

ENTEROTOKSĪNUS VEIDOJOŠIE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CELMI LATVIJĀ REALIZĒTAJOS PIENA PRODUKTOS

THE PREVALENCE OF ENTEROTOXINS PRODUCING *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS IN MILK PRODUCTS MARKETED IN LATVIAN

Joffe Rafaels¹, Birģele Edīte², Baranovičs Edgars³

Pārtikas un veterinārā dienesta Nacionālais diagnostikas centrs, Latvija¹, LLU
Veterinārmedicīnas fakultātes, Latvija², SIA "Pārtikas higiēnas laboratorija Auctoritas",
Latvija³

National Diagnostic Centre of Food and Veterinary Service, Latvia¹, Faculty of Veterinary
Medicine LLU, Latvia², Food Hygiene Laboratory Auctoritas Ltd, Latvia³
rafaels.joffe@ndc.gov.lv, Edite.Birģele@llu.lv, eb_phl@edi.lv

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is well known as a one of the most important causative agent of food poisoning, especially in milk and milk products. However, the most of the staphylococcal strains are enterotoxigenic and produce one or several enterotoxin serotypes.

In the article results of investigation are shown:

1. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in milk products marketed in Latvia.
2. The possible relationship with mastitic milk and contamination of milk products with enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*.

During investigations were found, that the 24,1 % of *S.aureus* isolates from machine made milk products and 15,2 % of *S.aureus* isolates from milk products on market can produce enterotoxins. The enterotoxin producing *S.aureus* were found in all analyzed milk products, except fermented milk products.

The enterotoxin A (SEA) producing *S.aureus* are the dominant strain in the machine made milk products in Latvia, but SEA, SEB and SEC strains were found in milk products, marketed in Latvia.

KEY WORDS. *Staphylococcus aureus*, enterotoxins.

IEVADS

Pasaules zinātniskajā literatūrā piena produkti visai bieži ierindoti kā vieni no galvenajiem avotiem pārtikas toksikoinfekciju izcelsmē, pateicoties to kontaminācijai ar enterotoksīnus veidojošiem stafilokokiem. Vairāku autoru darbos atspoguļoti pētījumi par piena produktu kvalitāti un to ietekmējošiem faktoriem, un visai bieži uzsvērta tā saucamā subklīniskā mastīta piena nozīme pārtikas toksikoinfekciju etioloģijā (Cenci-Goga et.al, 2003; Loncarevic et.al., 2005). To pierāda gan salīdzinoši lielais enterotoksīnus veidojošo *S.aureus* celmu īpatsvars ar mastītu slimo govju pienā – no 13,8% (Cenci-Goga et al., 2003) līdz pat 67,8% (Katsuda, 2005), gan mūsu līdzšinējie pētījumi, kuros pierādījām, ka 77,3% no mastīta slimo govju piena izdalītie *S.aureus* veido enterotoksīnus. Jāatzīmē, ka līdztekus primārajam kontaminācijas avotam, t.i., ar mastītu slimo govju pienam, enterotoksīnus veidojošo *S.aureus* celmu izplatībā sekundāra loma ir gan piena produktu pagatavošanas tehnoloģijai (rūpnieciski un individuālās saimniecībās ražotie piena produkti, kas tiek realizēti atklātajās tirdzniecības vietās), gan to uzglabāšanas un realizācijas sanitārhygiēniskajiem apstākļiem (temperatūra, sekundārās kontaminācijas novēršanas pasākumi).

Kā zināms, *S.aureus* spēj veidot vairākus enterotoksīnu serotipus un šobrīd atklāti vismaz 18 atšķirīgi seroloģiskie enterotoksīnu tipi (SE): A - U (Munson 1998; Loir et.al, 2003; Omoe et.al, 2003; 2004; Becker et al., 2004; Zschock et al., 2005). Pārtikas toksikoinfekciju gadījumos visbiežāk izdalīti *S.aureus* enterotoksīni A līdz D, turklāt bieži vien daudzi *Staphylococcus aureus* celmi producē vienlaikus divus vai vairākus enterotoksīnu tipus (Halpin - Dohnalek 1989; Orwin et.al, 2001).

Ņemot vērā piena produktu ražošanas un aprites tradīcijas Latvijā, un to, ka Latvijas tirgos tiek realizēts arī atsevišķās saimniecībās iegūts nepasterizēts piens un no tā gatavotie piena produkti, mūsu **darba mērķis** bija izpētīt enterotoksīnus veidojošo *S.aureus* celmu īpatsvaru gan rūpnieciski ražotos piena produktos, gan Latvijas tirgos realizācijā esošajos piena produktos un noskaidrot, kādus enterotoksīnu serotipus veido izdalītie stafilokoku celmi.

MATERIĀLS UN METODES

Kopumā analizēti 330 piena produktu paraugi, kas atlasīti piena pārstrādes uzņēmumos Latvijā un 313 piena, krējuma un biezpiena paraugi, kas iegūti Kurzemes, Zemgales, Vidzemes un Latgales reģionu tirgos un atklātajās tirdzniecības vietās. *S.aureus* noteicām ar starptautiski atzītu un zinātniski pamatotu metodi *LVS EN ISO 6888-1 : 1999*, izmantojot selektīvu barotni Baird-Parker agaru un trušu asins plazmu koagulāzes pierādīšanai. Lai veiktu izdalīto plazmu koagulējošo stafilokoku identifikāciju, izvēlējāmies speciālus bioķīmisko īpašību pārbaudes testus API-STAPH (20500, BioMérieux, France), kas ļāva precīzi noteikt izdalītā celma piederību *S.aureus*. Lai pierādītu enterotoksīnus veidojošos *S.aureus* celmus, izmantojām vienu no jaunākajām, pasaulē atzītajām metodēm - ar enzīmu saistītās imunofluorescences metodi (ELFA jeb `enzyme linked fluorescence assay` - angļu val.) (Pimbley, Patel, 1998), kas ir vispārzināma un atzīta metode stafilokoku enterotoksīnu noteikšanai. Stafilokoku enterotoksīnu klātbūtne izmeklējamā paraugā tika pierādīta, izmantojot Francijas firmas *BioMérieux* analizatoru *miniVIDAS* un speciālus enterotoksīnu noteikšanas testus *VIDAS Staph enterotoxin SET* (30701, *BioMérieux*, France).

Ar enzīmu saistītās imunofluorescences metodi izmantojām, lai identificētu enterotoksīnus veidojošos *S.aureus* celmus, jo tai ir augsta jutības pakāpe un specifiskums (ar tās palīdzību var noteikt enterotoksīnu serotipu A, B, C un D klātbūtni) (Pimbley, Patel, 1998). Lai nodrošinātu veikto analīžu ticamību, kontrolei izmantojām testu komplektācijā esošos enterotoksīnu standartšķīdumus. Šādu kvalitātes kontroli atkārtojām ik pēc 14 dienām. Precīzi noskaidrojot, tieši kuri no izdalītajiem *S.aureus* celmiem spēj veidot enterotoksīnus, mūsu turpmākais uzdevums bija noteikt, kādus enterotoksīnu serotipus veido konkrētie *S.aureus* celmi.

Enterotoksīnu serotipēšanai pielietojām t.s. reversās pasīvās lateksa aglutinācijas metodi, izmantojot *SET-RPLA Staphylococcus enterotoxin A, B, C, D detection kit* (TD 9000, Oxoid, U.K., 1996) testus. Analīžu ticamības pārbaudei izmantojām testu komplektācijā esošos enterotoksīnu A, B, C un D standartšķīdumus. Šādas kvalitātes pārbaudes veicām katru reizi, kad analizējām pētāmos paraugus. Reversās pasīvās lateksa aglutinācijas metode ir starptautiski atzīta metode enterotoksīnu serotipēšanai. Tā izstrādāta, balstoties uz imunoloģisko reakciju principiem, t.i., enterotoksīnu saistību ar specifiskām antivielām, precīzi nosakot enterotoksīnu serotipus A (SEA), SEB, SEC un SED (Bankes, Rose, 1998). Pierādīts, ka šīs metodes jutība ir ekvivalenta ar enzīmu saistītās imunofluorescences metodes jutībai (Bankes, Rose, 1998). Līdz ar to izmantojot šos testus, mums izdevās noteikt, kādus enterotoksīnus spēj veidot no piena produktiem izdalītie *S.aureus* celmi un raksturot noteiktu enterotoksīnu serotipu veidojošo *S.aureus* populāciju Latvijas teritorijā.

REZULTĀTI

Staphylococcus aureus un enterotoksīnus veidojošo celmu pētījumu rezultāti apkopoti 1.tabulā.

***Staphylococcus aureus* un enterotoksīnus veidojošie celmi pienā un piena produktos**
The prevalence of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin producing strains
in milk and milk products

Nosaukums Name	Analizēto paraugu skaits No of analysed samples	Paraugu skaits, kuros pierādīts <i>S.aureus</i> No. of samples, where <i>S.aureus</i> detected	Paraugu skaits, kuros pierādīti enterotoksīnus veidojošie <i>S.aureus</i> celmi No. of samples, the enterotoxin producing <i>S.aureus</i> strains were found	
			Skaitis	%
<i>Sviests</i> Butter	6	1 (16.7%)	0	0
<i>Siers</i> Cheese	92	4 (4.3%)	1	25.0
Skābpiena produkti Fermented milk products	52	0	0	0
Citi piena produkti* Other milk products	180	24 (13.3%)	6	25.0
Rūpnieciski ražotie piena produkti (kopā) Machine-made milk products (total)	330	29 (8.8%)	7	24.1
Piens Milk	116	51 (43.9%)	5	9.8
Biezpiens Cottage cheese	100	34 (34.0%)	10	29.4
Skābais krējums Sour cream	97	53 (54.6%)	6	11.3
Tirgū realizētie piena produkti (kopā) Milk and milk products on market (total)	313	138 (44.1%)	21	15.2

* Citi piena produkti - biezpiens, krējums, deserti uz piena bāzes, biezpiena sieriņi

Tā kā Latvijā tradicionāli ir attīstīta arī piena produktu ražošanas piemājas saimniecībās un to tirdzniecība atklātajās tirdzniecības vietās un tirgos, pētījumos šī piena produktu grupa tika izvēlēta līdztekus rūpnieciski ražotiem piena produktiem, lai novērtētu enterotoksīnus veidojošo *S.aureus* izplatību nozīmīgajos piena produktu ražošanas un aprites posmos. Rūpnieciski ražotajos piena produktos *S.aureus* izdalīts 8.8% analizēto produktu paraugu, savukārt tirgū realizācijā esošajos piena produktos *S.aureus* sastopamība procentuāli ir ievērojami augstāka – 44.1% analizēto paraugu izdalīts *S.aureus*. Savukārt, pārbaudot izdalīto stafilokoku celmu spēju veidot enterotoksīnus, konstatējām, ka 24.1% no rūpnieciski ražotajiem piena produktiem izdalītajiem *S.aureus* celmiem veido enterotoksīnus, bet tirgos un atklātajās tirdzniecības vietās realizētajos piena produktos enterotoksīnus veidojošie *S.aureus* sastopami 15.2% gadījumos.

Analizējot iegūtos rezultātus, kas iegūti, analizējot dažādus piena produktus, redzams, ka rūpnieciski ražoto piena produktu grupā enterotoksīnus veidojošie celmi izdalīti vienā siera paraugā jeb 25.0% gadījumos un sešos citu piena produktu paraugos, t.i., 25.0% gadījumos. Sviesta un skābpiena produktu paraugos enterotoksīnus veidojošie celmi nav pierādīti. Savukārt, ievērojami vairāk enterotoksīnus veidojošos celmus nākas izdalīt no tirgū realizētajiem jeb piemājas saimniecībās ražotajiem piena produktiem. Procentuāli visvairāk šie celmi izdalīti no biezpiena un skābā krējuma paraugiem – attiecīgi 29.4% un 11.3% gadījumos, mazāk no piena – 9.8% gadījumos.

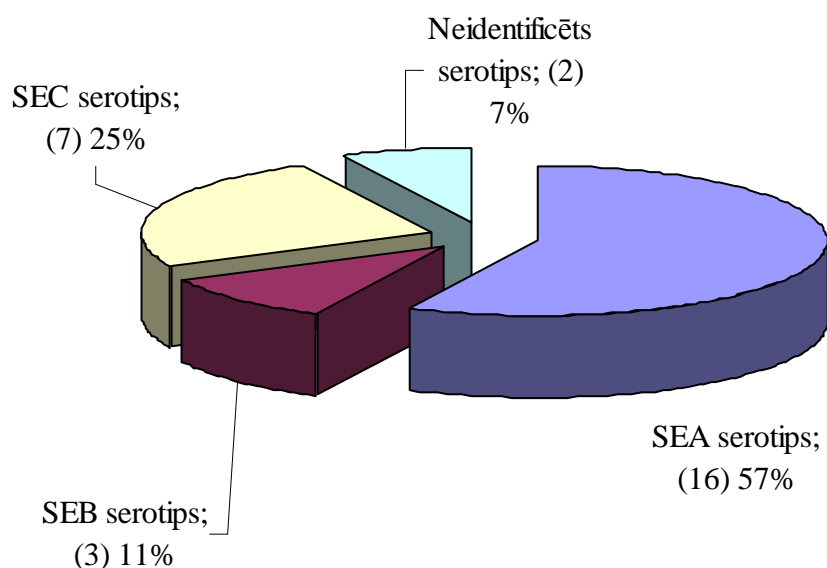
Stafilokoku enterotoksīnu kvalitatīvās izmaiņas piena produktos atspoguļotas 2.tabulā un 1.attēlā. Visās paraugu grupās kā dominējošais celms izdalīts enterotoksīnu A (SEA) veidojošais *S.aureus*. Ievērojami mazāk *S.aureus* celmiem izteikta spēja veidot enterotoksīnu B (SEB) un C (SEC). Divos piena produktu paraugos izdalīti seroloģiski neidentificējami enterotoksīni. Iegūtie rezultāti parāda, ka rūpnieciski ražotos piena produktos stafilokoku enterotoksīns A ir vienīgais izdalītais serotips, bet no tirgū realizētajiem piena produktiem līdztekus enterotoksīnam A salīdzinoši bieži nākas izdalīt arī enterotoksīnu B un enterotoksīnu C veidojošos celmus. *S.aureus* celmi, kas vienlaikus veido vairākus enterotoksīnu serotipus, pētītajos piena produktu paraugos nav konstatēti.

2.tabula / Table 2

***Staphylococcus aureus* enterotoksīnu serotipi piena produktos Latvijā**
The prevalence of *Staphylococcus aureus* enterotoxin serotypes in Latvia

Piena produktu grupas	SEA	SEB	SEC	Neidentificēts serotips
Rūpnieciski ražotie piena produkti ¹⁾	7	0	0	0
Tirgū realizētie piena produkti ²⁾	9	3	7	2
TOTAL	16	3	7	2

* SE – Stafilokoku enterotoksīni. ¹⁾ Joffe, 2002. ²⁾ Joffe, Birģele, 2006.



1.attēls. ***Staphylococcus aureus* enterotoksīnu serotipi piena produktos Latvijā**
Figure 1. The prevalence of *Staphylococcus aureus* enterotoxin serotypes in milk products in Latvia

DISKUSIJA

Staphylococcus aureus sastopamība rūpnieciski ražotos piena produktos ir visai zema (8.8%). Skābpiena produktos stafilokoki netika konstatēti, kas varētu būt saistīts ar fizikāli ķīmisko un bioloģisko faktoru ietekmi uz stafilokoku šūnu augšanu, vairošanos un

enterotoksīnu veidošanos. Kā jau norādījuši vairāki autori (Asperger, 1994; Halpin-Dohnalek, Marth, 1989), skāba vides reakcija ($\text{pH} < 4,0$) un pienskābo baktēriju (*Lactobacillus acidophilus*, *L.casei*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacteria*) un raugu (kefīra ieraugs) klātbūtne rada nelabvēlīgus apstākļus stafilokoku augšanai un enterotoksīnu veidošanai. Kā zināms, zemākā pH vērtība ir 4,0, lai *S.aureus* šūnas vēl spētu augt un vairoties, bet enterotoksīnu sintēzei minimālais pH ir 4,8. Skāba vide un stafilokoku izteikta jutība mikroorganismu konkurences apstākļos (pienskābo baktēriju klātbūtne) ir nozīmīgi faktori, kas liedz stafilokokiem iespēju attīstīties un saglabāt dzīvotspēju skābpiena produktos, tādēļ no riska analīzes un piesārņojuma ar stafilokoku enterotoksīniem viedokļa šos produktus var uzskatīt par drošiem un nekaitīgiem.

Jāatzīmē, ka rūpnieciski ražotos piena produktos enterotoksīnus veidojošo celmu īpatsvars ir zems. Jāņem vērā, ka piena produktu ražošanas procesā izejviela – nepasterizēts piens tiek gan mehāniski (separēšana, piena tauku atdalīšana, atšķaidīšana), gan termiski (pasterizācija) apstrādāts, kā rezultātā lielākā daļa baktēriju tiek iznīcinātas un produkta kontaminācijas pakāpe ir ļoti zema. Bet piena apstrādes procesā netiek iznīcināti stafilokoku enterotoksīni, kas, kā zināms, ir termostabili savienojumi, tādēļ nevar noliegt, ka piena produkti nesatur šos toksīnus. Tādējādi, ja piena produktu ražošanai izmanto nekvalitatīvu izejvielu – nepasterizētu pienu, kas ievērojami piesārņots ar *S.aureus* (> 105 KVV/ml), pastāv nopietns risks produktu kontaminācijai ar stafilokoku enterotoksīniem un tādā koncentrācijā, kas var būt kaitīga patērētāju veselībai. Jāpiebilst, ka mūsu darbā iegūtie rezultāti parādīja, ka *S.aureus* no piena produktiem tiek izdalīts procentuāli maz (8,8% no analizēto paraugu skaita), kā arī Latvijā nav datu par toksikoinfekciju gadījumiem, ko būtu izraisījuši stafilokoku enterotoksīni rūpnieciski ražotos piena produktos.

Enterotoksīnus veidojošo *S.aureus* īpatsvars tirgū realizētajā pienā arī ir visai zems. Varam pieņemt, ka tirgū realizācijā nonākušais piens ir jau termizēts, kas daļēji samazina sākotnējo baktēriju koncentrāciju pienā. Tomēr, ja analizējam *S.aureus* gadījumu skaitu piena paraugos, tas ir visai augsts – 43,9% gadījumu. Jāņem vērā fakts, ka konkrētā saimniecība pārdod koppienu, kas iegūts no vairākām govīm, tādēļ nākotnē būtu stingri jāizanalizē konkrētas saimniecības sanitārhygiēniskais stāvoklis un subklīniskā mastīta izplatība.

Kas attiecas uz *S.aureus* enterotoksīnu klātbūtni biezpiena un krējuma paraugos, redzams, ka to daudzums ir salīdzinoši lielāks nekā pienā. Zināms, ka biezpiens un krējums ir piena tauku un proteīna koncentrāts, līdz ar to šajos produktos to gatavošanas procesā piens tiek koncentrēts kopā ar visām tajā esošajām baktērijām, kas noved pie enterotoksīnus veidojošo stafilokoku īpatsvara pieaugumu šajos produktos. Ja rūpnieciskā procesa laikā lielākā daļa baktēriju šūnu tiek atdalītas ar separatoru un centrifūgu palīdzību, tad individuālajās saimniecībās gatavotajos piena produktos šīs tehnoloģijas pārsvarā netiek izmantotas. Kā zināms, stafilokoki ir rezistenti pret izžūšanu, tādēļ nepietiekami tīri trauki var būt papildus piena produktu kontaminācijas avots to izgatavošanas procesā (Sinell 1980; Halpin-Dohnalek 1989; Miwa 2001). Personāla higiēnas nozīme pārtikas produktu gatavošanas laikā ir būtiska sevišķi tad, kad tiek izmantots roku darbs kā tas ir biezpiena ražošanas procesā individuālajās saimniecībās. Jāatzīmē, ka stafilokoki ir izturīgi pret termisko apstrādi zemākās temperatūrās ($< 55^{\circ}\text{C}$) (Adams et.al, 1995). Ja ieraudzētā piena uzkaršēšana biezpiena gatavošanas procesā nav pietiekoša, lai iznīcinātu tajā esošās baktērijas, turklāt piena sākotnējā mikrobioloģiskā piesārņojuma līmenis ir bijis augsts, pieaug arī iespēja biežāk izdalīt stafilokokus un enterotoksīnus veidojošos celmus. Tātad varam secināt, ka tirgos realizācijā esošo piena produktu kvalitāti nosaka gan izejvielas kvalitāte, gan produktu gatavošanas process, gan arī uzglabāšanas un realizācijas apstākļi.

Vērtējot iegūtos rezultātus, var pieņemt, ka Latvijas tirgū realizācijā esošā piena un piena produktu kā primārais kontaminācijas ar *S.aureus* avots ir piens, kas iegūts saimniecībās, kurās govīm izplatīts *S.aureus* ierosinātais mastīts. Ir vairāk vai mazāk

pieņēmumu, ko apstiprina citu autoru darbos publicētie dati (Cenci-Goga et.al, 2003; Loncarevic et.al., 2005).

Jāatzīmē, ka enterotoksīnus veidojošie *S.aureus* celmi literatūrā tiek aprakstīti kā vieni no pārtikas saindēšanās izraisītājiem, īpaši enterotoksīnu A veidojošie *S.aureus* celmi (Evenson et.al, 1988; Yamashita et.al, 2003; Ikeda et.al, 2005). Šo apgalvojumu zināmā mērā apliecina pētījumu rezultāti, kas parāda stafilokoku enterotoksīna A (SEA) prevalenci gan rūpnieciski ražotos piena produktos (šajos produktos enterotoksīns A ir vienīgais izdalītais serotips), gan tirgū realizētajos piena produktos. Lai arī atsevišķu autoru pētījumos uzsvērtā SEB, SEC un SED prevalence (Tollersrud et.al, 2000; Stephan et.al, 2001; Nagase et.al, 2002), tomēr jāņem vērā, ka noteikta stafilokoku populācija var būt lokalizēta kādā konkrētā reģionā un valstī, kā jau to norādīšu vairāki zinātnieki (Annemüller et.al, 1999; Stephan et.al, 2001; Joo et.al, 2001). Iegūto rezultātu statistiskās analīzes dati arī parādīja stafilokoku enterotoksīna A ievērojamu pārsvaru rūpnieciski ražotos piena produktos (Kohrana Q kritērijs = 14,000 un p-vērtība = 0,001), savukārt, tirgos realizācijā esošo piena produktu paraugu analīžu rezultātu statistiskās analīzes dati apliecina, ka konstatēto enterotoksīnu serotipu īpatsvars praktiski ir vienāds visiem konstatētajiem serotipiem (Kohrana Q kritērijs = 4,333 un p-vērtība = 0,115).

Lai precīzi novērtētu stafilokoku ģeogrāfisko lokalizāciju Latvijas teritorijā, turpmākajos pētījumos būtu jāizmanto molekulārās bioloģijas metodes, kas ļautu precīzi un detalizēti analizēt izdalīto *S.aureus* celmu genotipu, pārbaudīt noteiktu enterotoksīnu kodējošo gēnu veidu un līdz ar to noteiktu serotipu veidošanās potenciālu izdalītajām stafilokoku kultūrām. Šāda veida pētījumi pēdējo 10 gadu laikā veikti pasaulē un dati publicēti daudzu autoru darbos (Lange et.al, 1996; Akineden et.al, 2001; Lim et.al, 2004; Becker et.al, 2004; Zschock et.al, 2005). Šo pētījumus ierosina turpināt iegūtie rezultāti, kas parādīja, ka atsevišķos gadījumos nākas izdalīt tādus *S.aureus* celmus, kas veido seroloģiski neidentificējamus enterotoksīnus.

SECINĀJUMI

1. Latvijā rūpnieciski ražotajos piena produktos enterotoksīnus veidojošie *S.aureus* celmi sastopami 24,1% gadījumos, bet tirgos realizētajā pienā un piena produktos – 15,2% gadījumos.
2. *S.aureus* vairāk konstatēts tirgū realizētajos piena produktos – 44,1% gadījumu, bet rūpnieciski ražotajos piena produktos to īpatsvars ir zems – 8,8%.
3. *S.aureus*, tai skaitā enterotoksīnus veidojošie *S.aureus* celmi ir sastopami visos piena produktos, izņemot rūpnieciski ražotos skābpiena produktos.
4. Latvijā rūpnieciski ražotajos piena produktos dominē enterotoksīnu A veidojošie *S.aureus* celmi, bet tirgū realizētajos piena produktos sastopami enterotoksīnus A, B un C veidojošie *S.aureus* celmi.
5. Divos tirgū realizētajos piena produktu paraugos konstatēti seroloģiski neidentificējami enterotoksīni, kas norāda uz enterotoksīnus veidojošo *S.aureus* populācijas mainību Latvijā un ierosina veikt turpmākos pētījumus.

LITERATŪRA

1. Adams M.R., Moss M.O. (1995) *Food microbiology* – University of Surrey, Guildford, UK, p. 205 – 210.
2. Akineden Ö., Annemüller C., Hassan A.A., Lämmler C., Wolter W., Zschöck M. (2001) Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis // *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, Vol.8, No.5, pp.959 – 964.

3. Annemuller C., Lammer Ch., Zschöck M. (1999) Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis // *Veterinary microbiology*, Vol.69, issue 3, pp.217 – 224.
4. Asperger H. (1994) *Staphylococcus aureus* // The significance of pathogenic microorganisms in raw milk. – *International dairy federation*, p. 24 – 43.
5. Bankes P., Rose A.S. (1989) Rapid detection of staphylococcal enterotoxins in foods with a modification of the reversed passive latex agglutination assay // *Journal of applied bacteriology*, Vol. 67, p. 395 – 399.
6. Becker K., Friedrich A.W., Peters G., von Eiff C. (2004) Systematic survey on the prevalence of genes coding for staphylococcal enterotoxins SEIM, SEIO and SEIN // *Mol.Nutr. Food Res.*, Vol.48, pp.488 – 495
7. Cenci-Goga B.T., Karama M., Rossitto P.V., Morgante R.A., Cullor J.S. (2003) Research note enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows // *Journal of food protection*, Vol.66, No.9, p.1693-1696.
8. Evenson L.M., Hinds W.M., Bernstein S.R., Bergdoll S.M. (1988) Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk // *International journal of food microbiology*, Vol.7, pp. 311-316.
9. Halpin – Dohnalek I.M., Marth H.E. (1989) *Staphylococcus aureus*: Production of extracellular compounds and behavior in foods – a review // *Journal of food protection*, Vol.52, No.4, p.267 – 282.
10. Ikeda T., Tamate N., Yamaguchi K., Makino S. (2005) Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H // *Applied environmental microbiology*, Vol.71, pp.2793 – 2795.
11. Joo S.Y., Fox K.L., Davis C.W., Bohach A.G., Park H.Y. (2001) *Staphylococcus aureus* associated with mammary glands of cows: genotyping to distinguish different strains among herds // *Veterinary microbiology*, Vol.80, issue 2, pp.131 – 138.
12. Katsuda K., Hata E., Kobayashi H., Kohmoto M., Kawashima K., Tsunemitsu H., Eguchi M. (2005) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms // *Veterinary microbiology*, Vol.105, issues 3-4, p.301 – 305.
13. Lange C., Cardoso M., Senczek D., Schwarz S. (1996) Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil // *Veterinary microbiology*, Vol.67, issue 2, pp.127 – 141.
14. Lim S.K., Joo Y.S., Lee A.R., Nam H.M., Wee S.h., Koh H.B. (2004) Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea // *Journal of veterinary medicine science*, Vol.66, pp.581 – 584
15. Loir Y.L., Baron F., Gautier M. (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning // *Genetics and molecular research*, Vol.2, p.63 – 76.
16. Loncarevic S., Jorgensen H.J., Lovseth A., Mathisen A., Rorvik L.M. (2005) Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products // *Journal of applied microbiology*, Vol. 98, p.344 – 350.
17. Miwa N., Kawamura A., Masuda T., Akiyama M. (2001) An outbreak of food poisoning due to egg yolk reaction-negative *Staphylococcus aureus* // *Int. journal of food microbiology*, Vol.64, issue 3, p.361 – 366.
18. Munson H.S., Tremaine T.M., Betley J.M., Welch A.R. (1998) Identification and characterization of Staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus* // *Infection and immunity*, Vol.66, No.7, p. 3337 – 3348.
19. Nagase N., Shimizu A., Kawano J., Yamashita K., Yoshimura H., Ishimaru M., Kojima A. (2002) Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Japan // *Journal of veterinary medicine science*, Vol.64, pp.1169 – 1172.

20. Omoe K., Hu D.L., Omoe H.T., Nakane A., Shinagawa K. (2003) Identification and characterization of a new Staphylococcal enterotoxin – related putative toxin encoded by two kinds of plasmids // *Infection and immunity*, Vol.71, p.6088 – 6094.
 21. Omoe K., Imanishi K., Hu D.L., Kato H., Omoe H.T., Nakane A., Uchiyama T., Shinagawa K. (2004) Biological properties of Staphylococcal enterotoxin-like toxin type R // *Infection and immunity*, Vol.72, No.6, p.3664 – 3667.
 22. Orwin P.M., Leung D.Y.M., Donahue H.L., Novick R.P., Schlievert P.M. (2001) Biochemical and biological properties of Staphylococcal enterotoxin K // *Infection and immunity*, Vol.69, No.1, p.360 – 366.
 23. Pimbley D.W., Patel P.D. (1998) A review of analytical methods for detection of bacterial toxins. // *Toxins. Supplement to journal of applied microbiology*, vol.84, 98. –109.
 24. Sinell H.J. (1980) Einführung in die Lebensmittelhygiene.– Verlag Paul Paery, Berlin und Hamburg, S. 42 – 46, 93 – 94.
 25. Stephan R., Annmuller C., Hassan A.A., Lammler Ch. (2001) Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland // *Veterinary microbiology*, Vol.78, issue 7, pp.373 – 382.
 26. Tollersrud T.M., Kenny K., Caugant D.A., Lund A. (2000) Characterisation of isolates of *Staphylococcus aureus* from acute, chronic and subclinical mastitis cows in Norway // *APMIS*, Vol.108, pp.565 – 572.
 27. Yamashita K., Kanazawa Y., Ueno M., Ohta H., Kitaguchi M., Kawakami T., Iwasaki K., Tsujisawa E., Morino Y., Tabita K. (2003) Significance of the detection of staphylococcal enterotoxin A gene in low fat milk which caused a serious outbreak of food poisoning // *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, Vol.44, pp.186 – 190.
 28. Zschock M., Kloppert B., Wolter W., Hamann H.P., Lammler C. (2005) Pattern of enterotoxin genes seg, she, sei and sej positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis // *Veterinary microbiology*, Vol. 21, pp.256 – 263.
-