

Staphylococcal enterotoxins in food – new hazards

Podkowik M., Schubert J., Bania J., Bystróż J.,
Department of Food Hygiene and Consumer
Health, Wrocław University of Environmental and
Life Sciences

In this article we aimed at the presentation of new hazards of food poisoning. Enterotoxins produced by *Staphylococcus aureus* are well recognized causative agents of food poisoning, being also able to interrupt human and animal immune responses. It has been a major concern of the food industry and public health for many decades, and great advances have been made in regard to its prevention, treatment and diagnosis. Only enterotoxins produced by *Staphylococcus aureus* are as yet comprehensively described. Compared to *S. aureus*, the enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci (CNS), has not been well characterized. Enterotoxin-producing CNS were already identified in sheep and goat milk, sheep cheese and fermented sausages, nonetheless the current status of knowledge is not sufficient to draw definite conclusions on CNS food poisoning potential. In recent years emetic properties of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins have been elucidated, however currently used commercially available tests are dedicated to detect only five, so-called 'classical enterotoxins' (SEA-SEE). Issue of enterotoxins production in various food matrices gained increasing attention in the last decade.

Keywords: staphylococcal enterotoxins, food poisoning, health hazard.

Enterotoksyny gronkowcowe stanowią rodzinę wydzielniczych białek produkowanych przez niektóre szczepy gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*). Zalicza się je, wraz z niektórymi toksynami bakterii z rodzaju *Streptococcus*, do grupy toksyn pirogennych. Enterotoksynom gronkowcowym przypisuje się udział w patogenezie alergii i chorób autoimmunologicznych. Przede wszystkim są one jednak czynnikiem etiologicznym zespołu wstrząsu toksycznego i zatruc pokarmowych (1, 2). Łączy je homologia sekwencji DNA i podobieństwo struktury białkowej. Masa cząsteczkowa enterotoksyn gronkowcowych waha się od 22 do 29 kDa. Są to białka o wysoce stabilnej strukturze, odporne na działanie niskiego pH oraz wielu enzymów proteolitycznych, takich jak pepsyna, tripsyna, rennina (chymozyna) i papaina, co umożliwia im zachowanie aktywności biologicznej podczas przechodzenia przez układ pokarmowy. Dzięki znacznej termooporności wynikającej ze struktury czwartorzędowej tych białek, enterotoksyny gronkowcowe nie ulegają inaktywacji w procesie obróbki termicznej żywności. Eksperymentalnie wykazano, że

Enterotoksyny gronkowcowe w żywności – nowe zagrożenia

Magdalena Podkowik, Justyna Schubert, Jacek Bania, Jarosław Bystróż

z Katedry Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta Wydziału Medycyny Weterynaryjnej we Wrocławiu

termooporność enterotoksyn jest wyższa w środowisku żywności niż w podłożach mikrobiologicznych (3, 4).

Dotychczas opisano 23 enterotoksyny gronkowcowe. Wśród nich wyróżnia się czynniki zdolne do wywołania wymiotów u naczelnych tzw. enterotoksyny właściwe, oznaczane skrótem SE (staphylococcal enterotoxin) i kolejnymi literami alfabetu (np. SEA, SEB, SEC) oraz homologiczne czynniki, które nie posiadają właściwości wymiotnych lub nie były dotąd pod tym względem badane, tzw. SEI's (staphylococcal enterotoxin-like toxins; 5). Pięć najwcześniejszych odkrytych enterotoksyn gronkowcowych (SEA-SEE) określanych jest mianem klasycznych (6). Wszystkie znane enterotoksyny zaliczane są do superantygenów. W odróżnieniu od antygenów konwencjonalnych nie muszą być one przetwarzane przez komórki prezentujące antygen, lecz łączą zewnętrzną stronę rowka wiążącego antygeny cząsteczki MHC II komórki prezentującej oraz łańcuch V β receptora limfocytów T. W ten sposób dochodzi do niespecyficznego stymulacji limfocytów T. Szacuje się, iż enterotoksyny gronkowcowe w stężeniach rzędu kilku pg/ml mogą aktywować nawet 50% wszystkich limfocytów T w organizmie. Pobudzone działaniem superantygeny limfocyty T wydzielają nienaturalnie wielkie ilości prozapalnych i immunomodulujących cytokin, co klinicznie objawia się jako zespół wstrząsu toksycznego (toxic shock syndrome – TSS; 1, 7, 8).

S. aureus jest zdolny do produkcji enterotoksyn w szerokim zakresie temperatur, tj. 10–46°C, aczkolwiek za optymalne uważane są temperatury 34–40°C. Na wytwarzanie enterotoksyn wpływ mają także takie parametry fizykochemiczne, jak aktywność wody (a_w), ciśnienie osmotyczne oraz kwasowość środowiska. Za wartości graniczne przyjmuje się a_w poniżej 0,86, zasolenie odpowiadające 12% NaCl oraz pH poniżej 5 i powyżej 9,6 (tab. 1; 9, 10, 11).

Do wywołania objawów zatrucia wystarczy zawartość enterotoksyn w żywności rzędu 0,5–1 ng/g (12, 13). Produkcja enterotoksyn przez *S. aureus* może rozpoczynać się dopiero po osiągnięciu określonej gęstości populacji bakteryjnej lub też przebiegać niezależnie od zagęszczenia bakterii w środowisku. W pierwszym przypadku

mówimy o toksynach zależnych od gęstości populacji, co rejestrowane jest przez bakterie dzięki aktywności systemu Agr. Agr jest jednym z najlepiej poznanych systemów regulatorowych *S. aureus*. Kontroluje on ekspresję genów białek wydzielniczych oraz białek ściany komórkowej. Aktywność Agr zmienia się wraz ze zmianą zagęszczenia bakterii w środowisku, co znane jest jako mechanizm wyczuwania liczebności (*quorum sensing*; 14). Przyjmuje się, że toksyny zależne od Agr (np. SEB, SEC, SED) są produkowane na poziomie wykrywalnym standardowymi technikami (testy ELISA), gdy populacja *S. aureus* osiąga $\geq 10^5$ jtk/ml. Toksyny niezależne od Agr (np. SEA) mogą być wytwarzane już we wczesnych fazach wzrostu populacji bakteryjnej. Wykazano, że SEA, której produkcja nie jest zależna od Agr, wykrywana jest w żywności doświadczalnie zanieczyszczanej *S. aureus* już po 2 godzinach inkubacji w 37°C (15, 16).

Enterotoksyny, jak wiele innych bakteryjnych czynników wirulencji, kodowane są przez geny zlokalizowane na tzw. dodatkowych elementach genetycznych, które najczęściej są elementami ruchomymi, co umożliwia ich przekazywanie na drodze horyzontalnego transferu pomiędzy szczepami, a nawet gatunkami bakterii (17).

Gronkowcowe zatrucia pokarmowe

Gronkowcowe zatrucie pokarmowe (staphylococcal food poisoning – SFP) jest zaburzeniem związanym ze spożyciem żywności zawierającej enterotoksyny. Żywnością najczęściej powiązaną z przypadkami zatruc gronkowcowych jest mięso czerwone, mięso drobiowe i jego przetwory, a także ciasta, sałatki i produkty mleczne oraz żywność garmażeryjna, która narażona jest na kontaminację enterotoksycznymi szczepami *S. aureus*, ze względu na wielokrotny kontakt z dłońmi pracowników podczas jej przygotowywania i sprzedaży (2, 18). Charakterystycznymi cechami gronkowcowego zatrucia pokarmowego są krótki okres inkubacji (od 30 minut do 8 godzin) oraz gwałtowny przebieg (19). Do głównych objawów zalicza się nudności, nasilone wymioty i bolesność ze strony przewodu pokarmowego. Towarzyszyć im mogą biegunka, umiarkowane

podwyższenie temperatury ciała organizmu oraz uczucie ogólnego osłabienia (20).

Gronkowcowe zatrucia pokarmowe od lat zajmują czołowe miejsce w statystykach występowania bakteryjnych zatruc pokarmowych w Europie i Stanach Zjednoczonych (20, 21). Pozycji tej nie osłabia nawet znaczna liczba przypadków niediagnozowanych, gdyż chorzy często nie zgłaszają się po pomoc medyczną ze względu na krótki czas trwania choroby i jej samograniczający się przebieg. Objawy zwykle ustępują samoistnie po 24–48 godzinach, a powikłania zdarzają się rzadko i dotyczą najczęściej osób starszych i dzieci (2, 23). Hospitalizacji wymaga jednak blisko 10% spośród osób, u których rozwiną się objawy zatrucia. Śmiertelność nie przekracza 0,03% (24).

Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority – EFSA) w myśl dyrektywy 2003/99/EC publikuje coroczne raporty uwzględniające dane na temat zatruc pokarmowych, pozyskane od poszczególnych państw członkowskich UE.

Przepisy w zakresie badania żywności w kierunku enterotoksyn gronkowcowych

Zgodnie z rozporządzeniem Komisji (WE) nr 1441/2007 żywnością badaną w kierunku enterotoksyn gronkowcowych są: sery, mleko w proszku i serwatka w proszku. Produkty te rutynowo badane są w kierunku obecności koagulazo-dodatnich gronkowców w trakcie lub po zakończeniu procesu produkcji, zależnie od asortymentu. Wskazaniem do badania produktów na obecność enterotoksyn jest przekroczenie liczby gronkowców koagulazo-dodatnich w badanym produkcie powyżej 10⁵ jtk/g. Metodą wykrywania enterotoksyn w żywności jest zatwierdzona przez Unijne Laboratorium Referencyjne ds. Gronkowców Koagulazo-Dodatnich, w tym *S. aureus* (EU Community Reference Laboratory for Coagulase-Positive Staphylococci, including *Staphylococcus aureus* – CRL CPS) metoda przesiewowa oparta na testach immunoenzymatycznych VIDAS SET 2 i Ridascreeen SET Total (25). Testy te pozwalają na wykrycie 5 (tj. SEA–SEE) z 23 opisanych dotychczas enterotoksyn i wymagają wieloetapowego przygotowania próbki. Charakteryzuje je wysoka czułość i specyficzność, prostota wykonania i relatywnie szybki wynik (tab. 2).

Tabela 1. Wartości parametrów fizykochemicznych wpływających na wzrost i produkcję enterotoksyn przez *S. aureus*

Czynnik	Wzrost		Produkcja enterotoksyn	
	Wartości optymalne	Wartości graniczne	Wartości optymalne	Wartości graniczne
Temperatura	35–41°C	6–48°C	34–40°C	10–46°C
pH	6,0–7,0	4,0–10,0	7,0–8,0	5,0–9,6
NaCl	0%	0–20%	0%	0–12%
A _w	0,99	0,85 ≥ 0,99	0,99	0,86 ≥ 0,99
Atmosfera	tlenowa	-	tlenowa	-

Diagnostyka gronkowcowych zatruc pokarmowych, w odróżnieniu od rutynowych badań przesiewowych, jest bardziej kompleksowa. Rozpoznanie gronkowcowego zatrucia pokarmowego opiera się zwykle na stwierdzeniu przynajmniej 10⁵ komórek *S. aureus* w gramie badanej żywności, detekcji enterotoksyn gronkowcowych w badanej żywności i/lub wyizolowanie tego samego szczepu *S. aureus* od chorego oraz żywności powiązanej z zatruciem (21, 26). Obecność enterotoksyn w badanej żywności, oprócz technik immunoenzymatycznych, może zostać potwierdzona próbami biologicznymi z użyciem zwierząt laboratoryjnych (małpa rezus, ryjówka domowa) lub linii komórkowych, a także za pomocą technik biologii molekularnej (wykazanie genów enterotoksyn w genomach gronkowców wyizolowanych z badanej żywności; 27, 28). Potwierdzając gronkowcowe zatrucie pokarmowe, należy mieć na uwadze niedostatki wspomnianych metod. Dla przykładu, w żywności poddanej działaniu wysokich temperatur wytworzenie enterotoksyn może nastąpić jeszcze przed jej ogrzaniem, ich aktywność nie zmienia się w wyniku obróbki cieplnej, jednak komórki gronkowca złożonego ulegną inaktywacji. Posiew wykonany z takiej próbki żywności w kierunku *S. aureus* będzie ujemny, lecz ze względu na zawartość wcześniej wytworzonych enterotoksyn będzie ona stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzi. Niepowodzenie izolacji *S. aureus* uniemożliwia też detekcję genów enterotoksyn technikami molekularnymi. Niezależnie od możliwych trudności z pozyskaniem DNA do oznaczeń molekularnych, należy zaznaczyć, iż samo stwierdzenie obecności genów enterotoksyn nie oznacza zdolności do ich wytwarzania, więc detekcja genów enterotoksyn nie może stanowić jednoznacznego potwierdzenia związku żywności z zatruciem (21, 29).

Próby biologiczne przeprowadzane na zwierzętach, celem określenia aktywności wymiotnej enterotoksyn, pociągają za sobą wątpliwości natury etycznej, będąc także kosztochłonne. Aby przy doustnym podaniu enterotoksyny indukować wymioty u zwierząt laboratoryjnych, wymagana jest dawka przekraczająca 200 ng/zwierzę, co znacznie przekracza szacowaną ilość wywołującą objawy zatrucia u człowieka (30, 31, 32). Dlatego też próby na zwierzętach nie wydają się odpowiednie do charakteryzowania przypadków gronkowcowych zatruc pokarmowych.

Wyniki najnowszych badań – impuls do zmian?

Trzy zagadnienia skupiły w ostatnich latach szczególną uwagę naukowców zajmujących się właściwościami enterotoksyn gronkowcowych oraz ich wytwarzaniem przez gronkowce. Pierwszym z tych zagadnień jest zdolność do produkcji enterotoksyn nie tylko przez koagulazo-dodatnie gatunki rodzaju *Staphylococcus*, ale także przez gatunki koagulazo-ujemne. Doniesienia na temat takiej możliwości pojawiały się w latach 50. i 70. XX w. (33, 34), jednak ze względu na brak dokładnych danych podchodzono do nich sceptycznie.

Obecność enterotoksycznych gronkowców koagulazo-ujemnych w mleku przeżuwaczy, zwłaszcza owiec i kóz, została później potwierdzona przez licznych badaczy (35, 36, 37). Powszechne występowanie tych mikroorganizmów w środowisku związanym z produkcją mleka oraz fakt, że koagulazo-ujemne gronkowce są drobnoustrojami najczęściej izolowanymi z przypadków *mastitis* u przeżuwaczy (38, 39, 40), skłania do podejmowania badań nad enterotoksycznością tych mikroorganizmów.

Zdolność wytwarzania enterotoksyn gronkowcowych została potwierdzona

Tabela 2. Komercyjne testy wykrywające enterotoksyny w żywności – charakterystyka

Test	Technika badania	Wykrywane enterotoksyny	Czas badania* (h)	Czułość testu (ng/ml)
VIDAS SET 2	ELFA**	SEA–SEE	1,5	0,25–0,5
Ridascreeen	ELISA***	SEA–SEE	2,5	0,1–0,75

* Nie obejmuje czasu ekstrakcji z próbek; ** Enzyme Linked Fluorescent Assay; *** Enzyme Linked Immunosorbent Assay

także w przypadku szczepów gronkowców koagulazo-ujemnych wyosobnionych z wędlin dojrzewających (41, 42). Enterotoksyczne właściwości stwierdzono nawet w szczepach gronkowców koagulazo-ujemnych wchodzących w skład kultur starterowych dodawanych, często w wysokich stężeniach, do surowców mięsnych podczas produkcji kielbas dojrzewających (43). Znaczący udział szczepów zdolnych do wytwarzania enterotoksyn stwierdzono w badaniach przeprowadzonych na szczepach gronkowców koagulazo-ujemnych pozyskanych od pracowników przemysłu spożywczego mających bezpośredni kontakt z żywnością (18). Pozwala to przypuszczać, że w warunkach niespełniających wymogów higienicznych ryzyko transmisji enterotoksycznych gronkowców koagulazo-ujemnych od ludzi do żywności jest realne.

Wykazano również, iż kliniczne izolaty koagulazo-ujemnych gatunków *Staphylococcus* są zdolne do wytwarzania enterotoksyn na poziomie wykrywalnym technikami serologicznymi (44, 45, 46). Enterotoksyny gronkowcowe produkowały także izolaty pozyskane od zwierząt towarzyszących (47).

W 2011 r. potwierdzono obecność genów homologicznych do genów enterotoksyn *S. aureus* w genomie *S. epidermidis*, koagulazo-ujemnego przedstawiciela *Staphylococcus* spp., opisując kompletną sekwencję nukleotydową genów kodujących enterotoksyny SEC i SEL (48).

W przypadkach zatruc, których potwierdzenie i analiza opierają się na detekcji termostabilnych enterotoksyn w żywności przetworzonej termicznie, skąd najczęściej nie można wyosobnić żywych gronkowców, ustalenie, czy wykryte w próbce enterotoksyny zostały wytworzone przez gronkowce koagulazo-ujemne, czy przez *S. aureus*, nie jest możliwe. Mając to na uwadze, można przypuszczać, że udział enterotoksycznych gronkowców koagulazo-ujemnych w rozwoju zatruc pokarmowych jest prawdopodobny (49).

Drugą istotną kwestią, która może przyczynić się do zmiany myślenia o wykrywaniu enterotoksyn gronkowcowych w żywności, zarówno w aspekcie rozporządzenia 1441/2007, jak i diagnostyki bakteryjnych zatruc pokarmowych, jest ujawnienie właściwości wymiotnych nowo opisanych enterotoksyn. Jak wspomniano, w zakres urzędowych badań wchodzi obecnie jedynie testy w kierunku enterotoksyn SEA-SEE. Od dłuższego czasu wiadomo jednak, że takie enterotoksyny, jak SEG, SEH, SEI, SER, SES i SET, również mają właściwości wymiotne (50, 51, 52). Enterotoksyna SEH została zidentyfikowana jako czynnik zbiorowych gronkowcowych zatruc pokarmowych w Norwegii i Japonii

(53, 54). Badania przeprowadzone przez Omoe i wsp. w 2013 r. (32) wykazały, że również enterotoksyny SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP oraz SEQ po doustnym podaniu indukują wymioty u małp (*Macaca fascicularis*). Pozwala to przypuszczać, że czynniki te odgrywają rolę w rozwoju gronkowcowych zatruc pokarmowych.

Trzecim zagadnieniem, które w ostatnich latach stało się przedmiotem intensywnych badań, jest wytwarzanie enterotoksyn w żywności. Większą część dotychczasowej wiedzy o warunkach wytwarzania enterotoksyn gronkowcowych uzyskano z badań prowadzonych na podłożach mikrobiologicznych. Najnowsze wyniki wykazują jednak, że środowisko żywności, jego parametry fizykochemiczne oraz obecność mikroflory towarzyszącej może znacząco modulować poziom produkcji enterotoksyn w stosunku do tego, co można zaobserwować w podłożach mikrobiologicznych (55). Badania te dotyczyły w szczególności wytwarzania enterotoksyny SEC w mleku. Stwierdzono bowiem, że szczepy *S. aureus* posiadające gen kodujący SEC występują z dużą częstością wśród przeżuwaczy oraz w środowisku pozyskiwanego mleka (56). Doświadczenia przeprowadzone przez Valihrach i wsp. (57, 58) wykazały, że wytwarzanie SEC w mleku, niezależnie od rodzaju mleka (mleko krowie, owcze, kozie), zawartości tłuszczu czy zastosowanej obróbki cieplnej (mleko w proszku, pasteryzowane, UHT), było na znacząco niższym poziomie niż w standardowych pożywkach laboratoryjnych. Stwierdzono, iż żaden z kilkunastu badanych szczepów *S. aureus* nie wytworzył w mleku SEC w ilości, która potrzebna jest do wywołania zatrucia pokarmowego u ludzi. Badania Cretenet i wsp. (59) wskazują na niską zdolność do wytwarzania SEC przez *S. aureus* rosnące w serze. W przypadku enterotoksyny SEA zaobserwowano, że naturalna mikroflora mleka surowego wpływa na obniżenie produkcji tej toksyny, przy jednoczesnym braku zahamowania wzrostu *S. aureus* (60). Zagadnienie produkcji enterotoksyn gronkowcowych w mleku i jego przetworach wymaga dalszych badań, choćby ze względu na niewielką liczbę scharakteryzowanych szczepów *S. aureus* (60, 61, 62) oraz różnice w zastosowanych metodach badawczych (63). Istnieją jednak przesłanki pozwalające przypuszczać, że mleko nie stanowi środowiska korzystnie wpływającego na produkcję enterotoksyn gronkowcowych.

Piśmiennictwo

- Balaban N., Rasooly A.: Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, 61, 1–10.
- Le Loir Y., Baron F., Gautier M.: *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2003, 2, 63–76.

- Bergdoll M. 1983. Enterotoxins. Staphylococci and Staphylococcal Infections. Easman C. Adlam C. red. Academic Press, London, UK.
- Bergdoll M. 1989. *Staphylococcus aureus*. Foodborne Bacterial Pathogens. Doyle M. red. Marcel-Dekker, New York, USA
- Lina G., Bohach G.A., Nair S.P., Hiramatsu K., Jouvin-Marche E., Mariuzza R.: Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J. Infect. Dis.* 2004, 189, 2334–2336.
- Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M.: Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000, 13, 16–34.
- McCormick J., Yarwood J., Schlievert P.: Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001, 55, 77–104.
- Proft T., Fraser J.: Bacterial superantigens. *Clin. Exp. Immunol.* 2003, 133, 299–306.
- McLean R.A., Lilly H.D., Alford J.A.: *J. Bacteriol.* 1968, 95, 1207–1221.
- Scheusner D.L., Hood L.L., Harmon L.G.: Effect of temperature and pH on growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus*. *J. Milk Food Technol.* 1973, 36, 249–252.
- Yang S.E., Yu R.C., Chou C.C.: Influence of holding temperature on the growth and survival of *Salmonella* spp and *Staphylococcus aureus* and the production of staphylococcal effects of meat curing salts and temperature on production of staphylococcal enterotoxin B enterotoxin in egg products. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, 63, 99–107.
- Meyrand A., Boutrand-Loei S., Ray-Gueniot S., Mazuy C., Gaspard C.E., Jaubert G., Perrin G., Lapeyre C., Vernoy-Rozand C.: 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.
- Jay J.: Indicators of Food Microbial Quality and Safety. W: Jay J. (edit.): *Modern Food Microbiology*. Chapman & Hall, New York 1992.
- Dunman P.M., Murphy E., Haney S., Palacios D., Tucker-Kellog G., Wu S., Brown E.L., Zagursky R.J., Shlaes D., Projan S.J.: Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the agr and/or sarA loci. *J. Bacteriol.* 2001, 183, 7341–7353.
- 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.
- Zhang S., Stewart G.C.: Characterization of the promoter elements for the staphylococcal enterotoxin D gene. *J. Bacteriol.* 2000, 182, 2321–2325.
- Novick R., Schlievert P., Ruzin A.: Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes Infect.* 2001, 3, 585–594.
- Udo E., Al-Bustan M., Jacob L., Chugh T.: Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. *J. Med. Microbiol.* 1999, 48, 819–823.
- Hennekinne J., de Buyser M., Dragacci S.: *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* 2012, 36, 815–836.
- Scharff R.L.: Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *J. Food Protect.* 2012, 75, 123–131.
- Hennekinne J.A., Ostyn A., Guillier F., Herbin S., Pruffer A.L., Dragacci S.: How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? *Toxins*. 2010, 2, 2106–2116.
- Doyle M., Hartmann E., Lee Wong A.: Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply? *Anim. Health Res. Rev.* 2012, 13, 157–180.
- Scallan E., Hoekstra R., Angulo E., Tauxe R., Widdowson M., Roy S., Jones J., Griffin P.: Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 2011, 17, 7–15.
- Murray R.J.: Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Intern. Med. J.* 2005, 35, 106–119.
- Rola J.G., Korpyś-Dzirba W., Osek J.: Enterotoksyny gronkowcowe. Część II. Europejska metoda skriningowa i jej modyfikacje – przyczyny i efekty. *Żywiec Wet.* 2012, 87, 767–769.
- Bryan F.L., Guzewish J.J., Todd E.C.D.: Surveillance of foodborne disease II. Summary and presentation of descriptive data and epidemiologic patterns; their value and limitations. *J. Food Prot.* 1997, 60, 567–578.
- Bergdoll M.S.: Staphylococcal intoxications. In Food-borne Infections and Intoxications; Riemann, H., Bryan, F.L., Eds.; Academic press: New York, NY, USA, 1979; pp. 443–494.
- Hawryluk T., Hirschfeld I.: A super antigen bioassay to detect staphylococcal enterotoxin A. *J. Food Prot.* 2002, 65, 1183–1187.

29. 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.
30. Surgalla M., Bergdoll M.S., Dack G.M.: Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by the monkey feeding test. *J. Lab. Clin. Med.* 1953, **41**, 782–788.
31. 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.
32. Omoe K., Hu D.L., Ono H.K., Shimizu S., Takahashi-Omoe H., Nakane A., Uchiyama T., Shinagawa K., Imanishi K.: Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. *Infect. Immunol.* 2013, **81**, 3627–3631.
33. Omori G., Kato Y.: A staphylococcal food poisoning caused by a coagulase-negative strain. *Bikken's J.* 1959, 2:92.
34. Breckinridge J., Bergdoll M.: Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin-producing staphylococcus. *N. Engl. J. Med.* 1971, **284**, 541–543.
35. Harvey J., Gilmour A.: Application of current methods for isolation and identification of staphylococci in raw bovine milk. *J. Appl. Bacteriol.* 1985, **59**, 207–221.
36. De Buyser M., Dilasser F., Hummel R., Bergdoll M.: Enterotoxin and toxic shock syndrome-1 production by staphylococci isolated from goat's milk. *Int. J. Food Microbiol.* 1987, **5**, 301–309.
37. Bautista L., Gaya P., Medina M., Nuñez M.: A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988, **54**, 566–569.
38. Bergonier D., de Crémoux R., Rupp R., Lagriffoul G., Berthelot X.: Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res.* 2003, **34**, 689–716.
39. Taponen S., Simojoki H., Haveri M., Larsen H., Pyörälä S.: Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet. Microbiol.* 2006, **115**, 199–207.
40. Taponen S., Pyörälä S.: Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis – not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet. Microbiol.* 2009, **134**, 29–36.
41. Marin M., de la Rosa M., Cornejo I.: Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* strains isolated from Spanish dry-cured hams. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, **58**, 1067–1069.
42. Rodríguez M., Núñez F., Córdoba J., Bermúdez E., Asensio M.: Gram-positive, catalase-positive cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, **62**, 1897–1902.
43. Zell C., Resch M., Rosenstein R., Albrecht T., Hertel C., Götz F.: Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 2008, **127**, 246–251.
44. Crass B., Bergdoll M.: Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 1986, **23**, 43–45.
45. Da Cunha M., Rugolo L., Lopes C.: Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2006, **101**, 661–668.
46. Da Cunha M., Calsolari R., Júnior J.: Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Microbiol. Immunol.* 2007, **51**, 381–390.
47. Adesiyun A., Usman B.: Isolation of enterotoxigenic strains of staphylococci from dogs. *Vet. Microbiol.* 1983, **8**, 459–468.
48. Madhusodanan J., Seo K., Remortel B., Park J., Hwang S., Fox L., Park Y., Deobald C., Wang D., Liu S., Daugherty S., Gill A., Bohach G., Gill S.: An enterotoxin-bearing pathogenicity island in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* 2011, **193**, 1854–1862.
49. Podkowik M., Park J., Seo K., Bystrón J., Bania J.: Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *Int. J. Food Microbiol.* 2013, **163**, 34–40.
50. Jarraud S., Peyrat M.A., Lim A., Tristan A., Bes M., Mougé C.: *egc*: A highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 2001, **166**, 669–677.
51. Omoe K., Imanishi K., Hu D.L., Kato H., Takahashi-Omoe H., Nakane A., Uchiyama T., Shinagawa K.: Biological properties of staphylococcal enterotoxin-like toxin type R. *Infect. Immunol.* 2004, **72**, 3664–3667.
52. Ono H.K., Omoe K., Imanishi K., Iwakabe Y., Hu D.L., Kato H., Saito N., Nakane A., Uchiyama T., Shinagawa K.: Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infect. Immunol.* 2008, **76**, 4999–5005.
53. 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.
54. 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.
55. Smith J.L., Buchanan R.L., Palumbo S.A.: Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis. *J. Food Prot.* 1983, **46**, 545–555.
56. Scherrer D., Corti S., Muehlherr J.E., 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.
57. Valihrach L., Alibayov B., Demnerova K.: Production of staphylococcal enterotoxin C in milk. *Int. Dairy J.* 2013, **30**, 103–107.
58. 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.
59. Cretenet M., Nouaille S., Thouin J., Rault L., Stenz L., François P., Hennekinne J.A., Piot M., Maillard M.B., Fauquant J., Loubière P., Loir Y.L., Even S.: *Staphylococcus aureus* virulence and metabolism are dramatically affected by *Lactococcus lactis* in cheese matrix. *Environ. Microbiol. Rep.* 2011, **3**, 340–351.
60. Sabike I.I., Fujikawa H., Sakha M.Z., Edris A.M.: Production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in raw milk at high temperatures. *J. Food Prot.* 2014, **77**, 1612–1616.
61. Otero A., García M.C., García M.L., Moreno B.: Effect of growth of a commercial starter culture on growth of *Staphylococcus aureus* and thermonuclease and enterotoxins (C1 and C2) production in broth cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 1988, **6**, 107–114.
62. Otero A., García M.L., García M.C., Moreno B., Bergdoll M.S.: Production of staphylococcal enterotoxins C1 and C2 and thermonuclease throughout the growth cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990, **56**, 555–559.
63. Soejima T., Nagao E., Kubota T., Yamagata H., Kagi H.: Comparison between ultrafiltration and trichloroacetic acid precipitation method for concentration of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in dairy samples. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, **93**, 185–194.