

# Enterotoksyny gronkowcowe. Część II. Europejska metoda skringowa i jej modyfikacje – przyczyny i efekty

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

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

Jedną z najczęstszych przyczyn zatruc pokarmowych na świecie są ciepłooporne enterotoksyny (SE) wytwarzane przez enterotoksyczne szczepy koagulazo-dodatnich gronkowców. Epidemiologię tego schorzenia podano w pierwszej części pracy. Wykrycie enterotoksyn jest potwierdzeniem, że produkt spożywczy był przyczyną gronkowcowego zatrucia pokarmowego (staphylococcal food poisoning – SFPO). Istnieją 3 rodzaje metod używanych do wykrywania enterotoksyn gronkowcowych – próby biologiczne, testy oparte na biologii molekularnej i metody serologiczne. Referencyjna metoda wykrywania tych białek została opracowana przez ówczesne Unijne Laboratorium Referencyjne ds. Mleka i Produktów Mlecznych zlokalizowane w Maisons-Alfort pod Paryżem (Community Reference Laboratory for Milk and Milk products – CRL MMP) w 2000 r. Procedura ta przeszła dotąd szereg modyfikacji, jednakże główne etapy wykonania badania pozostały niezmienione. Są to:

- 1) ekstrakcja/zagęszczanie próbki,
- 2) detekcja metodą immunoenzymatyczną.

W pierwszej wersji metody do detekcji zalecano wykorzystanie metody ELISA – Transia Plate. Test ten został określony jako najbardziej odpowiedni do wykrywania enterotoksyn gronkowcowych spośród wszystkich dostępnych na rynku. Opinia ta poprzedzona została przeprowadzeniem badań międzylaboratoryjnych, których celem była walidacja testu Transia Plate oraz określenie granic wykrywalności SE dla produktów najczęściej związanych z SFPO. W badaniach wzięło udział 13 laboratoriów, które poddały analizie 4 rodzaje produktów: ser, rawioli, pieczarki i majonez. Próbkę mleczną zostały sztucznie zanieczyszczone enterotoksyną A na poziomie 0, 0,5, 2 lub 5 ng/g, natomiast pozostałe produkty zostały sfortyfikowane tym samym rodzajem enterotoksyny, w ilości 0, 0,2, 0,8 lub 2 ng/g. Ponadto laboratoria otrzymały do zbadania hodowle enterotoksycznych szczepów *S. aureus*, jak również hodowlę szczepu *S. aureus* niewytwarzającego enterotoksyn, ale produkującego duże ilości białka A oraz samą pożywkę. Każde

laboratorium miało również samodzielnie sfortyfikować próbkę mleka i gotowanego mięsa za pomocą żelatynowych kapsułek zawierających mleko w proszku sztucznie zanieczyszczone enterotoksyną A. Granica wykrywalności dla próbek żywności określona na podstawie średnich wyników uzyskanych przez uczestników została wyznaczona na poziomie 0,5–1,5 ng/g. Opierając się na rezultatach tych porównań międzylaboratoryjnych, Francuska Agencja Normalizacyjna (French Normalization Agency – AFNOR) zatwierdziła test Transia Plate do wykrywania enterotoksyn gronkowcowych w próbkach żywności (1).

W 2003 r. CRL MMP przeprowadziło pierwsze międzylaboratoryjne badania dla krajów członkowskich Unii Europejskiej, mające na celu ocenę możliwości Krajowych Laboratoriów Referencyjnych (National Reference Laboratories – NRL) wykrywania enterotoksyn gronkowcowych w produktach mlecznych. Badania te wykonano z próbkami liofilizowanego sera sfortyfikowanego enterotoksyną gronkowcową na dwóch poziomach zanieczyszczenia: 0,1 i 0,25 ng/g. Wszystkie laboratoria nadały wyniki satysfakcjonujące i tym samym udowodniły, że są w stanie wykrywać enterotoksyny gronkowcowe w produktach mlecznych (2).

W tym samym roku CRL MMP przeprowadziło również walidacyjne badania międzylaboratoryjne, mające na celu wstępną ocenę przydatności testu Vidas SET 2 do wykrywania enterotoksyn gronkowcowych w produktach mlecznych. W badaniach tych uczestniczyło 9 NRL oraz 7 francuskich laboratoriów weterynaryjnych. Część z nich otrzymała do zbadania próbki sera wyprodukowanego z mleka krowiego, które następnie laboratoria miały samodzielnie sfortyfikować peletkami zawierającymi enterotoksynę C na poziomach 0–0,25 oraz 0,5 ng/g, natomiast pozostali uczestnicy otrzymali próbki sera wyprodukowanego z mleka koziego, do samodzielnej sfortyfikacji peletkami zawierającymi enterotoksynę A na poziomach 0–1 i 2 ng/g. Badania zostały wykonane równoległe dwiema metodami detekcji:

## Staphylococcal enterotoxins. Part II. European Screening Method and its modification – causes and effects

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

Staphylococcal food poisoning is one of the most common foodborne disease resulted from ingestion of staphylococcal enterotoxins (SEs) produced in food by enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus*. As a common contaminant of milk and milk products, SEs are often involved in human outbreaks and should be monitored regularly. In 2000, Community Reference Laboratory (CRL) developed and transferred to National Reference Laboratories (NRLs) a reference method for detection of SEs. Since that time, the procedure known as European Screening Method (ESM) has been modified several times. Those modifications were validated by proficiency tests or interlaboratory comparisons. At this moment version V of ESM dated on September 2010 is a current procedure for detection of SEs in all types of food.

**Keywords:** staphylococcal enterotoxins, validation, European Screening Method.

Transia Plate SE oraz Vidas SET 2. Analiza uzyskanych wyników wykazała, że test Vidas SET 2 ma taką samą czułość oraz lepszą specyficzność niż test Transia Plate SE. Organizator stwierdził jednak brak stabilności próbek wykorzystanych do przeprowadzenia badań, w związku z czym ustalono, że test Vidas SET 2 nie zostanie na tym etapie wprowadzony do europejskiej metody skringowej (European Screening Method – ESM) jako alternatywa dla testu Transia Plate SE i konieczne będzie przeprowadzenie badań międzylaboratoryjnych w celu pełnej walidacji testu Vidas SET 2 (3). Zanim to nastąpiło, CRL MMP przeprowadziło wewnątrzlaboratoryjną walidację, mającą na celu ocenę przydatności obu testów do detekcji enterotoksyn gronkowcowych w naturalnie zanieczyszczonych produktach mlecznych.

Podczas tych badań analizie poddano 62 próbki mleka i produktów mlecznych, kiedy etap detekcji przeprowadzano, używając obu ocenianych testów, bez wcześniejszej obróbki ekstraktów oraz po potraktowaniu ekstraktów przed detekcją króliczymi przeciwciałami IgG, przyjmując technikę ELISA jako metodę odniesienia. W pierwszym przypadku względna dokładność wyniosła 84 ± 9%, względna czułość 67 ± 17%, a względna specyficzność 100%, natomiast po potraktowaniu ekstraktów przeciwciałami IgG, parametry te wyniosły odpowiednio 97 ± 3%, 91 ± 11% oraz 100%. Etap użycia króliczych przeciwciał IgG miał na celu eliminację występowania

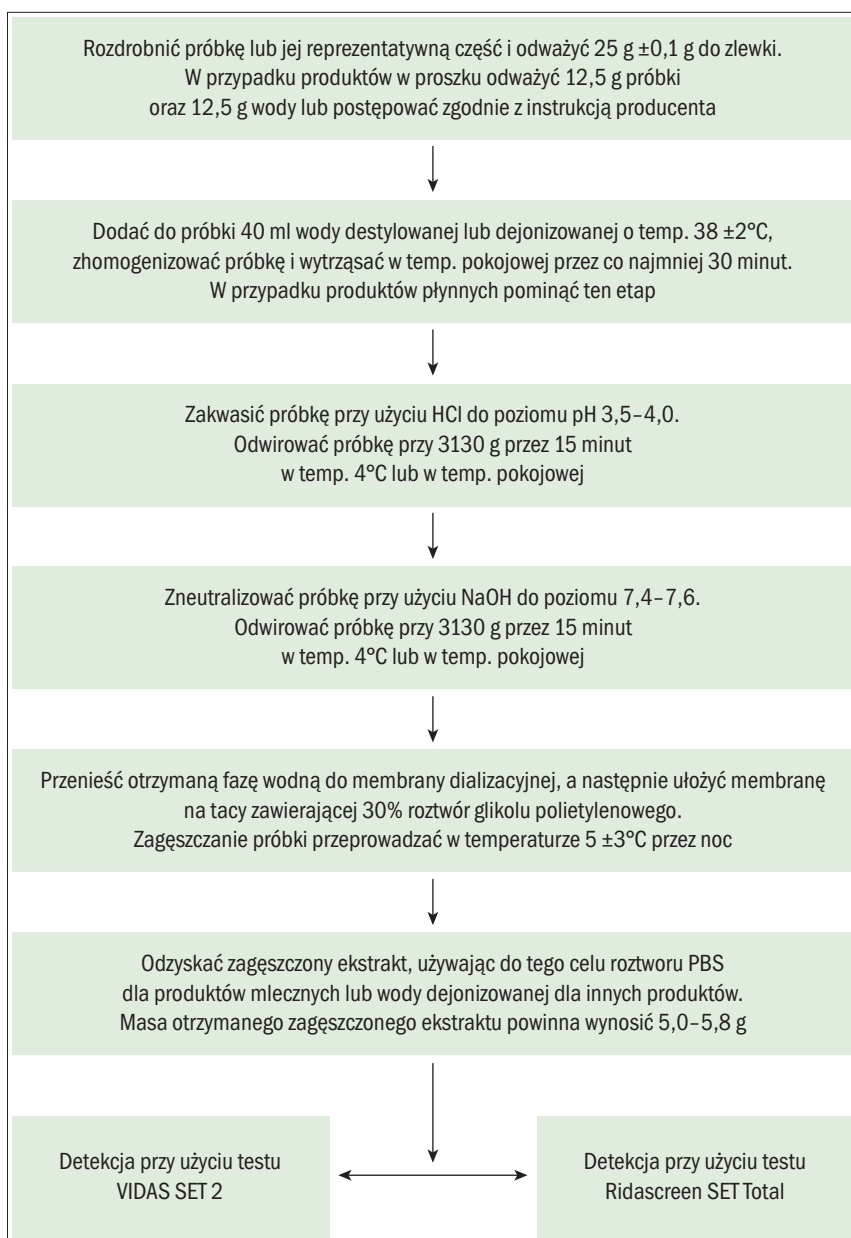
wyników fałszywie dodatnich, których obecność związana jest z białkiem A, występującym u większości szczepów *S. aureus*. Białko to ma powinowactwo do fragmentu Fc cząsteczek IgG niektórych gatunków zwierząt, np. myszy, królików. W testach immunoenzymatycznych stosuje się najczęściej mysie przeciwciała skierowane przeciwko konkretnym antygenom. Obecność białka A stwarza niebezpieczeństwo powstawania wyników fałszywie dodatnich poprzez wiązanie się do mysich przeciwciał opłaszczających dołki na mikropłytkce. Z tego też względu wyeliminowanie tego rodzaju reakcji jest niezwykle istotne. Stwierdzono, że traktowanie ekstraktów króliczymi przeciwciałami IgG istotnie zmniejsza częstość występowania wyników fałszywie-dodatnich (z 42 do 8%). Problem występowania takich reakcji związany z interakcją przeciwciał z białkiem A nie występuje w przypadku

stosowania testu Vidas SET 2, ponieważ są w nim używane inne rodzaje przeciwciał. Porównując obie metody detekcji, stwierdzono, że względne granice wykrywalności enterotoksyn A, D i E są podobne, jednakże test Vidas SET 2 jest w stanie wykryć enterotoksynę B na niższym poziomie niż test Transia Plate SE, odwrotnie niż w przypadku enterotoksyny C. Analizując otrzymane wyniki, stwierdzono, że zarówno test Transia Plate SE zastosowany łącznie z króliczymi przeciwciałami IgG, jak i test Vidas SET 2 mogą być stosowane do wykrywania enterotoksyn gronkowcowych w mleku i produktach mlecznych (4). W 2005 r. Francuska Agencja Bezpieczeństwa Żywności (AFSSA) opublikowała raport z porównania testów Vidas SET2 i Transia Plate SE do wykrywania enterotoksyn gronkowcowych w naturalnie zanieczyszczonych produktach mlecznych. Konsekwencją przeprowadzonych badań było

opracowanie drugiej wersji ESM, w której przed etapem detekcji dodano etap traktowania zagęszczonego ekstraktu otrzymanego po dializie próbek, króliczymi przeciwciałami IgG (5).

W celu pełnej walidacji testu Vidas SET 2 do wykrywania enterotoksyn gronkowcowych w mleku i produktach mlecznych CRL MMP zorganizowało pod koniec 2005 r. badania międzylaboratoryjne dla krajów członkowskich Unii Europejskiej. W porównaniach tych udział wzięło 21 laboratoriów, które miały za zadanie zbadać 6 liofilizowanych próbek sera oraz 3 zagęszczone ekstrakty. Wskazano, że etap detekcji ma być wykonany przy użyciu testu Vidas SET 2. Uzyskano 100% czułość i specyficzność, a co za tym idzie potwierdzono ostatecznie przydatność testu Vidas SET 2 do wykrywania enterotoksyn gronkowcowych, w związku z czym trzecią wersję ESM uzupełniono o możliwość wykonania detekcji przy użyciu tego testu (6).

W 2007 r. CRL MMP zostało przekształcone w Unijne Laboratorium ds. Gronkowców Koagulazo-Dodatnich, w tym *S. aureus* (EU Community Reference Laboratory for Coagulase Positive Staphylococci, including *Staphylococcus aureus* – CRL CPS). Uzupełniono również ESM o punkt opisujący interferencje, jakie mogą wystąpić w trakcie badania, szczególnie w odniesieniu do produktów mlecznych wytworzonych z surowego mleka. Mleko niepoddane obróbce cieplnej oraz sery wyprodukowane z takiego mleka mogą bowiem zawierać fosfatazę alkaliczną i laktoperoksydazę – enzymy, które mogą indukować fałszywie dodatnie reakcje podczas etapu detekcji. W procedurze zapisano, że jeżeli otrzymano wynik dodatni po wykonaniu detekcji testem Vidas SET 2 i zachodzi podejrzenie, że mogły wystąpić interferencje związane z występowaniem alkalicznej fosfatazy w badanym produkcie, należy podgrzać zagęszczony ekstrakt przez 2 minuty w temperaturze 80°C i powtórzyć detekcję testem Vidas SET 2 lub wykonać detekcję przy użyciu testu Transia Plate SE (bez wcześniejszego podgrzewania ekstraktu). Natomiast w przypadku otrzymania wyniku dodatniego po wykonaniu detekcji testem Transia Plate SE i gdy zachodzi podejrzenie wystąpienia interferencji związanych z obecnością laktoperoksydazy, należy przeprowadzić następującą próbę: umieścić 100 µl zagęszczonego ekstraktu poddanego działaniu króliczych przeciwciał IgG w próbce i dodać 50 µl substratu i 50 µl chromogenu zawartych w zestawie Transia Plate SE. Jeżeli próbka zabarwi się na kolor niebieskozielony, świadczy to o obecności laktoperoksydazy w zagęszczonym ekstrakcie. W takim przypadku należy powtórzyć etap detekcji, używając testu Vidas SET 2 (7).



Ryc. 1. Wykrywanie enterotoksyn gronkowcowych w produktach żywnościowych – etapy postępowania (12)

Kolejna wersja ESM (8) została poszerzona i podzielona na część A, dotyczącą wykrywania enterotoksyn gronkowcowych w mleku i produktach mlecznych, oraz część B, odnoszącą się do wykrywania tych białek w produktach innych niż mleczne. Część A w porównaniu do poprzedniej wersji ESM nie uległa zmianie. W części B opisano sposób wykrywania enterotoksyn gronkowcowych w produktach, takich jak: owoce morza, skorupiaki, małe, produkty mięsne, produkty gotowe do spożycia, warzywa oraz inne gotowe posiłki. Metoda ta składa się z 4 etapów:

- 1) ekstrakcja/zagęszczanie próbek,
- 2) traktowanie zagęszczonego ekstraktu króliczymi przeciwciałami IgG,
- 3) traktowanie zagęszczonego ekstraktu zestawem Transia Additive Raw Meat Extraction (konieczne w przypadku owoców morza oraz surowych bądź gotowanych produktów mięsnych),
- 4) detekcja z użyciem Transia Plate SE.

Wersja z 2008 r., została następnie zmodyfikowana w punkcie dotyczącym uwodnienia membrany do dializy, jak również dodano instruktaż postępowania w przypadku uzyskania wyników dodatnich, które powinny zostać potwierdzone. W tym celu próbki mogą być wysłane do CRL CPS. Należy wtedy uzupełnić i wysłać jeden z załączonych do ESM formularzy – w zależności od rodzaju badanego produktu, a następnie wysłać go razem z próbką, która ma zostać potwierdzona (9).

W związku z powtarzającymi się przypadkami uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych po zastosowaniu testu Transia Plate SE, CRL CPS postawiło sobie za cel walidację innego testu ELISA, który mógłby zastąpić aktualnie wykorzystywany zestaw Transia Plate. Ocenie poddano test Ridascreen SET Total. Wyniki jego wstępnej walidacji okazały się być satysfakcjonujące (względna czułość, specyficzność i dokładność wyniosła 97%), dlatego też w wersji 4 ESM wycofano test Transia Plate SE, a jego miejsce tymczasowo, w oczekiwaniu na pełną walidację, zajął test Ridascreen SET Total. Jednakże możliwość wykorzystania testu Ridascreen SET Total wprowadzono tylko w przypadku badania produktów mlecznych, a więc w części A ESM, natomiast w części B opisującej sposób badania produktów innych niż mleczne nie uwzględniono tej możliwości (10, 11).

Zaplanowane porównania międzylaboratoryjne, mające na celu walidację metody Ridascreen SET Total, odbyły się na początku 2011 r. Każde z laboratoriów miało za zadanie zbadać 24 próbek, stosując wersję 5 ESM oraz obie zawarte tam metody detekcji – Vidas SET 2 i Ridascreen SET Total (ryc. 1; 12). Udział w badaniach zadeklarowało 20 krajowych laboratoriów

**Tabela 1.** Cechy charakterystyczne metody – wykrywanie enterotoksyn gronkowcowych w mleku i produktach mlecznych

	DC + Ridascreen SET Total (%)	DC + Vidas SET 2 (%)	AC (%)
Poziom zerowy	SE = 100	SE = 100	100
Poziom niski	SP = 75	SP = 98	72
Poziom wysoki	SP = 100	SP = 100	100
Wszystkie poziomy	-	-	91

DC – dializa/koncentracja, SP – czułość, SE – specyficzność, AC – dokładność

**Tabela 2.** Cechy charakterystyczne metody – wykrywanie enterotoksyn gronkowcowych w żywności innej niż mleko i produkty mleczne

	DC + Ridascreen SET Total (%)	DC + Vidas SET 2 (%)
Poziom zerowy	SE = 96	SE = 100
Poziom niski	SP = 93	SP = 100
Poziom wysoki	SP = 100	SP = 100

DC – dializa/koncentracja, SP – czułość, SE – specyficzność

referencyjnych, w tym Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego (PIWet – PIB) w Puławach. Część uczestniczących laboratoriów otrzymała próbki sera, a część próbki szynki (12, 13, 14, 15). Do przygotowania próbek wykorzystano naturalnie zanieczyszczony enterotoksyną typu D ser z surowego mleka krowiego. Stężenie enterotoksyny określone własną metodą potwierdzającą wynosiło dla trzech poziomów zanieczyszczenia odpowiednio 0, 0,04 i 0,26 ng/g. Walidację metody przeprowadzono zgodnie z normą EN ISO 16140, określając jej czułość, specyficzność i dokładność. Uzyskane wyniki nie mogą być jednak uznane za satysfakcjonujące, bowiem czułość i dokładność dla niskiego poziomu zanieczyszczenia wyniosła odpowiednio 75 i 72% (tab. 1; 13). Próbki gotowanej szynki sformatyfikowano enterotoksyną typu E na poziomie odpowiednio 0, 0,5 i 1,25 ng/g. Stwierdzono, że specyficzność i czułość metody Ridascreen SET Total wyznaczona poprzez międzylaboratoryjne badania porównawcze była porównywalna z uzyskaną w badaniach wewnątrzlaboratoryjnych EURL CPS, a metoda może być stosowana do wykrywania enterotoksyn w żywności innej niż mleko i produkty mleczne (tab. 2; 14). Ze względu jednak na zbyt małą liczbę próbek w stosunku do zalecanej w normie EN ISO 16140 badania walidacyjne będą kontynuowane. Natomiast rezultaty badań walidacyjnych metody Vidas SET 2 wskazują, że metoda ta ma wysoko satysfakcjonującą specyficzność i czułość (100%) i jest rekomendowana do wykrywania enterotoksyn gronkowcowych także w żywności innej niż mleko i produkty mleczne (tab. 2; 15).

Wszystkie z opisanych powyżej wersji ESM były sukcesywnie wdrażane

w laboratorium Zakładu Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego PIWet – PIB. Ponadto, jako krajowe laboratorium referencyjne, Zakład był organizatorem badań biegłości w zakresie wykrywania enterotoksyn gronkowcowych w latach 2008, 2009, 2010 oraz 2011.

### Piśmiennictwo

1. Lapeyre C., de Solan M. N., Drouet X.: Immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins: international interlaboratory study. *JAOAC Int.* 1996, **79**, 1095-1101.
2. Hennekinne J. A., Guillier F., Perelle S., De Buyser M. L., Dragacci S., Krys S., Lombard B.: Intralaboratory validation according to the EN ISO 16140 Standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of Staphylococcal enterotoxins in milk products. *J. Appl. Microbiol.* 2007, **102**, 1261-1272.
3. Hennekinne J. A., Gohier M., Dragacci S., Lombard B.: Interlaboratory trial on the detection of staphylococcal enterotoxins in cheeses made of cow's and goat's milk, using Vidas SET2 (bioMérieux). European Union Community Reference Laboratory for Milk and Milk Products, August 2004, 1-30.
4. Hennekinne J. A., Gohier M., Dragacci S., Lombard B.: Evaluation of Vidas SET2 in comparison to Transia Plate SEs for detecting staphylococcal enterotoxins from naturally contaminated milk products. Report, AFSSA, 2005, 1-59.
5. Hennekinne J. A., Gohier M., Tiphaine M., Lapeyre C., Lombard B., Dragacci S.: First proficiency testing to evaluate the ability of European Union National Reference Laboratories to detect staphylococcal enterotoxins in milk products. *JAOAC Int.* 2003, **86**, 332-339.
6. Hennekinne J. A., Ostyn A., Guiller F., Gohier M., Messio S., Dragacci S., Krys S., Lombard B.: Interlaboratory validation of the Vidas SET2 detection kit for an use in official controls of staphylococcal enterotoxins detection in milk products. *JAOAC Int.* 2003, **90**, 756-764.
7. Gohier M., Ostyn A., Hennekinne J. A., Krys S., Lombard B.: Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in milk & milk products. European screening method of the CRL "Coagulase Positive Staphylococci including *Staphylococcus aureus*" Version 1, 19 November 2007, 1-7.
8. Ostyn A., Gohier M., Hennekinne J. A., Krys S., Assere A., Lombard B.: Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in milk & milk products and other food matrices. European screening method of the CRL "Coagulase Positive Staphylococci including *Staphylococcus aureus*" Version 2, 1 April 2008, 1-13.
9. Ostyn A., Papinaud L., Hennekinne J. A., Assere A., Lombard B.: Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in milk & milk products and other food matrices. European screening method of the CRL "Coagulase Positive Staphylococci including *Staphylococcus aureus*" Version 3, September 2009, 1-21.



10. Ostyn A., Prufer A.L., Papinaud I., Hennekinne J.A., As-sere A., Lombard B.: Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in milk and milk products and other food matrices. European Screening Method of the EU-RL "Coagulase Positive Staphylococci including *Staphylococcus aureus*" Version 4, April 2010, 1-17.
11. Ostyn A., Guiller F., Prufer A.L., Papianud I., Messio S., Krys S., Lombard B., Hennekinne J. A.: Intra – laboratory validation of the Ridascreen SET Total kit for detecting staphylococcal enterotoxins SEA to SEE in cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 2011, **52**, 468-474.
12. Ostyn A., Prufer A.L., Papinaud I., Hennekinne J.A., As-sere A., Lombard B.: Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in all types of food matrices. European Screening Method of the EU-RL "Coagulase Positive Staphylococci including *Staphylococcus aureus*" Version 5, September 2010, 1-12.
13. Guillier F., Mutel I., Ostyn A., Prufer A.L., Krys S., Hennekinne J.A.: Final report on the inter-laboratory validation trial. Screening for staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in milk and milk products using dialysis-concentration extraction and detection with Ridascreen SET Total Kit (r-biopharm®). Report ILVT/ANSES/LSA/CAT BAC/2011/05, EURL CPS, ANSES, August 2011, 1-44.
14. Guillier F., Mutel I., Ostyn A., Prufer A.L., Krys S., Hennekinne J.A.: Final report on the inter-laboratory validation trial. Screening for staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in foods other than milk and milk products using dialysis-concentration extraction and detection with Ridascreen SET Total Kit (r-biopharm®). Report ILVT/ANSES/LSA/CAT BAC/2011/06, EURL CPS, ANSES, August 2011, 1-36.
15. Guillier F., Mutel I., Ostyn A., Prufer A.L., Krys S., Hennekinne J.A.: Final report on the inter-laboratory validation trial. Screening for staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in foods other than milk and milk products using dialysis-concentration extraction and detection with Vidas SET 2 Kit (bioMerieux®). Report ILVT/ANSES/LSA/CAT BAC/2011/07, EURL CPS, ANSES, August 2011, 1-36.

---

Dr Jolanta G. Rola, Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: jolarola@piwet.pulawy.pl