

KAJETANA MACIEJSKA-ROCZAN, HALINA BURZYŃSKA

WYSTĘPOWANIE ENTEROTOKSYCZNYCH I ENTEROPATOGENNYCH SZCZEPÓW ESCHERICHIA COLI I KLEBSIELLA PNEUMONIAE W PRODUKTACH MLECZARSKICH

CZ. I. BADANIE WYTWARZANIA ENTEROTOKSYNY CIEPŁOSTALEJ (ST) I ENTEROPATOGENNOŚCI SZCZEPÓW

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku
Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr M. Nikonorow

Zbadano zdolność wytwarzania enterotoksyny ciepłostalej (ST) przez 139 szczepów *Escherichia coli* i 20 szczepów *Klebsiella pneumoniae*, wyizolowanych z produktów mleczarskich stosując metodę Dean'a i wsp. [2]. 28 szczepów *Escherichia coli* (20% zbadanych) i 3 szczepy *Klebsiella pneumoniae* wytwarzały enterotoksynę ST, ponadto 24 szczepy *Escherichia coli* (18% zbadanych) należały do enteropatogennych serotypów. Wśród nich dominowały typy 018:K76 i 025:K11. Szczepy enterotoksyczne i enteropatogenne najczęściej występowały w serach twarogowych i twarożkach homogenizowanych

W poprzedniej pracy [9] wykazano duże zanieczyszczenie bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* produktów mleczarskich pobranych z obrotu handlowego. W produktach tych, a zwłaszcza w serkach homogenizowanych i serach twarogowych najczęściej izolowano szczepy z gatunków coli oraz *K. pneumoniae*.

Jak wskazuje przegląd piśmiennictwa [7, 8, 10, 11, 12, 14], w ostatnich latach notuje się wzrost epidemicznych zachorowań, objawiających się ostrymi zaburzeniami przewodu pokarmowego, spowodowanych przez wyżej wymienione gatunki bakterii.

Udowodniono ponadto, że produkty żywnościowe zanieczyszczone pałeczkami *E. coli* i *K. pneumoniae* mogą powodować zatrucia pokarmowe [1, 8, 9, 10, 14].

Ostatnio wiele publikacji poświęcono wytwarzaniu przez te bakterie toksyn działających enterotropowo i powodujących zaburzenia żołądkowo-jelitowe.

Escherichia coli może produkować dwa rodzaje enterotoksyn: ciepłochwiejną LT („heat — labile”) i ciepłostalą ST („heat — stable”) [7, 11, 12]. Różnicuje się je na podstawie wrażliwości na działanie wysokiej temperatury, masy cząsteczkowej i szybkości oddziaływania na przewód pokarmowy. Enterotoksyna typu LT ma większą masę cząsteczkową, jest bardziej wrażliwa na temperaturę i charakteryzuje się wydłużonym okresem działania. Pod względem antygenowym zbliżona jest ona do toksyny przecinkowca cholery (*Vibrio cholerae*).

* Praca wykonana w ramach problemu MR-12.

Enterotoksyna ST działa szybciej i ze względu na ciepłooporność może być ona również obecna w produktach poddawanych obróbce termicznej, pozbawionych bakterii z grupy *coli*.

Szczepy *E. coli* wytwarzające tylko enterotoksynę typu ST izolowano po raz pierwszy od ludzi (z kału osób chorych na biegunkę) w 1974 roku [12]. Do tego czasu istniał pogląd, że enterotoksyna tego typu jest toksyczna tylko dla zwierząt. Obecnie notuje się wiele zatrucí pokarmowych, wywołanych przez szczepy *E. coli*, produkujące tylko toksynę ST [1, 7, 12].

Goldhar i inni [5] badając szczepy *E. coli* izolowane z kału osób chorych na biegunkę stwierdzili 3-krotnie więcej szczepów produkujących toksynę typu ST niż LT.

Toksynę podobną do enterotoksyny ST *E. coli* mogą wytwarzać również szczepy *K. pneumoniae* [6].

Dla stwierdzenia enterotoksyczności szczepów bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* i określenia typu enterotoksyny stosuje się wiele metod biologicznych. Są to próby na podwiązanych pętlach jelit królika, metoda na oseskach myszy, próba skórna na króliku, test na rogówce oka świnki morskiej oraz badania [1, 2, 4, 10, 11, 13] na różnego rodzaju hodowlach tkankowych.

Metodą specyficzną dla enterotoksyny ST jest próba na oseskach mysich wprowadzona po raz pierwszy przez Dean'a i in. [2]. Jako metoda szybka i powtarzalna jest obecnie szeroko stosowana w ośrodkach badawczych całego świata [2, 4, 7, 13]. Przy użyciu tego modelu biologicznego stwierdzono występowanie enterotoksygennych pałeczek jelitowych u 22% dzieci hospitalizowanych z powodu ostrej biegunki w szpitalu zakaźnym w Warszawie [16].

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie, czy szczepy *E. coli* i *K. pneumoniae* wyizolowane z produktów mleczarskich, spożywanych zwłaszcza często przez dzieci, wytwarzają enterotoksynę typu ST.

MATERIAŁ I METODYKA

Badaniom poddano 139 szczepów *E. coli* i 20 szczepów *K. pneumoniae*, wyizolowanych z produktów mleczarskich pobranych do badania bezpośrednio z obrotu handlowego [9].

Zgodnie z metodą Dean'a i wsp. [2] w modyfikacji Giannella [4] użyto do badań 3—4 dniowe myszki rasy *Swiss*, oddzielone od matek bezpośrednio przed doświadczeniem i dzielone na grupy po 4. Każdej grupie myszy podawano przesącz z hodowli jednego szczepu.

Szczepy hodowano na podłożu CA-YE (Casamino acids-yeast extract-salts broth) [4]. Do 15 ml tego podłoża w kolbie stożkowej o poj. 200 ml dodawano 1 ml 24 h hodowli bulionowej badanego szczepu i całość wytrząsano w wytrząsarce w temp. 37°C przez 24 h. Po tym czasie hodowlę odwirowywano przez 10 min. przez 11 tys. obrotów/min. Do supernatantów dodawano 2% błękit *Evansa* w ilości 2 krople na 1 ml.

Na wstępie porównano reakcje na myszkaach przy równoległym wprowadzaniu supernatantów otrzymanych przez odwirowanie w sposób opisany wyżej, jak i przesączów z hodowli, otrzymanych przez sączenie przez lejek szklany *Schotta G 5*.

Każdej myszce wstrzykiwano do żołądka przez powłoki brzuszne 0,1 ml płynu z hodowli, przygotowanego w ww. sposób. Myszkę umieszczano w ciepłarni o temp. 30°C na okres 4 h. Po tym czasie usypiano je chloroformem i po otwarciu jamy brzusznej oceniano wizualnie nagromadzenie się płynu w jelitach oraz obliczano stosunek masy wyciętych jelit (m j) do masy ciała myszy (m c). Wartości podawano dla grupy 4 myszek. Za wynik dodatni przyjęto wartości m j/m. większe od 0,083, za wynik słabo dodatni — wartości w granicach od 0,075 do 0,082, a za ujemny — wartość tego stosunku niższą niż 0,074 [4].

W każdym doświadczeniu, w którym oceniano 10—12 szczepów, były 2 grupy myszek kontrolnych — jednej wprowadzano dożołądkowo samo podłoże CA-YE (kontrola ujemna), a drugiej supernatant z hodowli szczepu E. coli, wytwarzającego enterotoksynę ST* (kontrola dodatnia).

Dla każdego szczepu wykonywano 2—3 powtórzenia. Ze szczepami, które dały wynik dodatni powtarzano doświadczenie, wprowadzając supernatant z hodowli gotowany przez 15 min przed zaaplikowaniem myszkom [2, 7].

133 szczepy E. coli poddano również badaniom serologicznym, wykonując aglutynację z surowicami diagnostycznymi, produkcji Wytwórni Surowic i Szczepionek w Krakowie. Umożliwiają one wykrycie 14 następujących enteropatogennych serotypów pałeczki okrężnicy: 018: K76, 025: K11, 026: K60, 044: K74, 055: K59, 0086: K61, 0111: K58, 0114: K90, 0119: K69, 0124: K72, 0125: K70, 0126: K71, 0127: K63, 0128: K67.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W tabeli I przedstawione zostały wyniki badań wstępnych, mające na celu ustalenie sposobu przygotowania płynu do wprowadzenia oseskom mysim.

Tabela I. Wyniki badania na oseskach mysich enterotoksyczności szczepów *Escherichia coli* w zależności od sposobu przygotowania przesączu z hodowli

Nr kolejny	Nr szczepu	mj/mc*	
		Hodowla sączona	Hodowla wirowana
1	214	0,056	0,055
2	271	0,057	0,063
3	253	0,060	0,058
4	195	0,062	0,062
5	89	0,063	0,066
6	117	0,064	0,056
7	221	0,064	0,053
8	272	0,039	0,073
9	186	0,070	0,064
10	276	0,071	0,068
11	215	0,080	0,064
12	75	0,084	0,093
13	269	0,087	0,072
14	98	0,092	0,082
15	273	0,097	0,081
16	123	0,099	0,100
17	128	0,099	0,106
18	182	0,106	0,111
19	114	0,112	0,102

* — mj/mc — stosunek masy wyciętych jelit do masy ciała myszy

Jak widać z tabeli, nie uzyskano różnic w działaniu hodowli przygotowanej obydwojma sposobami. W dalszej części pracy stosowano zatem odwirowywanie, zgodnie z metodą oryginalną, chociaż niektórzy autorzy preferują sączenie przez filtry bakteryjne, a nawet równocześnie odwirowywanie i sączenie [2, 4].

Z ogółem zbadanych 139 szczepów E. coli i 20 szczepów K. pneumoniae, 28 szczepów E. coli (co stanowi 20%) i 3 szczepy K. pneumoniae dały wynik dodatni na oseskach mysich, 21 szczepów (12,6%) w tym 18 E. coli i 3 K. pneumoniae dało wynik słabo dodatni.

* Otrzymanego od dr J. Noworyty z Zakładu Bakteriologii PZH.

Tabela II. Wyniki badania enterotoksyczności szczepów *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* izolowanych z produktów mleczarskich

Nr kolejny	Nr szczepu	Gatunek bakterii	Rodzaj produktu	mj/mc Przysącznie- gotowany	Przysącz- gotowany*
1	87	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	śmietana	0,084	0,087
2	98	<i>Escherichia coli</i>	masło	0,087	0,090
3	99	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	masło	0,088	0,085
4	148	<i>Escherichia coli</i>	mleko pasteryzowane	0,090	0,092
5	160	<i>Escherichia coli</i>	ser twarogowy	0,090	0,088
6	161	<i>Escherichia coli</i>	ser twarogowy	0,100	0,096
7	164	<i>Escherichia coli</i>	ser twarogowy	0,099	0,091
8	170	<i>Escherichia coli</i>	ser twarogowy	0,092	0,087
9	173	<i>Escherichia coli</i>	serek „Fromage”	0,093	0,091
10	184	<i>Escherichia coli</i>	serek homogenizowany	0,091	0,092
11	185	<i>Escherichia coli</i>	serek homogenizowany	0,098	0,106
12	187	<i>Escherichia coli</i>	serek homogenizowany	0,112	0,119
13	207	<i>Escherichia coli</i>	serek homogenizowany	0,117	0,123
14	208	<i>Escherichia coli</i>	serek homogenizowany	0,105	0,108
15	209	<i>Escherichia coli</i>	ser twarogowy	0,116	0,115
16	210	<i>Escherichia coli</i>	ser twarogowy	0,115	0,094
17	211	<i>Escherichia coli</i>	serek homogenizowany	0,123	0,146
18	212	<i>Escherichia coli</i>	serek homogenizowany	0,112	0,132
19	213	<i>Escherichia coli</i>	serek homogenizowany	0,101	0,123
20	216	<i>Escherichia coli</i>	ser dojrzewający	0,100	0,105
21	218	<i>Escherichia coli</i>	ser twarogowy	0,092	0,088
22	224	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	masło	0,085	0,084
23	228	<i>Escherichia coli</i>	ser dojrzewający	0,109	0,109
24	233	<i>Escherichia coli</i>	serek homogenizowany	0,130	0,125
25	234	<i>Escherichia coli</i>	serek homogenizowany	0,106	0,093
26	236	<i>Escherichia coli</i>	ser twarogowy	0,086	0,090
27	237	<i>Escherichia coli</i>	ser twarogowy	0,101	0,092
28	238	<i>Escherichia coli</i>	ser twarogowy	0,092	0,084
29	239	<i>Escherichia coli</i>	ser dojrzewający	0,104	0,092
30	240	<i>Escherichia coli</i>	ser dojrzewający	0,098	0,088
31	256	<i>Escherichia coli</i>	ser dojrzewający	0,089	0,088

* — 15 min w temp. 100°C

W tabeli II zestawione zostały wyniki badania wszystkich szczepów reagujących na myszki dodatnio z uwzględnieniem również zdolności wytwarzania enterotoksyny ciepłostajnej (ST). Wartość stosunku mj/m_c dla tych szczepów wahała się od 0,084 do 0,123.

Jak wynika z tabeli, supernatanty z hodowli gotowane dały niemal identyczne wyniki co niegotowane, potwierdza to obecność w nich enterotoksyny ST, niewrażliwej na działanie wysokiej temperatury.

W tabeli III zestawiono wyniki badań serologicznych.

Wskazują one, że do serotypów enteropatogennych należały 24 wyizolowane szczepy *E. coli*, co stanowi 18% ogółem zbadanych. Najczęściej występowały serotypy 018: K76 (9 szczepów) i 025: K11 (4 szczepy). Pozostałe typy enteropatogenne stwierdzano w pojedynczych przypadkach. Chorobotwórcze serotypy *E. coli* izolowano również najczęściej z serków homogenizowanych i serów dojrzewających.

Spośród tych 24 szczepów enteropatogennych tylko 4 dały dodatni wynik na oseskach mysich. Były to dwa szczepy o serotypie 018: K76

Tabela III. Typy enteropatogenne występujące wśród 133 szczepów *Escherichia coli* wyizolowanych z produktów mleczarskich

Typ serologiczny	Liczba szczepów	Rodzaj produktu
018 : K 76	9	serek homogenizowany, ser twarogowy i dojrzewający
025 : K 11	4	serek homogenizowany, ser dojrzewający
054 : K 74	2	serek homogenizowany, ser dojrzewający
083 : K 61	2	ser twarogowy
0114 : K 90	2	ser dojrzewający
0124 : K 72	2	ser dojrzewający, śmietana
055 : K 59	1	ser <i>Brie</i>
0111 : K 58	1	serek homogenizowany
0128 : K 67	1	ser twarogowy

i po jednym o serotypach 086: K61 i 044: K74. Potwierdza to brak korelacji między enterotoksycznością danego szczepu a jego przynależnością do serotypu enteropatogennego.

W związku z uzyskanymi wynikami warte przytoczenia są badania Świderskiego i wsp. [14], którzy wykazali powiązanie między zanieczyszczeniem mleka surowego i pasteryzowanego pałeczkami *E. coli* a występowaniem biegunek u niemowląt. Izolowali oni szczepy tego samego typu serologicznego z kału dzieci chorych i z próbek mleka.

Jak wskazują wyniki tych i poprzednich badań [9], produkty mleczarskie stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka, ponieważ zawierają one w dużej liczbie bakterie *E. coli* i *K. pneumoniae*, wśród których spotyka się często serotypy enteropatogenne lub działające enterotoksycznie na przewód pokarmowy lub obdarzone obydwoima właściwościami.

Konieczne jest zatem podjęcie wszelkich działań w celu jak najszybszej poprawy jakości mikrobiologicznej tych produktów, a zwłaszcza serków homogenizowanych i serów twarogowych, które wykazują największe zanieczyszczenie i są często spożywane przez małe dzieci i ludzi chorych, a więc osoby bardziej wrażliwe.

Dodatkowe niebezpieczeństwo stwarza fakt, że pałeczki *Enterobacteriaceae* obecne w produktach mleczarskich w przeciwieństwie do innych bakterii nie tylko nie giną w czasie przechowywania, ale nawet mogą się w nich namnażać [3, 15].

WNIOSKI

1. Badanie na oseskach mysich jest metodą prostą, szybką i powtarzalną, która powinna znaleźć zastosowanie jako metoda screeningowa do badania właściwości enterotoksycznych szczepów *E. coli* i *K. pneumoniae*.

2. Występowanie szczepów enterotoksycznych *E. coli* i *K. pneumoniae* w dużym odsetku produktów mleczarskich stwarza zagrożenie dla zdrowia konsumentów, a zwłaszcza małych dzieci i ludzi starszych.

3. Konieczne jest podjęcie jak najszybsze działań, które spowodowałyby radykalne zmniejszenie stopnia zanieczyszczenia bakteriami z grupy *coli* produktów mleczarskich.

К. Мацейска-Рочан, Х. Бужиньска

СОДЕРЖАНИЕ ЭНТЕРОТОКСИЧЕСКИХ И ЭНТЕРОПАТОГЕННЫХ
ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* И *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
В МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ

Ч. I. Исследование образования термостабильного энтеротоксина
и энтеропатогенности штаммов

Резюме

Целью работы было исследование частоты появления энтеротоксических штаммов *Escherichia coli* и *Klebsiella Pneumoniae* в молочных продуктах.

Всего исследовали 139 штаммов *E. coli* и 20 штаммов *K. pneumoniae* применяя метод Дина и сотр. (2) на сосунках мышей. Штаммы выращивали на питательной среде СА — YE Casamino acids-yeast extract-salts (по Гианеллу (4).

В случае 28 штаммов *E. coli* (20% исследуемых) и 3 штаммов *K. pneumoniae* был получен положительный результат (отношение веса кишечника к весу тела превышало 0,083), в то время как в случае 21 штамма (в том числе 18 штаммов *E. coli* и 3 штамма *K. pneumoniae*) результат был слабо положительным (в пределах 0,075—0,082).

Исследовали также содержание энтеропатогенных серотипов *E. coli* в молочных продуктах. Было установлено 24 штамма (18% исследуемых). Преобладали серотипы 018:K76 (9 штаммов) и 025:K11 (4 штамма). Было подтверждено отсутствие корреляции между энтеротоксичностью данного штамма и его энтеропатогенностью.

Как энтеротоксические, так и энтеропатогенные штаммы *E. coli* и *K. pneumoniae* наиболее часто содержались в гомогенизированных сырках и творогах.

К. Maciejaska-Roczán, H. Burzyńska

PRESENCE OF ENTEROTOXIC AND ENTEROPATHOGENIC STRAINS
OF *ESCHERICHIA COLI* AND *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
IN DAIRY PRODUCTS

I. Studies on production of thermostable enterotoxin (ST) and enteropathogenicity of the strains

Summary

The aim of this study was checking of the frequency of enterotoxic strains of *E. coli* and *K. pneumoniae* in dairy products. In all, 139 strains of *E. coli* and 20 strains of *K. pneumoniae* were investigated by the method of Dean et al. (2) on suckling mice. The strains were cultured on the CA-YE medium (Casamino acids-yeast extract-salts (according to Giannella (4).

Twenty-eight strains of *E. coli* (20% of all tested) and 3 strains of *K. pneumoniae* gave positive results (the ration of intestine mass to body mass in mice was above 0.083). On the other hand, 21 strains (18 strains of *E. coli* and 3 strains of *K. pneumoniae*) gave in this experimental model a weakly positive results (range: 0.075—0.082).

The presence of enteropathogenic serotypes of *E. coli* was investigated also in dairy products. Twenty-four strains were found (18%), with predominance of serotypes 018:K76 (9 strains) and 025:K11 (4 strains). Lack of correlation between the enterotoxicity of a strain and its enteropathogenicity was confirmed.

Enterotoxic as well as enteropathogenic strains of *E. coli* and *K. pneumoniae* were found, most frequently, in homogenized cottage cheese and common cottage cheese.

PIŚMIENNICTWO

1. Danielsson M. L., Möllby R., Brag H., Hansson N., Johnsson P., Olsson E., Wadström T.: Enterotoxigenic enteric bacteria in food and outbreaks of food-borne diseases in Sweden. *J. Hyg. Camb.*, 1979, 83, 33. — 2. Dean A. G., Ching Y. C., Williams R. G., Harden L. B.: Test for *Escherichia coli* enterotoxin using

infant mice: Application in a study of diarrhoea in children in Honolulu. J. Infect. Dis., 1972, 125, 407. — 3. Fantasia L. D., Mestrandrea L., Schrade J. P., Yaeger J.: Detection and growth of enteropathogenic *Escherichia coli* in soft ripened cheese. Appl. Microbiol., 1975, 29, 179. — 4. Giannella R. A.: Suckling mouse model for detection of heat — stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model. Inf. and Immun., 1976, 14, 95. — 5. Goldhar J., Peri R., Zilberberg R., Lahav M.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) isolated in the Tel-Aviv (Israel) area. Med. Microbiol. Immunol., 1980, 169, 53. — 6. Klipstein F. A., Engert R. F.: Purification and properties of *Klebsiella pneumoniae* heat-stable enterotoxin. Inf. and Immun. 1976, 13, 373. — 7. Kudoh Y., Zen-Yoji H., Matsu-shita S., Sakai S., Maruyama T.: Outbreaks of acute enteritis due to heat-stable enterotoxin producing strains of *Escherichia coli*. Microbiol. Immunol., 1977, 21, 175. — 8. Maciejska-Roczan K.: Występowanie niektórych gatunków pałeczek Gram-ujemnych z rodzajów *Yersinia*, *Klebsiella*, *Aeromonas* oraz ich rola w etiologii zatruc pokarmowych. Roczn. PZH, 1979, 30, 217. — 9. Maciejska-Roczan K., Burzyńska H.: Występowanie różnych gatunków bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w wybranych produktach mleczarskich. Roczn. PZH, 1981, 32, 107. — 10. Marrier R., Wells J. G., Swanson R. C., Callahan W., Mehlman I. J.: An outbreak of enteropathogenic *Escherichia coli* foodborne disease traced to imported French cheese. Lancet 1973, ii, 1376.

11. Mehlman I. J., Fishbein M., Gorbach S. L., Sanders A. C., Eide E. L., Olsson J.: Pathogenicity of *Escherichia coli* recovered from food. J. AOAC, 1976, 59, 67. — 12. Sack D. A., Wells J. G., Merson M. H., Sack R. B., Morris G. K.: Diarrhoea associated with heat-stable enterotoxin — producing strains of *Escherichia coli*. Lancet, 1975, ii, 239. — 13. Sack R. B.: International conference on the diarrhoea of travellers — new directions in research; A summary. J. Infect. Dis., 1978, 137, 355. — 14. Świdorski M., Jędrzejowski A., Lachowicz T. M.: Kolibakteriozy a biegunki niemowlęce. Med. Wet. 1975, 31, 286. — 15. Trawińska J.: Przeżywalność chorobotwórczych serotypów *E. coli* w serach twarogowych. Med. Wet. 1971, 27, 562. — 16. Truchanowicz-Jarmołowicz Z., Stypułkowska-Misiurewicz H., Noworyta J., Bielecka Z.: Występowanie enterotoksynogennych pałeczek jelitowych u dzieci hospitalizowanych z powodu biegunki w szpitalu choroób zakaźnych w Warszawie. Ped. Pol., 1978, 6, 723.

Dn. 30 IX 81 r.

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24.