

Enterotoksyny gronkowcowe.

Część I. Epidemiologia i znaczenie dla zdrowia publicznego

Weronika Korpysa-Dzirba, Jolanta G. Rola, Jacek Osek

z Zakładu Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Enterotoksyczne szczepy gronkowców są jedną z najczęstszych przyczyn zatrucia pokarmowych u ludzi (1). Zdolność do wytwarzania enterotoksyn mają głównie koagulazo-dodatnie izolaty należące do rodzaju *Staphylococcus*, przede wszystkim *S. aureus*. Jednakże istnieją również szczepy gronkowców koagulazo-ujemnych, np. *S. epidermidis* czy *S. xylosus*, które również mają zdolność do wytwarzania tych czynników toksycznych. Dotychczas poznano ponad 20 rodzajów enterotoksyn gronkowcowych (2). Wszystkie one mają aktywność superantygenu, ale tylko kilka może wywoływać objawy zatrucia pokarmowego, a co za tym idzie stanowi niebezpieczeństwo dla zdrowia konsumentów. Największe znaczenie w patogenezie intoksykacji pokarmowych u ludzi ma enterotoksyna A (staphylococcal enterotoxin A – SEA), która jest odpowiedzialna za wystąpienie ponad 75% przypadków gronkowcowych zatruc pokarmowych (staphylococcal food poisoning – SFP). W dalszej kolejności istotną rolę odgrywają również enterotoksyny B (SEB), C (SEC) i D (SED).

Ilość enterotoksyny niezbędna do wywołania objawów chorobowych zależy od indywidualnej wrażliwości osobniczej oraz ogólnego stanu zdrowia osoby zakażonej, ale przyjmuje się, że dawka wywołująca objawy zatrucia wynosi od 20 do 100 ng (3). Intoksykacje na tle gronkowcowym charakteryzują się krótkim okresem inkubacji,

wynoszącym już od 30 minut do około 8 godzin (1). Dominującymi objawami klinicznymi są: ból głowy, nudności i gwałtowne wymioty, którym towarzyszą bóle brzucha i biegunka (2). Inne, często obserwowane symptomy obejmują zawroty głowy, dreszcze oraz ogólne osłabienie organizmu, niekiedy związane z podwyższoną temperaturą ciała. W cięższych przypadkach występują również bóle głowy, uczucie wyczerpania oraz obniżenie ciśnienia krwi. Objawy działania enterotoksyn zwykle samoistnie ustępują po kilku lub kilkunastu godzinach (4). Najcięższy przebieg SFP obserwuje się u małych dzieci, osób starszych lub przyjmujących leki immunosupresyjne. Enterotoksyny gronkowcowe, w przeciwieństwie do bakterii *S. aureus*, są odporne na wysoką temperaturę, jak też na enzymy proteolityczne, odwodnienie, promieniowanie gamma oraz szeroki zakres pH. Dzięki tym cechom nie są dezaktywowane podczas termicznej obróbki żywności i pozostają aktywne, podczas gdy bakterie *S. aureus* są niszczone (1).

Aby doszło do gronkowcowego zatrucia pokarmowego, niezbędne jest zaistnienie pięciu czynników (2):

1. Źródła zawierającego enterotoksyczny szczep gronkowca, np. człowiek – nosiciel, który zanieczyszcza żywność na różnych etapach jej produkcji, było mleczne chore na gronkowcowe zapalenie wymienia.

Staphylococcal enterotoxins. Part I. Epidemiology and importance for public health

Korpysa-Dzirba W., Rola J.G., Osek J.,
Department of Hygiene of Food of Animal Origin,
National Veterinary Research Institute, Pulawy

The aim of this article was to present important aspects of staphylococcal infections. Staphylococcal food poisoning (SFP) is one of the most common food-borne diseases and it results from the ingestion of staphylococcal enterotoxins (SEs) produced in food by enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus*. To date, more than 20 SEs have been described. SEA is the most common cause of SFP worldwide, but involvement of other classical SEs has also been proved. The cause of this type of food poisoning is ingestion of different foods particularly meat and dairy products contaminated with *S. aureus* by improper handling and storage at elevated temperatures. This paper describes the SFP outbreaks in European Union and in Poland and currently available methods used to characterize SFP outbreaks.

Keywords: staphylococcal enterotoxins, epidemiology, SFP, food.

2. Przeniesienie gronkowców ze źródła zakażenia do żywności, np. przy braku odpowiedniej higieny w trakcie przygotowywania lub przetwarzania żywności.
3. Właściwości fizykochemiczne żywności sprzyjające namnażaniu się gronkowców i wytwarzaniu enterotoksyn, np. pH, aktywność wody.
4. Sprzyjająca temperatura i odpowiednia ilość czasu, umożliwiające namnażanie się gronkowców i wytwarzanie enterotoksyn.
5. Spożycie żywności zawierającej wystarczającą do wywołania objawów ilość enterotoksyny gronkowcowej.

Jak wspomniano wcześniej, za gronkowcowe zatrucia pokarmowe najczęściej odpowiedzialna jest enterotoksyna A, a w mniejszym stopniu toksyny B, C i D. Do niedawna

brak było danych epidemiologicznych wskazujących na obecność innych niż wymienione rodzajów enterotoksyn gronkowcowych w przypadkach gronkowcowych zatruc pokarmowych u ludzi. Jednakże pod koniec 2009 r. we Francji odnotowano 6 lokalnych epidemii zatruc na tle gronkowcowym (staphylococcal food poisoning outbreaks – SPFO), w których źródłem była toksyna znajdująca się w serach wyprodukowanych z niepasteryzowanego mleka. Zostało to udowodnione w przypadku 3 epidemii, natomiast w przypadku pozostałych trzech ognisk możliwe było jedynie ustalenie, że osoby, u których pojawiły się objawy zatruc na tle gronkowcowym spożywały ten sam rodzaj serów, które zostały potwierdzone jako źródło zachorowań. W badanych serach stwierdzono obecność koagulazo-dodatnich gronkowców na poziomie powyżej $1,5 \times 10^5$ jtk/g, występowanie enterotoksyny gronkowcowej E w ilości od 0,36 do ponad 1,14 ng/g oraz obecność genu *see*, kodującego enterotoksynę E w szczepach gronkowców wyizolowanych z serów. Wcześniej przypadki zatruc wywołanych przez ten rodzaj enterotoksyny odnotowywano rzadko. W piśmiennictwie istnieją jedynie doniesienia o pojedynczych przypadkach, które wystąpiły na terenie Stanów Zjednoczonych i Wielkiej Brytanii (5).

Potwierdzenie, że przyczyną zatrucia pokarmowego były enterotoksyny gronkowcowe, zwykle odbywa się poprzez wykrycie w żywności poziomu zanieczyszczenia *S. aureus*, co najmniej 10^5 jtk w gramie lub mililitrze, identyfikację samych enterotoksyn gronkowcowych lub też przez wyizolowanie tego samego szczepu *S. aureus* od pacjenta oraz ze spożytej przez niego żywności. W niektórych przypadkach potwierdzenie gronkowcowej etiologii zatrucia pokarmowego jest szczególnie trudne ze względu na wrażliwość tych bakterii na wysoką temperaturę oraz jednocześnie termooporność samych enterotoksyn. Z tego powodu, w odniesieniu do produktów spożywczych poddawanych obróbce termicznej, enterotoksyny gronkowcowe mogą pozostawać aktywne, podczas gdy komórki *S. aureus* zostają wyeliminowane. W takich przypadkach nie jest możliwa charakterystyka ognisk zatruc enterotoksyną gronkowcową na podstawie analizy wyizolowanego szczepu *S. aureus*. Oznaczanie liczby koagulazo-dodatnich gronkowców (coagulase positive staphylococci – CPS), w tym *S. aureus*, odbywa się przez posiew na odpowiednie pożywki bakteryjne takie jak agar Baird–Parkera wzbogacony lub nie osoczem króliczym (2).

Metody wykrywania enterotoksyn gronkowcowych można podzielić na 3 grupy: próby biologiczne, techniki biologii molekularnej oraz testy immunologiczne. Próby biologiczne, ze względu na ograniczenia

natury etycznej oraz niską czułość, nie są obecnie wykorzystywane do charakterystyki SFPO. Metody biologii molekularnej zwykle opierają się na wykorzystaniu techniki PCR i umożliwiają wykrycie genów kodujących SE w szczepach wyizolowanych z zanieczyszczonej żywności. Testy te mają jednak swoje ograniczenia. Przede wszystkim niezbędna jest izolacja szczepu z żywności, co nie zawsze jest możliwe, poza tym metody te umożliwiają wykrycie genów, ale nie dają informacji co do ich ekspresji. Pomimo tych ograniczeń, PCR jest specyficzną, czułą i szybką techniką umożliwiającą charakterystykę *S. aureus* związanych z SFPO. Najczęściej jednak do wykrywania SE w żywności stosuje się techniki immunologiczne, np. ELISA, ELFA (enzyme-linked fluorescent assay), RPLA (reverse passive latex agglutination). Użycie tych metod jest trudne ze względu na ich dosyć niską czułość i specyficzną. Ze względów ekonomicznych dostępne są przeciwciała skierowane jedynie przeciwko niektórym rodzajom SE, dlatego też testy te umożliwiają wykrycie tylko pięciu odmian enterotoksyn: SEA – SEE lub w przypadku RPLA jedynie czterech: SEA – SED. Ponadto problemem jest pojawianie się wyników fałszywie dodatnich w przypadku niektórych rodzajów matryc żywnościowych, jak również związanych z obecnością białka A oraz endogennych enzymów, takich jak laktoperoksydaza czy fosfataza alkaliczna. W celu zwiększenia czułości niezbędne jest zagęszczenie ekstraktu przed etapem detekcji. Metodą pozytywnie zaopiniowaną do tego celu przez Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej (EURL) ds. gronkowców koagulazo-dodatnich, w tym *S. aureus*, jest zagęszczenie poprzez dializę (1, 6). W celu pełnej charakterystyki SFPO łączy się coraz częściej zarówno techniki immunologiczne, jak i molekularne. Badania przeprowadzone we Francji w latach 1981–2002 na 178 szczepach *S. aureus* wykazały 84% zgodność pomiędzy wynikami uzyskanymi techniką PCR a tymi otrzymanymi na podstawie technik immunologicznych (2).

Ze względu na ograniczenia wymienionych testów coraz większe zainteresowanie budzi wykorzystanie metod opartych na technikach fizykochemicznych. Wśród nich szczególnie obiecująca wydaje się spektrometria mas (mass spectrometry – MS). Jest to jedna z najczulszych dostępnych obecnie metod, która umożliwia szybką i specyficzną analizę próbek pod kątem występowania oraz ilościowej oceny enterotoksyn gronkowcowych. Biorąc pod uwagę badania żywności, utrudnienie w wykorzystaniu tego rodzaju technik stanowi występowanie w matrycy, oprócz docelowego białka, również innych cząstek, które mogą wpłynąć na wynik. Dlatego też kluczowy

pozostaje etap przygotowania próbki do badania. Metoda stanowiąca połączenie chromatografii cieczowej z detekcją ESI/MS (electrospray ionization mass spectrometry) została z powodzeniem wykorzystana do ilościowego oznaczenia SEA w naturalnie zanieczyszczonych próbkach sera oraz w dochodzeniu epidemiologicznym dotyczącym epidemii zatrucia pokarmowego we Francji. W EURL stwierdzono, że metoda oparta na MS pozbawiona jest ograniczeń, jakie występują w przypadku zastosowania techniki ELISA, jednakże koszt wykonania jednej analizy jest ponaddwukrotnie wyższy niż w przypadku badań serologicznych. Z tego też względu ELISA pozostaje złotym standardem w analizie żywności pod kątem występowania w niej enterotoksyn gronkowcowych, natomiast metody fizykochemiczne mogą stanowić jej uzupełnienie (2, 7).

Organem zajmującym się oceną ryzyka w zakresie bezpieczeństwa żywności i pasz w Unii Europejskiej jest Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). Od 2005 r. publikuje on corocznie raporty dotyczące występowania chorób odzwierzęcych (zoonoz) u ludzi oraz ich czynników etiologicznych. W pierwszym roku raportowania jedynie 7 krajów członkowskich Unii Europejskiej zgłosiło wystąpienie na ich terytorium przypadków SFPO (n=36; 8). Natomiast dane pochodzące z 2006 r. mówią o wystąpieniu 236 epidemii SFP spośród odnotowanych 5807 (4,1%) masowych zatruc pokarmowych. Więcej przypadków epidemii stwierdzono jedynie w przypadku zatruc wywołanych przez *Salmonella* spp. (59,3%), wirusy (10,2%) oraz *Campylobacter* spp. (6,9%; 9). Obszerny rozdział dotyczący toksyn bakteryjnych został zamieszczony w raporcie EFSA w 2009 r., obejmujący epidemię zatruc pokarmowych na tle toksyn bakteryjnych występujących na terenie UE w 2007 r. Według zawartych tam informacji, pochodzących z 16 krajów UE, enterotoksyny gronkowcowe były czynnikiem odpowiedzialnym za 258 epidemii gronkowcowych zatruc pokarmowych, z czego 182 były to epidemie poddane weryfikacji, gdzie potwierdzono, że czynnikiem etiologicznym były enterotoksyny wytworzone przez *S. aureus*. Stanowi to 4,6% wszystkich odnotowanych na terenie Unii Europejskiej masowych zatruc pokarmowych. Ponadto w 2 krajach niebędących członkami UE stwierdzono 8 epidemii SFP. Z danych tych wynika, że najwięcej masowych zachorowań o potwierdzonej etiologii gronkowcowej odnotowano we Francji – 131 przypadków. W Polsce statystyki mówią o 4 przypadkach tego rodzaju epidemii, natomiast na terenie Niemiec, Włoch, Portugalii Szwecji i Wielkiej Brytanii nie odnotowano tego typu zachorowań.

Jedną z opisanych szczegółowo epidemii wystąpiła w Belgii, gdzie na obozie letnim u 15 osób, wśród których były zarówno dzieci, jak i osoby dorosłe, wkrótce po spożyciu posiłku pojawiły się nudności, wymioty i biegunka. W dochodzeniu epidemiologicznym analizie poddano próbki resztek wszystkich produktów, które były wcześniej spożywane przez osoby z zatruciem pokarmowym. Były to próbki mleka, hamburgerów, sera, keczupu oraz makaronu. Ponadto pobrano również próbki hamburgerów z supermarketu, mające taką samą datę produkcji, jak spożywane przez osoby chore, jak również próbki z zakładu produkcyjnego. W hamburgerach podanych na obozie stwierdzono duże ilości *S. aureus* oraz wykryto obecność gronkowcowej enterotoksyny A. Natomiast w próbkach pochodzących z supermarketu oraz z zakładu produkcyjnego również wykryto wysoką liczbę *S. aureus*, jednak nie stwierdzono samych enterotoksyn gronkowcowych. Wszystkie wyizolowane szczepy *S. aureus* poddano typowaniu molekularnemu metodą PFGE (pulse field gel electrophoresis) i stwierdzono, że należały one do tej samej grupy klonalnej, co jednoznacznie wskazało zakład produkcyjny jako źródło zanieczyszczenia. W dochodzeniu epidemiologicznym wykazano, że system chłodzący, którego zadaniem było schłodzenie gotowych hamburgerów, był zanieczyszczony przez *S. aureus* (10).

Według raportu EFSA w 2008 r. toksyny bakteryjne były odpowiedzialne za 525 spośród 5332 zgłoszonych epidemii zatruc pokarmowych (9,8%), co stawia je na trzecim miejscu po epidemiach wywołanych przez *Salmonella* spp. (35,4%) i wirusy (13,1%). Wśród toksyn bakteryjnych enterotoksyny gronkowcowe były odpowiedzialne za 291 spośród 525 zidentyfikowanych epidemii zatruc pokarmowych (55,4%). Masowe zatrucia na tym tle stanowiły 5,5% wszystkich epidemii zatruc pokarmowych (11). Według ostatniego opublikowanego raportu EFSA, zawierającego dane z 2009 r. (12), toksyny bakteryjne były odpowiedzialne za około 15% wszystkich przypadków zatruc pokarmowych odnotowanych w krajach Unii Europejskiej. Ogółem stwierdzono 558 epidemii zatruc pokarmowych wywołanych przez toksyny bakteryjne, co stanowi 10,1% wszystkich epidemii w UE. Jedynie 39,1% epidemii na tle toksyn bakteryjnych zostało poddanych weryfikacji. Opierając się na danych pochodzących z 18 krajów członkowskich UE, w sumie stwierdzono 293 epidemie wywołane przez *S. aureus*. Wśród nich 88 masowych zachorowań (30%) poddano szczegółowej weryfikacji i stwierdzono 978 przypadków gronkowcowych zatruc pokarmowych, z czego 165 osób było hospitalizowanych, a 2 osoby zmarły. Pozostałe 205 epidemii (70%) niepoddanych weryfikacji określono jako prawdopodobnie zatrucia wywołane przez *S. aureus* i wśród nich

Tabela 1. Produkty związane z gronkowcowymi zatruciami pokarmowymi – wg raportu EFSA za 2009 r. (12)

Rodzaje produktów	Udział w wywoływaniu zatruc gronkowcowych (%)
Sery	21,6
Wyroby garmażeryjne	15,9
Mięso drobiowe i produkty pochodne	5,7
Produkty piekarnicze	4,5
Mięso brojlerów (<i>Gallus gallus</i>) i produkty pochodne	3,4
Produkty mleczne z wyjątkiem serów	3,4
Ryby i produkty rybne	3,4
Mięso wołowe i produkty pochodne	2,3
Mleko	2,3
Warzywa i produkty pochodne	2,3
Nieznane	11,4
Inne produkty, np. jaja, maźle, skorupiaki, orzechy, migdały	18,2

stwierdzono 1693 przypadki SFPO, z których 138 dotyczyło pacjentów wymagających hospitalizacji, a jedna osoba zmarła. Największy odsetek epidemii SFPO wywołany był przez sery (21,6%) oraz przez wyroby garmażeryjne (15,9% tab. 1).

Z danych Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny wynika, że w Polsce na przestrzeni kilku ostatnich lat odnotowuje się kilkadziesiąt do kilkuset przypadków SFP. Od 2005 r. można zaobserwować tendencję spadkową zarówno co do liczby bakteryjnych zatruc pokarmowych, jak również w stosunku do intoksykacji gronkowcowych. Największą liczbę przypadków zatruc pokarmowych wywołanych przez enterotoksyny gronkowcowe w latach 2005–2009 odnotowano w 2005 r. i wynosiła ona 658 przypadków. Przez kolejne 4 lata liczba ta zmniejszała się, a w 2009 r. stwierdzono 146 przypadków zachorowań. Najczęściej przypadki SFP odnotowywano w województwie zachodniopomorskim, które w latach 2005, 2006 i 2007 stanowiły niemal połowę wszystkich SFPO w Polsce. W województwach świętokrzyskim i podkarpackim, w okresie 2005–2009, nie odnotowano żadnego przypadku SFP. Największą liczbę SFP stwierdza się w miesiącach letnich, w drugim, a szczególnie w trzecim kwartale roku (13).

Zgodnie z obowiązującymi kryteriami mikrobiologicznymi, zapisanymi w rozporządzeniu Komisji (WE) nr 2073/2005 z 15 listopada 2005 r. w produktach, takich jak sery, mleko w proszku i serwatka w proszku, gdy spodziewana liczba *S. aureus* w czasie procesu produkcji będzie wyższa niż 10^5 jtk/g, istnieje obowiązek przeprowadzenia badań w kierunku obecności enterotoksyn gronkowcowych. W rozporządzeniu tym, metodą wskazaną jako referencyjna w zakresie wykrywania enterotoksyn gronkowcowych, jest Europejska Metoda Skriningowa. Aktualnie obowiązująca wersja 5 metody z września 2010 r. (14, 15).

W części drugiej tego opracowania zostaną przedstawione dane dotyczące walidacji, poprzez badania wewnątrz-

i zewnątrzlaboratoryjne, oraz optymalizacji europejskiej metody skriningowej (ESM) wykrywania enterotoksyn gronkowcowych.

Piśmiennictwo

- Korpysa W., Rola J.G., Osek J.: Enterotoksyny gronkowcowe oraz ich wykrywanie w mleku i przetworach mlecznych. *Medycyna Wet.* 2005, **61**, 633-636.
- 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.
- Asao T., Kumeda Y., Kawai T., Shibata T., Oda H., Haruki K., Nakazawa H., Kozaki S.: An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.* 2003, **130**, 33-40.
- Do Carmo L.S., Cummings C., Linardi V.R., Souza Diaz R., De Souza J.M., De Sena M.J., Dos Santos D.A., Shupp J.W., Peres Pereira R.K., Jett M.: A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. *Foodborne Pathog. Dis.* 2004 **1**, 241-246.
- Ostyn A., De Buyser M.L., Guillier F., Groult J., Felix B., Salah S., Delma G., Hennekinne J-A.: First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. *Euro Surveill* 2010, **15**, 10-14.
- Wieneke A.A.: Comparison of four kits for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 1991, **14**, 305-312.
- Dupuis A., Hennekinne J.A., Garin J., Brun V.: Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for improved investigation of staphylococcal food poisoning outbreaks. *Proteomics* 2008, **8**, 4633-4636.
- Anonymous (2006): The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005. *EFSA J* **94**, 1-288.
- Anonymous (2007): The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. *EFSA J* **130**, 1-352.
- Anonymous (2009): The Community Summary Report on Foodborne outbreaks in the European Union in 2007. *EFSA J* **271**, 69-128.
- Anonymous (2010): The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA J* **1496**, 1-376.
- Anonymous (2011): The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2009. *EFSA J* **2090**, 1-378.
- <http://www.pzh.gov.pl>
- Ostyn A., Pruffer A.L., Papinaud I., Hennekinne J-A., Assere A., Lombard B.: Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in All types of food matrices. European screening method of the EU-RL for „Coagulase Positive Staphylococci including *Staphylococcus aureus*”. Version 5 September 2010, 1-12.
- Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych (DzU L. 338 z 22.12.2005).

Mgr Weronika Korpysa-Dzirba, Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowy Instytut Weterynaryjny, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: weronika.korpysa@piwet.pulawy.pl