

ANITA KUKUŁOWICZ, IZABELA STEINKA, ADRIANNA SIWEK

## PRODUKTY POCHODZENIA WODNEGO O RÓŻNYM STOPNIU PRZETWORZENIA JAKO ŹRÓDŁO *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METYCYLINOOPORNYCH

### Streszczenie

Produkty pochodzenia wodnego należą do głównych źródeł białka i innych składników odżywczych. Odgrywają one istotną rolę w diecie człowieka. *Staphylococcus aureus* uważane są za jedne z najczęściej występujących na świecie patogenów przenoszonych przez żywność. *S. aureus* nie jest rodzimą florą produktów pochodzenia wodnego, jednak bakterie te można izolować ze świeżo złowionych ryb. Dodatkowo zanieczyszczenie tych produktów może wynikać z niewłaściwego obchodzenia się z nimi, przechowywania w nieodpowiednich warunkach, przenoszenia patogenu przez pracowników, jak też może być następstwem zanieczyszczenia krzyżowego. Powszechne stosowanie antybiotyków w ostatnich latach doprowadziło do gwałtownego wzrostu oporności na antybiotyki wśród bakterii patogennych. W związku z powyższym niniejsze badania przeprowadzono w celu oceny występowania *S. aureus* metacylinoopornych (MRSA) w produktach pochodzenia wodnego o różnym stopniu przetworzenia (mrożonych, wędzonych, marynowanych i surowych). Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że MRSA najczęściej występował w próbach mrożonych (ok. 83 %), a najrzadziej – w produktach marynowanych (ok. 29 %). Pomimo tego, że najniższy odsetek prób, w których stwierdzono występowanie *S. aureus* metacylinoopornych, stanowiły produkty marynowane, to najniższą średnią ilość tych bakterii stwierdzono w przetworach wędzonych (0,54 log jtk/g). Ogólnie ok. 41 % prób było zanieczyszczonych tymi bakteriami.

**Słowa kluczowe:** produkty pochodzenia wodnego, *Staphylococcus aureus*, zanieczyszczenie patogenami, MRSA

### Wprowadzenie

Produkty pochodzenia wodnego odgrywają ważną rolę w diecie, dostarczając prawie 20 % białka zwierzęcego konsumowanego przez 7,5 mld ludzi na świecie [16]. Z danych przedstawionych przez Hryszkę [3] wynika, że bilansowe spożycie ryb

i owoców morza w 2019 r. wyniosło w Polsce 13,11 kg/mieszkańca i było o 0,7 % większe niż rok wcześniej. Wydatki gospodarstw domowych ponoszone na zakup tych produktów wzrosły o 8,1 % [6]. W kolejnych latach prognozowany jest wzrost konsumpcji ryb i owoców morza [20]. Z danych literaturowych wynika, że średnio 64 % Polaków spożywa ryby i owoce morza przynajmniej raz w tygodniu lub częściej, natomiast 28 % – dwa lub więcej razy w tygodniu. Najczęstszymi wyborami Polaków są produkty świeże oraz wędzone, które wskazywało odpowiednio: 51 i 50 % respondentów [2]. W strukturze wydatków gospodarstw domowych przeważają ponadto przetwory i konserwy (34 %), ryby wędzone, suszone i solone (23 %), ryby świeże (22 %) i ryby mrożone (19 %) [3]. Spożycie ryb i produktów rybnych, zwłaszcza w przypadku ich konsumpcji w stanie surowym lub niedogotowanym, często prowadzić może do wystąpienia chorób u ludzi. Spożywanie zanieczyszczonych bakteriami ryb i owoców morza wiąże się m.in. z zapaleniem żołądka i jelit, występowaniem krwawej biegunki, skurczami brzucha i wymiotami [5, 11, 13]. Obecność w tych produktach różnych gatunków bakterii, w tym chorobotwórczych dla ludzi, tj. *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni* może wynikać z bezpośredniego kontaktu z zanieczyszczonym środowiskiem wodnym, osadem lub skażoną paszą [5, 11, 17].

Źródła i czynniki mogące przyczyniać się do rozwoju mikroorganizmów chorobotwórczych, bakterii opornych na antybiotyki oraz powodujących psucie się produktów pochodzenia wodnego mogą być różne w zależności od etapu łańcucha produkcji i dostaw [11]:

1. Przed zbiorem lub połowem:

- woda – pochodzenie (morza, jeziora, rzeki, studnie), jakość wody, w tym czynniki chemiczne (np. pH, O<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, zasolenie) oraz mikrobiologiczne (różnorodność, obfitość),
- osad – obecność zwierzęcych i/lub ludzkich zanieczyszczeń (np. obornika),
- czynniki środowiskowe – pory roku, opady deszczu,
- praktyki w akwakulturze – działania rutynowe (zarybianie, sposób odżywiania, gęstość obsady zwierząt akwakultury), stan zdrowia ryb (infekcje, choroby bakteryjne), leczenie ryb (np. antybiotyki, metale ciężkie).

2. Po zbiorze lub połowie:

a) przetwarzanie:

- powierzchnie mające kontakt z żywnością (np. krajalnice, maszyny do patroszenia, stoły produkcyjne),
- powierzchnie pozbawione kontaktu z żywnością (np. podłogi, ściany, przewody kanalizacyjne, wentylacyjne),
- zabiegi/interwencje (chemiczne, biologiczne, inne zabiegi nietermiczne)

b) pakowanie, przechowywanie, transport:

- obecność konserwantów,
- skład atmosfery (np. pakowanie produktów w modyfikowanej atmosferze, w próżni, w powietrzu),
- temperatura,
- czas,
- sposób postępowania z produktem – sprzedawcy, restauratora, konsumenta (zanieczyszczenia krzyżowe, wtórne zanieczyszczenia).

Rzepakowska i wsp. [10] oraz Solomon i wsp [13] podają, że z żywności pochodzenia wodnego, ale także z pasz dla zwierząt oraz ich odchodów często izoluje się organizmy odporne na wiele leków. Ryby zostały zakwalifikowane jako rezerwuary bakteryjnych patogenów powiązanych z chorobami człowieka. Ponadto obecność w tych mikroorganizmach genów determinujących oporność drobnoustrojów na antybiotyki wywołuje obawy dotyczące rozprzestrzeniania się bakterii antybiotykoopornych w środowisku oraz wśród ludzi [5]. W ostatnich latach antybiotyki były stosowane nie tylko w leczeniu infekcji u ludzi i zwierząt, ale również wykorzystywano je w hodowli zwierząt i w akwakulturze do wspomagania wzrostu, zwiększenia efektywności wykorzystania paszy, w profilaktyce zakażeń. Jednak w przeciwieństwie do ludzi, którym antybiotyki są przepisywane na określony czas po zdiagnozowaniu infekcji bakteryjnych, stosowanie antybiotyków u zwierząt i w akwakulturze jest niejednokrotnie nieuzasadnione. Ze względu na nieuregulowane stosowanie antybiotyków do celów innych niż leczenie infekcji, ludzie są narażeni na działanie patogenów antybiotykoopornych obecnych w żywności i w środowisku [16, 17].

Celem niniejszej pracy była ocena występowania bakterii *S. aureus* metycylinoopornych (MRSA) w produktach pochodzenia wodnego o różnym stopniu przetworzenia pochodzących z punktów handlowych znajdujących się na terenie Trójmiasta.

### **Material i metody badań**

Badaniom poddano zakupione w różnych punktach handlowych mrożone ( $n = 12$ ), marynowane ( $n = 7$ ), wędzone ( $n = 8$ ) i surowe ( $n = 17$ ) produkty pochodzenia wodnego. Przetwory marynowane pobierane były z opakowań jednostkowych, natomiast pozostałe produkty nie miały opakowania. Zakupione produkty ze sklepu do laboratorium mikrobiologicznego przewożono w termoizolacyjnej torbie, umożliwiającej zachowanie ciągłości tzw. zimnego łańcucha dostaw. Transport próbek nie przekraczał 2 h. Bezpośrednio po dostarczeniu produktów do laboratorium poddawano je analizom. W komorze z laminarnym przepływem powietrza pobierano 20 g produktu, a następnie homogenizowano ze 180 ml roztworu soli fizjologicznej przy użyciu Stomacher Lab-Blender 400 (Seward, Worthing, Wielka Brytania). Pierwszym etapem izolacji gronkowców było prenamnażanie na podłożu Giolitti-Cantoni (Merck, Niem-

cy). Warunki inkubacji to: temp. 37 °C, 24 h, warunki beztlenowe. Po upływie 24 h z każdej próbki, w której stwierdzono obecność gronkowców (zaczernienie podłoża), wykonywano posiew powierzchniowy (0,1 ml) na płytce z podłożem CHROMagar MRSA (Graso Biotech, Gdańsk, Polska) do izolacji i szybkiej identyfikacji *Staphylococcus* opornych na metycylinę. Inkubację prowadzono przez 24 h w temp. 37 °C. Kolonie o barwie różowej kwalifikowano zgodnie z instrukcją jako *Staphylococcus aureus* metycylinooporne, a następnie liczbę komórek bakterii wyznaczano zgodnie z PN-EN ISO 7218:2008 [7].

Dane poddano transformacji  $\log \text{ jtk/g}+1$  ze względu na występowanie próbek bez *S. aureus*. Homogeniczność wariancji badano testem Levene'a. W analizie wpływu sposobu utrwalania na liczbę *S. aureus* w produktach zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji. Istotność różnic między podgrupami weryfikowano testem Tukeya dla różnych liczebności. Zależność między występowaniem *S. aureus* w próbach a sposobem utrwalania określano za pomocą testu  $\chi^2$  [15].

## Wyniki i dyskusja

Najwyższą liczbę metycylinoopornych gronkowców stwierdzono w grupie produktów mrożonych. Średnia liczba MRSA w badanych próbkach różniła się w zależności od sposobu przetworzenia i zawierała się w granicach  $0,54 \div 2,268 \log \text{ jtk/g}+1$  w produktach odpowiednio: wędzonych i mrożonych. Różnice między tymi grupami były statystycznie istotne –  $F = 3,917$ ,  $p = 0,0153$ ;  $\eta^2$  cząstkowe = 0,227 (tab. 1). Maksymalne liczby MRSA w produktach surowych i marynowanych były na podobnym poziomie (tab. 1).

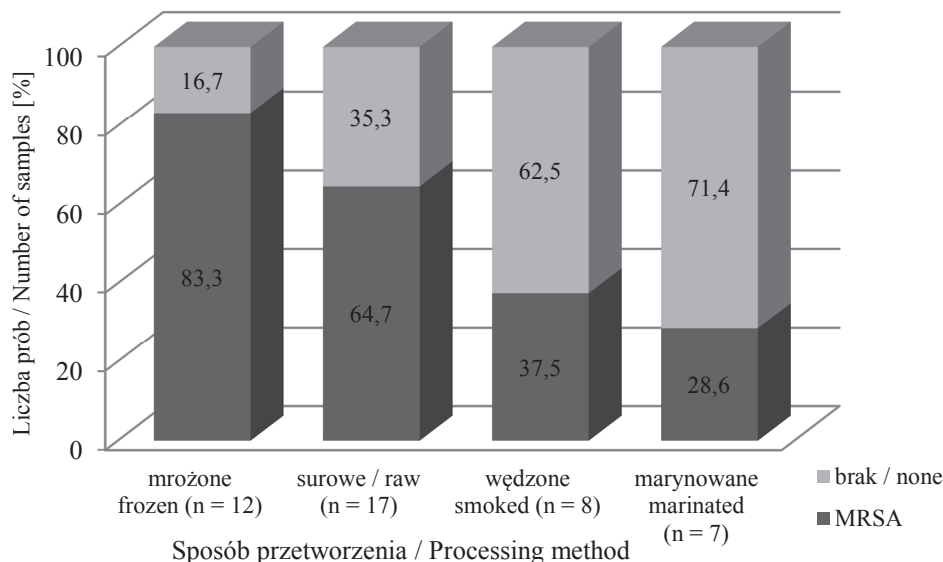
Tabela 1. Liczba metycylinoopornych *S. aureus* w zależności od rodzaju przetworzenia badanych produktów [ $\log \text{ jtk/g}+1$ ]

Table 1. Count of methicillin-resistant *S. aureus* depending on the type of processing of products tested [ $\log \text{ CFU/g}+1$ ]

Sposób przetworzenia produktów Types of product processing	n	$\bar{x}$	SD	$x_{\min.}$	$x_{\max.}$
mrożone / frozen	12	2,268 <sup>a</sup>	1,251	0	3,634
surowe / raw	17	1,334	1,121	0	3,486
marynowane / marinated	7	0,924	1,584	0	3,477
wędzone / smoked	8	0,540 <sup>a</sup>	0,771	0	1,785

Objaśnienia / Explanatory notes:

$\bar{x}$  – wartość średnia / mean value; SD – odchylenie standardowe / standard deviation;  $x_{\min.}$  – wartość minimalna / minimum value;  $x_{\max.}$  – wartość maksymalna / maximum value. Wartości średnie oznaczone literą a różnią się statystycznie istotnie ( $p < 0,05$ ) / mean values denoted by letter a differ statistically significantly ( $p < 0.05$ ).



Rys. 1. Odsetek prób, w których stwierdzono występowanie *Staphylococcus aureus* metycylinoopornych w zależności od sposobu przetworzenia

Fig. 1. Percent number of samples, in which methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* was found depending on the type of processing

MRSA najczęściej występowały w próbkach poddanych mrożeniu (ok. 83 %), a najrzadziej w wyrobach marynowanych (ok. 29 %) – rys. 1. W produktach rybołówstwa poddanych mrożeniu potwierdzono występowanie *S. aureus* metycylinoopornych na poziomie 17,5 % [4], 20 % [21], 30 % [19], a nawet 34 % [14], zatem nie obserwowano tak wysokiego odsetka próbek zanieczyszczonych tymi bakteriami, jaki uzyskano w badaniach własnych. Otrzymane wyniki stanowią rezultat wstępnych oznaczeń i wymagają dodatkowej weryfikacji. Nie potwierdzono zależności pomiędzy występowaniem MRSA a sposobem przetworzenia produktów ( $\chi^2 = 7,38$ ,  $p = 0,0608$ ). W niniejszych badaniach przeanalizowano łącznie 44 losowe próbki produktów pochodzenia wodnego na obecność MRSA i bakterie te wyizolowano z 18 próbek, co oznacza, że łącznie ok. 41 % próbek było zanieczyszczonych tymi bakteriami. Wszystkie produkty przetworzone ( $n = 27$ ) były zanieczyszczone w ponad 55 %, natomiast surowe ( $n = 17$ ) – w ok. 65 %. Solomon i wsp. [13] wykazali w surowych krewetkach obecność MRSA jedynie w 11 % próbek. Sivaraman i wsp. [12] stwierdzili podobną liczbę zanieczyszczonych produktów, spośród których ponad 93 % było opornych na wiele środków przeciwdrobnoustrojowych. W niniejszych badaniach odsetek próbek zanieczyszczonych MRSA był ponad 5-krotnie wyższy (rys. 1). Vazquez-Sanchez i wsp. [19] wykryli *S. aureus* metycylinooporne w ok. 25 % produktów rybołówstwa, z czego

największą liczbę zanieczyszczonych prób stanowiły produkty świeże (43 %) i mrożone (30 %), następnie solone (27 %) oraz wędzone (26 %). Sultana i wsp. [17] stwierdzili występowanie MRSA w prawie 25 % mrożonych próbek żywności, co było wynikiem ponad 3-krotnie niższym od uzyskanych w niniejszych badaniach (rys. 1) oraz nieznacznie niższym od wyników, które odnotowali Vazquez-Sanchez i wsp. [19]. Różnica w częstości występowania MRSA w poddanych analizom próbach może być związana z metodami postępowania podczas przetwarzania, warunkami przechowywania, sposobem gromadzenia i pakowania mrożonych produktów, obchodzeniem się z surowcami, jak też dużą odległością od łowisk do brzegu [1, 19]. Mrożone produkty pochodzenia wodnego bywają przechowywane w zmiennych temperaturach, a tym samym mogą przechodzić cykle zamrażania i rozmrażania, co stanowi zagrożenie dla zdrowia konsumentów [13].

Raymond i Ramachandran [8] zestawili kryteria mikrobiologiczne dotyczące patogenów bakteryjnych w produktach rybołówstwa odnoszące się do różnych krajów. Pomimo obecności wielu szczepów *S. aureus* opornych na antybiotyki w różnych rybach i owocach morza, wciąż brak jest ustalonych kryteriów mikrobiologicznych dotyczących liczby MRSA. Zawarte w obowiązującym w Polsce Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 2073/2005 [9] limity dotyczą jedynie występowania *S. aureus* w produktach z gotowanych skorupiaków i mięczaków bez skorup i muszli. Odniesiono jednak powyższe kryteria do wyników badań własnych i stwierdzono, że żadna z grup badanych produktów nie przekroczyła wartości progowej 3,0 log jtk/g (tab. 1). Vazquez-Sanchez i wsp. [19] badali produkty wędzone, mrożone oraz surowe i uzyskali odpowiednio [%]: 7, 7 i 4,8 próbek, w których wartości przekraczały 3,0 log jtk/g, natomiast w niniejszych badaniach uzyskano odpowiednio [%]: 0, 42 i 6 takich wyników. MRSA nie jest naturalną mikroflorą produktów pochodzenia wodnego, stąd do zanieczyszczenia tymi bakteriami doszło na skutek niewłaściwego obchodzenia się przez osoby uczestniczące w przetwarzaniu ryb czy handlu nimi [18]. Poddane analizie mikrobiologicznej produkty (z wyjątkiem marynowanych) sprzedawane były bez opakowań jednostkowych, co mogło dodatkowo wpłynąć na występowanie MRSA. W produktach marynowanych obserwowano najniższy odsetek zanieczyszczonych prób (rys. 1), co oprócz zastosowanego opakowania mogło wynikać z obecności słabych kwasów wpływających na przeżywalność drobnoustrojów. Dodatkowo na obecność mikroorganizmów chorobotwórczych mogą wpływać różne czynniki, w tym właściwe praktyki akwakulturowe, warunki środowiskowe, produkcja, przetwarzanie, dystrybucja, sprzedaż detaliczna, obsługa lub przygotowanie [11].

## Wnioski

1. Około 41 % produktów pochodzenia wodnego o różnym stopniu przetworzenia było zanieczyszczonych metycyloopornymi *Staphylococcus aureus*.

2. Średnia liczba MRSA w produktach wędzonych i mrożonych różniła się w sposób statystycznie istotny.
3. Istnieje potrzeba ciągłego monitorowania łańcucha produkcyjnego.

*Praca została sfinansowana ze środków WZNIJ/2021/PZ/01*

### Literatura

- [1] Ali F.S., Lupindu A.M, Mdegela R.H, Mmoch A.J.: Occurrence of *Staphylococcus aureus* in fresh Indian mackerel fish. Tanzania Veterinary Association Proceedings, 2019, 37, 7-16.
- [2] Badowski M.: Polacy pokochali ryby. [on line]. Strefa Biznesu. Dostęp w Internecie [28.04.2021]: <https://strefabiznesu.pl/polacy-pokochali-ryby-najczesciej-wybieramy-swieze-ale-przez-pandemie-covid19-zauwazamy-rosnacy-popyt-na-produkty-mrozone-i/ar/c3-15179942>
- [3] Hryszko K.: Rynek i spożycie ryb w 2019 roku. XLV Szkolenie – Konferencja Hodowców Ryb Łososiowatych – Webinarium, Rumia, 14 października 2020 r.
- [4] Lekshmi R.G., Kumar K., Anas K., Lekshmi M., Nayak B.B., Kumar S.: Incidence of methicillin-resistant staphylococci in fresh seafood. Adv. Microbiol., 2016, 6, 399-406.
- [5] Novoslavskij A., Terentjeva M., Eizenberga I., Valciā O., Bartkevičs V., Bērziņš A.: Major food-borne pathogens in fish and fish products: A review. Ann. Microbiol., 2016, 66, 1-15,
- [6] Pieńkowska B., Hryszko K.: Spożycie ryb i owoców morza oraz ich przetworów. Rynek ryb – stan i perspektywy, 2018, 29, 30-34.
- [7] PN-EN ISO 7218:2008. Mikrobiologia żywności i pasz. Wymagania ogólne i zasady badań mikrobiologicznych.
- [8] Raymond A., Ramachandran A.: Bacterial pathogens in seafood – Indian scenario. Fishery Technology, 2019, 56, 1-22.
- [9] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Dz. U. L 338, ss. 1-26, z 22.12.2005.
- [10] Rzepkowska A., Zielińska D., Kołożyn-Krajewska D.: Antybiotykooporność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* pochodzących z żywności jako kryterium stawiane probiotykom. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol., 2014, 578, 99-110.
- [11] Sheng L., Wang L.: The microbial safety of fish and fish products: Recent advances in understanding its significance, contamination sources, and control strategies. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., 2021, 20, 738-786.
- [12] Sivaraman G.K., Lalitha K.V., Shankar C.N.R., Jha A.K., Remya S., Vanik D., Visnuvinayagam S., Kriplani Y., Ajeesh: Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* in fish and its multiple drug resistant pattern. J. Envir. Biol., 2017, 38, 389-392.
- [13] Solomon L., Ougbue C.J., Okpokwasili G.C.: Antibiotic resistance profiles of bacteria associated with fresh and frozen shrimp (*Palaemonetes* sp.) and their public health significance. Int. J. Scient. Res. Knowledge, 2013, 1 (10), 448-456.
- [14] Soltan Dallal M.M., Nezhad Fard R.M., Sharifi-Yazdi M.K.: Prevalence of sea, seb, tsst, and mecA genes in *Staphylococcus aureus* isolated from shrimps sold in seafood retailers in Tehran, Iran. J. Food Qual. Hazards Control., 2018, 5 (2), 72-76.
- [15] StatSoft, Inc.: STATISTICA (data analysis software system). Version 10, 2011.
- [16] Stephen J., Mukherjee S., Lekshmi M., Kumar S.H., Varela M.F.: Antibiotic resistance in fish-borne pathogens of public health significance: An emerging food safety issue. Curr. Trends Microbiol., 2020, 14, 11-20.

- [17] Sultana F., Kamrunnahar, Afroz H., Jahan A., Fakruddin M., Datta S.: Multi-antibiotic resistant bacteria in frozen food (ready to cook food) of animal origin sold in Dhaka, Bangladesh. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2014, 4 (1), 268-271.
- [18] Vaiyapuri M., Joseph T.C., Rao B.M., Lalitha K.V., Prasad M.M.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in seafood: Prevalence, laboratory detection, clonal nature, and control in seafood chain. *J. Food Sci.*, 2019, 84, 3341-3351.
- [19] Vazquez-Sanchez D., Lopez-Cabo M., Saa-Ibusquiza P., Herrera J.J.R.: Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain). *Int. J. Food Microbiol.*, 2012, 157, 286-296.
- [20] Biuro Strategii i Analiz Międzynarodowych: Wpływ światowej pandemii koronowirusa na branżę ryb i owoców morza. [on line]. 2020. Dostęp w Internecie [28.04.2021]: [https://wspieramyeksport.pl/api/public/files/1956/Rybna\\_lipiec\\_2020.pdf](https://wspieramyeksport.pl/api/public/files/1956/Rybna_lipiec_2020.pdf)
- [21] Zarei M., Maktabi S., Ghorbanpour M.: Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella* spp. in seafood products using multiplex polymerase chain reaction. *Foodborne Pathog. Dis.*, 2012, 9, 108-112.

#### AQUATIC PRODUCTS OF DIFFERENT PROCESSING LEVELS AS A SOURCE OF METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

##### Summary

Aquatic products are one of the main sources of protein and other nutrients. They play a significant role in the human nutrition. *Staphylococcus aureus* is considered to be the most commonly occurring foodborne bacterial pathogen in the world. *S. aureus* is not a native microflora of aquatic products, but it can be isolated from freshly caught fish. Those products can be additionally contaminated owing to the incorrect handling, storage under improper conditions, transmission of the pathogen by workers and also it may be a consequence of cross-contamination. The wide use of antibiotics in the recent years led to a rapid increase in the antibiotic resistance among the pathogenic bacteria. For this reason, the present research study was performed to evaluate the occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the aquatic products of different processing levels (frozen, smoked, marinated and raw). Based on the research conducted, it was shown that MRSA most often occurred in the frozen samples (approx. 83 %), and the least frequently in the marinated products (approx. 29 %). Although the lowest percent number of samples with methicillin-resistant *S. aureus* was reported in the marinated products, the lowest average number of those bacteria was found in the smoked products (0.54 log CFU/g). Generally, about 41 % of the samples were contaminated by those bacteria.

**Key words:** aquatic products, *Staphylococcus aureus*, pathogen contamination, MRSA 