

Perzistentní kmeny a jejich výskyt v potravinářských podnicích



Gelbíčová T., Karpíšková R.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

Gelbíčová Tereza: gelbicova@vri.cz

Perzistence

- opakovaná izolace identických klonů bakterií po dlouhou dobu v konkrétním prostředí, např. v potravinářském podniku

Perzistentní kmeny

- identické klony izolované v jednom potravinářském podniku v průběhu jednoho roku
- detekce na povrchu technologických zařízení a plochách v potravinářském podniku nebo ve finálních produktech

dlouhodobý
proces
adaptace
bakterií

specifické
molekulární
mechanismy
bakterií

- vyšší tolerance/rezistence k dezinfekčním prostředkům,
- vyšší schopnost adheze na abiotické povrchy,
- schopnost tvorby biofilmů, aj.

Detekce perzistentních kmenů v potravinářských provozech

Monitoring výrobního prostředí

suroviny

pracovní plochy a zařízení

personál

finální výrobky

odběry vzorků

detekce cílových bakterií

charakterizace bakterií

Detekce perzistentních kmenů - aplikace v praxi

- výskyt a šíření *Escherichia coli* a *Klebsiella* spp. v prostředí sýráren s ohledem na dodržování podmínek správné výrobní a hygienické praxe



Escherichia coli – hygienický indikátor při výrobě sýrů

- **Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005** o mikrobiologických kritériích pro potraviny v platném znění
- Kritéria hygieny výrobního procesu
- Mléko a mléčné výrobky

Kategorie potravin	Mikroorganismy	Plán odběru vzorků		Limity		Analytická referenční metoda	Fáze, na níž se kritérium vztahuje	Opatření v případě nevyhovujících výsledků
		n	c	m	M			
Sýry vyrobené z tepelně ošetřeného mléka či tepelně ošetřené syrovátky	<i>E. coli</i>	5	2	100 KTJ/g	1000 KTJ/g	ISO 16649-1 nebo 2	v takovém okamžiku během výrobního procesu, kdy se předpokládá nejvyšší počet bakterií <i>E. coli</i>	zlepšení hygieny výroby a výběru surovin

Escherichia coli – hygienický indikátor při výrobě sýrů

Výrobce A: výroba tvrdých dlouho zrajících sýrů

Typ vzorku	Popis	Počet vzorků	
		vyšetřených	pozitivních
Surovina a meziprodukty	mléko	8	3
	syrovátka	12	7
	sýřenina	5	5
	mořská sůl k přípravě solného roztoku	6	0
Prostředí	stěry ze zařízení sýrárny	19	15
	stěry ze zařízení formovny	5	4
	stěry ze zařízení solovny	14	11
	roztok ze solných lázní	7	6
	odpadní kaly	7	6
Personál	oplach ruky	9	7
Produkt	sýr - finální výrobek	4	0
Celkem		96	64 (67 %)

Šíření kontaminace *E. coli* v prostředí výroby tvrdých sýrů – výrobce A

Charakteristika *E. coli* metodou PFGE (pulsed field gel electrophoresis)

- velká heterogenita získaných kmenů *E. coli* (33 různých pulzotypů)
- výskyt dvou dominantních klastrů v různých odběrových termínech - suspektně perzistentní kmene

stěry ze zařízení pro výrobu sýřeniny a sýřenina
stěry ze solovny a solný roztok

Dice (Opt:1.10%) (Tol:1.0%-1.0%) (H=0.0% S=0.0%) [0.0%-100.0%]
pfge pfge

Strain ID	Producer	Sample type	Source of isolation	Date of isolation	Pulzotype
LEV1279/17	A	FM	curd	2017_07_24	EC-Xba-19
LEV1282/17	A	PE	salt brine bath - brine	2017_07_24	EC-Xba-19
LEV1456/17	A	PE	salt brine bath - brine	2017_08_21	EC-Xba-19
LEV1461/17	A	PE	salt brine bath - sludge	2017_08_21	EC-Xba-19
LEV1005/17	A	PE	cloth for curd forming	2017_06_20	EC-Xba-19
LEV1043/17	A	PE	salt brine bath - sludge	2017_06_20	EC-Xba-19
LEV1028/17/B	A	FS	rinse from hand - a	2017_06_20	EC-Xba-7
LEV1029/17	A	FS	rinse from hand - b	2017_06_20	EC-Xba-7
LEV1030/17	A	FS	rinse from hand - c	2017_06_20	EC-Xba-7
LEV1033/17	A	FS	rinse from hand - d	2017_06_20	EC-Xba-7
LEV1039/17	A	FM	curd	2017_06_20	EC-Xba-7
LEV1283/17	A	PE	salt brine bath - swab	2017_07_24	EC-Xba-7
LEV1024/17	A	PE	salt brine bath - brine	2017_06_20	EC-Xba-7
LEV685/17	A	PE	salt brine bath - swab	2017_04_18	EC-Xba-7
LEV686/17/B	A	PE	salt brine bath - swab	2017_04_18	EC-Xba-7
LEV687/17	A	PE	salt brine bath - swab	2017_04_18	EC-Xba-7
LEV694/17	A	PE	salt brine bath - sludge	2017_04_18	EC-Xba-7
LEV1006/17	A	PE	cloth for curd forming	2017_06_20	EC-Xba-7
LEV1704/17	A	PE	cleaning sponge	2017_09_25	EC-Xba-7
LEV1705/17	A	PE	control board	2017_09_25	EC-Xba-7

stěry ze zařízení pro výrobu sýřeniny a sýřenina
stěry ze solovny a solný roztok
stěry z formovny
personál

Výrobní prostředí a
technologické zařízení

Sýřenina

Personál

Escherichia coli – hygienický indikátor při výrobě sýrů

Výrobce B: výroba plísňových zrajících sýrů

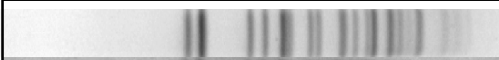






Typ vzorku	Popis	Počet vzorků	
		vyšetřených	pozitivních
Prostředí	stěry ze zařízení sýrárny	4	0
	stěry ze zařízení solovny	8	3
	roztok ze solných lázní	1	1
	mycí voda na sýry po zrání	1	1
	stěr z pásu na sýry po mytí	2	0
	stěry z balící místnosti	5	0
Produkt	sýry – finální výrobky z tržní sítě	3	3
Celkem		24	8 (33 %)

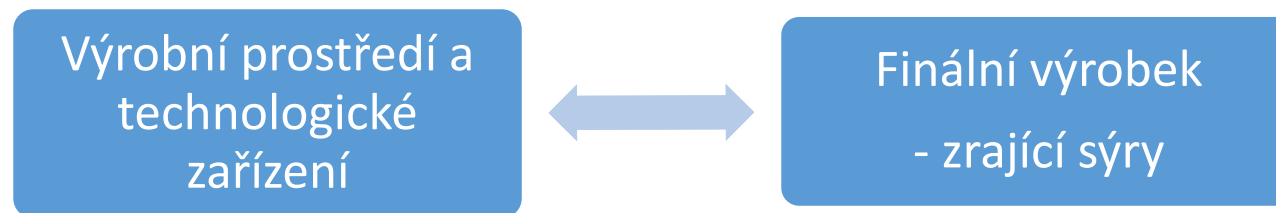
Počet *E. coli* ve zrajících sýrech z tržní sítě < 10 KTJ/g.

Šíření kontaminace *E. coli* v prostředí výroby tvrdých sýrů – výrobce B

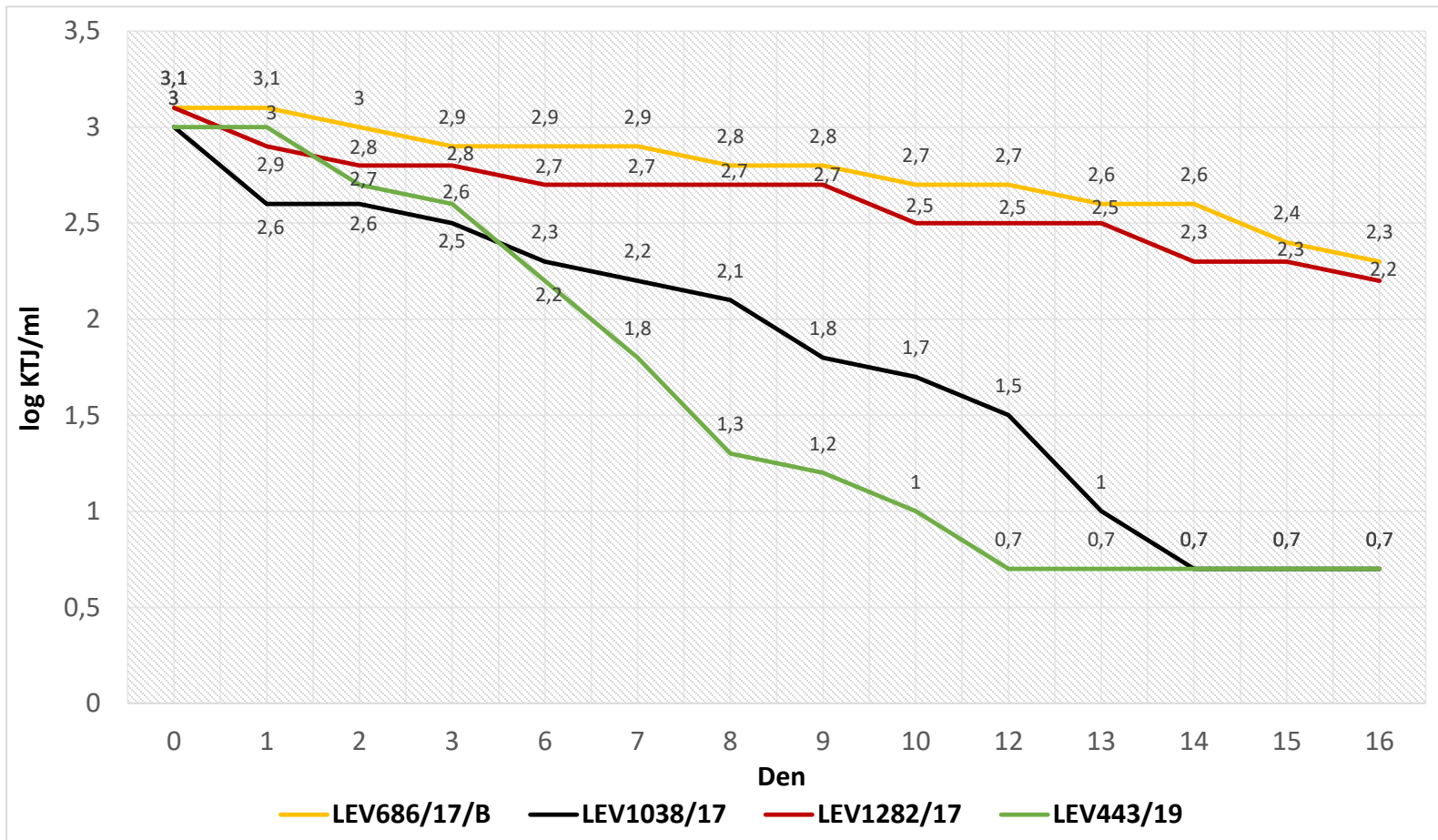
Charakteristika *E. coli* metodou PFGE (pulsed field gel electrophoresis)

- detekovány kmeny stejného PFGE profilu v sýrech z tržní sítě a prostředí solovny
- ve sledovaném období zjištěn pouze jeden kmen odlišného pulzotypu (EC-Xba-198) – kanál na solovně

	LEV184/19/A	B	FP	blue veined cheese (LOT - a)	2019_03_30	EC-Xba-191
	LEV443/19	B	PE	salt brine bath - brine	2019_04_26	EC-Xba-191
	LEV444/19	B	PE	salt brine bath - swab	2019_04_26	EC-Xba-191
	LEV447/19	B	PE	drain swab in salting room	2019_04_26	EC-Xba-191
	LEV454/19	B	PE	rinsing water for cheeses after the ripening	2019_04_26	EC-Xba-191
	LEV702/19/A	B	FP	blue veined cheese (LOT - b)	2019_06_07	EC-Xba-191
	LEV773/19/D	B	FP	blue veined cheese (LOT - c)	2019_06_11	EC-Xba-191



Fenotypový projev přežívání suspektně perzistentních kmenů *E. coli* při vysokých koncentracích soli



Teplota: 15 °C

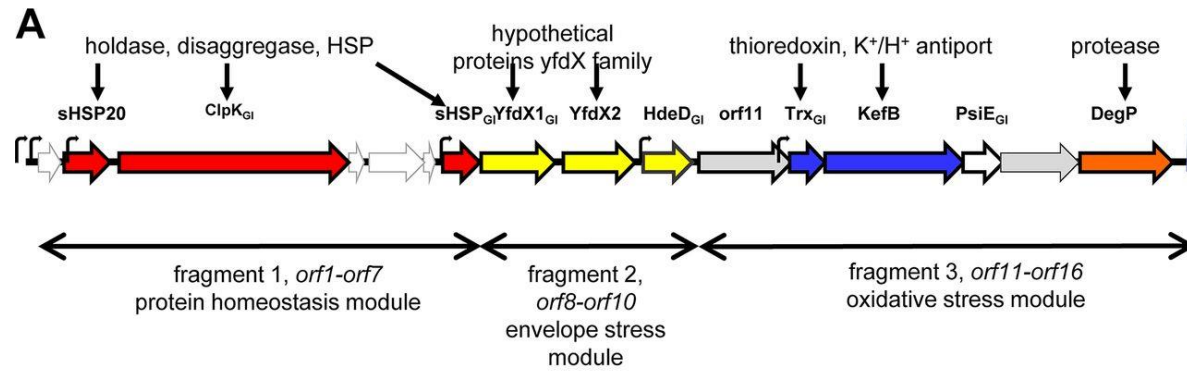
Použité médium: BHI + **15 % NaCl**

Výchozí koncentrace buněk:

- log 3 KTJ/ml

Označení	Výrobce	Perzistentní kmen
	A	ano
	A	ano
	A	ne
	B	ano

Genetické determinanty zvýšené teplotní odolnosti *E. coli*



Locus of heat resistance 1 (LHR1)

Wang et al. 2020

- přispívá i k odolnosti vůči chlóru a oxidačnímu stresu

Kmen	Výrobce	Perzistence	LHR1 region A	LHR1 region B	LHR1 region C	<i>clpK2</i> gen_LHR2
LEV 686/17/B	A	ano	+	+	+	+
LEV 1282/17	A	ano	+	+	+	+
LEV 1038/17	A	ne	+	+	-	+
LEV 443/19	B	ano	+	+	+	-

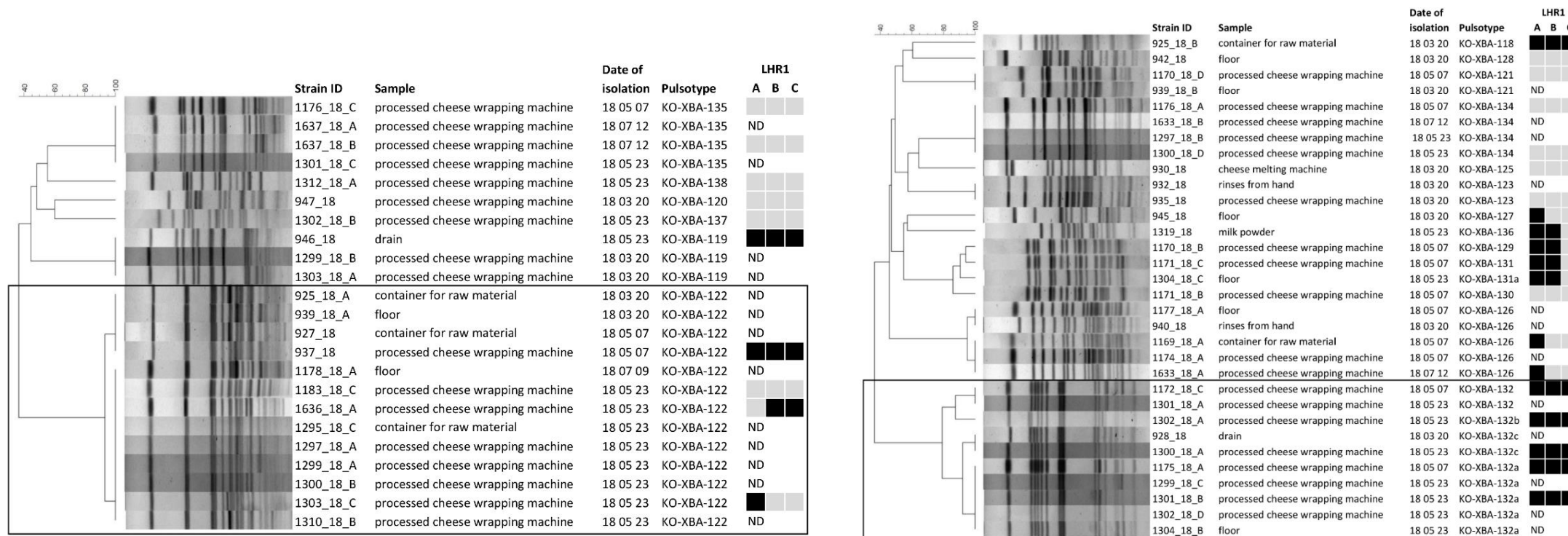
Klebsiella spp. – hygienický indikátor při výrobě sýrů

Výrobce C: výroba tavených sýrů

Typ vzorku	Popis	Počet vzorků	
		vyšetřených	pozitivních
Surovina	sušené mléko	7	1
Stěry z prostředí	nádoby na suroviny (sýry, máslo)	7	4
	zařízení na tavení sýrů	1	0
	zařízení na balení tavených sýrů	46	21
	podlahy	11	7
	kanály	2	2
	ventilační systém	1	0
	přepavní pás	1	0
	Personál	oplachy rukou	3
Produkty	finální tavené sýry	8	0
Celkem		87	37 (43 %)

Získané kmeny byly identifikovány jako *K. oxytoca* (n=32) a *K. pneumoniae* (n=23).

Klastrová analýza PFGE (pulsed field gel electrophoresis) *K. pneumoniae* a přítomnost genů lokusu teplotní rezistence LHR1



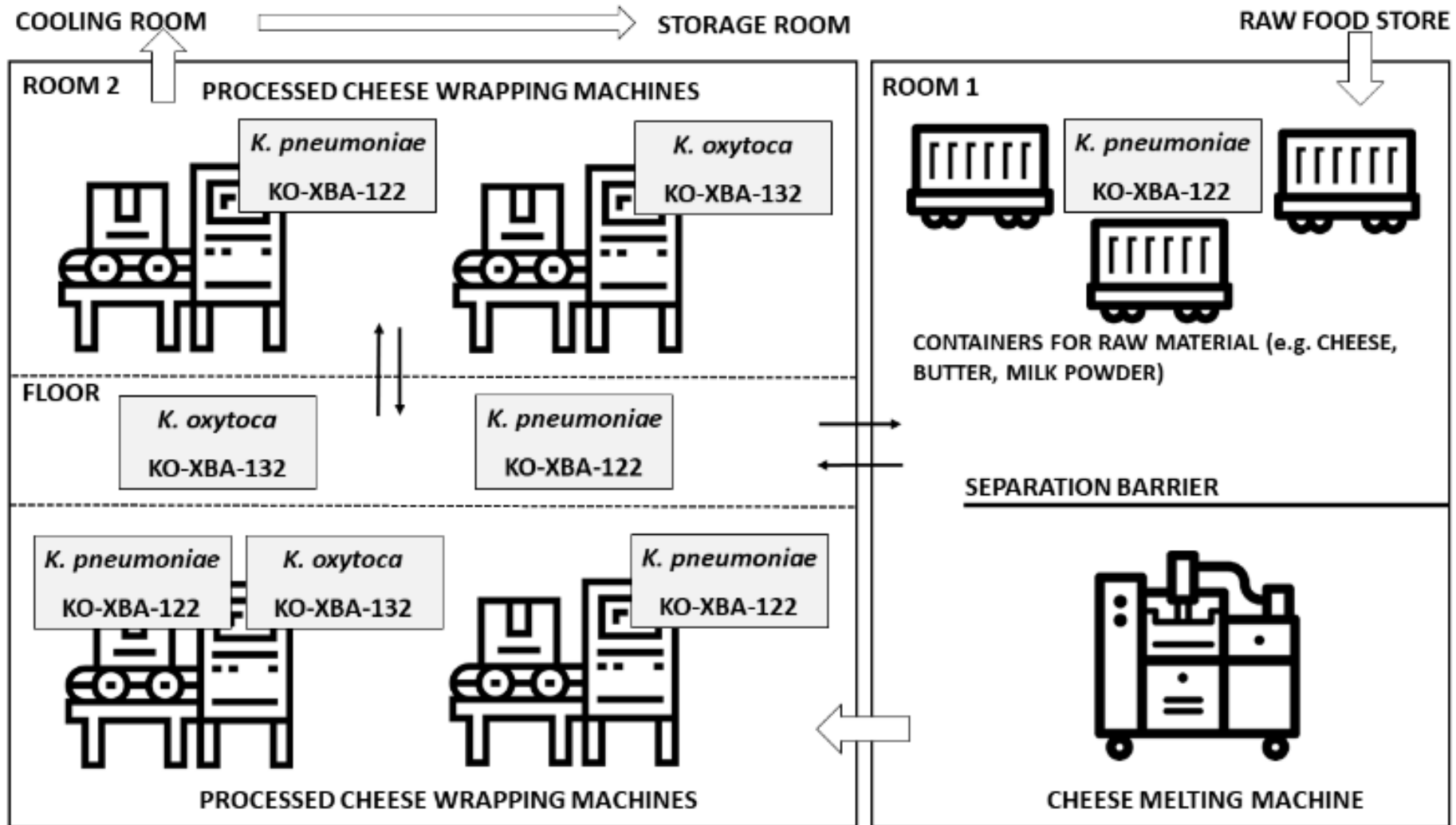
Výrobní prostředí a technologické zařízení



Personál

A, B, C – označení oblastí LHR1, šedý čtverec – negativní, černý čtverec – pozitivní, ND – nedetekováno, černý rámeček – PFGE klastr suspektně perzistentních kmenů

Schéma šíření suspektně perzistentních kmenů *K. pneumoniae* a *K. oxytoca* ve výrobně tavených sýrů – výrobce C



Faktory virulence a rezistence k antibiotikům u získaných kmenů *Klebsiella* spp.

Detekce genetických faktorů spojovaných s hypervirulencí:

- kapsulární serotyp K1 (gen *magA*) a K2 (gen *K2A*) → NEGATIVNÍ
- *pks* (polyketide synthase) genomic island – syntéza kolibaktinu → NEGATIVNÍ
- gen *rpmA* – mukoviskozita → NEGATIVNÍ

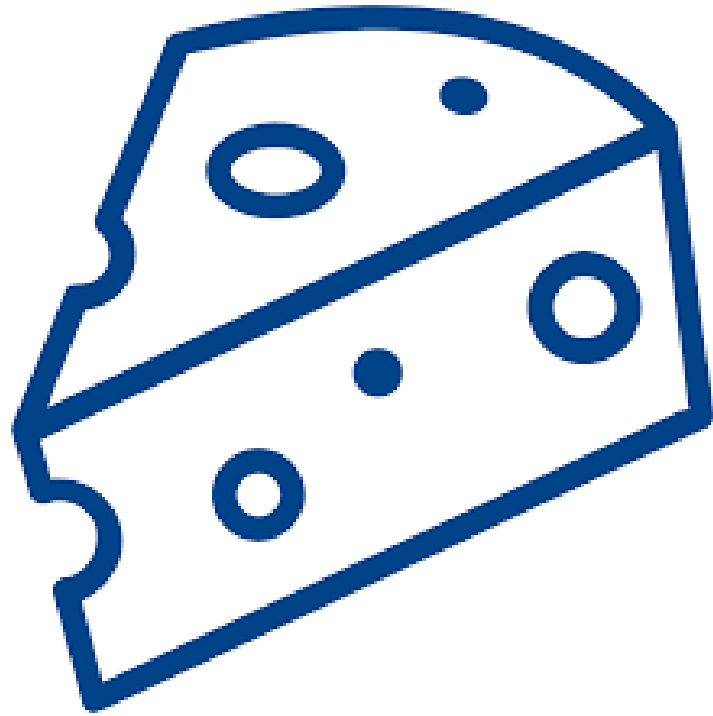
Rezistence k antibiotikům (fenotypový projev)

- rezistence ke kanamycinu – *K. oxytoca* (pulzotypy KO-XBA-132 a KO-XBA-118)
- rezistence ke streptomycinu - *K. oxytoca* (pulzotyp KO-XBA-134)
- přítomnost multirezistentních kmenů → NEGATIVNÍ

Závěry

- metody charakterizace bakterií jsou důležitou součástí sledování správné výrobní a hygienické praxe při výrobě potravin
- úroveň bakteriální kontaminace výrobního prostředí lze predikovat také na základě vyšetřování potravin z tržní sítě
- pro šíření a perzistenci koliformních bakterií ve výrobním prostředí mohou představovat výhodu vyšší odolnost vůči soli a termorezistence
- každý provoz výroby sýrů má svá specifika a vyžaduje individuální přístup sledování úrovně hygieny výroby k zajištění kvalitních a bezpečných potravin

Děkuji za pozornost



Uskutečněno za finanční podpory
projektu MZe ČR č. QK1710156.