

Enterotoksyny gronkowcowe oraz ich wykrywanie w mleku i przetworach mlecznych

WERONIKA KORPYSA, JOLANTA G. ROLA, JACEK OSEK

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego
Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Korpysa W., Rola J. G., Osek J.

Staphylococcal enterotoxins and their detection in milk and milk products

Summary

One of the most common causes of food-borne illnesses is staphylococcal food poisoning due to enterotoxins primarily produced by enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus*. Staphylococcal enterotoxins (SE) are a group of single-chain proteins resistant to high temperature and proteolytic enzymes. Growth of *S. aureus* to a concentration of 10^6 or more cells per gram of food is generally considered necessary to produce a sufficient amount of enterotoxin to cause intoxication. Outbreaks of staphylococcal food poisoning most often are associated with processed red meats, poultry products, mayonnaise and dairy products (especially cheeses). Most outbreaks result from the combined effects of food contamination, often through unsanitary handling and holding the foods at the wrong temperature, thus allowing growth of *S. aureus* and synthesis of enterotoxin. As little as 20 ng of staphylococcal enterotoxin can produce symptoms of intoxication – vomiting, diarrhea and abdominal cramping. To date 20 enterotoxins have been identified and only 7 of them: A, B, C1, C2, C3, D and E can be identified by antibodies with commercial immunoassay kits. A number of methods have been developed for the detection of staphylococcal enterotoxins in foods including immuno-diffusion assay, reversed passive latex agglutination assay (RPLA), radio-immunoassays (RIA), enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA). All of these methods are based on the specific antibodies directed to the enterotoxins. Several commercial kits based on these techniques are now available. The Community Reference Laboratory (CRL) of milk and milk products validated a reference method to detect staphylococcal enterotoxins in milk products. This method is based on a double sandwich ELISA as a detection step prior to toxin extraction using dialysis concentration.

Keywords: *S. aureus*, staphylococcal enterotoxin, food poisonings

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* należą do Gram-dodatnich ziarniaków, które układają się w pary, krótkie łańcuchy lub grona powstałe w następstwie wielokierunkowych podziałów (22). Z tych też względów drobnoustroje te nazywane są często gronkowcami. Bakterie te są bardzo szeroko rozpowszechnione w przyrodzie, nie wytwarzają zarodników i są względnie beztlenowcami (20). Ze względu na stosowane metody identyfikacji oraz właściwości chorobotwórcze gronkowce dzieli się na 2 zasadnicze grupy – koagulazoujemne i koagulazododatnie. Szczepy gronkowców koagulazododatnich, rzadziej koagulazoujemnych, posiadające zdolność wytwarzania enterotoksyn są jedną z najczęstszych przyczyn zatrucia pokarmowych u ludzi. Związane jest to z szeroko występującym nosicielstwem chorobotwórczych szczepów *Staphylococcus* u ludzi i zwierząt (8). Objawy zatrucia enterotoksyną gronkowcową występują po 1-6 godzinach od spożycia skażonej żywności i są to głównie nudności, wymioty i biegunka (20). Mogą wystąpić także bóle głowy i spadek ciśnienia krwi (2). Objawy te zwykle ustępują po kilku lub kilkunastu godzinach, dlatego większość chorych nie zgłasza się do lekarza, co powoduje, że wiele przy-

padków gronkowcowych zatruc pokarmowych nie jest rozpoznawana i ewidencjonowana.

Enterotoksyny gronkowcowe

Enterotoksyny gronkowcowe są grupą białek zbudowanych z pojedynczego łańcucha o stosunkowo małej masie cząsteczkowej (27-34 kDa). Wytwarzane są one w trakcie wszystkich faz wzrostu bakterii, ale w największej ilości w okresie wzrostu logarytmicznego i przy końcu fazy stacjonarnej (20, 21). Podczas gdy bakterie *S. aureus* są dość wrażliwe na działanie wysokich temperatur i mogą być łatwo inaktywowane w trakcie obróbki cieplnej, ich enterotoksyny są bardzo odporne na wysoką temperaturę, jak też na enzymy proteolityczne, odwodnienie, promieniowanie gamma oraz na pH w zakresie 2-12 (7). Najbardziej ciepłooporna jest enterotoksyna B, która wykrywana była w próbkach sterylizowanych w autoklawie przez 20 minut w temperaturze 121,1°C. Stwierdzono również, że inaktywowane termicznie enterotoksyny B i C ulegały reaktywacji po 24 godzinach w temperaturze 25°C (18). Do tej pory oznaczono 20 enterotoksyn gronkowcowych (SE – Staphylococcal enterotoxins), różniących się sek-

wencją aminokwasów w łańcuchu białkowym, a tym samym masą molekularną, punktem izoelektrycznym i budową antygenową. Oznaczono je, odpowiednio: A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R i U. Wszystkie toksyny zawierają dużo lizyny, kwasów asparaginowego i glutaminowego oraz tyrozyny. Większość z nich wytwarza charakterystyczną pętlę cysteinową, która, jak się uważa, odpowiedzialna jest za wystąpienie objawów wymiotnych u zakażonych osób (7, 9, 12, 13).

Toksyny SE cechują się wyjątkową odpornością na działanie szeregu enzymów proteolitycznych (pepsyna, tripsyna, chymotrypsyna, renina) przez co wykazują niezmienną aktywność biologiczną w przewodzie pokarmowym. Nieco odmienne właściwości posiada enterotoksyna typu F, która nie wywołuje typowych objawów intoksykacji po podaniu doustnym małym. Została ona określona jako toksyna syndromu szoku toksycznego (TSST-1) (8, 18).

Spośród pozostałych wymienionych wyżej toksyn SE, największe znaczenie w patogenezie intoksykacji pokarmowych u ludzi posiada enterotoksyna A (SEA), odpowiedzialna za wystąpienie ok. 75% schorzeń. Dużą rolę odgrywają też enterotoksyny B, C i D (2). Brak jest danych epidemiologicznych wskazujących na obecność innych niż wymienione odmian enterotoksyn gronkowcowych w intoksykacjach ludzi na tle *S. aureus*.

Materiał genetyczny odpowiedzialny za wytwarzanie enterotoksyn SE zlokalizowany jest w różnych miejscach bakteryjnego DNA. Mogą to być odcinki chromosomalne (np. SEB, SEI), zawarte w chromosomie wyspy patogenności (np. SEK, SEL), lub też elementy mobilne – transpozony (SEB), plazmidy (SEB, SEJ) i profagi (SEA, SEE). Ekspresja tych genów uzależniona jest od szeregu genów regulatorowych, np. agr, sar, których aktywność warunkowana jest przez określone czynniki środowiskowe (pH, temperatura, koncentracja niektórych jonów). Wykazano, że niskie pH wpływa hamująco na aktywność genu agr, przez co z kolei obniża ekspresję enterotoksyn typu B, C i D. Z drugiej strony efektu takiego nie obserwowano w stosunku do SEA i SEJ (8).

Wytwarzanie enterotoksyn przez chorobotwórcze szczepy *S. aureus* zależy od wielu czynników: rodzaju żywności, pH, temperatury, aktywności wodnej, warunków atmosferycznych i obecności innych mikroorganizmów. Obecność mikroflory towarzyszącej hamuje wzrost *S. aureus* i wytwarzanie enterotoksyn. Stwierdzono, że dodana podczas produkcji serów kultura starterowa bakterii mlekowych wytwarza kwas mlekowy, który obniża pH, wytwarza H_2O_2 oraz niekiedy bakteriocyny, a ponadto konkuruje o składniki odżywcze. Ekspresja enterotoksyn gronkowcowych optymalna jest w neutralnym pH, a znacznie zahamowana w kwaśnym; przy pH poniżej 5 toksyny SE nie są uwalniane. Wysoka koncentracja NaCl w produktach żywnościowych (powyżej 12%) również całkowicie blokuje wytwarzanie SE, niezależnie od pH środowiska (8).

Ilość enterotoksyny niezbędna do wywołania objawów chorobowych zależy od indywidualnej wrażliwości na toksynę, jej spożytej ilości oraz ogólnego stanu zdrowia osoby zakażonej, ale przyjmuje się że dawka, wywołująca objawy zatrucia wynosi od 20 do 100 ng (1, 7, 15).

Enterotoksyny gronkowcowe nie są inaktywowane (lub jedynie w niewielkim stopniu) podczas przetwarzania żywności, dystrybucji oraz przygotowywania pożywienia w domu. Z tego też względu, gdy liczba enterotoksygennych gronkowców osiągnie w żywności poziom 10^5 - 10^6 cfu w 1 g lub ml, to nawet po ich inaktywacji nadal pozostaje ryzyko zatrucia uwolnioną przez nie enterotoksyną (15). Do chwili obecnej w większości krajów szacowanie ryzyka mikrobiologicznego dla *S. aureus* opiera się na identyfikacji i określaniu liczby gronkowców koagulazo-dodatnich w produktach końcowych (8). Jednak to raczej obecność enterotoksyn gronkowcowej powinna być brana pod uwagę przy ocenie ryzyka zatrucia na tle *S. aureus*. We Francji badania na obecność enterotoksyn gronkowcowej w produktach mlecznych są wykonywane w przypadku, gdy liczba gronkowców wynosi powyżej 10^4 komórek na gram (10). Bakterie *S. aureus* mogą być łatwo wyeliminowane z produktów żywnościowych przez pasteryzację lub w produktach fermentowanych przez współzawodnictwo z inną mikroflorą, podczas gdy SE jest odporna na większość zabiegów stosowanych przy produkcji żywności. Co więcej, również inne gatunki *Staphylococcus* zdolne są do wytwarzania enterotoksyny. Z tych względów Komitet Naukowy Unii Europejskiej zaleca ustalenie we wszystkich krajach członkowskich systemu ewidencjonującego zatrucia pokarmowe wywołane przez enterotoksyny gronkowcowe (19).

Źródła zakażenia

Głównym źródłem zakażenia są osoby będące nosicielami *S. aureus* i biorące udział w produkcji lub przygotowywaniu żywności. Stwierdzono, że we wszystkich potwierdzonych przypadkach gronkowcowych zatruc pokarmowych produkt żywnościowy lub przynajmniej jeden z jego składników został zakażony szczepem *S. aureus* wytwarzającym enterotoksynę, po czym został poddany działaniu temperatury optymalnej dla wzrostu bakterii. Taka temperatura jest wymagana np. przy produkcji serów, jednak w innych przypadkach jest wynikiem niewłaściwego chłodzenia produktu (8). Można więc stwierdzić, że przyczyną gronkowcowych zatruc pokarmowych jest niewłaściwe postępowanie z żywnością i niedostateczna higiena produkcji (7).

Gronkowce mogą łatwo namnażać się w wielu produktach żywnościowych, a zwłaszcza w mięsie, drobiu, majonezie, produktach mlecznych i jajach (11). Szczególnie dobrze gronkowce namnażają się w produktach wcześniej poddanych obróbce termicznej i pozabawionych w ten sposób innych bakterii, które w większości wpływają hamująco na wzrost *S. aureus* i wytwarzanie enterotoksyny (8). Typowym przykładem zatrucia enterotoksyną gronkowcową, spowodowanym

niewłaściwym postępowaniem z produktem żywnościowym, jest przypadek z Brazylii, kiedy 12 osób zatrulo się ciastem z kremem. Zostało ono przygotowywane przez osobę od której wyizolowano szczep *S. aureus* wytwarzający enterotoksynę A. Ciasto posmarowano kremem kiedy było jeszcze ciepłe i dlatego, pomimo godzinnego chłodzenia, zbyt wysoka temperatura umożliwiła wytwarzanie enterotoksyny. Podczas konsumpcji produkt znajdował się przez około 2 godziny w temperaturze pokojowej, co spowodowało wytworzenie wystarczającej do wywołania zatrucia ilości enterotoksyny. Część osób, które spożyły ciasto tego samego dnia, kiedy zostało zrobione, nie zachorowało, co wskazuje, że nie otrzymały one wystarczającej dawki enterotoksyny lub wykazywały znaczną oporność osobniczą. Objawy zatrucia rozwinęły się natomiast u części osób, które spożyły ciasto pierwszego dnia i u wszystkich, którzy jedli ten produkt następnego dnia. W zbadanej próbie liczba gronkowców wynosiła $1,2 \times 10^8$ cfu/g (16).

Bergdoll (3) opisał przypadek zatrucia enterotoksyną gronkowcową znajdującą się w serze wyprodukowanym z mleka, które po pasteryzacji i przed zaszczepieniem kulturą starterową zostało zakażone *S. aureus*.

Znany jest również przypadek intoksykacji gronkowcowej przez enterotoksynę, która została wytworzona przez *S. aureus* na skutek przechowywania mleka czekoladowego w zbyt wysokiej temperaturze przez 4-5 godzin przed prawidłowo przeprowadzoną pasteryzacją. Proces ten pozwolił na inaktywację bakterii, ale nie miał wpływu na termooporną toksynę. Ilość enterotoksyny SEA w 400 ml pojemniku mleka wynosiła ok. 200 ng (4).

Metody wykrywania enterotoksyn gronkowcowych

Wykrycie enterotoksyny gronkowcowej wytwarzanej przez izolowane szczepy *S. aureus* jest potwierdzeniem, że produkt spożywczy był przyczyną zatrucia wywołanego przez chorobotwórcze gronkowce. Identyfikacja enterotoksyn w żywności wymaga jednak zastosowania bardziej czułych metod niż stwierdzenie samej produkcji enterotoksyn przez izolaty bakteryjne hodowane w odpowiednich warunkach *in vitro* (11). Istnieją trzy rodzaje metod używanych do wykrywania enterotoksyn gronkowcowych – próby biologiczne, testy oparte na biologii molekularnej i metody serologiczne.

Próby biologiczne

Pierwsze badania eksperymentalne nad zatruciami gronkowcowymi u ludzi przeprowadzane były głównie na ochotnikach, ponieważ zwierzęta doświadczalne okazały się niewrażliwe lub słabo wrażliwe na doustnie wprowadzane przesączy toksyczne. Zatrucie gronkowcowe wywoływano jednak u małą, wprowadzając im przesącz z hodowli enterotoksycznych gronkowców bezpośrednio do żołądka oraz u kotów po dotrzewnowym wprowadzeniu przesączy z hodowli *S. aureus*. Do wystąpienia objawów w przypadku tych modeli zwierzęcych konieczne są jednak wyższe dawki toksyny niż te wywołujące objawy u ludzi i muszą

wynosić co najmniej 200 ng (19, 21). Testy biologiczne, z uwagi m.in. na ograniczenia etyczne, nie są obecnie często stosowane.

Metody molekularne

Metoda PCR pozwala na stwierdzenie obecności lub braku genów kodujących wytwarzanie enterotoksyn *S. aureus*, ale nie daje informacji co do ekspresji tych genów podczas przetwarzania i przechowywania żywności. Z tego względu PCR ma ograniczone zastosowanie i może być wykorzystywany jedynie do identyfikacji szczepów odpowiedzialnych za wywołanie zatrucia pokarmowego (19).

Metody serologiczne

Obecnie do wykrywania enterotoksyn gronkowcowych najczęściej stosuje się metody serologiczne, takie jak: podwójna immunodyfuzja płytkowa, metoda radioimmunologiczna (RIA), testy lateksowe oraz metody oparte na sandwich ELISA (17). Podwójna immunodyfuzja płytkowa była pierwszym testem umożliwiającą wykrycie 100 ng enterotoksyny w 1 ml produktu. W metodzie tej do dołków w żelu agarozowym wprowadza się surowicę skierowaną przeciw enterotoksynie *S. aureus*, referencyjną enterotoksynę oraz badane próbki. Po 24 godzinach na granicy zetknięcia się antygeny (toksyny) ze swoistymi przeciwciałami powstają prążki precypitacyjne. Jeżeli badane próbki zawierają enterotoksynę, to powstaną łączące się ze sobą linie precypitacyjne. W przypadku natomiast, gdy antygeny będą różne, prążki będą się przecinały. Jest to oficjalna metoda wykrywania enterotoksyn gronkowcowych rekomendowana przez AOAC (17, 19).

Inną metodą umożliwiającą wykrycie enterotoksyn A, B, C, D i E w żywności jest test radioimmunologiczny (RIA), który polega na łączeniu się enterotoksyny gronkowcowej, występującej w badanym materiale, z przeciwciałami antyenterotoksycznymi opłaszczonymi w fazie stałej (mikropłytką). Następnie dodaje się obcogatunkową specyficzną surowicę, zawierającą przeciwciała znakowane radioaktywnym pierwiastkiem, skierowane przeciwko enterotoksynie *S. aureus* i odcenia się poziom radioaktywności, który jest proporcjonalny do ilości związanych przeciwciał, a tym samym do stężenia enterotoksyny w badanym materiale. Czułość tej metody wynosi poniżej 1 ng/g produktu, jednak ze względów bezpieczeństwa (radioizotopy) została wycofana z większości laboratoriów (19).

Podobną czułość jak metoda RIA mają testy lateksowe, które pozwalają na otrzymanie wyniku w ciągu 20-24 godzin. Opierają się one na reakcji odwróconej, biernej aglutynacji, która zachodzi między cząsteczkami lateksu pokrytymi przeciwciałami antyenterotoksycznymi a obecną w badanym materiale toksyną *S. aureus* (17). Gotowy test lateksowy SET RPLA (Denka-Seiken) pozwala na wykrycie enterotoksyny gronkowcowej w próbkach żywności i w filtratach z hodowli *S. aureus*. Zestaw ten nie wykrywa jednak enterotok-

syny typu E. Czulość testu w przypadku badania żywności wynosi 1 ng/g produktu (5).

Obecnie w badaniach diagnostycznych najczęściej stosowany jest odczyn sandwich ELISA, który pozwala na wykrycie już 0,1 ng w 1 g produktu. W metodzie tej do studzienek mikroplitek opłaszczonych przeciwciałami wprowadza się badany, odpowiednio przygotowany materiał. Jeżeli enterotoksyna gronkowcowa jest obecna w próbce, to łączy się ona z przeciwciałami, a następnie z dodanymi drugimi przeciwciałami swoistymi znakowanymi enzymem. Po dodaniu substratu następuje reakcja barwna, którą mierzy się kolorymetrycznie. Od października 2001 roku jest to oficjalna metoda kontroli mleka i produktów mlecznych używana do identyfikacji enterotoksyny gronkowcowej na podstawie Dyrektywy 92/46 EEC (19).

Istnieje obecnie szeroki wybór gotowych testów immunoenzymatycznych umożliwiających szybkie wykrycie enterotoksyn gronkowcowych w żywności. We wszystkich metodach etap detekcji musi być poprzedzony etapem ekstrakcji toksyny z badanych produktów żywnościowych. Do testów tych należy m.in. RIDASCREEN SET (R-Biopharm) – umożliwiający identyfikację enterotoksyn A, B, C, D, E *S. aureus*, oparty na sandwich ELISA. Pozwala on na wykrywanie toksyn w produktach płynnych i stałych, a także w hodowlach bakteryjnych. Limit detekcji w zależności od badanego produktu wynosi 0,2-0,7 ng/ml (14).

Innym testem handlowym umożliwiającym wykrycie 1 ng enterotoksyny w 1 ml przygotowanej próbki, jest zestaw Staphylococcal Enterotoxin VIA (TECRA International Pty. Ltd.). Test ten jest również oficjalnie zalecany przez AOAC. Po otrzymaniu pozytywnego wyniku testu, poszczególne odmiany enterotoksyny gronkowcowej mogą być następnie zidentyfikowane zestawem Staphylococcal Enterotoxin Identification VIA (TECRA) (7, 19).

Kolejnym zestawem ELISA używanym do detekcji toksyn *S. aureus* jest Transia Set Plate (Diffchem) pozwalający na wykrycie 7 głównych wariantów enterotoksyn (A, B, C1, C2, C3, D i E) w żywności w ciągu 2 godzin od chwili przygotowania próbki do badań. Limit detekcji wynosi tu około 0,1 ng/ml. Zestaw ten został użyty w badaniach międzylaboratoryjnych mających na celu określenie zdolności laboratoriów referencyjnych krajów Unii Europejskiej do wykrywania enterotoksyny gronkowcowej w produktach mlecznych (6, 19).

Toksynę *S. aureus* można też wykryć metodą VIDAS Staph. Enterotoxin II (bioMérieux), która jest oparta na automatycznym teście jakościowym dostosowanym do analizatora VIDAS, wykorzystującym technikę ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). Jest to bardzo szybka i czuła metoda, pozwalająca na otrzymanie wyników w ciągu 80 minut, przy granicy wykrywalności wynosi ok. 0,25 ng/ml (17).

Podsumowanie

Czuła i szybka metoda detekcji enterotoksyny gronkowcowej jest ważna dla oszacowania bezpieczeństwa

żywności, jak również dla zapewnienia diagnostyki gronkowcowych zatruc pokarmowych (7). Metoda referencyjna wykrywania enterotoksyny gronkowcowej w mleku i produktach mlecznych obejmuje 2 etapy: ekstrakcję i koncentrację poprzez dializę oraz detekcję przy użyciu metody immunologicznej opartej na sandwich ELISA. Unijne Laboratorium Referencyjne mleka i przetworów mlecznych zaleca zestaw Transia Plate do oznaczania enterotoksyny gronkowcowej metodą ELISA jako najodpowiedniejszy do jej wykrywania w mleku i produktach mlecznych (8, 19).

Piśmiennictwo

1. Asao T., Kumeda Y., Kawai T., Shibata T., Oda H., Haruki K., Nakazawa H., Kozaki S.: An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.* 2003, 130, 33-40.
2. Balaban N., Rasooly A.: Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, 61, 1-10.
3. Bergdoll M.: Staphylococcus aureus, [in:] *Foodborne Bacterial Pathogens* (Doyle, M.P., ed.) Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA, 463-523.
4. Evenson M., Hinds M., Bernstein R., Bergdoll M.: Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.* 1988, 7, 31-316.
5. Fukijawa H., Igarashi H.: Rapid latex agglutination test for detection of staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. *Appl. Env. Microbiol.* 1988, 10, 234-2348.
6. Hennekine J., Gohier M., Maire T., Lapeyre C., Lombard B., Dragacci S.: First proficiency testing to evaluate the ability of European Union National Reference Laboratories to detect staphylococcal enterotoxins in milk products. *J. AOAC* 2003, 86, 332-339.
7. Lapeyre C.: Immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins: International Laboratory Study. *J. AOAC Int.* 1996, 5, 1095-1101.
8. Le Loir Y., Baron F., Gautier M.: Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2003, 2, 63-76.
9. Letertre C., Perelle S., Dilasser F., Fach P.: Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the ege cluster of Staphylococcus aureus. *J. Appl. Microbiol.* 2003, 95, 38-43.
10. Macaluso L., Lapeyre C., Dragacci S.: Determination of influential factors during sample preparation for staphylococcal enterotoxin detection in dairy products. *Analisis* 1998, 26, 300-304.
11. Meyrand A., Atrache V., Bavai C., Montet M., Vernozzy-Rozand C.: Evaluation of an alternative extraction procedure for enterotoxin determination in dairy products. *Lett. Appl. Microbiol.* 1999, 28, 411-415.
12. Omoe K., Hu D., Takahashi-Omoe H., Nakane A., Shinagawa K.: Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect. Immun.* 2003, 71, 6088-6094.
13. Orvin P., Leung D., Tripp T., Bohach G., Earhart C., Ohlendorf D., Schlievert P.: Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. *Biochemistry* 2002, 41, 14033-14040.
14. Park C., Akhtar M., Rayman M.: Evaluation of a commercial enzyme immunoassay kit (Ridascreen) for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E in foods. *Appl. Env. Microbiol.* 1994, 60, 677-681.
15. Park C., Akhtar M., Rayman M.: Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (Tecra) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl. Env. Microbiol.* 1992, 58, 2509-2512.
16. Pereira M., do Carmo L., dos Santos E., Bergdoll M.: Staphylococcal food poisoning from cream-filled cake in a metropolitan area of South-Eastern Brazil. *Rev. Saude Publica*, 1994, 6, 406-409.
17. Pimbley D., Patel P.: A review of analytical methods for the detection of bacterial toxins. *J. Appl. Microbiol.* 1998, 84, 98S-109S.
18. Sandel M., McKillip J.: Virulence and recovery of Staphylococcus aureus relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. *Food Control* 2004, 15, 5-10.
19. SCVPH (Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health), Staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses. Adopted on 26-27 March 2003.
20. Soriano J., Font G., Molto C., Manes J.: Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. *Trends Food Sci. Techn.* 2002, 13, 60-67.
21. Surgalla M., Bergdoll M., Dack G.: Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by the monkey feeding test. *J. Lab. Clin. Med.* 1953, 41, 782-788.
22. Witkowska-Gwiazdowska A.: Występowanie, chorobotwórczość i diagnostyka Staphylococcus aureus. Agencja Wydawnicza Sowa, Warszawa 2002, 3-12.

Adres autora: mgr Weronika Korpysa, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: weronika.korpysa@piwet.pulawy.pl