

Paweł Nawrotek, Jacek Borkowski, Anna Boroń-Kaczmarska, Antoni J. Furowicz*

**CHARAKTERYSTYKA ENTEROTOKSYN GRONKOWCOWYCH
WYTWARZANYCH PRZEZ SZCZEPY IZOLOWANE OD KRÓW
Z ZAPALENIEM GRUCZOŁU MLEKOWEGO (MASTITIS),
Z UWZGLĘDNIENIEM ELEMENTÓW EPIDEMIOLOGICZNYCH**

Katedra Immunologii i Mikrobiologii
Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt AR w Szczecinie
Kierownik Katedry: Antoni J Furowicz
* Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych
Wydziału Lekarskiego PAM w Szczecinie
Kierownik Katedry i Kliniki: Anna Boroń-Kaczmarska

Artykuł przedstawia najnowsze dane dotyczące 21 typów enterotoksyn gronkowcowych, z uwzględnieniem ich zasadniczych właściwości oraz różnicowania pod względem homologii nukleotydowej i aminokwasowej, lokalizacji kodujących je genów, masy molekularnej i wysokości punktu izoelektrycznego, a także powiązań filogenetycznych. Różnicowanie, rozpowszechnienie i zmienność enterotoksyn stanowi ważny element chorobotwórczości gronkowców, wiążący zapalenie gruczołu mlekowego krów (mastitis) z zatruciami pokarmowymi człowieka.

Słowa kluczowe: enterotoksyny gronkowcowe, mastitis, epidemiologia
Key words: staphylococcal enterotoxins, mastitis, epidemiology

WSTĘP

Chorobotwórcze bakterie występujące w środkach żywności stanowią poważny problem zarówno zdrowotny (zatrucia i zakażenia pokarmowe), jak i ekonomiczny (1). Jedną z najczęstszych przyczyn zatruc pokarmowych człowieka stanowią enterotoksyny wytwarzane przez szczepy *Staphylococcus aureus* (2). Wynika to z faktu występowania tego gatunku gronkowców oraz w mniejszym stopniu *Staphylococcus intermedius*, w żywności (3,4). Istotną, w tym kontekście, rolę odgrywają enterotoksyczne szczepy gronkowców, którymi skażone są środki żywności zwierzęcego pochodzenia, w tym mleko i produkty mleczne, pochodzące od zwierząt z mastitis (2,5,6,7). Jak podaje Kuźma i wsp. (8), wymienione produkty spożywcze okazały się przyczyną 32% przypadków gronkowcowych zatruc pokarmowych we Francji i 8% w Wielkiej Brytanii. W Polsce zatrucia pokarmowe na tym tle zajmują od lat drugie miejsce za salmonelozami, z wzrastającą tendencją (8,9). W 2002 r. odnotowano 1,269 zachorowań, co stanowi 4,7% wszystkich zatruc pokarmowych, przy zapadalności – 3,30 na 100 000 mieszkańców. Gronkowce koagulazo-dodatnie

były głównym czynnikiem etiologicznym w 7,0% ognisk, co stanowi 16,5% ogółu zachorowań w ogniskach, tj. o około 5% więcej niż w 2001 roku. Nośnikami szczepów enterotoksycznych były najczęściej potrawy przygotowane z mięsa, drobiu, mieszanych produktów pochodzenia zwierzęcego oraz z mleka (1). Mleko i jego przetwory są dobrą pożywką dla wzrostu wielu patogennych bakterii. Produkt ten zawierający wydzielinę zapalną, pochodzącą od krów z zapaleniem wymienia, może zawierać bakterie, które je wywołały. Natomiast mleko od krów ze zdrowym gruczołem może ulec wtórnemu zanieczyszczeniu bakteriami w trakcie pozyskiwania, przechowywania, transportu i procesów technologicznych (8).

Dane te uzasadniają celowość porównania właściwości biologicznych i filogenetycznych poszczególnych enterotoksyn gronkowcowych, z uwzględnieniem ich roli w wywołaniu zatruc u ludzi, zarówno w aspekcie klinicznym jak i epidemiologicznym.

CHARAKTERYSTYKA ENTEROTOKSYN GRONKOWCOWYCH

Enterotoksyny gronkowcowe (SEs, *staphylococcal enterotoxins*) tworzą dużą, heterogenną grupę egzotoksyn, charakteryzujących się zróżnicowanym stopniem homologii nukleotydowej i aminokwasowej, różną lokalizacją kodujących je genów oraz odmienną masą molekularną i wysokością punktu izoelektrycznego (pI) białka (7). SEs po raz pierwszy zidentyfikowano w 1959 roku jako zewnątrzkomórkowe białka wytwarzane przez określone szczepy *Staphylococcus aureus* (10). Należą do grupy toksyn pirogennych, do których zalicza się również inne powiązane filogenetycznie ze sobą toksyny: TSST-1 (toksyna wstrząsu toksycznego), eksfoliatynę A i B oraz paciorkowcową toksynę erytrogeną (7). Obecnie wśród egzoprotein SEs wyróżnia się już 21 typów serologicznych, oznaczonych literami od A do U, rozszerzonych dodatkowo o warianty enterotoksyn C i G, oznaczonych kolejno cyframi arabskimi. Siedem zaliczanych jest do „klasycznych” enterotoksyn: SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED i SEE; pozostałe 14 zaliczono do „nowych” typów: SEG, SEG₂, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER i SEU (3,7,10,11,12,13,14). Najnowsze dane dowodzą istnienia kolejnego wariantu w obrębie typu SEI (11). Enterotoksyny są krótkimi jednołańcuchowymi polipeptydami o masie cząsteczkowej od 24,6 do 30 kDa, w których dominującymi aminokwasami są: lizyna, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy oraz tyrozyna (3,7,15). Pojedyncza cząsteczka enterotoksyny ma kształt elipsoidalny i składa się z dwóch nierównych domen większej A i mniejszej B, odpowiadających za związanie toksyny z węglowodanami lub kwasami nukleinowymi innych białek, chociaż w przypadku niektórych SEs funkcja ta nie zawsze była obserwowana. Pomiedzy domeną A i B znajduje się szczelina, wykazująca podobieństwo strukturalne do gronkowcowej toksyny wstrząsu toksycznego (16). Ponadto, sekwencja aminokwasowa pojedynczego epitopu odpowiedzialnego za transcytozę SEs wewnątrz komórek nabłonkowych, wykazuje wysoką konserwatywność zarówno w wielu gronkowcowych enterotoksynach, jak i toksynie TSST-1 (17). Ren i wsp. (18) podając królikom dożylnie oczyszczoną natywną enterotoksynę H, zauważyli wystąpienie zmian histopatologicznych, podobnych do obserwowanych u ludzi z zespołem wstrząsu toksycznego (TSS, *toxic shock syndrome*) oraz u zwierząt po podaniu TSST-1. Stanowi to dowód na to, iż za objawy kliniczne zespołu wstrząsu toksycznego odpowiadają zarówno enterotoksyny gronkowcowe (SEs), jak i TSST-1 (19).

Enterotoksyny gronkowcowe wykazują znaczną termostabilność, zachowując aktywność biologiczną nawet po przeprowadzeniu procesu pasteryzacji (4,7,15). Wprawdzie wysoka temperatura łatwo niszczy bakterie znajdujące się w żywności, ale nie unieczynnia wytworzonych wcześniej enterotoksyn (2,7). SEs charakteryzują się też dużą opornością na działanie wielu enzymów proteolitycznych, takich jak: pepsyna i trypsyna, dzięki czemu nie tracą aktywności w układzie pokarmowym (7). Wykazują także oporność na chymotrypsynę, reninę i papainę (7,15). Niektóre enterotoksyny (SEB), są co prawda trawione przez pepsynę przy pH 2, ale wykazują oporność powyżej tej wartości. Wytrzymałość SEs uzależniona jest zatem od temperatury i pH (7).

Geny kodujące syntezę enterotoksyn gronkowcowych (*se*) zlokalizowane są zarówno w DNA chromosomalnym, jak i w ruchomych elementach materiału genetycznego bakterii, takich jak wyspy patogenności, fagi, transpozony i plazmidy, uczestniczące w zjawisku horyzontalnego transferu genów (7,20). Większość genów *se* zlokalizowana jest w genomowym DNA, pozostałe natomiast znajdują się w DNA plazmidowym (*sec_p*, *sed* i *sej*), albo występują w materiale genetycznym profaga (*sea*, *sep*) lub faga defektywnego (*see*) (7,21). Gen *seb* może występować zarówno w chromosomalnym, jak i plazmidowym DNA, a także w transpozonie (7). Różne geny *se* znajdują się w obrębie wysp patogenności (PI, *pathogenicity islands*). Dotyczy to genów: *sec_{bov}*, *sek*, *sel* i *seq* (7, 21). Wyspy patogenności stanowią fragmenty DNA o wielkości od 10 do 200 kb, zawierające jeden lub kilka genów determinujących wyznaczniki wirulencji, które mogą zmieniać swoją pierwotną lokalizację przyczyniając się w ten sposób do zmienności genetycznej bakterii (22). Na szczególną uwagę zasługują geny *se* podlegające wspólnej regulacji w ramach operonu *egc* (*enterotoxin gene cluster*), kontrolującego syntezę kilku blisko filogenetycznie powiązanych toksyn, takich jak: SEG, SEI, SEM, SEN, SEO oraz SEU (7,21). Przy czym gen kodujący enterotoksynę U, wcześniej traktowany był jako dwa pseudogeny (ψ *ent1* i ψ *ent2*), zlokalizowane między genami *sei* i *sen* (21).

Ekspresja genów kodujących czynniki wirulencji *S. aureus*, w tym wytwarzanie SEs, kontrolowana jest przez główny system regulatorowy (*agr*, *accessory gene regulator*), określany w przypadku gronkowców jako – *sar* (*staphylococcal accessory regulator*). Jest on ściśle zależny od czynników zewnętrznych, np. składników pokarmu (7). *Le Loir* i wsp. (7) podają, że do wzrostu i syntezy enterotoksyn pięciu szczepów *S. aureus* pozytywnych w zakresie SEA, SEB i SEC, konieczna jest obecność waliny, argininy i cysteiny. Autorzy ci podkreślają także, iż fermentacja glukozy i związany z tym spadek pH hamuje ekspresję *agr*-zależnego systemu produkcji SEs. Optymalne warunki wytwarzania enterotoksyn występują w neutralnym pH (zwykle synteza ta ulega zahamowaniu przy pH poniżej 5) oraz podczas hodowli w optymalnej dla rozwoju gronkowców temperaturze 37°C; synteza SEs rozpoczyna się wtedy już w początkowej fazie wzrostu kolonii bakteryjnej. System *agr* kontroluje wytwarzanie enterotoksyn typu B, C i D, chociaż w tym przypadku środowisko zasadowe obniża jego ekspresję (7). Na syntezę SEs wpływają też pewne czynniki występujące podczas zakażenia, co sugeruje, że rozwój procesu chorobowego może w istotny sposób zależeć od interakcji pomiędzy organizmem gospodarza a enterotoksycznym gronkowcem (20). Geny *sea* i *sej* nie podlegają regulacji ze strony *agr*. Obecność konkurencyjnej flory bakteryjnej (bakterie kwasu mlekowego) w produktach spożywczych również może znacznie obniżyć tempo wzrostu gronkowców i ilość produkowanych przez nie enterotoksyn. Dane te mają szczególne znaczenie w technologii produkcji żywności fermentowanej.

Tabela I. Charakterystyka enterotoksyn gronkowcowych - SEs (wg 7; zmodyfikowana)

Table I. Characteristics of staphylococcal enterotoxins (SEs) (ref. 7, modified) *

Typ SEs	Odcinek ORF ¹ (pz)	Odcinek dojrzałego białka SEs ² (AA)	Masa molekularna (kDa)	pI	Numer sekwencji genu <i>se</i> w banku genów
A	774	233	27,100	7,3	
B	801	239	28,336	8,6	
C ₁	801	239	27,531	8,6	
C ₂	801	239	27,531	7,8	
C ₃	801	239	27,563	8,1	
D	777	228	26,360	7,4	
E	774	230	26,425	7,0	
G	777	233	27,043	5,7	
G ₂	777	233 ³	26,986 ⁴	6,39 ⁴	4126682 ⁵
H	725	217 ³	25,143 ⁴	5,18 ⁴	510691 ⁵
I	728	218 ³	24,925 ⁴	8,37 ⁴	3323612 ⁵
J	806	245	28,565	8,65	
K	729	219	25,539	6,5	
L	723	215	24,593	8,66	
M	722	217	24,842	6,24	
N	720	227	26,067	6,97	
O	783	232	26,777	6,55	
P	783	232 ³	26,609 ⁴	6,19 ⁴	30043925 ⁵
Q	771	216 ³	25,046 ⁴	7,14 ⁴	18266750 ⁵
R	780	233 ³	27,050 ⁴	8,76 ⁴	37196677 ⁵
U	786	232 ³	27,192 ⁴	6,20 ⁴	37681489 ⁵

¹ – liczba par zasad (pz) otwartej ramki odczytu (ORF, Open Reading Frame);

² – liczba aminokwasów (AA) w dojrzałym białku SEs;

³ – odcinek dojrzałego białka SEs, wyznaczony przy użyciu programu SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>);

⁴ – masa molekularna oraz punkt izoelektryczny (pI), określone przy użyciu programu ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>);

⁵ – numer sekwencji genu *se* w banku genów (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

*¹ – the number of base-pairs (bp) of the ORF (Open Reading Frame);

² – the number of aminoacids (AA) in mature SEs' protein;

³ – the region of mature SEs' protein estimated using SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>);

⁴ – molecular weight and isoelectric point (pI), estimated using ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>);

⁵ – the *se* gene sequence code in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

towanej (7). Ogólną charakterystykę enterotoksyn gronkowcowych przedstawiono w tabeli I, natomiast powiązania filogenetyczne genów *se*, ilustruje rycina 1.

PATOGENEZA ZATRUCIA SEs

Enterotoksyny są jedynymi czynnikami wirulencji gronkowców odpowiedzialnymi za objawy kliniczne występujące w przebiegu zatrucia pokarmowego (2,4,7). Zatrucia te u ludzi powodują najczęściej różne produkty spożywcze zwierzęcego i roślinnego pochodzenia (7,15), które zostały skażone pierwotnie lub w wyniku wtórnej kontaminacji za pośrednictwem rąk osoby zakażonej, czy też drogą kropelkową podczas kaszlu i kichania (7). Za zatruciem pokarmowym na tle gronkowcowym przemawia wykrycie co najmniej 10^5 j.t.k. (jednostek tworzących kolonię) w gramie badanej próbki (15). Jednak w niektórych krajach (Francja), dopuszcza się do spożycia sery przygotowane z surowego mleka, zawierające do 10^3 j.t.k. *S. aureus* / gram produktu (7).

Intoksykację w przebiegu gronkowcowego zatrucia pokarmowego u ludzi wywołują przede wszystkim enterotoksyny A i D oraz w mniejszym zakresie B i C (14,15). Po spożyciu, SEs przedostają się z jelit do krwiobiegu i po okresie wylegania trwającym od 30 min. do 8 godz. wywołują charakterystyczne dla zatrucia pokarmowego objawy kliniczne. Zwykle obserwuje się spontaniczną remisję po 24 godz. Okres wylegania i nasilenie objawów uzależnione są od dawki enterotoksyny, która dla człowieka wynosi ok. 0,1 mg i osobniczej wrażliwości chorego (2,4,7,15). Badania przeprowadzane na modelach zwierzęcych wykazały, że enterotoksyny gronkowcowe powodują biegunkę poprzez gwałtowną stymulację mechanizmów sekrecyjnych w jelicie cienkim bez naruszania mechanizmów absorpcji (23). W tym zakresie toksyny te wykazują mechanizm działania podobny do toksyny *Vibrio cholerae* (CT) (15,23). Z intoksykacją enterotoksynami gronkowcowymi związane są także nudności i wymioty, spowodowane stymulacją ośrodka wymiotnego w OUN drogą nerwu błędnego i nerwów współczulnych, przewodzących impulsy nerwowe z lokalnych receptorów w jelicie (15,23). Orwin i wsp. (14) podają, iż właściwości wymiotne SEs związane są z obecnością pętli cystynowej (Cys-Cys) w ich strukturze. Jako prawdopodobną przyczynę objawów klinicznych występujących w przebiegu zatrucia pokarmowego wywołanego enterotoksynami gronkowcowymi, wskazuje się również zaburzenie mechanizmów odporności (15,24). Z immunologicznego punktu widzenia, enterotoksyny działają jak superantygen pobudzając nadmierną proliferację i stymulację limfocytów T, co wynika z ich zdolności do wiązania z cząsteczką MHC II kl., obecną na komórkach prezentujących antygen (APC) oraz ze zmienną częścią łańcucha b antygenowego receptora limfocyty T (TCR Vb) (19). Nadmierna aktywacja komórek T i APC prowadzi do zwiększonej produkcji interferonu i innych cytokin, a w konsekwencji – do immunosupresji limfocytów T i B oraz zaburzenia mechanizmów obrony antybakteryjnej zakażonego organizmu – ewazji (16,17,24).

WYSTĘPOWANIE KLASYCZNYCH I NOWYCH SEs U BYDŁA Z MASTITIS

Odsetek enterotoksycznych szczepów *S. aureus* izolowanych od krów z zapaleniem gruczołu mlekowego waha się w różnych krajach od poniżej 5% do ponad 60%, przy czym różnice dotyczą także typu wytwarzanych toksyn (8). Wytwarzanie enterotoksyny A (SEA) determinowane jest obecnością w genomie gronkowca łagodnego faga (7). Analiza jego

sekwencji nukleotydowej wykazała, że białko kodowane przez tego profaga jest syntetyzowane jako 257-aminokwasowa cząsteczka, w której 24 aminokwasy stanowią sekwencję sygnałową (23). Sekwencja aminokwasowa tego białka wykazuje obecność regionów homologicznych do enterotoksyn B (SEB), C₁ (SEC₁), paciorkowcowej pirogennej egzotoksyny A (SPEA) oraz toksyny szoku toksycznego (TSST-1) (25,26).

Enterotoksyna A jest najczęściej występującą toksyną, odpowiedzialną za występowanie zatruc pokarmowych u ludzi o etiologii gronkowcowej (27). Wspólnie z enterotoksynami B, C i D oraz toksyną TSST-1 może wywoływać schorzenia takie, jak zespół wstrząsu toksycznego (TSS, *toxic-shock syndrome*), a także gronkowcową szkarlatyno-podobną gorączkę (SSF, *staphylococcal scarlet fever*) (14,28). Enterotoksyna ta wytwarzana jest przez szczepy *Staphylococcus aureus*, izolowane z przypadków *mastitis* u bydła, ale odsetek szczepów ją produkujących bywa różny, w zależności od regionu, z którego pochodziło bydło. Odnotowano, że na terenie Polski 10,8% szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych z przypadków *mastitis* wytwarzało enterotoksynę A (5). Natomiast odsetek szczepów *S. aureus* SEA (+) izolowanych na terenie północno-wschodniej Szwajcarii wynosił aż 23,5%, przy czym toksyna ta występowała najczęściej łącznie z enterotoksyną D (29). Niewielka liczba szczepów *S. aureus* izolowanych z przypadków *mastitis* na terenie Norwegii wytwarzała SEA (3,4%), łącznie z enterotoksyną D, jednak były to izolacje z podklinicznych form *mastitis* (30). Natomiast szczepy, wyosabniane z przypadków *mastitis* u bydła na terenie Hesji (Niemcy) i Danii, nie wytwarzały enterotoksyny A (24, 31). Na terenie Słowacji przeprowadzono badania dotyczące wytwarzania enterotoksyny A przez szczepy *S. aureus* izolowane z mleka owiec, u których nie zaobserwowano żadnych objawów klinicznych. Badania te wykazały, że 10,9% szczepów *S. aureus* wytwarzało tę toksynę jako jedyną (8,7%) lub łącznie z enterotoksyną B (2,2%) (6).

Enterotoksyna B (SEB) kodowana jest przez 798-nukleotydowy fragment DNA, który uważany jest za defektywnego bakteriofaga bądź plazmid. Cząsteczka SEB to pojedynczy łańcuch polipeptydowy, liczący 239 aminokwasów. Istnieje tu pewne podobieństwo do enterotoksyny C₁, której cząsteczka zbudowana jest z takiej samej liczby aminokwasów. Prekursor SEB o masie cząsteczkowej ok. 32 kDa jest jednym z komponentów błony komórkowej *S. aureus*, wytwarzających tę enterotoksynę, natomiast masa aktywnej cząsteczki SEB wynosi 28,366 Da (26). W sekwencji aminokwasowej tego białka istnieją również regiony homologiczne do enterotoksyny A (SEA), a także dla pirogennej paciorkowcowej toksyny A (SPE A) (25, 32). SEB, podobnie jak enterotoksyny A, C i D oraz TSST-1 jest odpowiedzialna za występowanie zespołu wstrząsu toksycznego, jak również gronkowcowej szkarlatyno-podobnej gorączki (14, 28). Jest także wymieniana jako jedna z głównych enterotoksyn, odpowiedzialnych za zatrucia pokarmowe na tle gronkowcowym (12).

Kuźma i wsp. (12) stwierdzili, że około 1,2% szczepów *S. aureus*, izolowanych z przypadków *mastitis* u bydła na terenie Polski wytwarzało SEB. Natomiast badania wykonane na terenie północno-wschodniej Szwajcarii oraz Danii wykazały, iż żaden szczep *S. aureus*, izolowany od bydła, pochodzącego z tych regionów, nie produkował SEB (24,29). Tollersrud i wsp. (30) wykazali, iż tylko 3,4% szczepów gronkowca złościstego, izolowanego od krów z podkliniczną formą *mastitis*, utrzymywanych na terenie Norwegii, produkowało enterotoksynę B łącznie z SEA, natomiast szczepy tej bakterii, izolowane od krów z objawami ostrego i chronicznego zapalenia wymienia, nie wytwarzały SEB. Enterotoksynę B wykrywano również wśród szczepów *S. aureus*, izolowanych od zdrowych owiec,

pochodzących z terenu Słowacji; 2,2% wyosobnionych szczepów produkowało samą SEB, a 2,2% – łącznie z enterotoksyną A (4).

Enterotoksyna C (SEC) uznawana jest za jedną z „klasycznych” enterotoksyn (7). Istnieje kilka wariantów tej toksyny, które mimo, iż wykazują silne immunologiczne reakcje krzyżowe, zostały wydzielone albo na podstawie różnic w wysokości punktu izoelektrycznego (warianty SEC₁, SEC₂, SEC₃) lub też w zależności od gatunku gospodarza, od którego izolowano szczepy *S. aureus*, wytwarzające te warianty (SEC_{bovine}, SEC_{ovine}, SEC_{canine}) (13, 33). Gen kodujący wariant SEC_{bovine} zlokalizowany jest w wyspie patogenności (21), natomiast białko SEC₁ kodowane jest przez gen obecny w plazmidzie (7).

Dane literaturowe wskazują, że SEC₁ jest najczęściej wytwarzaną enterotoksyną, a szczepy *S. aureus* ją wytwarzające są najczęściej izolowane z zakażeń u ludzi (13). SEC jest odpowiedzialna za występowanie syndromu wstrząsu toksycznego jak również gronkowcowej szkarlatyno-podobnej gorączki, a także *mastitis* u bydła (5,28). W badaniach autorów niemieckich wykazano, że SEC była produkowana przez 15,5% szczepów *S. aureus* izolowanych od bydła z *mastitis* na terenie tego kraju; w każdym przypadku enterotoksyna ta wytwarzana była łącznie z SEA, SEG, SEI i TSST-1, nigdy zaś nie występowała jako jedyna (5). Kuźma i wsp. (12) zaobserwowali, że 26,3% szczepów gronkowca złocistego, izolowanego od krów z *mastitis* na terenie Polski, wytwarzało SEC, przy czym 4% tych szczepów wytwarzało ją łącznie z TSST-1; korelację taką wykazywali również inni autorzy (5,31,34). Ponad 95,7% szczepów *S. aureus*, izolowanych od krów na terenie północno-wschodniej Szwajcarii, wytwarzało SEC łącznie z TSST-1, a tylko 4,3% jako pojedynczą toksynę (29). Podobnie Tollersrud i wsp. (30) wykazali, że 78% izolatów gronkowca złocistego, pochodzących od krów z objawami ostrego, przewlekłego i podklinicznego *mastitis*, utrzymywanych na terenie gospodarstw norweskich, wytwarzało SEC łącznie z TSST-1, zaś tylko 5,8% szczepów wytwarzało wyłącznie tę toksynę. Larsen i wsp. (24) porównywali w Danii szczepy *S. aureus*, izolowane od krów z *mastitis*, ze szczepami pochodzącymi od ludzi. Wykazali oni, że wśród szczepów wyosobnianych od krów, jedyną produkowaną toksyną była SEC, wytwarzana łącznie z TSST-1, choć sam odsetek tych szczepów był znikomy i stanowił 0,24% ogółu izolatów, natomiast u ludzi odsetek ten wynosił 3%. Badania słowackie wykazały ponadto, że SEC jest główną enterotoksyną wytwarzaną przez gronkowce, występujące nie tylko w mleku krów, ale także owiec i kóz (35).

Badania Letertre i wsp. (21) wskazują, że gen *entD* (*sed*), kodujący enterotoksynę D (SED), zlokalizowany jest na dużym plazmidzie pIB485. Cząsteczka enterotoksyny D liczy 228 aminokwasów (32). Aktywność SED może być przyczyną, m.in. syndromu wstrząsu toksycznego, szkarlatyno-podobnej gorączki, gronkowcowych zatruc pokarmowych i *mastitis* (5,28). Badania Kuźmy i wsp. (12) dowodzą, iż 4,8% szczepów gronkowca złocistego, izolowanych od krów z *mastitis* na terenie Polski, produkowało enterotoksynę D. Z kolei 15,8% badanych szczepów tego gatunku, pochodzących z terenu Niemiec, syntetyzowało tę toksynę łącznie z toksyną J (SEJ) (31). Stephan i wsp. (29) wykazali, że 11,5% szczepów *S. aureus*, izolowanych od bydła z *mastitis* na terenie Szwajcarii, syntetyzowało SED jako jedyną enterotoksynę, zaś ponad 30% – łącznie z enterotoksyną A. Na terenie Słowacji badano szczepy *S. aureus* izolowane z mleka owiec, u których nie zaobserwowano żadnych objawów klinicznych; wykazano, że 22,6% spośród nich wytwarzało toksynę SED (6).

Sekwencja nukleotydowa genu *see*, kodującego enterotoksynę E (SEE) jest w 84%

homologiczna do sekwencji genu *sea* kodującego SEA i obecna jest w defektywnym fagu. Białko SEE syntetyzowane jest jako 257-aminokwasowa cząsteczka, która po obróbce posttranslacyjnej osiąga długość 230 aminokwasów (25). Uważa się, że 95% wszystkich przypadków zatruc pokarmowych na tle *S. aureus* jest powodowanych przez „klasyczne” enterotoksyny, w tym również SEE (10, 27).

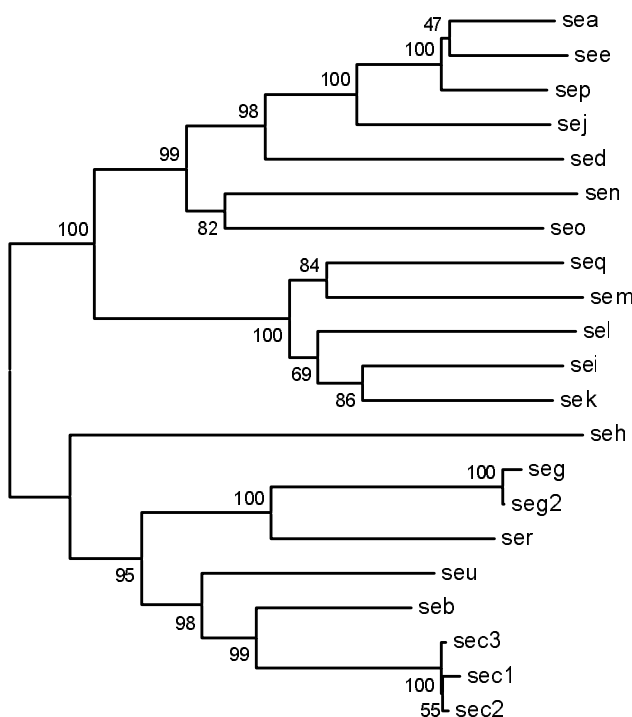
Enterotoksyny G, H, I należą do tzw. „młodych” enterotoksyn. Biosynteza SEG i SEI kontrolowana jest przez operon *egc* (*enterotoxine gene cluster*), w którego skład wchodzi również geny *sek*, *sel*, *sem*, *sen* i *seo*, a także pseudogeny ψ *ent1* i ψ *ent2* (11). Cząsteczka SEG liczy 233, a SEI – 218 aminokwasów (33). Opiswane enterotoksyny uważane są za jedną z przyczyn syndromu wstrząsu toksycznego u ludzi, zakażonych wytwarzającym je gronkowcem (28). Odpowiedzialne są one również za wywoływanie objawów gronkowcowego zatrucia pokarmowego, choć ich związek z występowaniem tego schorzenia nie został do końca poznany (11). Badania Orwina i wsp. (14), dowodzą jednak, iż struktura molekularna SEI wskazuje na bliższe podobieństwo do ostatnio odkrytej enterotoksyny K (SEK), ze względu na brak w jej strukturze pętli cystynowej, odpowiedzialnej za objawy wymiotne. SEG i SEI mogą być także przyczyną wystąpienia objawów gronkowcowej szkarlatyno-podobnej gorączki (27). Omoe i wsp. (27) wykonali badania dotyczące występowania genów *seg*, *seh* i *sei* wśród szczepów *S. aureus*, izolowanych od ludzi, przede wszystkim od chorych z objawami zatrucia pokarmowego na tle tej bakterii w Japonii, jak również wśród szczepów *S. aureus*, izolowanych od krów z *mastitis*. Z badań tych wynika, iż 2,8% szczepów zawierało tylko gen *seg*, 8,5% tylko gen *seh*, natomiast ponad 25% badanych szczepów posiadało zarówno gen *seh*, jak i *seb*. U 16,9% izolatów stwierdzono obecność genów *seg* i *sei*. Ponad 71% szczepów *S. aureus*, izolowanych od krów z *mastitis*, posiadało geny *seg* i *sei*, przy czym w 33,3% był to genotyp *seg / sei*, a w 38% genotyp *seg/sei* (27). Obecność genów *seg*, *seh* i *sei* badano również w szczepach *S. aureus*, izolowanych od krów z *mastitis* na terenie Polski. Badania te wykazały, że gen *seg* obecny był u 32,3% izolowanych szczepów, gen *seh* u 34,9% i *sei* u 36,1% (12). Salasia i wsp. (31) przeprowadzali badania szczepów *S. aureus* w kierunku produkcji enterotoksyn, w tym również SEG, SEH i SEI, izolowanych od krów na terenie Niemiec. Okazało się, że 15,8% szczepów gronkowca złocistego, pochodzących z terenu Niemiec zawierało gen *seh* i aż 63,2% geny *seg* i *sei* (31).

Gen *sek*, kodujący enterotoksynę K (SEK), znajduje się w wyspie patogenności (7,14). Cząsteczka SEK, łącznie z odcinkiem prekursorowym, liczy 242 aminokwasy. Biologiczne właściwości tej enterotoksyny wskazują na podobieństwo do innych enterotoksyn. Sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa enterotoksyny K jest podobna do SEI i SEL. W cząsteczce SEK istnieje tylko jedna reszta cystynowa, co uniemożliwia utworzenie pętli cystynowej, której istnienie wiąże się z wywoływaniem wymiotów u osób, które spożyły tę toksynę. Ostatnie badania wskazują, iż podobną budową charakteryzuje się również SEI, dlatego zaproponowano, aby SEK i SEI wydzielić do osobnej podgrupy enterotoksyn gronkowcowych. Enterotoksyna K wykazuje znacznie większe podobieństwo do SEA, -D i -E niż do SEB i SEC (14).

Enterotoksyna L (SEL) została wykryta niedawno w szczepach *S. aureus*, izolowanych od bydła z *mastitis*. Gen kodujący tę toksynę (*sel*) jest częścią wyspy patogenności SaPI-bov i kontrolowany jest przez operon *egc*, zaś jej dojrzała cząsteczka ma wielkość 215 aminokwasów (7). Biologiczne właściwości SEL upodobniają ją do innych, zwłaszcza kla-

sycznych enterotoksyn, chociaż nie wywołuje ona objawów wymiotnych, ponieważ nie posiada w swojej budowie pętli cystynowej (36).

Sekwencja enterotoksyny U (SEU) została wydzielona z sekwencji dwóch pseudogenów ψ *ent1* i ψ *ent2*, położonych w obszarze kontrolowanym przez operon *egc* (21). Jej biochemiczne i biologiczne właściwości wymagają dalszych badań.



Ryc. 1. Analiza filogenetyczna¹ (dendrogram) genów *se*², kodujących enterotoksyny gronkowcowe od typu A do U

Fig. 1. The phylogenetic analysis¹ (dendrogram) of *se*² genes encoding staphylococcal enterotoxins (types A–U)*

¹–Analiza filogenetyczna przeprowadzona, w oparciu o program MEGA wersja 3.0 (Kumar, Tamura, Nei 2004); ² – numery sekwencji nukleotydowych genów *se* w banku genów (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): *sea* (153120), *seb* (152999), *sec*₁ (46566), *sec*₂ (38426902), *sec*₃ (46570), *sed* (1492109), *see* (153001), *seg* (3323610), *seg*₂ (4126682), *seh* (510691), *sei* (3323612), *sej* (3372540), *sek* (18266750), *sel* (11094374), *sem* (11527263), *sen* (11527263), *seo* (11527263), *sep* (30043925), *seq* (18266750), *ser* (37196677), *seu* (37681489).

* ¹– The phylogenetic analysis based on MEGA v. 3.0 (Kumar, Tamura, Nei 2004); ² – the *se* genes sequence code in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): *sea* (153120), *seb* (152999), *sec*₁ (46566), *sec*₂ (38426902), *sec*₃ (46570), *sed* (1492109), *see* (153001), *seg* (3323610), *seg*₂ (4126682), *seh* (510691), *sei* (3323612), *sej* (3372540), *sek* (18266750), *sel* (11094374), *sem* (11527263), *sen* (11527263), *seo* (11527263), *sep* (30043925), *seq* (18266750), *ser* (37196677), *seu* (37681489).

PODSUMOWANIE

Zróźnicowanie i rozpowszechnienie enterotoksyn wytwarzanych przez szczepy gronkowców izolowane od krów z *mastitis*, jest ważnym problemem klinicznym oraz epidemiologicznym. Analiza wzajemnych powiązań poszczególnych enterotoksyn gronkowcowych, w zakresie ich struktury, właściwości i występowania, pozwoli w przyszłości na pełniejsze wykazanie rzeczywistej roli, jaką odgrywają te czynniki zjadliwości w powstawaniu, rozwoju i rozpowszechnianiu procesów chorobowych u ludzi i zwierząt. Niewątpliwie zarówno klasyczne, jak i nowe typy SEs stanowią ważny element chorobotwórczości gronkowców, wiążący epidemiologicznie *mastitis* z zatruciami pokarmowymi człowieka, a ponadto wykazujący dużą tendencję do zmian.

P Nawrotek, J Borkowski, A Boroń-Kaczmarek, AJ Furowicz

THE CHARACTERISTICS OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS PRODUCED
BY STRAINS ISOLATED FROM MASTITIC COWS, INCLUDING
EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS

SUMMARY

Staphylococcal enterotoxins (SEs) are big heterogenic group of exotoxins, rather differential in respect of their nucleotide and amino-acid homology, as well as the location of their genes, molecular weight and iso-electric point value. SEs were identified in 1959 as the extra-cellular proteins produced by some *Staphylococcus aureus* strains. These enterotoxins are known as the pyrogenic toxins and this group contains also other staphylococcal toxins (staphylococcal toxic-shock syndrome toxin – TSST-1, A and B exfoliative toxins and streptococcal scarlet fever toxin). Twenty one serological types of staphylococcal enterotoxins are distinguished. All of them are structurally and functionally similar to the toxic shock syndrome toxin (TSST-1). SEs are thermo-stabile proteins, resistant to many proteolytic enzymes (pepsin, trypsin, chymotrypsin, renin and papain), but this resistance depends on the temperature and pH. Staphylococcal enterotoxin-encoding genes are located as well in the chromosomal DNA, as on the pathogenicity island, in phages, transposons and plasmids. Enterotoxins are staphylococcal virulence factors responsible for food poisonings in humans. These proteins are also isolated from cows with *mastitis*. In various countries, the percentage of enterotoxin-producing *S. aureus* strains ranges from 5 to 60%, depending on the enterotoxigenic type. The variability and prevalence of enterotoxins produced by staphylococci isolated from mastitic cows is very important clinical and epidemiological problem. The analysis of enterotoxins interrelations, their structure, properties and occurrence, will provide better revealing their role in the emerging, development and spreading of human and animal diseases. Classical enterotoxins, as well as the new types of these proteins, are variable element of staphylococcal virulence that connects the occurrence of *mastitis* with human food poisonings.

PIŚMIENNICTWO

1. Przybylska A. Zatrucia i zakażenia pokarmowe w 2002 roku. *Przegl Epidemiol* 2004; 58: 85-101.
2. Loncarevic S, Jørgensen HJ, Lřvseth A, i in. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *J Appl Microbiol* 2005;98:344-50.

3. Futagawa-Saito K, Suzuki M, Ohsawa M, i in. Identification and prevalence of an enterotoxin-related gene, se-int, in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. *J Appl Microbiol* 2004; 96: 1361-6.
4. Holečková B, Holoda E, Fotta M, i in. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. *Ann Agric Environ Med* 2002; 9: 179-82.
5. Akineden Ö, Annemüller C, Hassan AA, i in. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 959-64.
6. Holečková B, Kalináčová V, Gondol J, i in. Production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus* isolated from sheep milk. *Bull Vet Inst Pulawy* 2004; 48: 41-5.
7. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2003; 2: 63-76.
8. Kuźma K, Malinowski E, Lassa H, i in. Wytwarzanie enterotoksyn oraz toksyny zespołu wstrząsu toksycznego przez szczepy *Staphylococcus aureus* izolowane z mastitis u krów. *Medycyna Wet* 2005; 61: 282-5.
9. Zieliński A, Czarkowski MP. Choroby zakaźne w Polsce w 2002 roku. *Przegl Epidemiol* 2004; 58: 9-19.
10. Su Y, Wong ACL. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 1438-43.
11. Blaiotta G, Ercolini D, Pennacchia C, i in. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-8802. *J Appl Microbiol* 2004; 97: 719-30.
12. Kuźma K, Malinowski E, Lassa H, i in. Detection of genes for enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Bull Vet Inst Pulawy* 2003; 47: 419-26.
13. Marr JC, Lyon JD, Roberson JR, i in. Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. *Infect Immun* 1993; 61: 4254-62.
14. Orwin PM, Leung DYM, Donahue HL, i in. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect Immun* 2001; 69: 360-6.
15. Niścigorska J. Zatrucie enterotoksyną gronkowcową. W: Boroń-Kaczmarek A, Furowicz AJ, red. *Choroby odzwierzęce przenoszone drogą pokarmową*. Warszawa: PZWL; 1999: 63-5.
16. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 16-34.
17. Shupp JW, Jett M, Pontzer CH. Identification of a transcytosis epitope on staphylococcal enterotoxins. *Infect Immun* 2002; 70: 2178-86.
18. Ren K, Bannan JD, Pancholi V, i in. Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. *J Exp Med* 1994; 180: 1675-83.
19. Furowicz AJ, Borkowski J, Ferlas M. Toxic-shock syndrome with special regard to clinical aspects in animals. Selected problems. *Adv Agric Sci* 2004; 9: 23-32.
20. Fitzgerald JR, Reid SD, Ruotsalainen E, i in. Genome diversification in *Staphylococcus aureus*: molecular evolution of a highly variable chromosomal region encoding the staphylococcal exotoxin-like family of proteins. *Infect Immun* 2003; 71: 2827-38.
21. Letertre C, Perelle S, Dilasser F, i in. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the ege cluster of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol* 2003; 95: 38-43.
22. Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, i in. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1998; 29: 527-43.
23. Bergdoll MS. Enterotoxins. W: Easmon CSF, Adlam C, red. *Staphylococci and staphylococcal infections*. T. 2, The organism in vivo and in vitro. Londyn: AP; 1983: 559-98.
24. Larsen HD, Huda A, Eriksen NHR, i in. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. *Vet Microbiol* 2000; 76: 153-62.

25. Couch JL, Soltis MT, Betley MJ. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol* 1988; 170: 2954-60.
26. Jones CHL, Khan SA. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1986; 166: 29-33.
27. Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, i in. Detection of seg, seh and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring seg, seh, or sei genes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 857-62.
28. Jarraud S, Cozon G, Vandenesch F, i in. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2446-9.
29. Stephan R, Annemüller C, Hassan AA, i in. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet Microbiol* 2001; 78: 373-82.
30. Tollersrud T, Kenny K, Caugant DA, i in. Characterisation of isolates of *Staphylococcus aureus* from acute, chronic and subclinical mastitis in cows in Norway. *APMIS* 2000; 108: 565-72.
31. Salasia SIO, Khusnan Z, Lämmler Ch, i in. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *J Vet Sci* 2004; 5: 103-9.
32. Bayles KW, Iandolo JJ. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol* 1989; 171: 4799-806.
33. Munson SH, Tremaine MT, Betley MJ, i in. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1998; 66: 3337-48.
34. Zschöck M, Riße K, Sommerhäuser J. Occurrence and clonal relatedness of sec/tst-gene positive *Staphylococcus aureus* isolates of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. *Lett Appl Microbiol* 2004; 38: 493-8.
35. Tkáčiková L, Tesfaye A, Mikula I. Detection of the genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxin by PCR. *Acta Vet Brno* 2003; 72: 627-30.
36. Orwin PM, Fitzgerald JR, Leung DYM, i in. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. *Infect Immun* 2003; 71: 2916-9.

Otrzymano: 29.06.2005 r.

Adres autorów:

Paweł Nawrotek
ul. Dr Judyma 24, 71-466 Szczecin
tel. (91) 454 15 21 wew. 384
e-mail: pawel.nawrotek@biot.ar.szczecin.pl