

Studie „Mléčné automaty“ – nálezy původců alimentárních onemocnění v syrovém mléce

Milk vending machines study – detection of causative agents of food-borne infections in raw milk

Renata Karpíšková, Ivana Koláčková, Marcela Vyletěllová, Bohumíra Janštová

Souhrn • Summary

Studie se zabývala výskytem patogenních bakterií vyvolávajících alimentární onemocnění v syrovém mléce prodávaném prostřednictvím mléčných automatů. Celkem bylo odebráno 219 vzorků mléka z 27 mléčných automatů pocházejících z 15 farem v Jihočeském, Jihomoravském a Olomouckém kraji. Mezi jednotlivými farmami byly zaznamenány velké rozdíly v mikrobiologické kvalitě syrového mléka, na některých farmách byly patogeny detekovány opakovaně. Bakterie *Staphylococcus aureus* byly detekovány ve 124 (56,6 %) vzorcích, schopnost produkovat klasické enterotoxiny A-E byla potvrzena jen u 13 (10,5 %) kmenů. *Campylobakter* byly detekovány v 10 (4,6 %) vzorcích, ve všech případech se jednalo o druh *Campylobacter jejuni*. *Listeria monocytogenes* byla zjištěna ve 4 (1,8 %) vzorcích. *Salmonely* byly izolovány ze 7 vzorků.

The study focused on the detection of causative agents of food-borne infections in raw milk dispensed from vending machines. Altogether 219 milk samples were collected from 27 vending machines of 15 farms from the South Bohemian, South Moravian and Olomouc administrative regions. The microbiological quality of raw milk varied widely between farms, with pathogens being found repeatedly in milk from some farms. Staphylococcus aureus was detected in 124 (56.6%) milk samples and the potential for producing classical enterotoxins A-E was confirmed in 13 (10.5%) of the detected strains. Campylobacter was reported in 10 (4.6%) milk samples and all strains were identified as Campylobacter jejuni. Listeria monocytogenes was recovered from 4 (1.8%) milk samples. Salmonella was isolated from 7 milk samples.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2011; 20(6): 212–214.

Klíčová slova: prodejní automat, syrové mléko, bezpečnost potravin

Keywords: vending machine, raw milk, food safety

Mléko je potravina s vysokou nutriční hodnotou a proto je jeho konzumace odborníky v oblasti výživy podporována. Tradičně je v České republice konzumováno balené pasterované mléko. Od roku 2003 byl v České republice povolen přímý prodej syrového mléka ze dvora a od roku 2009 se rozšířil i prodej syrového mléka z mléčných automatů. V současné době je na území ČR registrováno celkem 248 míst s prodejem syrového mléka, 90 farem má povolení k prodeji mléka ve 160 mléčných automatech (zdroj www.svscr.cz). Tento nový způsob prodeje syrového mléka, který je pro mnohé spotřebitele zajímavým zpestřením na trhu, ale přináší i možná zdravotní rizika.

Syrové mléko i to, které je určeno pro mlékárenské zpracování, pochází ze zdravých chovů, které jsou pod veterinárním dozorem. Díky této kontrole je zajištěna bezpečnost mléka před výskytem původců onemocnění, jako jsou tuberkulóza a brucelóza. Výskyt patogenů vyvolávajících alimentární onemocnění však není v chovech mléčného skotu běžně sledován, proto je prodejce povinen spotřebitele upozornit, že mléko musí být před konzumací tepelně ošetřeno. Farmáři jsou povinni dodržovat hygienická pravidla pro prodej syrového mléka (Nařízení EP a R (ES) 853/2004; 1662/2006) a dále provozní a sanitační řád, související s provozem automatů.

Někteří spotřebitelé však cíleně syrové mléko tepelně neupravují, aby nedošlo k senzorickým změnám a také proto, že se nesprávně domnívají, že záhřevem dochází ke snížení nutriční hodnoty a obsahu bioaktivních látek.

Od roku 2010 bylo opakovaně vysloveno podezření na možnou souvislost mezi konzumací syrového mléka z automatů a alimentárním onemocněním. Tento zdroj se však zatím ani v jednom případě nepodařilo potvrdit.

V roce 2010 byla realizována studie, zaměřená na sledování výskytu patogenů v syrovém mléce z automatů. Na studii participovaly tři pracoviště: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Státní zdravotní ústav Praha, Centrum zdraví, výživy a potravin Brno a Ústav pro chov skotu v Rapotíně.

MATERIÁL A METODY

Vzorky syrového mléka

Odběr vzorků probíhal od února do prosince roku 2010. Mléko o objemu 1 litr bylo odebíráno do sterilních vzorkovnic a po převozu do laboratoře při teplotě 4 ± 1 °C bylo ihned zpracováno. Celkem bylo odebráno 219 vzorků mléka z 27 mléčných automatů pocházejících z 15 farem v Jihočeském, Jihomoravském a Olomouckém kraji.

Bakteriologická analýza

– Stanovení počtu koaguláza pozitivních stafylokoků bylo prováděno podle ČSN EN ISO 6888-1, průkaz byl proveden po pomnožení v pufované peptonové vodě

Tabulka 1: Původ, počty vyšetřených vzorků syrového mléka a pozitivní nálezy vybraných původců alimentárních onemocnění

Označení farmy	Počet odebraných vzorků	Počet pozitivních vzorků			
		<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
A	16	5	0	0	0
B	18	10	0	0	3
C	3	0	0	0	0
D	1	1	0	0	0
E	8	8	2 (3 kmeny)	0	0
F	11	10	0	0	0
G	21	4	1	0	0
H	3	3	1	0	0
I	6	4	0	0	0
J	10	4	2	2	0
K	2	1	0	0	0
L	15	5	0	0	1
M	13	7	0	0	0
N	62	34	1	1	0
O	30	28	0	7	0
Celkem	219	124 (56,6 %)	7 (3,2 %)	10 (4,6 %)	4 (1,8 %)

(OXOID, UK). Ke kultivaci bylo použito médium Baird-Parker (OXOID, UK). Konfirmace suspektních kmenů *S. aureus* byla provedena metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) detekcí specifického úseku SA442 [Martineau *et al.*, 1998]. U izolátů *S. aureus* byla provedena detekce genů kódujících tvorbu stafylokokových enterotoxinů (*sea - see*) metodou PCR [Monday and Bohach, 1999; Løvseth *et al.*, 2004].

- Průkaz termotolerantních kampylobakterů byl prováděn podle ČSN EN ISO 10272-1. K pomnožení bylo použito médium Bolton s koňskou krví (OXOID, UK), po 48 hodinové kultivaci při 42 °C bylo provedeno vyočkování na médium CCDA (OXOID, UK) s inkubací při 42 °C po dobu 48 hodin mikroaerofilně. Suspektní kolonie byly konfirmovány a druhově určeny metodou PCR [Bang *et al.*, 2002; Linton *et al.*, 1997; Winters *et al.*, 1998].
- Průkaz *Listeria monocytogenes* byl prováděn podle ČSN EN ISO 11290-1 s modifikací při primárním pomnožení, které bylo provedeno v pufrované peptonové vodě (OXOID, UK). Po přeočkování do Fraserova média (OXOID, UK) bylo provedeno vyočkování na médium AL agar (BIO-RAD, FR). Typické kolonie byly konfirmovány a sérotypizovány metodou sklíčkové aglutinace za použití komerčně dostupných antisér (DENKA SEIKEN, Japonsko) a výsledky sklíčkové aglutinace byly potvrzeny pomocí multiplex PCR [Douthith *et al.*, 2004].
- Průkaz bakterií rodu *Salmonella* byl prováděn podle ČSN EN ISO 6579. Neselektivní pomnožení proběhlo v pufrované peptonové vodě (OXOID, UK), selektivní v médiích RVS a MKTTN (OXOID, UK). Poté následovalo vyočkování na média RAMBACH (MERCK, D)

a XLD (OXOID, UK). Suspektní kolonie byly sérotypizovány antiséry firmy BIO-RAD, k jednotlivým sérotypům byly kmeny zařazeny podle Kauffmann-White-Le Minor schématu [Popoff, 2001]. Sérotypy *S. Enteritidis* a *S. Typhimurium* byly charakterizovány fágovou typizací se sadami fágů připravenými HPA v Londýně [Callow, 1959; Ward *et al.* 1987].

VÝSLEDKY A DISKUSE

V mikrobiologické kvalitě syrového mléka z automatů byly zaznamenány velké rozdíly a to zejména v závislosti na farmě, ze které mléko pocházelo. Zatímco některé farmy do automatů dodávají mléko po stránce mikrobiologické zcela bezpečné, mléko z jiných farem je patogeny kontaminováno opakovaně. Detailní výsledky jsou uvedeny v tabulce 1. Bakterie *S. aureus* byly detekovány ve 124 (56,6 %) vzorcích, schopnost produkovat klasické enterotoxiny byla potvrzena jen u 13 (10,5 %) kmenů. Kampylobaktery byly detekovány v 10 (4,6 %) vzorcích, jenž pocházely ze 3 sledovaných farem. Z automatů, kam dodávala mléko jedna z těchto farem, bylo odebráno 30 vzorků mléka, pozitivní nález byl potvrzen opakovaně (u 7 vzorků). Ve všech případech se jednalo o druh *C. jejuni*. *L. monocytogenes* byla detekována ve 4 (1,8 %) vzorcích pocházejících ze dvou farem. Potvrzeny byly sérotypy 4b (1krát) a 1/2a (3krát), shodné sérotypy byly detekovány na jedné farmě. Výskyt salmonel byl potvrzen v 7 (3,2 %) vzorcích, ze kterých bylo detekováno 8 kmenů salmonel. Detekovány byly sérotypy Typhimurium DT 104 (3krát), monofazická 4,[5],12:i- (2krát), Enteritidis PT13a, Bovismorbificans a Infantis (1krát). Ve vzorcích mléka pocházejících ze dvou farem byly salmonely detekovány opakovaně, jednou se jednalo o shodný sérotyp.

Výsledky této studie potvrzují výskyt patogenních bakterií v syrovém mléce distribuovaném prostřednictvím mléčných automatů. Kromě doporučení pro spotřebitele, že konzumace syrového mléka není stejně bezpečná, jako u mléka pasterovaného, ze studie vyplývá i doporučení pro epidemiology. V případě, že je u pacienta podezření, že k alimentární nákaze mohlo dojít po konzumaci syrového mléka z automatů, je k potvrzení původce potřeba odebrat vzorky opakovaně a při pozitivním průkazu původce provést typizaci izolovaných kmenů.

PODĚKOVÁNÍ

Tato studie byla finančně podpořena projekty VZ MSM 6215712402 a 2B06048.

LITERATURA

- Bang DD, Wedderkopp A, Pedersen K, Madsen M. Rapid PCR using nested primers of the *16S* rRNA and the hippuricase (*hipO*) genes to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental samples. *Molecular and Cellular Probes* 2002; 16 (5): 359-369.
- Callow BR. A new phage-typing scheme for *Salmonella typhi-murium*. *Journal of Hygiene (Lond)* 1959; 57: 346-359.
- Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42 (8): 3819-3822.
- Løvseth A, Loncarevic S, Berdal KG. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42 (8): 3869-3872.
- Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-Specific and Ubiquitous-DNA-Based Assays for Rapid Identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36 (3): 618-623.
- Monday SR, Bohach GA. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37 (10): 3411-3414.
- Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35 (10): 2568-2572.
- Popoff MY. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 8th edition, 2001.
- Ward LR, De Sa JDH, Rowe B. A phage-typing scheme for *Salmonella* Enteritidis. *Epidemiology and Infection* 1987; 99 (2): 291-294.
- Winters DK, O'Leary AE, Slavik MF. Polymerase chain reaction for rapid detection of *Campylobacter jejuni* in artificially contaminated foods. *Letters in Applied Microbiology* 1998; 27 (3): 163-167.

Renata Karpíšková^{1,2}

Ivana Koláčková²

Marcela Vyletělová³

Bohumíra Janštová¹

¹ Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

² Státní zdravotní ústav, CZVP, Brno

³ Agrovýzkum Rapotín s.r.o.

kontakt: karpiskova@chpr.szu.cz