

Bakteriologická analýza potravin

a.

Souhrn

Ve studii zaměřené na bakteriologickou analýzu potravin jsme sledovali výskyt vybraných patogenních agens v potravinách z tržní sítě. Výběr vyšetřovaných komodit byl proveden podle spotřebního koše a byl zaměřen, jako v minulých letech, na ty skupiny potravin, které se u nás nebo v zahraničí podílely na vzniku alimentárních onemocnění. V roce 2010, na rozdíl od předchozích let, byla analýza zaměřena na vybrané potraviny k přímé spotřebě dodávané do tržní sítě v originálním malospotřebitelském balení.

Potraviny byly vyšetřovány na přítomnost čtyř etiologických agens - původců významných alimentárních onemocnění: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus*. Kromě salmonel a *L. monocytogenes*, jsou ostatní agens sledována v rámci běžné kontroly zdravotní nezávadnosti potravin pouze výjimečně. Informace o frekvenci jejich výskytu v jednotlivých komoditách a detailní fenotypová a genotypová charakteristika nejsou k dispozici. Průkaz a stanovení počtu vyšetřovaných patogenů byl proveden referenčními kultivačními metodami (normy řady EN ISO).

Na přítomnost **salmonel** bylo vyšetřeno 191 vzorků potravin určených k přímé spotřebě. Celkem bylo zjištěno 6 (3,1 %) vzorků s pozitivním nálezem salmonel. Jednalo se o 3 vzorky lahůdkářských, 2 vzorky cukrářských výrobků a 1 vzorek masného výrobku (trvanlivého tepelně neopracovaného salámu).

Termotolerantní **kampylobaktery** byly sledovány jen v uzených rybích filetech. U žádného z 12 vyšetřovaných vzorků nebyla prokázána přítomnost bakterií rodu *Campylobacter*.

Na přítomnost bakterií *Listeria monocytogenes* bylo vyšetřeno 191 vzorků potravin. Celkem bylo získáno 12 izolátů *L. monocytogenes*. Relativně nejčastěji byla tato bakterie detekována v cukrářských (6/16,7 %) a dále v rybích výrobcích (2/16,7 %). Dále byla *L. monocytogenes* zjištěna v lahůdkářských (2/4,2 %) a masných výrobcích (2/2,1 %). S výjimkou jednoho vzorku uzených rybích filet, ve kterém byly detekovány počty *L. monocytogenes* $1,3 \cdot 10^2$ KTJ/g, nebyl ve vyšetřovaných vzorcích překročen limit stanovený Nařízením Komise (ES) č. 2073/2005.

Výskyt bakterií *Staphylococcus aureus* byl sledován u 191 vzorků potravin. U 21 (11,0 %) vzorků byla potvrzena přítomnost *S. aureus*. V žádném z vyšetřovaných vzorků potravin nebyl detekován počet koagulázopozitivních stafylokoků vyšší než 50 KTJ/g.

b.

Spolupracující organizace a odborníci

Na laboratorních analýzách a zpracování dat se podíleli pracovníci oddělení mikrobiologie, OLHVBP, CLČ, SZÚ (Doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D., Mgr. Tereza Gelbičová, MVDr. Ivana Koláčková, Ph.D. a Lea Jakubcová).

c.

Základní informace

Počty hlášených alimentárních onemocnění bakteriálního původu zejména salmonelóz a kampylobakterióz jsou v ČR v porovnání s ostatními evropskými státy vysoké. Většina alimentárních onemocnění probíhá ve formě sporadických případů nebo rodinných výskytů, při kterých nejsou dostupné relevantní informace o vehikulech (potvrzených kultivačně). Pouze malý podíl těchto onemocnění je hlášen v epidemické souvislosti, kdy bývají k dispozici konkrétní informace o vehikulech přenosu nákazy a jen u několika epidemií ročně se vehikulum daří potvrdit i kultivačně.

Pro objektivnější analýzu dostupných informací o potravinách, podílejících se na vzniku alimentárních onemocnění bakteriálního původu, chybí laboratorně potvrzená data. Studie je proto zaměřena na vyšetřování potravin zakoupených v tržní síti, aby odrážely aktuální úroveň bakteriální kontaminace v době, kdy jsou buď přímo nebo po kulinární úpravě konzumovány spotřebitelem. Výběr vyšetřovaných komodit je prováděn podle spotřebního koše a je zaměřen na ty skupiny potravin, které se v minulosti u nás nebo v zahraničí podílely na vzniku alimentárních onemocnění. Výběr vyšetřovaných komodit je oproti předchozím letům upraven a je zaměřen především na potraviny určené k přímé spotřebě, dodávané do tržní sítě v malospotřebitelském balení.

Cílem této studie není kontrola potravin tak, jak je běžně prováděna kontrolními orgány, ale sledování frekvence výskytu a charakteristik významných patogenů v potravinách v návaznosti na aktuální epidemiologickou situaci v ČR. V roce 2010 jsme se zaměřili na průkaz čtyř etiologických agens - původců významných alimentárních onemocnění: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. a *Listeria monocytogenes* a dále na průkaz a stanovení počtu *S. aureus* a jejich schopnosti tvořit enterotoxiny.

d.

Použitá metodika

Mikrobiologická analýza byla prováděna podle platných norem:

ČSN EN ISO 6574 - Horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Salmonella*

ČSN ISO 10272 - Horizontální metoda průkazu termotolerantních druhů rodu *Campylobacter*

ČSN EN ISO 11290-1,2 - Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes*

ČSN EN ISO 6888-1 - Horizontální metoda stanovení počtu koagulázo-pozitivních stafylokoků

U vyšetřovaných vzorků potravin byl prováděn průkaz a u potravin k přímé spotřebě s pozitivním nálezem patogenů bylo prováděno i stanovení počtu bakterií. Všechny suspektní kolonie sledovaných agens byly konfirmovány podle příslušných norem, u salmonel a *L. monocytogenes* byl určován jejich sérotyp. Izoláty *L. monocytogenes* byly dále typizovány metodou makrorestrikční analýzy. U *S. Enteritidis* a *S. Typhimurium* byla prováděna fágová typizace. U *S. aureus* byla testována schopnost produkce stafylokokových enterotoxinů A – J (SEA – SEJ) stanovením přítomnosti genů kódujících stafylokokové enterotoxiny *sea – sej*. U izolátů salmonel a *S. aureus* byla sledována i rezistence k antimikrobiálním látkám.

e. Výsledky laboratorní analýzy

Celkem bylo vyšetřeno 191 vzorků potravin určených k přímé spotřebě pocházejících z tržní sítě ČR. Ve všech případech se jednalo o vzorky v originálním malospotřebitelském balení (baleno u výrobce). Nejčastěji byl ve vyšetřovaných vzorcích detekován *S. aureus* (11,0 %), následně *L. monocytogenes* (6,3 %) a *Salmonella* spp. (3,1 %). Výskyt *Campylobacter* spp. byl sledován pouze u rybích výrobků. Přítomnost termotolerantních kampylobaterů nebyla prokázána v žádném ze 12 vyšetřovaných vzorků uzených rybích výrobků. Detailní výsledky a pozitivní nálezy vyšetřovaných vzorků uvádí tabulka č. 1.

Tabulka č. 1: Přehled vyšetřovaných komodit, počty vzorků a pozitivních nálezů sledovaných patogenních agens

Komodita	n	Počet (%) pozitivních nálezů			
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. aureus</i>	<i>Campylobacter</i> spp.
Výrobky masné	95	2 (2,1)	1 (1,1)	6 (6,3)	NA
Výrobky rybí	12	2 (16,7)	0	1 (8,3)	0
Výrobky cukrářské	36	6 (16,7)	2 (5,6)	10 (27,8)	NA
Výrobky lahůdkářské	48	2 (4,2)	3 (6,3)	4 (8,3)	NA
Celkem	191	12 (6,3)	6 (3,1)	21 (11,0)	0

n – počet vyšetřených vzorků; NA- neanalyzováno

Ze 191 potravin určených k přímé spotřebě byla v 6 případech detekována *Salmonella* spp. U 4 izolátů salmonel byl zjištěn sérotyp *S. Enteritidis*, fágové typy PT8 (1 izolát z rybího salátu, 1 izolát z obložené bagety), PT23 (1 izolát z vlašského salátu) a PT1b (1 izolát z fermentovaného salámu). S výjimkou jednoho kmene *S. Enteritidis* PT1b, který vykazoval rezistenci k streptomycinu (S) a neomycinu (N), byly kmeny citlivé ke všem 17 testovaným antimikrobiálním látkám. U dvou vzorků z cukrářských výrobků byl zjištěn kmen sérotypu *S. 4,5,12:i:-* a kmen *S. Derby*, který se vyznačoval rezistencí k streptomycinu, chloramfenikolu (C) a sulfonamidům (Su). Tyto dva kmeny byly izolovány z výrobků stejného výrobce, v jehož vzorcích byla detekována také přítomnost *L. monocytogenes* sérotypu 1/2a pulzotypu L 701. V jednom případě byly ve vzorku likérové špičky zjištěny počty salmonel $7,5 \cdot 10^1$ KTJ/g.

Detailní charakteristika izolovaných kmenů *Salmonella* spp. podle komodit, sérotypů, fagotypů a rezistence je uvedena v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: *Salmonella* spp. – přehled a charakteristika izolovaných kmenů

Komodita		Počet KTJ v g	Sérotyp	Fagotyp	Rezistence k AML
Výrobky cukrářské	špička likérová	7,5.10 ¹	S. 4,5,12:i:-	DT 193	sensitivní
	ovocný řez	<50	S. Derby	-	C, S, Su
Výrobky lahůdkářské	salát vlašský	<50	S. Enteritidis	PT 23	sensitivní
	salát rybí	<50	S. Enteritidis	PT 8	sensitivní
	bageta obložená	<50	S. Enteritidis	PT 8	sensitivní
Výrobky masné	fermentovaný salám	<50	S. Enteritidis	PT 1b	S, N

Přítomnost termotolerantních kampylobakterů byla sledována v uzených rybích filetech. U žádného z 12 vyšetřovaných vzorků nebyla prokázána přítomnost bakterií rodu *Campylobacter*.

Na přítomnost bakterií *Listeria monocytogenes* bylo vyšetřeno všech 191 vzorků potravin. Celkem bylo získáno 12 izolátů *L. monocytogenes*. Nejčastěji byla *L. monocytogenes* detekována v cukrářských (6/16,7 %) a rybích výrobcích (2/16,7 %). Dále byla *L. monocytogenes* zjištěna v lahůdkářských (2/4,2 %) a masných výrobcích (2/2,1 %). S výjimkou jednoho vzorku uzených rybích filet, ve kterém byly detekovány počty *L. monocytogenes* 1,3 . 10² KTJ/g, nebyl ve vyšetřovaných vzorcích překročen limit 10² KTJ/g stanovený Nařízením Komise (ES) č. 2073/2005.

Sérotypizací získaných izolátů *L. monocytogenes* byl nejčastěji prokázán sérotyp 1/2a (10/83,3%). Rovněž byly detekovány sérotypy 1/2b (1/8 %) a 4b (1/8 %).

Typizací vyšetřovaných kmenů na molekulární úrovni bylo prokázáno, že patří k šesti různým klonům. Pět kmenů *L. monocytogenes* izolovaných z cukrářských výrobků patřilo k pulzotypu L 711. Všechny vzorky pocházely od jednoho výrobce, ale byly zakoupeny v různých prodejnách. Klonální identita kmenů jednoznačně odhaluje zdroj kontaminace přímo u výrobce. Klonální shoda byla prokázána rovněž u dvou kmenů izolovaných z uzených rybích filet pocházejících od jednoho výrobce, ale zakoupených v různých obchodech (sérotyp 1/2a, pulzotyp L 702). Detailní výsledky makrorestrikční analýzy uvádí tabulka č. 3.

Tabulka č. 3: *L. monocytogenes* – přehled a charakteristika izolovaných kmenů podle komodit

Komodita		Počet KTJ v 1 g	Sérotyp	Pulzotyp
Výrobky masné	salám měkký	<10	1/2b	L 505
	salám fermentovaný	<10	1/2a	L 720
Výrobky rybí	rybí filety uzené	<10	1/2a	L 702
	rybí filety uzené	1,3 . 10 ²	1/2a	L 702
Výrobky cukrářské	větrník karamelový	<10	1/2a	L 711
	špička likérová	<10	1/2a	L 711
	řez	<10	1/2a	L 711
	mini věneček	<10	1/2a	L 711
	kokosová roláda	<10	1/2a	L 711
	špička likérová	<10	1/2a	L 701
Výrobky lahůdkářské	bageta obložená	<10	1/2a	L 711
	bageta obložená	<10	4b	L 200

Přítomnost bakterií *Staphylococcus aureus* byla sledována u 191 vzorků potravin. U 21 (11,0 %) vzorků byla potvrzena přítomnost *S. aureus*. U všech vyšetřovaných potravin byly detekovány počty koagulázopozitivních stafylokoků nižší než 50 KTJ/g.

U 10 (47,6 %) izolátů *S. aureus* byla prokázána přítomnost genů kódujících stafylokokové enterotoxiny. Nejčastěji byla zjištěna přítomnost kombinace genů *seg* a *sei* (4 izoláty). Rovněž byly detekovány izoláty nesoucí kombinaci tří genů kódujících stafylokokové enterotoxiny, a to *sec*, *seg*, *sei* (3 izoláty) a *seb*, *seg*, *sei* (1 izolát). S výjimkou jednoho kmene izolovaného ze vzorku vepřové šunky, který byl rezistentní k chloramfenikolu, byly všechny kmeny citlivé k celému spektru 14 testovaných antimikrobiálních látek.

Tabulka č. 4: *S. aureus* - přehled a charakteristika izolovaných kmenů podle komodit

Komodita		Počet KTJ v 1 g	Genotyp <i>ses</i>
Výrobky masné	salám měkký	<50	-
	salám játrový	<50	-
	salám měkký	<50	-
	šunka vepřová	<50	I,G
	šunka vepřová	<50	-
	salám fermentovaný	<50	-
Výrobky rybí	rybí filety uzené	<50	B,G,I,
Výrobky cukrářské	Kokosová roláda	<50	G,I
	Špička	<50	-
	Roláda oříšková	<50	G,I
	Větrník	<50	-
	Likérová špička	<50	-
	Špička koňaková	<50	-
	Věneček	<50	C,G,I
	Řez meruňkový	<50	-
	Dort	<50	C,G,I
	Dort s krémem	<50	G,I
Výrobky lahůdkářské	vlašský salát	<50	-
	bageta obložená	<50	G
	bageta obložená	<50	C
	bageta obložená	<50	C,G,I

U 10 (47,6 %) izolátů *S. aureus* byla prokázána přítomnost genů kódujících stafylokokové enterotoxiny (tabulka č. 4). Nejčastěji byla u *S. aureus* zjištěna přítomnost kombinace genů *seg* a *sei* (4 izoláty). Rovněž byly detekovány izoláty nesoucí kombinaci tří genů kódujících stafylokokové enterotoxiny, a to *sec*, *seg*, *sei* (3 izoláty) a *seb*, *seg*, *sei* (1 izolát). S výjimkou jednoho kmene izolovaného ze vzorku vepřové šunky, který byl rezistentní k chloramfenikolu, byly všechny kmeny citlivé k celému spektru 14 testovaných antimikrobiálních látek. V žádném vzorku nebyly detekovány počty koagulázapozitivních stafylokoků vyšší než 50 KTJ/g.

V roce 2009 byla na základě výsledků genotypizace izolátů sledovaných agens získaných v rámci studie MIKROMON vyslovena hypotéza, že při manipulaci s výrobky (krájení, vážení, balení), dochází v tržní síti k jejich bakteriální kontaminaci. Proto byly v roce 2010 testovány masné výrobky balené přímo u výrobce. Výsledky srovnání pozitivních záchytů *S. aureus* u masných výrobků krájených při prodeji (studie MIKROMON 2009) potvrdily statisticky vysoce významný rozdíl ($p=0,01$) v porovnání s výsledky vyšetření výrobků krájených a balených u výrobce. Pro další patogeny (*L. monocytogenes* a *Salmonella* spp.) se tato hypotéza nepotvrdila, pravděpodobně z důvodu nízkých počtů pozitivních izolací.