

Studium výskytu listerií v procesu výroby olomouckých tvarůžků

JARMILA VYTRÁSOVÁ - MARCELA PEJCHALOVÁ - ZUZANA MĚRKOVÁ

SOUHRN. Byl studován výskyt listerií v měkkých zrajících sýrech. Průkaz listerií byl prováděn podle normy ČSN ISO 10560 po předchozím ověření selektivity živných médií Oxford a PALCAM na čistých kulturách. Mikrobiologickým rozbořem reálných vzorků měkkých sýrů byl potvrzen pravidelný výskyt listerií v olomouckých tvarůžcích, proto byl proveden monitoring provozu za účelem zjištění možných zdrojů kontaminace. K urychlení detekce byla využita metoda imunomagnetické separace listerií (IMS), která ve srovnání s klasickou kultivační metodou zkrátila stanovení o jeden den.

KLÍČOVÁ SLOVA: *Listeria*; imunomagnetická separace; olomoucké tvarůžky

V posledních letech se listerie stala mikroblem, k němuž se obrací pozornost vzhledem k závažnosti onemocnění, které může vyvolávat. Koncem sedmdesátých let bylo ve světě zaznamenáno několik epidemiologicky významných onemocnění listeriózou a vyskytlo se i několik smrtelných případů. *Listeria monocytogenes* se totiž vyskytuje v malém množství v potravinách souběžně s velkým množstvím doprovodné mikroflóry. U zdravých jedinců nevyvolává toto množství žádné komplikace, avšak rizikové skupiny (těhotné ženy, staré osoby, jedinci se sníženou imunitou organismu) jsou listeriózou ohroženi [1]. Přenos listeriózy se nejčastěji uskutečňuje kontaminovanými potravinami, rizikové jsou zejména tepelně neopracované masné výrobky, lahůdkové paštiky, mořští živočichové, ale i měkké, plísňové a pod mazem zrající sýry a sýry ovčí i kozí vyrobené z nepasterovaného mléka [2].

Pro zjištění listerií v potravinách se využívá jednak standardních klasických metod s kultivačními médii o různé selektivitě, jednak moderních metod urychlujících dobu stanovení, mezi něž patří i technika imunomagnetické separace (IMS). Následuje confirmace pomocí biochemických testů, kterými je možno odlišit patogenní *L. monocytogenes* od ostatních, nepatogenních druhů listerií.

Ing. Jarmila VYTRÁSOVÁ, CSc., Ing. Marcela PEJCHALOVÁ, Ing. Zuzana MĚRKOVÁ,
Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita
Pardubice, Štrossova 239, 530 03 Pardubice, Česká republika.

Hlavním cílem této práce bylo prověřit oběma uvedenými způsoby výskyt listerií v tvarůzcích a na základě provedených mikrobiologických rozborů v jednotlivých fázích výrobního procesu zjistit možné zdroje kontaminace. Dalším úkolem bylo ověřit selektivitu používaných půd pro tak složitou matici, jakou jsou olomoucké tvarůžky, veškeré vyzolované kolonie druhově identifikovat a pokusit se eliminovat případné nespecifické reakce.

Materiál a metody

Pro ověření selektivity živných médií Oxford a PALCAM a biochemických testů byly použity čisté kultury *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Staphylococcus aureus*, *Rhodococcus equi* - sbírka laboratoře Katedry biologických a biochemických věd, Univerzita Pardubice, *Brevibacterium linens* JHB-16, *Candida valida* JHY-23, diagnostická a produkční laboratoř Jindřichův Hradec. Pro imunomagnetickou separaci (IMS) bylo využito magnetického separátoru MPC-1 (Dynal, Oslo, Norsko) a imunomagnetických kuliček Dynabeads® anti-*Listeria* (Dynal).

Vzorky olomouckých tvarůžků byly zakoupeny jednak v tržní síti, jednak získány přímo ve výrobě.

Průkaz listerií v reálných vzorcích byl proveden dle normy ČSN ISO 10560 [3].

25 g vzorku bylo zhomogenizováno na stomacheru v 225 ml pomnožovací půdy *Listeria* Enrichment Broth (LEB, HiMedia, Bombay, Indie) a inkubováno při 30 °C po dobu 1; 2 a 7 dnů. V těchto intervalech bylo provedeno vyočkování na povrch pevných médií Oxford a PALCAM (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie) a inkubace 48 h při 37 °C.

Pro konfirmaci byly vybrány suspektní kolonie a přeočkovány na neselektivní půdu s tryptonem, soytonem a kvasničným extraktem (TSYEA, HiMedia). Po 24 h kultivaci při 37 °C byly provedeny příslušné biochemické testy dané normou, CAMP test a testy API *Listeria* (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francie).

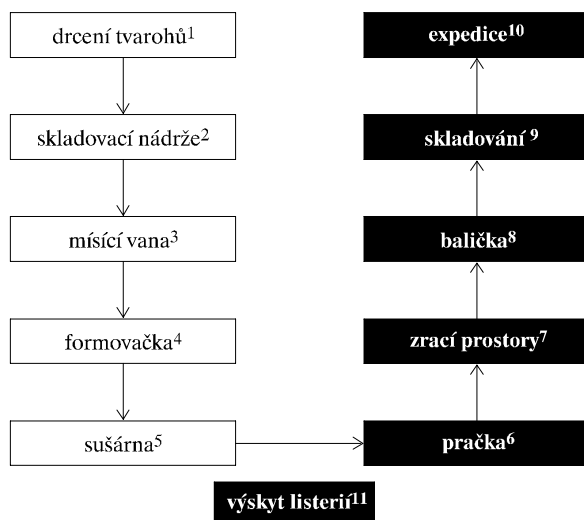
Současně s klasickou kultivační metodou byla provedena IMS. Do mikrozkuhavky bylo odměřeno 20 µl suspenze imunomagnetických kuliček a přidán 1 ml pomnoženého vzorku. Po 10 min inkubaci za mírného promíchávání při laboratorní teplotě byla mikrozkuhavka vložena do imunomagnetického separátoru a ponechána 3 minuty k separaci imunomagnetických částic (IMČ). Po odstranění supernatantu byly kuličky 5-krát promyty vždy 1 ml promývacího tlumivého roztoku PBS Tween (0,01 mol.l⁻¹ fosforečnanový tlumivý roztok pH 7,4; 0,15 mol.l⁻¹ NaCl a 0,05 % Tween 20). Poté

byl komplex IMČ-imobilizované buňky resuspendován v 100 μ l PBS Tweenu a suspenze byla vyočkována po 50 μ l na povrch kultivačních médií Oxford a PALCAM. Misky byly inkubovány 24–72 h při 37 °C.

Monitoring provozu na výrobu olomouckých tvarůžků byl proveden stěrovou metodou. Tampon byl po odběru vzorku vložen do 10 ml sterilní půdy LEB a inkubován při 30 °C 1; 2 a 7 dnů. Stěry byly odebrány celkem 3-krát, vždy na stejném místě provozu, v odstupu 6 týdnů. Na přítomnost listerií byly prověřeny též suroviny a polotovary a odebrány vzorky vod a odpadních vod.

Pro ověření selektivity tuhých kultivačních médií Oxford a PALCAM byl povrch těchto půd inokulován čistými kulturami listerií a čistými kulturami doprovodné mikroflóry vyzolované z reálných vzorků.

Identifikace doprovodné mikroflóry byla provedena podle identifikačních postupů zahrnujících morfologii buněk i kolonií narostlých na selektivně-diagnostických půdách. Dále byly použity biochemické testy a mikrotesty, které byly vyhodnoceny identifikačním počítačovým programem INFOS verze 2.0 (Česká sbírka mikroorganismů, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity Brno). Identifikace kvasinek byla provedena ve spolupráci s mikrobiologickým oddělením Nemocnice v Pardubicích.



OBR. 1. Schéma výroby olomouckých tvarůžků.

FIG. 1. Working scheme of Olomouc cheese cakes.

1 - crushing of curds, 2 - tanks for storage, 3 - mixing tube, 4 - machine for moulding, 5 - drier, 6 - washmachine, 7 - ripening room, 8 - wrapping machine, 9 - storage, 10 - expedition, 11 - occurrence of *Listeria* spp.

Výsledky a diskuse

Ve všech vzorcích zkoušených tvarůžků byly nalezeny listerie, které byly identifikovány jako *L. welshimeri*, v několika případech jako *L. innocua*. V žádném ze 16 odebraných tvarohů na výrobu tvarůžků listerie obsaženy nebyly. Při monitoringu výskytu listerií v provozu byly listerie pravidelně zjištěny na místech vyznačených na obr. 1. Jak vyplývá ze schématu, v procesu výroby se listerie poprvé objevují v pračce - a to i po výměně pračky staré za automatickou. Prací voda byla po mikrobiologické analýze jakožto zdroj listerií vyloučena.

V odpadních vodách byla vždy nalezena velmi rozmanitá mikroflóra, nejméně 2 druhy listerií a v 1 případě byla vizolována *L. monocytogenes*.

Při vyšetřování stěrů i polotovarů došlo na půdách PALCAM i Oxford k nárůstu doprovodné mikroflóry, která mnohdy ztěžovala odečítání charakteristických kolonií listerií, protože některé druhy vykazovaly slabou eskulinovou reakci. Výsledky analýzy polotovarů jsou uvedeny v tabulce 1.

Obdobná mikroflóra byla nalezena ve stěrech. Navíc se zde vyskytovaly kvasinky *Trichosporon cutaneum* a koryneformní bakterie (tab. 2, 3, 4) Zjištěné kvasinky patří mezi běžné mlékárenské mikroorganismy. Výskyt stafylokoků v mlékárenských provozech s vysokou hygienickou úrovní bývá často spojen s nálezem listerií, jak uvádí také Tóth a Ivanová [4].

TABULKA 1. Vyšetření polotovarů na přítomnost *Listeria* spp.
TABLE 1. Occurrence of *Listeria* spp. in semi-finished product.

Polotovary ¹	PALCAM		Oxford		
	<i>Listeria</i> spp.	<i>Candida</i> spp.	<i>Listeria</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.
tvaroh po formování ²	–	–	–	–	–
tyčinky před balením ³	+	+	+	–	+
tvarůžky malé po oplachu ⁴	+	–	+	–	+
věnečky - sušárna ⁵	–	+	–	+	+
tvarůžky velké před balením ⁶	+	–	+	–	+
kousky s kmínem před balením ⁷	+	–	+	–	+
tvarůžky malé před balením ⁸	+	+	+	–	+

1 - semi-finished products, 2 - curds after moulding, 3 - sticks before packing, 4 - Olomouc cakes of cheese (small) after washing, 5 - ringlets of cheese in drier, 6 - Olomouc cakes of cheese (big) before packing, 7 - pieces with cumin before packing, 8 - Olomouc cakes of cheese (small) before packing.

TABULKA 2. Stěry z provozu č. 1.
TABLE 2. Scrapings of the manufacture premises No. 1.

Stěry ¹	PALCAM			Oxford		
	<i>Listeria</i> spp.	<i>Candida</i> spp.	<i>Trichosp.</i> <i>cutaneum</i>	<i>Listeria</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Staph.</i> spp.
drtič ²	–	–	–	–	–	–
nádrž na tvarohy ³	–	–	–	–	–	–
mísící vana - nová ⁴	–	–	–	–	–	+
dopravní pás - mísící vana ⁵	–	–	–	–	–	+
formovačka ⁶	–	+	–	–	–	+
zrací rošty ⁷	–	–	+	–	+	+
sušárna - stěna ⁸	–	+	–	–	–	+
pračka stará ⁹	+	–	+	+	–	+
zrací bedny ¹⁰	+	–	+	+	–	+
paleta pod zrací bedny ¹¹	+	–	+	+	–	+
chladárna ¹²	–	–	–	–	–	+
balička - dopravní pás ¹³	+	–	+	+	–	+
plena ¹⁴	+	–	+	+	–	+
plastová zástěra ¹⁵	+	–	+	+	–	+
rukavice ¹⁶	+	–	+	+	–	+
podlaha - balárna ¹⁷	+	–	+	+	–	+
násypka na tvaroh ¹⁸	+	–	–	+	–	+
dřevěná paleta v rolovně ¹⁹	+	–	+	+	–	+
nůž - balička ²⁰	+	–	+	+	–	+
vanička na kousky ²¹	+	–	+	+	–	+
kbelík k mytí beden ²²	+	–	–	+	–	+
odpad - balárna ²³	+	–	+	+	–	+
pracovní stoly na rolování ²⁴	+	–	+	+	–	+

Trichosp. - *Trichosporon*, *Staph.* - *Staphylococcus*.

1 - scrapings, 2 - crusher, 3 - tank for curds, 4 - new mixing tub, 5 - mixing tub - transport band, 6 - machine for moulding, 7 - shelves for ripening, 8 - drier - wall, 9 - old washmachine, 10 - boxes for ripening, 11 - pallet under boxes for ripening, 12 - cooling plant, 13 - wrapping machine - transport band, 14 - sheet of linen, 15 - plastic apron, 16 - gloves, 17 - floor - packing room, 18 - hopper for curds, 19 - wooden pallet in moulding room, 20 - knife - wrapping machine, 21 - vat for pieces, 22 - pail for cleaning boxes, 23 - waste - packing room, 24 - working tables in moulding room.

TABULKA 3. Stěry z provozu č. 2.
TABLE 3. Scrapings of the manufacture premises No. 2.

Stěry ¹	PALCAM				Oxford				
	<i>List.</i>	<i>Cand.</i>	<i>Bac.</i>	koryn.	G ⁺ koky	<i>Trich.</i>	<i>List.</i>	<i>Staph.</i>	koryn.
drtič ²	–	–	+	–	–	–	–	–	–
nádrž na tvarohy ³	–	–	–	–	–	–	–	–	–
mísicí vana - nová ⁴	–	–	–	–	–	–	–	+	–
dopravní pás - mísicí vana ⁵	–	–	–	–	–	–	–	–	–
formovačka - nová ⁶	–	–	–	–	–	–	–	+	–
formovačka - stará ⁷	–	–	–	+	–	–	–	–	+
zrací rošty ⁸	–	–	–	–	–	–	–	–	–
sušárna ⁹	+	–	–	+	–	–	+	+	–
pračka - dopravní pás ¹⁰	+	+	–	–	–	+	+	–	–
zrací bedny ¹¹	+	+	–	–	–	+	+	–	–
paleta ke zrací bedně ¹²	+	+	–	–	–	+	+	+	–
chladárna ¹³	–	–	–	–	+	–	–	–	–
balička - pás po mytí ¹⁴	+	–	–	–	–	+	–	+	–
balička - dopravní pás ¹⁵	+	+	–	–	–	+	+	+	–
plošina v rolovně ¹⁶	+	+	–	–	–	+	+	+	–
pracovní stoly - rolovna ¹⁷	+	+	–	–	–	+	+	+	–
stohovač palet ¹⁸	+	–	–	–	–	+	+	+	–
zástěra jednorázová ¹⁹	–	–	–	–	–	–	–	–	–
zástěra v balírně ²⁰	+	+	–	–	–	+	+	+	–
balárna - stěna ²¹	–	+	–	–	+	–	–	+	–
stěna v rolovně ²²	–	–	–	–	+	–	–	+	–
topení v rolovně ²³	+	–	–	–	–	+	+	+	–
násypka na tvaroh ²⁴	–	–	–	–	+	–	–	–	–
formovna - zeď ²⁵	–	–	–	–	–	–	–	–	–
automatická pračka ²⁶	+	–	–	–	–	–	+	+	–
šatna ženy - skříňka ²⁷	–	–	–	–	+	–	–	+	–
šatna ženy - podlaha ²⁸	–	+	–	+	–	–	–	+	–

List. - *Listeria* spp., *Cand.* - *Candida* spp., *Bac.* - *Bacillus* spp., koryn. - koryneformní bakterie (coryneform bacteria), *Trich.* - *Trichosporon cutaneum*, *Staph.* - *Staphylococcus* spp.

1 - scrapings, 2 - crusher, 3 - tank for curds, 4 - new mixing tub, 5 - mixing tub - transport band, 6 - new machine for moulding, 7 - old machine for moulding, 8 - shelves for ripening, 9 - drier, 10 - washmachine - transport band, 11 - boxes for ripening, 12 - pallet under box for ripening, 13 - cooling plant, 14 - wrapping machine - band after washing, 15 - wrapping machine - transport band, 16 - platform in moulding room, 17 - working tables in moulding room, 18 - device for stocking of pallets, 19 - single use apron, 20 - apron in packing room, 21 - packing room - wall, 22 - wall in moulding room, 23 - heating in moulding room, 24 - hopper for curds, 25 - moulding hall - wall, 26 - automatic washmachine, 27 - cloak-room for women - wardrobe, 28 - cloak-room for women - floor.

TABULKA 4. Stěry z provozu č. 3.
TABLE 4. Scrapings of the manufacture premises No. 3.

Stěry ¹	PALCAM				Oxford			
	<i>List.</i>	<i>Cand.</i>	G ⁺ koky	koryn.	<i>Trich.</i>	<i>List.</i>	<i>Staph.</i>	<i>Bac.</i>
drtič ²	–	+	–	–	–	–	–	–
nádrž na tvaroh ³	–	–	+	–	–	–	+	–
mísicí vana - nová ⁴	–	–	–	–	–	–	+	–
mísicí vana - dopravní pás ⁵	–	–	–	–	–	–	+	–
násypka na tvaroh ⁶	–	–	–	+	–	–	+	–
formovačka - nová ⁷	–	–	+	–	–	–	+	–
formovačka - stará ⁸	–	–	–	+	–	–	–	+
formovačka stará - dopr. pás ⁹	–	–	–	–	–	–	+	–
zrací rošty ¹⁰	+	–	–	–	+	+	+	–
sušárna - stěna ¹¹	–	–	–	–	–	–	–	–
sušárna - topení ¹²	–	–	+	–	–	–	–	–
pračka - dopravní pás ¹³	+	–	–	–	–	+	+	–
zrací bedny ¹⁴	+	–	+	–	+	+	+	–
paleta pod zrací bedny ¹⁵	+	–	+	–	+	+	+	–
plošina v rolovně ¹⁶	+	–	+	–	+	+	+	–
pracovní stoly na rolování ¹⁷	+	–	–	–	+	+	+	–
stěna v rolovně ¹⁸	–	–	–	–	–	–	–	–
topení v rolovně ¹⁹	+	–	–	–	+	+	+	–
automatická pračka ²⁰	+	–	+	–	–	+	+	–
balička na věnečky - hlava ²¹	+	–	–	–	+	+	+	–
balička na věnečky - dopr. pás ²²	+	–	–	–	+	+	+	–
stohovač palet - balírna ²³	+	–	–	–	+	+	+	–
větrák z kotelny ²⁴	–	–	–	–	–	–	–	–
chladírna - stěna ²⁵	+	–	+	–	–	+	+	–

List. - *Listeria* spp., *Cand.* - *Candida* spp., *Bac.* - *Bacillus* spp., *koryn.* - koryneformní bakterie (coryneform bacteria), *Trich.* - *Trichosporon cutaneum*, *Staph.* - *Staphylococcus* spp.

1 - scrapings, 2 - crusher, 3 - tank for curds, 4 - new mixing tub, 5 - mixing tub - transport band, 6 - hopper for curds, 7 - new machine for moulding, 8 - old machine for moulding, 9 - old machine for moulding - transport band, 10 - shelves for ripening, 11 - drier - wall, 12 - drier - heating, 13 - washmachine - transport band, 14 - boxes for ripening, 15 - pallet under boxes for ripening, 16 - platform in moulding room, 17 - working tables in moulding room, 18 - wall in moulding room, 19 - heating in moulding room, 20 - automatic washmachine, 21 - wrapping machine for ringlets of cheese - head, 22 - wrapping machine for ringlets of cheese - transport band, 23 - device for stocking of pallets - packing room, 24 - ventilator from boiler room, 25 - cooling plant - wall.

Při ověřování selektivity obou kultivačních půd bylo zjištěno, že selektivita půdy PALCAM je nižší, než selektivita půdy Oxford, což je dáno jejím složením. Půda Oxford obsahuje cykloheximid, který potlačuje růst kvasinek. Vzhledem k růstu rozdílné mikroflóry na těchto půdách je výhodné používat při stanovení listerií půdy obě.

Doprovodná mikroflóra se objevovala na uvedených médiích nejen při klasické kultivační metodě, ale i po IMS. Tento fakt nás opravňuje domnívat se, že při IMS dochází k nespecifickým reakcím. Povaha nespecifických reakcí při IMS, které ztěžují detekci listerií a možnosti jejich eliminace zůstávají předmětem dalšího studia. Kulturní mikroflóra *Brevibacterium linens* a *Candida valida* používaná pro výrobu tvarůžků na sledovaných půdách nerostla.

V době, kdy byly prováděny jednotlivé odběry stěrů, vzorků a polotovarů, probíhala rekonstrukce provozu a výměna stávajícího zařízení za nerezové. Při dalších odběrech však byly listerie nalezeny i na nerezových částech. Toto zjištění je v souladu s Bilgilim [5], který uvádí, že listerie mohou tvořit biofilmy na hydrofilních površích předmětů (nerezová ocel), zvláště v přítomnosti komplexních růstových živin. V prostředí mlékárenských závodů je likvidace listerií technicky náročný a nákladný proces. Pokud se *Listeria* dostane do výrobního prostředí, je velmi těžké ji z tohoto prostředí odstranit. Asperger a kol. [6] poukázali na případ sýrárny kolonizované rezistentním kmenem *L. monocytogenes* 1/2, kde ani velmi přísný sanitální režim nedával záruku výroby sýra bez listerií. Také Neumann a kol. [7] uvádějí, že v závodech s intenzivním zabezpečením hygienických podmínek se listerie často vyskytují. Tyto paradoxní poznatky byly potvrzeny i ve výrobně olomouckých tvarůžků.

Závěr

Klasická kultivační metoda na stanovení listerií v potravinách představuje zdlouhavou metodu. Metoda IMS tento proces účinně zkracuje minimálně o jeden den. Vzhledem k růstu doprovodné mikroflóry na obou izolačních půdách však vyžadují obě metody vždy celou škálu identifikačních testů. Lokální zdroj listerií v procesu nalezen nebyl a lze předpokládat, že nejpravděpodobnějším zdrojem listerií jsou biofilmy na různých zařízeních.

Poděkování

Děkujeme MUDr. Karlu Menclovi, CSc. z oddělení mikrobiologie Nemocnice v Pardubicích za pomoc při identifikaci kvasinek.

Práce vznikla za podpory grantu MŠMT VS-96058 a GAČR 203/99/0044.

Literatura

1. CALDER, J. A. M.: *Listeria* meningitis in adults. *Lancet*, 350, 1997, s. 307-308.
2. STEINHAUSEROVÁ, I. - SMOLA, J.: Výskyt listerií v potravinách prodáváných v naší tržní síti. In: Moderní trendy v mikrobiologii. Praha : Československá společnost mikrobiologická, 1996, s. 75-78.
3. ČSN ISO 10560. Mléko a mléčné výrobky - Průkaz *Listeria monocytogenes*. 1996.
4. TÓTH, L. - IVANOVÁ, X.: Kontaminácia mlieka a mliečnych výrobkov listériami. Slovenský veterinárny časopis, 21, 1996, č. 1, s. 27-30.
5. BILGILI, S. F.: *Listeria* biofilm on food processing surfaces. *Broiler Industry*, 60, 1997, č. 5, s. 44.
6. ASPERGER H. - URL, B. - BRANDL, E.: Quality safeguard in soft cheese production (*Listeria*). (Zur Qualitätssicherung bei der Produktion von Weichkäse aus der Sicht der Listerienproblematik.) *Deutsche Molkerei-Zeitung*, 112, 1991, č. 37, s. 1125-1131.
7. NEUMANN, H. H. - KONERMANN, H. - ABDEL-HAKIEM: Zum Vorkommen von *Listeria* - Arten und *Listeria* - Serovaren in Käse. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 42, 1991, s. 90-92.

Do redakcie došlo 25.8.1999.

Study of *Listeria* spp. occurrence in Olomouc cheese-cakes manufacture

VYTRÁSOVÁ, J. - PEJCHALOVÁ, M. - MĚRKOVÁ, Z.: *Bull. potrav. Výsk.*, 38, 1999, p. 233-241.

SUMMARY. Occurrence of the *Listeria* spp. in ripening soft cheeses was studied. Detection of *Listeria* spp. was performed according to the standard ČSN ISO 10560 after previous verification of selectivity of the nutrient media Oxford and PALCAM using pure cultures. Continuous occurrence of *Listeria* spp. in Olomouc cheese-cakes was confirmed by microbiological analysis. Thus, the manufacture was monitored in order to find possible sources of contamination. To accelerate detection, the method of immunomagnetic separation of *Listeria* spp. was utilized. The IMS method saved the time of analysis in comparison with the standard cultivation method by one day.

KEYWORDS: *Listeria*; immunomagnetic separation; Olomouc cheese-cakes