

# Występowanie gronkowców enterotoksycznych w mleku surowym

JAROSŁAW BYSTRÓŃ, KATARZYNA KOSEK-PASZKOWSKA, JERZY MOLENDĄ

Zakład Mikrobiologii Żywności i Higieny Przetwórstwa Katedry Higieny Produktów Zwierzęcych  
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Bystróż J., Kosek-Paszkowska K., Molenda J.

## Occurrence of enterotoxigenic staphylococci in raw milk

### Summary

The aim of this study was to determine the occurrence of enterotoxigenic staphylococci among staphylococci isolated from raw milk. There is a chance of transmitting into milk enterotoxigenic strains from cows, which have no symptoms of mastitis. The investigations were carried out on 150 samples of cow's milk from two different dairy farms and 100 samples of swabs from dairy equipment after washing and disinfection. From the examined samples, 40 strains of staphylococci were isolated; 36 strains taken from milk samples and 4 from the swabs. Nearly half of the isolated strains were coagulase-positive. In the group of coagulase-positive staphylococci, 18 strains were determined as *Staphylococcus aureus* and 1 as *Staphylococcus intermedius*. The ability to produce enterotoxins was found in 66% of the strains of *S. aureus*. Generally enterotoxigenic strains were determined in 5% of the examined samples. None of the strains of coagulase-negative staphylococci or *S. intermedius* have any ability to produce enterotoxin. The examination of enterotoxigenicity of staphylococci occurring in food products seems to be more reliable for the evaluation of hazards caused by these bacteria.

**Keyword:** raw milk, food poisoning, staphylococcal enterotoxins

Obecność gronkowców enterotoksycznych w środkach żywności jest jedną z najczęściej stwierdzanych przyczyn zatruc pokarmowych u ludzi. Potencjalna zdolność tych drobnoustrojów do syntezy enterotoksyn stwarza istotne zagrożenie dla zdrowia człowieka. Ta ich właściwość w głównej mierze zdecydowała o konieczności kontroli ich występowania w produktach żywnościowych.

Enterotoksyny są klasycznymi egzotoksynami. Enterotoksyny gronkowcowe stanowią grupę białek o masie cząsteczkowej od 28 000 do 35 000 daltonów, wśród których wyróżniono następujące serotypy: A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D, E, G i H (21, 23). Aminokwasami dominującymi w cząsteczkach białka enterotoksyn, niezależnie od ich typu są: lizyna, kwas asparaginy, kwas glutaminowy oraz tyrozyna. Geny determinujące ich syntezę zlokalizowane są zarówno w genomie bakteryjnym jak i w plazmidach (19).

Enterotoksyny wykazują znaczną ciepłooporność, a szczególnie enterotoksyna A, która ogrzewana w buforze weralonowym w temperaturze 121,1°C nie ulega inaktywacji przez 18 minut. Największe ich ilości wytwarzane są przy wzroście w temperaturach optymalnych dla rozwoju poszczególnych szczepów gronkowców. Przy hodowli w temperaturze 37°C wytwa-

rzanie enterotoksyny rozpoczyna się już w początkowym okresie wzrostu logarytmicznego populacji. Wraz z obniżaniem temperatury hodowli ilość syntetyzowanej enterotoksyny maleje. Wzrost w temperaturach niższych od 20°C i wyższych od 46°C praktycznie hamuje ich wytwarzanie (16, 22).

Najczęstszymi przyczynami zatruc pokarmowych u ludzi są enterotoksyny A i B. Wśród objawów klinicznych obserwuje się bóle głowy, nudności, wymioty, rzadziej biegunkę, a niekiedy zapaść naczyniową. Objawy te pojawiają się po 2-6-godzinnym okresie inkubacji. Temperatura ciała zwykle jest w normie, choć może się podnieść do 38°C. Do całkowitego wyzdrowienia dochodzi najczęściej po 1 do 3 dniach, niemniej około 10% chorych wymaga hospitalizacji. Choroba najczęściej przebiega u dzieci oraz osób w starszym wieku (11, 18, 23).

Koszty leczenia zatruc gronkowcowych są znaczne. Według danych Todda koszty te w Stanach Zjednoczonych wynoszą aż 1,5 miliarda dolarów rocznie (17). We Francji zatrucia gronkowcowe klasyfikowane są na trzecim miejscu wśród przyczyn wszystkich zatruc pokarmowych, po pałeczkach *Salmonella* i *Clostridium perfringens* (14). Także w Polsce należą do najczęściej stwierdzanych przyczyn zatruc pokarmo-

wych. W 1998 r. odnotowano 13 zbiorowych ognisk zatrucia, w których zachorowało 375 ludzi (13).

Celem pracy było określenie udziału gronkowców enterotoksycznych wśród szczepów wyizolowanych z mleka krów. Gronkowce należą do głównych czynników etiologicznych infekcji gruczołu mlekowego u tych zwierząt, często także ich postaci podklinicznych. Istnieje zatem możliwość transmisji do puli mleka zbiorczego enterotoksycznych szczepów, pochodzących od zwierząt nie wykazujących klinicznych zmian w wymieniu.

### Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 150 próbek mleka krów pochodzących z dwóch różnych obór, nie wykazujących objawów klinicznych *mastitis* oraz 100 wymazów pobieranych ze sprzętu udojowego i zbiorników mleka, po ich umyciu i dezynfekcji.

Próbki posiewano na podłoże agarowe z krwią i podłoże Giolitti-Cantoni. Z wyrosłych kolonii, morfologicznie podobnych do kolonii gronkowców, wykonywano preparat mikroskopowy oraz określano cechy fizjologiczne i biochemiczne drobnoustrojów takie jak zdolność wytwarzania katalazy i koagulazy oraz utylizacji cukrów, alkoholi i aminokwasów. Właściwości biochemiczne wyosobnionych szczepów badano posługując się zestawem testów API Staph, firmy bioMérieux i komputerowym systemem diagnostycznym API-Lab+. Zdolność produkcji enterotoksyn stwierdzano przy użyciu immuno-enzymatycznego testu Tecra Staphylococcal Enterotoxin Via. Test umożliwia wykrycie obecności enterotoksyn A, B, C, D i E przy ich progowej koncentracji w badanym materiale od 1 ng/ml, jednak bez możliwości różnicowania typu enterotoksyny.

### Wyniki i omówienie

Z badanego materiału wyosobniono ogółem 40 szczepów gronkowców, w tym 36 z mleka i 4 z wymazów. Niemal połowa z nich wytwarzała koagulazę (17 wyosobnionych z mleka i 2 z wymazów). Wśród gronkowców koagulazododatnich 18 szczepów zaklasyfikowano do gatunku *Staphylococcus aureus*, a jeden (z mleka) jako *S. intermedius*. Z kolei wśród gronkowców koagulazoujemnych stwierdzono następujące gatunki: *S. xylosum* (8 szczepów), *S. hominis* (6 szczepów), *S. chromogenes* (4 szczepy) oraz *S. haemolyticus*, *S. caprae* i *S. lentus* (1 szczep) (tab. 1, 2).

Ogółem gronkowce stwierdzono w 16% badanych próbek. Większość izolacji dotyczyła próbek mleka (24%) i nielicznych wymazów (4%). Gronkowce koagulazododatnie stanowiły niemal połowę (19) ogółu wyosobnionych szczepów.

Zdolność wytwarzania enterotoksyn stwierdzono u 12 szczepów *S. aureus*, wśród których 11 pochodziło z mleka, a 1 z wymazu. Właściwości enterotoksycznych nie posiadał *S. intermedius*, podobnie jak żaden ze szczepów gronkowców koagulazoujemnych. Ogółem

Tab. 1. Gronkowce wyosobnione w posiewach z mleka surowego i ze sprzętu udojowego (liczba szczepów)

Materiał	Gronkowce koagulazododatnie		Gronkowce koagulazoujemne					
	<i>Staph. aureus</i>	<i>Staph. intermedius</i>	<i>Staph. xylosum</i>	<i>Staph. hominis</i>	<i>Staph. chromogenes</i>	<i>Staph. lentus</i>	<i>Staph. caprae</i>	<i>Staph. haemolyticus</i>
mleko	16	1	7	6	3	1	1	1
wymazy	2	-	1	-	1	-	-	-
ogółem	18	1	8	6	4	1	1	1

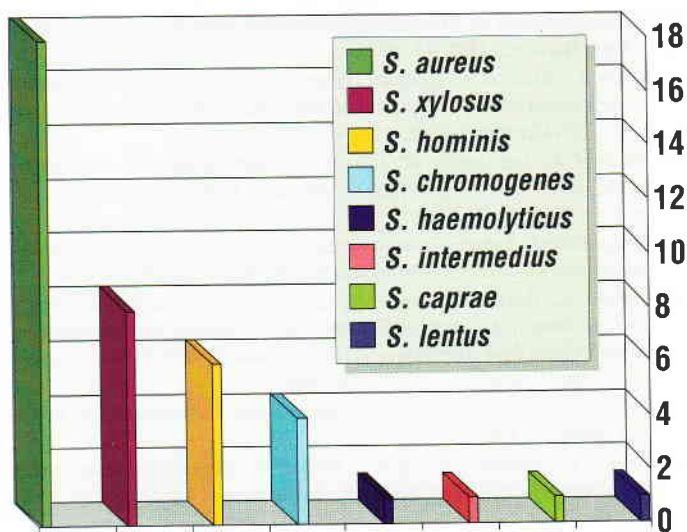
Tab. 2. Właściwości biochemiczne wyizolowanych szczepów gronkowców

Test	<i>S. aureus</i>	<i>S. xylosum</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. chromogenes</i>
Glukoza	+	+	+	+
Fruktoza	+	+	+	+
Mannoza	+	+	-	+
Maltoza	+	+	+	+
Laktoza	+	+	-	+
Trehaloza	+	+	+	+
Mannitol	+	+	±	-
Ksylitol	-	-	-	-
Melibioza	-	-	-	-
Azotany	+	+	+	+
PAL	+	+	+	+
VP	+	+	±	-
Rafinoza	-	-	-	-
Ksyloza	-	+	-	-
Sacharoza	+	+	+	±
MDG	-	-	-	-
NAG	+	+	-	-
ADH	+	-	+	+
Ureaza	+	+	-	±

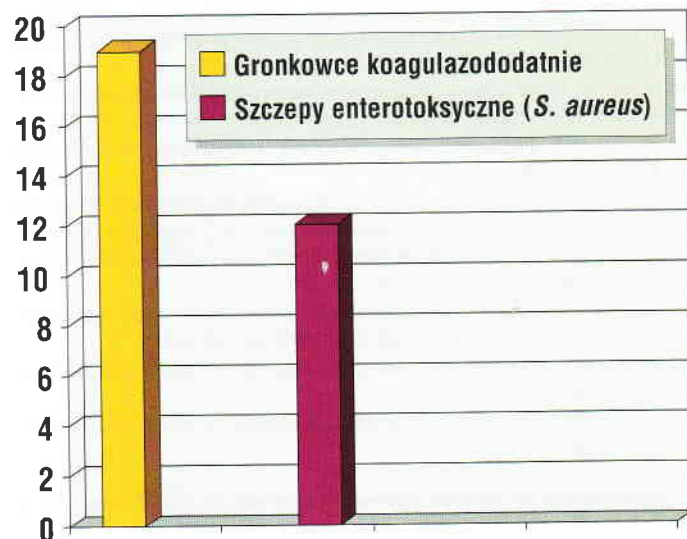
łem szczepy enterotoksyczne stwierdzono w niemal 5% badanych próbek. (ryc. 1, 2)

Obecność w środkach żywności gronkowców enterotoksycznych stanowi potencjalne zagrożenie dla zdrowia człowieka. Przez wiele lat uważano, że jedynie gronkowce koagulazododatnie, a przede wszystkim *Staphylococcus aureus* posiada zdolność wytwarzania enterotoksyn. W ostatnich latach stwierdzono, iż w niewielkiej ilości enterotoksyny wytwarzają także inne koagulazododatnie gatunki, takie jak *S. hyicus* i *S. intermedius*, a także niektóre gatunki gronkowców koagulazoujemnych, np. *S. epidermidis* i *S. xylosum* (2, 4, 5, 12, 20).

Najczęściej przyczyną zatruc pokarmowych są enterotoksyny typu A i B. Kliniczne symptomy choroby, nudności, wymioty i biegunka pojawiają się zwykle w 2 do 6 godzin po spożyciu zawierającego je pokarmu. Powrót do zdrowia następuje po 1 do 3 dniach, jednak około 10% chorych wymaga hospitalizacji (11, 19, 23).



Ryc. 1. Wyzolowane gatunki gronkowców koagulazododatnich i koagulazoujemnych



Ryc. 2. Udział szczepów enterotoksycznych wśród wyizolowanych gronkowców koagulazododatnich

Mechanizm tych objawów nie jest jasny. Prawdopodobnie wymioty są następstwem oddziaływania enterotoksyn na synapsy nerwowe w błonie śluzowej jelit, skąd impulsy przenoszone są za pośrednictwem nerwu błędnego do ośrodka wymiotnego w mózgu (7). Podobnie niejasny jest mechanizm wystąpienia biegunki. Stymulacja cyklazy adenylowej przez enterotoksyny gronkowców uważana jest za mało prawdopodobny efekt sprawczy biegunki (7). W ostatnich latach stwierdzono, że enterotoksyny gronkowców wykazują właściwości superantygenów, aktywujących limfocyty T do produkcji licznych limfokyn. Być może objawy kliniczne zatrucia pozostają w związku ze wzrostem ich koncentracji w organizmie (11).

W badaniach własnych właściwości enterotoksyczne wykazywały wyłącznie szczepy gronkowców złocistych (*S. aureus*). Zdolność taką stwierdzono u ponad połowy z nich (63%). Obecność szczepów koagulazododatnich, w tym także enterotoksycznych, stwierdzono także w wymazach ze sprzętu udojowego, pod-

danego myciu i dezynfekcji (tab. 1). Budzi to zastrzeżenia odnośnie do skuteczności tych zabiegów i czyni prawdopodobną transmisję zarazków do mleka podczas następnego udoju.

Częstotliwość występowania szczepów enterotoksycznych wśród gronkowców złocistych jest różna. Z danych piśmiennictwa wynika, że w poszczególnych badaniach cechą tą wykrywano u bardzo różnego odsetka (0-56%) szczepów *S. aureus* wyosobnionych z mleka i jego przetworów (1, 3, 9, 14, 15). Podobne zróżnicowanie (16-86%) obserwowano wśród szczepów pochodzących z przetworów mięsnych, zarówno surowych, jak i poddanych obróbce termicznej (6, 8, 10). Przyjmuje się, że liczebność populacji zarazków w produktach żywnościowych, niezbędna dla wytworzenia koncentracji toksyny wywołującej objawy choroby, wynosi co najmniej  $5 \times 10^6$  komórek w 1 g (16, 18).

Gronkowce enterotoksyczne obecne w surowym mleku są niezwykle rzadko powodem zatruc u ludzi. Znacznie częściej ich przyczyną są produkty mleczne. Znaczący wpływ na ten stan rzeczy może mieć wyraźnie wolniejszy w temperaturze 25°C wzrost *S. aureus* niż *S. lactis* lub enterokoków, a produkcja enterotoksyn w tej temperaturze jest znacznie zredukowana (16, 18). Aktualne dane wskazują, że koncentracja enterotoksyny rzędu od 0,5 do 1,0 ng w 1 ml lub 1 g produktu jest wystarczająca do wywołania objawów zatrucia (16, 21). Takie stężenia toksyn stwierdzono w mleku czekoladowym i w mleku w proszku, które było powodem zatruc dzieci szkolnych (16, 21).

Zatem mimo znikomego prawdopodobieństwa wystąpienia zatruc po spożyciu mleka surowego, obecność w nim potencjalnych producentów enterotoksyn musi być brana pod uwagę przy ocenie ryzyka różnych przetworów mlecznych. Nie przestrzeganie rygorów procesu technologicznego lub niewłaściwy dobór jego parametrów może stać się przyczyną namnożenia obecnych w surowcu drobnoustrojów i wytworzenia wykazujących znaczną termooporność enterotoksyn. Szczepy enterotoksyczne wyosobnione w badaniach własnych, produkowały podczas 24-godzinnej hodowli enterotoksyny w stężeniu co najmniej 1 ng/ml podłoża, ponieważ taką najmniejszą ich koncentrację wykrywa wg producenta zastosowany test. Jest to zgodnie z przytoczonymi badaniami koncentracja wystarczająca do wywołania choroby. Tego rodzaju możliwość powinna zatem być uwzględniana przy ocenie ryzyka produktów mlecznych.

Z przedstawionych danych wynika, że kryterium wytwarzania koagulazy nie jest w pełni obiektywnym wskaźnikiem chorobotwórczości gronkowców, zwłaszcza wobec wykazania właściwości enterotoksycznych u szczepów koagulazoujemnych (4, 5, 20). Wskazuje to na potrzebę poszerzenia diagnostyki gronkowców o określanie ich enterotoksyczności, a także na uwzględnienie tych badań w obowiązujących przepisach (normach), określających wymagania, jakie w

odniesieniu do gronkowców muszą spełniać produkty spożywcze.

## Wnioski

1. Gronkowce wytwarzające enterotoksyny stanowią znaczny odsetek szczepów koagulazododatnich, wyosobnionych z mleka krów nie wykazujących klinicznych objawów zapalenia wymienia. Ich obecność w mleku stwarza potencjalne zagrożenie dla zdrowia człowieka, stąd wskazane jest zmodyfikowanie zakresu obecnie wykonywanych badań.

2. Wprowadzenie do obowiązujących badań żywności obowiązku określania zdolności enterotoksycznych gronkowców w niej obecnych, stwarza możliwość bardziej rzetelnej oceny zagrożeń powodowanych przez te drobnoustroje.

## Piśmiennictwo

1. Bennet R. W., Yeterian M., Smith W., Coles C. M., Sassaman M., Mac Clure F. D.: Staphylococcus aureus identification characteristics and enterotoxigenicity. J. Food Sci. 1986, 51, 1337-1339.
2. Breckinridge J. C., Bergdoll M. S.: Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin-producing Staphylococcus. N.Engl. J. Med. 1971, 284, 541-543.
3. Castro R., Schoebitz R., Montes L., Bergdoll M. S.: Enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus isolated from cheese made from unpasteurized milk. Lebensm.-Wiss. Technol. 1986, 19, 401-402.
4. Crass B. A., Bergdoll M. S.: Involvement of coagulase negative staphylococci in Toxic Shock Syndrom. J. Clin. Microbiol. 1986, 23, 43-45.
5. Danielsson M. L., Hellberg B.: The biochemical activity of enterotoxin and non enterotoxin producing staphylococci. Acta Vet. Scand. 1977, 18, 266-273.
6. Ewald S.: Enterotoxin production by Staphylococcus aureus strains isolated from danish foods. Int. J. Food Microbiol. 1987, 4, 207-214.
7. Hedberg C. W., Mac Donald K.L., Osterholm M.T.: Changing epidemiology of food-borne diseases. A Minnesota Prospective., Clin.Infect.Dis. 1994, 18, 671-83.
8. Isigidi B. K., Mathieu A. M., Devriese L. A., Godard C., Van Hoof J.: Ente-

rotoxin production in different biotypes isolated from food and meat plants. J. Appl. Bacteriol. 1992, 72, 16-20.

9. Kenny K., Reiser R. F., Bastida-Corcuera F. D., Norcross N. L.: Production of enterotoxins and Toxic Shock Syndrome Toxin by bovine mammary isolates. J. Clin. Microbiol. 1993, 31, 706-707.
10. Marin M. E., Del Carmen M., Cornejo I.: „Enterotoxigenicity of Staphylococcus strains isolated from Spanish dry-cured hams.” Appl. Environ. Microbiol. 1992, 58, 1067-1069.
11. Naścigórska J.: Zatrucia enterotoksyną gronkowców. W: Choroby odzwierzęce przenoszone drogą pokarmową. PZWL, Warszawa 1999, s. 63-65.
12. Orden J. A., Goyache J., Hernandez J., Domenech A., Saurez G., Gomez-Lucia E.: Detection of enterotoxins and TSST-1 secreted by Staphylococcus aureus isolated from ruminant mastitis. Comparison of ELISA and Immno-blot. J. Appl. Bacteriol. 1992, 72, 486-489.
13. Przybylska A.: Zatrucia i zakażenia pokarmowe w 1988 roku. Przegl. Epidemiol. 2000, 54, 103-114.
14. Rosec J. P., Guiraud J. P., Dalet C., Richard N.: Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. Internat. J. Food Microbiol. 1997, 35, 213-221.
15. Ružičkova V.: Characteristics of Staphylococcus aureus isolated in dairy farms. Vet. Med. Czech. 1994, 39, 37-44.
16. Shapton D. A., Shapton N. F.: Principles and Practices for the Safe Processing of Foods, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, 1998, s. 283-297.
17. Todd E. C. D.: Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the United States. J. Food Prot. 1989, 52, 595-601.
18. Topley G. S. and Wilson's: Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, Sixth Edition, Edward Arnold, London, 1970, s. 764-801, 2089-2092.
19. Tranter H. S.: Foodborne illness. Foodborne staphylococcal illness, Lancet 1990, 336, 1044-67.
20. Vernozy C., Mazuy C., Lapeyre C., Chantegret G., Richard Y.: Etude des souches de staphylocoques à coagulase négative (S.C.N.) isolées de fromages de chèvre en région Rhône-Alpes: identification, antibiotype et entérotoxicité. Rev. Med. Vet. 1994, 145, 107-113.
21. Yi-Cheng Su, Amy C. Lee Wong: Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. J. Food Prot. 1997, 60, 195-202.
22. Zaleski S. J.: Mikrobiologia żywności pochodzenia zwierzęcego. WNT, Warszawa, 1985, s. 217-232.
23. Zaremba M. L., Borowski J.: Mikrobiologia lekarska. PZWL, Warszawa, 1997, s. 267-276.

Adres autora: dr Jarosław Bystron, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław; e-mail: bystry@ozi.ar.wroc.pl

**MAES D. G., DELUYKER H., VERDONCK M., CASTRYCK F., MIRY C., VRIJENS B., DUCATTELE R., DE KRUIF A.: Czynniki niezakaźne wywołujące zmiany mikroskopowe i makroskopowe w płucach świń rzeźnych w okresie od urodzenia do końca tuczu. (Non-infectious factors associated with macroscopic and microscopic lung lesions in slaughter pigs from farrow-to-finish herds). Vet. Rec. 148, 41-46, 2001 (2)**

Badania epidemiologiczne, którym poddano świnię w okresie od urodzenia do końca tuczu miały na celu określenie wpływu czynników ryzyka o charakterze niezakaźnym na występowanie zmian makro- i mikroskopowych w płucach. Zmiany makroskopowe świadczące o zapaleniu płuc i zapaleniu opłucnej występowały w 25% stad, przy czym nacieki limfohistiocytarne stwierdzano u około 10% osobników w stadzie. Średnia częstotliwość występowania w stadzie makroskopowych zmian zapalnych w płucach wynosiła 25%, w opłucnej 15%. Zmiany zapalne w płucach były ujemnie skorelowane z zapaleniem opłucnej i dodatnio z występowaniem nacieków limfohistiocytarnych. Zmiany zapalne w płucach występowały częściej w okresie sprzedaży zwierząt oraz uboju. Częstotliwość występowania i nasilenie zmian zapalnych w opłucnej była większa przy dużym zagęszczeniu stad świń w danej okolicy oraz w miesiącach styczeń-luty i marzec-kwiecień.

G.

**KLIMEŠ J., JUŘICOVÁ Z., LITERÁK I., ŠHRNILEC P., TRACHTA E SILVA E.: Częstość występowania przeciwciał dla kleszczowego zapalenia mózgu i flawiwirusa Zachodniego Nilu oraz kliniczne objawy kleszczowego zapalenia mózgu u psów w Republice Czeskiej. (Prevalence of antibodies to tickborne encephalitis and West Nile flaviviruses and the clinical signs of tickborne encephalitis in dogs in the Czech Republic). Vet. Rec. 148, 17-20, 2001 (1)**

Surowice 151 psów z terenów Czech, na których u ludzi występuje kleszczowe zapalenie mózgu (TBE) przebadano testem zahamowania odczynu hemaglutynacji na obecność przeciwciał TBE i dla flawiwirusa Zachodniego Nilu (WN). Przeciwciała dla TBE w mianie 40 i powyżej występowały w surowicach 5 psów, zaś u jednego psa stwierdzono obecność przeciwciał dla WN. Ponieważ u jednego psa miano było wysokie można przypuszczać wystąpienie reakcji krzyżowych pomiędzy tymi dwoma spokrewnionymi serologicznie wirusami. U 3 psów rasy rotweiler o mianie przeciwciał dla wirusa TBE wynoszącym 320 występowały objawy zapalenia mózgu i opon mózgowych. Wszystkie trzy psy przeżyły po leczeniu. Zanik miana przeciwciał dla wirusa TBE u jednego psa po leczeniu potwierdził, że przyczyną choroby była infekcja wywołana przez wirus TBE.

G.