

Porovnanie vplyvu dlhodobého zmrazovania na indentifikačné znaky kmeňov *Staphylococcus aureus*, izolovaných z mrazených a nemrazených potravín

J. ARPAI

Výskum vplyvu nízkych teplôt na mikroorganizmy, ktoré sme robili s osobitným zameraním na mikroflóru mraziarensky konzervovaných potravín, nám ukázal, že zmrazovanie účinkuje na metabolizmus mikróbov rozmanitým spôsobom a môže zapríčiniť u nich morfológické a fyziologické zmeny prechodného ako aj trvalého rázu. Pokusné výsledky nás viedli k názoru, že nízke teploty treba zaradiť medzi tie činitele, ktoré vyvolávajú, alebo zvyšujú variabilitu, resp. zasahujú do nededičnej prípadne dedičnej premenlivosti organizmov 1, 2, 3). So štúdiom a výkladom mechanizmu tohto javu ako aj s jeho všeobecne biologickým významom sa zaoberáme na inom mieste (4, 5). V nasledujúcom chceme sa zamerať iba na čiastkovú problematiku, ktorej význam vyplynie pre praktickú diagnostickú techniku z toho, že mikroorganizmy po zmrazovaní majú často netypické vlastnosti. Zistili sme to pri dlhodobom prieskume mikroflóry mrazeného mäsa a špeciálne pri sledovaní výskytu stafylokokov v mrazených potravinách (6, 7).

O stafylokokoch je známe, že sú po salmonelách najčastejšími pôvodcami intoxikácií z potravín, čo núti venovať im primeranú pozornosť z hľadiska potravinárskej mikrobiológie (8). Zásadne by si to vyžadovalo sledovať prítomnosť enterotoxínu, či už pokusmi na zvieratách alebo precipitačnými skúškami (9). V praxi sa to však málokedy robí a častejšie sa uspokojuje so stanovením diagnostických znakov, o ktorých sa vie zo skúsenosti, že sú vo vzťahu k patogenite a popríklad aj k tvorbe enterotoxínu. Ako významná vlastnosť sa pri tom hodnotí tvorba plazmakoagulózy, ktorá sa považuje za zvlášť spoľahlivé kritérium choroboplodnosti (10). Avšak práve o tejto vlastnosti stafylokokov je — popri pigmentácii — dokázané, že sa následkom zmrazovania mení, resp. stráca (11). To nás viedlo k tomu, aby sme pokusne sledovali aj ďalšie charakteristické znaky stafylokokov v závislosti od vplyvu zmrazovania a kultivácie. Zamerali sme sa menovite na stanovovanie bakteriálnych vlastností, významných z hľadiska praktickej diagnostiky a diferenciácie patogénnych kmeňov.

Materiál a metódy

Ako pokusný materiál slúžili stafylokokové izoláty, získané počas dlhodobého prieskumu mikroflóry potravín, spomedzi ktorých sa pre účely tejto práce vyhodnotili vlastnosti 25 kmeňov, pochádzajúcich z mrazených potravín a 28 kmeňov izolovaných z nemrazených potravinárskych výrobkov. Pri mrazených potravinách išlo o také, ktoré boli vyše deväť mesiacov skladované pri -18°C .

Pri identifikácii sa metodicky postupovalo podľa „Mikrobiologických vyšetrovacích metód“ (12). Vplyv nízkych teplôt sa vyhodnocoval na základe kvalitatívneho dôkazu nasledovných diagnostických znakov: I. Pigmentácia kolónií a ich disociačná fáza. II. Farbiteľnosť mikroskopického preparátu podľa Grama. III. Tvar buniek a mikrokolónií. IV. Hemolýza okolo kolónií na krvnom agare. V. Schopnosť stekúť želatínu. VI. Schopnosť redukovať nitráty. VII. Utiľzácia $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ako zdroj dusíka. VIII. Zrážanie mlieka za tvorby kyseliny. IX. Produkcia acetoínu. X. Produkcia čpavku z peptónu a arginínu. XI. Tvorba katalázy. XII. Tvorba indolu. XIII. Dôkaz plazmakoagulázy. XIV. Citlivosť na optochín. XV. Tvorba fosfatázy. XVI. Skvasovanie cukrov, a to glukózy, laktózy, sacharózy, maltózy, manitolu, glycerolu, eskulínu, salicínu a inulínu.

Na uvedené vlastnosti sa skúšali kmene hneď po izolácii a v piatej, desiatej a dvadsiatej subkultúre. Kmene sa udržiavali pravidelným preočkovaním v štvordenných intervaloch z bujónu na šikmý agar a opäť do bujónu. Inkubačná teplota sa udržiavala pri 37°C . Na diagnostické testy sa odobral materiál vždy z dvadsaťštyrihodinovej bujónovej kultúry.

Po dvadsiatich subkultúrach boli kmene vystavené nízkoteplotnému zásahu, ktorý sa robil tým spôsobom, že sa bujónové kultúry ponechali po dobu jedného mesiaca v mrazničke pri -26°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$). Po rozmrazení pri kultivačnej teplote sa znova sledovali vlastnosti kultúr, ako aj ďalších subkultúr až do 20. pasáže.

Štatistické vyhodnotenie významnosti rozdielov výskytu atypických diagnostických znakov sa robilo variačnou analýzou ako Bertlettov test podľa návodu Weberovej (13).

Výsledky a vyhodnotenie

Kvalitatívne diagnostické znaky kmeňov, pochádzajúcich z nemrazených potravín, ktoré sa stanovovali hneď po izolácii, po pasážovaní, ako aj po nízkoteplotnom zásahu, sú zostavené v tabuľke 1. Príslušné výsledky vyšetrenia izolátov z nemrazených potravín sú zostavené do tabuľky 2.

Z porovnania tabuľkových výsledkov vyplýva, že:

a) vo všeobecnosti mali čerstvo izolované kmene pochádzajúce z mrazených potravín signifikantne početnejšie atypické, resp. labilné diagnostické vlastnosti, ako obdobný bakteriálny materiál získaný z nemrazených potravín ($\chi^2_0 = 38,54$ $P > 95\%$). V subkultúrach sa však spravidla reštituovali charakteristické znaky, pričom sa ukázalo, že deficientné znaky po dlhodobom mraziarskom skladovaní sa podstatne pomalšie upravujú, ako stratové prejavy vyvolané pomerne kratším nízkoteplotným zásahom. Avšak v prípadoch, keď

Tabuľka 1.
Početnosť typických znakov pred a po zmrazovaní (v zátvorke) u kmeňov
Staphylococcus aureus, pochádzajúcich z mrazených potravín

Diagnostické znaky:	Počet pasáží			
	0	5	10	20
Pigment	18(17)	19(17)	23(19)	25(21)
Disociačná fáza kol. S	17(15)	18(17)	22(16)	23(19)
Pozit. farb. podľa Grama	16(12)	19(15)	25(24)	25(25)
Tvar mikrokol. typický	7(2)	25(21)	25(25)	25(25)
Hemolýza (beta)	17(14)	19(17)	24(24)	24(24)
Želatínu stekuje	17(15)	19(16)	23(19)	23(22)
Nitráty redukuje	23(21)	25(23)	25(25)	25(25)
NH ₄ H ₂ PO ₄ utilizuje	22(22)	25(23)	25(25)	25(25)
Mlieko zráža	16(12)	18(15)	21(20)	25(25)
Acetoin tvorí	21(20)	22(24)	24(24)	24(24)
Čpavok z peptónu a arginínu	21(18)	24(20)	23(23)	25(25)
Katalázu produkuje	25(24)	25(25)	25(25)	25(25)
Indol netvorí	25(25)	25(25)	25(25)	25(25)
Plazmakoagulázu tvorí	12(10)	14(11)	20(18)	22(20)
Optochín rezistent.	20(18)	24(19)	25(25)	25(25)
Fosfatázu tvorí	15(11)	16(12)	22(18)	22(20)
Glukózu skvasuje	25(25)	25(25)	25(25)	25(25)
Laktózu skvasuje	25(25)	25(25)	25(25)	25(25)
Sacharózu skvasuje	21(20)	25(24)	25(25)	25(25)
Maltózu skvasuje	25(24)	25(25)	25(25)	25(25)
Manitol skvasuje	12(10)	15(11)	21(15)	22(15)
Glycerol skvasuje	20(19)	20(21)	20(21)	21(21)
Eskulín skvasuje	20(18)	20(19)	25(21)	25(23)
Salicín neskvasuje	25(25)	25(25)	25(25)	25(25)
Inulín neskvasuje	25(25)	25(25)	25(25)	25(25)

T a b u l k a 2.
Početnosť typických znakov pred a po zmrazovaní (v zátvorke) u kmeňov
Staphylococcus aureus, pochádzajúcich z nemrazených potravín

Diagnostické znaky:	Počet pasáží			
	0	5	10	20
Pigment	28(22)	19(28)	28(27)	28(27)
Disociačná fáza kol. S	26(20)	18(26)	26(23)	24(23)
Pozit. farb. podľa Grama	27(20)	19(28)	28(26)	28(27)
Tvar mikrokol. typický	28(14)	28(28)	28(28)	28(28)
Hemolýza (beta)	28(20)	28(22)	28(28)	28(28)
Želatínu stekuje	24(18)	24(23)	24(23)	24(23)
Nitráty redukuje	28(24)	28(26)	28(27)	28(27)
NH ₄ H ₂ PO ₄ utilizuje	28(27)	28(27)	28(27)	28(27)
Mlieko zráža	25(19)	25(24)	25(27)	25(27)
Acetoin tvorí	28(23)	28(28)	28(28)	28(27)
Čpavok z peptónu a arginínu	28(23)	28(28)	28(28)	28(28)
Katalázu produkuje	28(28)	28(28)	28(28)	28(28)
Indol netvorí	28(28)	28(28)	28(28)	28(28)
Plazmakoagulázu tvorí	25(14)	25(15)	25(18)	25(20)
Optochín rezistent.	28(22)	28(24)	28(28)	26(26)
Fosfatázu tvorí	26(20)	26(21)	26(26)	28(28)
Glukózu skvasuje	28(28)	28(28)	28(28)	28(28)
Laktózu skvasuje	28(28)	28(28)	28(28)	28(28)
Sacharózu skvasuje	28(24)	28(24)	28(28)	28(28)
Maltózu skvasuje	26(26)	26(26)	26(26)	26(26)
Manitol skvasuje	25(23)	25(25)	25(25)	25(25)
Glycerol skvasuje	27(25)	27(27)	27(27)	27(27)
Eskulín skvasuje	26(25)	26(26)	26(26)	26(26)
Salicín neskvasuje	28(28)	28(28)	28(28)	28(28)
Indulín neskvasuje	28(28)	28(28)	28(28)	28(28)

sa kmene izolované z mrazeného substrátu opäť exponovali účinkom nízkych teplôt, zistil sa najvyšší počet stratových znakov, ktoré sa aj najdlhšie udržali.

b) V detailoch treba uviesť, že na účinky zmrazovania najcitlivejšie reagovala morfológia mikrokolónií, a to tým spôsobom, že sa strácalo hroznovité zoskupovanie buniek, ktoré je typické pre stafylokoky. Bunky, ako by mrazom vytrhané zo svojho zoskupenia, sa javili prevažne ojedinelé alebo po dvoch. Tiež farbiteľnosť mikroskopických preparátov podľa Grama bola často narušená, poprípade labilná. Výrazným spôsobom sa ukázala strata pigmentácie, o ktorej niektorí autori uvádzajú, že je striktné späť so stratou plazmakoagulázovej aktivity a hemolytickej schopnosti (14, 15). Výsledky našich pokusov nenاسvedčovali takejto korelácii ($\chi^2_0 = 11,67$ P > 2,5 %). Pozorovali sme iba, že pri strate farby, resp. pri vyblednutí pigmentácie došlo často k prechodu z disociačnej fázy S do fázy R.

Na základe biochemických skúšok sa zistilo, že následkom účinku nízkych teplôt vznikli početné kmene deficientné na tvorbu plazmakoagulázy, pričom neboli kvalitatívne rozdiely medzi výsledkami stanovovania aglutinácie vo fibrinogéne a v králičej plazme. Za významné považujeme zistenie, že z 11 kmeňov izolovaných z nemrazených potravín, ktoré po nízkoteplotnom zásahu sa stali koaguláza negatívnymi, zostalo 5 kmeňov deficientnými až do konca dlhodobého sledovania subkultúr. Obdobne tomu bolo aj pri strate niektorých iných fyziologických vlastností, najmä aktivity fosfatázy a proteolytických enzýmov, stanovovaných či už podľa hydrolýzy želatíny alebo koagulácie mlieka. Tu treba poznamenať, že práve posledné uvedené enzymatické prejavy stafylokokových kultúr sa za našich pokusov zväčša súbežne menili, resp. uplatnili s tvorbou plazmakoagulázy. V rovnakom rozpätí ako fosfatáza, proteínáza a plazmakoaguláza, avšak vo voľnejšej korelácii, sa menila hemolytická schopnosť (beta-). Ešte menej výrazné a vyhodnocovateľné boli zmeny u ostatných sledovaných biochemických znakov, akými sú redukcia nitrátov, utilizácia dusíka z fosforečnanu amonného, ako aj tvorba acetoínu a čpavku z príslušných substrátov. Základný fermentačný typ stafylokokov sa ukázal byť najstabilnejší na glukóze a laktóze. V ojedinelých prípadoch, kde sa neskvasovala sacharóza, nastala reštitúcia tejto fermentačnej vlastnosti po niekoľkých pasážach. Salicín a inulín sa nikdy nemetabolizoval. Manitol, ktorého štiepenie sa hodnotí ako znak patogenity, sa metabolizoval u mnohých kmeňov až po dlhšom pasážovaní, pričom opakovaná expozícia mrazu spôsobila výrazné zvýšenie počtu deficientných kmeňov. Pozoruhodné je, že práve tie diagnostické znaky, na ktoré sa prihliada pri posudzovaní choroboplodnosti, podliehajú vo zvýšenej miere fluktuácii, zdá sa však, že ich premenlivosť nie je vzájomne späť. Nikdy sa nezistilo narušenie tvorby katalázy, ani zmena negatívnych diagnostických znakov na pozitívne, ako napríklad produkcia indolu, alebo už spomenutá fermentácia salicínu a inulínu.

Zvlášť sa treba zmieniť o špecifickej deviacii niektorých izolátov od typickej rezistencie stafylokokov voči optochínu. Rast týchto kultúr bol po rozmrazení inhibovaný už prítomnosťou optochínu v dávke 1:50 000. Je to vysvetliteľné kryolytickou deštrukciou obranného zariadenia bunky, následkom čoho sú účinné antimikrobiálne látky už v podprahových koncentráciách na inak rezistentné mikroorganizmy, v prípadoch ak sú aplikované súčasne so zmrazovaním, resp. v čase rozmrazovania (16).

Diskusia

Ako sa už v rozbere výsledkov povedalo, nemožno účinky nízkych teplôt neletálnej povahy zúžiť vo všeobecnosti na poškodenia majúce za následok reverzibilnú stratu niektorej vlastnosti mikróba, ale treba zásadne pripustiť aj možnosť pozitívnej selekcie vlastností, alebo stimuláciu niektorej fyziologickej schopnosti, ktorej prejav bol predtým zatlačený vo fenotype. V rámci tejto časti našej práce však neboli predložené také výsledky, ktoré by tomu nasvedčovali. O kladnej chladovej selekcii sme referovali na inom mieste (17). Tu sa obmedzíme na čiastkový záver, že menovite pri diagnostifikovaní *Staphylococcus aureus*, a viac než pravdepodobne aj pri iných mikroorganizmoch treba rátať s tým, že pod vplyvom nízkych teplôt strácajú niektorú zo svojich typických vlastností. Tieto sa zväčša po dlhšom pasážovaní znova upravujú. Dôraz je na slove „zväčša“, lebo sa zistilo, že v ojedinelých prípadoch sa deficiencia udržiava aj v subkultúrach, pritom z hľadiska praxe je menej zaujímavé, do akej miery je zachovaná kontinuita kmeňa, ktorá by sa mala sledovať fagotypizáciou, čo sme v čase, keď sa tu opísané pokusy robili, ešte na oddelení rutinne nerobili. Sme si vedomí, že len klasickými genetickými metódami by sme mohli získať hlbšie poznatky o povahe spozorovaných zmien, ktoré sme predbežne hodnotili len v rámci rutínnej práce.

Zvláštnu pozornosť si v tejto spojitosti zasluhuje podľa našej mienky tá skutočnosť, že sa spozorovaná variabilita prejavovala najmä na diagnostických znakoch, podľa ktorých sa v praxi často usudzuje na patogenitu vyšetrovaného izolátu. Nanucuje sa otázka, či v týchto prípadoch ide skutočne o stratu patogenity, alebo len o deficienciu jedného z jej ukazovateľov. V literatúre sú zmienky o tom, že niektorí pôvodcovia otravy z potravín, menovite *Clostridium botulin*, prestali produkovať toxíny pod vplyvom dlhodobého účinku nízkych teplôt, resp. vtedy, ak rástli za suboptimálnych teplôt, napríklad v chladených potravinách (18). Vzhľadom na zdravotnícky význam tejto problematiky by bolo potrebné preveriť si takéto údaje. Na základe našich poznatkov odporúčame iba to, nespoliehať sa pri hygienicko-epidemiologickom posudzovaní mikrofóry mrazených potravín na nepriamu diagnózu choroboplodnosti, resp. tvorby enterotoxínu, ale sa o nej meritórne vysloviť až po toxikologickom dôkaze. Predíde sa tým nielen zdravotným kalamitám, ale aj hospodárskym škodám, ktoré nasledujú po takýchto nálezochoch.

S ú h r n

Sledovali sa diagnostické vlastnosti kmeňov *Staphylococcus aureus*, pochádzajúcich z mrazených (25 kmeňov) a nemrazených potravín (28 kmeňov). Kmene sa vyšetrovali hneď po izolácii a v subkultúrach. 20. subkultúra sa vystavila znova nízkoteplotnému účinku. Zistilo sa, že čerstvo izolované kmene z mrazených potravín mali početnejšie deficientné znaky, ako izoláty z nemrazených potravín. Pasážovaním sa reštituovali typické vlastnosti, v ojedinelých prípadoch sa však deficiencia udržala až do konca sledovania. Kratšie trvajúce zmrazovanie vyvolalo stratu diagnostických znakov len v menšej miere ako dlhotrvajúce zmrazovanie. Odlišne reagovali kmene, ktoré predtým už raz prekonali zmrazovanie, t. j. pochádzali z mrazených potravín.

Najčasnejšie sa prejavovala strata tých diagnostických znakov, ktoré sa bežne vyhodnocujú ako ukazovatele patogenity. Boli to menovite pigmentácia, produkcia plazmakoagulázy a fosfatázy, proteolytické a hemolytické schopnosti a skvasovanie manitolu. Aj v rýchlosti rastu sa prejavili významné rozdiely.

Poukazuje sa na hospodársky dosah uplatnenia týchto poznatkov v metodológii hygienicko-epidemiologickej expertízy.

Сопоставление влияния длительного заморживания на опознавательные признаки штаммов изолированных из замороженных и немороженны пищевых продуктов

Резюме

Проводились исследования диагностических свойств штаммов *Staphylococcus aureus* полученных из замороженных (25 штаммов) и немороженных пищевых продуктов (28 штаммов). Штаммы исследовались немедленно после изолировки и в субкультурах. 20-ую субкультуру подвергли снова охлаждению. Оказалось, что свежее изолированные штаммы из замороженных пищевых продуктов имели больше дефицитных признаков, чем штаммы из незамороженных продуктов. Пассажем восстанавливались типичные признаки, но в одиночных случаях дефицитность сохранилась до конца исследований. Кратковременное замораживание влияет на потерю диагностических признаков менее, чем длительное. Различно реагировали штаммы, которые уже раз подверглись замораживанию, были получены из замороженных продуктов.

Чаще всего пропавали такие диагностические признаки, которые являются показателями патогенеза, — пигментация, производство плазмокоагулазы и фосфатазы, протеолитические и гемолитические свойства и маннитное брожение. Большая разниця проявилась и в Росте.

Приведено экономическое влияние применения результатов проведенных исследований в методологии гигиеноэпидемиологической экспертизы.

Comparison of longperiod storage influence on identification characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from freezed and unfreezed foods

Summary

The diagnostic properties of the strains of *Staphylococcus aureus* were observed in freezed (25 strains) and unfreezed foods (28 strains). The strains were investigated immediately after their isolation in subcultures. The 20th subculture was exposed again to low temperature effects. It has been found that freshly isolated strains of frozen foods had more deficiency characteristics than isolates from unfrozen foods. By passage the typical properties were restituted but in individual cases the deficiency was retained until the end of our studies. Shorter freezing caused the loss of diagnostic characteristics in a smaller degree than long-term freezing. Strains which had already undergone freezing reacted differently from those which originated from frozen foods.

The loss of diagnostic characteristics currently evaluated as pathogenicity indices was the most frequent. They were especially pigmentation, plasmocoagulase and phosphatase production, proteolytic and haemolytic properties and the fermentation of manitol. The significant differences were shown also in the speed of the growth.

The economic importance of these findings, application in the methodology of sanitary and epidemiologic expert works are pointed out.

Literatúra

1. Arpai J., Kälteeinfluss und Peptidase-Aktivität von Bakterien. *Experientia* 17, 170, 1961.
2. Arpai J., Mutationsauslösung bei *Serratia marcescens* durch Frosteinfluss. *Die Naturwissenschaften* 48, 483, 1961.
3. Arpai J., Nonlethal freezing injury on metabolism and motility of *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli*. *Applied Microbiology* 10, 297, 1962.
4. Arpai J., Názory na mechanizmus a kinetiku účinku nízkych teplôt na mikroorganizmy. *Biológia* 15, 461, 1960.
5. Arpai J., Vplyv zmrazovacej teploty na kvótu odumierania a fyziologického poškodenia mikroorganizmov. *Biológia* 16, 31, 1961.
6. Arpai J., Identifikačné práce na vyše dvesto mikróbných kultúrach izolovaných z mrazeného mäsa. I. Kokovité baktérie a gramnegatívne tyčinky. *Veterinársky časopis* 9, 186 a 270, 1960.
7. Arpai J., Zmeny diagnostických znakov *Staphylococcus aureus* po zmrazovaní. Referát na Mikrobiologických dňoch Cs. spol. lekárskej J. Ev. Purkyne v Luhačoviciach 1962.
8. Raška K., *Epidemiológia*. Vyd. Osveta, Bratislava 1959.
9. Takács J., Juhász B., *Staphylococcusok enterotoxinja és az enterotoxin kimutatása*. *Élelmészeti ipar* 11, 117, 1957.
10. Evans J. B., Buettner L. G., Niven C. F., Evaluation of the coagulase test in the study of *Staphylococci* associated with food poisoning. *J. Bact.* 60, 481, 1950.
11. Steward E. E., Kelly F. C., Variation of bound coagulase of *Staphylococcus aureus*. *J. Bact.* 77, 101, 1959.
12. „Mikrobiologické vyšetřovací metody“ pod red. K. Rašky. SZN, Praha 1958.
13. Weber E., *Grundriss der biologischen Statistik*. G. Fischer Verlag, Jena 1957.
14. Barber M., Pigment production by *Staphylococci*. *J. Gen. Microbiol.* 13, 338, 1955.
15. Champan G. H., Berens C., Peters A., Curcio L., Coagulase and hemolysin tests as measures of the pathogenicity of *Staphylococci*. *J. Bact.* 28, 343, 1934.
16. Arpai J., Zur Problematik der baktericiden Wirkung von Antibiotica bei tiefen Temperaturen. *Archiv f. Mikrobiol.* 39, 195, 1961.
17. Arpai J., Selective effect of freezing as reflected in growth curves. *Folia Microbiol.* 8, 18, 1963.
18. Fitzgerald G. A., Are frozen foods a public health problem? *Amer. Jour. Public Health* 37, 695, 1947.