

IZOLÁCIA, IDENTIFIKÁCIA A TYPIZÁCIA PATOGÉNOV Z VÝROBKOV A PROSTREDIA SME SCREENING OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PERSISTENT STRAINS IN FOOD PROCESSING PLANTS

Janka Koreňová, Zuzana Rešková

Abstract: A number of 235 strains of *Staphylococcus aureus* previously isolated from small or medium (SME) meat- and cheese-processing plants, were genotypically characterized by analysis of VNTR and 4 strains of *Listeria monocytogenes* were typisate by PFGE analysis. Sub-species genotyping of microbial contaminants in food-processing factories may facilitate identification of transient and persistent contaminants, which may help to properly manage the process hygiene.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, VNTR, food processing plants

ÚVOD

Medzi hlavné kontaminanty zaradené v kritériách hygieny procesu výroby a v kritériách bezpečnosti potravín (**Nariadenie ES, 2005**) patrí *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.* a z koagulázopozitívnych stafylokokov *Staphylococcus aureus*.

Pre stranu odberateľa (výrobca) je cenné hodnotenie výskytu a kvantity týchto ukazovateľov vo výrobní a vo výrobkoch (**Koreňová a i. 2009**). Výskumné možnosti a zámery nás však posúvajú ďalej, do roviny identifikácie a typizácie izolovaných kmeňov molekulárno - biologickými metódami. Na základe týchto analýz môžeme posúdiť opakovanú kontamináciu výrobne konkrétnym kmeňom, vystopovať zdroj kontaminácie a spojitost' konkrétnych miest vo výrobní z hľadiska rizika kontaminácie. Niektoré kmene uvedených mikroorganizmov dokážu byť veľmi adaptabilné a schopné prežívať aj v nepriaznivých podmienkach prostredia. Práve opakovaná izolácia rovnakého kmeňa vo výrobnom prostredí v intervale väčšom ako 3 mesiace môže signalizovať jeho odolnosť a schopnosť perzistencie v prostredí.

Zatiaľ čo sporadický výskyt a záchyt rôznych kmeňov patogénov môže byť spôsobený náhodnou kontamináciou zo suroviny, alebo z vonkajšieho prostredia, opakovane zachytená kontaminácia tým istým, perzistentným kmeňom znamená spravidla prítomnosť skrytého miesta v prostredí výroby, ako zdroja kontaminácie. Na odlišenie typov baktérií v rámci jedného druhu a na dôkaz prítomnosti konkrétneho kmeňa slúžia metódy génovej typizácie.

Tieto informácie majú potom významný vplyv pri implementácii hygienických a sanitačných opatrení v potravinárskej výrobe. Počas dlhodobých typizačných štúdií je možné monitorovať a identifikovať perzistentné kmene baktérií (**Schlegelova a i., 2010**).

V práci podávame prehľad o kvantite koagulázopozitívnych stafylokokov (KPS), a identite izolovaných *S. aureus* a *Listeria monocytogenes* z výrobkov a výrobného prostredia troch výrobní potravín živočíšneho pôvodu na Slovensku počas rokov 2010 – 2012.

Na identifikáciu a fenotypickú a genotypickú charakterizáciu izolátov boli použité molekulárno-biologické metódy analýzy DNA.

MATERIÁL A METÓDY

Izolácia baktérií: Analyzované vzorky výrobkov, surovín a sterov z výrobných zariadení (3M™ Sponge-Stick, St. Paul, Minnesota, US) dvoch výrobní syrov z tepelne neošetreného ovčieho mlieka a jednej výrobne tepelne opracovaných mäsových výrobkov boli homogenizované v riediacom médiu peptónová voda (peptón 10 g.l⁻¹; NaCl 5 g.l⁻¹) pre analýzu stafylokokov a v selektívnom riediacom médiu pre množenie *Listeria monocytogenes* Fraser Broth, Merck, Darmstadt, Germany). Zriedené vzorky sa naniesli na Baird-Parker agar (Merck) a inkubovali sa pri 37 °C počas 48 h. Po inkubácii boli platne vyhodnotené na prítomnosť KPS. Vzorky v selektívnom riediacom médiu na množenie *Listeria monocytogenes* boli podrobené dvojestupňovému selektívnemu množeniu, v každom kroku boli nanesené na selektívne médium ALOA (Merck). Po inkubácii na ALOA agare pri 37°C počas 24 – 48 h boli vyrastené kolónie vyhodnotené ako suspektné *L. monocytogenes* podľa sfarbenia a precipitačnej zóny.

Identifikácia baktérií: Na identifikáciu suspektných izolátov *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes* boli použité metódy na báze polymerázovej reťazovej reakcie s priebežnou fluorimetriou (real-time PCR). Pre identifikáciu *S. aureus* boli amplifikované časti génu *acrB* pre akriřlavínovú rezistenciu (Trnčíková a i., 2009) a pre identifikáciu *L. monocytogenes* bol v real-time PCR amplifikovaný génový úsek kódujúci polymerizáciu aktínových proteínov *actA* (Oravcová a i., 2006).

Identifikácia génov *S. aureus* sea, seb, sec a sed: Génové úseky v genóme *S. aureus*, ktoré kódujú potenciálnu produkciu enterotoxínov boli zisťované pomocou real-time PCR: reakcia bola uskutočnená v dvoch duplexných reakciách pre jednotlivé enterotoxíny (SEA-joe a SEB-fam) a (SEC-fam a SED-rox) v 25µl reakčných zmesiach. Na amplifikáciu bol použitý termocykler iQ5 Multicolor Real-Time PCR (Bio-Rad). Fluorescencia bola meraná v kanáloch pre farbivá FAM, JOE a ROX (Klotz a i., 2003).

Typizácia kmeňov: Na typizáciu *S. aureus* kmeňov sme použili genotypizačnú multi-lókusovú analýzu variabilného počtu tandemových repetícií (VNTR). Princíp tejto metódy je založený na prítomnosti niekoľko VNTR lókusov v genóme *Staph. aureus*, vrátane *clfA*, *clfB*, *sdr*, *ssp* a *spa*. Rôzny počet inzertov rovnakej veľkosti sa prejaví v dobre definovateľnej variabilite v dĺžke lokusov (Sabat et al. 2003). Použitie metódy spočíva v multiplexnej PCR, amplifikácii prítomných VNTR lókusov a v ich analýze na kolónovej gélovej elektroforéze zo strany automatického analyzátora (Sabath a i., 2003).

Na genotypizáciu izolátov *L. monocytogenes* bola použitá REA-PFGE – restričná endonukleázová analýza s vyhodnotením na gélovej elektroforéze v pulznom poli. Na restrikciu genómu boli použité enzýmy *ApaI*, *AscI*, následne boli úseky genómu rozdelené na PFGE.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z ovčiarskej výroby I. sa v rokoch 2010 - 2012 zachytili KPS v 75,4 % vzoriek výrobkov a v 26,9% vzoriek sterov. Zo vzoriek bolo izolovaných 273 suspektných kolónií KPS, z ktorých 178 kolónií bolo identifikovaných ako *S. aureus*. Z ovčiarskej výroby II. sa zachytili KPS v 37,7 % vzoriek výrobkov a v 15,4 % vzoriek sterov. Zo vzoriek bolo izolovaných 93 suspektných kolónií KPS, z ktorých 68 kolónií bolo identifikovaných ako *Staph. aureus*. Z mäsiarskej výroby sa zachytili KPS len v jednom výrobku (2,8 %) a v 6 vzorkách sterov (5,6 %). Zo vzoriek bolo izolovaných 33 suspektných kolónií KPS, z ktorých 17 kolónií bolo identifikovaných ako *S. aureus*. Za celé obdobie (r. 2010 – 2012) sa izolovalo 373 suspektných kolónií KPS zo 70 vzoriek výrobkov a zo 45 vzoriek sterov z čoho bolo identifikovaných 263 kolónií *S. aureus* (Tab. 1).

Namerané množstvá mikroorganizmov v konkrétnych surovinách a výrobkoch zodpovedali ich charakteru a vo väčšine prípadov aj legislatívnym požiadavkám. V porovnaní

Potravinárstvo

s kritériami hygieny procesov výroby pre syry podľa Nariadenia (ES) 2073/2005 (2) boli najčastejšie prekročené limity pre KPS a to v OHS a v bryndzi. Z celkovo analyzovaných 118 ks ovčiarских surovín a výrobkov bolo pozitívnych na prítomnosť KPS 69 vzoriek (58,5 %), prekročený limitný počet KPS malo 25 vzoriek (21,2 %) (tabuľka 2).

Zo 45 vyšetovaných izolátov *S. aureus* zo surovín, výrobkov a prostredia výrobní boli len v 6 izolátoch (13,3 %) identifikované gény zodpovedné za produkciu enterotoxínov (z bryndze, pareného syra a z výrobného zariadenia) typu SEC (4x), SEA, SED. Vasil' a i. (2007) uvádzajú podiel kmeňov *S. aureus* obsahujúcich gény pre produkciu enterotoxínov zo surového ovčieho mlieka až 93,6 %.

Tabuľka 1 Prehľad počtu analyzovaných výrobkov a sterov za jednotlivé roky, počet a percentuálne vyjadrenie vzoriek pozitívnych na prítomnosť koagulázopozitívnych stafylokokov (KPS+), (% KPS+), počet analyzovaných suspektných kolónií KPS (KTJ) a kolónií identifikovaných ako *Staph. aureus* (*Staph. aureus*)

r.	Výrobňa	Výrobky	KPS+	KPS+ (%)	Stery	KPS+	KPS+ (%)	KPS (KTJ)	<i>S. aureus</i>
2010	Ovč I	24	16	66,7	52	13	25,0	86	65
	Ovč II	5	2	40,0	19	3	15,8	29	36
	Mäs	15	0	0,0	40	4	10,0	17	13
	spolu	44	18	40,9	111	20	18,0	132	114
2011	Ovč I	17	12	70,6	30	13	43,3	66	36
	Ovč II	14	8	57,1	26	1	3,9	36	17
	Mäs	14	1	7,1	39	0	0,0	9	0
	spolu	45	21	46,7	95	14	14,7	111	53
2012	Ovč I	24	21	87,5	26	3	11,5	95	77
	Ovč II	34	10	29,4	20	6	30,0	28	15
	Mäs	8	0	0,0	28	2	7,1	7	4
	spolu	66	31	47,0	74	11	14,9	130	96
za 3 roky	Ovč I	65	49	75,4	108	29	26,9	247	178
	Ovč II	53	20	37,7	65	10	15,4	93	68
	Mäs	37	1	2,8	107	6	5,6	33	17
	spolu	155	70	45,2	280	45	16,1	373	263

Celkovo sa počas riešenia úlohy zaznamenal záchyt *L. monocytogenes* v 10 vzorkách zo 6 odberových období. Bola to 1 vzorka suroviny, 2 vzorky výrobkov, 4 vzorky sterov z výrobných zariadení (nerez, plast) a 3 vzorky sterov z prostredia výrobní (nerez, hmyz). Pri pozitívnom záchyte bolo kontaminované vždy len jedno zariadenie. Len v jednej výrobní sa záchyt zopakoval v dvoch za sebou nenasledujúcich odberoch, ale na inom zariadení. V dvoch prípadoch sa zároveň so záchyтом na povrchu zariadenia, alebo prostredia identifikovali *L. monocytogenes* aj vo výrobku. Ani v jednej z výrobní sa pozitívny záchyt z rovnakého miesta, alebo vzorky nezopakoval (Tab. 3).

Z PFGE analýzy štyroch izolátov *L. monocytogenes* z ovčiarских výrobní (Obr. 1) sa identifikovali dva rovnaké kmene z ovčiarской výrobní II z etapy II/2011, ktoré sa izolovali z povrchu výrobného zariadenia (č.1) a z výrobku (č.2), a dva rôzne kmene, č. 3 z ovčiarской výrobní I z etapy III/2012 z pasce na hmyz a č. 4 z ovčiarской výrobní II, z etapy II/2012 zo suroviny. Na typizáciu izolátov *L. monocytogenes* z potravín a z prostredia výroby syrov bola použitá PFGE (*AscI* a *Apal*) v štúdiu autora Acciari a i., 2011 a z výroby mäsových výrobkov (Peccio a i., 2003).

Potravinárstvo

132 izolátov *S. aureus* izolovaných z výrobných zariadení, výrobkov a surovín ovčiarskej výroby I. bolo na základe VNTR profilov po MLVA zaradených do 11 kmeňov (A1 – A12) (Tab. 4). S najvyššou frekvenciou sa vyskytovali kmene s VNTR profilom A2 a A10, ktoré sa izolovali v šiestich etapách vzorkovania a v piatich rôznych surovinách a výrobkoch. Kmeň A2 celkovo 9x, kmeň A10 celkovo 14x. Kmeň A2 bol izolovaný z dvoch druhov výrobných zariadení, kmeň A10 zo siedmich druhov výrobných zariadení. Kmeň A1 bol izolovaný v piatich etapách vzorkovania z troch druhov výrobkov, celkovo 9x a z piatich výrobných zariadení, celkovo 7x. Kmeň s VNTR profilom A3 bol izolovaný v troch etapách vzorkovania z troch druhov výrobkov a surovín, celkovo 7x a 1x z plastovej police.

Tabuľka 2 Počet analyzovaných vzoriek surovín a výrobkov z dvoch ovčiarskych výrobní (OHS – ovčí hrudkový syr)

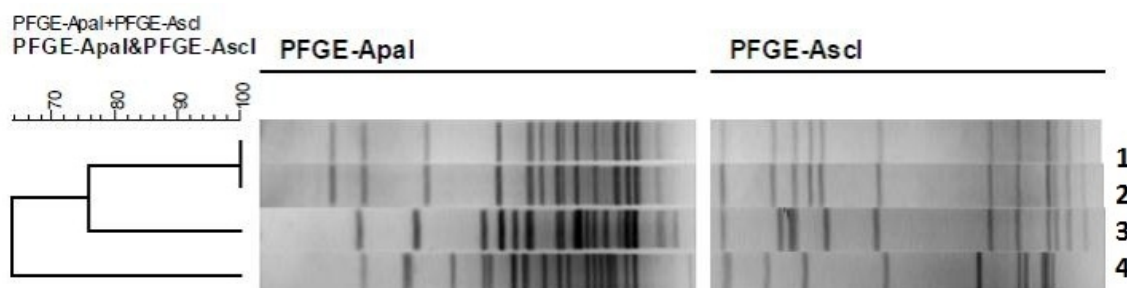
		počet vzoriek	prítomnosť KPS	%	prekročený limit KPS	%
suroviny	mlieko	9	6	66,67	0	0,00
	OHS	52	30	57,69	16	30,77
	Sudovka	6	3	50,00	0	0,00
	KHS	3	0	0,00	0	0,00
výrobky	OHS ochutený	4	4	100,00	2	50,00
	OHS údený	5	2	40,00	0	0,00
	Oštiepok	3	3	100,00	1	33,33
	Parený syr	9	4	44,44	0	0,00
	Parený syr údený	5	1	20,00	0	0,00
	Bryndza	22	16	72,73	6	27,27
	SPOLU	118	69	58,47	25	21,19

Tabuľka 3 Prehľad počtu pozitívnych záchytov *Listeria monocytogenes* vo vzorkách surovín, výrobkov, sterov z výrobných zariadení a z prostredia ovčiarskych výrobní a mäsiarskej výroby spolu za jednotlivé odberové obdobia

Obdobie	Surovina	Výrobok	Výrobné zariadenie	Prostredie	Spolu
IV/2010	-	-	1	-	1
I/2011	-	-	-	-	-
II/2011	-	2	1	1	4
III/2011	-	-	1	-	1
II/2012	1	-	1	-	2
III/2012	-	-	-	1	1
IV/2012	-	-	-	1	1
Spolu	1	2	4	3	10

- žiaden záchyt

Najviac frekventované vzorky opakovane obsahujúce kmene *S. aureus* A10, A1, A2



Potravinárstvo

a A3 sú OHS (12x), bryndza (9x), (kmeň A1 v bryndzi nebol zachytený) a parený syr (7x).

Obr.1: PFGE profil štyroch izolátov *L. monocytogenes* z ovčiarkej výroby II z etapy II/2011 z povrchu zariadenia (1) a z výrobku (2), z etapy II/2012 zo suroviny (4) a z ovčiarkej výroby I z etapy III/2012 z pasce na hmyz (3)

Z pohľadu možnej perzistencie kmeňa sú dôležité najmä opakované izolácie z výrobných zariadení a prostredia po sanitácii. Kmene *S. aureus* sa izolovali v rôznej frekvencii z jedenástich rôznych výrobných zariadení a vzoriek prostredia. Opakovaná izolácia z toho istého zariadenia bola zaznamenaná len v jednom prípade - z nerezovej vane na solný roztok (A), na ktorom sa zopakovala izolácia kmeňa A1 v troch etapách vzorkovania. Celkovo sa izolácia kmeňa A1 na rôznych zariadeniach zopakovala 4x (I, II, III/2010, III/2012) a kmeňa A10 2x 2/2011, III/2012 (Tab. 4).

MLVA analýzou bolo 62 izolátov *S. aureus* izolovaných z výrobných zariadení, výrobkov a surovín ovčiarkej výroby II. zaradených do 15 kmeňov podľa VNTR profilov (C1 – C16). Žiaden kmeň nebol z výrobných zariadení opakovane izolovaný v jednotlivých etapách vzorkovania. Kmeň s VNTR profilom C4 bol opakovane izolovaný v dvoch etapách vzorkovania z OHS. MLVA analýzou bolo 18 izolátov *S. aureus* izolovaných z výrobných zariadení mäsiarskej výroby zaradených do 4 kmeňov podľa VNTR profilov (B1 – B4). Žiaden kmeň z výrobných zariadení nebol v jednotlivých etapách vzorkovania opakovane izolovaný. Z analyzovaných výrobkov nebol izolovaný žiadny kmeň *S. aureus*, suroviny neboli analyzované.

Tab. 4 Výskyt 13 kmeňov *S. aureus* podľa VNTR profilov (A1–A12) v ovčiarkej výrobe I. počas 12 etáp vzorkovania na výrobných zariadeniach (A–H), v surovinách (S1-S2) a vo výrobkoch (V1–V5).

Etapa vzorkovania	A1	A2	A3	A5	A6	A7* A8* A9*	A10	A11	A12	A13	A14
I/2010	A I	A V2 C S2 L V4 D V3									
II/2010	B D V2 H V3	V1 V2									
III/2010	A S2 V5	S2									
IV/2010		S1 S2 V1		A V2 M							
I/2011	V4		V1			S2	V1 V5				
II/2011							B S2 F G J K				
III/2011								V4			
IV/2011							S1 S2 V1				

Potravinárstvo

I/2012		S2				S2	S2 V1		S2 V1		
II/2012	V3	V1 V3	S2 V1 V4		S2		S2 V1 V4			S2	S2
III/2012	A S2	V1	H S2 V4		S2		A H				
IV/2012											

A – vaňa na soľný roztok, B – stena (keramika), C – nádoba na surové mlieko, D – polica na zrenie syra (drevo), E – polica na kysnutie syra (plast), F – stôl v baliarni, G – filter na surové mlieko (textil), H – polica plast, I – nôž (nerez), J – váhy (nerez), K – podlaha (keramika), L - dojace zariadenie, M – polica (nerez) S1 - mlieko, S2 - OHS (ovčí hrudkový syr), V1 - bryndza, V2 - OHS ochutený, V3 - údený syr, V4 - parený syr, V5 - oštiepok

*profily s minimálnou odlišnosťou (v jednom lokuse)

ZÁVER

235 izolátov *S. aureus* izolovaných z výrobných zariadení, výrobkov a surovín dvoch ovčiarskych výrobní a mäsiarskej výrobného typizovaných analýzy VNTR. S najvyššou frekvenciou sa vyskytovali kmene s VNTR profilom A2 a A10, ktoré sa izolovali v šiestich etapách vzorkovania a v piatich rôznych surovinách a výrobkoch ovčiarskej výroby I. Opakovaná izolácia z toho istého zariadenia bola zaznamenaná len v jednom prípade (kmeň A1) - z výrobného zariadenia v troch etapách vzorkovania. Kmeň s VNTR profilom C4 bol opakovane izolovaný v dvoch etapách vzorkovania z OHS. Zo zariadení mäsiarskej výroby nebol v jednotlivých etapách vzorkovania opakovane izolovaný žiadny kmeň. Z analyzovaných výrobkov nebol izolovaný žiadny kmeň *S. aureus*, suroviny neboli analyzované.

LITERATÚRA

- ACCIARI, V. A., TORRESI, M., MIGLIORATI, G., DI GIANNATALE, E., SEMPRINI, P., PRENCIPE, V. 2011. Characterisation of *Listeria monocytogenes* strains isolated from soft and semi-soft cheeses sampled in a region of Italy. In *Veterinaria Italiana*, 47, 1, 2011, pp. 15 – 23.
- KOREŇOVÁ, J., LOPAŠOVSKÁ, J., KUČHTA, T. 2009. Biofilm forming bacterial contaminants in small and medium-sized ewe's milk and meat processing enterprises in Slovakia. In *Journal of Food and Nutrition Research*, 48/3, 2009, 115 - 120.
- KLOTZ, M., OPPER, S., HEEQ, K., ZIMMERMANN, S. 2003. detection of *Staphylococcus enterotoxins A to D* by real-time PCR assay. In *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (10), 2003, 4683-7.
- NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 2073/2005 z 15. novembra 2005, o mikrobiologických kritériách pre potraviny. Úradný vestník EÚ L 338/8, 2005.
- ORAVCOVÁ, K., KAČLÍKOVÁ, E., KRASCENICSOVÁ, K., PANGALLO, D., BREŽNÁ, B., SIEKEL, P., KUČHTA, T. 2006. Detection and quantification of *Listeria monocytogenes* by 5'-nuclease polymerase chain reaction targeting the *actA* gene. In *Letters in Applied Microbiology*, 42, 2006, pp. 15–18.
- PECCIO, A., AUTIO, T., KORKEALA, H., ROSMINI, R., TREVISANI, M. 2003. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. In *Letters in Applied Microbiology*, 37, 2003, pp. 234–238.
- SABAT, A., KRZYSZTON-RUSSIAN, J., STRZALKA, W., FILIPEK, R., KOSOWSKA, K., HRYNIEWICZ, TRAVIS, J., POTEPA, J. 2003. New Method for Typing *Staphylococcus aureus* Strains: Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Polymorphism and Genetic Relationships of Clinical Isolates. In *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 4, 2003, pp. 1801-1804.
- SCHLEGELOVA, J., BABAK, V., HOLASOVA, M., KONSTANTINOVA, L., NECIDOVA, L., ŠIŠAK, F., VLKOVA, H., ROUBAL, P. and JAGLIC, Z. 2010. Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. In *Czech J. Food Sci.*, 28, 450–461.

TRNČÍKOVÁ, T., HRUŠKOVÁ, V., ORAVCOVÁ, K., PANGALLO, D., KACLÍKOVÁ, E. 2009. Rapid and Sensitive Detection of *Staphylococcus aureus* in Food Using Selective Enrichment and Real-Time PCR Targeting a New Gene Marker. In *Food Anal.* 2, 241–250

VASIL, M., FOTTA, M., ELEČKO, J.: Produkcia enterotoxínov druhom rodu *Staphylococcus sp.* izolovaných z ovčieho mlieka. In *Slovak Journal of Animal Science*, 40 (1), 2007, 52-56.

Podakovanie: Táto práca bola podporovaná projektom MPaRV SR č. 4697/2009-810 a projektom ASFEU „Efektívne metódy kontroly pre bezpečné potraviny“ (IMTS 26240220012).

Kontaktná adresa: Ing. Janka Koreňová, Výskumný ústav potravinársky Bratislava, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, tel.:02/ 50 237 156, E-mail:korenova@vup.sk