

Bakteriálne toxíny vyskytujúce sa v potravinách

ALEXANDER PRÍBELA - TERÉZIA ŠINKOVÁ

Súhrn. Podáva sa prehľad hlavných producentov bakteriálnych toxínov a cesty, ktorými sa dostávajú do potravinového reťazca. Ide najmä o toxíny klostridií, salmonel, stafylokokov, shigel, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, rodu *Vibrio* a i. Diskutujú sa zásady prevencie proti bakteriálnym toxínom a možnosti detoxikácie potravín.

Charakteristika bakteriálnych toxínov

Mikrobiálne toxikózy spôsobujú často vážne zdravotné problémy, ktoré patria prevažne do kategórie tzv. ochorení z potravín (food poisoning). Štatistiky dokazujú, že frekvencia výskytu bakteriálnych toxikóz sa zvyšuje nielen v rozvojových krajinách, ale aj vo vyspelých štátoch. Z početných mikroorganizmov majú osobitné postavenie pri vzniku týchto ochorení najmä toxínogénne baktérie. Sú nebezpečné tým, že sa v potravine alebo makroorganizme masívne rozmnožia a vytvárajú toxické látky - bakteriálne toxíny, ktoré potom vyvolávajú zodpovedajúce ochorenie.

V praxi sa rozlišujú termíny alimentárna nákaza (infekcia) a alimentárna otrava (intoxikácia). V prvom prípade ide o mikroorganizmy prítomné v potravine v čase konzumácie, ktoré potom svojimi patogénnymi vlastnosťami vyvolávajú ochorenie. V druhom prípade sa mikroorganizmy rozmnožili už v potravine a vyprodukovali metabolit, ktorý má toxické účinky na ľudský organizmus, prípadne aj na zvieratá.

Prof.Ing. Alexander Príbelá, DrSc., Katedra sacharidov a konzervácie potravín, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Ing. Terézia Šinková, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 820 06 Bratislava.

Medzi producentov bakteriálnych toxínov patria prevažne gramnegatívne baktérie rodov *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* a niektoré grampozitívne baktérie - *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Bacillus* a i.

Produkcia bakteriálnych toxínov jednotlivými mikroorganizmami je veľmi rozdielna, závisí od podmienok kultivácie (živné médium, teplota, pH prostredia, prítomnosť kyslíka), ďalej od druhu resp. kmeňa baktérií. Podrobne sa bakteriálnymi toxínmi zaoberajú monografie [1,2].

Rozdelenie a charakteristika jednotlivých bakteriálnych toxínov nie sú jednoznačné. Z potravinárskeho hľadiska je dôležitá najmä skupina enterotoxínov, neurotoxínov a ďalších. Určité druhy bakteriálnych toxínov, napr. botulotoxíny, choleratoxín, sú relatívne dobre preštudované po stránke biologických vlastností, chemickej štruktúry a frekvencie výskytu v jednotlivých druhoch potravín. Na druhej strane u mnohých toxínov chýbajú základné poznatky o štruktúre a biologických vlastnostiach. Vzťah medzi biologickou aktivitou a chemickým zložením toxínov má významné postavenie pri objasňovaní patogenity baktérií a tým aj pri prevencii proti bakteriálnym toxikózam [3].

Bakteriálne toxíny sú sekundárne metabolity baktérií. Podľa lokalizácie v mikrobiálnej bunke a podľa času uvoľňovania do prostredia sa všeobecne rozdeľujú na endotoxíny a exotoxíny. Oba tieto typy toxínov môžu byť enterotoxíny t.j. látky so škodlivými účinkami na tráviaci trakt. Dodnes je v literatúre opísaných 240 bakteriálnych toxínov, proteínov resp. peptidov. Z toho 125 produkujú gramnegatívne a 115 grampozitívne baktérie. Viac než 100 toxínov sa podarilo purifikovať tak, že je známa ich molekulová hmotnosť, podjednotková štruktúra a sekvencia aminokyselín. U 60 toxínov bol identifikovaný aklónovaný gén.

ENDOTOXÍNY sú stavebné zložky vonkajšej membrány bakteriálneho obalu gramnegatívnych baktérií, odkiaľ sa uvoľňujú z odumretých buniek za určitých podmienok, napr. pri autolýze. Ide o veľmi termostabilné látky, ktoré znášajú teplotu 126°C až 7 h resp. 146°C až 30 min [4]. Táto charakteristika nie je úplne presná, pretože sa zistilo, že i niektoré exotoxíny sú uvoľňované z odumretých buniek a vyskytujú sa i termostabilné exotoxíny. Obsah endotoxínov v pitnej vode a niektorých mliečnych produktoch podľa rôznych autorov sa pohybuje od desiatok po 50 000 ng.g⁻¹ resp. ng.ml⁻¹ produktu [4]. Otázkam štruktúry a biologickým vlastnostiam endotoxínov

sa venovala veľká pozornosť [1,4-6]. Chemicky je to makromolekulový komplex lipopolysacharidov.

Endotoxíny vykazujú viaceré biologické účinky, najmä leukopéniu, letalitu, antigenitu, hypotenziu, pyrogenitu, hypoglykémiu, agregáciu trombocytov, hyperlipidémiu, nekrózu nádorov, stimuláciu tvorby cyklického adenosín-3,5-monofosfátu, indukciu syntézy prostaglandínov. Charakteristickým prejavom endotoxínu v makroorganizme je endotoxínový šok. Biologická aktivita endotoxínov závisí v značnej miere od senzibilizujúcich alebo naopak od retardujúcich faktorov. Podľa niektorých autorov je zdravotné riziko potravín obsahujúcich endotoxíny malé, pretože orálne prijaté endotoxíny i vo vysokých množstvách sa klinicky neprejavili [4].

EXOTOXÍNY sú bakteriálne toxíny, ktoré sa tvoria rozmnožujúcimi sa mikroorganizmami a sú vylučované do prostredia v okolí baktérie. Niektoré z nich sa potom prenášajú krvnou cestou do rôznych orgánov. Exotoxíny v potravinách sa zachovávajú aj po odumretí bakteriálnej bunky. Chemicky sú to proteíny, často s enzýmovou aktivitou [3,6].

Mechanizmus pôsobenia bakteriálnych toxínov nie je dostatočne objasnený s výnimkou choleratoxínu a botulotoxínu. Často sa uplatňuje viacero mechanizmov súčasne.

Bakteriálne toxíny významných mikroorganizmov

Toxíny klostrídií

Za najsilnejšie bakteriálne toxíny sa považujú botulotoxíny produkované *Clostridium botulinum*, u ktorého sa rozlišuje viacero antigénne odlišných typov A, B, C α , C β , D, E, F, G. Pre ľudský organizmus sú toxické najmä typy A, B, E, výnimočne aj F. Typy C a D sú toxické pre hydinu, hovädzí dobytok a ovce. Frekvencia typu B je najvyššia v Európe, zatiaľ čo typ A je frekventovanejší v Amerike. Typ E sa vyskytuje v morských produktoch (ryby, mušle). Botulotoxíny sú produkované v anaeróbnom prostredí (konzervy, klobásky) *Cl.botulinum* pri optimálnom pH 4,8 až 8,5 a teplote 30°C. Toxín sa môže tvoriť aj pri nízkych teplotách.

Chemicky sú to proteíny obsahujúce 19 aminokyselín. Relatívna molekulová hmotnosť u typu A a B je 900 000 - 1 000 000. Otrava botulotoxínmi sa prejaví u človeka po 5 až 72 h v závislosti od množstva toxínu. Sú to neurotoxíny, ktoré vyvolávajú bolesť hlavy, únavu, nevoľnosť, dávenie, ochrnutie očných, hltanových a jazykových nervov, sekréciu slín. Smrť nastáva spravidla ochrnutím dýchacích orgánov za 3 až 6 dní. Podobné prejavy sú aj u zvierat otrávených botulotoxínmi. Pri kontaminácii potravín samotným botulotoxínom sa nemení ich chuť ani vôňa a netvorí sa plyn. Tým vzniká veľké riziko pri senzorickom posúdení. Botulotoxíny sú termolabilné. Inaktivujú sa pri 80°C za 10 min alebo za varu počas niekoľkých minút [3,7,8].

Z ostatných druhov je známy producent enterotoxínov *Cl.perfringens*, najmä typ A, C a E. Zvlášť nebezpečný je typ C, ktorý vyvoláva enteritis necroticans s vysokou úmrtnosťou. *Cl.perfringens* veľmi zle sporuluje v potravinách, preto tvorba enterotoxínov nie je významná. Môže však sporulovať v tenkom čreve [3]. *Cl.difficile* produkuje enterotoxíny A, B a tiež toxické proteíny C₁, C₂ a C₃, ktoré sa líšia chemickými, biologickými a antigénovými vlastnosťami oproti toxínu A a B [9]. Študovala sa odozva ľudských monocytov na toxíny A a B *Cl.difficile* [10].

Toxíny kmeňov *Escherichia coli*

E.coli produkuje dva druhy toxínov. Termolabilný toxín (LT) je vysokomolekulárna oligomérna látka (rel.mol.hmotnosť 180 000 až 200 000), obsahuje dve peptidické jednotky A a B. Biologickú aktivitu určuje väzbová špecifita podjednotky B a enzýmová aktivita podjednotky A. Podjednotka A má zhodnú enterotoxickú aktivitu s choleragénom. Termolabilný enterotoxín *E.coli* aktivuje adenylátcyklázu [11,12]. Termostabilné enterotoxíny (ST) sú nízkomolekulové, dialyzovateľné látky (rel.mol.hmotnosť 4 400). V purifikovanej forme je stabilný ešte pri 100°C do 30 min a pH 1,0. Aktivita klesá zvyšovaním pH (pri pH 9,0 sa inaktivuje). Svojou aktivitou sa odlišuje od choleragénu a LT toxínu predovšetkým tým, že aktivuje guanylatcyklázu [13].

Podobné enterotoxíny produkujú *Klebsiella pneumoniae* [14] a *Enterobacter cloacae* [15].

Toxíny salmonel

Salmonely produkujú rad toxínov, z ktorých sú pre človeka nebezpečné najmä enterotoxíny. Termolabilný enterotoxín (S-LT) má rel.mol.hmotnosť asi 90 000 a podobné vlastnosti ako choleraagén. Termostabilný enterotoxín (S-ST) zachováva aktivitu ešte pri 80°C v zásaditom aj kyslom prostredí. Stály je i pri -20°C [16,17]. Najintenzívnejšími producentami enterotoxínov sú kmene *S.typhimurium*, *S.enteritis*, *S.agona* a *S.dublin* [17-19]. Salmonely produkujú aj endotoxíny [19] a cytotoxíny (verotoxíny), ktoré sú zložkami vonkajších membrán [20].

Stafylokokové toxíny

Najčastejším producentom enterotoxínov je *Staphylococcus aureus*, ktorý produkuje 7 serologicky odlišných enterotoxínov označených A, B, C₁, C₂, D, E a F. Sú to proteíny rozpustné vo vode, rel.mol.hmotnosť 30 000 až 35 000. Ich tepelná stabilita je rozdielna. Enterotoxíny B a C sú relatívne termostabilné, vydržia zohrev pri 90°C 30 min. Prežívajú aj v prostredí 10 % NaCl. Naproti tomu toxín A sa inaktivuje pomerne ľahko. Nízke teploty znášajú dobre. Toxicita enterotoxínu B je vysoká. Už pri dávke 20 až 25 µg sa prejaví známky toxikózy [3]. Mechanizmus patogenity enterotoxínu na cicavcoch študovali Marrack a Kappler [21]. Proti enterotoxínom A a B boli vyvinuté polyklonálne protilátky [22].

Toxíny rodu Bacillus

Zvýšené nebezpečie ochorenia z potravín predstavuje najmä *B.cereus*, ktorý produkuje viaceré enterotoxíny a cytolytické toxíny. Otravy z potravín, vyvolané *B.cereus* sa pripisujú najmä hnačkovému a emetickému enterotoxínu. Hnačkový toxín je labilný proteín (rel.mol.hmotnosť je asi 50 000, IP 4,9), vyvoláva ochorenie dolnej časti intestinálneho traktu podobné otrave *Cl.perfringens*. Neskôr sa získala toxická frakcia proteínov, ktorá obsahovala tri detegovateľné antigény [23]. Emetický enterotoxín má rel.mol.hmotnosť 5 000 až 15 000, pravdepodobne nie je proteínovej povahy. Je termostabilný a necitlivý na pH. Spôsobuje ochorenie najmä hornej časti intestinálneho traktu podobné ako pri otrave stafylokokmi [24]. Okrem toho *B.cereus* produkuje aj rad cytolytických toxínov [25].

Toxíny rodu Vibrio

Detailne sú preštudované enterotoxíny rodu *Vibrio*, najmä druhu *V.cholerae*. Cholera toxín (rel.mol.hmotnosť 84 000) obsahuje dve nekovalentne viazané jednotky A a B a označuje sa ako cholera gén. Izolované jednotky sú biologicky neaktívne. Cholera gén stimuluje adenylátcyklázu v pečňových a tukových bunkách, v leukocytoch a v erythrocytoch [26,27]. Podobné účinky má enterotoxín produkovaný *V.parahaemolyticus*. Tento druh produkuje tiež termostabilný hemolýzín [28].

Toxíny ďalších baktérií

Toxíny produkuje aj rad ďalších baktérií, ktorých frekvencia je spravidla nižšia a iba ojedinele môžu vyvolať hromadné ochorenie. Enterotoxíny shigel, produkované najmä druhmi *Shigella dysenteriae* 1 a *S.flexneri* 2A (rel.mol.hmotnosť 50 000 až 70 000) sú cytotoxické pre HeLa bunky, letálne pre myši. Sú antigénne príbuzné. Záhrevom pri 90°C za 30 min sa inaktivujú [29]. Molekula shigatoxínu je zaujímavá tým, že je nositeľom troch aktivít, neurotoxickej, enterotoxickej a cytotoxickej.

Je popísaný výskyt enterotoxínu *Aeromonas hydrophila* a *A.sobria* v mäsovom extrakte pri nízkej teplote [30], ďalej štruktúra exotoxínu *Pseudomonas aeruginosa* [31], *Enterobacter cloacae* [15] a i.

Detoxikácia potravín a prevencia proti bakteriálnym toxínom

Detoxikácia potravín, ktoré už obsahujú vytvorený a difúzne rozptýlený toxín, je komplikovaná. Spôsoby detoxikácie sú limitované iba takými zásahmi, ktoré sú technologicky uskutočniteľné a pritom nedochádza k zhoršeniu nutričných, organoleptických a hygienických vlastností potravín. Medzi takéto operácie patrí tepelná inaktivácia najmä termolabilných toxínov. Zahrievaním suroviny alebo výrobku počas 10 až 30 min pri teplotách nad 80°C sa termolabilné enterotoxíny inaktivujú. Najmä botulotoxín sa rozrušujú už za 10 min pri 80°C. Spóry *Cl.botulinum* však za týchto podmienok prežívajú a môžu rekontaminovať potravinu. Preto sa na dôkaz prítomnosti spór *Cl.botulinum* používa pri kontrole výroby sterilizovaných

konzerv [3]. Na identifikáciu toxínu F *Cl.botulinum* v potravinách (napr. konzervovaná pečťonová paštéta, mäso z tuniaka a kraba) bola použitá monoklonálna látka [32].

Druhá cesta ochrany proti bakteriálnym toxínom je prevencia, t.j. úzkostlivé dodržiavanie hygienických a technologických podmienok pri skladovaní a spracovaní surovín a skladovaní výrobkov. Pri skladovaní vákuovo balených filiet pstruha pri 5 - 8°C, ktoré boli zámerne kontaminované spórami *Cl.botulinum*, sa nezabránilo ich klíčeniu a tvorbe toxínu. Až znížením teploty na 3°C sa mu zabránilo [33]. Obmedzenie kontaminácie sa dosiahne aj vhodným ošetrovaním suroviny pred spracovaním, ide najmä o uskladnenie v chladených skladoch, dôkladné umývanie surovín, blanžirovanie a čo najrýchlejšie spracovanie. Nie menej významné je prísne dodržiavanie technologických postupov a vhodných spôsobov spracovania. Veľmi dôležitá je tepelná úprava potraviny pred vlastnou konzumáciou, ktorou sa likvidujú najmä termolabilné toxické látky.

Literatúra

1. KADIS, S. - CIEGLER, A.: Microbial toxins. Bacterial protein toxins vol. I, IIA, IIB, III, Bacterial endotoxins vol. IV, V, Academic Press, New York - London, 1972.
2. ALOUF, J.E. - FREER, J.H.: Sourcebook of bacterial protein toxins, Academic Press Ltd., London, 1991, 518.
3. MACHOLZ, R. - LEWERENZ, H.J.: Bacterial toxins (in German), in Lebensmitteltoxikologie, Akademie Verlag, Berlin, 1989, chap. 19.2.
4. JUEGLICHER, B. - SCHUETZ, M. - WIESNER, H.U.: Arch. Lebensmittelhygiene, 40, 79, 1989.
5. REITSCHEL, T.E. - BRADE, H.: Sci. Amer., 267, 27, 1992.
6. ČIŽNÁR, I.: Toxíny gramnegatívnych črevných baktérií. Veda, Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava 1982.
7. TOMPKIN, B.R. - CHRISTIANSEN, L.N.: *Clostridium botulinum*, in DEFIGUEIREDO, M.P. - SPLITTSTOESSER, D.F., Food microbiology, Public health and spoilage aspects, AVI Publishing, Westport, Conn., 1976, chap.4.
8. HUHTANEN, C.N.: J. Food Protect., 54, 50, 1991.
9. TORRES, J.F. - LOENNROTH, I.: Biochim. Biophys. Acta, 998, 151, 1989.
10. FLEGEL, W.A. - MUELLER, F. - DAEUBNER, W. - FISCHER, H.G. - HADDING, U. - NORTHOFF, H.: Infect. Immun., 59, 3659, 1991.
11. FUKUTA, S. - MAGNANI, J.L. - TWIDDY, E.M. - HOLMES, R.K. - GINSBURG, V.: Infect. Immun., 56, 1748, 1988.
12. YOH, M. - NARITA, I. - HONDA, T. - MIWATANI, T. - NISHIBUCHI, M.: J. Clin. Microbiol., 29, 2326, 1991.
13. CHAN, S.K. - GIANNELA, R.A.: J. Biol. Chem., 256, 7744, 1981.
14. KLIPSTEIN, F.A. - ENGERT, R.F.: J. Infect. Dis., 132, 200, 1975.

15. KLIPSTEIN, F.A. - ENGERT, R.F.: Infect. Immun., 13, 1307, 1976.
16. SANDEFUR, P.D. - PETERSON, J.W.: Infect. Immun., 14, 671, 1976.
17. KOUPAL, L.R. - DEIBEL, R.H.: Infect. Immun., 11, 14, 1975.
18. KUHN, H. - TCHAEPE, H. - RISCHE, H.: Zbl. Bakt. A, 240, 171, 1978.
19. STINAVAGE, P.S. - MARTIN, L.E. - SPITZNAGEL, J.K.: Mol. Microbiol., 4, 283, 1990.
20. ASHKENAZI, S. - CLEARY, T.G. - MURRAY, B.E. - WAGNER, A. - PICKERING, L.K.: Infect. Immun., 56, 3089, 1988.
21. SPERBER, W.H.: Food Technol., 36, 89, 1982.
22. CHRISTIANSEN, L.N.: Food Technol., 34, 237, 1980. J. Food Protect., 53, 782, 1990.
23. THOMPSON, N.E. - KETERHAGEN, M.J. - BERGDOLL, M.S. - SCHANTZ, E.J.: Infect. Immun., 43, 887, 1984.
24. HUGHES, S. - BARTHOLOMEW, B. - HARDY, J.C. - KRAMER, J.M.: FEMS Microb. Lett., 52, 7, 1988.
25. GILMORE, M.S. - CRUZ-RODZ, A.L. - LEIMEISTER-WAECHTER, M. - KREFT, J. - GOEBEL, W.: J.Bacteriol., 171, 744, 1989.
26. SATTLER, J. - WIEGANDT, H.: Eur. J. Biochem., 57, 309, 1975.
27. VAN HEYNINGEN, S.: J. Infect. Dis. Suppl., 133, 5, 1976.
28. MIWATANI, T. - SAKURAI, J. - TAKEDA, Y. - SHINODA, S.: Studies on direct hemolysins of *V. parahaemolyticus*, in International symposium on *V. parahaemolyticus*, Saikon Publishing Co., Tokyo, 1974, 245.
29. O'BRIEN, A.D. - THOMPSON, M.R. - GEMSKI, P. - DOCTOR, B.P. - FORMAL, S.B.: Infect. Immun., 15, 796, 1977.
30. MAJEED, K.N. - MACRAE, I.C.: Int. J. Food Microbiol., 12, 181, 1991.
31. KLINGER, K.W. - SHUSTER, C.W.: Infect. Immun., 43, 912, 1984.
32. GLASS, K.A. - DOYLE, P.M.: J. Food Protect., 54, 162, 1991.
33. DEHOF, E. - GREUEL, E. - KRÄMER, J.: Archiv Lebensmittelhyg., 40, 27, 1989.

Do redakcie došlo 22.10.1993.

Bacterial toxins occurring in foods

Summary

A survey of main producers of bacterial toxins and ways of their obtaining in food chain is given. It is mainly toxins of clostridia, salmonels, staphylococci, shigelles, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Vibrio* genus etc. Principles of prevention against bacterial toxins and possibility of food detoxication is discussed.