

Streszczenie

Szczepy gronkowców koagulazo-dodatnich posiadające zdolność do wytwarzania enterotoksyn (Staphylococcal Enterotoxins, SE) są częstą przyczyną zatruc pokarmowych u ludzi. Według ostatniego raportu Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) dotyczącego występowania chorób odzwierzęcych (zoonoz) u ludzi oraz ich czynników etiologicznych, w krajach Unii Europejskiej epidemie wywołane przez toksyny bakteryjne w 2014 r. znajdowały się na trzecim miejscu. Wśród nich, za największą liczbę masowych zatruc pokarmowych odpowiedzialne były enterotoksyny gronkowcowe. Częstym źródłem tego typu intoksykacji jest mleko lub produkty mleczne. Potwierdzono istnienie ponad 20 rodzajów SE, jednak charakterystyczne dla gronkowcowego zatrucia pokarmowego (Staphylococcal Food Poisoning, SFP) objawy najczęściej powodowane są przez enterotoksyny określane jako „klasyczne”: SEA, SEB, SEC, SED oraz SEE. Ze względu na krótki czas trwania choroby oraz często niewłaściwą diagnozę, wiele przypadków SFP nie jest rozpoznawana i ewidencjonowana.

W przedstawionej pracy opracowano testy mPCR umożliwiające identyfikację *S. aureus* posiadających geny klasycznych enterotoksyn gronkowcowych, a następnie określono zdolność wytwarzania tych czynników przez gronkowce wyosobnione z surowego mleka krowiego pochodzącego z województw lubelskiego i podlaskiego. Zbadano 1081 próbek surowego mleka krowiego, z których wyosobniono 396 szczepów gronkowców koagulazo-dodatnich, w tym 51 posiadających co najmniej jeden gen klasycznych enterotoksyn. Najczęściej identyfikowano marker *sec* (43,1%), a w dalszej kolejności *sea* (23,5%), *sed* (19,6%) oraz *seb* (5,9%), nie stwierdzono natomiast obecności genu *see*. Więcej niż jeden gen enterotoksyn wykazano w przypadku czterech szczepów, z których dwa posiadały *sea* w połączeniu z *sec*, po jednym *sea* i *seb* oraz *sea* i *sed*. Jedynie trzy (5,9%) spośród badanych *S. aureus* nie wytwarzały enterotoksyn w warunkach *in vitro*. W izolatach enterotoksycznych określono obecność wybranych markerów wirulencji. Geny *tst* i *pvl* wystąpiły odpowiednio u 3,9% i 2,0% szczepów, natomiast żaden z badanych izolatów nie posiadał czynników *eta* i *etb*. Gronkowce mogące potencjalnie wytwarzać enterotoksyny zostały zbadane pod kątem oporności na metycylinę, a warunkujący tę cechę gen *mecA* stwierdzono w przypadku czterech izolatów.

W obecnej pracy przeprowadzono również analizę genotypową enterotoksycznych izolatów *S. aureus*. Stosując metodę PFGE otrzymano 16 grup klonalnych co wskazuje na wysoki stopień zróżnicowania badanych gronkowców. W wyniku drugiej z zastosowanych metod genotypowania (PCR-RFLP) uzyskano profile molekularne zawierające od dwóch do czterech fragmentów DNA, a znaczący odsetek (21,6%) stanowiły izolaty o wzorach restrykcyjnych charakterystycznych dla pojedynczych szczepów, co świadczy o stosunkowo niskiej zdolności różnicującej tej metody. Analiza MLST enterotoksycznych *S. aureus* wykazała występowanie 15 typów sekwencyjnych, wśród których najliczniejsze były ST 45 oraz ST 1 (obejmujące odpowiednio 17 i 9 izolatów). W przypadku jednego szczepu zidentyfikowano nowy allel genu *glpF*, któremu został przypisany numer ST 3051.

Wyniki niniejszej pracy wskazują, że surowe mleko krowie może być znaczącym rezerwuarem gronkowców koagulazo-dodatnich, w szczególności *S. aureus*, które posiadają geny klasycznych enterotoksyn gronkowcowych a niekiedy również innych czynników wirulencji i oporności na metycylinę. Obecność takich szczepów może stanowić potencjalne zagrożenie dla bezpieczeństwa konsumentów.

Abstract

Coagulase-positive staphylococci with the ability to produce enterotoxins are the common cause of human food intoxications. According to the last EFSA (European Food Safety Authority) report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in the European Union in 2014, bacterial toxins were on the third place as a causative agents of massive food poisonings. Among them, staphylococcal enterotoxins were most often involved. Milk and milk products are frequently implicated in such intoxications. To date, over 20 types of SE have been recognized; however, the symptoms of staphylococcal food poisoning are usually caused by classical toxin types: SEA, SEB, SEC, SED and SEE. Taking into account a short duration of illness and often inadequate diagnosis, many SFP cases are not identified and registered.

In the present study multiplex PCR tests for identification of *S. aureus* with classical SE genes have been developed and applied to detect enterotoxin markers in staphylococci recovered from raw cow milk in lubelskie and podlaskie voivodeships. A total of 1081 of raw cow milk samples were collected and in 396 of them CPS strains were recovered. Among them, 51 CPS possessed at least one gene encoding classical staphylococcal enterotoxins. The *sec* marker was the most commonly identified (43.1%), followed by the *sea* (23.5%), *sed* (19.6%) and *seb* (5.9%) genes. None of the isolates harboured the *see* gene. More than one SE markers were found in four strains; two of them had the *sea* in combination with *sec* and single isolates had *sea* with *seb* and *sea* with *sed* genes. Only three (5.9%) of the tested *S. aureus* were not able to synthesize enterotoxins *in vitro*. The presence of other selected virulence markers including *tst*, *pvl*, *eta* and *etb* was also verified. The *tst* and *pvl* genes were found in 3.9% and 2.0% of the strains, respectively, while none of the isolates tested possessed the *eta* and *etb* markers. The resistance to methicillin among the enterotoxigenic strains of *S. aureus* was tested and the *mecA* marker responsible for this feature was found in four isolates.

Furthermore, a genotypic analysis of enterotoxigenic *S. aureus* was performed. Using the PFGE method, 16 clonal groups were distinguished which indicates the high degree of diversity among the tested staphylococci. As a result of the second genotypic method used (PCR-RFLP), molecular profiles with two to four fragments of DNA were obtained. A high percentage (21.6%) of the isolates had the unique individual profiles which demonstrates a relatively low discrimination power of this method. The MLST analysis of enterotoxigenic *S. aureus* revealed the presence of 15 sequence types with the most common ST 45 and ST 1

(covering 17 and 9 isolates, respectively). In case of one strain a new allele of *glpF* gene was found and ST 3051 was assigned to this isolate.

The results of this study indicate that raw cow milk may be a significant source of coagulase-positive staphylococci, especially of *S. aureus*, which have classical enterotoxin genes and occasionally also other virulence and methicillin-resistance markers. The presence of such strains may pose a potential threat for the consumers' safety.