

SLEDOVÁNÍ ŠÍŘENÍ LISTERIÍ NA MODELOVÉ SÝROVÉ HMOTĚ

Šárka Havlíková, Eva Kvasničková, Marta Pechačová
MILCOM a. s. Praha

Investigation of *Listeria* spread on model rennet curd

Abstrakt

Šíření listerií je usnadňováno schopností buněk listerií tvořit flagelinové bičíky jako orgány pohybu. V uvedené práci byla testována pohyblivost 6 izolovaných kmenů *Listeria monocytogenes* a dvou kmenů *Listeria innocua*. Byla konstatována shodná pohyblivost v neutrálním prostředí při teplotě 22-25 °C, v kyselém prostředí (pH 4,5) při téže teplotě pohyblivost u jednoho kmene *Listeria monocytogenes* a u jednoho kmene *Listeria innocua* pouze za plně aerobních podmínek. Na modelové sýrové hmotě byly k testování použity kmeny *Listeria innocua* a šíření listerií bylo dokumentováno odběrem vzorků z určené vzdálenosti na povrchu a do hmoty od plochy naočkované známým počtem buněk listerií. Šíření listerií není funkcí pouze jejich aktivního pohybu, ale současně i dalších faktorů.

Klíčová slova: listerie, pohyblivost, bičíky, flagelin, sýrová hmota

Abstract

Listerias spread is facilitated with cell ability to make flagellum as the organ of motility. Activity of 6 isolated strains of *Listeria monocytogenes* and two strains of *Listeria innocua* was tested in this work. According to motility at temperature 22 to 25 °C was finding in neutral medium and for one strain of *Listeria monocytogenes* and one strain of *Listeria innocua* in acidic medium only under fully anaerobic conditions. Strains of *Listeria innocua* were used to testing on the model rennet curd. Listerias spread was documented by sampling from fixed distance (space) on the surface and into the rennet curd from the surface inoculated with known cell count. Listerias spread is not only the function of their active motility, but also of the other factors.

Key words: listerias, motility, flagella, flagellin, rennet curd

Úvod

Přímý cílevědomý pohyb je jedna z kvalit, spojovaná s živými organismy, a všechny známé formy života na Zemi vykazují nějaký druh pohybu. U bakterií jde především o převod chemické energie na mechanickou na buněčné úrovni. Takto získaná energie umožňuje bakteriím lepší přístup k živinám anebo, což je případ listerií, přesun k hostitelským buňkám živých mikroorganismů; po vniknutí do jejich buněk a využití jejich obsahu dochází k rychlému pronikání do dalších buněk (Tilney et al., 1989).

Listerie způsobují tzv. saproozonózy, což jsou onemocnění způsobená listeriem přenesenými z neživého organického substrátu nebo zvířete na člověka. Rozmnožují se a rostou za podmínek, kdy většina ostatních bakterií pouze přežívá. Jako minimální pH se uvádí až hodnota 4,4, maximální obsah soli 10 %, minimální teplota - 0,4 °C. To znamená, že jsou schopné růstu a rozmnožování při teplotách a podmínkách uchovávání a konzervace potravin. Jsou aerobní, osidlují především povrchy potravin a vyhovuje jim vyšší vlhkost - jako minimální aw se uvádí hodnota 0,92 (Bednář a kol., 1996).

Listerie jsou schopny pohybu dvěma způsoby. První způsob je pohyb pomocí peritrichiálních bičků, tvořených bílkovinou flagelinem. Tuto bílkovinu si tvoří listerie samy (Jacchieri et al., 2003) a přemístování pomocí bičků využívají především při teplotách nižších než je teplota buněk teplokrevných živočichů. Listeriím tento způsob pohybu slouží především k přemístování směrem k cílovým buňkám infekce (O'Neil et al., 2006) a tak přispívá k rychlému šíření nákazy mimo živé tkáně. Významně se uplatňuje při tvorbě biofilmů (Done et al., 2004), které jsou možným zdrojem kontaminace potravinářských výrobků listeriem. Při velmi nízkých teplotách se uvádí, že se listerie prakticky nepohybují, ale že jsou schopny rozmnožování a růstu.

Druhý způsob je pomocí asymetricky umístěných dlouhých vláken, tvořených bílkovinou aktinem (Tilney et al., 1989). Po průniku do organismu listerie adhezuje na hostitelskou buňku a indukuje fagocytózu. Pomocí hemolysinu- listeriolysinu se dostane do protoplazmy a na svém povrchu vyloučí protein ActA, na který se váží aktinové monomery z protoplazmy hostitelské buňky živých organismů, tzn. při teplotě 37 °C, a vytváří dlouhá vlákna - filamenta. Kontinuální polymerizace aktinu posunuje bakterii dopředu ve směru určeném asymetrickým výskytem bílkoviny aktinu A na povrchu buňky listerií. Pro popis tohoto pohybu se používá většinou termín "raketový pohyb". Aktinové bičíky umožňují pomnoženým buňkám listerií rychlý průnik fagocytózou do sousedních buněk hostitele a tím velmi rychlé šíření infekce v napadeném organismu. Při tvorbě aktinových bičků při 37 °C je blokována tvorba flagelinových peritrichiálních bičků, tzn. že buňka listerií se tedy pohybuje buď jedním nebo druhým způsobem (Kathariou et al., 1995; Shen et al., 2006). U nepatogenního druhu *Listeria innocua* není při 37 °C blokována tvorba flagelinových bičků, přičemž se netvoří aktinové bičíky, tudíž druh není patogenní a lze ho používat jako modelový mikroorganismus místo patogenního druhu *Listeria monocytogenes* (Gleeson, 2005).

Pohyb pomocí peritrichiálních flagelinových bičků je pro vyhledávání rizika kontaminace potravin, šíření a přenosu infekce významný, a proto je sledování pohybu listerií v sýrech cílem naší práce. Počátečním krokem bylo ověření pohyblivosti listerií za různých teplot a podmínek.

Metody stanovení pohyblivosti jsou založeny buď na přímém mikroskopickém pozorování ve visuté kapce nebo na vpichu do speciálního média a sledování růstu podél něj.

Vytváří-li se typický deštníkovitý tvar, je bakterie pohyblivá (Siegrist, 2006).

Další experimentální metoda je popsána v literatuře (Kathariou, 1995). Na mírně ztužený agar (TSB s 0,25 % agaru) v Petriho misce bylo bodově naočkováno inokulum, u pohyblivých bakterií se po kultivaci kolem kolonií vytvořilo "halo", u nepohyblivých zůstávaly kolonie kompaktní.

Metody a materiál

BBLTM Motility Test Medium (BD-Diagnostic, USA, kat. č. 211435)

Izoláty *Listeria monocytogenes* č. 1 - 6 (tabulka č. 1)

Listeria innocua (CCM Brno, ČR, sb. č. 4030 a NCTC, UK, sb. č. 11288, ozn. Ln 07)

Listeria innocua (izolát ozn. Ln 08)

Brain Heart Infusion (OXOID, UK, CM0225)

BrillianceTM Listeria Agar Base (OXOID, UK, CM1080)

BrillianceTM Listeria Selective Supplement (OXOID, UK, SR0227E)

BrillianceTM Listeria Differential Supplement (OXOID, UK, SR0228E)

Sýrová hmota "cheese slurry" (chráněný užitný vzor MIL-COM a.s., ČR)

Tab. 1 Izoláty kmenů *Listeria monocytogenes*

Arch. číslo	Pracovní označení	Komodita	Druh
L1225	L-1	zrající sýr	LM
L2023	L-2	stěr	LM
L2175	L-3	plísňový sýr	LM
L2182	L-4	stěr	LM
L2219	L-5	zelenina košťál	LM
L2002	L-6	salám	LM

Pro vlastní sledování pohyblivosti byla použita metoda vpichu a sledování růstu podél něj. U komerčního média BBLTM Motility Test Medium bylo upraveno pH na hodnotu 4,5 (HCl) a bylo naočkováno vpichem jednotlivými izoláty *Listeria monocytogenes* a kmeny *Listeria innocua* nakul-

Tab. 2 Porovnání pohyblivosti listerií v médiu BBL při různých teplotách a pH (vpichová metoda)

Kmen	Teplota (°C) 34-37 aktivní kyselost pH		Teplota (°C) 22-25 aktivní kyselost pH		Teplota (°C) 6 aktivní kyselost pH	
	7	4,5	7	4,5	7	4,5
<i>Listeria monocytogenes</i>						
L-1	-	-	+	-	-	-
L-2	+/-	-	+	+	-	-
L-3	-	-	+	-	-	-
L-4	-	-	+	-	-	-
L-5	+/-	-	+	-	-	-
L-6	-	-	+	-	-	-
<i>Listeria innocua</i>						
Ln 07	+	+	+	+	-	-
Ln 08	+	+	+	+	-	-

* pozitivní jen v horní části vpichu

+ pozitivní - negativní +/- dubiální

tovanými v BHI bujónu. Totéž bylo provedeno u média s původním neutrálním pH. Naočkované zkumavky byly kultivovány při teplotě 22-25 a 34-37 °C po dobu 24 hodin a při teplotě 6 °C po dobu 5 dní, pak byl vizuálně vyhodnocen růst. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Další sledování pohybu na modelovém materiálu bylo prováděno s kmeny *Listeria innocua*, které při teplotě 22-25 °C a neutrálním pH vykazují stejnou pohyblivost jako patogenní kmeny *Listeria monocytogenes* (tabulka č. 2). Počty KTJ.ml⁻¹ byly stanovovány na Brilliance Listeria Agar s doplňky.

Na Petriho misky s termizovanou sýrovou hmotou (pH 6,25, a_w 0,941) o výšce vrstvy 1 cm byla naočkována do středu vyznačeného sterilním nebozecem o průměru 15 mm 0,1 ml inokula o známém počtu listerií a misky byly kultivovány v termostatu při teplotě 25 °C po dobu 5 dnů. Po této době byl odebrán vzorek povrchové vrstvy o definované ploše a tloušťce vrstvy z určité vzdálenosti středů naočkované a odebírané plochy. V takto odebraném vzorku byl stanoven počet listerií. Výsledky přepočítané na jednotku plochy jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tab. 3 Šíření listerií po povrchu sýrové hmoty při teplotě 25 °C za 5 dní

Kmen	A	B	C
	log (KTJ.cm ²)	log (KTJ.cm ²)	log (KTJ.cm ²)
Ln 07	1,63	4,17	5,23
	0,60	nezjištěn růst	7,05
Ln 08	2,40	5,48	6,20
	1,40	nezjištěn růst	7,57

A - počet listerií na kruhové kontaminované ploše o průměru 15 mm.

B - počet listerií po kultivaci na kruhové ploše o průměru 15 mm, jejíž střed byl ve vzdálenosti 38 mm od středu kontaminované kruhové plochy

C - počet listerií po kultivaci na původně kontaminované kruhové ploše o průměru 15 mm

Stejný postup byl aplikován při stanovení migrace listerií hmotou. Ze spodní strany sýrové hmoty byly odebrány vzorky pod naočkovanou plochou a v různé vzdálenosti a zpracovány stejně jako v předchozím případě. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tab. 3 Šíření listerií po povrchu sýrové hmoty při teplotě 25 °C za 5 dní

Kmen	C	D	E
	log (KTJ.cm ²)	log (KTJ.cm ²)	log (KTJ.cm ²)
Ln 07	1,36	7,12	6,23
	0,30	7,12	5,48
Ln 08	2,89	8,16	6,98
	1,89	7,10	6,26

C - počáteční počet listerií na kruhové kontaminované ploše o průměru 15 mm

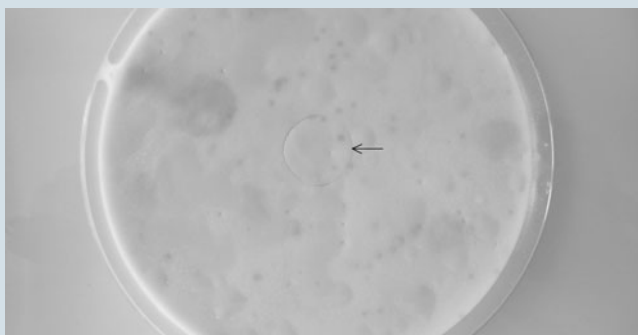
D - počet listerií na téže kruhové ploše po kultivaci

E - počet listerií na kruhové ploše o průměru 15 mm 1 cm pod kontaminovanou plochou (na spodní straně sýrové plotny)

Dále bylo sledováno šíření listerií na sýrové hmotě modifikované přidávkou chromogenního média tak, aby nebyla změněna hodnota aktivity vody, pH a konzistence. Šíření listerií bylo možno sledovat i pouhým okem, protože kolonie listerií byly díky reakci chromogenních solí s enzymy produkovanými listeriami tyrkysově zelené a na pozadí světlé sýrové hmoty zřetelně viditelné. Do vy-



Obr. 1: Sýrová hmota kontaminovaná kmenem *Listeria innocua* Ln 07 při teplotě kultivace 25 °C po dobu 5 dní; ← kruhová plocha o průměru 15 mm zaočkovaná listeriemi o denzitě 64 KTJ.cm².



Obr. 2: Sýrová hmota kontaminovaná kmenem *Listeria innocua* Ln 08 při teplotě kultivace 25 °C po dobu 5 dní; ← kruhová plocha o průměru 15 mm, zaočkovaná listeriemi o denzitě 70 KTJ.cm².

značeného středu misek byl naočkován známý počet buněk listerií, a misky byly po kultivaci při teplotě 25 °C po dobu 5 dní dokumentovány fotograficky (obr. 1 a 2).

Výsledky

U obou testovaných kmenů *Listeria innocua* byla při teplotě 22-25 °C zjištěna stejná pohyblivost, jakou vykazovalo šest testovaných izolátů *Listeria monocytogenes*. Při pH 4,5 byla při této teplotě konstatována pohyblivost u jednoho kmene *Listeria monocytogenes* a omezená pohyblivost obou kmenů *Listeria innocua*, a to pouze za plně aerobních podmínek. Při nízké teplotě odpovídající teplotě skladování potravin nebyly při obou hodnotách pH pohyblivé ani kmeny *Listeria monocytogenes* ani *Listeria innocua*. Při teplotě 34-37 °C a neutrálním pH byla u dvou kmenů *Listeria monocytogenes* zjištěna dubiózní pohyblivost, při pH 4,5 u žádného. Oba kmeny *Listeria innocua* naopak při těchto teplotách pohyblivé byly při neutrálním pH, při pH 4,5 pak pouze za plně aerobních podmínek (jen horní část deštníkovitého tvaru).

U obou kmenů *Listeria innocua* bylo při sledování plošné kontaminace (tabulka č. 3) zjištěno, že při nižší úrovni kontaminace (4 KTJ.cm⁻² u kmene Ln 07 a 25 KTJ.cm⁻² u kmene Ln 08) nebyly listerie zjištěny ve stejné vzdálenosti jako při desetinásobně vyšším počtu kontaminujících buněk, při němž byl zjištěn nárůst listerií v měřené vzdálenosti, a to na úrovni přibližně o tři řády

vyšší než byla původní kontaminace. V samotném místě kontaminace došlo o nárůst zhruba o čtyři řády.

Při sledování šíření listerií do hloubky 1 cm sýrové hmoty (tabulka č. 4) byl zjištěn kvantitativně téměř shodný nárůst listerií po kultivaci v místě kontaminovaném v jednotkách i desítkách KTJ.cm⁻² a byly zjištěny přibližně o řád nižší počty listerií na ploše jednoho centimetru čtverečního v hloubce 1 cm pod kontaminovanou plochou.

Závěr

Porovnáním kmenů *Listeria monocytogenes* a *Listeria innocua* bylo ověřeno, že při neutrálním pH a teplotě 22-25 °C byla pohyblivost listerií srovnatelná, a že při běžné teplotě skladování potravin 6 °C a neutrálním pH listerie pohyblivé nebyly. Při sníženém pH a teplotě 22-25 °C byl ze šesti kmenů *Listeria monocytogenes* pohyblivý jeden kmen a oba kmeny *Listeria innocua* byly pohyblivé jen za plně aerobních podmínek, tzn. na povrchu agaru ve zkumavce a nerostly podél vpichu. Kmeny *Listeria innocua* byly schopny pohybu v souladu s údaji v literatuře i při teplotě 37 °C při neutrálním pH, při sníženém pH jen za plně aerobních podmínek.

V sýrové hmotě modelující podmínky měkkých plísňových sýrů nebo sýrů zrajících pod mazem se listerie šířily rychle. Je ovšem nutné brát v úvahu, že šíření listerií na povrchu i v modelové hmotě sýra není jen důsledkem jejich schopnosti přemísťovat se pomocí flagelinových bičičků, ale že výsledek zahrnuje řadu faktorů včetně jejich rozmnožování, fyzikálních změn sýrové hmoty při zrání, difúzních pochodů, a v neposlední řadě i vzájemných vztahů listerií a vlastní mikroflóry sýrů.

Literatura

- BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ V., SCHINDLER J., SOUČEK A., VÁVRA J., Lékařská mikrobiologie, Marvil, Praha 1996 :221-4.
- O'NEIL H. S., MARQUIS H.: *Listeria monocytogenes* flagella are used for motility, not as adhesin, to increase host cell invasion. *Infect Immun.* 2006 Dec; 74(12): 6675-81.
- JACCHIERI S. G., TORQUATO R., BRENTANI R. R.: Structural study of binding of flagellin by toll-like receptor 5. *J. Bacteriol.* 2003, 185: 4243-4247.
- DONE L., ERICSSON E., JIN X., ROTTENBERG M. E., KRISTENSSON K., LARSEN CH. N., BRESCIANI J., OLSEN J. O.: Role of flagellin and two-component CheA/CheY system of *Listeria monocytogenes* in host cell invasion and virulence. *Infection and immunity*, 2004 Jun; 79(6): 3237-3244.
- TILNEY L. G., PORTNOY D. A.: Actin filaments and the growth, movement and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* 1989, 109: 1597-1608.
- KATHARIOU S., KANENAKA R., ALLEN R. D., FOK A. K., MIZUMOTO C.: Repression of motility and flagellin production at 37°C is stronger in *Listeria monocytogenes* than in the nonpathogenic species *Listeria innocua*. *Can J. Microbiol.* 1995 Jul; 41(7): 572-7.
- SHEN, A., HIGGINS D. E.: The MogR transcriptional repressor regulates nonhierarchical expression of flagellar motility genes and virulence in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog.* 2006, Apr; 2(4): e30.
- GLEESON E., O'BEIRNE D.: Effect of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. *Food Control*, 2005 Oct.; 16(8): 677-685.
- SIEGRIST J.: Diagnostic Media and Supplements for *Listeria monocytogenes*, The Analytix, Sigma-Aldrich Co., 2006, issue 4.:20-22

Poděkování:

Tato práce probíhala díky podpoře MŠMT při řešení grantu 2B08050.