

VLIV PASTERAČNÍCH TEPLOT NA AKTIVITU STAFYLOKOKOVÝCH ENTEROTOXINŮ TYPU A, B, C

MVDr. Lenka Necidová, Ph.D.,

Mgr. Kateřina Bogdanovičová

Ústav hygieny a technologie mléka, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno

Pasteurization Temperature Influence on *Staphylococcal Enterotoxins A, B, C* Activity

Souhrn

Kmeny *Staphylococcus aureus* schopné produkovat stafylokokové enterotoxiny (SEs) jsou zodpovědné za vznik onemocnění z potravin známé jako stafylokoková enterotoxikóza. Cílem provedené studie bylo posoudit vliv pasteračních teplot na možnou inaktivaci SEs. Vzorky mléka byly inokulovány dvaceti devíti různými kmeny *S. aureus* se schopností produkce SEs typu A, B nebo C a inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin za účelem vytvoření SEs v jednotlivých vzorcích mléka. Následovalo tepelné opracování třemi různými teplotami (72 °C, 85 °C, 92 °C) po dobu 15 s. U vzorků byly hodnoceny počty *S. aureus* a především přítomnost SEs. Studie ukázala, že zatímco bakterie *S. aureus* mohou být pasteračními teplotami inaktivovány, výskyt stafylokokových enterotoxinů může v mléce přetrvávat. Termorezistence, uváděná jako významná vlastnost SEs, byla v případě pasterační teploty 72 °C/15 s prokázána u 93,1 % vzorků SEs, při pasteraci 85 °C/15 s u 62,1 % SEs a při pasteraci 92 °C/15 s bylo rezistentních pouze 51,7 % SEs.

Klíčová slova: stafylokokové enterotoxiny, *Staphylococcus aureus*, pasterace

Summary

Staphylococcus aureus strains are capable of producing staphylococcal enterotoxins (SEs). SEs are responsible for the emergence of foodborne diseases known as staphylococcal enterotoxigenicosis. Our study focus was on assessing pasteurization temperature effect on inactive potential SEs. Milk samples were inoculated with 29 different *S. aureus* strains having the ability to produce SEs type A, B, or C, which were then incubated at 37 °C for 24 hours to form SEs among our samples. Incubation was followed by heat treatment at three different temperatures (72 °C, 85 °C, 92 °C) for 15 seconds. Samples were then analyzed for *S. aureus* count and especially for SEs presence. Our study concludes that while *S. aureus* bacteria can be inactivated through pasteurization, an incidence of staphylococcal enterotoxins may still persist in milk. Thermal resistance degree is an important factor affecting SEs when pasteurized. Our study substantiated that 93.1 % of staphylococ-

cal enterotoxins remained active after pasteurization 72 °C/15 s, 62.1 % SEs after pasteurization 85 °C/15 s and only 51.7 % of staphylococcal enterotoxins remained active after pasteurization 92 °C/15 s.

Keywords: staphylococcal enterotoxins, *Staphylococcus aureus*, pasteurization

Úvod

Staphylococcus aureus je významným patogenem člověka i zvířat. Je schopen produkovat řadu toxických substancí, jako jsou stafylokokové enterotoxiny, toxin syndromu toxického šoku, Pantoniův-Valentiniův leukocidin a exfoliativní toxiny. Stafylokoková enterotoxikóza vyvolaná SEs má rychlý nástup i průběh. První symptomy intoxikace - zvracení, bolest hlavy, břicha a průjem se objevují za 1 - 6 hodin po požití potravin kontaminované SEs (Loir, et al., 2003). *S. aureus* je jedním z hlavních etiologických agens způsobujících mastitidy u mléčného skotu (Rabello, et al., 2007). Z tohoto důvodu může mléko a mléčné výrobky představovat zvýšené riziko pro konzumenty. V současnosti je známo 22 typů SEs označovaných písmeny A-V (Argudín et al., 2010). Významnou a pro konzumenty nežádoucí vlastností *S. aureus* je tvorba termostabilních stafylokokových enterotoxinů (Janšová et al., 2014;). Za rizikové množství koagulázopozitivních stafylokoků, mezi jejichž hlavní zástupce se *S. aureus* řadí, je považován počet více než 10^5 KTJ/ml (g) potravin (Necidová et al., 2012; Nařízení komise (ES) č. 2073/2005). Inaktivaci *S. aureus*, přítomného v surovinách a potravinách, lze docílit dostatečným tepelným záhřevem, termostabilní stafylokokové enterotoxiny, které byly za vhodných podmínek při množení *S. aureus* v potravině vyprodukovány, se však mohou vyskytovat i v potravinách po jejich tepelném opracování.

Cílem této práce bylo hodnocení termostability stafylokokových enterotoxinů účinkem teplot běžně používaných při tepelném opracování (pasteraci) mléka.

Materiál a metodika

Jako zkoumanou matici jsme zvolili čerstvé pasterované mléko, zakoupené v tržní síti, u kterého byla předem testováním vyloučena přítomnost *S. aureus*.

Kmeny *S. aureus* použité k pokusům, pocházely ze syrového kravského mléka (26) a z České sbírky mikroorganismů Brno (CCM 5765, CCM 5757, CCM 5971) (3). Celkem bylo použito 29 kmenů *S. aureus* s produkcí enterotoxinů SEA (10), SEB (9), SEC (10). U všech kmenů byla prokázána přítomnost genu kódujícího tvorbu SEs: *sea*, *seb* nebo *sec*.

Toxinogenními kmeny bylo zaočkováno pasterované mléko v počtech $1,7 \cdot 10^4$ - $1,5 \cdot 10^5$ KTJ.ml⁻¹. Takto zaočkovávané vzorky byly inkubovány 24 hodin při teplotě 37 °C, aby došlo k pomnožení *S. aureus* a k produkci stafylokokových enterotoxinů. U všech vzorků bylo po 24 hodinové inkubaci provedeno stanovení počtu *S. aureus* dle

Tab. 1 Počty *S. aureus* [KTJ.ml⁻¹] a průkaz stafylokokových enterotoxinů v mléce v závislosti na tepelném ošetření

Kmen <i>S. aureus</i>	Typ SEs	Počty <i>S. aureus</i>				Průkaz SEs				
		Před pasterací	Pasterace 72 °C/15 s	Pasterace 85 °C/15 s	Pasterace 92 °C/15 s	Před pasterací	Pasterace 72 °C/15 s	Pasterace 85 °C/15 s	Pasterace 92 °C/15 s	
1	SA 393	A	4,4.10 ⁸	0	0	0	+	+	+	+
2	SA 562	A	1,9.10 ⁸	8,7.10 ²	0	0	+	+	+	+
3	SA 596	A	6,4.10 ⁸	2,5.10 ⁴	0	0	+	+	+	+
4	SA 598	A	5,3.10 ⁸	8,6.10 ³	1,5.10 ¹	0	+	+	+	+
5	SA 650	A	1,5.10 ⁹	0	0	0	+	+	-	-
6	SA 623	A	1,9.10 ⁸	0	0	0	+	+	+	+
7	SA 271	A	6,0.10 ⁸	0	0	0	+	+	+	+
8	SA 341	A	4,1.10 ⁸	10	0	0	+	+	+	+
9	SA 819	A	6,7.10 ⁸	2,8.10 ²	0	0	+	+	-	-
10	SA 5756	A	2,2.10 ⁸	4,0.10 ²	0	0	+	+	+	+
11	SA 414	B	2,7.10 ⁸	3,1.10 ³	0	0	+	+	-	-
12	SA 484	B	4,5.10 ⁸	5,7.10 ³	0	0	+	+	-	-
13	SA 504	B	2,3.10 ⁸	2,9.10 ³	5,0.10 ⁰	0	+	+	-	-
14	SA 529	B	3,9.10 ⁸	5,2.10 ³	0	0	+	+	-	-
15	SA 536	B	2,7.10 ⁸	3,5.10 ³	0	0	+	+	-	-
16	SA 652	B	4,0.10 ⁸	5,0.10 ³	0	0	+	+	+	+
17	SA 867	B	1,9.10 ⁹	0	0	0	+	-	-	-
18	SA 879	B	6,6.10 ⁸	0	0	0	+	+	+	-
19	SA 5757	B	4,1.10 ⁸	8,3.10 ²	0	0	+	+	+	+
20	SA 487	C	4,1.10 ⁸	1,5.10 ¹	0	0	+	-	-	-
21	SA 177	C	4,2.10 ⁸	0	0	0	+	+	-	-
22	SA 196	C	3,0.10 ⁸	0	0	0	+	+	+	+
23	SA 289	C	2,6.10 ⁸	0	0	0	+	+	+	+
24	SA 298	C	1,1.10 ⁹	0	0	0	+	+	+	+
25	SA 315	C	6,2.10 ⁸	0	0	0	+	+	+	+
26	SA 360	C	4,6.10 ⁸	0	0	0	+	+	+	-
27	SA 925	C	6,7.10 ⁸	0	0	0	+	+	+	-
28	SA 956	C	7,7.10 ⁸	0	0	0	+	+	-	-
29	SA 5971	C	4,8.10 ⁸	3,0.10 ³	0	0	+	+	+	+

ČSN EN ISO 6888-1 (1999). Jako arbitrážní půda je určen Baird-Parker agar s vaječnou emulzí a teluricitanem draselným (Oxoid, UK). Inokulované plotny byly inkubovány aerobně při 37 °C po dobu 24 - 48 hodin. Následně byly vzorky ve zkumavkách pasterovány ve vodní lázni při různých teplotách, které jsou běžně využívány v mlékárenském průmyslu (72 °C, 85 °C a 92 °C), a to po dobu 15 s.

Po tepelném ohřevu došlo ke zchlazení mléka a ke stanovení počtu *S. aureus* a přítomnosti SEs. Průkaz stafylokokových enterotoxinů byl proveden fluorescenční imunologickou metodou ELFA (Enzyme-Linked Immuno-fluorescent Assay) přístrojem miniVIDAS® (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Tento automatizovaný systém detekuje stafylokokové enterotoxiny typu A-E jako sumu, s detekčním limitem 0,5 ng.g⁻¹ (ml⁻¹) potravin pro SEA a SEB a s detekčním limitem 1,0 ng.g⁻¹ (ml⁻¹) pro SEC - SEE. ELFA metoda není kvantitativní, výsledky pro detekci SEs jsou prezentovány jako pozitivní nebo negativní.

Výsledky a diskuse

První část výsledků studie zaznamenala vliv pasteračních teplot na přežívání *S. aureus* v mléce. Teploty 72 °C, 85 °C a 92 °C působící 15 s nedokázaly vždy bakterie *S. aureus*

zcela inaktivovat (Tab. 1). Legislativou požadovaná teplota 72 °C působící po dobu 15 s (nařízení (ES) č. 853/2004), označovaná jako šetrná pasterace, se pro inaktivaci bakterií *S. aureus* dle očekávání ukázala jako nejméně účinná. Jedním z důvodů byly, vzhledem k předchozí záměrné inkubaci vzorků za účelem tvorby SEs, vysoké počty *S. aureus* před pasterací, které se pohybovaly v rozmezí 1,9 - 2,6.10⁹ KTJ.ml⁻¹. Pro syrové kravské mléko je limit celkového počtu mikroorganismů legislativou stanoven v podobě klouzavého geometrického průměru na maximálně 10⁵ bakterií v 1 ml mléka (nařízení (ES) č. 853/2004). Provedená studie modelovala situaci sekundární kontaminace pasterovaného mléka bakteriemi *S. aureus*. V případě syrového mléka patří, na rozdíl od mléka pasterovaného, mezi významné faktory potlačující růst *S. aureus* také přítomnost konkurenční mikroflóry - např. bakterií mléčného kvašení (Janšová et al., 2012).

Hlavním cílem studie bylo posoudit vliv pasteračních teplot na možnou inaktivaci SEs typu A, B, C. Bhunia (2008) uvádí, že SEs jsou termorezistentní a zůstávají aktivní dokonce po 30 minutovém varu. U hub jsou stabilní při teplotě 121 °C po dobu 28 minut. Larkin et al. (2009) a Argudín et al. (2010) uvádí, že jsou stafylokokové enterotoxiny odolné vůči podmínkám tepelného zpracování, které

běžně ničí bakterie. Výsledky Tabulky 1 ukazují, že stafylokokový enterotoxin typu A nebyl inaktivován žádnou z pasteračních teplot u 8 vzorků z 10 (80 %), v případě SEB byly rezistentní 2 vzorky z 9 (22,2 %), u SEC bylo rezistentních 5 vzorků z 10 (50 %). Nejčastěji byla termorezistence zaznamenána u SEA, nejméně často u SEB. Z celkového počtu 29 vzorků jich bylo termorezistentních 15 (51,7 %). Termorezistenci při pasteraci 72 °C/15 s prokázalo 93,1 % vzorků SEs, při pasteraci 85 °C/15 s 62,1 % SEs a při pasteraci 92°C/15 s bylo rezistentních 51,7 % SEs.

Závěr

Provedená studie ukázala, že i v případě, kdy při mikrobiologickém vyšetření pasterovaného mléka nejsou bakterie *S. aureus* detekovány, případně je stanoven jejich nízký počet, může být potravina příčinou stafylokokové enterotoxikózy z důvodu přítomnosti termostabilních SEs. Dále bylo prokázáno, že pasterační teploty mohou stafylokokové enterotoxiny inaktivovat. Termorezistence stafylokokových enterotoxinů vůči pasteračním teplotám, uváděná odbornou i vědeckou literaturou jako jejich významná vlastnost, tak byla prokázána jen u části vzorků (51,7 %). Nejčastěji byla odolnost k tepelnému záhřevu zaznamenána u SEA, nejméně často u SEB. Odolnost SEs klesala se vzrůstající pasterační teplotou. Přestože pasterace mléka má zásadní vliv na zajištění bezpečnosti této potraviny, hlavním preventivním krokem pro zabránění výskytu stafylokokové enterotoxikózy u konzumentů pasterovaného mléka zůstává nepřerušení chladicího řetězce, jak požaduje platná evropská legislativa (nařízení (ES) č. 853/2004).

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory IGA VFU Brno č. 212/2015/FVHE a NAZV KUS QJ 1230044

Seznam literatury

- ARGUDÍN, M. A., MENDOZA, M. C., RODICIO, M. R. (2010): Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2, s. 1751-1773.
- BHUNIA, A. K. *Foodborne microbial pathogens. Mechanisms and pathogenesis*. 1st Ed. New York, USA: Springer Science+Business Media, LLC. 2008. 276 s. ISBN 978-0-387-74536-7
- ČSN EN ISO 6888-1 - *Mikrobiologie potravin a krmiv* - Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy) - Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera, 1999.
- JANŠTOVÁ, B. jr., NECIDOVÁ, L., JANŠTOVÁ, B., VORLOVÁ, L. (2012): *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in different types of milk. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 60, s. 103-108.
- JANŠTOVÁ, B. jr., NECIDOVÁ, L., SKOČKOVÁ, A., JANŠTOVÁ, B. (2014): Staphylococcal enterotoxin production in model samples of milk and fresh cheese. *Journal of Food and Nutrition Research*, 53, s. 389-392.
- LARKIN E. A., CARMAN, R. J., KRAKAUER, T., STILES, B. G. (2009): *Staphylococcus aureus* the toxic presence of a pathogen extraordinaire. *Current Medicinal Chemistry*, 16, s. 4003-4019.
- LOIR, Y., BARON, F., GAUTIER, M. (2003): *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2, s. 63-76.

NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Úřední věstník 2004; L 139: 55-205.

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Úřední věstník L 338, 22/12/2005, S. 0001 - 0026.

NECIDOVÁ, L., JANŠTOVÁ, B., KARPÍŠKOVÁ, R. (2012): Dynamics of staphylococcal enterotoxin production in model experiments simulating the fresh cheese environment. *Acta Veterinaria*, 81, s. 391-396.

RABELLO, R. F., MOREIRA, B. M., LOPES, R. M., TEIXEIRA, L., M., RILEY, L., W., CASTRO, A., C. (2007): Multilocus semence typik of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *Journal of Medical Microbiology*, 56, s. 1505-1511.

Přijato do tisku: 8. 9. 2015

Lektorováno: 17. 9. 2015

METODY TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI SANITAČNÍCH ROZTOKŮ PROTI PLÍSNÍM

Irena Němečková, Denisa Mihalová, Marie Kejmarová, Petr Roubal

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Control methods for sanitary solutions efficiency against moulds

Souhrn

Plísně patří mezi významné původce vzniku vad různých typů mléčných výrobků, a tak může zvýšený výskyt plísní v provozu mlékárny vést ke značným ekonomickým ztrátám. Proto je důležité proti nežádoucímu výskytu plísní bojovat, mj. i používáním vhodných sanitačních roztoků s antifungálním účinkem. Z toho důvodu byla na souboru 7 kmenů plísní izolovaných z mléčných výrobků a 12 sanitačních roztoků navržena a ověřena metoda pro testování účinnosti sanitačních roztoků. Metoda spočívá v kombinaci měření inhibičních zón agarovou difuzní metodou a testování smáčivosti plísní sanitačními roztoky za podmínek simulujících podmínky sanitace. Tímto způsobem lze otestovat jak vliv sanitačních roztoků na jednotlivé buňky, tak na kolonie plísní jako celek. Získané výsledky naznačují, že je navržena metoda vhodná pro potřeby mlékárenské praxe.

Klíčová slova: eliminace plísní, mléčné výrobky, sanitační roztoky, účinnost sanitace

Summary

Moulds belong to important spoilage microorganisms of various dairy products. Thus, the elevated occurrence of moulds in a plant can lead to considerable economic losses. Therefore, it is important to fight against undesirable