

Výskyt *B. cereus* a *B. licheniformis* v syrovém mléce, pasterovaném mléce a sýrech a tvorba diarheálního toxinu u *B. cereus*

Occurrence of *B. cereus* and *B. licheniformis* within the raw milk, pasteurized milk and cheese and determination of diarrheal toxin by *B. cereus*.

Vyleťlová M., Hanuš O., Nejeschlebová L.

Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o., Rapotín

ABSTRACT

There were monitored the sporeforming bacteria *B. cereus* and *B. licheniformis* within 106 raw bulk milk samples and during the technological process of cheese production (19 batches – raw milk, pasteurized milk and cheese). We have found *B. cereus* in 13 cases and *B. licheniformis* in 46 cases of all 106 bulk milk samples. During the technological cheese process we have identified 1 strains of *B. cereus* and 9 *B. licheniformis* within raw milk, 1 *B. cereus* and 6 *B. licheniformis* within pasteurized milk. There were no *B. cereus* or *B. licheniformis* in the cheese samples. We have used BCET RPLA and ELISA test for detection of the diarrheal enterotoxin producing by *B. cereus*. There were 10 strains, which produced the enterotoxin (both methods were positive), 3 strains were negative (both methods were negative) and 5 cases were disputable. In these cases (RPLA neg. and ELISA posit.) we have the results determinated as negative. BCET RPLA and ELISA test were provided in the accredited laboratory SVÚ Jihlava and RPLA test was provided in our laboratory as well as. We have found no differences between RPLA (reversed passive latex agglutination) results between both laboratories.

ÚVOD

B. cereus se projevuje dvěma syndromy potravinových otrav. Diarheální typ způsobuje tvorbou termolabilního enterotoxinového komplexu průjem a břišní bolesti po 8 až 16 hodinách po požití kontaminované potravy (mléko). Tento typ by měl být eliminován pasterační teplotou. Emetický typ je charakterizován tvorbou termostabilního enterotoxinu a vyvolává žaludeční nevolnost a zvracení po 1 až 5 hodinách (pasterizovaná smetana, mléčný pudink). Je schopný přežívat jak pasterační teplotu, tak i teplotu UHT.

Cílem práce bylo zjištění výskytu sporotvorných bakterií *B. cereus* a *B. licheniformis* v bazénových vzorcích mléka a během technologie zpracování mléka na sýry ementálského typu a dále pak u vybraných kmenů *B. cereus* zjistit tvorbu diarheálního enterotoxinu.

MATERIÁL A METODY

Ve spolupráci s Centrální laboratoří v Pardubicích bylo v průběhu let 2003 a 2004 vyšetřeno 106 bazénových vzorků mléka z různých odběrných míst ČR a ve spolupráci s mlékárnou byly vyšetřeny vzorky při výrobě ementálského sýru (syrové mléko, pasterované mléko a finální výrobky) vždy jedné šarže mléka (celkem 19 šarží). Vedle jiných patogenních mikroorganismů jako *S. aureus*, *E. coli*, *E. coli* O157 a *L. monocytogenes* byly vzorky vyšetřeny na přítomnost *B. cereus* a *B. licheniformis*. U jednotlivých vzorků byl stanoven i jejich počet v CFU/ml. Pro kultivaci a konfirmaci podezřelých kolonií se vycházelo z normy: ČSN ISO 7932: Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu *Bacillus cereus*. Jako kultivační médium byl použit MYP Agar (HiMedia).

U některých izolovaných kmenů *B. cereus* byla zjištěna tvorba diarrheálního enterotoxinu pomocí BCET RPLA – reverzní pasivní latexová aglutinace. Ke stanovení bylo použito kitu BCET RPLA a návodu Oxoid (TD0950). Pro potvrzení tvorby enterotoxinu byly tyto vybrané kmeny zaslány do akreditované zkušební laboratoře č. 1129 Státního veterinárního ústavu v Jihlavě, kde byl *B. cereus* vyšetřen metodou ELISA a metodou RPLA. Výsledky jsou interpretovány v tabulce.

VÝSLEDKY A DISKUSE

V případě bazénových vzorků mléka bylo celkem 13 (22%) pozitivních na výskyt *B. cereus* a 46 (78%) na *B. licheniformis* (tab.1). Při výrobě sýrů jsme izolovali v syrovém mléce *B. cereus* v 1 případě a *B. licheniformis* v 9 případech. Ve vzorcích pasterovaného mléka byl pozitivní výskyt *B. cereus* v 1 případě a *B. licheniformis* v 6 případech. Ve vzorcích sýrů byl výsledek pro oba druhy negativní (tab. 1). Z výsledků je zřejmé, že se v mnohem častěji vyskytuje *B. licheniformis*, což potvrzuje i naše dřívější sledování. Je schopený rovněž produkce diarrheálního enterotoxinu a navíc je schopený přežívat i UHT teplotu, přesto je větší pozornost věnována nejen u nás, ale i v zahraničí *B. cereus*.

Tvorba diarrheálního enterotoxinu byla provedena dvěma metodami. Z výsledků získaných v naší laboratoři a v akreditované laboratoři SVÚ Jihlava můžeme konstatovat, že celkem u 10 kmenů *B. cereus* byla zjištěna pozitivní tvorba toxinu pro obě metody (tab. 2). U 3 kmenů nebyla potvrzena tvorba toxinu a obě metody byly shodné. V případě pozitivního stanovení enterotoxinu metodou ELISA a negativního metodou RPLA byl konečný výsledek označen jako negativní (5 kmenů *B. cereus*). Výsledky jsou v některých případech rozdílné vzhledem k tomu, že každá metoda je zaměřena na jinou frakci toxinů. V těchto sporných případech se výsledek označí jako suspektní a výsledek je negativní. Výsledky reverzní pasivní latexové aglutinace pro obě pracoviště byla shodná. Výjimku tvořily pouze dva kmeny 79D a

568, kdy jsme v obou případech zjistili vyšší tvorbu enterotoxinu (tab. 2). Tento rozdíl však v konečném důsledku a hodnocení nemá žádný vliv.

Tabulka 1: Výskyt *B. cereus* a *B. licheniformis* v bazénových vzorcích mléka

Kmen	CL (106)		Sýry - syr.mléko		Sýry-paster.mléko		Sýry
	Počet příp.	CFU/ml	Počet příp.	CFU/ml	Počet příp.	CFU/ml	Počet příp.
<i>Bacil. cereus</i>	13	0-110	1	0 - 20	1	0 - 10	0
<i>Bacil. licheniformis</i>	46	0-120	9	0 - 40	6	0 - 30	0

Tabulka 2: Tvorba diarreálního enterotoxinu *B. cereus*

		SVÚ Jihlava		V.u.p.s.	
Vzorky při výrobě sýrů		RPLA v ng	ELISA test	RPLA v ng	diarrh. toxin
79D	syrové mléko	32	+	64	++
79P	pasterované mléko	32	+	32	++
89D	syrové mléko	32	+	32	++
310D	syrové mléko	64	+	64	++
7947	syrové mléko	<2	+	<2	-
7952	pasterované mléko	<2	+	<2	-
Bazénové vzorky z CL					
281	syrové mléko	128	+	128	+++
341	syrové mléko	<2	-	<2	---
239	syrové mléko	<2	+	<2	-
230	syrové mléko	64	+	64	++
568	syrové mléko	32	+	64	++
566	syrové mléko	<2	+	<2	-
570	syrové mléko	<2	-	<2	---
579	syrové mléko	<2	+	<2	-
330	syrové mléko	16	+	16	+
255	syrové mléko	<2	-	<2	---
235	syrové mléko	8	+	8	+
218	syrové mléko	16	+	16	+

Příspěvek byl vypracován za podpory projektu pro MZe NAZV QF 3162 a MSMT