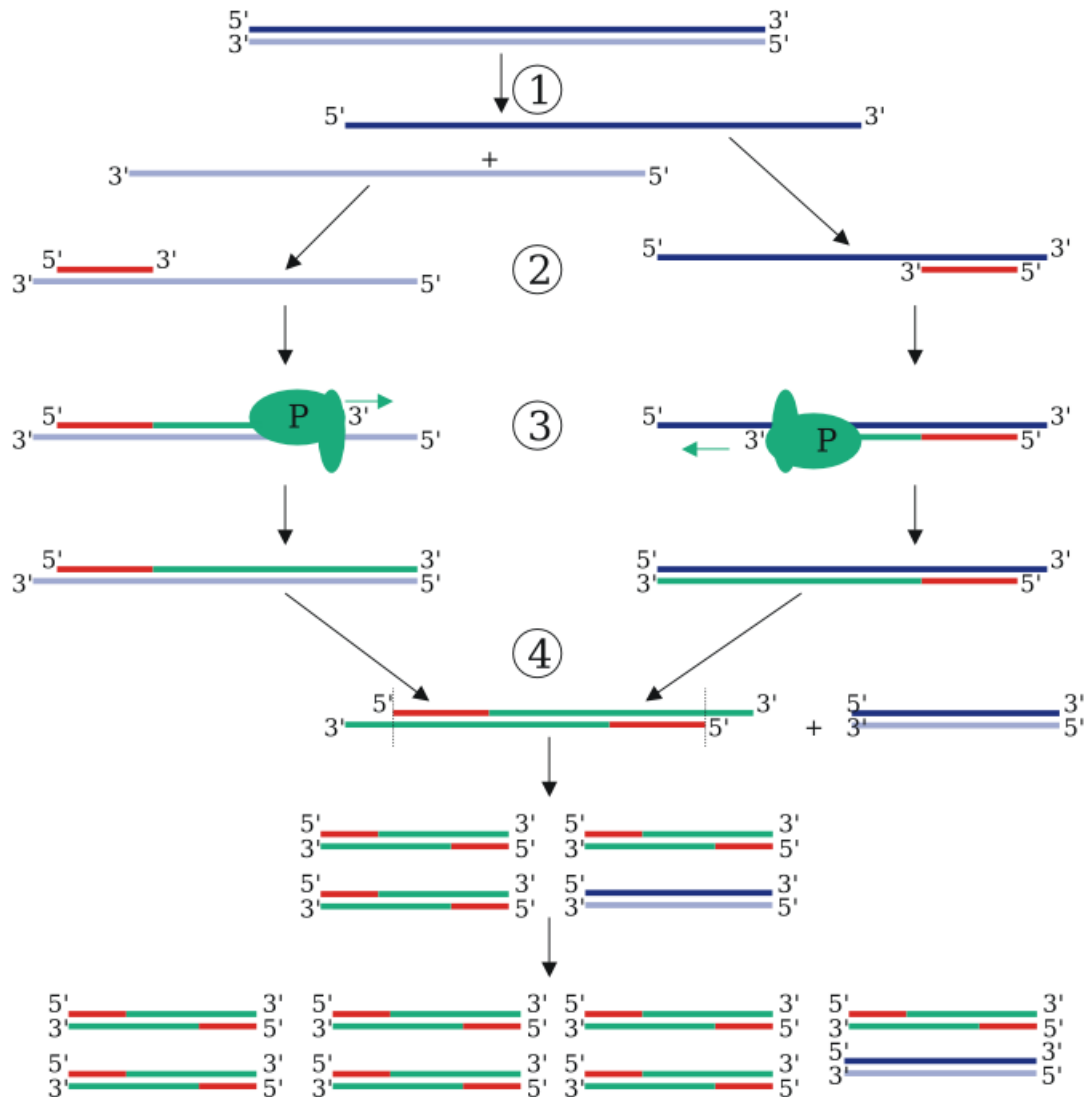
Slika 2.9.2a. Prikaz Thermocycler-a

Specifičan deo DNK koji se treba amplifikovati određen je parom prajmera. Prajmeri su kratki i veštački lanci DNK, dužine obično od 18-25 baznih parova koji su komplementarni sa početkom i krajem DNK sekvence koju treba amplifikovati. Proces njihovog vezivanja vodoničnim vezama za komplementarni deo ispitujuće sekvence naziva se *annealing*. Na mestu annealing-a, veže se DNK polimeraza koja počinje sintezu novog polinukleotida. Izbor dužine prajmera, kao i njegove temperature topljenja (*melting temperature, T_m*) zavisi od brojnih faktora. Temperatura topljenja prajmera nije isto što i temperatura topljenja DNK u prvoj fazi PCR procesa – to je temperatura pri kojoj je polovina mesta za vezivanje prajmera zauzeta. Temperatura topljenja povećava se sa povećanjem broja baza u prajmeru. Prajmeri koji su prekratki mogu se vezivati za više mesta u dugačkom DNK lancu, što ima za rezultat pojavu nespecifičnih kopija.

S druge strane dužina prajmera ograničena je temperaturom potrebnom za njegovo topljenje. Previsoke temperature topljenja (preko 80°C), mogu uzrokovati probleme u vidu smanjene aktivnosti DNK polimeraze kojoj aktivnost opada sa povišenjem temperature. Optimalna dužina prajmera je od 15-40 nukleotida i temperatura topljenja između 55°C i 65°C. Prilikom izbora prajmera, treba uzeti u obzir i sledeće faktore:

- Procenat G-C parova u prajmeru mora biti od 40-60%;
- T_m vrednosti prajmera ne smeju se međusobno razlikovati za više od 5°C, a T_m vrednost dobijenog amplifikata ne sme se razlikovati od T_m prajmera za više od 10°C;
- Temperatura „annealing-a“ mora biti za 5°C niža od najniže T_m vrednosti prajmera;
- Izbegavati prajmere u kojima spontano može nastati više od 8 dimera i više od 4 ukosnice;
- 3' terminus je izrazito osetljiv - ne sme biti komplementaran bilo kom regionu drugog prajmera (ili istog prajmera) koji se koristi u reakciji i mora obezbediti tačno podudaranje sa bazama u templatu.

Procedura PCR obično se sastoji od 25-35 ciklusa. Svaki ciklus sastoji se iz tri koraka:



Slika 2.9.2b. Prikaz PCR ciklusa

1. Denaturacija- Ispitujući uzorak dvolančane DNK zagreva se u thermocycler-u do temperature od 94°C-96°C. Pri ovoj temperaturi dolazi do reverzibilnog prekida vodoničnih veza između komplementarnih lanaca DNK i lanci se razdvajaju. Obično se pre ovog koraka izvrši inicijalno zagrevanje do navedenih temperatura da bi se osiguralo potpuno razdvajanje lanaca DNK, ali i prajmera. Ovaj korak traje 1-2 min.

2. Annealing- thermocycler naglo obara temperaturu da bi se prajmeri vezali za razdvojene lance DNK. Zbog visoke koncentracije prajmera u reakcionoj smeši sparivanje prajmera sa komplementarnim lancem ispitujuće DNK odvija se brže nego što bi se dva lanca DNK ponovo spojila. U ovom koraku temperatura se spušta za 5°C niže od T_m vrednosti prajmera, što znači obično od 45°C-60°C. Ovaj korak traje 1-2 min.

3. Elongacija-DNK polimeraza konačno može da počne da kopira DNK lance. Ona počinje polimerizovati dNTP molekule od mesta annealing-a i to u 5'→3' pravcu. Temperatura u ovom koraku zavisi od osobina same DNK polimeraze, ali obično je to 72°C. Dužina trajanja ovog koraka zavisi od dužine sekvence koja se amplifikuje, a pravilo je 1 minut na svakih 1000 baznih parova. Nakon završetka svih ciklusa primenjuje se *finalna elongacija* koja omogućava preostalim jednolančanim molekulima DNK da budu kopirani, što obično traje oko 10 minuta.

U toku procesa lančane reakcije polimeraze, količina nosintetisanog PCR proizvoda raste eksponencijalno, tj. 2, 4, 8, 16, 32, 64... 2^n . Na kraju 30 ciklusa ima 2^{30} kopija prvobitne količine ispitujuće DNK, tako da ovakav amplifikacioni potencijal pruža mogućnost da se iz 10-milionitog dela litra (0,1 μ L) bujona u kome se nalazi npr. 1-3 bakterije može rekonstituisati njihov celokupan genom.

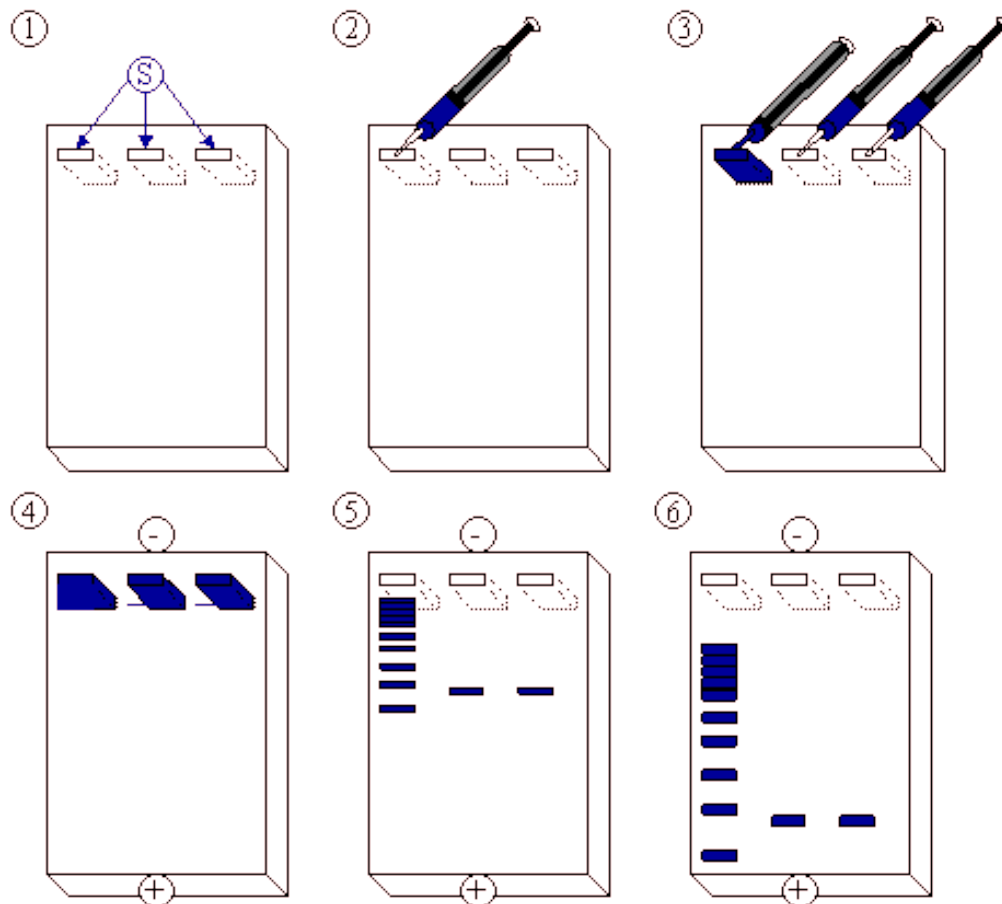
Po završetku finalne elongacije, PCR proizvod se ostavlja na 4°C u slučaju da se daljnji postupak nastavlja sutradan (izlaganje preko noći na temperaturi od 4°C ne oštećuje nosintetisani DNK fragment).

Sledeća faza je vizuelizacija dobijenog proizvoda. Vizuelizacija se izvodi metodom agaroz-gel elektroforeze i prosvetljavanjem uzoraka primenom UV zraka. Agaroz-gel elektroforeza koristi se u molekularnoj biologiji za separaciju DNK lanaca, na osnovu njihove različite elektroforetske pokretljivosti u polju jednosmerne električne struje kroz gel agarozu, radi procene njihove molekulske veličine poređenjem sa fragmentima poznate dužine (DNK ladder sin. DNK marker). Metoda se zasniva na različitoj brzini kretanja negativno naelektrisanih molekula DNK (pri neutralnom pH) ka pozitivnom polu kroz agarozni matriks, pri čemu molekuli manje veličine (manje baznih parova) prolaze brže, a veći molekuli kreću se sporije.

Da bi se trake DNK proizvoda videle, neophodno je u agaroz gel dodati boju *etidijum bromid* (*EtBr*). Etidijum bromid je boja koja se interkalarno veže za DNK (veže se za malu i veliku krivinu dvolančanog DNK molekula i razmotava ga) i pod uticajem UV svetlosti (od 254-365 nm) snažno fluorescira.

Osim EtBr, u sam uzorak PCR proizvoda dodaje se „*loading buffer*“. To je puferska smeša koja se sastoji od glicerola i indikatora kao što je bromfenol-plavo ili Orange G. Glicerol ima ulogu da PCR produkt učini gušćim i istaloži ga na dno „bazenčića“ u gelu, dok navedene boje imaju ulogu vizuelnog indikatora napredovanja traka u toku elektroforeze. Bromfenol-plavo koristi se za indicaciju PCR proizvoda veličine od 300-5000 bp, dok se Orange G koristi za indicaciju PCR proizvoda veličine od 50-125 bp. Sam gel potapa se u

odgovarajući puffer (1×Tris-BoRNK kiselina-EDTA) i elektroforeza može početi. Trajanje elektroforeze zavisi od veličine gela i rezolucije koju želimo, ali za gel dužine 15 cm obično traje 1,5h pri 8V/cm.



Slika 2.9.2c. Prikaz agarozna gel elektroforeze

2.9.3. Razvoj kvantitativnog PCR-a

Konvencionalna PCR metoda je od svog uvođenja 1985. godine preovladala kao metoda izbora u medicinskoj dijagnostici i opštoj analitici. Međutim, vremenom je uočeno da ima određene manjkavosti. Naime, iako je ovom tehnikom omogućena sinteza velikog broja kopija gena, nije moguće utvrditi početnu količinu ispitujućeg DNK materijala. Takođe, konvencionalnim PCR-om moguća je samo kvalitativna detekcija akumulisanog PCR proizvoda i to tek na kraju reakcije. Paradoksalno je što visoka osetljivost ove metode predstavlja i ograničenje, jer se mogu detektovati i male količine drugih, kontaminirajućih, DNK. Konačni rezultat PCR reakcije zavisi i od kvaliteta i količine target sekvence DNK u uzorku, kvaliteta *Taq* polimeraze, količine slobodnih dinukleotid trifosfata, količine $MgCl_2$, kvaliteta i količine prajmera itd. Pojačan naučni interes za ovu problematiku doveo je do

saznanja o kinetici reakcije lančane polimeraze i otvorio mogućnost kvantifikacije ispitujućeg DNK materijala u uzorku.

Tokom 1992. godine objavljeni su prvi naučni radovi o *Real Time* PCR-u (poznatom i kao kvantitativni PCR). Osnovna prednost nove tehnike bila je mogućnost kvantifikacije početne količine ispitujuće DNK u uzorku i izbegavanje post-PCR manipulacije (upotreba etidijum bromida i elektroforeza u gelu).

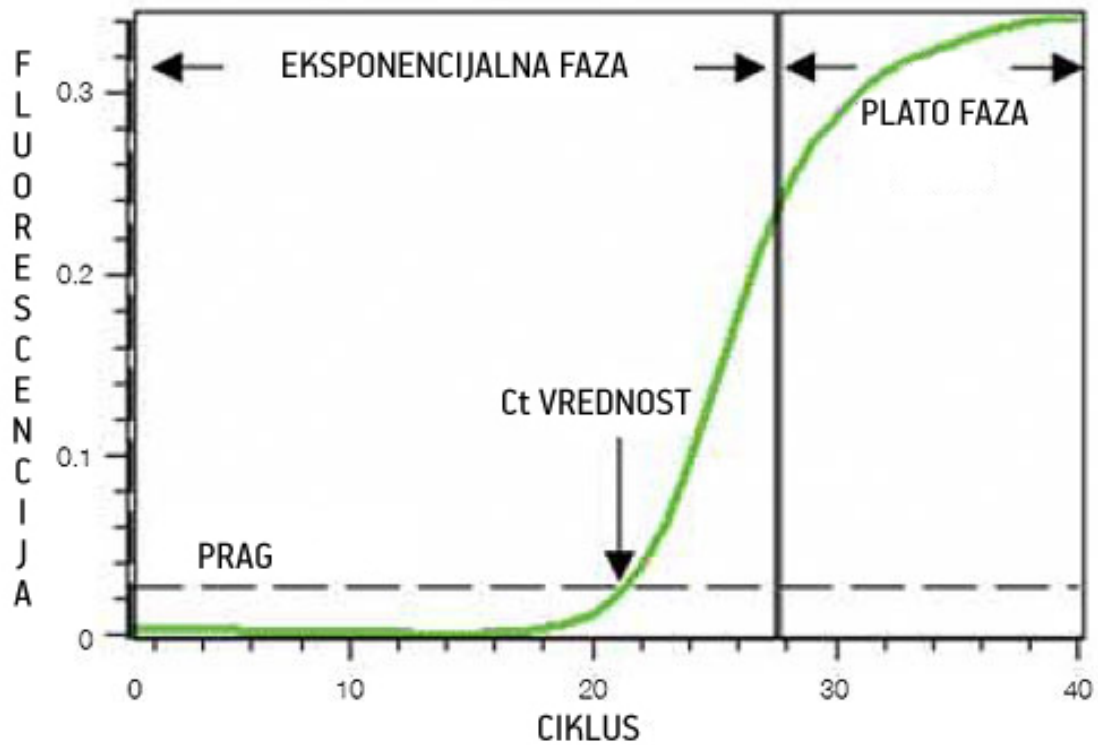
2.9.4. *Real Time* PCR

Evolucija PCR tehnike dovela je do drastičnog smanjenja vremena potrebnog za ispitivanje, do smanjenja količine neophodnih hemijskih reagenasa kao i do izbegavanja korišćenja radioaktivnih i toksičnih supstanci. To je omogućeno upotrebom samo jednog uređaja, *Real Time* PCR thermalcycler-a. U poređenju sa konvencionalnim PCR-om, *Real Time* PCR ne samo da ima veću osetljivost, već su poboljšani specifičnost, preciznost i interval kvantifikacije nepoznatog uzorka.

Princip funkcionisanja *Real Time* PCR-a je da se tokom PCR reakcije meri količina akumuliranih PCR proizvoda i to tako što se u klasičnu reakcionu smešu dodaje fluorescentna boja koja se, po okončanju svakog ciklusa, interkalarno veže za novosintetisani DNK fragment. Kompjuterski kontrolisana CCD kamera potom snima intenzitet svetlosti koju UV-pobuđena boja emituje iz reakcione smeše. Obzirom da se amplifikacija fragmenata DNK tokom PCR reakcije odvija eksponencijalno, eksponencijalno se povećava i fluorescencija. *Real Time* PCR sistem upoređuje intenzitet fluorescencije u odnosu na svaki ciklus i prikazuje kinetiku PCR procesa u obliku amplifikacione krivulje. Na taj način postalo je nepotrebno koristiti finalni DNK proizvod, jer njegova količina u finalnoj fazi PCR reakcije nije proporcionalna količini na početku reakcije.

Amplifikaciona krivulja koja predstavlja PCR proces samo je teoretski eksponencijalna. U stvarnosti, ona je eksponencijalna samo u prvim ciklusima PCR reakcije, dok je količina raspoloživih reaktanata u reakcionoj smeši velika. Nakon nekoliko ciklusa (obično oko 15) kriva postaje izrazito linearna, dok primicanjem kraja PCR reakcije poprima plato oblik. Mogućnost da pratimo reakciju tokom realnog vremena dozvoljava nam da analiziramo trenutak kada je amplifikacija u eksponencijalnoj fazi.

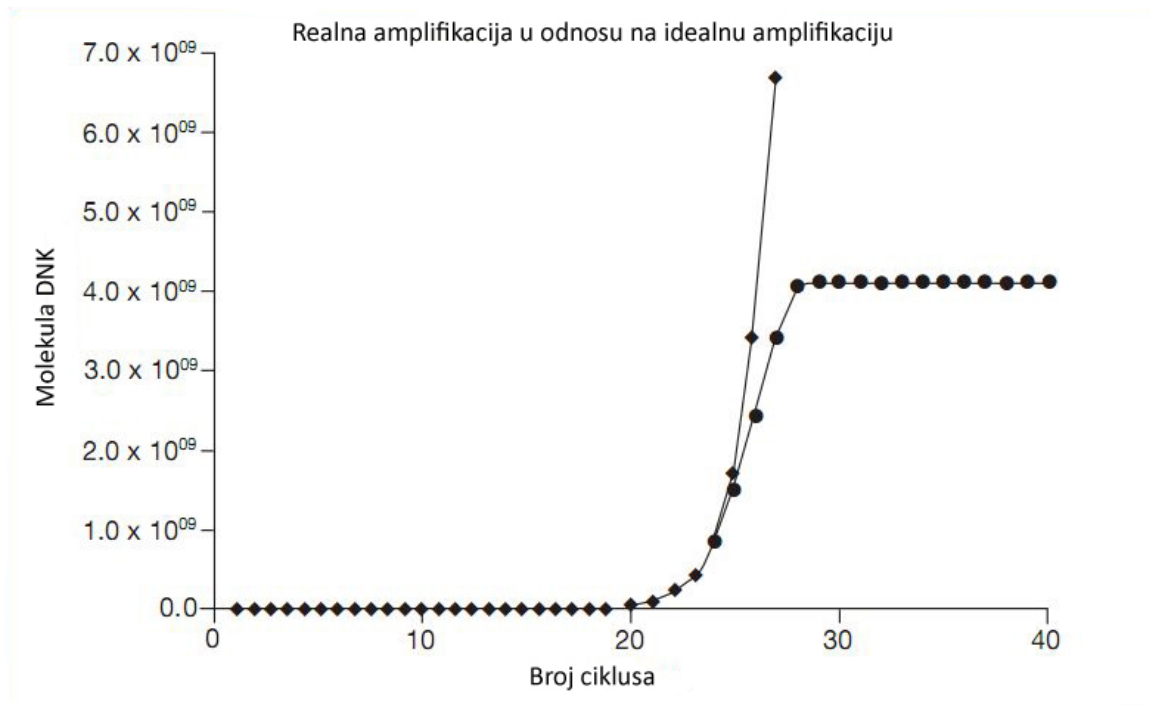
Tok reakcije vizuelno se predstavlja grafikonom u kome je za svaki uzorak DNK definisan relativni intenzitet fluorescencije (Y-osa) pri određenom ciklusu PCR reakcije (X-osa) (Slika 2.9.4.).



Slika 2.9.4a. Prikaz amplifikacione krivulje u *Real Time* PCR-u

U prvim ciklusima *Real Time* PCR reakcije ne postoje merljive varijacije intenziteta fluorescencije, ali u istom periodu se definiše prvi značajan parametar – **bazna linija amplifikacione krivulje**. Povećanje fluorescencije iznad bazne linije predstavlja početak faze akumulacije DNK proizvoda. Drugi značajan parametar je **linija praga**. Ova linija je paralelna baznoj liniji, a presecu amplifikacionu krivu u fazi ekspanzije rasta intenziteta fluorescencije. U cilju tačne kvantifikacije početne količine ispitujuće DNK neophodno je da položaj linije praga bude što precizniji. Tokom *Real Time* PCR reakcije položaj linije moguće je podesiti automatski, poluautomatski ili ručno.

Amplifikaciona krivulja svakog ispitujućeg uzorka presecu liniju praga u određenom ciklusu PCR reakcije. Taj ciklus naziva se **ciklus praga (threshold cycle)** i označava kao C_t . Presecanje dve linije nastupa u trenutku ekspanzije porasta intenziteta fluorescencije. Linija praga tako predstavlja početnu količinu ispitujuće DNK. Logaritamski prikaz količine DNK proizvoda u odnosu na cikluse PCR reakcije je prava linija (Slika 2.9.4b).



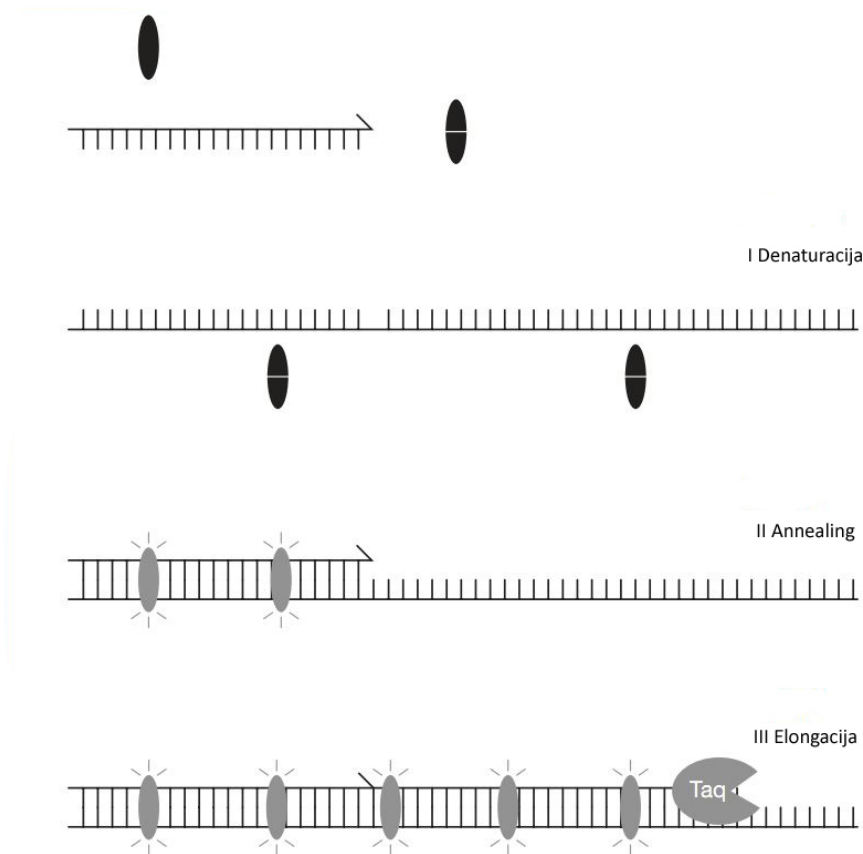
Slika 2.9.4b. Prikaz količine DNK u odnosu na cikluse tokom PCR reakcije

Iz napred navedenog proizlazi da je, ukoliko se kroz *Real Time* PCR sistem paralelno propuste uzorci sa poznatom količinom DNK (standardi) i ispitujući uzorci, poređenjem C_t vrednosti, moguće utvrditi početnu količinu DNK materijala u ispitujućem uzorku.

Emitovanje fluorescencije podrazumeva da se u reakcionoj smeši, pored klasičnih hemijskih reagenasa, nalaze:

1. interkalarnе boje koje imaju afinitet za malu i/ili veliku pukotinu DNK i fluoresciraju ukoliko se osvetle UV svetlošću ili
2. hibridizacione probe, tj. specifične oligonukleotidne sekvence koje na svom 5' kraju imaju fluorescentni molekul pod nazivom „reporter“, a na 3' kraju molekul pod nazivom „quencher“.

Najčešće korišćena interkalaRNK boja u *Real Time* PCR sistemu je SYBR Green I. Ova boja se vezuje za malu pukotinu DNK lanca i tom prilikom fluorescira približno 2000 puta jače nego kada se slobodna u reakcionoj smeši. Svakim ciklusom amplifikacije intenzitet fluorescencije vezane boje se udvostručuje. Međutim, ova boja se nespecifično vezuje za DNK lanac tj. ukoliko je u uzorku prisutna i najmanja količina kontaminirajuće DNK, ista će se koamplifikovati sa ispitujućom DNK. Rezultat je da intenzitet fluorescencije neće odgovarati realnoj količini ispitujuće DNK (Slika 2.9.4c.).



Slika 2.9.4c. Prikaz SYBR Green I

Otkrićem fizičkog fenomena FRET (fluorescence resonance energy transfer) omogućen je daljnji razvoj hemijskih reagenasa i poboljšana je specifičnost *Real Time* PCR sistema. Za nastajanje FRET fenomena neophodna su dva molekula koji mogu međusobno reagovati i od kojih bar jedan mora da ima sposobnost fluorescencije. Fluorescentna komponenta naziva se **donor**, a drugi molekul naziva se **akceptor**. Ukoliko se donor pobudi svetlosnom energijom iz spoljnog izvora čija je talasna dužina jednaka ili približna njegovoj talasnoj dužini ekscitacije, on će emitovati svetlosnu energiju veće talasne dužine nego ekscitatorNK (Stoksov zakon). Međutim, *Real Time* PCR sistem neće detektovati ovu svetlost jer će akceptor, koji se nalazi u neposrednoj blizini donora, apsorbovati emitovanu svetlosnu energiju i „ugasiti“ (quenching) donora. Akceptor može, ali i ne mora reemitovati apsorbovanu svetlost. Optimalna udaljenost između dva molekula kreće se između 1-10 nm. Drugi neophodni zahtev za nastajanje FRET fenomena je da ekscitaciona talasna dužina akceptora mora biti bliska njegovoj emitovanoj talasnoj dužini. Neki od najčešće korišćenih donora i akceptora u *Real Time* PCR sistemu navedeni su u tabeli 2.9.4.

Tabela 2.9.4. Donori i akceptori u *Real Time* PCR sistemu

Nespecifične boje	Max. ab (nM)	Max. em (nM)
SYBR [®] Green I	497	525
EvaGreen [™]	497	525
BOXT0 [™]	515	552
„Reporter“ boje	Max. ab (nM)	Max. em (nM)
Pulsar [®] 650	460	650
Fluorescein [™]	492	520
6-FAM	494	518
Alexa 488 [™]	495	519
JOE [™]	520	548
TET [™]	521	536
Cal Fluor Gold 540 [™]	522	544
Yakima Yellow [™]	530	549
HEX [™]	535	556
Cal Fluor Orange 560 [™]	538	559
VIC [™]	538	554
Quasar [®] 570	548	566
Cy3 [™]	552	570
TAMRA [™]	565	580
Cal Fluor Red 590 [™]	569	591
Redmond Red [™]	579	595
ROX [™]	580	605
Cal Fluor Red 635 [™]	618	637
LightCycler [®] 640	625	640
Cy5 [™]	643	667
Quasar [®] 670	647	667
LightCycler [®] 705	685	705
„Quencher“ boje	Max. ab (nM)	Max. em (nM)
DABCYL	453	-
BHQ0 [™]	495	-
Eclipse [™]	522	-
Iowa Black [™] FQ	531	-
BHQ1 [™]	534	-
BHQ2 [™]	579	-
Iowa Black [™] RQ	656	-
BHQ3 [™]	680	-

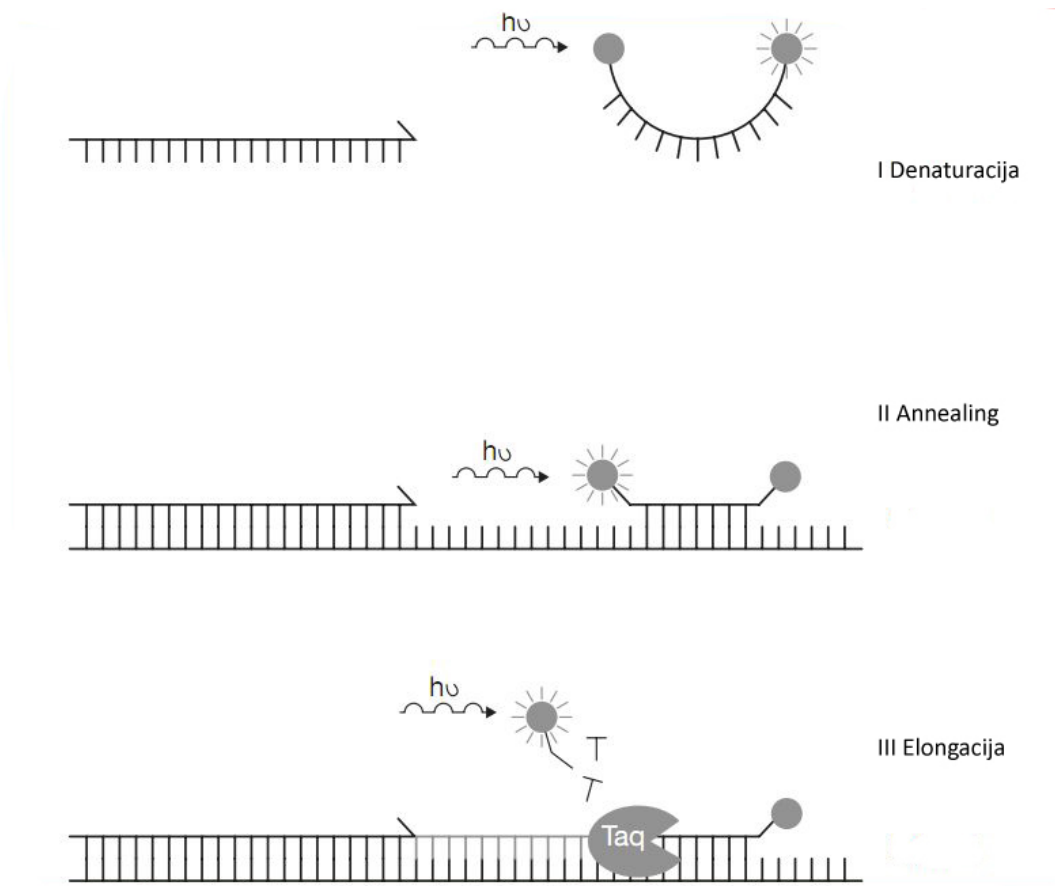
Strategija razvoja podrazumevala je ispitivanje različitih hibridnih fluorescentno obeležnih proba koje bi se „ugnezdile“ u ispitujuću sekvencu DNK omeđenu parom prajmera. Na taj način bi intenzitet fluorescencije rastao ukoliko bi bio amplifikovan ispitujući segment, dakle poboljšava se specifičnost. Primenom nove tehnike u reakcionoj smeši više ne postoji nespecifična fluorescentna boja.

Koristeći ovaj tip razvijanja fluorescencije razvijena su tri tipa *Real Time* PCR testova:

1. „*Cleaveage based*“ - zasnivaju se na enzimskom cepanju (hidrolizi) sekvence koja na sebi nose fluorescentne hromofore;
2. „*Displacable probes*“ – zasnivaju se izbacivanju probe sa ispitujuće sekvence i ponovnom iskorištavanju usled promene tercijarne strukture;
3. Testovi koji koriste probu vezanu direktno za jedan od prajmera

Osnovna prednost hibridizacionih proba u odnosu na interkalarne leži u činjenici da je za generisanje fluorescentnog signala neophodna specifična hibridizacija između sekvence sa hromoforima i ispitujuće DNK. U ovom slučaju nespecifične amplifikacije kao što su „mispriming“ i stvaranje dimera ne generišu signal.

U „*Cleaveage based*“ testovima najčešće se koristi *TaqMan* proba (Slika 2.9.4d.). *TaqMan* je oligonukleotid koji je komplementaran sekvenci ispitujuće DNK omeđene parom prajmera. Za ovaj oligonukleotid na 5' kraju kovalentno je vezan hromoforni molekul „Reporter“, a na 3' kraju hromoforni molekul „Quencher“. „Reporter“ molekul konstantno emituje fotone, ali fotonska energija se prenosi na „quencher“ molekul **bez emitovanja svetlosti**. U *TaqMan* probama kao „reporter“ hromofora najčešće se koristi FAM (6-carboxyfluorescein), a kao „quencher“ molekul TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine). Proba se ne raspada dok se nalazi u reakcionoj smeši, već samo u PCR fazi „annealinga“.

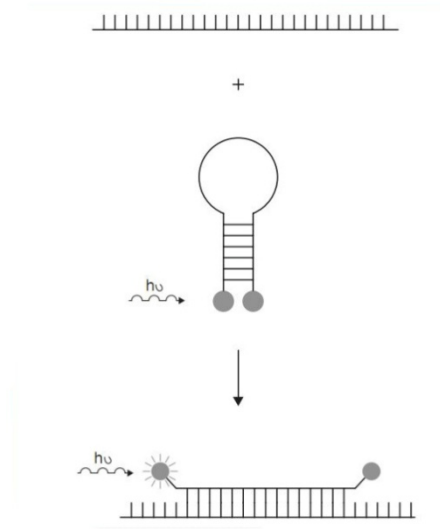


Slika 2.9.4d. TaqMan proba

Tokom faze ekstenzije PCR reakcije polimeraza koja, krećući se po jednolančanom DNK lancu sintetiše komplementaran lanac, nailazi na *TaqMan* oligonukleotid i 5' nukleaznom aktivnošću hidrolizuje i izbacuje „reporter“ sa novosintetisanog lanca. Hromoforni molekul „reporter“ udaljava se od svog „quencher“ i emituje se svetlost. Intenzitet fluorescencije direktno je proporcionalan koncentraciji specifičnog amplifikata. Esencijalno je da se *TaqMan* proba veže za komplementarnu sekvencu brže od prajmera tako da fluorescentni signal zaista potiče od svakog novosintetisanog amplikona. *Taq* polimeraza veoma brzo po vezivanju prajmera počinje elongaciju DNK lanca. Iz ovih razloga hidrolizne probe se konstruišu tako da im je T_m za 9-10°C veća od T_m prajmera

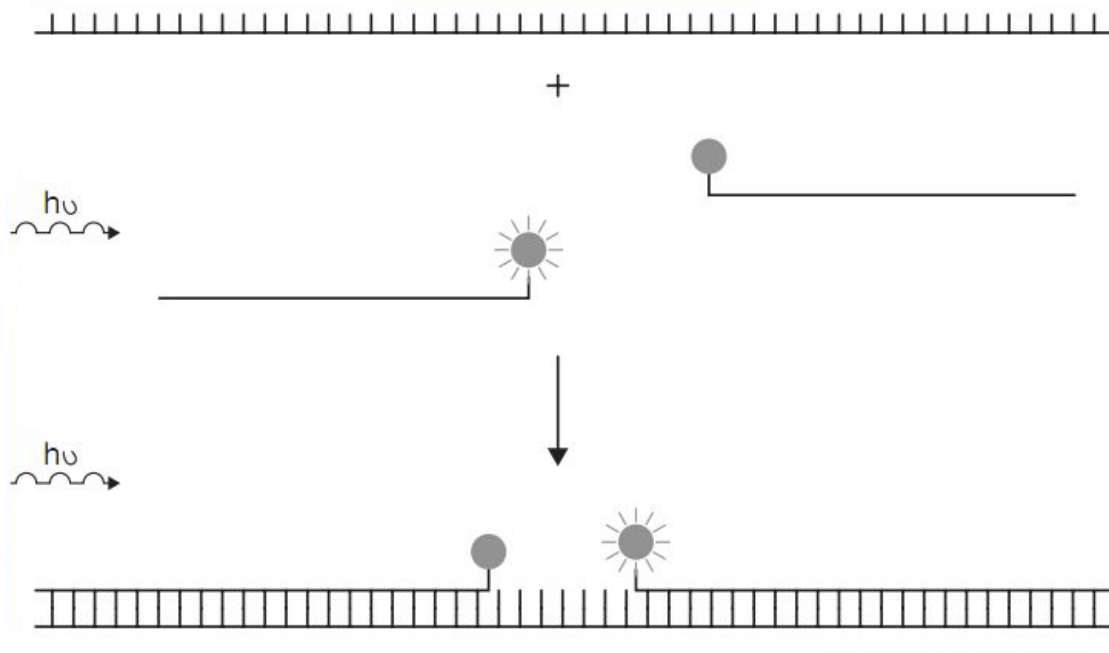
U „*Displacable probes*“ testovima koriste se oligonukleotidi poznati kao „*Molecular Beacons*“. Ovi oligonukleotidi slični su *TaqMan* probama u smislu da su takođe obeleženi „reporter“ i „quencher“ hromofornim molekulima i da je njihova T_m veća od prajmera korišćenih u testu. Međutim, za razliku od hidroliznih proba, generisanje signala kod „*molecular beacons*“ ne zavisi od cepanja probe. „*Molecular Beacons*“ poseduju na oba kraja

samokomplementarnu sekvencu dužine 4-6 baza. U vodenom rastvoru krajevi su savijeni u energetski povoljnu strukturu oblika ukosnice. Na taj način „reporter“ i „quencher“ nalaze se u neposrednoj blizini jedan drugome i stvaraju blisku FRET vezu. Za vreme PCR faze „annealinga“, proba se razmotava, boje se odvajaju i *Real Time* PCR sistem detektuje signal „reportera“ (Slika 2.9.4e.).



Slika 2.9.4e. Molecular Beacons

Konačno, kod nekih testova hibridizaciona proba sadrži dva oligonukleotida koji se vezuju između prajmera i svaki od njih nosi po jednu fluorescentnu boju. Što je oligonukleotid 5' krajem bliži sekvenci „forward“ prajmera, eksprimira se sve više donora na 3' kraju, a drugi oligonukleotid eksprimira sve više akceptora na 5' kraju. Kada se probe vežu, donor i akceptor se nalaze u neposrednoj blizini, udaljeni samo 1-3 baze. Donor (fluoresceinska boja) apsorbuje svetlosnu energiju iz spoljnog izvora i FRET fenomenom predaje ju akceptoru (rodaminska boja). Ovim putem *Real Time* PCR sistem detektuje signal akceptora, umesto donora kao što je to slučaj kod prethodnih varijanti hibridizacionih proba (Slika 2.9.4f.).



Slika 2.9.4f. hibridizacione probe

2.9.5. Kvantifikacija u *Real Time* PCR sistemu

Postoje dve osnovne metode za kvantifikaciju u *Real Time* PCR sistemu: apsolutna i relativna. Apsolutna kvantifikacija je najprecizniji i najdirektniji način za analizu kvantitativnih podataka jer koristi standardnu krivu, koja predstavlja odnos koncentracije decimalnih razređenja DNK pozitivne kontrole i odgovarajuće Ct vrednosti. Ovaj metod se koristi u situacijama kada se zahteva merenje tačne koncentracije DNK u uzorku. Kao standard se mogu koristiti različiti reagensi: genomska DNK, cDNK, plazmidska DNK, sintetički oligonukleotidi, *in vitro* transkripti ili ukupna RNK. Nakon amplifikacije serije standarda, standardna kriva se pravi tako što se na apscisu nanose početne logaritamske vrednosti broja kopija šablona, a na ordinatu odgovarajuće Ct vrednosti. Ukoliko je pipetiranje bilo tačno i efikasnost reakcije bila konstantna, dobijena linija je prava. U idealnom slučaju kriva treba da sadrži minimalno 4 vrednosti, s tim da svaka vrednost mora biti ponovljena bar u duplikatu. Opseg koncentracija za izradu standardne krive mora biti takav da obuhvata koncentracije koje će se koristiti u eksperimentu (nekoliko redova veličine). Sem toga, prava mora biti linearna u celom opsegu koncentracija. Linearnost se označava koeficijentom R^2 (Pearsonov koeficijent korelacije) i on treba da bude što bliži vrednost 1 (minimalno $> 0,985$). Ukoliko kriva postaje nelinearna pri veoma niskim koncentracijama kopija DNK to je znak limita detekcije testa. Nepoznati uzorci čije se Ct

vrednosti nalaze u nelinearnom delu krive ne mogu se tačno kvantifikovati. U idealnom slučaju, efikasnost reakcije kod standarda i uzoraka trebala bi da varira između 90 i 110%. Stoprocentna efikasnost označava da se u svakom ciklusu od šablona stvore 2 amplikona. Ukoliko je efikasnost značajno niža, to ukazuje da je reakcija usporena bilo zbog prisustva inhibitora u reakcionoj smeši bilo zbog suboptimalnih uslova reakcije. U obrnutom slučaju, ukoliko je efikasnost veća od 100% to ukazuje na grešku u eksperimentu (pogrešno kalibrisana pipeta, inhibitori PCR reakcije, degradacija probe, stvaranje nespecifičnih proizvoda ili prajmer-dimera). Stvaranja prajmer dimera najveći je problem kod ispitivanja u kojima se koristi SYBR Green boja, gde se mogu detektovati bilo koji dvolančani fragmenti. Devijacije u efikasnosti takođe mogu biti posledica loše laboratorijske prakse, najčešće loše pripremljenih decimalnih razređenja ili prevelikog opsega koncentracija. Idealno bi bilo da devijacija efikasnosti standarda i uzoraka ne premaši 5%, s tim da bi obe trebale biti blizu 100%.

Kada se optimizuju eksperimentalne procedure za standarde i uzorke, mogu se upoređivati njihove Ct vrednosti i utvrditi početne količine ispitujuće DNK u uzorku. Veoma je važno da se standardi i uzorci istovremeno obrade u *Real Time* PCR sistemu, obzirom da Ct vrednosti variraju u zavisnosti od vremena ispitivanja, test pločice itd. i kao takve nisu direktno uporedive. Takođe, u ispitivanju bi trebalo koristiti 2-3 negativne kontrole, a kod reverzna transkripcija *Real Time* PCR sistema bar 2-3 negativne kontrole bez enzima reverzne transkriptaze.

Relativna kvantifikacija koristi se u naučnim ispitivanjima ekspresije gena. U ovom slučaju meri se relativna koncentracija ciljnog gena u nepoznatom uzorku u odnosu na kalibrator ili kontrolni uzorak. Relativna kvantifikacija ne meri tačnu koncentraciju DNK u delu uzorka za ispitivanje, već povećanje ili smanjenje koje se izražava u odnosu na neki drugi uzorak (relativno).

Endogena kontrola je normalizator količine DNK u uzorku, to je uvek neki gen koji se eksprimira bez obzira na eksperimentalne uslove. Obično se koriste tzv. „housekeeping“ geni

Kalibrator je uzorak koji služi kao referentna vrednost za ekspresiju ciljnog gena (u slučaju kada imamo uzorke gena iz eksperimentalnih grupa, koje su na neki način tretirane, to je uvek kontrolna - netretirana grupa ili vrednost nultog časa – kod eksperimenata sa ispitivanjem uticaja vremena).

Relativna kvantifikacija podrazumeva poređenje Ct vrednosti ciljnog gena (i ispitujućeg uzorka i kalibratora) sa endogenom kontrolom (to je tzv. normalizacija ciljnog gena):

$$\Delta Ct = Ct \text{ target gena} - Ct \text{ endog. Kontrole}$$

Nakon toga poredi se ΔCt uzorka sa ΔCt kalibratora tj:

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct \text{ uzorka} - \Delta Ct \text{ kalibratora}$$

Komparacija se vrši softverski, a na istraživaču je samo analiza rezultata. Prilikom dizajniranja testa komparativne kvantifikacije (KK) nije neophodno praviti standardnu krivu za svaku test pločicu kao što bi trebalo kod apsolutne kvantifikacije. Rezultati se u ovom slučaju iskazuju kao razlika ciljnog gena i normalizatora u eksperimentalnim uslovima u odnosu na iste vrednosti kod kontrolnih uzoraka.

Obzirom da je stepen ekspresije normalizatora konstantan, svaka varijacija u Ct vrednosti normalizatora može se pripisati varijacijama spoljnih faktora kao što je efikasnost reverzne transkripcije ili varijacije u broju ćelija iz kojih se izoluje RNK. Ovi izvori varijacije podjednako utiču i na normalizator i na ciljni gen, tako da se razlika u Ct vrednostima normalizatora od uzorka-do uzorka koristi kao korektivni faktor za razlike u Ct vrednostima ciljnog gena koje nisu plod različitog stepena ekspresije gena.

2.9.6. Reverzna transkripcija – *Real Time* PCR

Reverzna transkripcija – *Real Time* PCR (RT-PCR) je varijanta lančane reakcije polimeraze koja se u molekularnoj biologiji koristi za sintezu DNK, a najveću primenu nalazi u ispitivanju genske ekspresije. Naime, jedini način da se ispita funkcionalni genetski profil prokariota je relativna kvantifikacija molekula iRNK određenog gena. Za razliku od običnog PCR-a, polazni molekul je jednolančana RNK sa koje se pomoću enzima reverzne transkriptaze sintetiše komplementarna DNK (cDNK). Reverzna transkriptaza prvi put je opisana 1975. godine od strane Temina i Dulbeccs. Ovaj enzim sintetišu virus Moloney leukemije miševa (M-MLV) i virus ptičje mijeloblastoze (AMV). Virus humane imunodeficijencije takođe sintetiše HIV-1 reverznu transkriptazu. Ovi enzimi poseduju RNKza H aktivnost, tj. mogu da razgrađuju RNK u DNK-RNK hibridnim lancima. AMV ima nešto jače izraženu RNKza H aktivnost u odnosu na M-MLV. RNKza H aktivnost ne utiče na RNK-zavisnu DNK polimeraza aktivnost koja transkribuje jednolančani molekul RNK u

komplementaran DNK lanac. Iako su fizička svojstva AMV reverzne transkriptaze bolja u odnosu na M-MLV (dimer naspram monomera, otporna na visoku temperaturu itd.) u praksi se najčešće koriste genetski modifikovana M-MLV reverzna transkriptaza jer ova svojstva predstavljaju fizičku barijeru za *Taq* polimerazu.

U RT-PCR reakciji glavni korak je sinteza cDNK obzirom da *Taq* polimeraza deluje samo na DNK lanac. Ovaj korak može se izvesti u istom reakcionom sudu kao i PCR (*one-step PCR*) ili u posebnim sudovima (*two-step PCR*). Za aktivnost reverzne transkriptaze optimalna temperatura iznosi od 40-50°C.

Postoji više načina da se započne reakcija reverzne transkriptaze: primena oligo-dT sekvenci, nasumični prajmeri ili test-zavisni prajmeri. Svaka od opcija ima svoje *pro et contra* razloge za korišćenje, a najbolje je da se izbor načina usaglasi sa formatom *Real Time PCR* reakcije koja se primenjuje nakon reverzne transkripcije.

Oligo-dT prajmeri se često koriste zato što se vezuju za informacionu RNK u regionu sa poly-A sekvencama. Međutim, nemaju sve iRNK poly-A sekvence, a kod nekih se one nalaze unutar funkcionalnog dela RNK molekula. Upotreba nasumičnih prajmera omogućava transkripciju ribozomalne i transportne RNK, čineći tako sastav reakcione smeše gušćim i olakšavajući pogrešno sparivanje lanaca za vreme PCR reakcije. Najbolji način za početak reverzne transkripcije je korišćenje test-zavisnog prajmera, u ovom slučaju reverznog prajmera. Na ovaj način se, teoretski, obezbeđuje da svaki potencijalni transkript usmeren ka PCR testu ima sintetisanu odgovarajuću cDNK. Sem toga, dužina svake sekvence cDNK može biti identična dužini amplikona. Inače, za bilo koji oblik *Real Time PCR* reakcije maksimalna dužina amplikona je 250 baza.

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Poznato je da sve koagulaza pozitivne stafilokoke nisu i enterotoksične. Nalaz enterotoksogenih stafilokoka u hrani također ne znači da će doći do trovanja, jer uslovi matriksa hrane i sredine određuju preživljavanje, rast populacije stafilokoka i stvaranje dovoljnih količina enterotoksina koje mogu izazvati oboljenje ljudi. Međutim, literaturni podaci o uticaju paragenetskih faktora (uticaj temperature, vremena čuvanja, matriksa itd.) na genetsku regulaciju virulentnosti veoma su ograničeni. Pored opsežnih istraživanja koja se provode dugi niz godina ostaje još pitanja koja treba razjasniti sa aspekta objektivne procene rizika.

Zbog toga cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je da se ispita stepen ekspresije gena za sintezu stafilokoknog enterotoksina A i toksina TSST-1 kod *S. aureus* u pasterizovanom i UHT mleku tokom 24, 48 i 72 sata pri temperaturama od 15°C, odnosno 22°C, te da se istraži da li postoji korelacija između varijacije broja mikroorganizama i stepena ekspresije.

Shodno ciljevima rada, zadaci u okviru ove doktorske disertacije su:

- da se ispita inicijalni broj referentnih sojeva ATCC 13565 i ATCC BAA-2094 *S. aureus* kojim će se inokulisati uzorci mleka;
- da se ispita promena broja *S. aureus* u mleku čuvanom pri različitim temperaturama;
- da se ispita količina sintetisanog stafilokoknog enterotoksina A u različitim vrstama mleka u eksperimentalnim uslovima;
- da se ispita stepen ekspresije gena za sintezu stafilokoknog enterotoksina A, kao i toksični šok sindrom toksina 1 *S. aureus* u mleku čuvanom pri različitim temperaturama;

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Materijal

Materijal za eksperimentalnu inokulaciju predstavljalo je kratkotrajno sterilizovano i pasterizovano kravlje mleko sa 3,2% masti.

4.1.1. Mikroorganizmi

Tokom eksperimenta kao referentni soj korišćeni su:

- *S. aureus* – referentni soj ATCC 13565 koji sintetiše stafilokokni enterotoksin A;
- *S. aureus* – referentni soj ATCC BAA – 2094 koji sintetiše toksin 1 toksičnog šok sindroma.

4.1.2. Podloge

Tokom eksperimenta korišćene su komercijalne hranljive podloge.

4.1.2.1. Podloge za određivanje inicijalnog broja *S. aureus*

Za određivanje inicijalnog broja *S. aureus* u prekončnoj bujonskoj suspenziji referentnog soja *S. aureus* korišćene su sledeće podloge:

- ¼ Ringerov rastvor – osmotski inertan rastvor za pravljenje razređenja proizvođač, Oxoid, Velika Britanija;
- Baird-Parker agar – selektivno-diferencijalna čvrsta podloga, proizvođač Oxoid, Velika Britanija.

Sastav ¼ Ringerovog rastvora, tableta (Oxoid, Velika Britanija) (g/l):

Natrijum hlorid (NaCl)	2,25g
Kalijum hlorid (KCl)	0,105g
Kalcijum hlorid × 6H ₂ O (CaCl ₂)	0,12g
Natrijum bikarbnat (NaHCO ₃)	0,05g

¼ Ringer rastvora se priprema tako što se 1 tableta rastvori u 500 mL destilovane vode i sterilise u autoklavu pri temperaturi od 121°C tokom 15 minuta. Nakon sterilizacije ¼ Ringer rastvor razliti u sterilne epruvete po 9 mL.

4.1.2.2. Podloga za određivanje broja *S. aureus*

Za određivanje broja *S. aureus* korišćena je podloga po Baird-Parkeru. Sastav podloge po Baird Parkeru (Oxoid, Velika Britanija) (g/l):

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

Podloga je pripremana tako što je 63 g praha rastvoreno u 1000 mL destilovane vode, a posle zagrevanja, podloga je sterilisana u autoklavu 15 minuta pri 121°C, krajnji pH je bio 6,8±0,2. U podlogu rashlađenu na oko 50°C dodata je suspenzija žumanca jajeta (10 mL) i 1 mL 2% kalijum telurita na 100 mL podloge.

4.1.3. Reagensi i oprema za dokazivanje enterotoksina

Da bi se utvrdila sposobnost referentnih sojeva *S. aureus* inokulisanih u mleko za sintezu enterotoksina SEA korišćena je fluorescentna imunoenzimska (ELFA) skrining metoda VIDAS SET2 (BioMerieux, Francuska). VIDAS SET2 je automatizovan sistem na detekciju antigena stafilokoknog enterotoksina. U toku ispitivanja korišćeni su stripovi (BioMerieux, Francuska) za ovaj test u kojima se nalazi standard, pozitivna i negativna kontrola, kojima je vršena kalibracija pre svakog ispitivanja.

Za dokazivanje enterotoksina korišćena je sledeća oprema, reagensi i podloge:

Oprema:

- UV lampa;

- Aparat za dejonizaciju vode;
- Autoklav;
- Bunsenov plamenik;
- Homogenizator (Stomacher);
- Vorteks – aparat za vibraciju kiveta;
- Centrifuga 1000 – 10000 g;
- VIDAS[®] aparat;
- pH metar (tačnost kalibracije $\pm 0,1$ pH jedinica pri temperaturi od 20 do 25°C).

Reagensi/podloge:

- Trihlorosirćetna kiselina 5,5 N;
- Natrijum hidroksid 1N i 4N;
- Hlorovodonična kiselina 5N;

Komponente kita:

- SET2 SPR[®] nastavci, 30 komada;
- SET2 stripovi, 30 komada;
- SET2 standard, 6 mL;
- SET2 pozitivna kontrola, 6 mL;
- SET2 negativna kontrola, 6 mL;
- SET2 konc. pufer za ekstrakciju, 55 mL;
- MLE karta, 1 komad.

4.1.4. Reagensi i oprema za ekstrakciju RNK

Za ekstrakciju RNK korišćeni su sledeći reagensi:

- **Trizol** – rastvor za inhibiciju RNK aktivnosti, zamrzavanje ekspresionog profila i destrukciju ćelijske membrane, proizvođač Ambion, USA;
- **PLG kolone**, Prime 5, USA;
- **Cirkonijumske kuglice**, dijametra od 0,1 mm;
- **Hloroform**;
- **Fenol-hloroform-izoamil alkohol**.

4.1.5. Reagensi za ispitivanje prisustva gena za sintezu enterotoksina stafilokoka (SEA i TSST-1)

Za ispitivanje prisustva gena za sintezu enterotoksina (SEA i TSST1) stafilokoka korišćeni su sledeći reagensi:

- **RNA Easy Kit** - kit za izolaciju ribonukleinskih kiselina, proizvođač Qiagen, Nemačka;
- **Proteinaza K** – proizvođač Merck, Nemačka;
- **Izopropanol** – proizvođač Merck, Nemačka;
- **Etanol 75%** – proizvođač Merck, Nemačka;
- **Turbo DNA-free kit** – enzim DNA-za, proizvođač Ambion, USA;
- **Reverzna transkriptaza (5 U/μL)** – proizvođač Invitrogen, USA;
- **Reaction buffer (5×)** - reakcioni pufer, proizvođač Invitrogen, USA;
- **dNTP mix (10 mM)** – smeša nukleotida, proizvođač Fermentas, Litvanija;
- **Set prajmera i proba – (100 μM)** - proizvođač Invitrogen, USA;
- **Set TaqMan proba – (100 μM)** – Invitrogen, USA;
- **2X SYBR Green MasterMix** – proizvođač Euroclone, Italy;

Spisak prajmera korišćenih za ispitivanje prisustva gena za sintezu enterotoksina i TSST-1 toksina *S. aureus* je u tabeli 4.1.5.

Tabela 4.1.5. Spisak prajmera korišćenih za ispitivanje prisustva gena za sintezu enterotoksina i TSST-1 toksina *S. aureus*.

Prajmer	Target gen	Sekvenca
ftsZ-f ftsZ-r	<i>ftsZ</i>	5'-ATCCAAATCGGTGAAAAATTAACAC-3' 5'-CCATGTCTGCACCTTGGATTG-3'
sea-f sea-r	<i>sea</i>	5'-TCAATTTATGGCTAGACGGTAAACAA-3' 5'-GAAGATCCAACTCCTGAACAGTTACA-3'
tst-f tst-r	<i>tst</i>	5'-TCATCAGCTAACTCAAATACATGGATT-3' 5'-TGTGGATCCGTCATTCATTGTT-3'

4.2. Metode

4.2.1. Eksperimentalna procedura

Eksperimentalni rad odvijao se u dve faze. U prvoj fazi eksperimenta, odabrana je hrana animalnog porekla (mleko) koja simulira najčešće izvore toksoinfekcije *S. aureus*. Mleko (pasterizovano i UHT) je inokulisano određenom količinom prekonoćne bujonske suspenzije referentnog soja *S. aureus*, u kojoj je prethodno utvrđen inicijalni broj. Uzorci su čuvani pri temperaturama od 15°C, odnosno 22°C tokom 24, 48, odnosno 72 časa. Nakon 24,

48, odnosno, 72 časova kontaminirano mleko inokulisano je na Baird-Parker agar [4] (SRPS ISO 6888-1), a nakon inkubacije podloga prebrojan je broj izraslih kolonija *S. aureus* i upoređen sa inicijalnim brojem. Paralelno sa inokulacijom ETGP agara, uzeta je određena količina mleka koja je potom tretirana tečnim azotom da bi se konzervisala iRNK tj. da bi se „zamrznuo“ ekspresioni genetski profil *S. aureus*. Ovako tretiran uzorak čuvan je pri temperaturi od -30°C do početka druge faze eksperimenta.

Posle upoređivanja broja izraslih kolonija *S. aureus* iz ispitivanih uzoraka i inicijalnog broja, zatim zamrzavanja ekspresionog profila, pristupilo se drugoj fazi eksperimenta u kojoj je determinisan genom *S. aureus*. Posle toga utvrđene su sekvence DNK specifične za referentni gen i gene za sintezu SEA i TSST-1 *S. aureus*. Iz zamrznutih uzoraka ekstrahovana je RNK, koja je potom metodom reverzne transkripcije prevedena u odgovarajuću cDNK svakog od ispitivanih gena. Na kraju eksperimenta, cDNK *sea* i *tst* gena relativno je kvantifikovana u odnosu na referentni gen i na taj način izračunat je nivo ekspresije ovih gena u mleku pri različitim temperaturama i vremenu čuvanja u odnosu na ekspresiju u normalnim uslovima (*S. aureus* u mleku čuvanom pri 8°C). Eksperiment je ponovljen tri puta da bi se dobili što koherentniji rezultati.

4.2.2. Određivanje inicijalnog broja referentnog soja *S. aureus* koji sintetiše enterotoksin SEA

Od prekonocne bujonske suspenzije referentnog soja *S. aureus* ATCC 13565 koji sintetiše stafilokokni enterotoksin A, pravljena su decimalna razblaženja sa ¼ ringer rastvorom. 10 µL iz svakog decimalnog razblaženja inokulisano je na Baird-Parker agar, i inkubirano pri 37°C od 18 do 24 časa. Nakon inkubacije određen je inicijalni broj *S. aureus*.

4.2.3. Određivanje inicijalnog broja referentnog soja *S. aureus* koji sintetiše enterotoksin TSST-1

Od prekonocne bujonske suspenzije referentnog soja *S. aureus* ATCC BAA-2094 koji sintetiše toksični šok sindrom toksin 1, pravljena su decimalna razblaženja sa ¼ Ringer rastvorom. 10 µL iz svakog decimalnog razblaženja inokulisano je na Baird-Parker agar, i inkubirano pri 37°C od 18 do 24 časa. Nakon inkubacije određen je inicijalni broj *S. aureus*.

4.2.4. Određivanje broja *S. aureus* u mleku

U 9 mL mleka inokulisano je 1 mL prekonocne bujonske suspenzije referentnog soja *S. aureus* u kojoj je početna koncentracija iznosila 10^4 cfu/mL. Nakon toga, mleko je inkubirano pri temperaturama od 15°C, odnosno 22°C tokom 24, 48 i 72 časa. Za određivanje broja izraslih kolonija *S. aureus*, nakon inkubacije kontaminirano mleko inokulisano je na Baird-Parker agar [4]. Po 10 µL svakog razređenja, u duplikatu je klipnom mikropipetom nanešeno na površinu Baird-Parker agara (Miles-Misrov postupak). Agar se ostavi 15-20 minuta pri sobnoj temperaturi dok se inokulum ne upije i potom se inkubira pri 37°C od 18 do 24 časa. Nakon inkubacije izbrojane su izrasle kolonije i upoređene sa inicijalnim brojem.

4.2.5. Dokazivanje enterotoksina

Prekonocna bujonska kultura termički je inaktivisana tokom 15 min pri 95°C. Tokom termičke obrade dolazi do istovremene sterilizacije bujona, a ćelijski zidovi stafilokoka se raspadaju, što za posledicu ima znatno bolje vezivanje glikopolisaharidnih antigenih determinanti sa antistafilokoknim antitelima impregniranim u insuflacionim nastavcima. Inaktivisani bujon otpipetiran je u količini od po 500 µL u Vidas SET 2 strip. Tako pripremljen strip, postavljen je u Mini Vidas imunoenzimski analizator.

Aparat insuflira određenu količinu obogaćenog uzorka iz posebnog stripa sa 10 bazenčića kroz plastični nastavak obložen anti-stafiloknim enterotoksin antitelima. U slučaju da u uzorku ima enterotoksina, antitela impregnirana u zidu nastavka vezuju se za antigene enterotoksina. Nastavak se potom višestruko ispira da bi se izbacio višak reaktanata, a zatim se insuflira rastvor sa kompleksom antitelo-alkalna fosfataza koji se veže za komplekse antigen-antitelo. Nakon sledećeg ispiranja, finalno se insuflira rastvor supstrata (4-metil umbeliferil fosfat) iz poslednjeg bazenčića. Konjugat enzim katalizuje hidrolizu supstrata u fluorescentno jedinjenje 4-metil umbeliferon, a intezitet fluorescencije meri se automatski na 450 nm. Instrument zatim preračunava rezultate i poredi ih sa vrednošću interne reference (praga) i interpretira rezultat kao pozitivan ili negativan.

Fluorescencija se meri dva puta u stripu sa ispitivanim uzorkom. Prvo čitanje obuhvata pozadinski šum, pre nego što SET SPR nastavak bude uronjen u supstrat. Drugo čitanje odvija se nakon inkubacije supstrata sa enzimom unutar SPR nastavka. Izmerena vrednost RFV (relativna fluorescentna vrednost) dobija se oduzimanje vrednosti šuma od finalnog rezultata i rezultat se štampa. Dobijenu RFV vrednost VIDAS[®] sistem deli sa RFV vrednošću standarda i ukoliko je količnik veći od vrednosti praga uzorak je pozitivan i smatra se pozitivnim na

prisustvo stafilokoknog enterotoksina. Pre svakog ispitivanja vršena je kalibracija pomoću standarda enterotoksina, koji se nalaze u kitu.

4.2.6. Ekstrakcija RNK

Za ekstrakciju RNK korišćeni su uzorci mleka koji su prethodno tretirani tečnim azotom da bi se konzervisala iRNK, i čuvani pri temperaturi od -80°C . U prazne ependorfice dodato je 800 mg cirkonijumskih kuglica dijametara od 0,1 mm i 1,25 mL Trizola. Nakon toga u iste ependorfice dodato je 150-200 mg odmrznutog uzorka. Takva smesa homogenizovana je u homogenizatoru tri puta po 60 sekundi. Zatim je centrifugirana ependorfica 10 minuta, pri 12.000 x g, pri temperaturi od 4°C . Za to vreme pripremljene su PLG tube od 2 mL tako što su centrifugirane tokom jednog minuta, pri 12000 g, pri sobnoj temperaturi. U ependorficama sa uzorkom izdvojila su se tri sloja, a odatle se pipetirao samo providan supernatant u količini od oko 1150 μL u PLG tube (Slika 4.2.6a.). Nakon toga u PLG tube dodato je 280 μL hloroforma, i centrifugirano tokom 10 minuta, pri 12.000 g, pri temperaturi od 4°C . Pipetiran je gornji vodeni sloj u količini od 700 μL i prebačen u nove PLG tube. Potom u PLG tube dodat je rastvor fenol-hloroform-izoamil alkohol, a zatim centrifugiran tokom 10 minuta, pri 12.000 g, pri temperaturi od 4°C . Izdvojeni gornji sloj pipetiran je u zapremini od oko 600 μL u prazne ependorfice od 2 mL (Slika 4.2.6b.).



Slika 4.2.6a. i 4.2.6b. Ekstrakcija RNK

4.2.7. Purifikacija RNK na RNEASY kolonama sa DNase digestijom na koloni

U ependorficama u kojima se nalazilo 600 μL RNK, dodato je po 600 μL RLT pufera i 600 μL 70% etanola. Nakon toga je vorteksovano i pipetirano u RNeasy kolonama. RNeasy kolone su centrifugirane tokom 30 sekundi, pri 13.000 rpm, pri sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja odbačen je se flow-through i ostaje samo fiksirana RNK za membranu u koloni. U RNeasy kolonama pipetirano je po 350 μL RW1 pufera, pritom je centrifugirano 1 minut, pri 13.000 rpm, pri sobnoj temperaturi. Flow-through je odbačen, a nakon toga na samu membranu u RNeasy kolonama, pipetirano je po 80 μL DNase, i inkubirano 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Zatim je ponovo pipetirano po 350 μL RW1 pufera u RNeasy kolonama i centrifugirano tokom 30 sekundi, pri 13.000 rpm, pri sobnoj temperaturi. Nakon odbacivanja flow-through, kolone su prebačene u nove tube. 500 μL RPE pufera je pipetirano u RNeasy kolonama, i centrifugirano tokom 30 sekundi pri 13.000 rpm, pri sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja odbačen je flow-through. Postupak se ponovio još jednom sa RPE puferom. Na samu membranu u RNeasy kolonama, pipetirano je po 40 μL RNase-Free voda, a zatim centrifugirana tokom jednog minuta pri 13.000 rpm, pri sobnoj temperaturi. Prikupljan je eluat u nove ependorfice od 1,5 mL i čuvan na ledu. Postupak je ponovljen još jednom sa 30 μL RNKse-Free vodom. U prikupljenim eluatima rađena su ispitivanja da li ima i koliko ima RNK i kolika je njena čistoća pomoću UV-spektrofotometra (Biophotometer, Eppendorf, Nemačka).

4.2.8. Ispitivanje ekspresije gena za sintezu SEA i TSST-1 kod referentnih sojeva

S. aureus

Za ispitivanje ekspresije gena neophodno je kvantifikovati količinu sintetisane RNK određenog gena. Obzirom da *Real Time* PCR amplifikuje samo DNK sekvence, u daljem toku eksperimenta RNK svakog ispitivanog gena je konvertovana u njegovu odgovarajuću komplementarnu cDNK pomoću reverzne transkripcije. RNK svakog uzorka u količini od po 2,5 μL , pomešana je sa po 2 μL vode i dodato je po 0,5 μL 100 μM reverznog prajmera za određeni gen. Uzorci su potom stavljeni u thermocycler na temperaturu od 75°C tokom 5 minuta da bi došlo do denaturacije RNK lanca, a zatim su naglo stavljeni na led. Za svaki od ispitivanih gena pripremljen je poseban pufer čiji je sastav dat u Tabeli 4.2.8a.

Po 7,5 μL pufera za reverznu transkripciju pipetirano je u uzorke na ledu, a zatim su uzorci stavljeni u thermocycler na temperaturu od 42°C tokom 60 minuta da bi došlo do

sinteze komplementarnog DNK lanca. Postupak je ponovljen za svaki pojedinačni gen, a uzorci su potom stavljeni u zamrzivač na temperaturu od -30°C .

Sledećeg dana uzorci su amplifikovani na *Real Time* PCR uređaju. Za svaki od ispitivanih gena pripremljen je poseban pufer čiji je sastav dat u Tabeli 4.2.8b.

Tabela 4.2.8a. Sastav pufera za reverznu transkripciju

Ukupni volumen pufera (μL)	7,5
Sastav i koncentracije komponenti:	
5×Pufer (μL)	2,5
10 mM dNTP (μL)	2,5
Reverzna transkriptaza (μL)	0,5
Sterilna H_2O (μL)	2,0

Tabela 4.2.8b. Sastav pufera za *Real Time* PCR

Ukupni volumen pufera (μL)	25,0
Sastav i koncentracije komponenti:	
2×Pufer (μL)	12,5
Gen-f (μL)	1,0
Gen-r (μL)	1,0
Sterilna H_2O (μL)	9
cDNK ispitivanog uzorka	1,0

Za izvođenje *Real Time* PCR reakcije pripremljen je sledeći program, prikazano u tabeli 4.2.8c.

Tabela 4.2.8c. Program za *Real Time* PCR

Inicijalna denaturacija	95°C	10 min
50 ciklusa	95°C	30 s
	50°C	30 s
	72°C	30 s
Merenje fluorescencije		

Nakon *Real Time* PCR reakcije očitane su Ct vrednosti svakog ispitivanog gena u svakom uzorku i unešene su u Microsoft Office Excel tabelu. Ct vrednost referentnog soja *S. aureus* izraslog u BHI bujonu pri temperaturi od 37°C tokom 24 časa uzeta je kao **vrednost kalibratora**. Zatim je izračunat nivo ekspresije ovih gena pri različitim temperaturama odnosu na vrednost ekspresije kalibratora. Eksperiment je ponovljen tri puta da bi se dobili što koherentniji rezultati.

4.2.9. Obrada rezultata rada

U statističkoj analizi dobijenih rezultata izvedenog eksperimenta kao osnovne statističke metode korišćeni su deskriptivni statistički parametri. Ovi parametri su omogućili opisivanje dobijenih eksperimentalnih rezultata i njihovo tumačenje. Od deskriptivnih statističkih parametara korišćeni su: aritmetička sredina, standardna devijacija (SD), standardnu greška (SE), interval varijacije (IV) i koeficijent varijacije (CV). Regresionom analizom izračunata je jednačina prave koja nam govori o slaganju zavisno i nezavisno promenljive, a pomoću standardne greške regresije određen je interval pouzdanosti. Koeficijentom korelacije ustanovljena je jačina zavisnosti posmatranih pojava.

Prilikom testiranja i utvrđivanja statistički značajnih razlika između ispitivanih eksperimentalnih grupa korišćena su dva testa. Prvi test koji je korišćen, potpuno slučajan plan (ANOVA), grupni je test i na osnovu njega je ustanovljavano postojanje signifikantnih razlika između posmatranih tretmana ukupno. Drugi test koji je korišćen je pojedinačni, Tukey test, pomoću koga su ustanovljavane statistički signifikantne razlike između tretmana pojedinačno. Signifikantnost razlika ustanovljavana je na nivoima značajnosti od 5 i 1 %. Svi dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički. Statistička analiza dobijenih rezultata urađena je u statističkom paketu PrismPad 6.0.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

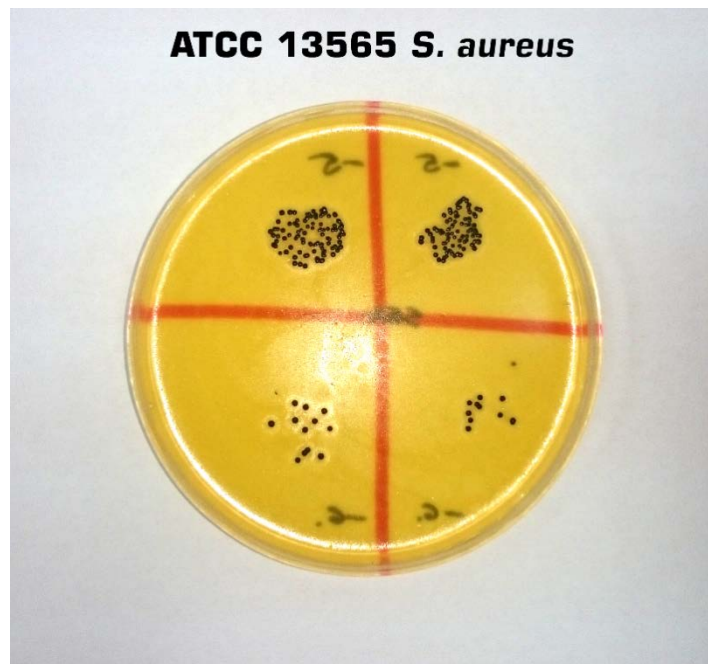
5.1. Rezultati ispitivanja inicijalnog broja referentnog soja *S. aureus* koji sintetiše SEA

U tabeli 5.1. prikazani su rezultati ispitivanja inicijalnog broja referentnog soja ATCC 13565 *S. aureus* koji sintetiše stafilokokni enterotoksin A, izraslog na ETGP agaru.

Tabela 5.1. Rezultati ispitivanja inicijalnog broja referentnog soja ATCC 13565 *S. aureus*

Srednja vrednost (\log_{10} CFU/mL)	SD	CV (%)
8,08	0,35	4,33

Izrasle kolonije bile su crne boje, sjajne i konveksne, prečnika 1 do 5 mm. Zacrnjenje je nastupilo kao posledica redukcije telurita u elementarni telur. Nadalje, oko kolonija su obrazovane prozirne zone usled aktivnosti novosintetisane lecitinaze kao i zone zamućenja, nastale kao posledica sinteze lipaze.



Slika 5.1. Kolonije *S. aureus* ATCC 13565 na ETGP agaru

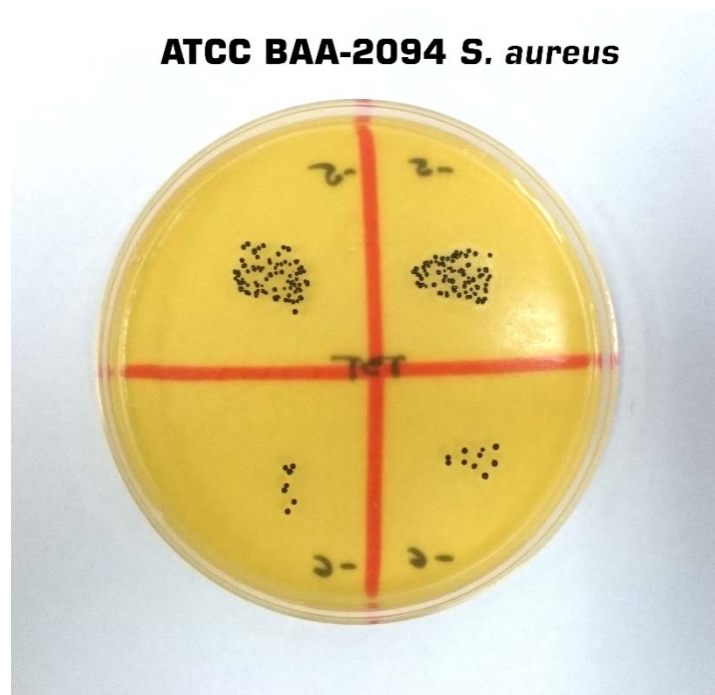
5.2. Rezultati ispitivanja inicijalnog broja referentnog soja *S. aureus* koji sintetiše TSST-1

U tabeli 5.2. prikazani su rezultati ispitivanja inicijalnog broja referentnog soja ATCC BAA-2094 *S. aureus* koji sintetiše toksični šok sindrom toksin 1, izraslog na ETGP agaru.

Tabela 5.2. Rezultati ispitivanja inicijalnog broja referentnog soja ATCC BAA-2094 *S. aureus*

Srednja vrednost (\log_{10} CFU/mL)	SD	CV (%)
7,93	0,56	7,06

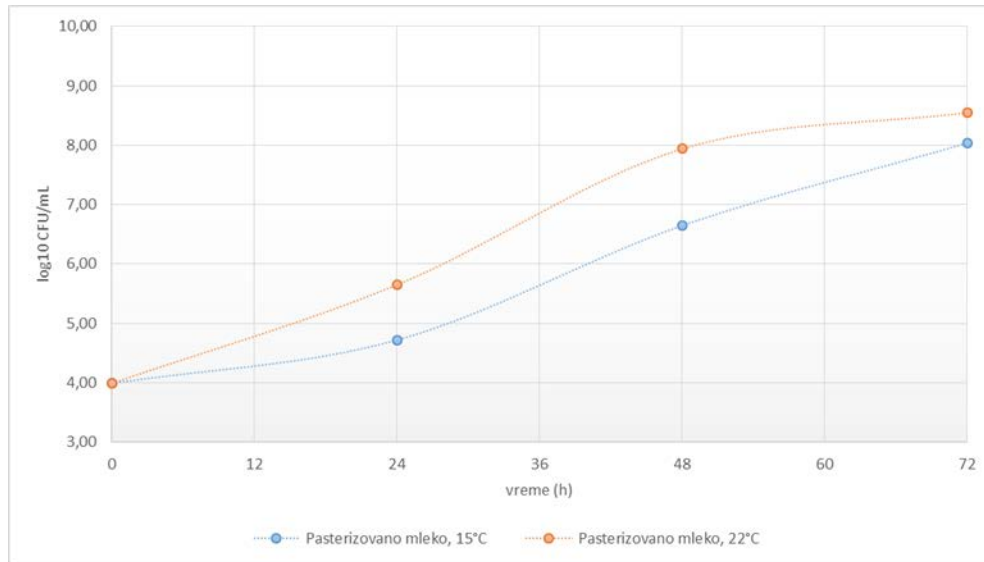
Izrasle kolonije bile su crne boje, sjajne i konveksne, prečnika 1 do 5 mm. Zacrnjenje je nastupilo kao posledica redukcije telurita u elementarni telur. Nadalje, oko kolonija su obrazovane prozirne zone usled aktivnosti novosintetisane lecitinaze kao i zone zamućenja, nastale kao posledica sinteze lipaze.



Slika 5.2. Kolonije *S. aureus* ATCC BAA-2094 na ETGP agaru

5.3. Rezultati ispitivanja promene broja *S. aureus* koji sintetiše SEA u pasterizovanom mleku

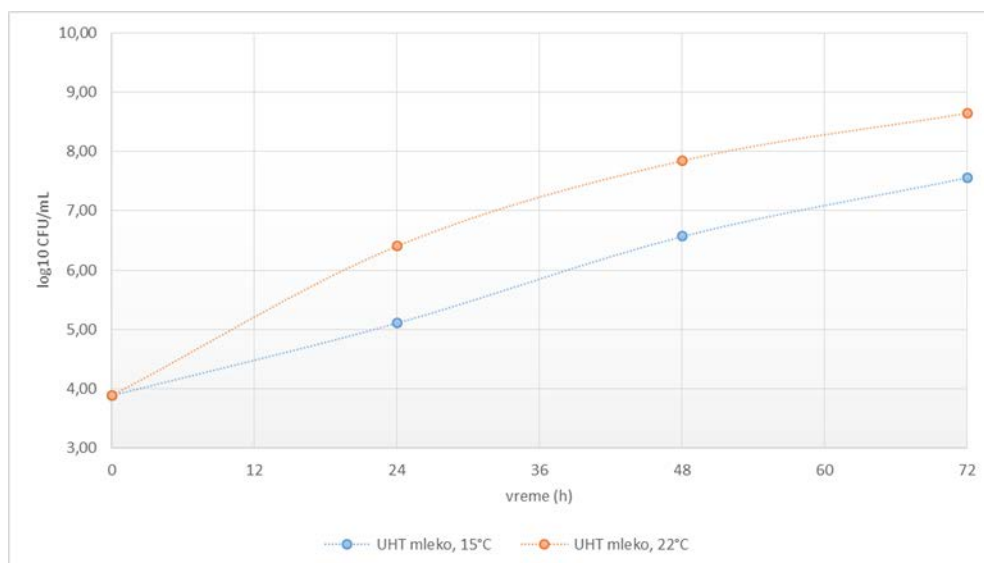
Grafički prikaz promene broja *S. aureus* u inokulisanom pasterizovanom mleku čuvanom pri temperaturi od 15°C, odnosno 22°C tokom 0, 24, 48, odnosno 72 časa prikazan je na grafikonu 5.3.



Grafikon 5.3. Promena broja *S. aureus* koji sintetiše SEA u pasterizovanom mleku

5.4. Rezultati ispitivanja promene broja *S. aureus* koji sintetiše SEA u UHT mleku

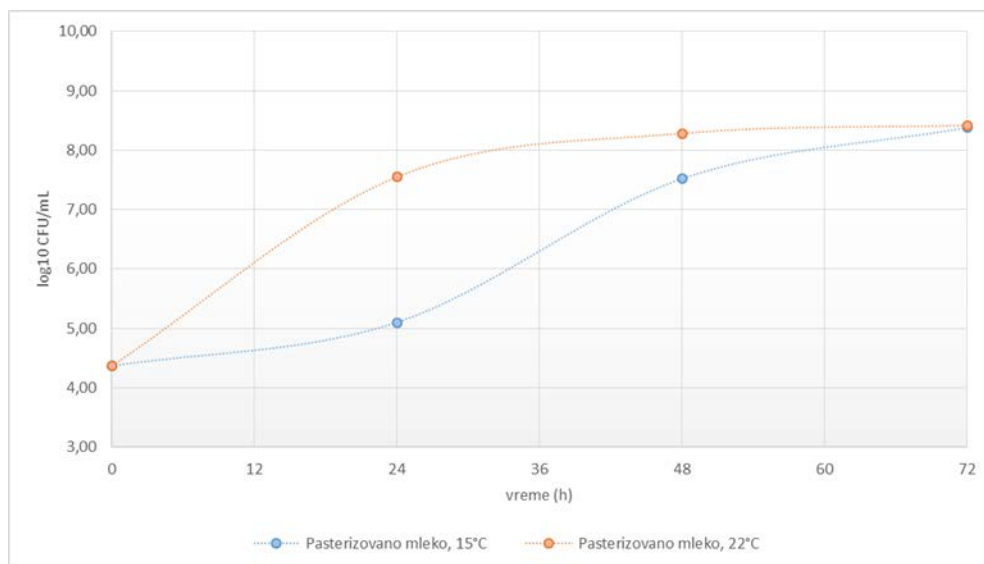
Grafički prikaz promene broja *S. aureus* u inokulisanom UHT mleku čuvanom pri temperaturi od 15°C, odnosno 22°C tokom 0, 24, 48, odnosno 72 časa prikazan je na grafikonu 5.4.



Grafikon 5.4 Promena broja *S. aureus* koji sintetiše SEA u UHT mleku

5.5. Rezultati ispitivanja promene broja *S. aureus* koji sintetiše TSST-1 u pasterizovanom mleku

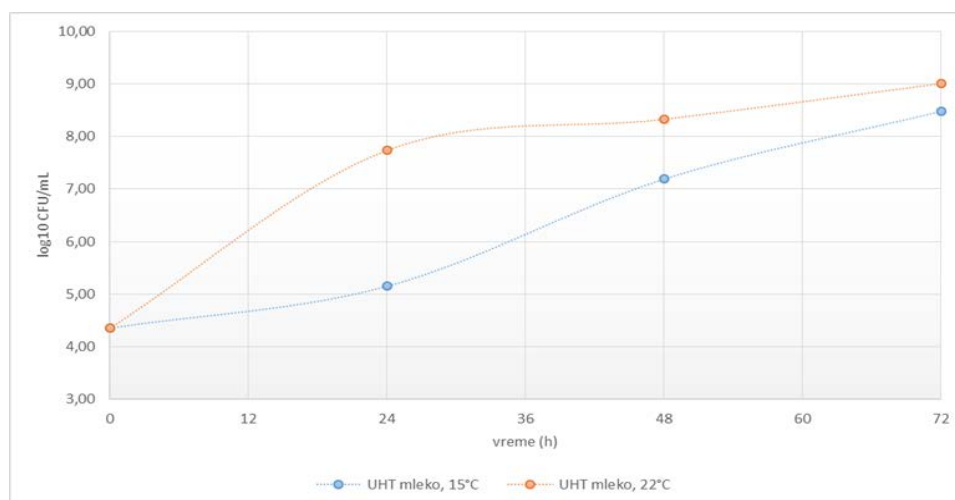
Grafički prikaz promene broja *S. aureus* u inokulisanom pasterizovanom mleku čuvanom pri temperaturi od 15°C, odnosno 22°C tokom 0, 24, 48, odnosno 72 časa prikazan je na grafikonu 5.5.



Grafikon 5.5 Promena broja *S. aureus* koji sintetiše TSST-1 u pasterizovanom mleku

5.6. Rezultati ispitivanja promene broja *S. aureus* koji sintetiše TSST-1 u UHT mleku

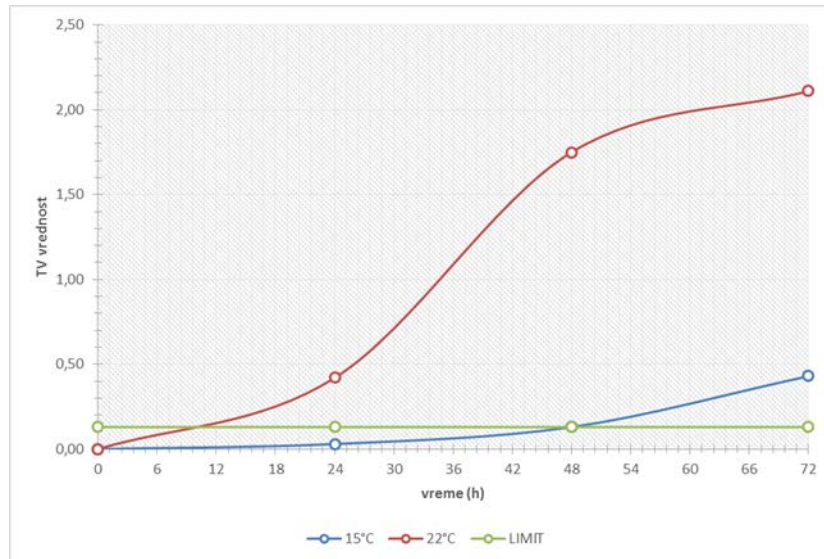
Grafički prikaz promene broja *S. aureus* u inokulisanom UHT mleku čuvanom pri temperaturi od 15°C, odnosno 22°C tokom 0, 24, 48, odnosno 72 časa prikazan je na grafikonu 5.6.



Grafikon 5.6 Promena broja *S. aureus* koji sintetiše TSST-1 u UHT mleku

5.7. Rezultati ispitivanja sinteze stafilokoknog enterotoksina A u pasterizovanom mleku

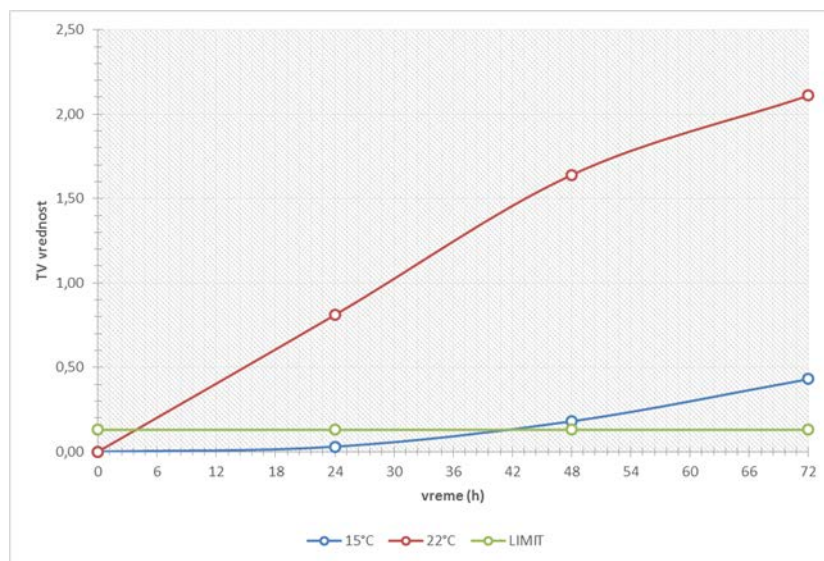
Grafički prikaz promene intenziteta sinteze stafilokoknog enterotoksina A *S. aureus* u inokulisanom pasterizovanom mleku čuvanom pri temperaturi od 15°C, odnosno 22°C tokom 0, 24, 48, odnosno 72 časa prikazan je na grafikonu 5.7.



Grafikon 5.7 Sintaza stafilokoknog enterotoksina A u inokulisanom pasterizovanom mleku

5.8. Rezultati ispitivanja sinteze stafilokoknog enterotoksina A u UHT mleku

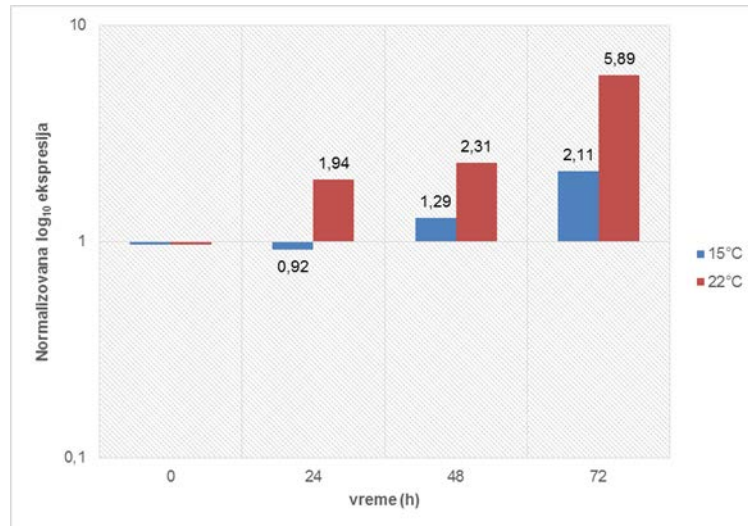
Grafički prikaz promene intenziteta sinteze stafilokoknog enterotoksina A *S. aureus* u inokulisanom UHT mleku čuvanom pri temperaturi od 15°C, odnosno 22°C tokom 0, 24, 48, odnosno 72 časa prikazan je na grafikonu 5.8.



Grafikon 5.8 Sintaza stafilokoknog enterotoksina A u inokulisanom UHT mleku

5.9. Rezultati ispitivanja stepena ekspresije gena za sintezu stafilokoknog enterotoksina A *S. aureus* u pasterizovanom mleku

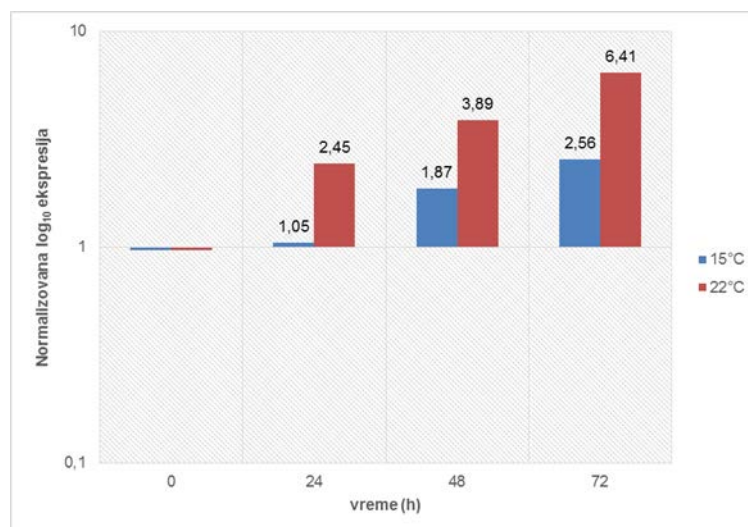
Promena stepena ekspresije gena *sea* *S. aureus* u inokulisanom pasterizovanom mleku čuvanom pri temperaturi od 15°C, odnosno 22°C časova tokom 48 odnosno 72 časa prikazana je na grafikonu 5.9.



Grafikon 5.9. Ekspresija gena *sea* u inokulisanom pasterizovanom mleku

5.10. Rezultati ispitivanja stepena ekspresije gena za sintezu stafilokoknog enterotoksina A *S. aureus* u UHT mleku

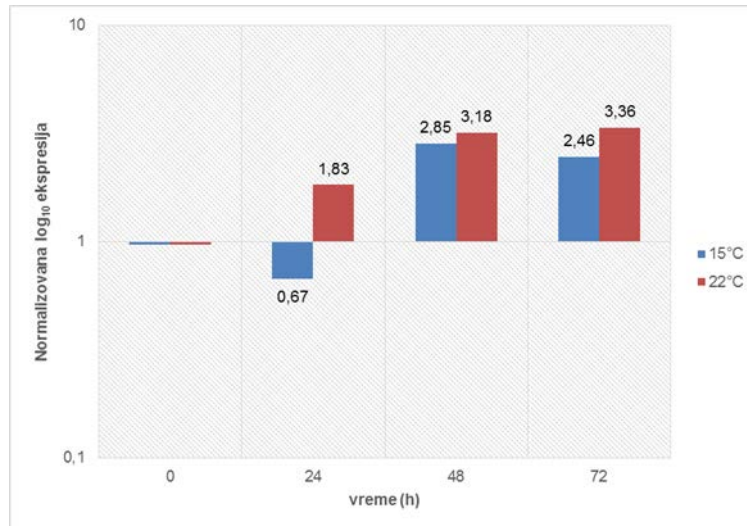
Promena stepena ekspresije gena *sea* *S. aureus* u inokulisanom pasterizovanom mleku čuvanom pri temperaturi od 15°C, odnosno 22°C časova tokom 48 odnosno 72 časa prikazana je na grafikonu 5.10.



Grafikon 5.10 Ekspresija gena *sea* u inokulisanom UHT mleku

5.11. Rezultati ispitivanja stepena ekspresije gena za sintezu TSST-1 *S. aureus* u pasterizovanom mleku

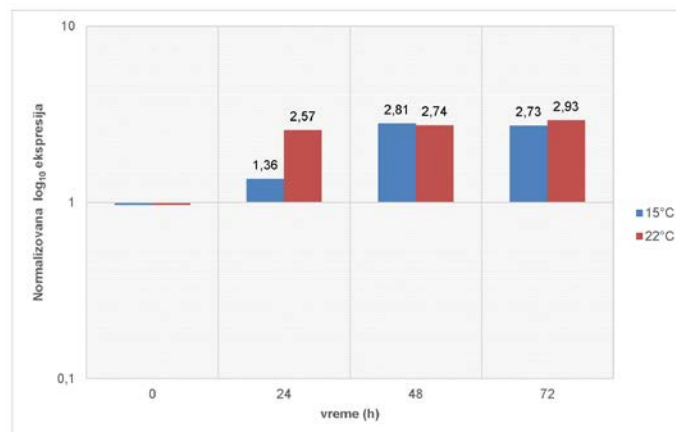
Promena stepena ekspresije gena *tst* *S. aureus* u inokulisanom pasterizovanom mleku čuvanom pri temperaturi od 15°C, odnosno 22°C časova tokom 48 odnosno 72 časa prikazana je na grafikonu 5.11.



Grafikon 5.11 Ekspresija gena *tst* u inokulisanom pasterizovanom mleku

5.12. Rezultati ispitivanja stepena ekspresije gena za sintezu TSST-1 *S. aureus* u UHT mleku

Promena stepena ekspresije gena *tst* *S. aureus* u inokulisanom pasterizovanom mleku čuvanom pri temperaturi od 15°C, odnosno 22°C časova tokom 48 odnosno 72 časa prikazana je na grafikonu 5.12.



Grafikon 5.12 Ekspresija gena *tst* u inokulisanom UHT mleku

6. DISKUSIJA

Bezbednost i trajnost mleka u najvećoj meri zavisi od njegove higijenske ispravnosti i prisustva patogenih mikroorganizama. Mleko, od momenta dobijanja, preko transporta i u toku prerade može da se kontaminira različitim mikroorganizmima. Glavni izvori kontaminacije mleka velikim brojem *S. aureus* su: 1) životinje, kada se mleko tokom muže kontaminira kao posledica upaljenog i zaraženog vimena krave; 2) nehigijenski postupci muže, loša higijena opreme i neadekvatni uslovi skladištenja; 3) ljudi (mogu kontaminirati mleko putem ruku ili preko respiratornog trakta kašljenjem i kihanjem), kada se kontaminacija javlja nakon termičke obrade mleka [136, 137]. Dakle, vrlo je važno da se sirovo mleko što pre skladišti pri temperaturama ispod 8°C i održi njegova svežina što je duže moguće, kao i da se poštuju principi dobre higijenske i dobre proizvođačke prakse [137].

S. aureus sintetiše skup superantigenih toksina, uključujući toksin 1 toksičnog šok sindroma (TSST-1) i stafilokokne enterotoksine (SE) koji selektivno aktiviraju veliki broj T-ćelija, zavisno od $V\beta$ elementa u T-ćelijskim receptorima (TCR) udruženim sa glavnim histokompatibilnim kompleksom (MHC) klase II na antigen-prezentujućim ćelijama [138, 139, 140]. Iako oba toksina poseduju slična superantigena svojstva, izazivaju različite kliničke manifestacije prilikom trovanja hranom. Neki autori [93, 95, 15] otkrili su prisustvo *tst* gena u *S. aureus* izolovanom iz mleka i iz uzorka hrane koja je bila u kontaktu sa rukama radnika. Obzirom da TSST-1 toksin može biti prisutan u hrani, ingestijom može dospeti i u organizam čoveka. Istraživanja koja su radili Li i saradnici [90] pokazuje da za razliku od SEA, TSST-1 toksin ima veću otpornost na toplotni tretman, dejstvo pepsina i tripsina u toku varenja. TSST-1 toksin brzo se degradira na manje fragmente posle tretmana pepsinom ili tripsinom, ali pritom i dalje zadržava superantigenu aktivnost koja se može završiti fatalnim ishodom usled nastanka šoka.

Mleko je veoma podložno kontaminaciji sa *S. aureus*-om, naročito pri visokim temperaturama tokom dužeg skladištenja. Iako temperatura pasterizacije uništava ćelije *S.*

aureus, termorezistentni SE i TSST-1 zadržavaju svoju biološku aktivnost [141, 119]. Zbog važnosti ovih toksina u oblasti veterinarskog javnog zdravlja, potrebno je efikasno ispitivanje da bi se otkrila prevalencija enterotoksogenih vrsta *S. aureus* u hrani. Imajući u vidu ovu činjenicu, cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi promena broja *S. aureus*-a, kao i promena ekspresije *sea* i *tst* gena, kada je mleko čuvano pri različitim temperaturama tokom produženog vremena skladištenja. Inkubacije mleka pri temperaturama od 15°C i 22°C (sobna temperatura) koje su korišćene tokom eksperimenta, simulirale su neadekvatan transport i uslove skladištenja. U našem eksperimentu, broj *S. aureus* i u pasterizovanom i u UHT mleku čuvanom pri 8°C ostao je nepromenjen tokom čitavog perioda skladištenja. Nasuprot tome, povećanje temperature i produženje vremena skladištenja oba mleka (pasterizovano i UHT) doprinelo je povećanju broja *S. aureus*, što su takođe primetili Janštová B. i saradnici [142]. Pored toga, broj *S. aureus* i u pasterizovanom i u UHT mleku skladištenom pri 15°C i 22°C tokom 24 sata, premašili su vrednost od 10⁵ CFU/mL, koja predstavlja prag za sintezu enterotoksina i povećan rizik od alimentarne stafilokokne intoksikacije [143]. Takođe, neki autori [45, 144] beleže povećanje broja *S. aureus* pri različitim temperaturama inkubacije u mleku, a samim tim i povećanje virulentnog potencijala. *S. aureus* u stanju je da raste u širokom opsegu temperatura od 7°C do 48,5°C, uz optimalan rast koji je primećen pri temperaturama od 30°C do 37°C, dok je sinteza enterotoksina moguća u opsegu temperatura od 10°C do 46°C [48].

U našem istraživanju, najveći broj *S. aureus* koji sintetiše SEA toksin kao i *S. aureus* koji sintetiše TSST-1 toksin zabeležen je pri inkubaciji od 22°C u oba mleka (pasterizovano i UHT).

Obradom rezultata ispitivanja promena broja *S. aureus* koji sintetiše SEA toksin u pasterizovanom mleku uočena je veoma značajna statistička razlika ($P < 0,001$) u broju *S. aureus* (SEA) u pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C tokom 24 sata u odnosu na pasterizovano mleko čuvano pri 15°C i 22°C tokom 48 i 72 sata. Statistički veoma značajna razlika u broju *S. aureus* koji sintetiše SEA toksin uočena je u pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C tokom 48 sati u odnosu na pasterizovano mleko čuvano pri 22°C i 15°C tokom 72 sata ($P < 0,001$), zatim u broju *S. aureus* u pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C tokom 72 sata u odnosu na pasterizovano mleko čuvano pri 22°C tokom 24 sata ($P < 0,001$). Ovi rezultati nam ukazuju da je pri višim temperaturama potreban kraći period da bi se broj *S. aureus* povećao u odnosu na mleko koje se drži na nižim temperaturama.

Kada je u pitanju dinamika rasta, zanimljivo je da u prvih 24 sata nakon kontaminacije, uprkos razlici od 7°C, nije ustanovljena statistički značajna razlika u broju *S.*

aureus u pasterizovanom mleku ($P = 0,054$). Istovetna pojava uočena je posmatranjem broja *S. aureus* u pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C tokom 72 sata u odnosu na pasterizovano mleko čuvano pri 22°C tokom 48 i 72 sata ($P = 0,989$).

Obradom rezultata ispitivanja promena broja *S. aureus* koji sintetiše SEA toksin u UHT mleku uočena je veoma značajna statistička razlika ($P < 0,001$) u broju *S. aureus* (SEA) u UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 24 sata u odnosu na UHT mleko koje je čuvano pri 15°C tokom 72 sata i 22°C tokom 24, 48 i 72 sata, zatim u broju *S. aureus* u UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 48 sati u odnosu na UHT mleko čuvano pri 22°C tokom 48 i 72 sata ($P < 0,001$). Statistički veoma značajna razlika u broju *S. aureus* ustanovljena je poređenjem broja u UHT mleku čuvanom pri 22°C tokom 24 sata u odnosu na UHT mleko čuvano pri 22°C tokom 72 sata ($P < 0,001$). Nije utvrđena statistički značajna razlika u broju *S. aureus* u UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 48 sati u odnosu na UHT mleko čuvano pri 22°C tokom 24 sata ($P = 0,994$), zatim u UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 72 sata u odnosu na UHT mleko čuvano pri 22°C tokom 48 sati ($P = 0,907$). Navedeni podaci impliciraju da se promene broja *S. aureus* u UHT mleku odvijaju nešto brže nego što je to slučaj kod pasterizovanog mleka. Ovo je u skladu sa rezultatima istraživanja Nouaille S. i saradnici [145] koji implicira da prisutna mikrobiota BMK ima inhibitorski uticaj na rast *S. aureus*.

Obradom rezultata ispitivanja promene broja *S. aureus* koji sintetiše TSST-1 toksin u pasterizovanom mleku uočena je veoma značajna statistička razlika ($P < 0,001$) u broju *S. aureus* (TSST-1) u pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C tokom 24 sata u odnosu na pasterizovano mleko čuvano pri 15°C tokom 48 i 72 sata i pri 22°C tokom 24, 48 i 72 sata. Nije uočena statistički značajna razlika između broja *S. aureus* u pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C tokom 48 sati u odnosu na pasterizovano mleko čuvano pri 22°C tokom 24 sata ($P > 0,999$), zatim u broju *S. aureus* u pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C tokom 72 sata u odnosu na broj u pasterizovanom mleku čuvanom pri 22°C tokom 48 i 72 sata ($P = 0,984$).

Obradom rezultata ispitivanja promene broja *S. aureus* koji sintetiše TSST-1 toksin u UHT mleku uočena je veoma značajna statistička razlika ($P < 0,001$) u broju *S. aureus* u UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 24 sata u odnosu na UHT mleko čuvano pri 15°C tokom 48 i 72 sati i 22°C tokom 24, 48 i 72 sata ($P < 0,001$), zatim u UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 48 sati u odnosu na UHT mleko čuvano pri 15°C i 22°C tokom 72 sata ($P < 0,001$). Statistički veoma značajna razlika u broju *S. aureus* ustanovljena je i u UHT mleku čuvanom pri 22°C tokom 24 sata u odnosu na UHT mleko čuvano pri 22°C tokom 72 sata ($P < 0,001$).

Statistički značajne razlike nisu utvrđene u broju *S. aureus* u UHT mleku koje je čuvano pri 15°C tokom 72 sata u odnosu na UHT mleko čuvano pri 22°C tokom 48 i 72 sata ($P = 0,909$).

Ispitivanjem uticaja matriksa na neto promenu broja SEA pozitivnog *S. aureus* od momenta kontaminacije do kraja ogleda, ustanovljena je statistički značajna razlika ($P = 0,018$) u broju *S. aureus* u pasterizovanom mleku koje je čuvano pri 15°C u odnosu na pasterizovano mleko čuvano pri 22°C, kao i u broju *S. aureus* u pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C u odnosu na UHT mleko čuvano pri 22°C. Vrlo značajna razlika ($P = 0,009$) u broju *S. aureus* bila je u pasterizovanom mleku čuvanom pri 22°C u odnosu na UHT mleko čuvano pri 15°C, zatim u UHT mleku čuvanom pri 15°C u odnosu na UHT čuvanom pri 22°C.

Pored toga, kod *S. aureus* koji sintetiše TSST-1 toksin uočena je statistički značajna razlika u pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C u odnosu na UHT mleko čuvano pri 22°C ($P = 0,025$), zatim u UHT mleku čuvanom pri 15°C u odnosu na UHT mleko čuvano pri 22°C ($P = 0,019$).

Sagledavajući uticaj matriksa na promenu broja SEA pozitivnog i TSST-1 pozitivnog *S. aureus*, zaključujemo da nije bilo statistički značajne razlike u neto vrednostima broja u periodu od momenta kontaminacije do kraja ogleda. Međutim, dinamika promena broja *S. aureus* u pojedinačnim vremenskim intervalima od po 24 sata, pokazala je statistički značajne razlike u pasterizovanom, odnosno UHT mleku.

Stafilokokna trovanja hranom javljaju se usled unošenja stafilokoknih enterotoksina (SE) koji mogu biti sintetisani u hrani nakon kontaminacije sa *S. aureus*. Sinteza je moguća u širokom opsegu temperatura od 10°C do 50°C [48], pH opsegu od 4,8 do 9,0 [40] i aktivnosti vode od 0,87 do 0,99 [76]. Stafilocokni enterotoksini pokazuju termostabilnost, jer je istraživanjima dokazano da ne gube funkcije i na temperaturama od 121°C u trajanju od 10 minuta [146]. Retrospektivnom analizom, zabeleženo je trovanje potrošača stafilokoknim enterotoksinom A u Japanu 2000. godine nakon konzumacije mlečnih proizvoda [119]. U Austriji 2007. godine zabeležena je epidemija u kojoj je tridesetoro dece obolelo nakon konzumiranja proizvoda od mleka u kojima su dokazane stafilocoke, koje su stvarale enterotoksine A i D (SEA i SED) [113]. U Italiji, u periodu od 2002. do 2010. godine, 181 osoba obolela je u epidemijama izazvanim *S. aureus* i njegovim enterotoksinima [105]. Tsutsuura S. i saradnici [53] ispitivali su sintezu enterotoksina A sa dve veličine inokuluma (10^2 i 10^6 cfu/mL) u BHI bujonu kod 11 sojeva *S. aureus* koji sintetišu enterotoksin A pri različitim temperaturama inkubacije (10, 15, 20 i 37°C). Rezultati tog istraživanja pokazali su povećanje sinteze enterotoksina A sa povećanjem temperature, što se slaže sa našim

rezultatima, koji su pokazali da je sinteza enterotoksina A bila brža u mleku čuvanom pri 22°C u odnosu na mleko čuvano pri 15°C. Autori Janštová B. i saradnici [142] ispitivali su promene broja *S. aureus* koji sintetiše enterotoksin A, kao i fizičku sintezu enterotoksina A, pri različitim temperaturama (15 i 22°C) u sirovom, pasterizovanom i UHT mleku. Sinteza enterotoksina A pri 15°C u sirovom mleku nije otkrivena tokom celog vremena skladištenja (102 sata), u pasterizovanom mleku uočena je tek nakon 81 sata skladištenja, a u UHT mleku nakon 90 sati inkubacije. Sa druge strane, naši rezultati pokazali su da je sinteza enterotoksina u pasterizovanom i u UHT mleku pri 15°C detektabilna već nakon 48 sati skladištenja. Isti autori uočili su sintezu enterotoksina A pri 22°C nakon 12 sati skladištenja u oba mleka (pasterizovano i UHT), što je bilo u skladu sa našim rezultatima.

Obradom rezultata ispitivanja sinteze enterotoksina A kod *S. aureus* u funkciji matriksa (pasterizovano i UHT mleko) i temperature uočena je statistički veoma značajna razlika u sintezi enterotoksina A u pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C tokom 24 sata u odnosu na pasterizovano mleko čuvano pri 22°C tokom 48 i 72 sata, i u UHT mleku čuvano pri 22°C tokom 24, 48 i 72 sata ($P < 0,001$). Statistički veoma značajna razlika u sintezi enterotoksina A uočena je kod pasterizovanog mleka čuvanog pri 15°C tokom 48 sati u odnosu na pasterizovano mleko čuvano pri 22°C tokom 48 i 72 sata, i u UHT mleku čuvanom pri 22°C tokom 24, 48 i 72 sata ($P < 0,001$). U pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C tokom 72 sata uočena je statistički veoma značajna razlika u sintezi enterotoksina A u odnosu na pasterizovano mleko čuvano pri temperaturi od 22°C tokom 48 i 72 sata ($P < 0,001$). U UHT mleku koje je čuvano pri 15°C tokom 24 sata uočena je statistički veoma značajnu razliku u sintezi enterotoksina A u odnosu na pasterizovano mleko čuvano pri 22°C tokom 48 i 72 sata i UHT mleko čuvano pri 22°C tokom 24, 48 i 72 sata ($P < 0,001$). Statistički veoma značajna razlika u sintezi enterotoksina A uočena je u UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 48 sati u odnosu na pasterizovano mleko čuvano pri 22°C tokom 48 i 72 sata i UHT mleko čuvano pri 22°C tokom 24, 48 i 72 sata ($P < 0,001$), zatim u UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 72 sata u odnosu na pasterizovano i UHT mleko čuvano pri 22°C tokom 48 i 72 sata ($P < 0,001$). U pasterizovanom mleko čuvano pri 22°C tokom 24 sata uočena je statistički veoma značajna razlika u sintezi enterotoksina A u odnosu na UHT mleko čuvano pri 22°C tokom 48 i 72 sata, zatim u pasterizovanom mleku čuvanom pri 22°C tokom 72 sata u odnosu na UHT mleko čuvano pri 22°C tokom 24 i 48 sati ($P < 0,001$).

Obradom rezultata ispitivanja sinteze enterotoksina A kod *S. aureus* u pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C tokom 24 sata u odnosu na pasterizovano mleko čuvano pri 15°C tokom 48 sata ($P = 0,969$), i UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 24 i 48 sati nije uočena

statistički značajna razlika ($P = 0,465$). Statistički značajna razlika za sintezu enterotoksina A nije uočena u pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C tokom 48 sati u odnosu na UHT mleko čuvano pri 15°C tokom 24 i 48 sati ($P = 0,969$). U pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C tokom 72 sata u odnosu na pasterizovano mleko čuvano pri 22°C tokom 24 sata, i UHT mleko čuvano pri 15°C tokom 48 i 72 sata nije uočena statistički značajna razlika u sintezi enterotoksina A ($P = 0,942$). U UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 24 sata u odnosu na UHT mleko čuvano pri 15°C tokom 48 sati nije uočena statistički značajna razlika u sintezi enterotoksina A ($P = 0,465$). UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 48 sati u odnosu na pasterizovano mleko čuvano pri 22°C tokom 24 sata nije pokazalo statistički značajnu razlika u sintezi enterotoksina A ($P = 0,260$), zatim u UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 72 sata u odnosu na pasterizovano i UHT mleko čuvano pri 22°C tokom 24 sata ($P = 0,902$). Statistički značajna razlika u sintezi enterotoksina A nije uočena ni u pasterizovanom mleku čuvanom pri 22°C tokom 48 sati u odnosu na UHT mleko čuvano pri 22°C tokom 72 sata ($P = 0,099$), zatim u pasterizovanom mleku čuvanom pri 22°C tokom 72 sata u odnosu na UHT mleko čuvano pri 22°C tokom 72 sata ($P = 0,942$).

Naša istraživanja pokazuju da je enterotoksin A bio prisutan u obe vrste mleka (pasterizovano i UHT) nakon 24 sata čuvanja pri temperaturi od 22°C , pri čemu je broj *S. aureus* prelazio vrednost od 10^5 cfu/mL. Sinteza enterotoksina A u pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C uočena je nakon 72 sata, pri čemu je broj *S. aureus* prešao vrednost od 10^5 cfu/mL nakon 48 sati, dok je u UHT mleku uočena sinteza enterotoksina A nakon 48 sati, a broj *S. aureus* prešao je vrednost 10^5 cfu/mL nakon 24 sata čuvanja. Ovi rezultati potvrđuju ispravnost hipoteze da najveći uticaj na sintezu SEA ima veličina populacije *S. aureus* koja mora da pređe vrednost od 10^5 cfu/mL u mleku, dok dinamiku rasta *S. aureus* u mleku dominantno utiču temperatura, dužina čuvanja i sastav matriksa.

S. aureus poseduje gene za regulaciju ekspresije stafilokoknih enterotoksina i TSST-1. Ekspresiju *tst* gena koji je odgovoran za virulentnost *S. aureus*-a reguliše *agr* sistem (accessory gene regulator), dok je *sea* kodiran profagom. Na sintezu enterotoksina utiče više paragenetskih faktora kao što su temperatura, početan broj *S. aureus* u hrani kao i unutarćelijska regulacija ekspresije gena u bakteriji.

Rezultati ispitivanja ekspresije *sea* gena kod *S. aureus* u pasterizovanom mleku pokazuje da postoji statistički vrlo značajna razlika u stepenu ekspresije *sea* gena u pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C tokom 72 sata ($P < 0,01$) i u pasterizovanom mleku čuvanom pri 22°C tokom 24 sata u odnosu na kalibrator (*S. aureus* u mleku čuvanom pri 8°C). Statistički veoma značajna razlika u stepenu ekspresije *sea* gena uočena je u

pasterizovanom mleku čuvanom pri 22°C tokom 48 i 72 sata u odnosu na kalibrator ($P < 0,001$). Statistički značajne razlike u stepenu ekspresije *sea* gena nije bilo u pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C tokom 24 i 48 sata ($P = 0,228$). Statistički vrlo značajna razlika u ekspresiji *sea* gena uočena je u UHT mleku čuvanom pri 22°C tokom 24 sata u odnosu na kalibrator ($P = 0,003$). Ispitivanjem ekspresije *sea* gena kod *S. aureus* u UHT mleku uočena je statistički veoma značajna razlika u stepenu ekspresije *sea* gena u UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 72 sata i u UHT mleku čuvanom pri 22°C tokom 48 i 72 sata u odnosu na kalibrator ($P < 0,001$). Statistički značajna razlika u stepenu ekspresije *sea* gena bila je u UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 48 sati u odnosu na kalibrator ($P = 0,011$), a statistički značajna razlika nije uočena u UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 24 sata ($P = 0,295$).

Rezultati ispitivanja ekspresije *tst* gena kod *S. aureus* u pasterizovanom mleku pokazuje da postoji statistički značajna razlika u stepenu ekspresije *tst* gena u pasterizovanom mleku čuvanom pri 22°C tokom 24 sata u odnosu na kalibrator ($P = 0,023$). Statistički veoma značajna razlika u ekspresiji *tst* gena uočena je između pasterizovanog mleka čuvanog pri 15°C i 22°C tokom 48 i 72 sata u odnosu na kalibrator ($P < 0,001$). U pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C tokom 24 sata nije uočena statistički značajna razlika u stepenu ekspresije *tst* gena u odnosu na kalibrator ($P = 0,192$). U UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 24 sata uočena je statistički značajna razlika u ekspresiji *tst* gena u odnosu na kalibrator ($P = 0,049$). Statistički vrlo značajna razlika u ekspresiji *tst* gena uočena je u UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 48 sati, zatim u UHT mleku čuvanom pri 22°C tokom 24 sata u odnosu na kalibrator ($P < 0,01$). Rezultati ispitivanja ekspresije *tst* gena kod *S. aureus* pokazuju statistički veoma značajnu razliku u UHT mleku čuvanom pri 15°C tokom 72 sata, zatim u UHT mleku čuvanom pri 22°C tokom 48 i 72 sata u odnosu na kalibrator ($P < 0,001$).

Naša istraživanja pokazuju da postoji statistički značajna razlika između stepena ekspresije *sea* gena u pasterizovanom mleku čuvanom pri temperaturi od 22°C tokom 24 sata u odnosu na kalibrator, što se poklapa sa postignutim brojem *S. aureus* od 10^5 cfu/mL i imunohromatografski detektovanom količinom enterotoksina A. Stepenu ekspresije enterotoksina A u pasterizovanom mleku čuvanom pri temperaturi od 15°C tokom 72 sata statistički se značajno razlikuje u odnosu na kalibrator, što se takođe podudara sa detektovanom količinom enterotoksina A u istim uslovima. U UHT mleku čuvanom tokom 24 sata pri temperaturi od 22°C, odnosno tokom 48 sati pri temperaturi od 15°C utvrđena je statistički značajna razlika u stepenu ekspresije u odnosu na kalibrator, što se podudara sa detektovanom količinom enterotoksina A i dinamikom promene broja *S. aureus*. Na osnovu

ovih podataka možemo zaključiti da nije bilo posttranslacionih promena u sintezi enterotoksina A, da intenzitet ekspresije *sea* gena odgovara količini fizički „*de novo*“ sintetisanog enterotoksina A.

Naša ispitivanja pokazuju statistički značajnu razliku u stepenu ekspresije *tst* gena u odnosu na kalibrator u pasterizovanom i UHT mleku nakon 24 sata pri temperaturi od 22°C i 48 sati pri temperaturi od 15°C, dok je broj *S. aureus* pozitivan na TSST-1 prelazio 10⁵ cfu/mL u pasterizovanom i UHT mleku nakon 24 sata čuvanim pri temperaturama 15°C, odnosno 22°C. Na osnovu ovih podataka možemo zaključiti da je na ekspresiju *tst* gena pored broja *S. aureus* uticaj imala i temperatura čuvanja.

Obzirom na mali broj literaturnih podataka o uticaju sastava hrane, temperature i vremena čuvanja kao i drugih paragenetskih faktora na regulaciju patogenosti *S. aureus*, smatramo da dobijeni rezultati mogu predstavljati polaznu osnovu za ispitivanje značaja genetskog profila patogenosti *S. aureus* u hrani na razvoj infekcije kod potrošača.

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata dobijenih u okviru ove doktorske disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

1. Broj SEA pozitivnog *S. aureus* u uzorcima pasterizovanog mleka čuvanog pri 15°C, premašio je kritičnu vrednost od 10⁵ CFU/mL, koja predstavlja prag za sintezu enterotoksina i povećan rizik od alimentarne stafilokokne intoksikacije, za manje od 48 sati inkubacije, dok je kod mleka čuvanog pri 22°C, ta vrednost dostignuta za samo 24 sata inkubacije.
2. Broj SEA pozitivnog *S. aureus* u uzorcima UHT mleka čuvanog pri 15°C, odnosno 22°C premašio je vrednost od 10⁵ CFU/mL za samo 24 sata inkubacije.
3. Broj TSST-1 pozitivnog *S. aureus* i u uzorcima pasterizovanog mleka i UHT mleka čuvanim pri 15°C i 22°C premašio je vrednost od 10⁵ CFU/mL za samo 24 sata inkubacije.
4. Uticaj matriksa (pasterizovano i UHT mleko) na promenu broja SEA pozitivnog i TSST-1 pozitivnog *S. aureus*, nije pokazivao statistički značajne razlike u neto vrednostima broja u periodu od momenta kontaminacije do kraja ogleda. Međutim, utvrđena je statistički značajna razlika u dinamici promene broja *S. aureus* u pojedinačnim vremenskim intervalima od po 24 sata, tako da se promene broja SEA pozitivnog i TSST-1 pozitivnog *S. aureus* odvijaju nešto brže u UHT mleku nego što je to slučaj kod pasterizovanog mleka.
5. Stafilokokni enterotoksin A bio je prisutan u obe vrste mleka (pasterizovano i UHT) nakon 24 sata čuvanja pri temperaturi od 22°C, pri čemu je broj *S. aureus* prelazio vrednost od 10⁵ CFU/mL. Sinteza enterotoksina A u pasterizovanom mleku čuvanom pri 15°C uočena je u periodu između 48 i 72 sata, pri čemu je broj *S. aureus* prešao vrednost od 10⁵ CFU/mL nakon 48 sati, dok je u UHT mleku sinteza enterotoksina A

uočena nakon 48 sati, a broj *S. aureus* prešao je vrednost 10^5 CFU/mL nakon 24 sata čuvanja.

6. Intenzitet ekspresije *sea* gena u obe vrste mleka pri istim temperaturama inkubacije odgovara količini fizički „*de novo*“ sintetisanog stafilokoknog enterotoksina A, što ukazuje da pri neadekvatnim uslovima čuvanja mleka ne dolazi do posttranslacione modifikacije narastajućeg polipeptidnog lanca.
7. Statistički značajna razlika u stepenu ekspresije *tst* gena u odnosu na kalibrator (*S. aureus* u mleku čuvanom pri 8°C) u pasterizovanom i UHT mleku nakon 24 sata inkubacije pri 22°C, odnosno 48 sati inkubacije pri 15°C ukazuje da je u mleku čuvanom u neadekvatnim uslovima, moguća sinteza TSST-1 toksina.
8. Obzirom na mali broj literaturnih podataka o uticaju paragenetskih faktora na regulaciju virulentnosti *S. aureus*, dobijeni rezultati mogu predstavljati polaznu osnovu za kvantitativnu procenu rizika za bezbednost potrošača u uslovima narušavanja hladnog lanca u proizvodnji mleka.

8. LITERATURA

1. Euzeby J. List of procaryotic names with standing in nomenclature: - Genus *Staphilococcus*. 2012. 252 p.
2. <https://www.studyblue.com/notes/note/n/cellular-envelope/deck/5306970>.
3. <https://puserscontentstorage.blob.core.windows.net/userimages/a802861b-4a61-4f7d-b5ea-f5c3e9638f33/8ab9d67d-0352-4702-adf4-c76526956be6image26.jpeg>.
4. ISO 6888-1:1999(E). Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka (*S. aureus* i druge vrste) – Deo 1: Tehnika korišćenja Baird-Parker agara. International Organization for Standardization (ISO); 1999.
5. ISO 6888-2:2008. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka (*S. aureus* i druge vrste) – Deo 2: Tehnika korišćenje agara sa plazmom kunića i fibrinogenom. International Organization for Standardization (ISO); 2008.
6. Baird-Parker A. The staphylococci: an introduction. Pg 1S-8S In: Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement Series 19. D. Jones, R G Board, and M Sussman, ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford; 1990.
7. Asperger H, Zangerl P, S. aureus. In: Roginski H, Fuquay J, Fox P, editors Encyclopedia of Dairy Science San Diego: Academic Press. 2003:2563-9
8. Jay JM. Staphylococcal gastroenteritis. Modern food microbiology: Springer; 2000. p. 441-59.
9. Hennekinne J-A, Ostin A, Guillier F, Herbin S, Pruger A-L, Dragacci S. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? Toxins. 2010;2(8):2106-16.
10. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. Nat Rev Micro. 2005;3(12):948-58.

11. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *S. aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*. 2009;7(9):629-41.
12. Grov A. Studies on the interaction between staphylococcal protein a and the fc-region of immunoglobulin G. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica Supplement*. 1973;236:77-83.
13. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *S. aureus*. *Clinical microbiology reviews*. 2000;13(1):16-34.
14. Johansson J, Cossart P. RNA-mediated control of virulence gene expression in bacterial pathogens. *Trends in microbiology*. 2003;11(6):280-5.
15. Fueyo J, Mendoza MC, Rodicio MR, Muniz J, Alvarez M, Martín MC. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *S. aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(3):1278-84.
16. Hwang SY, Park YK, Koo HC, Park YH. spa typing and enterotoxin gene profile of *S. aureus* isolated from bovine raw milk in Korea. *Journal of veterinary science*. 2010;11(2):125-31.
17. Rosengren Å, Fabricius A, Guss B, Sylvén S, Lindqvist R. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *S. aureus* in cheese produced on farm-dairies. *International journal of food microbiology*. 2010;144(2):263-9.
18. Argudín MÁ, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and *S. aureus* enterotoxins. *Toxins*. 2010;2(7):1751-73.
19. Ikawaty R, Brouwer E, Van Duijkeren E, Mevius D, Verhoef J, Fluit A. Virulence factors of genotyped bovine mastitis *S. aureus* isolates in the Netherlands. *International Journal of Dairy Science*. 2010;5(2):60-70.
20. Adesiyun A. Characteristics of *S. aureus* strains isolated from bovine mastitic milk: bacteriophage and antimicrobial agent susceptibility, and enterotoxigenicity. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1995;42(3):129-39.
21. Munson SH, Tremaine MT, Betley MJ, Welch RA. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *S. aureus*. *Infection and immunity*. 1998;66(7):3337-48.
22. Novick R, Projan S, Kornblum J, Ross H, Ji G, Kreiswirth B, et al. The agr P2 operon: An autocatalytic sensory transduction system in *S. aureus*. *Molecular and General Genetics MGG*. 1995;248(4):446-58.

23. Saenz HL, Augsburger V, Vuong C, Jack RW, Götz F, Otto M. Inducible expression and cellular location of AgrB, a protein involved in the maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone. *Archives of microbiology*. 2000;174(6):452-5.
24. Zhang L, Lin J, Ji G. Membrane anchoring of the AgrD N-terminal amphipathic region is required for its processing to produce a quorum-sensing pheromone in *S. aureus*. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(19):19448-56.
25. Otto M, Süßmuth R, Jung G, Götz F. Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis* agr system. *FEBS letters*. 1998;424(1-2):89-94.
26. Novick R. Staphylococcal pathogenesis and pathogenicity factors: genetics and regulation. *Gram-positive pathogens*. 2006;2:496.
27. Novick RP, Schlievert P, Ruzin A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes and infection*. 2001;3(7):585-94.
28. Morfeldt E, Taylor Dv, Von Gabain A, Arvidson S. Activation of alpha-toxin translation in *S. aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *The EMBO journal*. 1995;14(18):4569.
29. Huntzinger E, Boisset S, Saveanu C, Benito Y, Geissmann T, Namane A, et al. *S. aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate spa gene expression. *The EMBO journal*. 2005;24(4):824-35.
30. Yarwood J, Schlievert, PM. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(11):1620-5.
31. Betley MJ, Mekalanos JJ. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science*. 1985;229:185-8.
32. Wallin-Carlquist N, Cao R, Márta D, da Silva ASA, Schelin J, Rådström P. Acetic acid increases the phage-encoded enterotoxin A expression in *S. aureus*. *BMC microbiology*. 2010;10(1):147.
33. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *S. aureus*. *The Lancet*. 2001;357(9264):1225-40.
34. Baba T, Bae T, Schneewind O, Takeuchi F, Hiramatsu K. Genome sequence of *S. aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. *Journal of bacteriology*. 2008;190(1):300-10.

35. Holden MT, Feil EJ, Lindsay JA, Peacock SJ, Day NP, Enright MC, et al. Complete genomes of two clinical *S. aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(26):9786-91.
36. Goerke C, Pantucek R, Holtfreter S, Schulte B, Zink M, Grumann D, et al. Diversity of prophages in dominant *S. aureus* clonal lineages. *Journal of bacteriology*. 2009;191(11):3462-8.
37. Sumbly P, Waldor MK. Transcription of the toxin genes present within the staphylococcal phage ϕ Sa3ms is intimately linked with the phage's life cycle. *Journal of bacteriology*. 2003;185(23):6841-51.
38. Borst DW, Betley MJ. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression correlate with *sea* allele class. *Infection and immunity*. 1994;62(1):113-8.
39. Fraser JD, Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunological reviews*. 2008;225(1):226-43.
40. Smith J, Buchanan R, Palumbo S. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. *Journal of Food Protection*. 1983;46(6):545-55.
41. Qi Y, Miller KJ. Effect of low water activity on staphylococcal enterotoxin A and B biosynthesis. *Journal of Food Protection*®. 2000;63(4):473-8.
42. Paulin S, Horn B, Hudson JA. Factors influencing staphylococcal enterotoxin production in Dairy Products. Ministry for Primary Industries New Zealand Government. 2012.
43. Tatini S. Influence of food environments on growth of *S. aureus* and production of various enterotoxins. *Journal of Milk and Food Technology (JMFT)*. 1973;36(11):559-63.
44. Farrell GM, Upton ME. The effect of low temperature on the growth and survival of *S. aureus* and *Salmonella typhimurium* when inoculated on to bacon. *International Journal of Food Science & Technology*. 1978;13(1):15-23.
45. Medved'ová A, Valík, L, Studeničová, A. The effect of temperature and water activity on the growth of *S. aureus*. *Czech Journal of Food Sciences*. 2009;27:28-35.
46. Valero A, Pérez-Rodríguez F, Carrasco E, Fuentes-Alventosa JM, García-Gimeno R, Zurera G. Modelling the growth boundaries of *S. aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *International Journal of Food Microbiology*. 2009;133(1):186-94.

47. Stiles M, Witter L. Thermal Inactivation, Heat Injury, and Recovery of *S. aureus* 1. *Journal of dairy science*. 1965;48(6):677-81.
48. Schmitt M, Schuler-Schmid U, Schmidt-Lorenz W. Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *S. aureus* strains isolated from foods. *International journal of food microbiology*. 1990;11(1):1-19.
49. Bergdoll M, Lee Wong, AC. Staphylococcal intoxications. In: (eds: Rieman HP, Cliver, DO) *Foodborne Infections and Intoxications* Academic Press, Elsevier Inc, San Diego, California. 2006:523-62.
50. Aoyama K, Takahashi C, Yamauchi Y, Sakai F, Igarashi H, Yanahira S, et al. Examination of *S. aureus* survival and growth during cheese-making process. *Shokuhin eiseigaku zasshi Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 2008;49(2):116-23.
51. Yang S-E, Yu R-C, Chou C-C. Influence of holding temperature on the growth and survival of *Salmonella* spp. and *S. aureus* and the production of staphylococcal enterotoxin in egg products. *International journal of food microbiology*. 2001;63(1):99-107.
52. Tatini S. Thermal stability of enterotoxins in food. *Journal of Milk and Food Technology*. 1976;39(6):432-8.
53. Tsutsuura S, Murata M. Temperature dependence of staphylococcal enterotoxin A production by *S. aureus*. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine*. 2012;70(8):1323-8.
54. Baird-Parker T. *S. aureus*. Dalam : Lund, BM, BairdParker, TC and Gould, GW (ed) *The Microbiological Safety and Quality of Food*. 2000;2:1317-31.
55. Bremer P, Fletcher G, Osborne C. *S. aureus*. *New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited Private Bag*. 2004;4704:1-6.
56. Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia N, Corrente M, Parisi A, et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *S. aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 2007;115(3):290-6.
57. Charlier C, Cretenet M, Even S, Le Loir Y. Interactions between *S. aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. *International journal of food microbiology*. 2009;131(1):30-9.

58. Cebrián G, Sagarzazu N, Pagán R, Condón S, Mañas P. Development of stress resistance in *S. aureus* after exposure to sublethal environmental conditions. *International journal of food microbiology*. 2010;140(1):26-33.
59. International Commission on Microbiological Specifications for Foods: *S. aureus*. In: *Microorganisms in foods: Microbiological specifications of food pathogens*, Ed: T. A. Roberts, A. C. Baird-Parker and R. B. Tompkin. Blackie Academic, London. 1996, 299-333.
60. Genigeorgis C, Foda MS, Mantis A, Sadler WW. Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production. *Applied microbiology*. 1971;21(5):862-6.
61. Carpenter DF, Silverman GJ. Synthesis of staphylococcal enterotoxin A and nuclease under controlled fermentor conditions. *Applied and environmental microbiology*. 1976;31(2):243-8.
62. Baker-Austin C, Dopson M. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in microbiology*. 2007;15(4):165-71.
63. de Oliveira CEV, Stamford TLM, Neto NJG, de Souza EL. Inhibition of *S. aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. *International journal of food microbiology*. 2010;137(2):312-6.
64. Kreisman L, Labuza T. Storage stability of intermediate moisture food process cheese food products. *Journal of food science*. 1978;43(2):341-4.
65. Belay N, Rasooly A. *S. aureus* growth and enterotoxin A production in an anaerobic environment. *Journal of food protection*. 2002;65(1):199-204.
66. Cretenet M, Nouaille S, Thouin J, Rault L, Stenz L, François P, et al. *S. aureus* virulence and metabolism are dramatically affected by *Lactococcus lactis* in cheese matrix. *Environmental microbiology reports*. 2011;3(3):340-51.
67. Pitt W, Harden T, Hull R. Investigation of the antimicrobial activity of raw milk against several foodborne pathogens. *Milchwissenschaft*. 2000;55(5):249-52.
68. Ortolani MBT, Yamazi AK, Moraes PM, Viçosa GN, Nero LA. Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *S. aureus*. *Foodborne pathogens and disease*. 2010;7(2):175-80.
69. Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P, Teixeira P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *S. aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiology*. 2009;26(3):278-82.

70. Radovanovic R, Katic V. Influence of lactic acid bacteria isolates on *S. aureus* growth in skimmed milk. *Bulg J Agric Sci.* 2009;15(3):196-203.
71. Halpin-Dohnalek MI, Marth EH. *S. aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods-a review. *Journal of Food Protection®.* 1989;52(4):267-82.
72. Donnelly C, Leslie J, Black L. Production of enterotoxin A in milk. *Applied microbiology.* 1968;16(6):917-24.
73. Genigeorgis C, Riemann H, Sadler W. Production of EnterotoxinB in Cured Meats. *Journal of Food Science.* 1969;34(1):63-8.
74. Márta D, Wallin-Carlquist N, Schelin J, Borch E, Rådström P. Extended staphylococcal enterotoxin D expression in ham products. *Food microbiology.* 2011;28(3):617-20.
75. Barber LE, Deibel R. Effect of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausage. *Applied microbiology.* 1972;24(6):891-8.
76. Notermans S, Heuvelman C. Combined Effect of Water Activity, pH and Sub-optimal Temperature on Growth and Enterotoxin Production of *S. aureus*. *Journal of Food Science.* 1983;48(6):1832-5.
77. Scheusner D, Hood L, Harmon L. Effect of temperature and pH on growth and enterotoxin production by *S. aureus* 1. *Journal of Milk and Food Technology.* 1973;36(5):249-52.
78. Regassa L, Betley M. High sodium chloride concentrations inhibit staphylococcal enterotoxin C gene (*sec*) expression at the level of *sec* mRNA. *Infection and immunity.* 1993;61(4):1581-5.
79. Sakai F, Ihara H, Aoyama K, Igarashi H, Yanahira S, Ohkubo T, et al. Characteristics of Enterotoxin H-Producing *S. aureus* Isolated from Clinical Cases and Properties of the Enterotoxin Productivity. *Journal of food protection.* 2008;71(9):1855-60.
80. Bang W, Hanson D, Drake M. Effect of salt and sodium nitrite on growth and enterotoxin production of *S. aureus* during the production of air-dried fresh pork sausage. *Journal of Food Protection®.* 2008;71(1):191-5.
81. Genigeorgis CA. Quality control for fermented meats. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1976;169(11):1220-8.
82. Schmidt KA, Donegan NP, Kwan J, William A, Cheung A. Influences of σ B and *agr* on expression of staphylococcal enterotoxin B (*seb*) in *S. aureus*. *Canadian journal of microbiology.* 2004;50(5):351-60.

83. Hughes A, Hurst A. The effect of NaCl on the upper temperature limit for growth of and enterotoxin synthesis by *S. aureus*. *Canadian journal of microbiology*. 1980;26(4):507-10.
84. Markus Z, Silverman G. Enterotoxin B synthesis by replicating and nonreplicating cells of *S. aureus*. *Journal of bacteriology*. 1969;97(2):506-12.
85. Baird-Parker A. Factors affecting the production of bacterial food poisoning toxins. *Journal of Applied Bacteriology*. 1971;34(1):181-97.
86. Woodburn M, Morita TN, Venn SZ. Production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C in colloidal dispersions. *Applied microbiology*. 1973;25(5):825-33.
87. Even S, Charlier C, Nouaille S, Zakour NLB, Cretenet M, Cousin FJ, et al. *S. aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(13):4459-72.
88. Gómez-Lucía E, Goyache J, Orden JA, Domenech A, Hernandez FJ, Ruiz-Santa Quiteria JA, et al. Growth of *S. aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental Manchego-type cheese. *Journal of dairy science*. 1992;75(1):19-26.
89. Bergdoll MS. Enterotoxins. In *Staphylococci and Staphylococcal Infections*; Easman, C.S.F., Adlam, C., Eds.; Academic Press Inc: London, UK, 1983; 2:559–598.
90. Li S-J, Hu D-L, Maina EK, Shinagawa K, Omoe K, Nakane A. Superantigenic activity of toxic shock syndrome toxin-1 is resistant to heating and digestive enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 2011; 110: 729–736.
91. Ote I, Taminiau B, Duprez JN, Dizier I, Mainil JG. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *S. aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Veterinary microbiology*. 2011; 153(3): 285-292.
92. Deurenberg RH, Nieuwenhuis RF, Driessen C, London N, Stassen FR, Tiel Van FH, Stobberingh EE, Vink, C. The prevalence of the *S. aureus* *tst* gene among community- and hospital-acquired strains and isolates from Wegener's Granulomatosis patients. *FEMS Microbiology Letters*. 2005; 245(1): 185-189.
93. Farahmand-Azar S, Ahmadi M, Saei HD, Anassori E. Identification of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1) gene in *S. aureus* isolated from bovine mastitis milk. *Archives of Razi Institute*. 2013; 68: 17–22.
94. Baniardalan S, Mohammadzadeh A, Pajohi-Alamoti M, Mahmoodi, P, Sadeghinassab A. Detection of toxic shock toxin (*tst*) gene in *S. aureus* isolated from bovine milk samples. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2017; 20(3).

95. Sospedra I, Mañes J, Soriano JM. Report of toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) from *S. aureus* isolated in food handlers and surfaces from foodservice establishments. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2012; 80: 288-290.
96. Montville T, Matthews K. *Food Microbiology: An Introduction*. 2nd ed. Blackwell Publishers. 2008; 432.
97. EFSA, ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *The EFSA Journal* 2012; 10(3).
98. Wieneke AA, Roberts D, Gilbert RJ. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969–90. *Epidemiology & Infection*. 1993; 110(3): 519-531.
99. EFSA, ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *The EFSA Journal* 2013; 11(4).
100. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe R-V, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases journal (CDC)*. 2011; 17: 7–15.
101. Eurosurveillance Editorial Team. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *The EFSA Journal*. 2015; 13: 3991.
102. EFSA, ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *The EFSA Journal* 2015; 14(12).
103. Haeghebaert S, Le Querrec F, Gallay A, Bouvet P, Gomez M, Vaillant V. Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000. *Bull Epidemiol Hebdo*. 2002; 23:105-9.
104. Kérouanton A, Hennekinne J, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A, et al. Characterization of *S. aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International journal of food microbiology*. 2007;115(3):369-75.
105. Ferrari P, Tiberti, D, Rossi, MV, Vencia, W, Costa, A, Magliola, R, Demicheli, V, Biorci, F. . Il sistema di sorveglianza dei focolai epidemicidi malattie trasmesse da alimenti della regione Piemonte. Rapporto 2010 Centro MTA Book in Italian Regione Piemonte ed, Torino, Italy. 2011.

106. Bianchi D, Gallina S, Bellio A, Chiesa F, Civera T, Decastelli L. Enterotoxin gene profiles of *S. aureus* isolated from milk and dairy products in Italy. *Letters in applied microbiology*. 2014;58(2):190-6.
107. Lindqvist R, Westöö A, Hjertqvist M, Andersson Y. Reported suspected food poisonings 2005. 2006.
108. Lindqvist R, Westöö, A, Hjertqvist, M, Andersson, Y. Rapporterade misstänkta matförgiftningar 2004. *www.slv.se*. 2005.
109. Lindqvist R, Westöö, A, Hjertqvist M, Andersson, Y. Rapporterademisstänkta matförgiftningar 2003. *www.slv.se*. 2004.
110. Lindblad M, Karnehed N, Lindqvist R, Hjertqvist M. Rapporterade misstänkta matförgiftningar 2009: National Food Agency. 2010.
111. Lindblad M, Westöö A, Lindqvist R, Hjertqvist M, Andersson Y. Matförgiftningar i Sverige-analys av rapporterade matförgiftningar 2003-2007. Livsmedelsverket Rapport. 2009;16.
112. Lindblad M, Westöö, A, Lindqvist, R, Hjertqvist, M, Andersson, Y. Rapporterade misstänkta matförgiftningar 2007: *www.slv.se*. 2008.
113. Schmid D, Fretz R, Winter P, Mann M, Höger G, Stöger A, et al. Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2009;121(3):125-31.
114. Vitale M, Scatassa, ML, Cardamone, C, Oliveri, G, Piraino, C, Alduina, R, Napoli, C. Staphylococcal Food Poisoning Case and Molecular Analysis of Toxin Genes in *S. aureus* Strains Isolated from Food in Sicily, Italy. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2015;12(1):21-3.
115. Mossel DAA, Corry JE, Struijk CB, Baird RM. *Essentials of the microbiology of foods: a textbook for advanced studies*: John Wiley & Sons; 1995.
116. Martin S, Myers, ER, Iandolo, JJ. *S. aureus*. *Foodborne Disease Handbook, Bacterial Pathogens* (Hui YH, Pierson MD, Gorham JR, eds) Marcel Dekker Inc, New York, Basel. 2001;1:345-81.
117. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *International journal of food microbiology*. 2000;61(1):1-10.
118. Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu D-L, Ueda S, Shinagawa K. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *S. aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(3):857-62.

119. Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, et al. 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. *Epidemiology and infection*. 2003;130(01):33-40.
120. Fooladi AI, Tavakoli H, Naderi A. Detection of enterotoxigenic *S. aureus* isolates in domestic dairy products. *Iranian journal of microbiology*. 2010;2(3):135-40.
121. Pajić M. Patogenost i filogenetska srodnost sojeva *S. aureus* izolovanih iz mleka krava sa poremećenom sekrecijom. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, departman za veterinarsku medicinu Univerzitet u Novom Sadu. 2014:66.
122. Tkáčiková Ľ, Tesfaye A, Mikula I. Detection of the Genes for *S. aureus* Enterotoxins by PCR. *Acta Veterinaria Brno*. 2003;72(4):627-30.
123. Adwan GM, Abu-Shanab B, Adwan K. Enterotoxigenic *S. aureus* in raw milk in the North of Palestine. *Turkish Journal of Biology*. 2006;29(4):229-32.
124. Morandi S, Brasca M, Lodi R, Cremonesi P, Castiglioni B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *S. aureus* from milk and dairy products. *Veterinary microbiology*. 2007;124(1):66-72.
125. Rall V, Vieira F, Rall R, Vieitis R, Fernandes A, Candeias J, et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *S. aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Veterinary Microbiology*. 2008;132(3):408-13.
126. Arcuri EF, Ângelo FF, Guimarães MFM, Talon R, Borges MdF, Leroy S, et al. Toxigenic status of *S. aureus* isolated from bovine raw milk and Minas frescal cheese in Brazil. *Journal of Food Protection*®. 2010;73(12):2225-31.
127. Bendahou A, Abid M, Bouteldoun N, Catelejine D, Lebbadi M. Enterotoxigenic coagulase positive *Staphylococcus* in milk and milk products, lben and jben, in northern Morocco. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2009;3(03):169-76
128. Oh SK, Lee N, Cho YS, Shin D-B, Choi SY, Koo M. Occurrence of toxigenic *S. aureus* in ready-to-eat food in Korea. *Journal of food protection*. 2007;70(5):1153-8.
129. Bianchi DM, Gallina S, Bellio A, Chiesa F, Civera T, Decastelli L. Enterotoxin gene profiles of *S. aureus* isolated from milk and dairy products in Italy. *The Society for Applied Microbiology*. 2014;58(2):190-6.
130. Hassani S, Doust RH, Mobarez AM. Enterotoxin A gene barrier *S. aureus* within traditionally dairy products of Tehran. *International Journal of Enteric Pathogens*. 2014;2(4).

131. Pedonese F, D'ascenzi, C, Torracca, B, Zingoni, C, Tutchi, B, Fratini, F, Nuvoloni, R. *S. aureus* growth and enterotoxin production in Italian caciotta cheese. Department of Veterinary Sciences, University of Pisa, Pisa, Italy Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 2014;38:318-24.
132. Aydin A, Sudagidan M, Muratoglu K. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *S. aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. International journal of food microbiology. 2011;148(2):99-106.
133. Savić Radovanović R. Procena rizika od nalaza enterotoksina stafilokoka u mekim sirevima. Doktorska disertacija, Fakultet Veterinarske Medicine Univerzitet u Beogradu. 2015;83-91.
134. Günaydın B, Aslantaş Ö, Demir C. Detection of superantigenic toxin genes in *S. aureus* strains from subclinical bovine mastitis. Tropical animal health and production. 2011;43(8):1633-7.
135. Vernozy-Rozand C, Mazuy- Cruchaudet C, Bavai C, Richard Y. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. Letters in applied microbiology. 2004;39(6):490-4.
136. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *S. aureus* and food poisoning. Genetics and Molecular Research. 2003; 2(1): 63-76.
137. Chye FY, Abdullah A, Ayob MK. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. Food microbiology. 2004; 21(5): 535-541.
138. Schlievert PM, Shands KN, Dan BB, Schmid GP, Nishimura RD. Identification and characterization of an exotoxin from *S. aureus* associated with toxic-shock syndrome. Journal of Infectious Diseases. 1981;143(4), 509-516.
139. Uchiyama T, Tadakuma T, Imanishi K, Araake M, Saito S, Yan X, Fujikawa H, Igarashi H, Yamaura N. Activation of murine T cells by toxic shock syndrome toxin-1. The toxin-binding structures expressed on murine accessory cells are MHC class II molecules. The Journal of Immunology. 1989; 143(10), 3175-3182.
140. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. Annual Reviews in Microbiology. 2001; 55(1), 77-104.
141. Evenson ML, Hinds MW, Bernstein RS, Bergdoll MS. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. International Journal of Food Microbiology. 1988; 7(4): 311–316.

142. Janštová B, Necedová L, Janštová B, Vorlová L. *S. aureus* growth and enterotoxin production in different types of milk. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2013; 60(5):103-108.
143. Duquenne M, Fleurot I, Aigle M, Darrigo C, Boreze´e-Durant E, Derzelle S, Bouix M, Deperrois-Lafarge V, Delacroix-Buchet A. Tool for quantification of staphylococcal enterotoxin gene expression in cheese. *Applied and environmental microbiology*, 2010; 76(5): 1367-1374.
144. Fujikawa H, Morozumi S. Modeling *S. aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiology*. 2006; 23(3): 260-267.
145. Nouaille S, Rault, L, Jeanson S, Loubière P, Le Loir Y, Even S. Contribution of *Lactococcus lactis* Reducing Properties to the Downregulation of a Major Virulence Regulator in *S. aureus*, the agr System. *Applied and Environmental Microbiology* 2014; 80 (22):7028–7035.
146. Pexara A, Burriel A, Govaris A. *S. aureus* and staphylococcal enterotoxins in foodborne diseases. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 2010; 61(4): 316-322.

PRILOZI

1. Promena broja *S. aureus* SEA u pasterizovanom mleku

Table Analyzed		Pasterizovano mleko				
ANOVA summary						
F						76,8
P value						< 0,0001
P value summary						****
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)						Yes
R square						0,970
Brown-Forsythe test						
F (DFn, DFd)						0,495 (5, 12)
P value						0,7740
P value summary						ns
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)						No
Bartlett's test						
Bartlett's statistic (corrected)						
P value						
P value summary						
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)						
ANOVA table						
		SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)		34,2	5	6,84	F (5, 12) = 76,8	P < 0,0001
Residual (within columns)		1,07	12	0,0891		
Total		35,3	17			
Data summary						
Number of treatments (columns)						6
Number of values (total)						18

Number of families		1				
Number of comparisons per family		15				
Alpha		0,05				
Tukey's multiple comparisons test						
	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Broj 15/24 vs. Broj 15/48	-1,82	-2,64 to -0,998	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/24 vs. Broj 15/72	-3,35	-4,17 to -2,53	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/24 vs. Broj 22/24	-0,807	-1,63 to 0,0120	No	ns	0,0543	
Broj 15/24 vs. Broj 22/48	-3,20	-4,02 to -2,38	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/24 vs. Broj 22/72	-3,68	-4,50 to -2,86	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/48 vs. Broj 15/72	-1,53	-2,35 to -0,711	Yes	***	0,0005	
Broj 15/48 vs. Broj 22/24	1,01	0,191 to 1,83	Yes	*	0,0133	
Broj 15/48 vs. Broj 22/48	-1,38	-2,20 to -0,565	Yes	**	0,0011	
Broj 15/48 vs. Broj 22/72	-1,86	-2,68 to -1,04	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/72 vs. Broj 22/24	2,54	1,72 to 3,36	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/72 vs. Broj 22/48	0,147	-0,672 to 0,965	No	ns	0,9889	
Broj 15/72 vs. Broj 22/72	-0,330	-1,15 to 0,489	No	ns	0,7517	
Broj 22/24 vs. Broj 22/48	-2,39	-3,21 to -1,57	Yes	****	< 0,0001	
Broj 22/24 vs. Broj 22/72	-2,87	-3,69 to -2,05	Yes	****	< 0,0001	
Broj 22/48 vs. Broj 22/72	-0,477	-1,30 to 0,342	No	ns	0,4176	

2.Promena broja *S. aureus* SEA u UHT mleku

Table Analyzed		UHT mleko				
ANOVA summary						
F		58,6				
P value		< 0,0001				
P value summary		****				
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)						
R square		0,961				
Brown-Forsythe test						
F (DFn, DFd)		0,565 (5, 12)				
P value		0,7256				
P value summary		ns				
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)						
Bartlett's test		No				
Bartlett's statistic (corrected)						
P value						
P value summary						
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)						
ANOVA table						
		SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)		24,3	5	4,85	F (5, 12) = 58,6	P < 0,0001
Residual (within columns)		0,994	12	0,0829		
Total		25,3	17			
Data summary						
Number of treatments (columns)		6				
Number of values (total)		18				

Number of families		1				
Number of comparisons per family		15				
Alpha		0,05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Broj 15/24 vs. Broj 15/48	-1,33	-2,12 to -0,540	Yes	**	0,0011	
Broj 15/24 vs. Broj 15/72	-2,50	-3,29 to -1,71	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/24 vs. Broj 22/24	-1,45	-2,24 to -0,664	Yes	***	0,0005	
Broj 15/24 vs. Broj 22/48	-2,73	-3,52 to -1,94	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/24 vs. Broj 22/72	-3,61	-4,40 to -2,82	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/48 vs. Broj 15/72	-1,17	-1,96 to -0,377	Yes	**	0,0034	
Broj 15/48 vs. Broj 22/24	-0,123	-0,913 to 0,666	No	ns	0,9940	
Broj 15/48 vs. Broj 22/48	-1,40	-2,19 to -0,614	Yes	***	0,0007	
Broj 15/48 vs. Broj 22/72	-2,28	-3,07 to -1,49	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/72 vs. Broj 22/24	1,04	0,254 to 1,83	Yes	**	0,0081	
Broj 15/72 vs. Broj 22/48	-0,237	-1,03 to 0,553	No	ns	0,9069	
Broj 15/72 vs. Broj 22/72	-1,11	-1,90 to -0,320	Yes	**	0,0051	
Broj 22/24 vs. Broj 22/48	-1,28	-2,07 to -0,490	Yes	**	0,0016	
Broj 22/24 vs. Broj 22/72	-2,15	-2,94 to -1,36	Yes	****	< 0,0001	
Broj 22/48 vs. Broj 22/72	-0,873	-1,66 to -0,0838	Yes	*	0,0274	

3. Promena broja *S. aureus* TSST-1 u pasterizovanom mleku

Table Analyzed		pasterizovano mleko			
ANOVA summary					
F					137
P value					< 0,0001
P value summary					****
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)					
R square					0,983
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)					0,636 (5, 12)
P value					0,6769
P value summary					ns
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)					
Bartlett's test					No
Bartlett's statistic (corrected)					
P value					
P value summary					
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)					
ANOVA table					
Treatment (between columns)		SS	DF	MS	F (DFn, DFd) P value
Residual (within columns)		23,9	5	4,78	F (5, 12) = 137 P < 0,0001
Total		0,419	12	0,0349	
		24,3	17		
Data summary					
Number of treatments (columns)					6
Number of values (total)					18

Number of families		1				
Number of comparisons per family		15				
Alpha		0,05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Broj 15/24 vs. Broj 15/48	-2,42	-2,93 to -1,91	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/24 vs. Broj 15/72	-3,28	-3,79 to -2,77	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/24 vs. Broj 22/24	-2,45	-2,96 to -1,94	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/24 vs. Broj 22/48	-3,18	-3,69 to -2,67	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/24 vs. Broj 22/72	-3,31	-3,82 to -2,80	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/48 vs. Broj 15/72	-0,860	-1,37 to -0,347	Yes	**	0,0012	
Broj 15/48 vs. Broj 22/24	-0,0300	-0,543 to 0,483	No	ns	> 0,9999	
Broj 15/48 vs. Broj 22/48	-0,760	-1,27 to -0,247	Yes	**	0,0033	
Broj 15/48 vs. Broj 22/72	-0,890	-1,40 to -0,377	Yes	***	0,0009	
Broj 15/72 vs. Broj 22/24	0,830	0,317 to 1,34	Yes	**	0,0016	
Broj 15/72 vs. Broj 22/48	0,100	-0,413 to 0,613	No	ns	0,9838	
Broj 15/72 vs. Broj 22/72	-0,0300	-0,543 to 0,483	No	ns	> 0,9999	
Broj 22/24 vs. Broj 22/48	-0,730	-1,24 to -0,217	Yes	**	0,0046	
Broj 22/24 vs. Broj 22/72	-0,860	-1,37 to -0,347	Yes	**	0,0012	
Broj 22/48 vs. Broj 22/72	-0,130	-0,643 to 0,383	No	ns	0,9511	

4.Promena broja *S. aureus* TSST-1 u UHT mleku

Table Analyzed		UHT mleko				
ANOVA summary						
F					147	
P value					< 0,0001	
P value summary					****	
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)						
R square					0,984	
Brown-Forsythe test						
F (DFn, DFd)					0,872 (5, 12)	
P value					0,5278	
P value summary					ns	
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)						
Bartlett's test					No	
Bartlett's statistic (corrected)						
P value						
P value summary						
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)						
ANOVA table						
		SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)		28,1	5	5,63	F (5, 12) = 147	P < 0,0001
Residual (within columns)		0,460	12	0,0384		
Total		28,6	17			
Data summary						
Number of treatments (columns)						6
Number of values (total)						18

Number of families		1				
Number of comparisons per family		15				
Alpha		0,05				
Tukey's multiple comparisons test						
	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Broj 15/24 vs. Broj 15/48	-2,03	-2,57 to -1,49	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/24 vs. Broj 15/72	-3,32	-3,86 to -2,78	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/24 vs. Broj 22/24	-2,57	-3,11 to -2,03	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/24 vs. Broj 22/48	-3,16	-3,70 to -2,62	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/24 vs. Broj 22/72	-3,84	-4,38 to -3,30	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/48 vs. Broj 15/72	-1,29	-1,83 to -0,753	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/48 vs. Broj 22/24	-0,540	-1,08 to -0,00281	Yes	*	0,0486	
Broj 15/48 vs. Broj 22/48	-1,13	-1,67 to -0,593	Yes	***	0,0001	
Broj 15/48 vs. Broj 22/72	-1,81	-2,35 to -1,27	Yes	****	< 0,0001	
Broj 15/72 vs. Broj 22/24	0,750	0,213 to 1,29	Yes	**	0,0054	
Broj 15/72 vs. Broj 22/48	0,160	-0,377 to 0,697	No	ns	0,9091	
Broj 15/72 vs. Broj 22/72	-0,520	-1,06 to 0,0172	No	ns	0,0598	
Broj 22/24 vs. Broj 22/48	-0,590	-1,13 to -0,0528	Yes	*	0,0287	
Broj 22/24 vs. Broj 22/72	-1,27	-1,81 to -0,733	Yes	****	< 0,0001	
Broj 22/48 vs. Broj 22/72	-0,680	-1,22 to -0,143	Yes	*	0,0111	

5.Promena broja *S. aureus* SEA u funkciji matriksa

Table Analyzed	pasterizovano+UHT					
Repeated measures ANOVA summary						
Assume sphericity?	No					
F	14,3					
P value	0,0001					
P value summary	***					
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes					
Geisser-Greenhouse's epsilon	0,660					
R square	0,566					
Was the matching effective?	No					
F	61,8					
P value	< 0,0001					
P value summary	****					
Is there significant matching (P < 0.05)?	Yes					
R square	0,899					
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Treatment (between columns)	8,34	3	2,78	F (1,98, 21,8) = 14,3	P = 0,0001	
Individual (between rows)	132	11	12,0	F (11, 33) = 61,8	P < 0,0001	
Residual (random)	6,40	33	0,194			
Total	147	47				
Data summary						
Number of treatments (columns)	4					
Number of subjects (rows)	12					

Number of families	1					
Number of comparisons per family	6					
Alpha	0,05					
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Pasterizovano 15C vs. Pasterizovano 22C	-0,630	-1,15 to -0,106	Yes	*	0,0181	
Pasterizovano 15C vs. UHT 15C	0,109	-0,207 to 0,425	No	ns	0,7306	
Pasterizovano 15C vs. UHT 22C	-0,882	-1,56 to -0,206	Yes	*	0,0109	
Pasterizovano 22C vs. UHT 15C	0,739	0,183 to 1,30	Yes	**	0,0096	
Pasterizovano 22C vs. UHT 22C	-0,253	-0,727 to 0,222	No	ns	0,4170	
UHT 15C vs. UHT 22C	-0,992	-1,62 to -0,368	Yes	**	0,0027	

6.Promena broja *S. aureus* TSST-1 u funkciji matriksa

Table Analyzed	pasterizovano+UHT					
Repeated measures ANOVA summary						
Assume sphericity?	No					
F	9,70					
P value	0,0075					
P value summary	**					
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes					
Geisser-Greenhouse's epsilon	0,371					
R square	0,469					
Was the matching effective?						
F	30,8					
P value	< 0,0001					
P value summary	****					
Is there significant matching (P < 0.05)?						
R square	0,845					
ANOVA table						
	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Treatment (between columns)	10,7	3	3,56	F (1,11, 12,3) = 9,70	P = 0,0075	
Individual (between rows)	124	11	11,3	F (11, 33) = 30,8	P < 0,0001	
Residual (random)	12,1	33	0,368			
Total	147	47				
Data summary						
Number of treatments (columns)	4					
Number of subjects (rows)	12					

Number of families	1					
Number of comparisons per family	6					
Alpha	0,05					
Tukey's multiple comparisons test						
	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Pasterizovano 15C vs. Pasterizovano 22C	-0,810	-1,72 to 0,0987	No	ns	0,0856	
Pasterizovano 15C vs. UHT 15C	0,0425	-0,133 to 0,218	No	ns	0,8844	
Pasterizovano 15C vs. UHT 22C	-1,01	-1,91 to -0,120	Yes	*	0,0255	
Pasterizovano 22C vs. UHT 15C	0,853	-0,0630 to 1,77	No	ns	0,0704	
Pasterizovano 22C vs. UHT 22C	-0,202	-0,445 to 0,0403	No	ns	0,1131	
UHT 15C vs. UHT 22C	-1,06	-1,94 to -0,173	Yes	*	0,0186	

7. Sinteza enterotoksina A u funkciji matriksa i temperature

Table Analyzed		Sinteza SEA				
ANOVA summary						
F		208				
P value		< 0,0001				
P value summary		****				
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)						
R square		0,990				
Brown-Forsythe test						
F (DFn, DFd)		1,33 (11, 24)				
P value		0,2682				
P value summary		ns				
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)						
Bartlett's test		No				
Bartlett's statistic (corrected)						
P value						
P value summary						
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)						
ANOVA table						
Treatment (between columns)		SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Residual (within columns)		20,0	11	1,81	F (11, 24) = 208	P < 0,0001
Total		0,209	24	0,00872		
		20,2	35			
Data summary						
Number of treatments (columns)		12				
Number of values (total)		36				

Number of families						
Number of comparisons per family		66				
Alpha		0,05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Sinteza, P-15/24 vs. Sinteza, P-15/48	-0,100	-0,375 to 0,175	No	ns	0,9693	
Sinteza, P-15/24 vs. Sinteza, P-15/72	-0,400	-0,675 to -0,125	Yes	**	0,0011	
Sinteza, P-15/24 vs. Sinteza, U-15/24	-6,21e-010	-0,275 to 0,275	No	ns	> 0,9999	
Sinteza, P-15/24 vs. Sinteza, U-15/48	-0,180	-0,455 to 0,0949	No	ns	0,4649	
Sinteza, P-15/24 vs. Sinteza, U-15/72	-0,510	-0,785 to -0,235	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, P-15/24 vs. Sinteza, P-22/24	-0,390	-0,665 to -0,115	Yes	**	0,0015	
Sinteza, P-15/24 vs. Sinteza, P-22/48	-1,72	-1,99 to -1,45	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, P-15/24 vs. Sinteza, P-22/72	-2,08	-2,35 to -1,81	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, P-15/24 vs. Sinteza, U-22/24	-0,710	-0,985 to -0,435	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, P-15/24 vs. Sinteza, U-22/48	-1,28	-1,55 to -1,01	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, P-15/24 vs. Sinteza, U-22/72	-1,97	-2,24 to -1,70	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, P-15/48 vs. Sinteza, P-15/72	-0,300	-0,575 to -0,0251	Yes	*	0,0241	
Sinteza, P-15/48 vs. Sinteza, U-15/24	0,100	-0,175 to 0,375	No	ns	0,9693	
Sinteza, P-15/48 vs. Sinteza, U-15/48	-0,0800	-0,355 to 0,195	No	ns	0,9943	
Sinteza, P-15/48 vs. Sinteza, U-15/72	-0,410	-0,685 to -0,135	Yes	***	0,0008	
Sinteza, P-15/48 vs. Sinteza, P-22/24	-0,290	-0,565 to -0,0151	Yes	*	0,0324	
Sinteza, P-15/48 vs. Sinteza, P-22/48	-1,62	-1,89 to -1,35	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, P-15/48 vs. Sinteza, P-22/72	-1,98	-2,25 to -1,71	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, P-15/48 vs. Sinteza, U-22/24	-0,610	-0,885 to -0,335	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, P-15/48 vs. Sinteza, U-22/48	-1,18	-1,45 to -0,905	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, P-15/48 vs. Sinteza, U-22/72	-1,87	-2,14 to -1,60	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, P-15/72 vs. Sinteza, U-15/24	0,400	0,125 to 0,675	Yes	**	0,0011	
Sinteza, P-15/72 vs. Sinteza, U-15/48	0,220	-0,0549 to 0,495	No	ns	0,2075	
Sinteza, P-15/72 vs. Sinteza, U-15/72	-0,110	-0,385 to 0,165	No	ns	0,9422	
Sinteza, P-15/72 vs. Sinteza, P-22/24	0,0100	-0,265 to 0,285	No	ns	> 0,9999	
Sinteza, P-15/72 vs. Sinteza, P-22/48	-1,32	-1,59 to -1,05	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, P-15/72 vs. Sinteza, P-22/72	-1,68	-1,95 to -1,41	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, P-15/72 vs. Sinteza, U-22/24	-0,310	-0,585 to -0,0351	Yes	*	0,0179	
Sinteza, P-15/72 vs. Sinteza, U-22/48	-0,880	-1,15 to -0,605	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, P-15/72 vs. Sinteza, U-22/72	-1,57	-1,84 to -1,30	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, U-15/24 vs. Sinteza, U-15/48	-0,180	-0,455 to 0,0949	No	ns	0,4649	
Sinteza, U-15/24 vs. Sinteza, U-15/72	-0,510	-0,785 to -0,235	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, U-15/24 vs. Sinteza, P-22/24	-0,390	-0,665 to -0,115	Yes	**	0,0015	
Sinteza, U-15/24 vs. Sinteza, P-22/48	-1,72	-1,99 to -1,45	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, U-15/24 vs. Sinteza, P-22/72	-2,08	-2,35 to -1,81	Yes	****	< 0,0001	
Sinteza, U-15/24 vs. Sinteza, U-22/24	-0,710	-0,985 to -0,435	Yes	****	< 0,0001	

Sinteza, U-15/24 vs. Sinteza, U-22/48	-1,28	-1,55 to -1,01	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, U-15/24 vs. Sinteza, U-22/72	-1,97	-2,24 to -1,70	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, U-15/48 vs. Sinteza, U-15/72	-0,330	-0,605 to -0,0551	Yes	**	0,0097
Sinteza, U-15/48 vs. Sinteza, P-22/24	-0,210	-0,485 to 0,0649	No	ns	0,2596
Sinteza, U-15/48 vs. Sinteza, P-22/48	-1,54	-1,81 to -1,27	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, U-15/48 vs. Sinteza, P-22/72	-1,90	-2,17 to -1,63	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, U-15/48 vs. Sinteza, U-22/24	-0,530	-0,805 to -0,255	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, U-15/48 vs. Sinteza, U-22/48	-1,10	-1,37 to -0,825	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, U-15/48 vs. Sinteza, U-22/72	-1,79	-2,06 to -1,52	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, U-15/72 vs. Sinteza, P-22/24	0,120	-0,155 to 0,395	No	ns	0,9023
Sinteza, U-15/72 vs. Sinteza, P-22/48	-1,21	-1,48 to -0,935	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, U-15/72 vs. Sinteza, P-22/72	-1,57	-1,84 to -1,30	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, U-15/72 vs. Sinteza, U-22/24	-0,200	-0,475 to 0,0749	No	ns	0,3203
Sinteza, U-15/72 vs. Sinteza, U-22/48	-0,770	-1,04 to -0,495	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, U-15/72 vs. Sinteza, U-22/72	-1,46	-1,73 to -1,19	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, P-22/24 vs. Sinteza, P-22/48	-1,33	-1,60 to -1,06	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, P-22/24 vs. Sinteza, P-22/72	-1,69	-1,96 to -1,42	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, P-22/24 vs. Sinteza, U-22/24	-0,320	-0,595 to -0,0451	Yes	*	0,0132
Sinteza, P-22/24 vs. Sinteza, U-22/48	-0,890	-1,16 to -0,615	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, P-22/24 vs. Sinteza, U-22/72	-1,58	-1,85 to -1,31	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, P-22/48 vs. Sinteza, P-22/72	-0,360	-0,635 to -0,0851	Yes	**	0,0038
Sinteza, P-22/48 vs. Sinteza, U-22/24	1,01	0,735 to 1,28	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, P-22/48 vs. Sinteza, U-22/48	0,440	0,165 to 0,715	Yes	***	0,0003
Sinteza, P-22/48 vs. Sinteza, U-22/72	-0,250	-0,525 to 0,0249	No	ns	0,0986
Sinteza, P-22/72 vs. Sinteza, U-22/24	1,37	1,10 to 1,64	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, P-22/72 vs. Sinteza, U-22/48	0,800	0,525 to 1,07	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, P-22/72 vs. Sinteza, U-22/72	0,110	-0,165 to 0,385	No	ns	0,9422
Sinteza, U-22/24 vs. Sinteza, U-22/48	-0,570	-0,845 to -0,295	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, U-22/24 vs. Sinteza, U-22/72	-1,26	-1,53 to -0,985	Yes	****	< 0,0001
Sinteza, U-22/48 vs. Sinteza, U-22/72	-0,690	-0,965 to -0,415	Yes	****	< 0,0001

8. Ekspresija sea gena u pasterizovanom mleku

Table Analyzed	pasterizovanom mleku					
Repeated measures ANOVA summary						
Assume sphericity?	No					
F	5805					
P value	< 0,0001					
P value summary	****					
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes					
Geisser-Greenhouse's epsilon	0,199					
R square	1,00					
Was the matching effective?						
F	9,49					
P value	0,0034					
P value summary	**					
Is there significant matching (P < 0.05)?	Yes					
R square	0,000545					
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Treatment (between columns)	52,8	6	8,80	F (1,19, 2,39) = 5805	P < 0,0001	
Individual (between rows)	0,0288	2	0,0144	F (2, 12) = 9,49	P = 0,0034	
Residual (random)	0,0182	12	0,00152			
Total	52,9	20				
Data summary						
Number of treatments (columns)	7					
Number of subjects (rows)	3					
<hr/>						
Number of families	1					
Number of comparisons per family	21					
Alpha	0,05					
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary Adjusted P Value		
Kalibrator vs. Ekspresija SEA, P-15/24	0,0800	-0,103 to 0,263	No	ns	0,2276	
Kalibrator vs. Ekspresija SEA, P-15/48	-0,290	-0,673 to 0,0933	No	ns	0,0851	
Kalibrator vs. Ekspresija SEA, P-15/72	-1,11	-1,38 to -0,841	Yes	**	0,0015	
Kalibrator vs. Ekspresija SEA, P-22/24	-0,940	-1,16 to -0,719	Yes	**	0,0013	
Kalibrator vs. Ekspresija SEA, P-22/48	-1,31	-1,44 to -1,18	Yes	****	< 0,0001	
Kalibrator vs. Ekspresija SEA, P-22/72	-4,89	-5,42 to -4,36	Yes	****	< 0,0001	

9. Ekspresija sea gena u UHT mleku

Table Analyzed	UHT mleku				
Repeated measures ANOVA summary					
Assume sphericity?	No				
F	3377				
P value	< 0,0001				
P value summary	****				
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes				
Geisser-Greenhouse's epsilon	0,262				
R square	0,999				
Was the matching effective?					
F	3,18				
P value	0,0778				
P value summary	ns				
Is there significant matching (P < 0.05)?	No				
R square	0,000314				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	64,6	6	10,8	F (1,57, 3,14) = 3377	P < 0,0001
Individual (between rows)	0,0203	2	0,0102	F (2, 12) = 3,18	P = 0,0778
Residual (random)	0,0383	12	0,00319		
Total	64,7	20			
Data summary					
Number of treatments (columns)	7				
Number of subjects (rows)	3				

Number of families	1				
Number of comparisons per family	21				
Alpha	0,05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Kalibrator vs. Ekspresija SEA, UHT-15/24	-0,0500	-0,184 to 0,0843	No	ns	0,2953
Kalibrator vs. Ekspresija SEA, UHT-15/48	-0,870	-1,25 to -0,487	Yes	*	0,0109
Kalibrator vs. Ekspresija SEA, UHT-15/72	-1,56	-1,88 to -1,24	Yes	***	0,0004
Kalibrator vs. Ekspresija SEA, UHT-22/24	-1,45	-1,83 to -1,07	Yes	**	0,0026
Kalibrator vs. Ekspresija SEA, UHT-22/48	-2,89	-3,43 to -2,35	Yes	***	0,0001
Kalibrator vs. Ekspresija SEA, UHT-22/72	-5,41	-5,64 to -5,18	Yes	****	< 0,0001

10. Ekspresija *tst* gena u pasterizovanom mleku

Table Analyzed	pasterizovanom mleku					
Repeated measures ANOVA summary						
Assume sphericity?	No					
F	1096					
P value	< 0,0001					
P value summary	****					
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes					
Geisser-Greenhouse's epsilon	0,315					
R square	0,998					
Was the matching effective?						
F	10,6					
P value	0,0023					
P value summary	**					
Is there significant matching (P < 0.05)?	Yes					
R square	0,00319					
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Treatment (between columns)	20,1	6	3,36	F (1,89, 3,78) = 1096	P < 0,0001	
Individual (between rows)	0,0647	2	0,0323	F (2, 12) = 10,6	P = 0,0023	
Residual (random)	0,0367	12	0,00306			
Total	20,2	20				
Data summary						
Number of treatments (columns)	7					
Number of subjects (rows)	3					
<hr/>						
Number of families	1					
Number of comparisons per family	21					
Alpha	0,05					
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Kalibrator vs. Ekspresija TSST-1, P-15/24	0,330	-0,353 to 1,01	No	ns	0,1920	
Kalibrator vs. Ekspresija TSST-1, P-15/48	-1,85	-2,25 to -1,45	Yes	***	0,0006	
Kalibrator vs. Ekspresija TSST-1, P-15/72	-1,46	-1,78 to -1,14	Yes	***	0,0007	
Kalibrator vs. Ekspresija TSST-1, P-22/24	-0,830	-1,40 to -0,265	Yes	*	0,0235	
Kalibrator vs. Ekspresija TSST-1, P-22/48	-2,18	-2,64 to -1,72	Yes	***	0,0005	
Kalibrator vs. Ekspresija TSST-1, P-22/72	-2,36	-2,59 to -2,13	Yes	****	< 0,0001	

11. Ekspresija *tst* gena u UHTmleku

Table Analyzed		UHT mleku				
Repeated measures ANOVA summary						
Assume sphericity?	No					
F	800					
P value	< 0,0001					
P value summary	****					
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes					
Geisser-Greenhouse's epsilon	0,258					
R square	0,998					
Was the matching effective?						
F	9,46					
P value	0,0034					
P value summary	**					
Is there significant matching (P < 0.05)?	Yes					
R square	0,00392					
ANOVA table						
	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Treatment (between columns)	11,0	6	1,84	F (1,55, 3,10) = 800	P < 0,0001	
Individual (between rows)	0,0436	2	0,0218	F (2, 12) = 9,46	P = 0,0034	
Residual (random)	0,0276	12	0,00230			
Total	11,1	20				
Data summary						
Number of treatments (columns)	7					
Number of subjects (rows)	3					
Number of families						
	1					
Number of comparisons per family						
	21					
Alpha						
	0,05					
Tukey's multiple comparisons test						
	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted	P Value
Kalibrator vs. Ekspresija TSST-1, UHT-15/24	-0,360	-0,715 to -0,00465	Yes	*		0,0488
Kalibrator vs. Ekspresija TSST-1, UHT-15/48	-1,81	-2,34 to -1,28	Yes	**		0,0041
Kalibrator vs. Ekspresija TSST-1, UHT-15/72	-1,73	-2,11 to -1,35	Yes	***		0,0008
Kalibrator vs. Ekspresija TSST-1, UHT-22/24	-1,57	-1,94 to -1,20	Yes	**		0,0012
Kalibrator vs. Ekspresija TSST-1, UHT-22/48	-1,74	-2,05 to -1,43	Yes	****		< 0,0001
Kalibrator vs. Ekspresija TSST-1, UHT-22/72	-1,93	-2,30 to -1,56	Yes	***		0,0002

BIOGRAFSKI PODACI

Milijana Babić rođena je 28. aprila 1984. godine u Lazarevcu. Osnovnu školu završila je u Lajkovcu sa odličnim uspehom.

Završila je gimnaziju u Lazarevcu, prirodno-matematički smer, a potom je upisala Fakultet veterinarske medicine u Beogradu. Studije je završila 15. novembra 2010. godine sa prosečnom ocenom 7,79.

Specijalističke akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu završila je 28. septembra 2012. godine i odbranila je specijalistički rad pod naslovom „Preživljavanje i tehnološki značaj termorezistentnih mikroorganizama u mleku“ sa ocenom 10. Završila je i užu specijalizaciju iz oblasti mikrobiologije namirnica.

Od 03. septembra 2013. godine, zaposlena je na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu kao stručni saradnik na Katedri za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla.

Do sada je, kao autor ili koautor, objavila petnaest naučnih radova i saopštenja iz oblasti veterinarske medicine. Svoje radove izlagala je na međunarodnim i nacionalnim skupovima.

Govori engleski i španski jezik.