



## PRODUKCIA ENTEROTOXÍNŮV DRUHMI RODU *STAPHYLOCOCCUS SP.* IZOLOVANÝCH Z OVČIEHO MLIEKA

### Enterotoxin production in *Staphylococcus sp.* isolated from sheep milk

M. VASIL, M. FOTTA, J. ELEČKO

University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

---

#### ABSTRACT

Aim of this work was the determination of enterotoxin producing strains, their frequency and comparison of enterotoxin production ability to the production of nucleases in *Staphylococcus sp.* isolated from sheep milk. 1275 samples of sheep milk originating from two farms were examined for positivity to staphylococcus during the period from May to October 2005. From sheep's milk a total of 125 strains of *Staphylococcus sp.* were isolated of which 117 strains were found to be capable of producing staphylococcal enterotoxins. Out of the 117 strains of *Staphylococcus sp.* isolated from sheep's milk 23 produced staphylococcal enterotoxins. Staphylococcal enterotoxin type C (SEC) occurred most frequently (14 cases, i.e., 60.9 %) where as 2 cases were identified for SEA, SED and SEE each. Production of DNA-se and TNA-se in all coagulase-positive strains of *Staphylococcus sp.*, i. e. in *Staphylococcus aureus* was confirmed. Coagulase-negative strains of *Staphylococcus sp.* did not produce TNA and DNA, although they produced the enterotoxins. It refers to the fact that production of enzymes proves the presence of *Staphylococcus aureus* in examined samples, but does not confirm the presence of *Staphylococcus* enterotoxins as was expected.

**Key words:** raw sheep milk, plasmocoagulase-negative and plasmocoagulase-positive, staphylococci, *Staphylococcus aureus*, staphylococcal enterotoxins

---

#### ÚVOD

Z mnohých metabolitov produkovaných stafylokoki najväčšie riziko pre zdravie konzumentov predstavujú enterotoxíny (SE), ktoré po požití môžu vyvolať otravu potravinami - stafylokokovú enterotoxikózu.

Počas mnohých rokov produkcia enterotoxínov bola spájaná hlavne s kmeňmi druhu *Staphylococcus aureus* (Bergdoll, 1989). Viacerí autori uvádzajú, že aj ostatné druhy koagulázo-pozitívnych stafylokokov (ako napr. *S. intermedius*, *S. hyicus*) môžu tvoriť enterotoxíny (Adesiyun a i., 1984; Becker a i., 2001). Ba aj niektoré koagulázo-negatívne stafylokoky sú enterotoxigénne (Bautista et al., 1988; Vernozy-Rozand, 1996).

Podľa Bennetta (1996) produkcia enterotoxínov súvisí skôr s koagulázo-pozitívnymi než s koagulázo-negatívnymi stafylokoki.

Stafylokokové enterotoxíny patria k bunkovým exoproduktom, ktoré sa vyskytujú pri niektorých druhoch rodu *Staphylococcus*, predovšetkým pri niektorých kmeňoch druhu *Staphylococcus aureus*. Ide o bielkoviny s molekulovou hmotnosťou v rozmedzí 26,9 - 29,6 kDa (Su a Wong, 1997). Významnou vlastnosťou stafylokokových enterotoxínov je ich značná odolnosť voči rôznym fyzikálnym a chemickým účinkom (Funk a i., 1973; Jamlang a i., 1971; Silverman a i., 1969), čo znamená, že ich biologická aktivita ostáva zachovaná aj po tepelnom spracovaní potravy.

---

**Correspondence:** E-mail: vasil@uvm.sk

Cieľom predloženej práce bolo pri druhoch rodu *Staphylococcus* izolovaných z ovčieho mlieka určiť kmene produkujúce stafylokokové enterotoxíny, frekvenciu týchto kmeňov a zároveň túto ich vlastnosť porovnať s produkciou nukleáz.

## MATERIÁL A METÓDY

### Izolácia baktérií

V priebehu jednej sezóny, t. j. od mája do októbra 2005 sme na prítomnosť stafylokokov vyšetrili celkom 1275 vzoriek ovčieho mlieka, pochádzajúcich z dvoch chovov.

Bakteriologické vyšetrenie sme vykonali podľa platných metodík Medzinárodnej mliekárskej federácie (IDF, 1981). Izoláciu sme vykonali na krvnom agare Columbia (Biomark, Ahmedabad, India) s 5 %-ným prídavkom defibrinovanej baranej krvi.

### Identifikácia druhov rodu *Staphylococcus*

Na identifikáciu sme použili selektívne médiá *Staphylococcus medium* No. 110 (Oxoid, Hampshire, Anglicko) a Baird-Parkerov agar (Biomark, Ahmedabad, India). Koagulázový test sme vykonali testom Staphylo PK (Imuna, Šarišské Michaľany). Identifikáciu jednotlivých stafylokokových druhov sme urobili pomocou komerčného setu Staphy test 16 (Pliva – Lachema a.s., Brno, ČR). Doplnená bola o dodatkové testy, ktoré zahŕňali predovšetkým tvorbu kyseliny za aeróbnych podmienok z arabinózy, cellobiózy, fruktózy, glycerínu, laktózy, memelbiózy, melezitózy, N-acetylglukosamínu, rafinózy, ribózy a sorbitolu. Výsledky sme vyhodnotili pomocou identifikačného programu TNW

6 Pro. Testy sme doplnili o tvorbu kyseliny z manitolu za anaeróbných podmienok.

### Vyšetrenie na produkciu enterotoxínov

Suspektné solitárne kolónie sme naočkovali do 5 ml BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid, Hampshire, Anglicko) s keramickými izolátormi a inkubovali 18 - 24 hodín pri 37°C za neustáleho pretrepávania. Kultivačnú tekutinu sme vyčírili oddelením buniek pomnožovaného kmeňa 60 minútov centrifugáciou pri 3000 x G. Supernatant analyzovaný na prítomnosť stafylokokového enterotoxínu (SE) komerčnou súpravou Ridascreen® set A, B, C, D, E (R-Biopharm, Darmstadt, Nemecko) s citlivosťou 02 – 07 ng.ml<sup>-1</sup>.

### Test na DNAzu a TNAzu

Test na dezoxyribonukleázu (DNA-za) a termo-stabilnú dezoxyribonukleázu (TNA-za) bol spravený na DNA-zovom agare (Oxoid, Hampshire, Anglicko) podľa návodu výrobcu. Pri teste na TNA-zu sme odvážili dané množstvo DNA-zového agaru, rozpustili v Tris-HCl pufrí s pH 9,0 a po rozvarení sme pridali roztok Toluidínovej modrej do výslednej koncentrácie 0,1 g na 1000 ml. Po ochladení agarového roztoku asi na 50°C, sme ho vylievali po 5 ml do Petriho misiek s priemerom 5 cm.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z ovčieho mlieka sme izolovali a vyšetrili 125 stafylokokových kmeňov. Z nich bolo 83 koagulázo-pozitívnych a 42 koagulázo-negatívnych. Všetky kmene sme podrobili druhovej identifikácii (Tab. 1).

**Tabuľka 1: Druhové zastúpenie baktérií *Staphylococcus sp.* izolovaných z ovčieho mlieka**  
**Table 1: Representation of *Staphylococcus sp.* bacterias isolated from sheep milk**

¹Druh	<i>Staphylococcus</i>			
	pozit.		negat.	
	n	%	n	%
<i>S. aureus</i> *	83	66,4	-	-
<i>S. epidermidis</i> *	-	-	10	8,00
<i>S. caprae</i> *	-	-	9	7,20
<i>S. warneri</i> *	-	-	7	5,60
<i>S. simulans</i> *	-	-	5	4,00
<i>S. chromogenes</i>	-	-	3	2,40
<i>S. gallinarum</i>	-	-	3	2,40
<i>S. hominis</i>	-	-	2	1,60
<i>S. piscifermentas</i>	-	-	2	1,60
<i>S. schleiferi</i>	-	-	1	0,80
²Celkom	83	66,40	42	33,60

pozit. – koagulázo-pozitívny druh – coagulase-positive species; negat. – koagulázo-negatívny druh – coagulase-negative species  
n – počet vyšetovaných kmeňov – number of examined strains

\* - stafylokoky produkujúce enterotoxíny (viď tab. 2) - enterotoxins producing staphylococci (see tab. 2); ¹Species, ²Total

Získané výsledky sú takmer zhodné s Kirkanom a kol. (2005), ktorí rovnako identifikovali kmene *Staphylococcus aureus* a koagulázo–negatívnych stafylokokov na základe morfológických vlastností kolónií, farbenia preparátov podľa Grama a biochemických testov determinujúcich produkciu katalázy, hemolyzínov na krvnom agare, koagulázy, redukciu nitrátov, prítomnosťou DN-ázy, zhlukovacieho (tzv. clumping) faktoru, tvorbu arginínu dihydrolázy, ureázy a testu na rezistenciu voči novobiocínu. Z dodatkových fermentačných testov použili výsledky tvorby kyseliny zo sacharózy, maltózy, D-mannitolu, D-trehalózy, a rafinózy. Celkom vyšetrili 300 vzoriek mlieka a v 145 (48,33%) zistili stafylokoky, z čoho *Staphylococcus aureus* bol prítomný v 85 (28,33%) a koagulázo–negatívne stafylokoky boli izolované v 60 (20,00%) vzorkách. V skupine koagulázo–negatívnych stafylokokov bolo identifikovaných 20 kmeňov (33,33%) ako *S. hyicus*, 16 (26,66%) *S. chromogenes*, 9 (15,00%) *S. epidermidis*, 5 (8,33%) *S. haemolyticus*, 4 (6,66%) *S. sciuri*, 3 (5,00%) *S. lentis* a 3 kmene (5,00%) *S. cohnii subsp. cohnii*.

Vyšetrovanie na produkciu stafylokokových enterotoxínov sme realizovali súpravou Ridascreen® Set A,B,C,D,E (R-Biopharm AG, Darmstadt, Nemecko). Celkovo sme vyšetrili 117 stafylokokových kmeňov. Z nich 23 (t. j. 19,66 %) produkovalo rôzne enterotoxíny, a to samostatne enterotoxíny, alebo v kombinácii viacerých (dvoch) typov enterotoxínov (Tab. 2).

Najčastejšie sme produkciu enterotoxínov zaznamenali pri koagulázo–pozitívnych stafylokokoch, menovite pri *S. aureus*. Z koagulázo–negatívnych stafylokokov sa na produkcii enterotoxínov podieľali *S. simulans*, *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. warneri*.

Z biochemických vlastností stafylokokov sme sledovali ich schopnosť tvorby deoxyribonukleázy a termostabilnej deoxyribonukleázy. Oba enzýmy sa

vyšetrovali u koagulázo–pozitívnych a enterotoxínov tvoriacich stafylokokov (menovite u *Staphylococcus aureus*). Naopak, pri koagulázo–negatívnych stafylokokoch, napriek produkcii stafylokokových enterotoxínov sme ani v jednom prípade nezaznamenali tvorbu DNA-zy alebo TNA-zy. Potvrzuje to skutočnosť, že pozitívny nález týchto enzýmov síce dokazuje prítomnosť *Staphylococcus aureus* vo vyšetrovanej vzorke, ale nedokazuje prítomnosť stafylokokových enterotoxínov ako sa pôvodne predpokladalo.

Da Silva a i. (2000) študoval biochemické vlastnosti 274 kmeňov *Staphylococcus aureus*, ktoré izoloval z mlieka, rúk dojičov a dojacích strojov. Pri štúdiu postupoval tak, že najprv sledované kmene kultivoval na Baird-Parker agare, testoval ich na tvorbu katalázy, koagulázy a termonukleázy a až potom na bližšiu špecifikáciu použil referenčný identifikačný test API-Staph (Bio Mérieux, Lyon, Francúzsko). Atypický morfológický obraz na Baird-Parker agare vykazovalo 39,4 % kmeňov. Frekvencia výskytu atypických kolónií bola vyššia medzi kmeňmi, ktoré boli izolované z mlieka (40,6 %) ako u kmeňov zachytených zo sterov odobratých z rúk dojičov, alebo dojacieho stroja (26,1 %). Všetky kmene boli koaguláza–pozitívne, ale intenzita testu kolísala podľa zdroja vzoriek: kmene zachytené z prostredia vykazovali koagulázový test na 3+ až 4+, zatiaľ čo 17,1 % kmeňov izolovaných z mlieka dávali výsledok na 1+, alebo 2+. Negatívny TN-ázový test vykazovalo 2,2 % kmeňov *Staphylococcus aureus*.

Schopnosť produkcie termostabilnej DNA-zy koagulázo–pozitívnymi stafylokokmi viedla k vývoju niekoľkých metód pre vyšetrovanie potravinárskych výrobkov na prítomnosť tohto enzýmu. Tvrdilo sa, že jej preukázanie v potravine naznačuje pomnoženie *Staphylococcus aureus* vo výrobku a tým indikuje aj možnú prítomnosť enterotoxínov (Koupal a Deibel, 1978; Stadhouders a i.,

**Tabuľka 2: Produkcia stafylokokových enterotoxínov jednotlivými druhmi stafylokokov**  
**Table 2: Production of staphylococcus enterotoxins by individual staphylococcus species**

<sup>1</sup> Druh stafylokoka	<sup>2</sup> Produkovany typ SE – počet							<sup>3</sup> Celkom
	A	B	C	D	E	A+D	C+E	
<i>S. aureus</i>	1	0	12	0	0	1	1	15
<i>S. caprae</i>	0	0	2	0	1	0	0	2
<i>S. epidermidis</i>	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. simulans</i>	0	0	0	1	1	1	0	3
<i>S. warneri</i>	1	0	0	1	0	0	0	2
Celkom <sup>(3)</sup> / % <sup>a</sup>	2	0	14	2	2	2	1	23
% <sup>a</sup>	8,7	0,0	60,9	8,7	8,7	8,7	4,3	100

%<sup>a</sup> – % z celkového počtu enterotoxíny tvoriacich stafylokokov; %<sup>a</sup> - enterotoxins producing staphylococci from total number (%)

<sup>1</sup>Staphylococcus species, <sup>2</sup>production type SE (staphylococcal enterotoxin) – number, <sup>3</sup>total

1980; Van Schouwenburg a i., 1978). Neskôr sa zistilo, že toto tvrdenie s najväčšou pravdepodobnosťou neplatí v prípade koagulázo–negatívnych stafylokokov (Su a Wong, 1997) a potvrdzujú to aj naše výsledky.

## ZÁVER

Z prezentovaných výsledkov vyplýva:

1. Bakteriologickým vyšetrením bolo v súbore 1275 vzoriek ovčieho mlieka diagnostikovaných 125 kmeňov *Staphylococcus sp.* (9,8%), z ktorých sa častejšie vyskytovali koagulázo–pozitívne stafylokoky, t. j. *Staphylococcus aureus* (83 kmeňov) ako koagulázo–negatívne stafylokoky (42 kmeňov).
2. Zo 42 koagulázo–negatívnych stafylokokov takmer 3/4 (74,55%) tvorili *S. epidermidis* (10/42), *S. caprae* (9/42), *S. warneri* (7/42) a *S. simulans* (5/42), t. j. druhy s výskytom kmeňov produkujúcich enterotoxíny.
3. Enterotoxíny produkovali obe skupiny stafylokokov. Najfrekvencovanejší bol výskyt produkcie stafylokokového enterotoxínu typu C (14 kmeňov). Produkcia enterotoxínu typu B nebola vôbec zachytená. Súčasne viac typov stafylokokových enterotoxínov produkovali 3 druhy stafylokokov a to následovne: A+D (2 kmene) a C+E (1 kmeň).
4. Na produkcii enterotoxínov sa najčastejšie podieľali kmene *Staphylococcus aureus* (15), potom *Staphylococcus simulans* (3), *Staphylococcus caprae* (2), *Staphylococcus warneri* (2), *Staphylococcus epidermidis* (1).
5. Výsledky sledovania produkcie DNA-zy a TNA-zy dokumentujú, že touto schopnosťou sa vyznačujú koagulázo–pozitívne stafylokoky. Produkcia DNAazy a TNA-zy nebola u druhov koagulázo–negatívnych stafylokokov pozorovaná.

Táto práca bola podporovaná projektom APVT „Mikrobiálne a hygienické aspekty etiológie, diagnostiky, prevencie a tlmenia environmetálnych mastitíd prežúvavcov a zdravotná neškodnosť produkovaného mlieka“ č. APVT-20-025604, projektom VEGA „Štúdium vzájomných vzťahov medzi produkciou stafylokokových enterotoxínov a charakteristických znakov patogenity u stafylokokov izolovaných z mlieka prežúvavcov“ č. 1/ 1371/04 a štátnym programom výskumu a vývoja „Potraviny – kvalita a bezpečnosť“ číslo 2003SP270280E010280E01.

## LITERATÚRA

- ADESIYUM, A. A. - TATINI, S. R. - HOOVER, D. G. 1984. Production of enterotoxins by *Staphylococcus hyicus*. In: *Veter. Microbiol.*, vol. 9, 1984, p. 487-495.
- BECKER, K. - KELLER, B. - VON EIFF, C. - BRÜCK, M. - LUBRITZ, G. - ETIENNE, J. - PETERS, G. 2001. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. In: *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, 2001, p. 5551-5557.
- BERGDOLL, M. S. 1989. *Staphylococcus aureus*, In: DOYLE, M. P. (ed.), Foodborne bacterial pathogens. New York : Marcel Decker Inc., 1989, p. 463-523, 816 p
- BAUTISTA, L. - GAYA, P. - MEDINA, M. - NUNEZ, M. 1988. A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. In: *Appl. Environ. Microbiol.*, vol 54, 1988, p. 566-569.
- BENNETT, R. W. 1996. Atypical toxigenic *Staphylococcus* and non-*Staphylococcus aureus* species on the horizon? (an update). In: *J. Food Protect.*, vol. 59, 1996, p.1123-1126.
- DA SILVA, P. W. – DESTRO, M. T. – LANDGRAF, M. –FRANCO, B.D.G.M. 2000. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and enviromental samples of Brazilian dairy farms. In: *Brasil. J. Microbiol.*, vol. 31, 2000, p. 103-106.
- FUNK, D. K. – STEINBERG, D. H. - MILLET, R. D. – KURANTNIK, K. J. - MUPHY, T. F. 1973. Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxins B and C1. In: *Appl. Microbiol.*, vol. 26, 1973, p. 938-942.
- IDF 1981. Laboratory methods for use in mastitis work. International Dairy Federation Bulletin. Brussels. IDF Document no. 132, 1981, 27 p.
- JAMLANG, E. M. - BARTLETT, M. L. - SNYDER, H. E. 1971. Effect of pH, Protein concentration and Ionic Strenght on Heat Inactivation of Staphylococcal Enterotoxin B. In: *Appl. Microbiol.*, vol. 22, 1971, p. 1034-1040.
- KIRKAN, S. – GÖKSOY, E. O. – KAYA, O. 2005. Identification and Antimicrobial succceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase–negative staphylococci from bovine mastitis in the Aydin region of Turkey. In: *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, vol. 29, 2005, p. 791-795.
- KOUPAL, A. – Deibel, R. H. 1978. Rapid qualitative method for detecting staphylococcal nuclease in foods. In: *Appl Environ Microbiol.*, vol. 35 , 1978, no.6, p. 1193–1197.
- STADHOUDERS, J. - HASSING, F. - GALESLOOT, T.E. 1980. A rapid and simple method for the detection of *Staphylococcus aureus* thermonuclease in cheese. In: *Netherl. Milk Dairy J.*, vol. 34, 1980, p. 199-204.
- SILVERMAN, S. J. - ESPESETH, D. A. - SCHANTZ, E. J. 1969. Effect of formaldehyde on the immunological and biological activity of staphylococcal enterotoxin B. In: *J. Bacteriol.*, vol. 89, 1969, p. 437-442.

- SU, Y.Ch. - WONG, A.C.L. 1997. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. In: *J. of Food Protec.*, vol. 60, 1997, no. 2, p. 195-202.
- VAN SCHOUWENBURG - VAN FOEKEN, A. W. J. - STADHOUDERS, J. - JANS, J.A. 1978. The thermonuclease test for assessment of the growth of coagulase positive staphylococci in Gouda cheese with a normal acidity development. In: *Netherl. Milk Dairy J.*, vol. 32, 1978, p. 217-231.
- VERNOZY-ROZAND, C. - MAZURY, C. - PREVOST, G. - LAPEYRE, C. - BES, M. - BRUN, Y. - FLEURETTE, J. 1996. Enterotoxin production by coagulase- negative staphylococci isolated from goat's milk a cheese. In: *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 30, 1996, p. 271-280.

**Adresa autorov:** doc. MVDr. Milan Vasiľ, CSc., MVDr. Marian Fotta, MVDr. Juraj Elečko. CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Ústav chovu zvierat, Laboratórium produkcie a hygieny mliečnej žľazy, Komenského 73, 041 81 Košice.