Wytwarzanie enterotoksyn gronkowcowych w żywności

JUSTYNA SCHUBERT, SYLWIA KRAKOWIAK, JACEK BANIA

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul Norwida 31, 50-375 Wrocław

Otrzymano 03.07.2017

Zaakceptowano 31.07.2017

Schubert J., Krakowiak S., Bania J.

Production of staphylococcal enterotoxins in food

Summary

Staphylococcal food poisoning results from ingestion of food contaminated with toxins produced by enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. Common symptoms of this intoxication include vomiting, diarrhea, and abdominal cramps. Staphylococcal enterotoxins are resistant to heat and a number of environmental factors. Certain cheeses, milk powder, and whey powder are the only foodstuffs that are being routinely examined for the presence of staphylococcal enterotoxins SEA-SEE. The newly identified enterotoxins are not included in the current examination scheme. Enterotoxin-producing staphylococci were already isolated from meat, meat products, milk, dairy products, fermented food products, vegetables, pastries and fish products. It has been demonstrated that many environmental factors associated with food processing and storage can significantly influence the level of secreted enterotoxins by *S. aureus* strains. Nevertheless, only a few studies on the production of staphylococcal enterotoxins were conducted in foodstuffs. Most data on their expression is based on experiments performed with a low number of *S. aureus* strains, and usually only SEA-SEE enterotoxins are investigated. These results inclined many authors to the conclusion that milk and dairy products are unfavorable environments for expression of staphylococcal enterotoxins. However, recent research has indicated a significant heterogeneity in the ability of enterotoxin production in milk among *S. aureus* strains derived from diverse sources. *S. aureus* strains able to secrete high levels of enterotoxins in milk and meat juice were described. This research indicates that a high number of *S. aureus* strains should be used for studying staphylococcal enterotoxins expression in food. It seems to be the appropriate way to assess the risk of staphylococcal food poisoning.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, staphylococcal enterotoxins, food

Gronkowcowe zatrucia pokarmowe

Jednym z wielu zagrożeń bezpieczeństwa żywności są gronkowcowe zatrucia pokarmowe. Są one wywoływane przez spożycie produktów zawierających enterotoksyny wytwarzane przez niektóre szczepy gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*). Typowe symptomy takich zatruc występują zazwyczaj po 0,5-8 godzinach od spożycia i obejmują wymioty, którym może towarzyszyć biegunka oraz bolesne skurcze mięśni gładkich przewodu pokarmowego. Początek występowania objawów i ich charakter zależą od ilości spożytej toksyny i indywidualnej wrażliwości osoby. Ze względu na szybki okres rekonwalescencji i niezgłaszanie przypadków gronkowcowych zatruc pokarmowych dane dotyczące liczby przypadków tych zatruc mogą być zaniżone (21). Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) corocznie publikuje raporty dotyczące m.in. przypadków zatruc pokarmowych odnotowanych w 32 państwach Europy.

W 2015 r. *S. aureus* był odpowiedzialny za 434 (10,1%) spośród 4362 zewidencjonowanych przypadków zatruc pokarmowych, z czego zdecydowana większość miała miejsce we Francji (91,7%). Fakt ten może wiązać się z wysokim poziomem spożycia serów przez mieszkańców tego kraju. Zaobserwowano niewielką tendencję wzrostową w porównaniu z rokiem poprzednim, gdzie liczba zgłoszonych przypadków w Europie wynosiła 393 (<http://www.efsa.europa.eu/en/publications>).

Enterotoksyny wytwarzane przez *S. aureus*

Enterotoksyny gronkowcowe należą do rodziny gronkowcowych i paciorkowcowych egzotoksyn pirogennych. Enterotoksyny są białkami o masie molekularnej 24-28 kDa, posiadającymi pojedynczy łańcuch polipeptydowy. Są rozpuszczalne w wodzie i roztworach soli. Charakteryzują się wysoką stabilnością termiczną i odpornością na działanie wielu czynników środowiska, np. niskiego pH, które może niszczyć

komórki *S. aureus*. Enterotoksyny gronkowcowe nie ulegają hydrolizie w obecności enzymów proteolitycznych, takich jak: tripsyna, pepsyna, papaina, rennina i chymotrypsyna. Z tych względów enterotoksyny pozostają aktywne w trakcie procesu przetwarzania żywności, jak też w trakcie przechodzenia przez układ pokarmowy człowieka (7). Dotychczas opisano 23 enterotoksyny gronkowcowe, których nazwy są tworzone poprzez dodawanie kolejnych liter alfabetu do skrótu SE (Staphylococcal Enterotoxin), tj. SEA-SEIY (31).

S. aureus ma zdolność wytwarzania enterotoksyn w zakresie temperatury 10-46°C, z optimum przypadającym na 34-40°C. Do czynników wpływających na wytwarzanie enterotoksyn zalicza się także: odczyn środowiska, jego aktywność wodną (a_w), stężenie soli, natlenienie, potencjał oksydoredukcyjny oraz obecność mikroflory towarzyszącej. Za wartości graniczne dla wytwarzania enterotoksyn gronkowcowych uznano pH poniżej 5 i powyżej 9,6, a_w nie mniejszą niż 0,86 oraz stężenie NaCl powyżej 12% (1). Z uwagi na obszerność tematu poleca się inne prace przeglądowe dotyczące opisu białek z rodziny i właściwości enterotoksyn gronkowcowych (4, 33).

Wykrywanie enterotoksyn gronkowcowych w żywności

W świetle Rozporządzenia Komisji Europejskiej (WE) nr 1441/2007 w żywności wykrywa się 5 najwcześniej opisanych enterotoksyn gronkowcowych (SEA-SEE), określanych mianem toksyn klasycznych. Badanie to dotyczy wyłącznie niektórych serów, mleka w proszku i serwatki w proszku. W produktach tych rutynowo oznacza się stopień zanieczyszczenia gronkowcami koagulazo-dodatnimi. W przypadkach, gdy ich liczba przewyższa 10^5 jtk/g, produkt poddaje się badaniu na obecność enterotoksyn. Metodą wykrywania enterotoksyn w żywności jest zatwierdzona przez Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej ds. Gronkowców Koagulazo-Dodatnich, w tym *S. aureus* (EU Reference Laboratory for Coagulase-Positive Staphylococci, including *Staphylococcus aureus* – EURLCPS) metoda przesiewowa oparta na testach immunoenzymatycznych VIDAS SET 2 i Ridascreeen SET Total (38). Testy te pozwalają na detekcję enterotoksyn SEA-SEE, wymagając wieloetapowego przygotowania próbki. Charakteryzuje je wysoka czułość i specyficzność, prostota wykonania oraz relatywnie szybki wynik, jednak w pewnych sytuacjach obecne procedury zapewnienia bezpieczeństwa żywności dotyczącego obecności enterotoksyn gronkowcowych mogą się wydać niedostateczne. Możliwe jest bowiem nie stwierdzenie obecności *S. aureus* w produkcie, który może zawierać enterotoksyny. Znacząca redukcja komórek *S. aureus* następuje już w trakcie ogrzewania w temperaturze 65°C, więc standardowa obróbka cieplna powinna całkowicie eliminować obecność tych bakterii w wielu produktach. Enterotoksyny są natomiast czynnikami wysoce termoodpornymi, zachowującymi

aktywność biologiczną mimo ogrzewania. Mogą zatem przetrwać pasteryzację, a nawet sterylizację produktów. Za najbardziej ciepłooporną uznano enterotoksynę B, której obecność stwierdzano nawet w próbkach żywności sterylizowanych przez 20 minut w temperaturze 121°C (26, 30, 40).

Enterotoksyczne szczepy *S. aureus* były izolowane z wielu produktów spożywczych, m.in. mięsa i produktów mięsnych, mleka i jego przetworów, żywności fermentowanej, warzyw, wyrobów cukierniczych z kremem i produktów rybnych (21). W USA opisano przypadek zbiorowego zatrucia na skutek spożycia mleka o smaku czekoladowym zanieczyszczonego enterotoksyną gronkowcową. Przyczyną było przechowywanie mleka przed etapem pasteryzacji w temperaturze wyższej niż warunki chłodnicze przez 4-5 godzin. Proces pasteryzacji unieszkodliwił komórki *S. aureus*, nie wyeliminował jednak wytworzonych wcześniej enterotoksyn (12).

Aktywność wymiotna enterotoksyn gronkowcowych

Dotychczas nie zostały dokładnie określone stężenia enterotoksyn gronkowcowych, których spożycie wywołuje wymioty. Związane jest to z brakiem odpowiedniego modelu zwierzęcego, który odzwierciedlałby przebieg zatrucia zachodzącego u człowieka. Poszczególne gatunki zwierząt wykazują różny stopień wrażliwości na działanie enterotoksyn gronkowcowych. Uważa się, że najwyższą wrażliwością charakteryzuje się człowiek (6). Obecnie do badań wykorzystuje się małpy *Macaca fascicularis* oraz ryjówka domowego (*Suncus murinus*), ssaka należącego do rodziny ryjówkowatych (15, 28). Wykorzystywanie małp wiąże się z wysokimi kosztami i pociąga za sobą wątpliwości natury etycznej. W eksperymentach przeprowadzonych na małpach, przy doustnym lub dootrzewnowym podaniu enterotoksyn A, B, C₂, D oraz E ustalono, że do wywołania efektu wymiotnego konieczne jest podanie zwierzęciu od 5 do 20 µg enterotoksyny (6). Badania przeprowadzone dotychczas wskazują, że aktywność wymiotna enterotoksyn klasycznych jest nawet 2-krotnie wyższa niż nowo opisanych czynników (28). Prace przeprowadzone przez Hu i wsp. (15) na *Suncus murinus* wykazały znaczące zróżnicowanie efektu wymiotnego białek rodziny enterotoksyn. W wyniku dootrzewnowej iniekcji toksyn wykazano, że dawki indukujące wymioty u ryjówka domowego są istotnie niższe dla SEA, SEE i SEI w porównaniu do SEB, SEC₂, SED, SEG oraz SEH. Wykazano, iż na aktywność wymiotną toksyn duży wpływ wywiera sposób ich podania. Stwierdzono bowiem, iż wartość ED₅₀ (Effective dose – dawka wywołująca efekt u 50% osobników) dla enterotoksyny A przy podaniu dootrzewnowym *S. murinus* była niemal 11-krotnie niższa niż przy podaniu doustnym. W badaniach efektu wymiotnego enterotoksyn wykorzystuje się zarówno białka natywne, jak i rekombinowane, gdyż przypuszcza się, że posiadają one zbliżoną aktywność biologiczną (16).

Dane zebrane przez Hennekinne i wsp. (14) na podstawie analizy przypadków zbiorowych zatruc gronkowcowych wskazują, iż dawka enterotoksyn wystarczająca do wywołania wymiotów może zawierać się w bardzo szerokim zakresie. Dla dorosłego człowieka wynosi ona 10-20 µg, natomiast w przypadku osób wrażliwych wystarczy spożycie 1 µg enterotoksyny gronkowcowej. Analiza niektórych przypadków zbiorowych zatruc gronkowcowych związanych z produktami na bazie mleka zanieczyszczonymi enterotoksyną A pozwoliła wskazać najniższe dawki gronkowcowej toksyny powodujące wymioty. Stężenia SEA wytworzone przez szczepy *S. aureus* odpowiedzialne za zatrucia związane z tą toksyną wynosiły zaledwie 0,5-2 ng/ml (11, 12). Są to dawki znacznie niższe niż te oszacowane w próbach biologicznych przeprowadzonych na zwierzętach (28).

Regulacja ekspresji enterotoksyn gronkowcowych

Poziom wytwarzania enterotoksyn gronkowcowych wykazuje różnorodność zależną od rodzaju toksyny, otoczenia genetycznego i sposobu regulacji ekspresji genu toksyny (7). Uważa się, iż najważniejszym systemem kontrolującym ekspresję czynników wirulencji u *S. aureus* jest dwuskładnikowy system regulacyjny agr (accessory gene regulator). Operon agr składa się z dwóch jednostek transkrypcyjnych, RNAII i RNAIII (27). Transkrypt RNAII koduje system wyczuwania liczebności (quorum sensing) składający się z genów: agrA, agrB, agrC oraz agrD. AgrC jest zlokalizowanym w błonie komórkowej białkiem sensorowym, którego aktywacja zachodzi w momencie, gdy stężenie induktora w środowisku, będącego w przypadku *S. aureus* cyklicznym tiolaktonem, osiąga pewną krytyczną wartość. AgrD jest propeptydem, z którego w efekcie proteolizy wydzielana jest na zewnątrz komórki bakterii cząsteczka induktora. Związanie induktora przez AgrC prowadzi do fosforylacji białka ArgA, które wiąże się z promotorem P2 kontrolującym transkrypt RNAII oraz P3 kontrolującym RNAIII. Transkrypt RNAIII, który jest efektem systemu agr, reguluje ekspresję wielu genów kodujących czynniki wirulencji, posiadając w swym obrębie także sekwencję genu kodującego hemolizynę δ (hld). W trakcie trwania hodowli bakteryjnej, kiedy wzrasta liczba komórek, dochodzi do aktywacji systemu agr, co pociąga za sobą wzrost poziomu RNAIII. Podwyższony poziom RNAIII wpływa na zwiększenie transkrypcji genów wielu białek wydzielniczych i obniżenie transkrypcji białek związanych ze ścianą komórkową.

System agr podlega autoregulacji zależnej od AgrA, a także regulacji zależnej od SarA (50). SarA (Staphylococcal accessory regulator) jest czynnikiem transkrypcyjnym, który, oddziałując z agr, prowadzi do jego aktywacji i tym samym pośredniej regulacji genów znajdujących się pod kontrolą agr. SarA może wiązać się do regionów promotorowych genów kodujących czynniki wirulencji aktywując (np. białko wiążące

fibrynogen) lub hamując ich transkrypcję (np. gronkowcowe białko A) (27). SarA oddziałuje również z innym czynnikiem regulatorowym, jakim jest Rot (Repressor of toxin). Początkowo białku temu przypisano efekt odwrotny do agr, tj. hamowanie ekspresji egzotoksyn i indukowanie syntezy składników ściany komórkowej, jednak badania przeprowadzone przez Sato'o i wsp. (41) dowiodły, że w przypadku enterotoksyny H czynnik Rot pełni funkcję regulatora pozytywnego.

Wiadomo obecnie, że ekspresja takich enterotoksyn, jak B, C, D oraz R, jest regulowana przez agr. Aktywacja transkrypcji genów kodujących te toksyny przypada na późną fazę logarytmiczną i utrzymuje się w fazie stacjonarnej (9, 23). Natomiast toksyny SEA, SEH oraz SEI prawdopodobnie są wytwarzane niezależnie od agr z uwagi na to, iż ich transkrypty stwierdza się głównie podczas fazy wzrostu logarytmicznego (22). Na ekspresję genu sea wpływ wywierają warunki hodowli i jest ona bezpośrednio powiązana ze zmianami gęstości populacji bakteryjnej. Uważa się, iż sposób regulacji wytwarzania toksyn może wpływać na stopień zagrożenia bezpieczeństwa żywności ze strony tych czynników. Enterotoksyny zależne od agr mogą być wytworzone dopiero po przekroczeniu przez komórki *S. aureus* pewnej liczby, najczęściej szacowanej na 10^5 jtk/ml. Z tego względu ich produkcja może mieć miejsce tylko w środowiskach sprzyjających wzrostowi *S. aureus*. W warunkach niekorzystnych dla wzrostu, w których liczba bakterii nie jest w stanie przekroczyć granicy pozwalającej na aktywację agr, nie powinno dochodzić do kumulacji enterotoksyn w zanieczyszczonym produkcie.

Enterotoksyny, których ekspresja nie jest regulowana przez agr, np. SEA, mogą być wytwarzane już na wczesnym etapie wzrostu populacji bakteryjnej. Obecność SEA w żywności stwierdzono już po 2 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C (36). W tym przypadku możliwe jest kumulowanie się toksyny przez dowolnie długi czas, nawet jeśli warunki nie sprzyjają osiągnięciu przez gronkowce wysokiego poziomu wzrostu ze względu na chłodzenie produktu lub stałe rozcieńczanie surowcem.

Układy modelowe w badaniach wytwarzania enterotoksyn gronkowcowych w żywności

Niewiele spośród dotychczas opublikowanych prac dotyczy badań nad możliwością wytwarzania enterotoksyn gronkowcowych przez szczepy *S. aureus* rozwijające się w żywności. Wyniki dotychczas opublikowanych wskazują na silny związek między warunkami środowiska a poziomem produkcji toksyn (42). Wiadomo, iż skład ilościowy oraz jakościowy surowców zwierzęcych może być istotnie zróżnicowany. Dotyczy to zwłaszcza występowania naturalnej mikroflory, której skład może różnić się w zależności od partii produktów zawierających te składniki. Z tego też względu badacze najchętniej wybierają układy modelowe, które najwierniej odzwierciedlają warun-

ki panujące w żywności, zapewniając jednocześnie możliwość badania ekspresji enterotoksyn w uproszczonych i kontrolowanych warunkach, pozwalających uniknąć nieprzewidzianych oddziaływań. Mleko, sery oraz wyroby mięsne są produktami często związanymi z przypadkami gronkowcowych zatruc pokarmowych. Badacze najczęściej posługują się komercyjnie dostępnym mlekiem krowim o zmiennej zawartości tłuszczu (0-3,5%), poddanym procesom pasteryzacji lub sterylizacji UHT lub mlekiem w proszku poddanym uwodnieniu, co eliminuje obecność naturalnej mikroflory mleka (17, 45, 47). Sery natomiast, jako produkty stałe, mogą posiadać bardziej skomplikowany skład i strukturę. Istnieje też wiele rodzajów serów uzyskiwanych w złożonych procesach produkcji (7). Aby badać wirulencję i metabolizm szczepów *S. aureus*, Cretenet i wsp. (8) wykorzystali przesącz uzyskany w wyniku ultrafiltracji produktów wytworzonych w typowych procesach produkcji serów miękkich i półtwardych uzyskiwanych we Francji. Z kolei Zeleny i wsp. (52) jako środowisko wzrostu bakterii zastosowali uwodniony liofilizat sera Tomme de Savoie, jednak w obydwu przypadkach opisany model sera nie odzwierciedlał rzeczywistej konsystencji i struktury produktu. Badania przeprowadzone przez Fleurot i wsp. (13) uwzględniły dynamikę zmian fizykochemicznych i wpływ czynników biotycznych, które mają miejsce w produkcji serów dojrzewających. Badacze ci odtworzyli proces wytwarzania sera z pasteryzowanego mleka z dodatkiem kultur starterowych. Poprzez zastosowanie znaczników fluorescencyjnych i mikroskopu konfokalnego wizualizowali rozmieszczenie zarówno mikroorganizmów starterowych, jak i *S. aureus* w serze oraz badali ekspresję genów kodujących czynniki wirulencji oraz toksyny. W analizie zagrożenia, jakie obecność *S. aureus* stwarza w wyrobach mięsnych, posługiwano się modelami kielbas oraz wędlin sporządzanych w warunkach laboratoryjnych. W jednym z modeli wykorzystano surowe, mielone mięso wieprzowe, wzbogacone o składniki wchodzące w skład receptury kielbasy. Tak przygotowaną mieszaninę umieszczano w osłonkach służących do produkcji kielbas lub w szalkach Petriego (3, 39). Pozwalało to na inokulację mięsa bakteriami i śledzenie rozwoju i produkcji enterotoksyn w całej objętości produktu. W badaniach stosowano również wyciąg mięsny uzyskany z surowego mięsa mielonego (35, 44). Zeaki i wsp. (51) wykorzystali pakowane próżniowo frankfurterki, umieszczane w sterylnych, plastikowych workach strunowych, umożliwiających bezpośrednią homogenizację w urządzeniu typu Stomacher. Frankfurterki posłużyły do badań wytwarzania enterotoksyn gronkowcowych w efekcie powierzchniowej inokulacji tych wędlin szczepami *S. aureus*. Podobne doświadczenia prowadzono stosując jako model wędliny w plastrach, takie jak: szynka gotowana, szynka wędzona, surowa szynka Serrano oraz salami z dodatkiem czarnego pieprzu (24, 49). Alibayov i wsp. (2) prowadzili badania dotyczące wytwarzania enterotoksyn gronkowcowych

stosując model szynki wieprzowej i drobiowej oraz salami wołowego. Produktów tych nie poddawano procesom fermentacji, zatem nie zawierały one kultur starterowych. Wędliny rozdrabniano, inokulowano enterotoksycznymi szczepami *S. aureus* i inkubowano w szalkach Petriego. Modele te posłużyły do badań wytwarzania gronkowcowych enterotoksyn A, C oraz D, a także wpływu eksperymentalnej mikroflory na wzrost i wirulencję *S. aureus*, jednak eksperymenty te dotyczą tylko wybranych produktów spożywczych pochodzenia zwierzęcego, zostały zawężone do określonych warunków i układów doświadczalnych, i stanowią zdecydowaną mniejszość wśród prac poświęconych zagrożeniu, jakie *S. aureus* może stanowić w żywności.

Wytwarzanie enterotoksyn gronkowcowych w żywności

Dotychczasowe badania wskazują, iż wytwarzanie enterotoksyn przez *S. aureus* przebiegać może w różny sposób, w zależności od tego, czy szczepy hodowane są w żywności, czy w podłożach mikrobiologicznych (42). Produkty spożywcze stanowią bardzo złożone środowisko, w którym zarówno czynniki wewnętrzne (pH, a_w , obecność konserwantów i mikroflory towarzyszącej), jak i czynniki zewnętrzne towarzyszące przetwarzaniu i przechowywaniu żywności (np. temperatura, zmiany odczynu, promieniowanie) mogą wywierać wpływ na poziom wytwarzania enterotoksyn przez szczepy *S. aureus*. W wielu eksperymentach *in vitro* komórki *S. aureus* rozwijają się w zawiesinie, a ich hodowle stanowią monokulturę, co nie uwzględnia możliwości oddziaływania z pozostałą mikroflorą żywności.

Dowiedziano, iż wzrost *S. aureus* w mleku indukuje ekspresję innych genów niż w trakcie wzrostu w podłożu mikrobiologicznym. W komórkach *S. aureus* hodowanych w mleku zaobserwowano rozwinięcie się oporności na fagocytozę oraz zwiększenie wirulencji w modelu mysim. Stwierdzono, iż w trakcie wzrostu *S. aureus* w mleku dochodzi do indukcji genów związanych z syntezą nukleotydów i składników ściany komórkowej oraz metabolizmem węglowodanów (20). W efekcie wzrasta stopień sieciowania peptydoglikanu i zwiększenie grubości ściany komórkowej. Konsekwencją tych zmian jest utrata wrażliwości komórek *S. aureus* hodowanych w mleku na lizostafinę, bakteryjny enzym stosowany w laboratoriach do lizy komórek gronkowców. Cecha ta znacznie utrudnia analizę białek i kwasów nukleinowych gronkowców rozwijających się w mleku (7, 34). Wykazano także, iż termostabilność niektórych enterotoksyn jest wyższa w żywności niż w pożywkach mikrobiologicznych (5).

Badając produkcję enterotoksyny A w żywności stwierdzono, iż szczep *S. aureus* rozwijający się w serze typu Camembert wytworzył tę toksynę w stężeniu znacząco niższym niż w trakcie wzrostu w przetworzonym mięsie wieprzowym (25, 49). Cretenet i wsp. (8) prowadzili hodowle szczepu *S. aureus* MW2 posiadającego geny enterotoksyn sea, sec, seg, seh, sel oraz

sek wraz ze szczepem *Lactococcus lactis* w podłożu mikrobiologicznym i modelowym serze. Stwierdzono, iż SEA była wydzielana w serze na poziomie podobnym jak w pożywce mikrobiologicznej, w serze natomiast nie stwierdzono obecności SEC. Niskie stężenia SEC wydzielane przez *S. aureus* podczas wytwarzania sera potwierdziły również badania Otero i wsp. (32). Enterotoksynę C wymienia się jako najczęstszą przyczynę gronkowcowych zatruc pokarmowych spowodowanych spożyciem zanieczyszczonego mleka i produktów mlecznych (43), jednak wyniki najnowszych badań wskazują mleko jako niekorzystne środowisko dla produkcji enterotoksyn przez szczepy *S. aureus*, chociaż dane dotyczą jedynie enterotoksyn C, D, H oraz R (17, 46-48). W pracach Hunt i wsp. (17) nie stwierdzono obecności SEC w hodowli *S. aureus* w niepasteryzowanym mleku po 72 godzinach. Produkcja enterotoksyny C w mleku porównana była także z jej wytwarzaniem w podłożu mikrobiologicznym dla 14 szczepów *S. aureus* (47). Dowiedziono, że ilość uwolnionej toksyny była znacząco niższa w mleku. Po 48 godzinach hodowli szczepu *S. aureus* w mleku stężenie SEC było, w zależności od szczepu, 2- do 1100-krotnie niższe niż w trakcie hodowli w płynnym podłożu mikrobiologicznym, zaś szczep osiągał zbliżone liczby w obydwu środowiskach.

Badania nad wytwarzaniem enterotoksyny D w szynce wykazały, iż w wyniku 5-dniowej hodowli szczepu *S. aureus* dochodziło do kumulacji SED w ilości wystarczającej do wywołania gronkowcowego zatrucia pokarmowego (24). Wallin-Carlquist i wsp. (49) badali wytwarzanie enterotoksyny A przez szczep *S. aureus* hodowany przez 7 dni w temperaturze pokojowej w podłożu mikrobiologicznym oraz na powierzchni 4 różnych produktów wytworzonych z mięsa wieprzowego (szynka gotowana, szynka wędzona, surowa szynka Serrano, salami z dodatkiem czarnego pieprzu). W pożywce mikrobiologicznej najwyższe stężenie SEA zaobserwowano w momencie wejścia hodowli bakteryjnej w stacjonarną fazę wzrostu. W trakcie wzrostu w szynce gotowanej badany szczep wytworzył najwięcej SEA w trzecim dniu inkubacji, po czym zaobserwowano stopniowe zmniejszanie się stężenia toksyny. Dla wyjaśnienia obserwowanego spadku stężenia SEA zaproponowano możliwość utraty właściwości immunogennych toksyny lub jej degradację przez proteazy wytwarzane przez bakterie kwasu mlekowego. W szynce wędzonej badany szczep *S. aureus* wytwarzał SEA aż do siódmego dnia hodowli, jednak w niższym stężeniu niż w szynce gotowanej. Szynka Serrano, ze względu na niską wartość a_w , wysoką zawartość soli i tłuszczu oraz obecność mikroflory towarzyszącej okazała się środowiskiem niesprzyjającym wytwarzaniu SEA. Zwiększenie stężenia tej enterotoksyny zaobserwowano dopiero w 5.-7. dniu hodowli. Nie stwierdzono wzrostu badanego szczepu *S. aureus* w salami z dodatkiem czarnego pieprzu. Przyczyną były prawdopodobnie antybakteryjne wła-

ściwości pieprzu wchodzącego w skład tej wędliny. Badacze podkreślili różnice między podłożem mikrobiologicznym a mięsem jako środowiskiem rozwoju bakterii. Mięso stanowi złożoną matrycę, w której może dochodzić do immobilizacji mikroorganizmów i tworzenia przez nie biofilmu (10). Alibayov i wsp. (2) stwierdzili, iż enterotoksyczne szczepy *S. aureus* wytwarzają enterotoksynę C na znacząco różnych poziomach w produktach mięsnych, takich jak szynka wieprzowa i drobiowa oraz salami wołowe. Niektóre z badanych szczepów uwolniły 60 razy więcej SEC w efekcie hodowli w płynnym podłożu mikrobiologicznym niż w szynce z indyka oraz 750 razy więcej w szynce z mięsa kurczaka niż w szynce z indyka po 72 godzinach inkubacji, pomimo osiągnięcia przez bakterie zbliżonej liczby w każdym z tych środowisk.

W produktach mięsnych zaobserwowano znaczną heterogenność populacji *S. aureus* pod względem produkcji enterotoksyn. Badając szczepy *S. aureus* zdolne do wytworzenia enterotoksyny SEA na powierzchni kielbasy wieprzowej w trakcie 14-dniowej inkubacji w temperaturze 15°C stwierdzono, iż całkowita ilość wyprodukowanej toksyny była ponad 10-krotnie niższa niż w podłożu mikrobiologicznym. Wśród badanych szczepów wyodrębniono grupę wytwarzającą 3-krotnie wyższe stężenia SEA na powierzchni kielbasy w porównaniu do pozostałych szczepów (51).

Jak już wspomniano, wyniki dotychczasowych badań wskazują, iż mleko nie jest środowiskiem sprzyjającym produkcji enterotoksyn przez *S. aureus* (2, 17). Zgodnie z tą tezą, prawdopodobieństwo wytworzenia enterotoksyny C w mleku jest niskie. Opisane badania dotyczyły jednak niewielu szczepów *S. aureus*, nie biorąc pod uwagę różnorodności dotyczącej wytwarzania toksyn w żywności przez różne szczepy gronkowca.

Ostatnie badania wykazały, iż wytwarzanie niektórych enterotoksyn w mleku przez szczepy *S. aureus* może wykazywać znaczną heterogenność. Badania Schubert i wsp. (45) dotyczyły zdolności do produkcji enterotoksyny H przez gronkowce rozwijające się w mleku oraz w podłożu mikrobiologicznym. Analizowane szczepy *S. aureus* pochodziły z różnorodnych źródeł, zaś SEH to białko zaliczane do toksyn wymiotnych, zidentyfikowane jako czynnik sprawczy przypadków zbiorowych zatruc gronkowcowych związanych ze spożyciem mleka. W 2000 r. w Japonii zanotowano szereg zbiorowych, gronkowcowych zatruc pokarmowych, które łącznie objęły ok. 10 000 osób. W próbkach żywności wiązanej z wystąpieniem objawów zatrucia stwierdzono obecność SEA w ilości uznanej za zbyt niską do wywołania zatrucia na tak wielką skalę. Badania próbek wykazały jednak obecność SEH na poziomie 20 ng/g produktu (18). Trzy lata później w Norwegii stwierdzono szereg przypadków zatruc pokarmowych związanych ze spożyciem mleka. W zanieczyszczonym mleku nie wykryto enterotoksyn SEA-SEE, a jedynie SEH w stężeniu 56 ng/g (19).

Wyniki badań Schubert i wsp. (45) pozwoliły na wyodrębnienie spośród badanych gronkowców licznej grupy szczepów wytwarzających w mleku bardzo niskie stężenia SEH, nieprzekraczające kilkudziesięciu nanogramów w mililitrze po 48 godzinach hodowli. Te same szczepy były zdolne do uwalniania SEH w płynnym podłożu mikrobiologicznym w stężeniach dochodzących do kilku mikrogramów w mililitrze. Zidentyfikowano również mniej liczną grupę szczepów *S. aureus*, które były zdolne do wytwarzania SEH w pożywce mikrobiologicznej oraz w mleku na podobnym, wysokim poziomie. Jeden z tych szczepów wytworzył w mleku SEH w stężeniu przekraczającym kilka mikrogramów w mililitrze (45). Stwierdzono, iż cechą wyróżniającą szczepy *S. aureus* produkujące wysokie stężenia SEH w mleku jest ich zdolność do stopniowego obniżania pH mleka. Zmiany pH są częstym następstwem rozwoju mikroorganizmów w danym środowisku, zaś bezpośrednią przyczyną zmian odczynu jest gromadzenie się metabolitów bakteryjnych (37). W szczepach *S. aureus* wytwarzających SEH wykazano bezpośredni związek pomiędzy zdolnością do obniżania pH a produkcją wysokich stężeń tej toksyny. Stwierdzono bowiem, iż eksperymentalne uniemożliwienie obniżania pH mleka w trakcie hodowli prowadzi do znaczącego spadku wytwarzania SEH przez szczepy produkujące tę toksynę na wysokim poziomie. W przypadku szczepów uwalniających SEH w mleku w niewielkich stężeniach obniżenie pH środowiska wpłynęło na istotny wzrost produkcji toksyny. Założono, iż dla *S. aureus* rozwijającego się w mleku zasadniczym substratem, którego metabolizm prowadziłby do gromadzenia się kwaśnych produktów, mogła być laktoza. Wykazano, iż takie elementy metabolizmu laktozy, jak enzym EII odpowiedzialny za transport laktozy do wnętrza komórki i jej fosforylację oraz gronkowcowa β -galaktozydaza są wytwarzane w mleku na znacząco wyższym poziomie przez szczepy *S. aureus* zdolne do zakwaszania mleka, w porównaniu do poziomu tych czynników w szczepach niezakwaszających mleka, wytwarzających SEH na niskim poziomie. Schubert i wsp. (45) wskazali również na rolę wybranych czynników w regulacji ekspresji SEH w mleku. Wyniki tych badań wykazały, iż czynnikami powiązanymi z wysokim poziomem SEH w mleku mogą być *rot*, *sarA* oraz *hld*, gdyż poziom tych czynników był istotnie wyższy w szczepach wytwarzających w tym środowisku znaczne ilości SEH. Wykazano, iż obniżanie się pH środowiska pozytywnie stymuluje ekspresję *rot*, *sarA* oraz *hld*, gdyż stabilizacja pH na poziomie bliskim obojętnemu prowadzi do istotnego obniżenia ekspresji tych czynników. Może to wskazywać, iż gen *seh* jest pośrednio stymulowany przez *sarA*, *hld* oraz *rot*, których ekspresja wzrasta wraz ze spadkiem pH środowiska. Na uwagę zasługują ostatnie badania Sato'o i wsp. (41), które wykazały, iż *rot*, pierwotnie scharakteryzowany jako represor enterotoksyn, jest induktorem genu *seh*.

Heterogenność populacji *S. aureus* dotyczy także wytwarzania enterotoksyn gronkowcowych SED i SER. Potwierdzają to badania Schubert i wsp. (44), przeprowadzone na szczepach *S. aureus*, pochodzących z różnorodnych źródeł, zdolnych do wytworzenia enterotoksyn SED oraz SER. Zbadano wytwarzanie tych toksyn przez szczepy gronkowca rozwijającego się w mleku oraz w soku mięsny. Gen kodujący SER został stwierdzony w szczepach *S. aureus* na dwóch rodzajach plazmidów. Na plazmidzie pIB485 gen *ser* występuje wraz z genami *sed* oraz *selj*, zaś na plazmidach z rodziny pF5 wraz z genami *ses* oraz *set*. W strukturze plazmidów pF5 nie stwierdzono obecności genu kodującego SED (29). Schubert i wsp. (44) wskazują, iż stężenia SED oraz SER są znacząco niższe w szczepach *S. aureus* rozwijających się w mleku, jeśli je porównać ze stężeniami toksyn wytworzonych w soku mięsny. Poziom SED w soku mięsny wytworzonej przez niektóre szczepy *S. aureus* sięgał wartości miligrama w mililitrze, zaś w trakcie hodowli w mleku wyodrębniono grupę szczepów zdolnych do wytworzenia SED w zakresie od kilku do 100 ng/ml oraz szczepy zdolne do wytworzenia 1-2 mikrograma toksyny w mililitrze. Ponadto, wiele szczepów *S. aureus* rozwijających się w mleku oraz soku mięsny i wytwarzających niskie stężenia SED wytworzyło w tych środowiskach SER na poziomie niemal 270-krotnie przewyższającym stężenia SED.

Większość dotychczas zgromadzonej wiedzy na temat wytwarzania enterotoksyn przez szczepy *S. aureus* pochodzi z eksperymentów prowadzonych w podłożach mikrobiologicznych. Niewiele prac opisuje produkcję enterotoksyn w żywności, podczas gdy informacje te powinny odgrywać kluczową rolę w ocenie realnego zagrożenia, jakie stwarzają enterotoksyczne szczepy *S. aureus*. Spośród szerokiego asortymentu produktów spożywczych, które były wiązane z przypadkami gronkowcowych zatruc pokarmowych do tej pory zbadano mleko oraz niektóre rodzaje serów i wyrobów mięsnych. Prace te przeprowadzono na niewielkiej liczbie szczepów *S. aureus* i dotyczyły jedynie wybranych enterotoksyn gronkowcowych (8, 17, 24, 47, 49), w większości przypadków SEA-SEE. Zgodnie z oceną wielu autorów, ryzyko wytworzenia enterotoksyn, głównie SEC, w mleku i produktach mlecznych jest bardzo niskie i w świetle tych stwierdzeń obecność *S. aureus* w tego rodzaju żywności nie stanowiłaby istotnego zagrożenia zdrowia konsumenta. Biorąc jednak pod uwagę wyniki najnowszych badań, wydaje się, iż w populacji enterotoksycznych szczepów *S. aureus* istnieje znacząca heterogenność szczepów pod względem ilości wytwarzanych przez nie toksyn. Badania te wskazują na potrzebę prowadzenia badań nad wytwarzaniem enterotoksyn gronkowcowych w żywności z użyciem zróżnicowanych kolekcji szczepów *S. aureus*. Wydaje się, iż jest to jedyny sposób realnej oceny wytworzenia enterotoksyn gronkowcowych i oceny ryzyka gronkowcowych zatruc pokarmowych.

Piśmiennictwo

- Adams M. R., Moss M. O.: Bacterial agents of foodborne illness – *Staphylococcus aureus*, [w:] Food Microbiology. Cambridge: Royal Society of Chemistry 2008.
- Alibayov B., Karamonova L., Hollerova R., Zdenkova K., Demnerova K.: Differences in transcription and expression of staphylococcal enterotoxin C in processed meat products. LWT – Food Sci. Technol. 2015, 64, 578-585.
- Ananou S., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Gálvez A., Valdivia E.: Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. Meat Sci. 2005, 71, 549-556.
- Argudin M. Á., Mendoza M. C., Rodicio M. R.: Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. Toxins. 2010, 2, 1751-1773.
- Bergdoll M. S.: Enterotoxins, [w:] Easman C., Adlam C. (red.): *Staphylococci and staphylococcal infections*. Academic Press, London, UK 1983, s. 559-598.
- Bergdoll M. S.: Monkey feeding test for staphylococcal enterotoxin. Methods Enzym. 1988, 165, 324-333.
- Cretenet M., Even S., Le Loir Y.: Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. Dairy Sci. Technol. 2011, 91, 127-150.
- Cretenet M., Nouaille S., Thouin J., Rault L., Stenz L., François P. i wsp.: *Staphylococcus aureus* virulence and metabolism are dramatically affected by *Lactococcus lactis* in cheese matrix. Environ. Microbiol. Rep. 2011, 3, 340-351.
- Derzelle S., Dilasser F., Duquenne M., Deperrois V.: Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. Food Microbiol. 2009, 26, 896-904.
- Dorman H. J., Deans S. G.: Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 2000, 88, 308-316.
- Ercoli L., Gallina S., Nia Y., Auvray F., Primavilla S., Guidi F. i wsp.: Investigation of a staphylococcal food poisoning outbreak from a chantilly cream dessert, in Umbria (Italy). Foodborne Pathog. Dis. 2017. doi: 10.1089/fpd.2016.2267 (w druku).
- Evenson M. L., Hinds M. W., Bernstein R. S., Bergdoll M. S.: 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, 311-316.
- Fleuret I., Aigle M., Fleuret R., Darrigo C., Hennekinne J. A., Gruss A. i wsp.: Following pathogen development and gene expression in a food ecosystem: The case of a *Staphylococcus aureus* isolate in cheese. Appl. Environ. Microbiol. 2014, 80, 5106-5115.
- Hennekinne J. A., Buyser M. L. de, Dragacci S.: *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS Microbiol. Rev. 2012, 36, 815-836.
- Hu D.-L., Omoe K., Shimoda Y., Nakane A., Shinagawa K.: Induction of emetic response to staphylococcal enterotoxins in the house musk shrew (*Suncus murinus*). Infect. Immun. 2003, 71, 567-570.
- Hu D.-L., Omoe K., Shimura H., Ono K., Sugii S., Shinagawa K.: Emesis in the shrew mouse (*Suncus murinus*) induced by peroral and intraperitoneal administration of staphylococcal enterotoxin A. J. Food Prot. 1999, 62, 1350-1353.
- Hunt K., Butler F., Jordan K.: Factors affecting staphylococcal enterotoxin C bovine production in milk. Int. Dairy J. 2014, 39, 41-46.
- Ikeda T., Tamate N., Yamaguchi K., Makino S.: Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. Appl. Environ. Microbiol. 2005, 71, 2793-2795.
- Jørgensen H. J., Mathisen T., Løvseth A., Omoe K., Qvale K. S., Loncarevic S.: An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. FEMS Microbiol. Lett. 2005, 252, 267-272.
- Lammers A., Kruijt E., Kuijt C. van de, Nuijten P. J. M., Smith H. E.: Identification of *Staphylococcus aureus* genes expressed during growth in milk: a useful model for selection of genes important in bovine mastitis? Microbiology 2000, 146, 981-987.
- Le Loir Y., Baron F., Gautier M.: *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet. Mol. Res. 2003, 2, 63-76.
- Lis E., Podkowik M., Bystron J., Stefaniak T., Bania J.: Temporal expression of staphylococcal enterotoxin H in comparison with accessory gene regulator-dependent and -independent enterotoxins. J. Food Prot. 2012, 75, 238-244.
- Lis E., Podkowik M., Schubert J., Bystron J., Stefaniak T., Bania J.: Production of staphylococcal enterotoxin R by *Staphylococcus aureus* strains. Foodborne Pathog. Dis. 2012, 9, 762-766.
- Márta D., Wallin-Carlquist N., Schelin J., Borch E., Rådström P.: Extended staphylococcal enterotoxin D expression in ham products. Food Microbiol. 2011, 28, 617-620.
- Meyrand A., Boutrand-Loei S., Ray-Gueniot S., Mazuy C., Gaspard C. E., Jaubert G. i wsp.: Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. J. Appl. Microbiol. 1998, 85, 537-544.
- Niścigorska J.: Zatrucia enterotoksyną gronkowcową, [w:] Boroń-Kaczmarzka A., Furwicz A. J. (red.): Choroby odzwierzęce przenoszone drogą pokarmową. Wydawnictwo Lekarskie PZWL 1999.
- Novick R. P.: Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol. Microbiol. 2003, 48, 1429-1449.
- Omoe K., Hu D.-L., Ono H. K., Shimizu S., Takahashi-Omoe H., Nakane A. i wsp.: Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. Infect. Immun. 2013, 81, 3627-3631.
- Omoe K., Imanishi K., Hu D.-L., Kato H., Takahashi-Omoe H., Nakane A. i wsp.: Biological properties of staphylococcal enterotoxin-like toxin type R. Infect. Immun. 2004, 72, 3664-3667.
- Omoe K., Ishikawa M., Shimoda Y., Hu D.-L., Ubeda S., Shinagawa K.: Detection of seg, seh, and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring seg, seh, or sei genes. J. Clin. Microbiol. 2002, 40, 857-862.
- Ono H. K., Sato'o Y., Narita K., Naito I., Hirose S., Hisatsune J. i wsp.: Identification and characterization of a novel staphylococcal emetic toxin. Appl. Environ. Microbiol. 2015, 81, 7034-7040.
- Otero A., García M. C., García M. L., Santos J. A., Moreno B.: Behaviour of *Staphylococcus aureus* strains FRI 137 and FRI 361 during the manufacture and ripening of manchego cheese. Int. Dairy J. 1993, 3, 85-96.
- Podkowik M., Schubert J., Bania J., Bystron J.: Enterotoksyny gronkowcowe w żywności – nowe zagrożenia. Życie Weter. 2015, 90, 310-313.
- Postollec F., Falentin H., Pavan S., Combrisson J., Sohler D.: Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. Food Microbiol. 2011, 28, 848-861.
- Rantsiou K., Greppi A., Garosi M., Acquadro A., Mataragas M., Coccolin L.: Strain dependent expression of stress response and virulence genes of *Listeria monocytogenes* in meat juices as determined by microarray. Int. J. Food Microbiol. 2012, 152, 116-122.
- Rasooly A., Rasooly R. S.: Detection and analysis of staphylococcal enterotoxin A in food by Western immunoblotting. Int. J. Food Microbiol. 1998, 41, 205-212.
- Rode T. M., Møretro T., Langsrud S., Langsrud Ø., Vogt G., Holck A.: Responses of *Staphylococcus aureus* exposed to HCl and organic acid stress. Can. J. Microbiol. 2010, 56, 777-792.
- Rola J. G., Korpysa-Dzirba W., Osek J.: Enterotoksyny gronkowcowe. Część II. Europejska metoda skryningowa i jej modyfikacje – przyczyny i efekty. Życie Weter. 2012, 87, 767-770.
- Sameshima T., Magome C., Takeshita K., Arihara K., Itoh M., Kondo Y.: Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. Int. J. Food Microbiol. 1998, 41, 1-7.
- Sandel Mary K., McKillip John L.: Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. Food Control. 2004, 15, 5-10.
- Sato'o Y., Hisatsune J., Nagasako Y., Ono H. K., Omoe K., Sugai M.: Positive regulation of staphylococcal enterotoxin H by Rot (repressor of toxin) protein and its importance in clonal complex 81 subtype 1 lineage-related food poisoning. Appl. Environ. Microbiol. 2015, 81, 7782-7790.
- Schelin J., Wallin-Carlquist N., Cohn M. T., Lindqvist R., Barker G. C., Rådström P.: The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. Virulence. 2011, 2, 580-592.
- Scherer D., Corti S., Muehlherr J., Zweifel C., Stephan R.: Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. Vet. Microbiol. 2004, 101, 101-107.
- Schubert J., Podkowik M., Bystron J., Bania J.: Production of staphylococcal enterotoxins D and R in milk and meat juice by *Staphylococcus aureus* strains. Foodborne Pathog. Dis. 2017, 14, 223-230.
- Schubert J., Podkowik M., Bystron J., Bania J.: Production of staphylococcal enterotoxins in microbial broth and milk by *Staphylococcus aureus* strains harboring seh gene. Int. J. Food Microbiol. 2016, 235, 36-45.
- Tollersrud T., Kampen A. H., Kenny K.: *Staphylococcus aureus* enterotoxin D is secreted in milk and stimulates specific antibody responses in cows in the course of experimental intramammary infection. Infect. Immun. 2006, 74, 3507-3512.
- Valihrach L., Alibayov B., Demnerova K.: Production of staphylococcal enterotoxin C in milk. Int. Dairy J. 2013, 30, 103-107.
- Valihrach L., Alibayov B., Zdenkova K., Demnerova K.: Expression and production of staphylococcal enterotoxin C is substantially reduced in milk. Food Microbiol. 2014, 44, 54-59.
- Wallin-Carlquist N., Márta D., Borch E., Rådström P.: Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. Int. J. Food Microbiol. 2010, 141, S69-74.
- Wang B., Muir T. W.: Regulation of virulence in *Staphylococcus aureus*: molecular mechanisms and remaining puzzles. Cell Chem. Biol. 2016, 23, 214-224.
- Zeaki N., Cao R., Skandamis P. N., Rådström P., Schelin J.: Assessment of high and low enterotoxin A producing *Staphylococcus aureus* strains on pork sausage. Int. J. Food Microbiol. 2014, 182-183, 44-50.
- Zeleny R., Emteborg H., Charoud-Got J., Schimmel H., Nia Y., Mutel I. i wsp.: Development of a reference material for *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in cheese: Feasibility study, processing, homogeneity and stability assessment. Food Chem. 2015, 168, 241-246.

Adres autora: dr inż. Justyna Schubert, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław;
e-mail: justyna.schubert@upwr.edu.pl