

Enterotoxigenicity of Staphylococci isolated from dehydrated soup mixes

Π. ΚΟΪΔΗΣ, Α. ΜΑΝΤΗΣ, Ι. ΚΑΤΖΑΠΑΝΝΑΚΗΣ

doi: [10.12681/jhvms.21452](https://doi.org/10.12681/jhvms.21452)

Copyright © 2019, Π. ΚΟΪΔΗΣ, Α. ΜΑΝΤΗΣ, Ι. ΚΑΤΖΑΠΑΝΝΑΚΗΣ



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

To cite this article:

ΚΟΪΔΗΣ Π., ΜΑΝΤΗΣ Α., & ΚΑΤΖΑΠΑΝΝΑΚΗΣ Ι. (2019). Enterotoxigenicity of Staphylococci isolated from dehydrated soup mixes. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 31(3), 139–144. <https://doi.org/10.12681/jhvms.21452>

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΤΕΡΟΤΟΞΙΝΩΝ ΑΠΟ ΣΤΕΛΕΧΗ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΑΦΥΔΑΤΩΜΕΝΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Υπό

Π. ΚΟΪΔΗ*, Α. ΜΑΝΤΗ* και Ι. ΚΑΤΖΑΓΙΑΝΝΑΚΗ*

ENTEROTOXIGENICITY OF STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM DEHYDRATED SOUP MIXES

By

P. KOIDIS*, A. MANTIS*, and J. KATZAGIANNAKIS*

S U M M A R Y

Staphylococcus aureus strains isolated from dehydrated soup mixtures were tested for their ability to produce enterotoxins.

From a total of 153 tested, 37 (24.1%) were found to produce enterotoxin A, 143 (93.4%) were coagulase positive and 136 (88.7%) produced thermostable DNase. All enterotoxinogenic strains produced coagulase and thermostable DNase were isolated from 27 samples of the same origin. The strains tested were grown on Casein hydrolysate broth (BBL) and supernatant was concentrated to 1/50 of the original volume and tested with the microslide technique against A.B.C₁, C₂, D and E anti-enterotoxins.

Η παρουσία σταφυλοκόκκων και ιδιαίτερα παθογόνων στελεχών (*S. aureus*) σε διάφορα αφυδατωμένα τρόφιμα όπως κρέας, γάλα, λαχανικά, ζυμαρικά και αρτύματα, έχει αναφερθεί από πολλούς έρευνητές (Bergdoll 1968, Dagneaux και Mossel 1968, Minor και Marth 1972, 1976, Mossel και Shennan 1976).

Ειδικότερα στις αφυδατωμένες σούπες κρέατος οι σταφυλόκοκκοι εμφανίζονται συνήθως σε χαμηλό ποσοστό ή απουσιάζουν έντελως. Έτσι οι Catsaras και συν. (1961), όταν εξέτασαν 100 δείγματα διαφόρων τύπων αφυδατωμένης σούπας κρέατος, διαπίστωσαν ποσοστό μόλυνσεως από *S. aureus* μόνο 2%, ενώ άλλοι έρευνητές όπως οι Coretti και Müggensburg (1967), Dagneaux

* Έργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως Κτηνιατρικής Σχολής του Άριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

και Mossel (1968), Inal και συν. (1975) δέν διαπίστωσαν τήν παρουσία σταφυλοκόκκων στο παραπάνω τρόφιμο. Σε αντίθεση με τὰ παραπάνω δεδομένα, ο Κοϊδής (1979), κατά τήν εξέταση 180 δειγμάτων διαφόρων τύπων αφυδατωμένης σούπας κρέατος διαπίστωσε παρουσία *S. aureus* σε ποσοστό 24% τών δειγμάτων και σε αριθμούς που κυμαίνονταν από 3 έως 100/g.

Έπειδή όμως ή πρόκληση σταφυλοκοκκικής τροφικής τοξινώσεως από τήν κατανάλωση κάποιου τροφίμου εξαρτάται από τήν ικανότητα τών διαφόρων στελεχών *S. aureus* που παράγουν μία ή περισσότερες έντεροτοξίνες και έπειδή μόνον όρισμένα στελέχη χαρακτηρίζονται από έντεροτοξινογόνο ικανότητα, ή διερεύνηση τής ικανότητας αυτής δίνει χρήσιμα στοιχεία για τó βαθμό κινδύνου που παρουσιάζει ένα τρόφιμο που περιέχει σταφυλόκοκκους.

Στήν έργασία αυτή δίνονται στοιχεία σχετικά με όρισμένα βιοχημικά χαρακτηριστικά καθώς και τήν έντεροτοξινογόνο ικανότητα στελεχών σταφυλοκόκκων που απομονώθηκαν από αφυδατωμένα μίγματα σουπών κρέατος.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

1. Προέλευση στελεχών:

Τά στελέχη σταφυλοκόκκων που εξέτάσθηκαν προέρχονταν από 180 δείγματα αφυδατωμένων σουπών κρέατος. Η απομόνωση τών στελεχών έγινε με τή χρήση του έμπλουτιστικού υποστρώματος Giolitti-Cantoni Broth (Giolitti και Cantoni, 1980) σε συνδυασμό με τó υπόστρωμα Tellurite Polymyxin Egg-Yolk Agar (Crisley και συν. 1965) όπως περιγράφεται από τούς Μάντη και Καραϊώαννογλου (1978) και Κοϊδή (1979).

2. Δοκιμή καταλάσης:

Η δοκιμή καταλάσης γινόταν με τήν τεχνική αντικειμενοφόρου πλάκας. Μία σταγόνα υπεροξειδίου του υδρογόνου 3% αναμιγνυόταν πάνω σε αντικειμενοφόρο με ποσότητα 24ωρης καλλιέργειας του στελέχους σε Trypticase Soy Agar τής BBL. Η παραγωγή αερίου, με τή μορφή φυσαλίδων λαμβανόταν σαν θετική δοκιμή.

3. Ζύμωση άναεροβίως τής γλυκόζης (O/F test):

Γινόταν με χρήση του υποστρώματος Hugh και Leifson (Biolife) όπως περιγράφεται από τόν Mossel (1962).

4. Δοκιμή πηκτάσης:

Η ικανότητα παραγωγής πηκτάσης από τὰ στελέχη έλεγχόταν αρχικά με τή μέθοδο «πλακός» και τὰ άρνητικά στελέχη υποβάλλονταν στη δοκιμή με τή μέθοδο τών σωλήνων (Cowan και Steel, 1966). Χρησιμοποιήθηκε λυοφιλοποιημένο πλάσμα κονίκλου τής DIFCO (Bacto-Coagulase Plasma EDTA).

5. Έλεγχος παραγωγής θερμοανθεκτικής DNase(δεσοξυριβοζονουκλεάσης):

Η δοκιμή τής θερμοανθεκτικής DNase γινόταν με τή χρήση του υποστρώματος DNase test Agar τής BBL. Τά προς δοκιμή στελέχη ένοφθαλμιζονταν σε ζωμό BHI (BBL) και έπιάζονταν στους 37°C για 24 ώρες και στη

συνέχεια οί καλλιέργειες τοποθετούνταν για 15' σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 98-100°C. Σε τρυβλία που περιείχαν το υπόστρωμα DNase Agar διανοίγονταν πέντε κυκλικές έμβασθύνσεις (βοθρία) διαμέτρου 2mm (τέσσερις στην περιφέρεια και μία στο κέντρο, σε σχήμα σταυρού). Ο βυθός των βοθρίων σφραγιζόταν με μιá σταγόνα στείρου διαλύματος 1% ρευστού agar και στη συνέχεια τὰ περιφερικά βοθρία γεμίζονταν με καλλιέργεια στελεχών που θερμάνθηκε. Το κεντρικό βοθρίο γεμίζονταν με καλλιέργεια στελέχους θετικού μάρτυρα.

Τὰ τρυβλία επώάζονταν στους 37°C για 2-4 ώρες και στη συνέχεια κατακλύζονταν με διάλυμα N HCl όξέος. Έμφάνιση διαυγούς ζώνης γύρω από το βοθρίο έρμηνευόταν σαν θετικό αποτέλεσμα (παραγωγή θερμοανθεκτικής NDase).

6. Δοκιμή ίκανότητας παραγωγής έντεροτοξίνης:

Για τόν έλεγχο της ίκανότητας παραγωγής έντεροτοξίνης χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα Casein Hydrolysate Broth (BBL). Φιάλες Erlenmeyer που περιείχαν 100 ml από το παραπάνω υπόστρωμα ένοφθαλμιζόταν με 1 ml 18ωρης καλλιέργειας του στελέχους σε ζωμό Brain Heart Infusion (B.H.I.) και στη συνέχεια επώάζονταν στους 37°C σε υδατόλουτρο που διέθετε σύστημα άνακινήσεως μέχρι να έπιτευχθεί έντονη ανάπτυξη του στελέχους.

Άκολουθούσε φυγοκέντρωση της καλλιέργειας σε ψυχόμενη φυγόκεντρο σε 10.000 rpm επί 20' και το έπιπλέον υγρό υποβαλόταν σε έξισορροπητική όσμωτική διάλυση έναντι 20πλασίου όγκου διασπασταγμένου ύδατος σε θερμοκρασία 4°C για 24 ώρες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν σάκκοι όξικής κυτταρίνης διαμέτρου 3 cm περίπου και μεγέθους πόρων 48 Å.

Στη συνέχεια το ύλικό των σάκκων συμπυκνωνόταν σε διάλυμα 30% PVP (Polyvinyl Pyrolidone) M.W.=2.000 μέχρι όγκου περίπου 1ml. Το συμπύκνωμα παραλαμβάνόταν με 1ml 0,02 M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος pH=7,2, φυγοκεντριόταν σε 18.000rpm σε ψυχόμενη υπερφυγόκεντρο για 30' και το διαυγασμένο πλέον υγρό έλεγχόταν για την ύπαρξη έντεροτοξινών με την μέθοδο της άνασοδιαχύσεως σε άντικειμενοφόρο πλάκα σύμφωνα με την τεχνική των Zehren και Zehren (1968), όπως περιγράφεται από τόν Μάντη (1973).

Τὰ στελέχη εξέτάστηκαν για παραγωγή έντεροτοξινών A,B,C₁,C₂, D και E με άντιστοιχούς άντι-ορούς.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Έξετάστηκαν συνολικά 153 στελέχη σταφυλοκόκκων από τὰ όποια, όπως φαίνεται στον πίνακα 1, τὰ 143 (ποσοστό 93,4) ήταν θετικά στη δοκιμή της πηκτάσης, τὰ 136 (ποσοστό 88,7%) ήταν θετικά για θερμοανθεκτική DNase, ενώ τὰ 37 (ποσοστό 24,1%) παρήγαν έντεροτοξίνη τύπου A. Τέλος όλα τὰ στελέχη που εξέτάστηκαν ήσαν θετικά στη δοκιμή καταλάσης και ζύμωναν άναεροβίως τη γλυκόζη.

Τὰ 37 έντεροτοξινογόνα στελέχη προέρχονταν από 27 δείγματα άφυδατω-

μένων σουπών κρέατος τύπου «κοτόσουπα με ζυμαρικά» ελληνικής προελεύσεως.

Τά αποτελέσματα επιπλέον έδειξαν ότι, ποσοστό 95,1 από τὰ θετικά στηηηκτάση στελέχη ήταν θετικά και στη DNase. Η συνύπαρξη τών δύο αυτών βιοχημικών χαρακτηριστικών σε ποσοστό από 95% έως 100% στα στελέχη σταφυλοκόκκων έχει διαπιστωθεί και από άλλους έρευνητές (Lachica και συν. 1969, 1971, PULLEN και GENIGEORGIS 1977, AHMED και συν. 1978).

Πίνακας 1

Βιοχημικοί παράμετροι στελεχών σταφυλοκόκκων που άπομονώθηκαν από άφυδατωμένες σουπες κρέατος.

	Θετικά	Άρνητικά	Ποσοστό %	Σύνολο
Καταλάση	153	-	100	153
Ζύμωση άναεροβίως της γλυκόζης	153	-	100	153
Πηκτάση	143	10	93,4	153
Θερμοανθεκτική DNase	136	17	88,7	153
Έντεροτοξίνη	37	116	24,1	153

Όλα τὰ στελέχη που άποδείχτηκαν έντεροτοξινογόνα, ήταν θετικά στις δοκιμές ηηκτάσης και DNασης. Δέν πρέπει όμως να παραβλέπεται τó γεγονός ότι έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία και άπομονώσεις έντεροτοξινογόνων στελεχών άρνητικών στη δοκιμή ηηκτάσης (Thatcher και Simon 1956, Bergdoll και συν. 1067).

Ένα άξιοπρόσεκτο σημείο αυτης της έρευνας είναι ότι τὰ στελέχη παρήγαν μόνο έντεροτοξίνη τύπου Α καιτοι έλέγχθησαν και για τις ύπόλοιπες γνωστές έντεροτοξίνες όπως Β, C, D και Ε. Αυτό σε συνδυασμό με τó γεγονός ότι τὰ έντεροτοξινογόνα στελέχη άπομονώθηκαν όλα από δείγματα τροφίμου της αυτης προελεύσεως ύποδηλώνει κοινή πηγή μόλυνσεως. Υπέρ αυτης της άπόψεως συνηγορεί και τó γεγονός ότι τó κρέας τών πουλερικών ύποβάλλεται σε πολλαπλούς χειρισμούς μετά τó βρασμό, προκειμένου να άποστεωθεί, να γίνει ή έπιλογή του και να μετατραπεί σε πολύ μικρά κομμάτια τὰ όποια θά χρησιμοποιηθοϋν για την παρασκευή του μίγματος της άφυδατωμένης σουπας (Κοϊδης, 1979). Έτσι εκτίθεται σε μόλυνση από τὰ χέρια τών εργατών, οι όποιοι είναι συνήθως και ή κυριώτερη πηγή έντεροτοξινογόνων στελεχών σταφυλοκόκκου (Pablo και συν. 1966, Bergdoll 1968, Angelotti 1969, Βατοπούλου και συν. 1969, Παπαπαναγιώτου 1969, Malaki και συν. 1973).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Διερευνήθηκε ή ικανότητα παραγωγής έντεροτοξινών σε εϋνοϊκά ύποστρώματα 153 στελεχών σταφυλοκόκκων που άπομονώθηκαν από άφυδατωμένες σουπες κρέατος. Η άνίχνευση

τῶν ἐντεροτοξινῶν ἐγινε μὲ τὴ μέθοδο τῆς ἀνοσοδιαχύσεως σὲ στοιβάδα ἄγαρ πάνω σὲ ἀντικειμενοφόρο πλάκα (micro-slide test). Ἐπιπλέον τὰ στελέχη ἐξετάστηκαν ὡς πρὸς τὴν ἱκανότητα παραγωγῆς καταλάσης, ἀναερόβιας ζυμώσεως τῆς γλυκόζης, παραγωγῆς πηκτάσης καὶ θερμοανθεκτικῆς DNAσης.

Τὰ ἀποτελέσματα ἔδειξαν ὅτι 37 ἀπὸ τὰ στελέχη (ποσοστὸ 24,1%) παρήγαγαν ἐντεροτοξίνη τύπου Α. 143 (ποσοστὸ 93,4%) ἔδιναν θετικὴ τὴ δοκιμὴ πηκτάσης καὶ 136 (ποσοστὸ 88,7%) θετικὴ τὴ δοκιμὴ θερμοανθεκτικῆς DNAσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ahmed, A.A., Terplan, G., and E. Simon, 1978: Enterotoxigenicity of staphylococcal strains isolated from milk and dairy products. *Arch. Lebensmittelhyg.* 29: 212-214.
2. Angelotti, R. 1969: Staphylococcal Intoxication (in «Food-borne Infections and Intoxications»). H. Riemann, Edit. Academic Press, New York and London.
3. Βατοπούλου, Θ., Πετροπούλου, Δ., Μαυροειδῆ, Α. καὶ Ε. Λιάπα, 1969: Ἐρευνα ἐπὶ τῶν παθογόνων σταφυλοκόκκων. Πρακτ. 2ου Ἐθν. Συμπ. Μικροβιολ. σελ. 179. Ἀθήναι.
4. Bergdoll, M.S., Weiss, K.F., and M.J. Muster, 1967: The production of staphylococcal enterotoxin by a coagulase negative microorganism. *Bacteriol. Proc.* 1967: 12.
5. Bergdoll, M.S. 1968: Staphyloenterotoxins in dried foods. 6th International Symposium on Food Microbiology. p 225. Bilthoven, the Netherlands.
6. Catsaras, J.J., Sampaio-Ramos, M.H., et R. Buttiaux, 1961: Etude microbiologique des potages dehydrates ou concentrés du marché Français. *Ann. Inst. Pasteur, Lille.* 12:163.
7. Coretti, K., and H. Muggenburg, 1967: Keimgehalt von trockensuppen und seine beurteilung. *Feinkostwirtschaft.* 4: 76-78, 108-115.
8. Cowan, S.T., and K.J. Steel, 1966: Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press, London.
9. Crisley, F.D., Peeler, J.T., and R. Angelotti, 1965: Comparative evaluation of five selective and differential media for the detection and enumeration of coagulase positive staphylococci in foods. *Appl. Microbiol.* 13: 140.
10. Dagneaux, E.L.K., and D.A.A. Mossel, 1968: The microbiological condition of dried soups. 6th International Symposium on Food Microbiology. p. 411. Bilthoven, the Netherlands.
11. Giolitti, G., and C. Cantoni, 1965: A medium for the isolation of staphylococci from foodstuffs. *J. Appl. Bact.* 29: 395.
12. Inal, T., Kaymar, S., Yildirim, Y., and M. Unsal, 1975: Untersuchungen über Bakterienflora der Trockensuppen. *J. Fac. Vet. Med. Istanbul.* 1. (1): 20.
13. Κοϊδῆς, Π. 1979: Ἀφυδατωμένα σοῦπαι καὶ ζωμοὶ κρέατος. Ἐρευνα ἐπὶ

- της υγιεινολογικής αὐτῶν καταστάσεως. Διατριβὴ ἐπὶ διδακτορία. Θεσσαλονίκη.
14. Lachica, R.V.F., Weiss, K.F., and R.H. Deibel, 1969: Relationships among coagulase, enterotoxin and heat stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 18: 126-127.
 15. Lachica, R.V.F., Hoeprieh, P.D., and C. Genigeorgis, 1971: Nuclease production and lysostaphin susceptibility of *Staphylococcus aureus* and other catalase positive cocci. *Appl. Microbiol.* 21: 823-826.
 16. Malaki, M., Kohneshahri, M., and R. Charagozloo, 1973: Bacteriophage. Typing of *Staphylococci* isolated from foodstuffs and handlers in Tehran. *J.Milk Food Technol.* 36: 262.
 17. Μάντης, Α. καὶ Πρ. Καραϊωάννογλου, 1978. Μικροβιολογικὴ ἀνάλυση τροφίμων. Θεσσαλονίκη.
 18. Μάντης, Α.Ι. 1973: Συνθήκαι παραγωγῆς σταφυλοκοκκικῶν ἐντεροτοξινῶν εἰς τυρόν «φέτα». Διατριβὴ ἐπὶ ὑψηγεία. Θεσσαλονίκη.
 19. Minor, T.E., and E.H. Marth, 1972: *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* food intoxications. A review. IV. *Staphylococci* in meat, bakery products and other foods. *J.Milk Food Technol.* 35: 228.
 20. Minor, T.E., and E.H. Marth, 1976: *Staphylococci* and their significance in foods. Elsevier. Amsterdam, Oxford, New York.
 21. Mossel, D.A.A. 1962: Attempt in classification of catalase-positive staphylococci and micrococci. *J.Bacteriol.* 84: 1140-1147.
 22. Mossel, D.A.A., and J.L. Shennan, 1976: Micro-organisms in dried foods. Their significance, limitation and enumeration. *J. Food Technol.* 11: 205.
 23. Pablo, S.I., Silverman, G.J., and S.A. Goldblith, 1966: Microbial growth patterns of rehydrated freeze-dried foods. II. Chicken. *J. Food Sci.* 31: 245.
 24. Παπαπαναγιώτου, Ι. 1969: Τροφικαὶ δηλητηριάσεις ἐκ σταφυλοκόκκων. Πρακτ. 2ου Ἐθν. Συμπ. Μικροβιολ. σελ. 27. Ἀθήναι.
 25. Pullen, M.M., and C.A. Genigeorgis, 1977: A study of coagulase-positive staphylococci in salami before fermentation. *J. Food Prot.* 40: 704-708.
 26. Thatcher, F.S., and W.A. Simon, 1956. A comparative appraisal of the properties of «staphylococci» isolated from clinical sites and from dairy products. *Can. J. Microbiol.* 2: 703-714.
 27. Zehren, V.L., and V.F. Zehren, 1968: Examination of large qualities of cheese for staphylococcal enterotoxin. *A.J. Dairy Sci.* 51: 635.