



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STANOVENÍ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*  
*A BACILLUS CEREUS* V CUKRÁŘSKÝCH VÝROBCÍCH

DETERMINATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *BACILLUS CEREUS*  
IN CONFECTIONERY PRODUCTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Monika Vdolečková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. MVDr. Bursová Šárka, Ph.D.

BRNO 2020

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1550/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Monika Vdolečková**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **doc. MVDr. Bursová Šárka, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Stanovení *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus* v cukrářských výrobcích

### Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

1. Vypracování literární rešerše zaměřené na problematiku *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus* v cukrářských výrobcích.
2. Odběr vzorků cukrářských výrobků.
3. Průkaz *S. aureus* a *B. cereus* v cukrářských výrobcích plotnovou metodou.
4. Konfirmace suspektních izolátů.
5. Detekce genů kódujících produkci toxinů metodou PCR.
6. Vyhodnocení a diskuse výsledků.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Monika Vdolečková

studentka

-----  
doc. MVDr. Bursová Šárka, Ph.D.

vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

vedoucí ústavu

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.

děkan

## Abstrakt

Tato bakalářská práce se v teoretické části zaměřuje na popis bakterií *Bacillus cereus* a *Staphylococcus aureus*, jakožto bakterií, které mohou kontaminovat suroviny ať už rostlinného či živočišného původu. Obě tyto bakterie se mohou vyskytovat v půdě, ve vodě, ale můžeme se s nimi i setkat na naší pokožce. Tato skutečnost může napomáhat kontaminaci při výrobě cukrářských výrobků.

V experimentální části byly zpracovány odebrané vzorky vánočního cukroví. U vánočního cukroví byla sledována přítomnost výše zmíněných bakterií a u vzorků, kde byla přítomnost bakterií prokázána, byly dále detekovány geny kódující produkci toxinů. Ze stanovených výsledků vyplývá, že vánoční cukroví z tržní sítě i domácí výroby není hlavním zdrojem *S. aureus*, ale jsou možným zdrojem toxigenních kmenů bakterie *B. cereus*.

## Abstract

This bachelor thesis focuses in the theoretical part on the description of bacteria *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*, as bacteria that can contaminate raw materials of either plant or animal origin. Both of these bacteria can be found in soil, water, but we can also encounter them on our skin. This fact can aid contamination in the manufacture of confectionery products. In the experimental part, samples of Christmas sweets were processed. The presence of the above mentioned bacteria was monitored in Christmas sweets and genes encoding toxin production were the presence of bacteria was detected.

## Klíčová slova

*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, cukrářské výrobky, genotypová konfirmace, fenotypová konfirmace, PCR, emetický toxin, diarhogenní enterotoxiny, stafylokokové enterotoxiny

## Keywords

*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, confectionery, genotypic confirmation, phenotypic confirmation, emetic toxin, diarrhogenic enterotoxins, staphylococcal enterotoxins

VDOLEČKOVÁ, Monika: *Stanovení Staphylococcus aureus a Bacillus cereus v cukrářských výrobcích*. Brno, 2020. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

## **Stanovení *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus* v cukrářských výrobcích**

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala zcela samostatně pod vedením doc. MVDr. Šárky Bursové, Ph.D. Další informace a užitečné rady mi byly poskytnuty konzultantkou Ing. Andreou Němcovou, Ph.D.

Použila jsem pouze podklady uvedené v seznamu literatury vloženém v bakalářské práci a další nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze bakalářské práce je shodná.

.....  
Monika Vdolečková

### **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat především doc. MVDr. Šárce Bursové, Ph.D. za umožnění vykonání bakalářské práce, za vedení práce, metodickou a odbornou pomoc a další rady. Dále bych chtěla poděkovat Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně, že mi byly poskytnuty laboratoře pro praktickou část mé bakalářské práce, dále děkuji ostatním pracovníkům Ústavu hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie za pomoc při práci a poskytnutí technického zázemí právě při vypracovávání praktické části bakalářské práce.

© Monika Vdolečková, 2020

*Tato práce vznikla jako školní dílo na Vysokém učení technickém v Brně, Fakultě chemické. Práce je chráněna autorským zákonem a její užití bez udělení oprávnění autorem je nezákonné, s výjimkou zákonem definovaných případů.*

## Obsah

Obsah.....	5
1 Úvod.....	7
2 Teoretická část.....	8
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	8
2.1.1 Charakteristika .....	8
2.1.2 Zdroje kontaminace potravin .....	9
2.1.3 Stafylokoková enterotoxikóza.....	9
2.1.3.1 Stafylokokové enterotoxiny .....	10
2.1.4 Detekce toxinů.....	10
2.1.4.1 Přímé metody .....	10
2.1.4.2 Nepřímé metody.....	11
2.2 <i>Bacillus cereus</i> .....	11
2.2.1 Charakteristika .....	12
2.2.2 Výskyt .....	12
2.2.3 Charakteristika alimentárních onemocnění (průjmový a emetický syndrom) ..	13
2.2.4 Spory .....	13
2.2.5 Toxiny .....	14
2.2.5.1 Emetický toxin .....	14
2.2.5.2 Enterotoxiny .....	15
2.2.5.3 Hemolysiny .....	15
2.2.6 Detekce toxinů.....	16
2.2.6.1 Přímé metody .....	16
2.2.6.2 Nepřímé metody.....	16
2.2.7 Metoda PCR .....	16
2.2.7.1 Princip .....	16
2.2.7.2 Postup provedení.....	17
2.2.7.3 Modifikace metody PCR.....	18
2.2.7.4 Využití v mikrobiologii potravin .....	18

2.2.8	Horizontální gelová elektroforéza .....	18
3	Praktická část.....	20
3.1	Materiál.....	20
3.1.1	Vzorky vánočního cukroví .....	20
3.1.2	Přístroje .....	22
3.1.3	Pomůcky .....	22
3.1.4	Chemikálie a roztoky .....	22
3.1.5	Kultivační média .....	23
3.1.5.1	Baird-Parker agar .....	23
3.1.5.2	Mannitol Yolk Polymyxin B agar.....	24
3.1.5.3	Krevní agar.....	25
3.2	Metodika.....	25
3.2.1	Izolace <i>Staphylococcus aureus</i> a <i>Bacillus cereus</i> ze vzorků vánočního cukroví 25	
3.2.2	Fenotypová confirmace izolátů <i>Bacillus cereus</i> .....	27
3.2.3	Fenotypová confirmace izolátů <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
3.2.4	Genotypová confirmace a charakterizace izolátů <i>Bacillus cereus</i> .....	28
3.2.4.1	Postup reakce PCR BC-01 .....	29
3.2.4.2	Postup reakce PCR BC-02.....	30
3.2.4.3	Postup reakce PCR BC-03 .....	32
3.2.4.4	Postup reakce PCR BC-04.....	33
3.2.5	Genotypová confirmace a charakterizace izolátů <i>Staphylococcus aureus</i> .....	34
3.2.5.1	Postup reakce PCR MRSA .....	34
3.2.5.2	Postup reakce PCR SES1 .....	35
3.2.5.3	Postup reakce PCR SES2.....	36
4	Výsledky a diskuse.....	38
4.1	Výskyt bakterie <i>Bacillus cereus</i> .....	38
4.2	Výskyt bakterie <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39
4.3	Genotypová confirmace bakterie <i>Bacillus cereus</i> .....	40
4.4	Genotypová confirmace bakterie <i>Staphylococcus aureus</i> .....	42
5	Závěr.....	44

# 1 Úvod

Obecně je výroba potravin a jejich zpracování spjata s přítomností a možnou kontaminací mikroorganismy, které jsou schopné způsobit i vážné zdravotní obtíže, o to více, je-li součástí zpracování či úpravy potravin ruční práce. Zejména ruce a sliznice jsou zdrojem mnoha mikroorganismů a může tak docházet ke kontaminaci výrobků. Velmi známými, ale ne příliš žádanými mohou být rody *Staphylococcus* a *Bacillus*. Významnými zástupci těchto rodů jsou patogenní druhy *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus*.

*Bacillus cereus* hraje významnou roli, jelikož se vyskytuje ve formě spor, díky nim je tato bakterie velmi odolná i vůči vysokým teplotám. Jeho přítomnost je nežádoucí nejen z pohledu bezpečnosti potravin, ale také s ohledem na možné ovlivnění jakosti a trvanlivosti výrobků. Závažným rizikem jsou diarhogenní enterotoxiny a emetický toxin, schopné vyvolat gastrointestinální onemocnění.

*Staphylococcus aureus* je patogenní bakterie, která produkuje termostabilní toxiny. Asi u 1/3 obyvatel se tato bakterie vyskytuje na kůži, sliznicích a ve vlasech. *S. aureus* je odolná bakterie, která je rezistentní například k penicilinu a ampicilinu, léčba onemocnění bývá náročná a zdlouhavá. Alimentární intoxikace – otrava z potravin, vyvolaná *S. aureus* je označována jako stafylokoková enterotoxikóza.

Mikrobiologické metody využívají k detekci bakterií jejich morfologické a biochemické vlastnosti. Novější metody využívají genotypové stanovení za využití molekulárně biologických metod, běžně se jedná např. o metodu polymerázové řetězové reakce. Molekulárně biologické metody nám umožňují získat podrobnější informace o vlastnostech a příbuznosti bakterií a jejich evoluci.

Cílem bakalářské práce je zhodnocení výskytu bakterií *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus* v tradičním vánočním cukroví domácí výroby i z tržní sítě. Dílčím cílem je zjištění prevalence enterotoxigenních a emetických kmenů *B. cereus* a enterotoxigenních kmenů *S. aureus*, a dále celkové posouzení, zda je sledovaná komodita potenciálním rezervoárem toxigenních kmenů uvedených bakterií.

## 2 Teoretická část

### 2.1 *Staphylococcus aureus*

Alimentární onemocnění dělíme podle mechanismu působení na infekce a intoxikace, také je dělíme podle původu, a to na onemocnění bakteriální, virové a parazitární. Alimentární intoxikace mohou být příčinou vzniku velkých epidemií, zejména pokud dojde ke vzniku onemocnění ve stravovacích zařízeních. Toxin, který onemocnění vyvolává je vytvořen již v potravě v důsledku nesprávné manipulace a uchování potravin nebo pokrmů. Mezi nejvýznamnější bakterie, které produkují toxiny patří *S. aureus*, *B. cereus* a *Clostridium botulinum* [1].

Alimentární intoxikace po konzumaci potravin kontaminovaných bakterií *Staphylococcus aureus* patří mezi nejčastější příčiny gastroenteritidy na celém světě. Alimentární intoxikace vyvolaná stafylokokovými enterotoxiny patří mezi závažná onemocnění z potravin [2].

První případ zaznamenané alimentární otravy vyvolané *S. aureus* se datuje do roku 1914. Bylo zjištěno, že po opakovaném požití kontaminované potraviny (mléka) byly pozorovány typické příznaky gastroenteritidy [3].

O objasnění příčin vzniku onemocnění se zasloužil v roce 1930 Dack, který sám a dobrovolně požíval supernatant (kapalina nad sedimentem) z kultur *S. aureus*. Po požití u něj byly pozorovány příznaky gastroenteritidy, jako je průjem, zvracení a křeče v břiše. Následkem tohoto experimentu byl popsán první stafylokokový enterotoxin. Zajímavé bylo jeho srovnání s doposud známým botulotoxinem, jelikož aktivita enterotoxinu nebyla utlumena ani po 30 minutách zahřívání při 100 °C [4].

Při následné charakterizaci *S. aureus* bylo zjištěno, že je schopen produkovat řadu extracelulárních metabolitů schopných vyvolat onemocnění u lidí a zvířat. Další onemocnění, které způsobuje bakterie *S. aureus* je syndrom toxického šoku, stafylokoková enterokolitida, syndrom opárené kůže, sepse, absces a ječné zrno [4].

#### 2.1.1 Charakteristika

Nejdůležitějším druhem rodu *Staphylococcus* je *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* se přirozeně vyskytuje na lidské i zvířecí kůži. Je však nebezpečný a v nejhorších případech může způsobit poškození mnoha orgánů [5].

Rod *Staphylococcus* představuje skupina malých gram-pozitivních, fakultativně anaerobních kokovitých bakterií, které v případě *S. aureus* vytváří typické hroznovité shluky [5, 6], které jsou nepohyblivé a na neselektivních půdách tvoří zlaté až žluté kolonie v důsledku tvorby karotenoidních pigmentů [5]. Velikost buněk se pohybuje v rozmezí od 0,5 do 1,5  $\mu\text{m}$ . Jedná se o kataláza pozitivní chemoorganotrofy. Jejich DNA je tvořena z 30–40 molárních % guaninem a cytosinem [6]. Buněčná stěna *S. aureus* je tvořena třemi hlavními složkami, mezi které patří peptidoglykan, který obsahuje opakující se jednotku N-acetylglukosaminu  $\beta$ -1,4 vázaného na kyselinu N-acetylmuramovou, dále kyselina teichoová, která se váže na muramyl-6-fosfát a protein A (tím se liší od ostatních druhů stafylokoků), který se kovalentně váže na peptidoglykan. Protein A způsobuje shlukování krvinek a bakterií v plazmě [5].



Bergeyho manuál systematické bakteriologie zařazuje rod *Staphylococcus* do čeledi *Micrococcaceae*, do níž jsou dále řazeny i rody *Stomatococcus*, *Micrococcus* a *Planococcus*. Rod *Staphylococcus* je dále dělen na 32 druhů a poddruhů. Kontaminace potravin stafylokoky je velmi častá, podílí se na ní lidé, zvířata i životní prostředí. I když mnoho druhů stafylokoků má schopnost vyvolat gastroenteritidu [7], téměř všechny případy alimentární otravy – stafylokokové enterotoxikózy, jsou přisuzovány právě bakterii *S. aureus*.

V tabulce 1 je uvedena obecná charakteristika *Staphylococcus aureus* [8].

Tabulka 1: Vlastnosti bakterie *Staphylococcus aureus* a jeho rezistence a citlivost vůči antibiotikům [9]

<i>Staphylococcus aureus</i>		
Vlastnosti	Rezistentní	Citlivý
Koaguláza	Methicilin	β-laktamy
Termostabilní nukleáza	Polyen	Makrolidy
Faktor shlukování	Polymixin	Tetracykliny
Žlutý pigment		Likosamid
Hemolytická aktivita		Novobiocin
Fosfatáza		Chloramfenikol
Hyaluronidáza		Lysostapin
Fermentace mannitolu		

### 2.1.2 Zdroje kontaminace potravin

Hlavním zdrojem kontaminace potravin bakterií *S. aureus* jsou lidé, protože stafylokoky, včetně *S. aureus*, jsou běžnou součástí kožní mikroflóry. *S. aureus* je hlavním lidským patogenem, kolonizovaní jedinci mohou být jeho nositeli a přispívat k jeho šíření. Šíření *S. aureus* mezi lidmi a následná kontaminace potravin může být způsobena přímým kontaktem nebo nepřímo vlivem částeček kůže [10].

Důležitým zdrojem kontaminace jsou také používané pomůcky a zařízení jako jsou nože, mlýnky na maso, skladovací náčiní atd. Vznik stafylokokové enterotoxikózy je často spojován s nedostatečným chlazením, přípravou potravin s velkým předstihem, špatnou hygienou (nedostatečné mytí rukou a nástrojů), nedostatečnou tepelnou úpravou (vaření či ohřívání) či dlouhodobým zahříváním, které umožňují růst bakterie a následnou produkci enterotoxinů [7].

### 2.1.3 Stafylokoková enterotoxikóza

Alimentární intoxikace způsobená *S. aureus* postihuje celosvětově velké množství osob, a to i přesto, že se nejedná o oficiálně hlášené onemocnění. Odhad, který pochází ze Spojených států amerických, říká, že je hlášeno asi pouze 1–5 % všech případů stafylokokové enterotoxikózy. Většinou nedochází k hlášení této otravy v domácnostech, pouze ve vysoce propagovaných ohniscích [11]. Studie realizovaná Ministerstvem zemědělství ve Spojených státech amerických uvádí více než 1,5 milionů případů onemocnění během jednoho roku, 1 210 osob zemřelo [12]. Otrava potravinami bývá nejvíce hlášena v období léta, což je způsobeno zejména nevhodným skladováním potravin v tomto ročním období [13].

Po velmi krátké inkubační době se asi u 50 % pacientů objevují příznaky zvracení. Mezi další příznaky se řadí nevolnost, křeče v břiše, průjem a bolesti hlavy, duševní a tělesná skleslost, slabost, závratě a zimnice. Symptomy se obvykle projeví do 6 hod od podání kontaminované potraviny [12].

Stafylokokové enterotoxiny (SEs) jsou stabilní molekuly. Studie prokázala neúplné zničení enterotoxinů po vaření. SEs je obtížné inaktivovat zahříváním, mají zvýšenou stabilitu, pokud jsou přítomny ve vysokých koncentracích. Vlastností SEs, která má význam pro rozvoj alimentární intoxikace vyvolané *S. aureus*, je jejich odolnost proti inaktivaci proteázami přítomnými v gastrointestinálním traktu, odolnost vůči pepsinu, zejména v prostředí s relativně nízkým pH, je klíčovým požadavkem na aktivitu SEs *in vivo* [11].

### **2.1.3.1 Stafylokokové enterotoxiny**

V současné době je známo 22 typů stafylokokových enterotoxinů – SEs. Stafylokokové enterotoxiny jsou označovány SEA-SEV. Přičemž SEC je možné dále dělit na jednotlivé subtypy (SEC1, SEC2, SEC3, SEC-hovězí, SEC-ovčí, SEC-kozí), a to podle rozdílných izoelektrických bodů. SEs se dělí na klasické, mezi které se řadí SEA-SEE, ostatní jsou označovány jako nové typy enterotoxinů [1].

Stafylokokové enterotoxiny jsou proteiny, které mají molekulovou hmotnost v rozmezí 24–29 kDa. Jsou složeny z jednoduchých polypeptidových řetězců. Polypeptidové řetězce obsahují jednu disulfidickou vazbu a jsou bohaté na lysin, kyselinu asparagovou, glutamovou a tyrosin [1].

Schopnost produkovat toxiny je možné prokázat asi u ½ kmenů *S. aureus* izolovaných z potravin. SEs jsou termostabilní a odolávají trávicím enzymům [1].

Ne všechny SEs vyvolávají u konzumentů intoxikaci z potravin. Schopnost vyvolat gastroenterický syndrom byla prokázána u klasických typů SEs (SEA-SEE), z nových typů pouze u SEH. Enterotoxiny SEG a SEI vykazují emetickou aktivitu [1].

### **2.1.4 Detekce toxinů**

Schopnost produkovat toxiny lze prokázat asi u ½ kmenů *S. aureus* izolovaných z potravin. Toxiny *S. aureus* mohou být stanoveny pomocí přímých nebo nepřímých metod [14].

#### **2.1.4.1 Přímé metody**

K přímé detekci stafylokokových enterotoxinů se používají imunologické metody, které jsou založeny na principu reakce specifické protilátky s antigenem (tím je v tomto případě stafylokokový enterotoxin) [14].

Reverzní pasivní latexová aglutinace označována zkratkou RLPA umožňuje prostřednictvím testovací soupravy SET-RPLA detekovat toxiny SEA-SED přímo ve vzorcích potravin. Tato souprava neobsahuje protilátku pro SEE, kmeny s produkcí SEE jsou označeny jako SEA produkující (zkřížená reaktivita mezi SEA a SEE). Inkubace po nanesení vzorků a protilátek do jamek mikrotitrační destičky trvá při laboratorní teplotě přibližně 20–24 hodin. Výsledky je možné hodnotit podle struktury vzniklé na spodní části jamek [14].

Enzyme linked immunosorbent assay označována též jako ELISA se také využívá ke stanovení SEs. Nejčastěji je využívána sandwich ELISA. Tato metoda využívá vazby

antigenu a protilátky značené enzymem, který štěpením substrátu vyvolá barevnou změnu v jamkách destiček. Časově je tato metoda nenáročná, provedení a vyhodnocení metody trvá zhruba 3–4 hodiny [14].

Enzyme linked immunofluorescent assay (ELFA) je automatizovaná imunofluorescenční metoda, která slouží k detekci klasických typů stafylokokových enterotoxinů SEA-SEE. Tato metoda funguje na obdobném principu jako ELISA testy. Rozdíl spočívá ve vyhodnocení, kdy enzym, použitý ke značení detekčních protilátek katalyzuje konverzi fluorogenního substrátu za vzniku přístrojem měřené fluorescence. Z výsledků není možné rozpoznat, jaký typ SEs je přítomen. Tato metoda je časově méně náročná než dříve zmiňované testy ELISA, hovoříme o stanovení během 2 hodin [14].

Mezi další přímé metody stanovení SEs se řadí vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo kombinace kapalinové chromatografie s detekcí hmotnostní spektrometrií (LC-MS) [14].

#### **2.1.4.2 Nepřímé metody**

Mezi nejčastější používané nepřímé metody patří polymerázová řetězová reakce (PCR), nebo její modifikace – polymerázová řetězová reakce v reálném čase (real-time PCR) [14]. Obě tyto metody a jejich rozdíly jsou dále popsány v kapitole 2.2.7 – Metoda PCR.

## **2.2 *Bacillus cereus***

Skupina *Bacillus cereus* se skládá ze sedmi druhů, mezi které patří *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* a *B. cytotoxicus*. Všechny druhy jsou spolu úzce spjaty. Široké spektrum toxicity *B. cereus* sahá od avirulentních kmenů používaných u lidí jako probiotika až po vysoce toxické kmeny, které jsou zodpovědné za úmrtí způsobené v souvislosti s konzumací kontaminovaných potravin [15, 16].

*Bacillus cereus* může způsobovat dva typy alimentárního onemocnění. Prvním typem je průjmový (diarhogenní) syndrom, poprvé byl rozpoznán v roce 1948, kdy postižení touto nemocí požili kontaminovanou vanilkovou omáčku [17]. Druhým typem je emetický syndrom, který byl popsán v roce 1968. Tato forma onemocnění byla prokázána v několika ohniscích spojených se smaženou rýží, která se podávala v Londýně [18].

Diarhogenní forma onemocnění je způsobena enterotoxiny, které jsou produkovány během vegetativního růstu bakterie *Bacillus cereus* v tenkém střevě [19]. Emetická forma onemocnění je způsoben toxinem, který vzniká při růstu *B. cereus* v potravinách [20]. U obou forem nemoci jsou přežívající spory zdrojem otravy z potravin. *B. cereus* po vaření a ochlazení pod cca 48 °C v potravinách velmi dobře roste [21]. Převládající forma onemocnění se liší v jednotlivých zemích [20, 22, 23], je to pravděpodobně způsobeno stravovacími návyky v daných lokalitách. U některých pacientů mohou současně proběhnout oba typy onemocnění [24], jen však asi 5 % kmenů *B. cereus* produkuje oba typy toxinů [20, 25].

Tepelné zpracování potravin podporuje klíčení spor, a pokud není přítomna konkurenční flóra, roste tato bakterie velmi dobře, za optimálních podmínek se jedná o dobu klíčení menší než 12 minut [21].

*Bacillus cereus* je půdní saprofyt a snadno se šíří do různých typů potravin, zejména pak do potravin rostlinného původu, masných výrobků, potravin z vajec a mléčných výrobků. Onemocnění, které způsobuje *B. cereus*, trvá obvykle maximálně 24 hodin [20]. Ojedinele se však setkáváme s hlášenou závažnější formou alimentárního onemocnění, kterou způsobuje *Bacillus cereus*, zejména u průjmového syndromu [19]. Byly zaznamenány tři úmrtí, které byly způsobeny nekrotickým enterotoxinem [26], podobně byly hlášeny úmrtí u emetické formy onemocnění, a to v případě požití velkého množství emetického toxinu [27, 28, 29].

### 2.2.1 Charakteristika

*Bacillus cereus* je aerobní bakterií, která má schopnost tvořit endospory. Bakterie *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycoides* [30], *B. weihenstephanensis* [31] a *B. cytotoxicus* [15] mají velmi podobné sekvence rRNA (16S a 23S), to nám naznačuje, že se nedávno odchýlily od běžné evoluční linie [32, 33] a můžeme pozorovat fenotypovou podobnost v rámci tzv. skupiny *B. cereus sensu lato* [15, 16].

*B. anthracis* vykazuje vysokou virulenci a je tak nejvýraznějším členem z této skupiny. Podobně však *B. cereus* má velmi podobné vlastnosti s *B. anthracis* [34], právě proto je ještě obtížnější rozeznat tyto dva druhy od sebe [35].

Bacily jsou tyčinkovité bakterie, šířka buněk je větší než 0,9 µm. Produkují elipsoidní nebo oválné endospory [30, 31, 36].

Skupina *B. cereus* může být nejlépe rozlišena podle kritérií, které jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Vybraná kritéria pro fenotypové rozlišení základních druhů skupiny *B. cereus sensu lato* [30, 31]

Druh	Morfologie kolonií	Hemolýza	Pohyblivost	Citlivost k penicilínu
<i>B. cereus</i>	Bílá	Pozitivní	Vykazuje	Nevykazuje
<i>B. anthracis</i>	Bílá	Negativní	Nevykazuje	Vykazuje
<i>B. thuringiensis</i>	Bílá/šedá	Pozitivní	Vykazuje	Nevykazuje
<i>B. mycoides</i>	Rhizoidní	Slabě pozitivní	Nevykazuje	Nevykazuje
<i>B. pseudomycoides</i>	Rhizoidní	Slabě pozitivní	Nevykazuje	Nevykazuje
<i>B. weihenstephanensis</i>	Bílá	Pozitivní	Vykazuje	Nevykazuje

### 2.2.2 Výskyt

*Bacillus cereus* je v přírodě rozšířeným druhem bakterie a vyskytuje se ve střevě člověka. Často je izolován z půdy a rostlin, dále pak je přítomen v prachu, zvířecí srsti, povrchové vodě a v sedimentech [20, 60]. Z rostlin může docházet ke snadnému šíření do potravin. Častý výskyt je zaznamenán v surovinách a složkách používaných v potravinářském průmyslu, jako je zelenina, škrob, koření, dále pak je možné rozšíření na masné výrobky [37], do mléka a mléčných výrobků. Spory *B. cereus* přežívají pasteraci mléka [38].

### 2.2.3 Charakteristika alimentárních onemocnění (průjmový a emetický syndrom)

Na alimentární onemocnění každoročně v České republice zemře několik pacientů. Skutečný počet nakažených osob je však mnohonásobně vyšší, než je hlášeno. Mnoho dospělých osob při mírném průběhu nenavštíví lékaře a infekce uniká systému hlášení. Nejvyšší počet nakažených bývá hlášen u malých dětí (zejména kojenců a batolat), a to z důvodu nedostatečné zralosti imunitního systému, rychlé dehydrataci a možnému selhání oběhového systému [1].

Průjmovou formu onemocnění z potravin způsobují enterotoxiny. Emetická forma onemocnění je způsobem emetickým toxinem (cereulidem), který vyvolává zvracení. S malou pravděpodobností je možný výskyt obou forem onemocnění z potravin zároveň, to může být způsobeno bakterií *B. cereus*, která produkuje obě formy toxinů [20].

V tabulce 3 je uvedeno srovnání obou forem alimentárního onemocnění.

Tabulka 3: Porovnání průjmového a emetického syndromu [20, 24, 39]

Forma alimentárního onemocnění	Průjmový	Emetický
Dávka způsobující onemocnění	10 <sup>5</sup> –10 <sup>7</sup> buněk (celkově)	10 <sup>5</sup> –10 <sup>8</sup> buněk (na gram v jídle)
Produkce toxinu	V tenkém střevě hostitele	V potravinách
Druh toxinu	Protein (enterotoxiny)	Cyklický peptid (emetický toxin)
Inkubační doba	Obvykle méně než 24 hod.	0–5 hod.
Trvání nemoci	12–24 hod., výjimečně dny	6–24 hod.
Symptomy	Bolesti břicha, průjem	Nevolnost, zvracení, malátnost, (někdy průjem v důsledku produkce enterotoxinu)
Nejčastěji kontaminované potraviny a jídlo	Masné výrobky, polévky, zelenina, pudíng/omáčky a mléko/mléčné výrobky	Smažené a vařené rýže, těstoviny, pečivo a nudle

Mezi faktory, které mohou ovlivnit vznik otravy z potravin, patří: uchovávání potravin při pokojové teplotě, konzumace potravin v syrovém stavu, nedostatečné chlazení a ohřátí potravin, nedostatečné rozmrazení potravin a v neposlední řadě použití zbytků [40].

Větší výskyt otrav je pozorován u malých dětí a dětí předškolního věku, dále pak u starších lidí, kteří jsou náchylnější k onemocnění [40].

### 2.2.4 Spory

Tvorba spor u bakterie *B. cereus* je významným faktorem, který přispívá ke vzniku onemocnění. Spory *B. cereus* jsou hydrofobnější, než spory jiných druhů rodu *Bacillus*. Tato vlastnost jim umožňuje přilnutí k různým povrchům s následnou tvorbou biofilmů [41].

Spory jsou velmi odolné, odolávají i účinku běžných dezinfekčních prostředků. Povrchové struktury (pili) umožňují lepší adhezi a [41, 42] napomáhají tvorbě velkých agregátů spor. Výše uvedené vlastnosti napomáhají bakteriím odolávat dezinfekčním prostředkům a dále kontaminovat potraviny, u kterých došlo ke kontaktu s infikovanými pomůckami a zařízením. [42].

## 2.2.5 Toxiny

Konzumace potraviny, které jsou kontaminovány toxigenními kmeny *B. cereus*, může zapříčinit vznik 2 různých forem alimentárního onemocnění – emetické a diarhogenní. Tepelně stabilní emetický toxin (cereulid) se tvoří během stacionární fáze růstu bakterií v potravinách. Syntéza emetického toxinu může být vázána na sporulaci. Mezi rizikové potraviny patří těstoviny, rýže, maso, mléčné produkty a kojenecká výživa [14].

Diarhogenní enterotoxiny mohou být tři základní, patří mezi ně HBL toxin, Nhe a CytK, nově se hovoří o enterotoxinu T a FM. Tyto toxiny bývají produkovány během pozdní exponenciální a na počátku stacionární fáze růstu při množení bakterií ve střevě. Rizikovými potravinami jsou masné výrobky, maso, ryby, omáčky, zelenina, brambory a mléčné výrobky [14].

Přehled toxinů produkovaných bakterií *Bacillus cereus* je uveden v následující tabulce 4.

Tabulka 4: Toxiny produkované bakterií *Bacillus cereus*

Syndrom	Typ toxinu	Geny	Podjednotky toxinů	Geny
Průjmový	Hemolysin	<i>Hbl</i>	B-komponenta	<i>hblA</i>
			L-komponenta (L1)	<i>hblD</i>
			L-komponenta (L2)	<i>hblC</i>
	Hemolysin I	<i>Clo</i>		
	Hemolysin II	<i>hlyII</i>		
	Hemolysin III	<i>hlyIII</i>		
	Nehemolytický enterotoxin	<i>He</i>	NheA	<i>nheA</i>
			NheB	<i>nheB</i>
			NheC	<i>nheC</i>
	Cytotoxin K	<i>cytK</i>		
	Enterotoxin T	<i>bceT</i>		
Enterotoxin FM	<i>entFM</i>			
Emetický	Cereulid	<i>ces, cer</i>		

### 2.2.5.1 Emetický toxin

Emetický toxin se skládá ze tří opakování čtyř modifikovaných aminokyselin, které tvoří kruhovou strukturu. Tento toxin je produkován velkým enzymovým komplexem s více doménami, je vysoce hydrofobní a termostabilní (až 121 °C podobu 90 min). Je aktivní v pH rozmezí 2-11. Trypsinem nedochází k jeho inaktivaci. Tento toxin vzniká při dlouhodobém uchovávání potravin [5].

### 2.2.5.2 Enterotoxiny

Diarhogenní enterotoxiny jsou obecně termolabilní a citlivé k účinku proteolytických enzymů. Do této skupiny řadíme: hemolysin BL (HBL), nehemolytický enterotoxin (Nhe), cytotoxin K (cytK) a nově i enterotoxiny BceT a FM [5].

HBL se skládá z jedné složky B a dvou složek L (L1 a L2). Všechny tři složky jsou vysoce heterogenní a všechny tři jsou nutné pro maximální aktivitu toxinu. Vytvářejí vzorec hemolýzy charakterizovaný přítomností čisté zóny a zóny neúplné hemolýzy na krevním agaru. Tato aktivita je nejvyšší v krvi morčat, prasat, telat, ovcí, koz, králíků, člověka a na posledním místě koňů. Hemolysin BL je považován za důležitý virulenční faktor [5].

Nehemolytický enterotoxin je dalším tříložkovým toxinem, který je produkován bakterií *B. cereus*. Tento toxin je složený z podjednotek NheA, NheB a NheC. Bylo zjištěno, že NheB interaguje s receptorem hostitelské buňky. Specifická role Nhe při gastroenteritidě však nebyla jasně stanovena [5].

Cytotoxin K se řadí mezi toxiny, které vytvářejí póry. CytK se podílí na propuknutí nekrotické enteritidy a následkem je krvavý průjem [5].

Enterotoxin BceT byl původně označován jako enterotoxin T. Funkce BceT je v patogenezi kontroverzní. Některé studie zastávají názor, že má tento toxin enterotoxickou aktivitu, jiné studie to zpochybňují [5].

Enterotoxin FM nebyl implikován jako enterotoxin zodpovědný za vznik alimentárního onemocnění, je však přítomen u většiny kmenů *B. cereus*. Experimentálně byla prokázána zvýšená vaskulární permeabilita, akumulace tekutin, pro myši je tento toxin smrtelný [5].

### 2.2.5.3 Hemolysiny

Hemolysin I je také známý pod názvem cereolysin O (CLO). Jedná se o toxin, který má schopnost vázat cholesterol a tvořit póry. Jeho aktivita může být inhibována cholesterolem. Přínos tohoto toxinu není jinak blíže objasněn [5].

Hemolysin II označovaný jako HlyII, patří mezi toxiny, které tvoří kanály a produkuje póry s vnitřním průměrem 1,5 – 2 nm a vnějším v rozmezí 6–8 nm [5].

Hemolysin III označovaný jako HlyIII je toxin, který tvoří póry na membráně s průměrem pórů 3 – 3,5 nm. Role tohoto toxinu v patogenezi není známá [5].

Fosfolipázy jsou produkovány bakterií *B. cereus* ve formě dvou enzymů, a to fosfolipázy C, která je známá také jako lecitináza a je specifická pro fosfatidylcholin (PC-PLC). Druhým enzymem je fosfatidylinositol (PI-PLC). PC-PLC je enzym, který má na svém aktivním místě tři atomy zinku, ten přispívá ke strukturním a katalytickým vlastnostem enzymu. Enzymy PC-PLC a PI-PLC hrají důležitou roli při infekcích dýchacích cest, které vedou k nekróze a krvácení do tkání v dýchacích cestách. Sfingomyelináza je enzym, který má na svém aktivním místě dva atomy hořčíku [5].

## 2.2.6 Detekce toxinů

### 2.2.6.1 Přímé metody

Nejpoužívanějšími metodami detekce diarhogenních enterotoxinů jsou testy ELISA a RPLA. Reverzní pasivní latexová aglutinace je vhodná pro stanovení diarhogenních enterotoxinů. Dostupný BCET-RPLA test detekuje L<sub>2</sub> komponentu toxinu HBL [14].

Další dostupný test, který vyrábí firma TECRA, funguje na principu sendvičové metody ELISA. Tento test je určen pro detekci průjmového enterotoxinu, přesněji komponenty A (NheA). Výsledky tohoto testu je možno získat během 4 hodin [14].

GLISA imunochromatografický test je další přímou metodou, která slouží k detekci komponent NheB a Hbl-L<sub>2</sub>. V nejběžnějším provedení se jedná o plošnou imunochromatografii. Test se skládá z nitrocelulóзовé membrány, na které jsou imobilizované vazebné proteiny pro cílové detekované molekuly [1].

K detekci průjmových toxinů se dále využívá kombinace vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí hmotnostní spektrometrií (HPLC – MS) [14].

### 2.2.6.2 Nepřímé metody

Obdobně jako u stanovení stafylokokových enterotoxinů se i zde, pro stanovení genů, které zodpovídají za tvorbu toxinů, běžně používá metoda PCR. Emetický toxin je kódován *ces* geny a jeho detekce bývá založena na detekci genu cereulid syntetázy (*cesB*). Nehemolytické enterotoxiny jsou kódovány geny *nheA–nheC*. U hemolysinu BL se jedná o geny *hblA* (pro komponentu B), *hblC* (pro komponentu L<sub>2</sub>) a *hblD* (pro komponentu L<sub>1</sub>). Metodou PCR můžeme získat informaci i o přítomnosti genu *cytK*, který kóduje cytotoxin K nebo genu *bceT*, který kóduje produkci enterotoxinu T [14].

## 2.2.7 Metoda PCR

Metoda polymerázové řetězové reakce je označována zkratkou PCR, která pochází z anglického Polymerase Chain Reaction. Tato metoda byla zavedena do praxe na konci 20. století [43].

Detekce pomocí metody PCR je založená na sledování přítomnosti genů kódujících tvorbu toxinů uvedených v tabulce 4 a nabízí vysokou úroveň citlivosti a specifity. Metoda PCR neodhaluje patogenitu kmenů. Detekci toxinů pomocí metody PCR může být negativně ovlivněna přítomností inhibitorů v potravních matricích, z tohoto důvodu je někdy nutné bakteriální buňky před jejich analýzou oddělit [5].

### 2.2.7.1 Princip

Metoda PCR využívá enzym DNA-polymeráza, který opakovaně opisuje (amplifikuje) vzorovou (templátovou) molekulu DNA. Syntézu řídí primery, jedná se o krátké oligonukleotidy, které nasedají na začátek a konec kopírovaného úseku DNA [14].

Mnohonásobné amplifikace je dosaženo třemi kroky – denaturace, hybridizace a syntéza. Denaturace probíhá obvykle při teplotě 95 °C, kdy dochází k denaturaci templátové DNA v důsledku rozrušení vodíkových můstků mezi jednotlivými bázemi komplementárních nukleotidů a přechodu dvouřetězcové šroubovice DNA na 2 jednořetězcové. Při hybridizaci se nejprve reakční směs ochladí na teplotu přibližně 50–60 °C. Poté dojde k navázání



komplementárních primerů na specifické místo. Tento proces se nazývá též *annealing*. Dochází k ohraničení amplifikovaného úseku DNA z obou stran a je zabráněno vzniku původní dvoušroubovice. V poslední fázi, která se nazývá syntéza, nebo-li *elongace*, dochází za přítomnosti enzymu DNA-polymerázy a základních stavebních kamenů DNA – nukleosidtrifosfátů, k prodlužování nově vzniklého vlákna DNA podle původní DNA. *Elongace* probíhá obvykle při teplotě 72 °C [14].

Všechny kroky se opakují 25–35×. Počet cyklů by měl být dostatečný pro nasyntetizování požadovaného množství DNA. Proces amplifikace probíhá v termocykleru – jedná se o přístroj, který umožňuje nastavit cyklické střídání teplot v reakční směsi v přesně definovaných intervalech. K samotné detekci namnožených úseků DNA je nejčastěji využívána horizontální elektroforetická separace v agarózovém gelu, který je následně obarven roztokem ethidium bromidu, vizualizace se provádí pod UV světlem [14].

Základní pojmy, které se využívají při metodě PCR a následné detekci při gelové elektroforéze, jsou uvedeny a popsány v tabulce 5.

*Tabulka 5: Základní pojmy využívané při metodě PCR a jejich specifikace [14]*

<b>Základní pojmy</b>	<b>Popis</b>
Master mix	Reakční směs, zajišťuje optimální podmínky pro průběh reakce. Skládá se z: koncentrovaného pracovního pufru s Mg <sup>2+</sup> ionty (zajišťují vhodné podmínky pro DNA-polymerázu), vlastní DNA-polymerázy, specifické primery, PCR vody a templátovou DNA.
Templát	DNA, která složí jako šablona pro syntézu nových řetězců; koncentrace přibližně 10 ng/μl.
DNA-polymeráza	Enzym, slouží k syntéze nové DNA ve směru 5' → 3' od místa navázání primeru.
Primery	Oligonukleotidy (obvykle 20–25 bází), svou sekvencí odpovídají DNA templátu, vymezují úsek DNA, který má být pomnožen.
Termocykler	Teplotní cyklátor, zajišťuje regulaci teploty pro dosažení optimálních podmínek.
Marker	Velikostní standard; obsahuje různě dlouhé fragmenty DNA s přesně definovaným počtem páru bází. Používá se k odhadu velikostí PCR produktů na základě pohyblivosti při agarózové gelové elektroforéze.

### **2.2.7.2 Postup provedení**

Prvním krokem v provedení PCR je extrakce nukleonové kyseliny a její oddělení od ostatních složek. Kvalita izolované DNA rozhoduje o následném průběhu PCR. Existuje řada extrakčních a purifikačních metod, kterými se dá získat DNA o různé čistotě, integritě a množství [14].

Nejjednodušším způsobem izolace bakteriální DNA je lýza bakteriálních buněk varem. Tento způsob získávání DNA jsem prováděla v laboratoři. Je dále blíže popsán v kapitole genotypová konfirmace izolátů *Bacillus cereus* [14].

Dále je možné provést izolaci pomocí chelatační iontoměničové pryskyřice. Izolace je založená na iontové vazbě molekuly DNA na nabitý iontoměnič v roztoku nebo na membráně, promytí a uvolnění DNA do roztoku. Jedná se o rychlou a rozšířenou metodu [14].

Jedna z nejstarších, ale stále používaných metod je izolace DNA založená na fenol-chloroformové extrakci. Po smíchání fenolu, chloroformu a lyzované buňky pomocí lysozymu, SDS detergentu a proteinázy K a následné centrifugaci dojde k vytvoření dvou fází. Spodní fáze je organická, horní vodná, ta obsahuje DNA a RNA. Fázové rozhraní je tvořeno vysráženými proteiny. Jedná se o levnou metodu s vyšší a stabilnější výtěžností DNA, než které poskytují komerčně dostupné kity. Časově je tato metoda náročná, další nevýhodou je práce s fenolem a chloroformem [14].

V dnešní době se často využívají silikátové kolonky. Výhodou je nenáročnost (pracovní i časová) a získáme poměrně čistou DNA. Jedná se o metodu, která je založená na principu afinitní chromatografie. DNA má schopnost vázat se na silikátový povrch, nachází-li se v přítomnosti chaotropních solí, DNA se uvolní po použití elučního činidla [14].

Metoda, která využívá například síran sodný, nebo chlorid sodný je tzv. technika vysolování, která je založena na změně rozpustnosti molekul DNA v závislosti na změně koncentrace iontů v roztoku [14].

### **2.2.7.3 Modifikace metody PCR**

Během několika let vzniklo mnoho modifikací PCR.

Mezi běžně používanou modifikací PCR patří mnohonásobná multiplex-PCR, která umožňuje detekci více genů současně. Master mix obsahuje příslušný počet párů primerů. Tato metoda se často využívá při detekci genů kódujících stafylokokové enterotoxiny či genů rezistence [14].

Další často využívanou modifikací této metody je real-time PCR, označována zkratkou qPCR. Tato metoda nám umožňuje přímou detekci a kvantifikaci PCR produktu v průběhu celé PCR reakce. Využívá se zde sledování fluorescenčního signálu, jeho intenzita je snímána a analyzována. Tato metoda je jednodušší a rychlejší než klasická PCR metoda [14].

### **2.2.7.4 Využití v mikrobiologii potravin**

V oblasti mikrobiologie potravin má metoda PCR široké uplatnění. Využívá se k poměrně rychlé detekci alimentárních patogenů přímo ze vzorků. Vzorky často obsahují jen malé množství těchto mikroorganismů, proto je nutné jejich pomnožení. Pomocí PCR můžeme prokázat i mrtvé bakterie, také ji můžeme využít při průkazu genů kódujících rezistenci k antimikrobiálním látkám, faktory virulence, atd [14].

### **2.2.8 Horizontální gelová elektroforéza**

Jak již bylo výše zmíněno, k vyhodnocení výsledků PCR se velmi často využívá gelová elektroforéza v agarózovém gelu [14].

Přípravený gel se vkládá do elektroforetické vany (gel musí být umístěn ve správné orientaci, aby elektroforéza proběhla – vzorky musí být umístěny u katody) a je zalitý 0,5× TBE (tris-EDTA-borátovým pufrém). Gel musí být celý ponořen a hladina pufru by lehce měla vystupovat nad povrch gelu. Do vytvořených jamek se nanáší malé množství PCR

amplifikované reakční směsi. Pokud není využita barevná polymeráza s vkládacím pufrem, je nutné před PCR produkt smíchat s vkládacím pufrem v poměru 1:5. Vkládací pufr obsahuje stabilizační složky a barvivo pro zviditelnění migrace DNA v gelu. Do jedné jamky se nanáší DNA marker. Rychlost migrace závisí na molekulové hmotnosti [14].

Po ukončení elektroforézy je gel obarven pomocí roztoku ethidium bromidu. Obarvený gel se prohlíží na transiluminátoru pod UV světlem a pozorujeme oranžovou fluorescenci. Další alternativou barvení produktů je látka Midori Green, která již podle názvu pod UV světlem fluoreskuje zeleně [14].

### **3 Praktická část**

#### **3.1 Materiál**

##### **3.1.1 Vzoroký vánočního cukroví**

Přítomnost bakterií *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus* byla sledována ve vzorcích vánočního cukroví (drobné kusové cukrářské výrobky), a to z domácí výroby či z tržní sítě. Celkem bylo odebráno 65 vzorků cukrářských výrobků, z tohoto množství pochází 60 vzorků, tedy 92 %, z domácí výroby a 5 vzorků, tedy 8 %, z tržní sítě. Všechny vzorky z tržní sítě byly pečené, u vzorků domácí výroby bylo 11 vzorků nepečených a 49 vzorků pečených. Jejich přehled je uveden v tabulce 6 a v tabulce 7.

Cukrářské výrobky byly odebírány do sterilních sáčků za pomoci rukavic, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků. Odebrané vzorky byly následně označeny, popsány a zamrazeny.

Tabulka 6: Pečené a nepečené cukroví z domácí výroby

Domácí výroba					
Typ cukroví	Typ vzorku	Počet vzorků		Náplň	
		Celkový	Podle náplně		
Pečené	Perníčky	5		-	
	Vanilkové rohlíčky	8		-	
	Linecké cukroví		10	6	Marmeláda
				2	Nutella
				2	Bez náplně
	Ořechy		3	1	Puding, máslo
				1	Čokoládový krém
				1	Máslový krém
	Moca	2		Kávový krém	
	Trubičky	2		Máslový krém	
	Mandlové rohlíčky	1		-	
	Tlapky	1		-	
	Cukroví s kakaem a kokosem	1		Marmeláda	
	Šátečky plněné ořechy	1		Ořechy	
	Košíček s čokoládou	1		Ořechovo-rumová	
	Kolečka s ořechy	1		Kakaový krém	
	Rohlíčky s čokoládou	1		Máslový krém	
	Rohlíčky	1		Máslový krém s ořechy	
	Kornoutky	1		Karamelový krém, čokoláda	
	Ořechové tyčinky	1		-	
	Laskonky	1		Máslový krém	
	Cigarety	1		Marmeláda	
	Ovesné placky	1		-	
	Marokánky	1		-	
	Čoko kokosky	1		Máslový krém	
	Kokosky	1		-	
	Srdíčka tlačená	1		Marmeláda	
	Ořechové hvězdičky	1		Marmeláda	
Biskupský chlebiček	1		-		
Tirolský chlebiček	1		-		
Nepečené	Kokosové kuličky s kakaem	2		-	
	Kokosové kuličky	3		-	
	Ořechové kuličky	1		-	
	Suk	2	1	Citrónovo kokosový	
			1	Jablečno kokosový	
Kmen	2	1	Jahodový s pistáciemi		
		1	Datlový		

Tabulka 7: Pečené cukroví z tržní sítě

Tržní síť				
Typ cukroví	Typ vzorku	Počet vzorků		Náplň
		Celkový	Podle náplně	
Pečené	Vanilkové rohlíčky	1		-
	Linecké cukroví	1		Marmeláda
	Čajové cukroví	1		Marmeláda
	Čajové cukroví s kakaem	2	1	Krém, čokoláda
			1	Krém

### 3.1.2 Přístroje

- Váhy BWL51 (Boeckel + Co (GmbH + Co), Hamburg, Německo)
- Kahan Fuego (WLD-TEC GmbH, Göttingen, Německo)
- Třepačka OS-20 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Odstředivka Z 233 M-2 (Herme laboratory technic, GmbH, Wehinger, Německo)
- Inkubátor v suché lázni MD-01 (Major Science, USA)
- Vortex MS1 Minishaker (IKA<sup>®</sup> Works, Inc., Wilmington NC, USA)
- Automatické mikropipety
- Termocykler PTC-200 (MJ Research, Inc., Watertown, Massachusetts, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu MP-300 N (Major Science, USA)
- UV transluminátor MUVB-15 (Ultra-Lüm, Inc., Claremont, USA)

### 3.1.3 Pomůcky

- Jednorázové sterilní pomůcky
- Plastové laboratorní pomůcky
- Standardní laboratorní sklo
- Nůžky
- Pinzety
- Sterilní plastové sáčky s filtrem pro stomacher
- Mikrozkuřavky Eppendorf

### 3.1.4 Chemikálie a roztoky

- Ethanol (Penta s.r.o., Chrudim, Česká republika)
- Pufrovaná peptonová voda (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Indie)
- Fyziologický roztok (Penta s.r.o., Chrudim, Česká republika)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, Inc., St. Luis, Montana, USA) – zásobní roztok
- Agarosa (Serva Electrophoresis, GmbH, Heidelberg, Německo)
- TBE pufr (Duchefa, Haarlem, Holandsko)

### 3.1.5 Kultivační média

Mezi tradiční metody detekce patří biochemické testy. Bakterie lze izolovat nanesením na selektivní, nebo diferenciální médium obsahující vaječný žloutek a mannitol. Aktivita lecitinázy se stanoví pozorováním. Na miskách s agarem vaječného žloutku je pozorována bílá sraženina, která obklopuje kolonie bakterie. U krevního agaru je pozorována hemolytická aktivita. Na takto připravených půdách je možné stanovit počet spor – porovnávají se bakteriální kolonie, které byly vystaveny tepelnému šoku s koloniemi, které nebyly vystaveny vysokým teplotám [5].

#### 3.1.5.1 Baird-Parker agar

Jedná se o agar, který slouží jako selektivní diagnostická půda pro izolaci, identifikaci a určení počtu koaguláza-pozitivních *Staphylococců* z potravin [44].



Obrázek 1: Připravený Baird-Parker agar [45]

Pyruvát sodný, který je obsažen v Baird-Parker agaru chrání poškozené buňky a napomáhá jejich zotavení, podporuje selektivitu média vůči *Staphylococcus aureus*. Teluričitan draselný způsobuje černé zbarvení kolonií koaguláza-pozitivních stafylokoků, které pozorujeme. Obsažený vaječný žloutek slouží k rozeznání lecitinázové aktivity, která je pozorována vznikem zóny projasnění kolem kolonií (viz obrázek 2). Zóny projasnění jsou typické pro koaguláza-pozitivní stafylokoky [44].



Obrázek 2: Směsná kultura - typické a atypické kolonie [45]

- Katalogové číslo M043
- pH se upravuje na 7,0 s možnou odchylkou 0,5 při 25 °C a sterilizuje se v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min

- Po sterilizaci se agar ochladí na 45–50 °C, asepticky bylo přidáno 25 ml žloutkové emulze s teluricitanem draselným (FD046 Egg Yolk Tellurite Emulsion).
- Připravený agar byl rozlit do Petriho misek [46].

### 3.1.5.2 Mannitol Yolk Polymyxin B agar

Jedná se o klasickou metodu používanou k identifikaci členů skupiny *B. cereus*. Zkráceně označován jako MYP se skládá z mannitolu, vaječného žloutku a polymyxinu. Jedná se o médium, které bylo doporučeno již v roce 1967 pro výčet skupiny *B. cereus* v potravinách [47].



Obrázek 3: Připravený Mannitol Yolk Polymyxine B agar [45]

Princip je založen na nedostatku mannitolu fermentace *B. cereus* a produkce lecitinázy většinou kmenů skupiny *B. cereus*. Antibiotikum polymyxin B je přidáván z důvodu zamezení kontaminace jinými mikroorganismy. Pozitivní kolonie se vyznačují růžovým zbarvením a jsou obklopeny projasněním [47].



Obrázek 4: Směsná kultura - *B. cereus* a mannitol pozitivní bakterie [45]

Příprava:

- Katalogové číslo M1139 – agarový základ, FD003 – selektivní suplement Polymyxin B, FD045 – žloutková emulze (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Indie).
- pH se upravuje na 7,1 s možnou odchylkou 0,2 při 25 °C a sterilizuje se v autoklávu při 21 °C, 15 minut.
- Po sterilizaci se agar vychladí na 55 °C, asepticky byly přidány 2 ml Polymyxinu B (koncentrace 100 jednotek v mililitru) a 50 ml sterilní žloutkové emulze.
- Takto připravený agar se rozmíchá a rozlévá do Petriho misek.



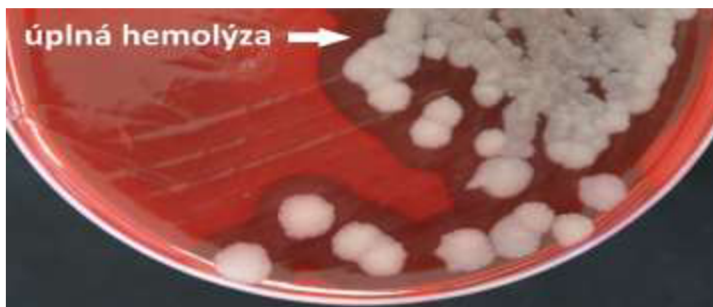
### 3.1.5.3 Krevní agar

Škrob obsažený v krevním agaru (KA) neutralizuje toxické metabolity, také slouží jako zdroj energie pro mikroorganismy, které produkují alfa amylázy. NaCl udržuje osmotickou rovnováhu. Krev je zdrojem růstového faktoru X (hemin), který je podstatný pro růst některých patogenních mikroorganismů [48].



Obrázek 5: Připravený krevní agar [45]

Pozitivní kolonie drsnými koloniemi šedé barvy, kolem kolonií se vyskytuje zóna  $\beta$ -hemolýzy.



Obrázek 6: Úplná hemolýza krevního agaru [45]

- Columbia Blood Agar 63784 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francie).
- Ready-to-use médium v Petriho miskách.

## 3.2 Metodika

### 3.2.1 Izolace *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus* ze vzorků vánočního cukroví

Z každého odebraného vzorku bylo odváženo 25 g, bylo přidáno 225 ml pufrované peptonové vody a provedena homogenizace na homogenizátoru peristaltického typu (stomacher). Vzniklý homogenát byl při teplotě 37 °C inkubován po dobu 16–20 hodin. Po provedeném pomnožení byly vzorky vyočkovány na živná média: Baird-Parker agar (B-P; *S. aureus*) a Mannitol Yolk Polymyxine B agar (*B. cereus*). Naočkované misky s MYP agarem byly inkubovány při teplotě 30 °C po dobu 24 h, V případě B-P proběhla inkubace při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Typické kolonie *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus* pro každý vzorek byly

subkultivovány, opět na totožných živných médiích, pro ověření čistoty izolátů. Následovala fenotypová confirmace (viz níže).

Suspektní izoláty *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus* byly archivovány v glycerolovém médiu a uchovávány při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Obrázek 7: Základní zpracování vzorků a přidavek pufrované peptonové vody



Obrázek 8: Archivace *Bacillus cereus* a příprava k izolaci DNA

### 3.2.2 Fenotypová konfirmace izolátů *Bacillus cereus*

Jako první fenotypový konfirmační test byl použit růst kmenů na MYP agaru. Suspektní kolonie vykazovaly růžové zbarvení (nevyužití mannitolu) a byly obklopeny růžovou zónou precipitace (produkce lecithinázy).



Obrázek 9: Suspektní kolonie *Bacillus cereus* na MYP

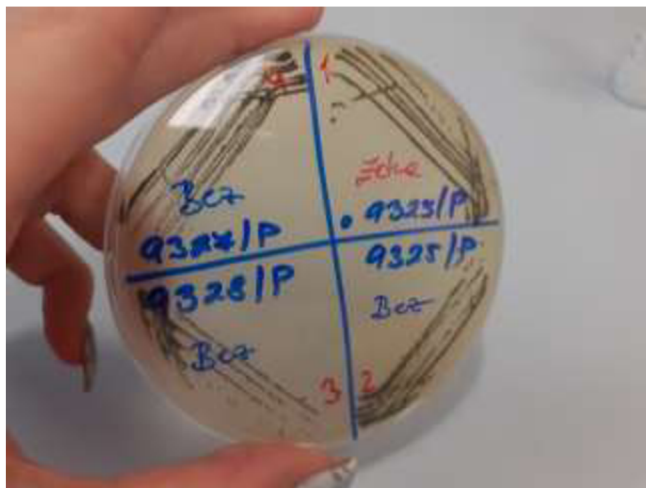
Druhým fenotypovým konfirmačním testem bylo hodnocení tvorby úplné hemolýzy na krevním agaru. Izoláty z MYP agaru byly rozočkovány sterilní bakteriologickou kličkou na krevní agar. Po inkubaci (30 °C, 24 h) byl pozorován vznik úplné hemolýzy ( $\beta$ -hemolýza).



Obrázek 10: Úplná hemolýza okolo kolonií *Bacillus cereus* na krevním agaru

### 3.2.3 Fenotypová confirmace izolátů *Staphylococcus aureus*

Suspektní kolonie koagulázopozitivních stafylokoků na Baird-Parker agaru vykazují černé zbarvení, které je způsobeno přítomným teluricitanem draselným. V některých případech byly pozorovány zóny projasnění kolem kolonií (lecitinázová aktivita). Ke confirmaci byly odebrány jak kolonie se zónou (typické kolonie), tak černé kolonie bez zóny projasnění (atypické kolonie).



Obrázek 11: Suspektní kolonie *Staphylococcus aureus* na Baird-Parker agaru

Základní confirmace spočívá v provedení aglutinačního testu (Staph Test Latex Reagent). Aglutinační test využívá latexové částice senzibilizované fibrinogenem králičí plazmy. Pokud má testovaný izolát stafylokoků vázanou koagulázu a/nebo protein A, dochází po smíchání s testovacím latexem k viditelnému shlukování (aglutinaci) [49].

Na testovací destičku byla nanесena jedna zhomogenizovaná kapka latexové reagentie a byla přidána testovaná kultura *S. aureus*. Kultura byla rozetřena v kapce reagentie tak, aby vzniklo mléčné zakalení. Kartička byla jemně naklápěna a směs byla přelévána po celé testovací oblasti. Do 2 minut bylo pozorováno, zda dochází k projasnění suspenze a vzniku bílých shluků [50].

### 3.2.4 Genotypová confirmace a charakterizace izolátů *Bacillus cereus*

Izolace bakteriální DNA byla provedena varem.

K přípravě suspenze buněk byla využita kultura bakteriálního kmene z krevního agaru. Sterilní bakteriologickou kličkou byla odebrána část kolonie, která byla uvolněna do mikrozkušavky Eppendorf s 1 ml sterilního fyziologického roztoku. Mikrozkušavky s bakteriální suspenzí byly odstředěny 10 minut při 11 000 rpm. Po odstředění byly supernatanty slity. K sedimentu v mikrozkušavce bylo přidáno 200  $\mu$ l fyziologického roztoku a následně byly zkušavky protřepány na vortexu, dokud nedošlo k uvolnění sedimentu do roztoku. Eppendorfy byly vloženy do suché lázně a zahřívány na teplotu přibližného varu, tedy 100 °C po dobu 20 min. Následně byly mikrozkušavky opět odstředěny po dobu 6 min při 12 000 rpm. Jako vzorek DNA byl využit supernatant.

### 3.2.4.1 Postup reakce PCR BC-01

Ke genotypové confirmaci izolátů *B. cereus* byla využita metoda polymerázové řetězové reakce. PCR bylo založeno na detekci genu *gyrB*, který kóduje podjednotku B DNA-gyrasy [51]. Metoda byla koncipována jako multiplex PCR, kdy současně docházelo k detekci genu kódujícího produkci neribozomální peptid syntetázy pro tvorbu emetického toxinu – cereulidu [52]. V tabulce 8 je uvedený přehled, včetně sekvencí, použitých primerů a inertní kontroly.

Tabulka 8: Přehled použitých primerů

Primer		Sekvence	Produkt [base pairs]	Zdroj
<i>gyrB</i>	BC1	5' – ATT GGT GAC ACC GAT CAA ACA – 3'	365 bp	[51]
	BC2	5' – TCA TAC GTA TGG ATG TTA TTC – 3'		
NRPS	CER1	5' – ATC ATA AAG GTG CGA ACA AGA – 3'	188 bp	[52]
	CER2	5' – AAG ATC AAC CGA ATG CAA CTG – 3'		
16SrRNA	InKo1	5' – GGA GGA AGG TGG GGA TGA CG – 3'	241 bp	[53]
	InKo2	5' – ATG GTG TGA CGG GCG GTG TG – 3'		

Amplifikace (program BCEM-CER) probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace 95 °C / 10 minut, vlastní amplifikace 30 cyklů (denaturace 94 °C / 1 minuta, annealing 54 °C / 1 minuta a extenze 72 °C / 1 minuta), závěrečná extenze 72 °C / 5 minut. Následně probíhalo chlazení při 4 °C po dobu 2 hodin. Získané produkty byly analyzovány gelovou elektroforézou v 2 % agarózovém gelu, při podmínkách 100 V / 90 mA / 45 min. Následně bylo provedeno barvení pomocí roztoku ethidium bromid a vizualizace oranžové fluorescence pod UV lampou. Gen *gyrB* byl detekován jako produkt o velikosti 365 bp. Při negativní reakci byl pozorován pouze produkt o velikosti 241 bp, který odpovídá interní kontrole. Gen pro emetický toxin byl detekován jako produkt o velikosti 188 bp.

Tabulka 9: Komponenty pro přípravu reakční směsi – reakce PCR BC-01

Reakční směs		
Objem [μl]		Výrobce
12,50	PPP Master Mix	Top-Bio s.r.o., Praha, ČR
7,00	PCR H <sub>2</sub> O	
1,00	Primer BC1	GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové, ČR
1,00	Primer BC2	
0,50	Primer CER1	
0,50	Primer CER2	
0,25	Primer InKo1	
0,25	Primer InKo2	
2,00	DNA templát	/
<b>Celkový objem [μl]</b>	25,00	

Vyhodnocení gelové elektroforézy – metody PCR BC 01 je popsáno na obrázku 12.



365 bp – *Bacillus cereus* (druhová identifikace); gen – *gyrB*  
 241 bp – interní kontrola  
 188 bp – emetický toxin, gen – *cer*

[doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.]

Obrázek 12: Vyhodnocení gelové elektroforézy PCR BC 01

(13) nepotvrzený *B. cereus* – jablečný kokosový suk, (14) potvrzený *B. cereus* – kokosky, (15) potvrzený *B. cereus* s genem pro emetický toxin – moca, (16) DNA marker 970-155 (Top-Bio s.r.o., Praha, ČR)

### 3.2.4.2 Postup reakce PCR BC-02

Ke genotypové confirmaci izolátů *B. cereus* byla využita metoda polymerázové řetězové reakce. PCR bylo založeno na detekci genů kódujících produkci vybraných komponentů hemolyzinu BL. Jednalo se o geny *hblA* (komponent B) a *hblC* (komponent L2). V tabulce 10 je uvedený přehled použitých primerů včetně jejich sekvencí.

Tabulka 10: Přehled použitých primerů

Primer		Sekvence	Produkt [base pairs]	Zdroj
<i>hblA</i>	HBLA1	5' – GCT AAT GTA GTT TCA CCT GTA GCA AC - 3'	873 bp	[54]
	HBLA2	5' – AAT CAT GCC ACT GCG TGG ACA TAT AA - 3'		
<i>hblC</i>	HBLC-N	5' – AAT AGG TAC AGA TGG AAC AGG – 3'	399	
	HBLC-C	5' – GGC TTT CAT CAG GTC ATA CTC – 3'		

Amplifikace (program BCTOX1) probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace 94 °C / 4 minuty, vlastní amplifikace 36 cyklů (denaturace 94 °C / ½ minuty, annealing 62,5 °C / 1 minuta a extenze 72 °C / 1 minuta), závěrečná extenze 72 °C / 7 minut.

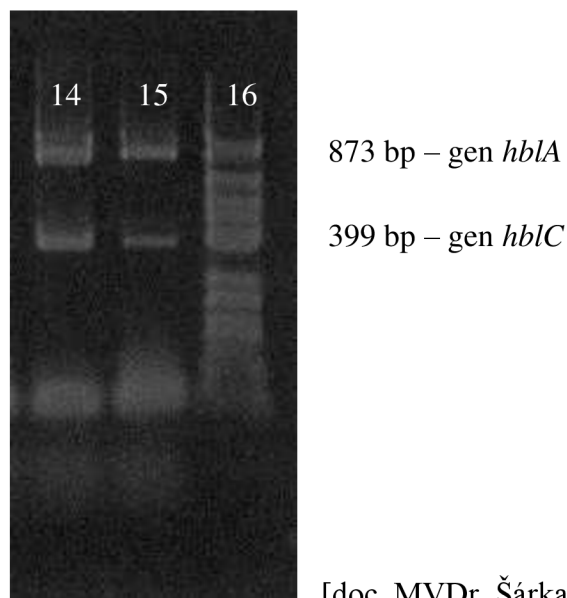
Následně probíhalo chlazení při 4 °C podobu 1 hodiny. Získané produkty byly analyzovány gelovou elektroforézou za přítomnosti 2 % agarózového gelu, při podmínkách 120 V / 90 mA / 45 min. Následně bylo provedeno barvení pomocí roztoku ethidium bromid a vizualizace fluorescence pod UV lampou. Gen *hblA* byl detekován jako produkt o velikosti 873 bp. Gen *hblC* byl detekován jako produkt o velikosti 399 bp.

Pro tento postup byla připravena reakční směs o složení, které je uvedeno v tabulce 11.

Tabulka 11: Komponenty pro přípravu reakční směsi – postup PCR BC-02

Reakční směs		
Objem [μl]		Výrobce
12,5	PPP Master Mix	Top-Bio s.r.o., Praha, ČR
8,5	PCR H <sub>2</sub> O	
0,4	Primer HBLA1	GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové, ČR
0,4	Primer HBLA2	
0,6	Primer HBLC-N	
0,6	Primer HBLC-C	
2,0	DNA templát	/
<b>Celkový objem [μl]</b>	25,0	

Vyhodnocení gelové elektroforézy – metody PCR BC 02 je vysvětleno na následujícím obrázku 13.



Obrázek 13: Vyhodnocení gelové elektroforézy PCR BC 02

(14) *B. cereus* – *hblA*, *hblC* – vanilkové rohlíčky, (15) *B. cereus* – *hblA*, *hblC* – košíček s čokoládou, (16) DNA marker 970-155 (Top-Bio s.r.o., Praha, ČR)

### 3.2.4.3 Postup reakce PCR BC-03

Ke genotypové confirmaci izolátů *B. cereus* byla využita metoda polymerázové řetězové reakce. PCR bylo založeno na detekci genů kódujících produkci komplexu nehemolytických enterotoxinů bakterie *B. cereus*. Jednalo se o geny *nheA* (komponent A) a *nheC* (komponent C). V tabulce 12 je uvedený přehled použitých primerů včetně jejich sekvencí.

Tabulka 12: Přehled použitých primerů

Primer		Sekvence	Produkt [base pairs]	Zdroj
<i>nheA</i>	nheA344S	5' – TAC GCT AAG GAG GGG CA – 3'	499 bp	[55]
	nheA843A	5' – GTT TTT ATT GCT TCA TCG GCT – 3'		
<i>nheC</i>	NCF	5' – TGG ATT CCA AGA TGT AAC G – 3'	683 bp	[56]
	NCR	5' – ATT ACG ACT TCT GCT TGT GC – 3'		

Amplifikace (program BC-TOX2) probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace 94 °C /2 minuty, vlastní amplifikace 35 cyklů (denaturace 94 °C /1 minuta, annealing 54 °C /1 minuta a extenze 72 °C /2 minuty), závěrečná extenze 72 °C /5 minut. Následně probíhalo chlazení při 4 °C podobu 1 hodiny. Získané produkty byly analyzovány gelovou elektroforézou za přítomnosti 2 % agaróзовého gelu, při podmínkách 120 V / 90 mA / 45 min. Následně bylo provedeno barvení pomocí roztoku ethidium bromid a vizualizace fluorescence pod UV lampou. Gen *nheC* byl detekován jako produkt o velikosti 683 bp. Gen *nheA* byl detekován jako produkt o velikosti 499 bp.

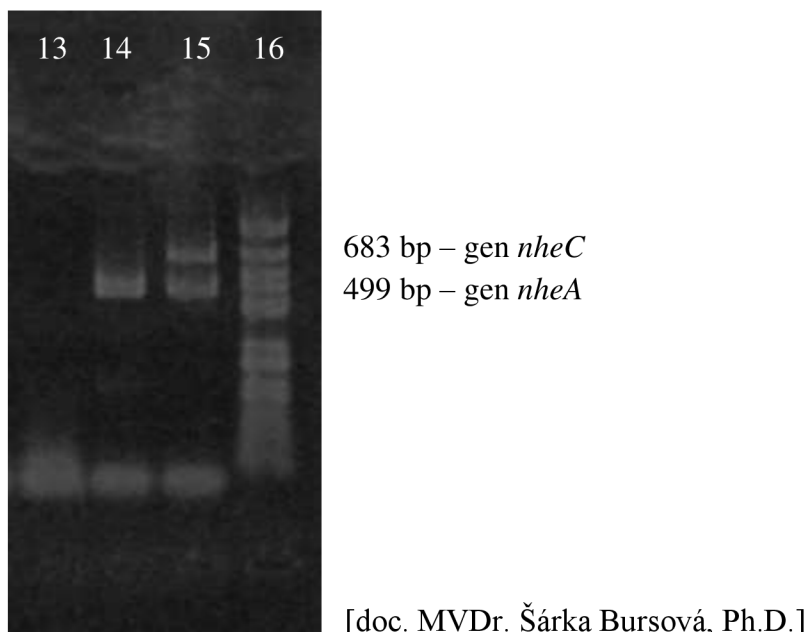
Pro tento postup byla připravena reakční směs o složení, které je uvedeno v tabulce 13.

Tabulka 13: Komponenty pro přípravu reakční směsi – postup PCR BC-03

Reakční směs		
Objem [μl]		Výrobce
12,5	PPP Master Mix	Top-Bio s.r.o., Praha, ČR
8,5	PCR H2O	
0,5	Primer <i>nheA344S</i>	GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové, ČR
0,5	Primer <i>nheA843A</i>	
0,5	Primer NCF	
0,5	Primer NCR	
2,0	DNA templát	/
<b>Celkový objem [μl]</b>	25,0	

Vyhodnocení gelové elektroforézy – PCR BC 03 je zobrazeno na následujícím obrázku 14.





Obrázek 14: Vyhodnocení gelové elektroforézy PCR BC 03

(13) nepotvrzený *B. cereus* – jablečný kokosový suk, (14) *B. cereus* – *nheA* – kokosky, (15) *B. cereus* – *nheA*, *nheC* – moca, (16) DNA marker 970-155 (Top-Bio s.r.o., Praha, ČR)

#### 3.2.4.4 Postup reakce PCR BC-04

Ke genotypové confirmaci izolátů *B. cereus* byla využita metoda polymerázové řetězové reakce. PCR bylo založeno na detekci genů *nheB* (komponent B komplexu nehemolytických enterotoxinů) a *hblD* (komponent L<sub>1</sub> hemolyzinu). V tabulce 14 je uvedený přehled použitých primerů včetně jejich sekvencí.

Tabulka 14: Přehled použitých primerů

Primer		Sekvence	Produkt [base pairs]	Zdroj
nheB	NBF	5' – TTT AGT AGT GGA TCT GTA CGC – 3'	743 bp	[56]
	NBR	5' – TTA ATG TTC GTT AAT CCT GC – 3'		
hblD	HBLD-N	5' – AAT CAA GAG CTG TCA CGA AT – 3'	439 bp	[54]
	HBLD-C	5' – CAC CAA TTG ACC ATG CTA AT – 3'		

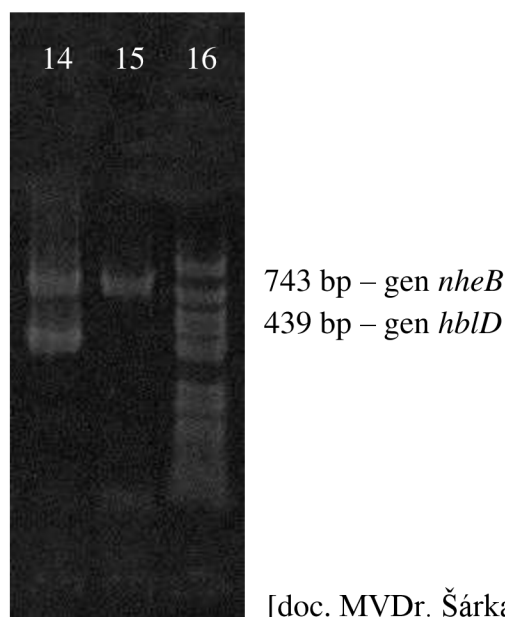
Amplifikace (program BC-TOX2) probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace 94 °C /2 minuty, vlastní amplifikace 35 cyklů (denaturace 94 °C /1 minuta, annealing 54 °C /1 minuta a extenze 72 °C /2 minuty), závěrečná extenze 72 °C /5 minut. Následně probíhalo chlazení při 4 °C podobu 1 hodiny. Získané produkty byly analyzovány gelovou elektroforézou za přítomnosti 2 % agarózového gelu, při podmínkách 120 V / 90 mA / 45 min. Následně bylo provedeno barvení pomocí roztoku ethidium bromid a vizualizace fluorescence pod UV lampou. Gen *nheB* byl detekován jako produkt o velikosti 743 bp. Gen *hblD* byl detekován jako produkt o velikosti 439 bp.

Pro tento postup byla připravena reakční směs o složení, které je uvedeno v tabulce 15.

Tabulka 15: Komponenty pro přípravu reakční směsi – postup PCR BC-04

Reakční směs		
Objem [μl]		Výrobce
12,5	PPP Master Mix	Top-Bio s.r.o., Praha, ČR
8,5	PCR H <sub>2</sub> O	
0,5	Primer NBF	GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové, ČR
0,5	Primer NBR	
0,5	Primer HBDL-N	
0,5	Primer HBLD-C	
2,0	DNA templát	/
<b>Celkový objem [μl]</b>	25,0	

Vyhodnocení gelové elektroforézy – PCR BC 04 je uvedeno na obrázku 15.



Obrázek 15: Vyhodnocení gelové elektroforézy PCR BC 04

(14) *B. cereus* – *nheB*, *hblD* – kokosky, (15) *B. cereus* – *nheB* – moca, (16) DNA marker 970-155 (Top-Bio s.r.o., Praha, ČR)

### 3.2.5 Genotypová konfirmace a charakterizace izolátů *Staphylococcus aureus*

#### 3.2.5.1 Postup reakce PCR MRSA

Ke genotypové konfirmaci izolátů *S. aureus* byla využita metoda polymerázové řetězové reakce. PCR bylo založeno na detekci genu SA a *mecA*. Použité primery jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16: Přehled použitých primerů

Primer		Sekvence	Produkt [base pairs]	Zdroj
SA	442-1	5' – AAT CCT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG – 3'	108 bp	[57]
	442-2	5' – CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA – 3'		
<i>mecA</i>	P4	5' – TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G – 3'	162 bp	[58]
	P7	5' – CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG – 3'		
16SrRNA	InKo1	5' – GGA GGA AGG TGG GGA TGA CG – 3'	241 bp	[53]
	InKo2	5' – ATG GTG TGA CGG GCG GTG TG – 3'		

Amplifikace (program MRSA) probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace 94 °C / 5 minut, vlastní amplifikace 30 cyklů (denaturace 94 °C / 0,5 minuty, annealing 59 °C / 1 minuta a extenze 72 °C / 1 minuta), závěrečná extenze 72 °C / 10 minut. Získané produkty byly analyzovány gelovou elektroforézou v 2 % agarózovém gelu, při podmínkách 120 V / 40 min. Následně bylo provedeno barvení pomocí roztoku ethidium bromid a vizualizace fluorescence pod UV lampou. Gen *SA* byl detekován jako produkt o velikosti 108 bp. Při negativní reakci byl pozorován pouze produkt o velikosti 241 bp, který odpovídá interní kontrole. Gen *mecA* byl detekován jako produkt o velikosti 162 bp.

Pro tento postup byla připravena reakční směs o složení, které je uvedeno v tabulce 17.

Tabulka 17: Komponenty pro přípravu reakční směsi – metoda MRSA

Reakční směs		
Objem [μl]		Výrobce
12,50	PPP Master Mix	Top-Bio s.r.o., Praha, ČR
6,00	PCR H <sub>2</sub> O	
1,00	Primer SA 442-1	GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové, ČR
1,00	Primer SA 442-2	
1,00	Primer <i>mecA</i> P4	
1,00	Primer <i>mecA</i> P7	
0,25	Primer InKo1	
0,25	Primer InKo2	
2,00	DNA templát	
<b>Celkový objem [μl]</b>	25,00	

### 3.2.5.2 Postup reakce PCR SESI

Ke genotypové konfirmaci izolátů *S. aureus* byla využita metoda polymerázové řetězové reakce. PCR bylo založeno na detekci genů *sed*, *see*, *seg*, *seh* a *sei*.

Tabulka 18: Přehled použitých primerů

Primer		Sekvence	Produkt [base pairs]	Zdroj
<i>Sed</i>	1	5' – GTG GTG AAA TAG ATA GGA CTG C – 3'	384 bp	[59]
	2	5' – ATA TGA AGG TGC TCT GTG G – 3'		
<i>See</i>	1	5' – TAC CAA TTA ACT TGT GGA TAG AC – 3'	170 bp	
	2	5' – CTC TTT GCA CCT TAC CGC – 3'		
<i>Seg</i>	1	5' – CGT CTC CAC CTG TTG AAG G – 3'	327 bp	
	2	5' – CCA AGT GAT TGT CTA TTG TCG – 3'		
<i>Seh</i>	1	5' – CAA CTG CTG ATT TAG CTC AG – 3'	360 bp	
	2	5' – GTC GAA TGA GTA ATC TCT AGG – 3'		
<i>Sei</i>	1	5' – CAA CTC GAA TTT TCA ACA GGT AC – 3'	465 bp	
	2	5' – CAG GCA GTC CAT CTC CTG – 3'		

Amplifikace (program SES1) probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace 95 °C / 10 minut, vlastní amplifikace 15 cyklů (denaturace 95 °C / 1 minuta, annealing 64 °C / 45 sekund a extenze 72 °C / 1 minuta) a 20 cyklů (denaturace 95 °C / 1 minuta, annealing 56 °C / 45 sekund a extenze 72 °C / 1 minuta), závěrečná extenze 72 °C / 10 minut. Získané produkty byly analyzovány gelovou elektroforézou v 2 % agarózovém gelu, při podmínkách 120 V / 40 min. Následně bylo provedeno barvení pomocí roztoku ethidium bromid a vizualizace fluorescence pod UV lampou. Geny byly detekovány jako produkty o určité velikosti, které jsou popsány v tabulce 18.

Pro tento postup byla připravena reakční směs o složení, které je uvedeno v tabulce 19.

Tabulka 19: Komponenty pro přípravu reakční směsi – metoda SES1

Reakční směs		
Objem [μl]		Výrobce
10,00	QIAGEN Multiplex	Oiagen, Hilden, Germany
5,50	PCR H2O	Top-Bio s.r.o., Praha, ČR
0,75	Všechny primery	GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové, ČR
2,00	DNA templát	/
<b>Celkový objem [μl]</b>	25,0	

### 3.2.5.3 Postup reakce PCR SES2

PCR bylo založeno na detekci genů *sea*, *seb-sec*, *sec*, *seh* a *sej*.

Tabulka 20: Přehled použitých primerů

Primer		Sekvence	Produkt [base pairs]	Zdroj
sea	1	5' – GCA GGG AAC AGC TTT AGG C – 3'	520 bp	[59]
	2	5' – GTT CTG TAG AAG TAT GAA ACA CG – 3'		
seb-sec	1	5' – ACA TGT AAT TTT GAT ATT CGC ACT G – 3'	667 bp	
	2	5' – TGC AGG CAT CAT GTC ATA CCA – 3'		
sec	1	5' – CTT GTA TGT ATG GAG GAA TAA CAA – 3'	283 bp	
	2	5' – TGC AGG CAT CAT ATC ATA CCA – 3'		
seh	1	5' – CAA CTG CTG ATT TAG CTC AG – 3'	360 bp	
	2	5' – GTC GAA TGA GTA ATC TCT AGG – 3'		
sej	1	5' – CAT CAG AAC TGT TGT TCC GCT AG – 3'	142 bp	
	2	5' – CTG AAT TTT ACC ATC AAA GGT AC – 3'		

Amplifikace (program SES2) probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace 95 °C / 10 minut, vlastní amplifikace 15 cyklů (denaturace 95 °C / 1 minuta, annealing 68 °C / 45 sekund a extenze 72 °C / 1 minuta) a 20 cyklů (denaturace 95 °C / 1 minuta, annealing 60 °C / 45 sekund a extenze 72 °C / 1 minuta), závěrečná extenze 72 °C / 10 minut. Získané produkty byly analyzovány gelovou elektroforézou v 2 % agarózovém gelu, při podmínkách 120 V / 40 min. Následně bylo provedeno barvení pomocí roztoku ethidium bromid a vizualizace fluorescence pod UV lampou. Geny byly detekovány jako produkty o určité velikosti, které jsou popsány v tabulce 20.

Pro tento postup byla připravena reakční směs o složení, které je uvedeno v tabulce 21.

Tabulka 21: Komponenty pro přípravu reakční směsi – metoda SES2

Reakční směs		
Objem [μl]		Výrobce
10,00	QIAGEN Multiplex	Oiagen, Hilden, Germany
5,50	PCR H2O	Top-Bio s.r.o., Praha, ČR
0,75	Všechny primery	GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové, ČR
2,00	DNA templát	/
<b>Celkový objem [μl]</b>	25,0	

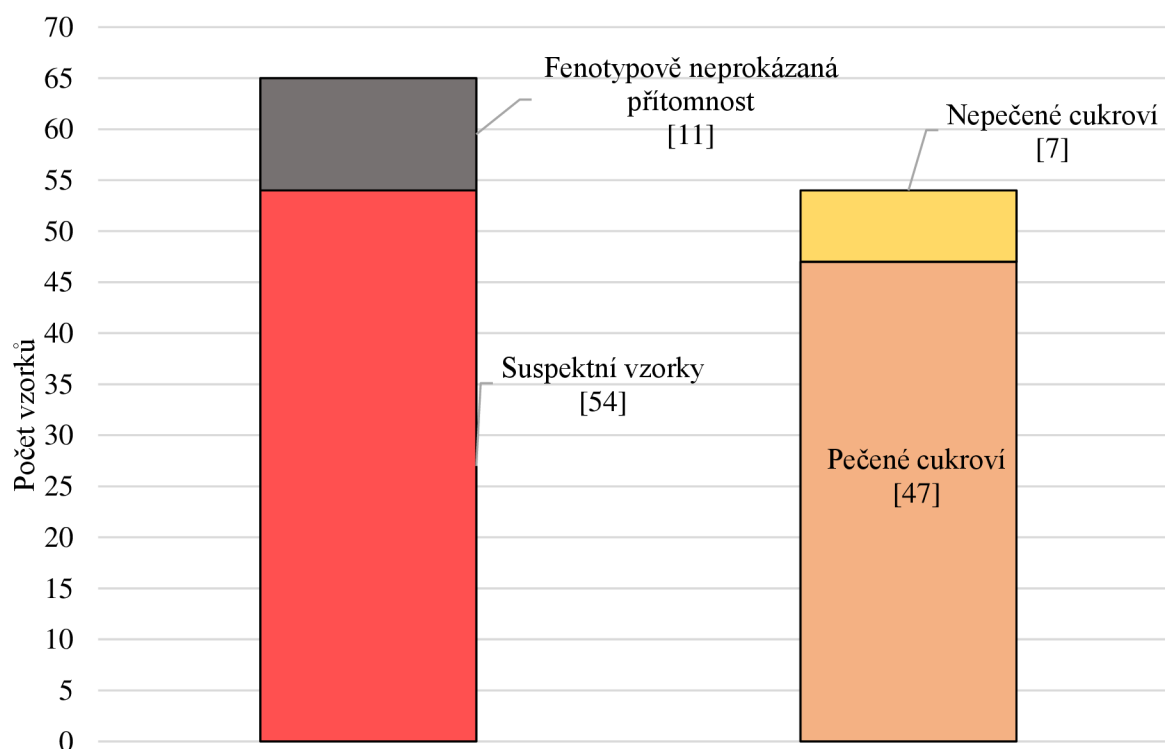
## 4 Výsledky a diskuse

V první části práce jsme se zaměřily na zhodnocení výskytu sledovaných bakterií ze vzorků vánočního cukroví. Vzorky byly zpracovány kultivačními metodami. Kvalitativní stanovení bylo zaměřeno na průkaz přítomnosti nebo absence bakterie *B. cereus* a *S. aureus* v navážených vzorcích.

V druhé části jsme se zaměřily na genotypovou identifikaci a typizaci suspektních izolátů *B. cereus* a *S. aureus* pomocí metody polymerázové řetězové reakce.

### 4.1 Výskyt bakterie *Bacillus cereus*

Z celkového počtu 65 vzorků byly suspektní izoláty *B. cereus* zachyceny u 54 vzorků (tj. 83 %). *B. cereus* nebyl fenotypově prokázán u 11 vzorků vánočního cukroví (tj. 17 %). Z 54 suspektních vzorků je 47 vzorků pečených (tj. 87 % z celkového počtu pečeného cukroví) a 7 nepečených vzorků (tj. 64 % z celkového počtu nepečeného cukroví). Celkem bylo získáno 62 fenotypově suspektních izolátů. Vyhodnocení výskytu a zastoupení můžeme pozorovat v grafu 1.



Graf 1: Výskyt *B. cereus* ve vzorcích vánočního cukroví, zastoupení pečeného a nepečeného cukroví

V tabulce 22 můžeme pozorovat, že z celkového počtu 65 odebraných vzorků (tj. 100 %) je 54 vzorků pečených (tj. 83 % z celkového počtu odebraných vzorků) a 11 vzorků nepečených (tj. 17 % z celkového počtu odebraných vzorků).

Z těchto dat vyplývá, že i přesto, že cukroví bylo tepelně zpracováno, bakterie *B. cereus* může těmto vysokým teplotám odolat (tento závěr však není úplně přesný, dalšími faktory pro vnesení bakterie je další podíl ruční práce po upečení vzorku – náplně, zdobení, slazení a podobně).

Z celkového počtu 54 fenotypově pozitivních vzorků je 32 vzorků, které dále po upečení (21 ks) nebo pouze po ruční přípravě za studena (11 ks) podlehly dalšímu kontaktu s rukama cukráře.

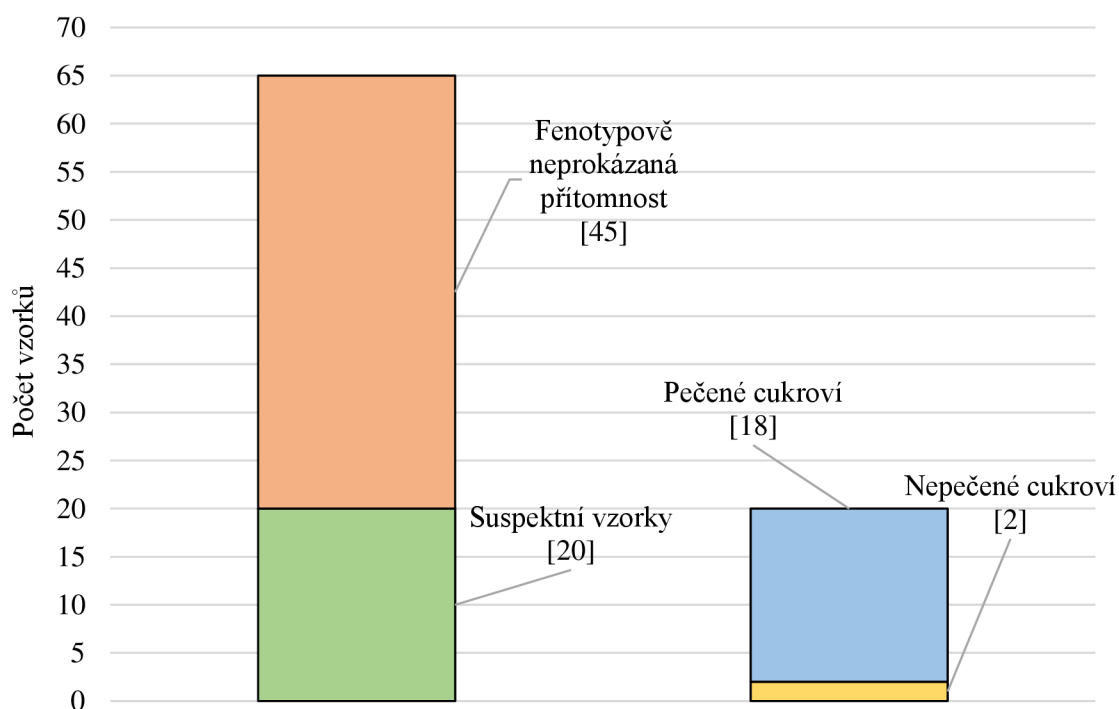
Tabulka 22: Srovnání zastoupení pečených a nepečených vzorků

Vzorky	Odebrané		Suspektní	
Počet	65 (100 %)		54 (83 %)	
Typ cukroví	Pečené	Nepečené	Pečené	Nepečené
Počet	54 (83 %)	11 (17 %)	47 (87 %)	7 (64 %)

#### 4.2 Výskyt bakterie *Staphylococcus aureus*

Obdobně jako u bakterie *B. cereus* jsme se v první části praktické práce zaměřily na zhodnocení počtu pozitivních vzorků testovaného vánočního cukroví. Z celkového počtu 65 vzorků bylo vyhodnoceno 20 vzorků jako podezřelých na přítomnost *S. aureus* (tj. 31 %) (viz graf 2). Celkem bylo získáno 22 fenotypově suspektních izolátů.

Z celkového počtu fenotypově suspektních vzorků (tj. 20 vzorků) je 18 vzorků pečených a 2 nepečené.



Graf 2: Výskyt *S. aureus* ve vzorcích vánočního cukroví, zastoupení pečeného a nepečeného cukroví

V porovnání s procentuálním zastoupením přítomnosti bakterie *B. cereus* a *S. aureus* můžeme říct, že bakterie *S. aureus* se vyskytuje ve vánočním cukroví v mnohem menším množství než právě zmíněná bakterie *B. cereus*.

Z celkového počtu 20 podezřelých vzorků bylo 19 vzorků vánočního cukroví dále zpracováváno (další vliv ruční práce a možné kontaminace).

Tabulka 23: Srovnání zastoupení pečených a nepečených vzorků

Vzorky	Odebrané		Suspektní	
Počet	65 (100 %)		20 (31 %)	
Typ cukroví	Pečené	Nepečené	Pečené	Nepečené
Počet	54 (83 %)	11 (17 %)	18 (33 %)	2 (18 %)

### 4.3 Genotypová confirmace bakterie *Bacillus cereus*

U získaných fenotypově suspektních izolátů byla provedena genotypová confirmace. Pouze u 8 vzorků (tj. 15 %) z celkového počtu 54 vzorků nebyla metodou PCR potvrzena přítomnost bakterie *B. cereus*.

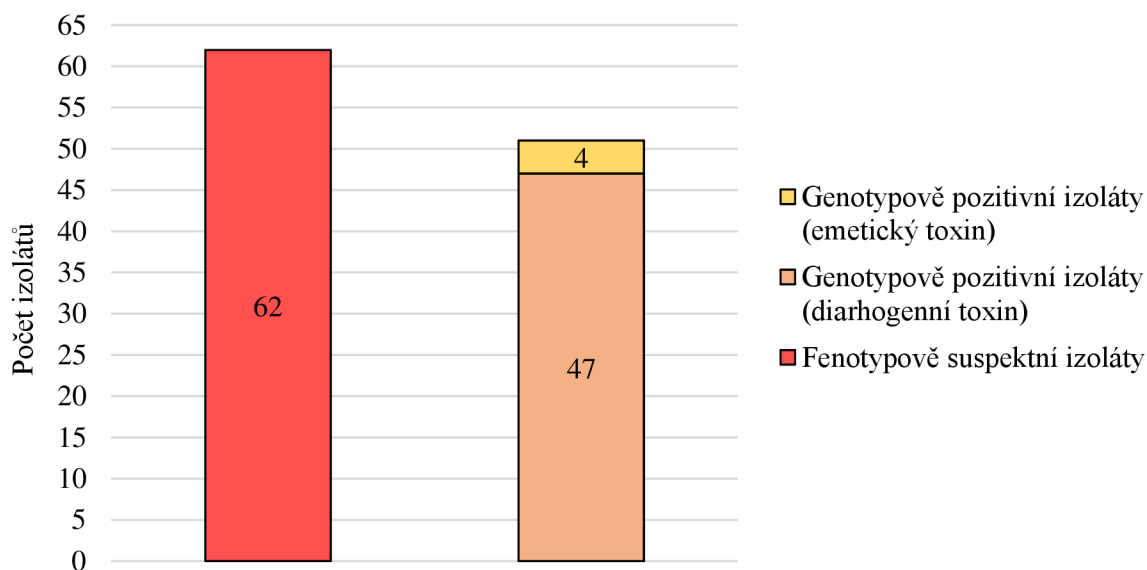
V následujícím grafu 3 můžeme pozorovat, že z 62 fenotypově suspektních izolátů (izolovaných z 54 vzorků) byla genotypově stanovena bakterie *B. cereus* u 51 izolátů, tedy u 82 % (tj. 46 vzorků). Na základě genotypové confirmace lze konstatovat, že pozitivních na výskyt bakterie *B. cereus* bylo 71 % testovaných vzorků.

Emetický toxin byl prokázán u 4 izolátů, zbylých 47 izolátů bylo určeno jako diarhogenní.

Pro maximální aktivitu hemolyzinu BL a nehemolytického toxinu je nutné, aby měl daný kmen geny pro produkci všech tří podjednotek. Pro produkci hemolyzinu BL se jedná o geny *hblA*, *hblC* a *hblD*. Pro produkci nehemolytických toxinů hovoříme o genech *nheA*, *nheB* a *nheC*. U všech emetických kmenů byla současně detekována i přítomnost všech 3 genů pro tvorbu Nhe (*nheA-nheC*). U 33 diarhogenních kmenů byla pozorována přítomnost genů pro tvorbu Hbl i Nhe, 14 kmenů vykazovalo pouze přítomnost genů pro tvorbu Nhe (z toho 6 kmenů obsahovalo geny *nheA-nheC*, u zbylých 8 kmenů některý z genů chyběl).

Zdrojem spor *B. cereus* může být mimo jiné mouka [62]. Ze stanovených výsledků můžu tuto skutečnost potvrdit. Mouka je u většiny cukroví hlavní surovinou, pokud je tedy kontaminována spory, může být zdrojem toxigenních kmenů *B. cereus*.

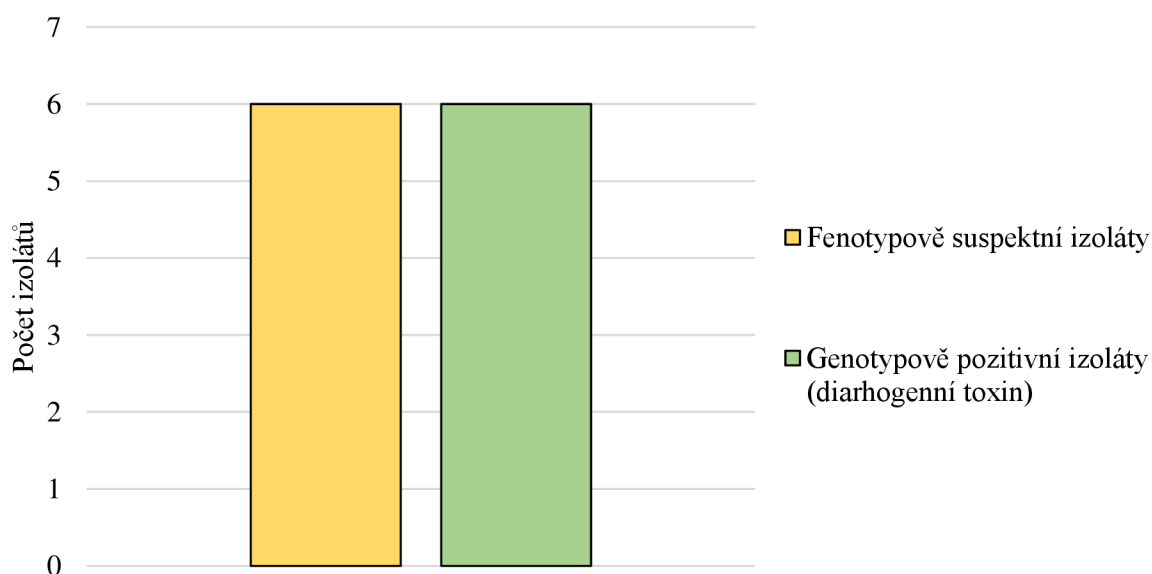




Graf 3: Zastoupení genotypově pozitivních izolátů s emetickým a diarhogenním toxinem z celkového počtu fenotypově suspektních izolátů

V grafu 4 je uvedena četnost výskytu bakterie *B. cereus* u vánočního cukroví, které bylo získáno z tržní sítě, kdy veškeré cukroví bylo tepelně zpracováno. V grafu můžeme vidět, že veškeré odebrané vzorky byly kontaminovány bakterií *B. cereus*.

U 4 diarhogenních kmenů byly pozorovány geny pro tvorbu Hbl i Nhe, u zbylých 2 kmenů byly pozorovány některé geny *nheA-nheC*.

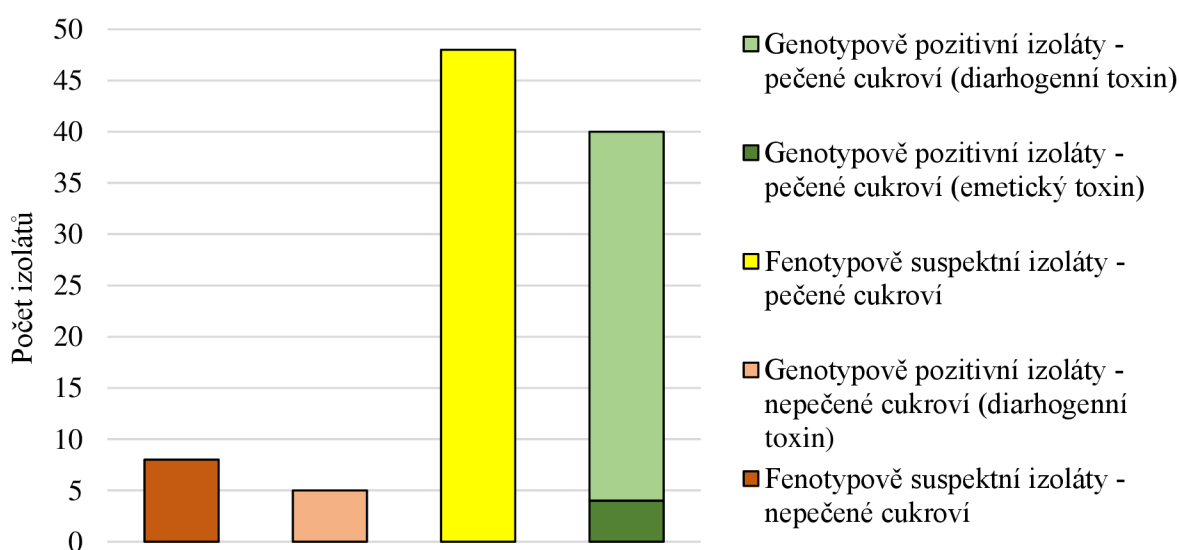


Graf 4: Zastoupení genotypově pozitivních izolátů ze získaných fenotypově suspektních izolátů z komerčně dostupné tržní sítě

V grafu 5 je znázorněna shoda fenotypové a genotypové confirmace u získaných izolátů *B. cereus* (n = 62).

U nepečeného cukroví bylo z 8 fenotypově suspektních izolátů genotypově potvrzeno 5 z nich. Vždy se jednalo o bakterii *B. cereus* s přítomným diarhogenním toxinem. U 2 kmenů byly prokázány geny pro tvorbu Hbl i Nhe, u zbývajících 3 kmeny byly prokázány pouze geny pro tvorbu Nhe (1 kmen obsahoval všechny tři geny *nheA-nheC*, zbývajících 2 kmeny neobsahovaly jeden gen z řady *nheA-nheC*).

V případě domácího pečeného vánočního cukroví bylo fenotypově suspektních 48 izolátů, z toho 40 izolátů (tj. 83 %) bylo genotypově potvrzeno. Přítomnost genu pro produkci emetického toxinu byla potvrzena u 4 izolátů, a to současně s geny *nheA-nheC*. Zbýlých 36 izolátů bylo diarhogenních, z toho u 27 izolátů byly současně detekovány geny pro produkci Nhe i Hbl. 9 izolátů neslo geny pouze pro produkci Nhe, u 5 z nich byly detekovány všechny tři sledované geny *nheA-nheC*.



Graf 5: Zastoupení genotypově pozitivních izolátů ze získaných fenotypově suspektních izolátů z domácích výrobků – pečené i nepečené cukroví

#### 4.4 Genotypová confirmace bakterie *Staphylococcus aureus*

Genotypová confirmace byla provedena u fenotypově suspektních izolátů. Z celkového počtu 22 suspektních izolátů byla metodou PCR bakterie *S. aureus* potvrzena pouze u 4 izolátů (tj. 18 %). Všechny vzorky s prokázanou přítomností této bakterie byly vzorky pečené, které byly po upečení opět ručně zpracovávány – promazávány, obalovány v cukru. Nejvíce zastoupené cukroví s přítomností bakterie *S. aureus* bylo linecké cukroví, jednalo se o 2 vzorky, dále se jednalo o ořechové hvězdičky s marmeládou a vanilkové rohlíčky.

U pozitivních izolátů byla dále stanovena přítomnost genů kódujících produkci stafylokokových enterotoxinů. Pouze u jednoho vzorku z lineckého cukroví, byly stanoveny geny *sea* a *seg*, ostatní 3 izoláty byly vyhodnoceny jako netoxigenní.

Zajímavým zjištěním je skutečnost, že ze všech vzorků s potvrzeným výskytem *S. aureus* byly současně izolovány také enterotoxigenní kmeny *B. cereus* nesoucí geny pro produkci enterotoxinů Hbl a Nhe.

Celkem bylo odebráno 5 vzorků vánočního cukroví z tržní sítě, narozdíl od bakterie *B. cereus*, která byla prokázána u všech vzorků, *S. aureus* nebyl prokázán u žádného vzorku.

Pouze u jednoho izolátu byly detekovány geny pro tvorbu stafylokokových enterotoxinů, konkrétně se jednalo o geny *seA* a *seG*. Z celkového počtu 65 vzorků hovoříme o prevalenci 1,5 %.

Na výskyt bakterií *S. aureus* v pekařských a cukrářských výrobcích poukazuje řada studií. Například v Turecku byly enterotoxigenní kmeny *S. aureus* izolovány u 0,32 % z celkového počtu 309 cukrovinek, medu a pekařských výrobků, jednalo se o kmeny produkující enterotoxin SED [61].

Naproti tomu v další studii nebyla u 65 vzorků (jednalo se o suroviny potřebné pro výrobu cukrářských výrobků jako cukr, mouka, máslo, vejce, korpusy, krémy) přítomnost *S. aureus* prokázána [62].

Z našich výsledků jednoznačně vyplývá, že výskyt *S. aureus* v drobných kusových cukrářských výrobcích není příliš častý. Vzhledem k tomu, že se ve všech případech jednalo o pečené výrobky lze předpokládat, že hlavním zdrojem kontaminace byla následná manipulace s výrobky po upečení. V souvislosti s potvrzeným výskytem toxigenního kmene lze usuzovat, že i tyto výrobky mohou představovat za určitých okolností potenciální riziko pro konzumenty.

## 5 Závěr

*Staphylococcus aureus* je přirozeným mikroorganismem lidského a zvířecího těla. Často bývá spojován s infekcemi, které mohou mít u nemocných osob fatální následky. Za rizikové, s ohledem na možný vznik alimentární intoxikace, jsou považovány mimo jiné výrobky s vysokým podílem ruční práce.

Z 65 vyšetřených vzorků vánočního cukroví byly u cca třetiny z nich (31 %) detekovány fenotypově suspektní izoláty *S. aureus*. Genotypově byl však výskyt *S. aureus* potvrzen pouze u 4 vzorků, ve všech případech se jednalo o vzorky pečeného, ale následně upravovaného cukroví. Z jednoho vzorku byl izolován toxigenní kmen nesoucí geny pro tvorbu stafylokokového enterotoxinu typu A a G.

*B. cereus* je často izolován z různých potravin rostlinného i živočišného původu. Po konzumaci kontaminovaných potravin může dojít ke vzniku alimentárního onemocnění dvojího typu – emetický nebo průjemový syndrom.

Z celkového množství 65 vzorků vánočního cukroví byly fenotypově suspektní izoláty *B. cereus* detekovány u 54 vzorků (83 %), z toho 47 vzorků bylo tepelně upraveno a 7 vzorků neprošlo tepelnou úpravou. U 48 vzorků (71 %) byl výskyt *B. cereus* následně potvrzen i genotypově.

Z celkového počtu 51 potvrzených izolátů *B. cereus* byl gen pro produkci emetického toxinu detekován u 4 izolátů, tyto kmeny současně nesly geny pro produkci Nhe. U 33 diarhogenních kmenů byla pozorována přítomnost genů pro tvorbu Hbl i Nhe, 14 kmenů vykazovalo pouze přítomnost genů pro tvorbu Nhe.

Na základě dosažených výsledků lze konstatovat, že vánoční cukroví z domácí výroby i tržní sítě není významným zdrojem toxigenních kmenů *S. aureus*. Na druhou stranu potvrzený záchyt enterotoxigenního kmene naznačuje, že tyto produkty nelze považovat za zcela bezpečné. Oproti tomu lze uvedené výrobky označit za potenciální rezervoár toxigenních kmenů *B. cereus*. Vyšší riziko je zejména u výrobků, které jsou po upečení dále ručně upravovány.

## Seznam použitých zdrojů

- [1] BURSOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ, Lenka NECIDOVÁ, Renata KARPÍŠKOVÁ a Petra MYŠKOVÁ. *Mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. 80pp. ISBN 978-80-7305-676-6.
- [2] Bergdoll, M. S. 1985. The staphylococcal enterotoxin-an update, p. 247-254. In J. Jeljaszewicz (ed.), *The Staphylococci*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
- [3] BAUMGARTNER, ANDREAS, ISABEL NIEDERHAUSER a SOPHIA JOHLER, 2014. Virulence and Resistance Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Ready-to-Eat Foods. *Journal of Food Protection* [online]. **77**(7), 1232-1236 [cit. 2020-07-22]. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-14-027. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/77/7/1232/174592/Virulence-and-Resistance-Gene-Profiles-of>
- [4] Dack, G. M., W. E. Cary, O. Woolper, and H. Wiggers. 1930. An outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow hemolytic *Staphylococcus*. *Can. J. Microbiol.* **4**:167-175.
- [5] BHUNIA, Arun K., 2008. *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. New York: Springer Science. ISBN 978-0-387-74536-7.
- [6] Stefani, S., and P. E. Varaldo. 2003. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**:1179-1186.
- [7] BLAIOTTA, G., D. ERCOLINI, C. PENNACCHIA, V. FUSCO, A. CASABURI, O. PEPE a F. VILLANI, 2004. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-8802. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **97**(4), 719-730 [cit. 2020-06-20]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-672.2004.02349.x>
- [8] Hajek, V., and E. Marsalek. 1973. The occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains in hosts of different animal species. *Zentralbl. Bakteriol. Orig. A* **223**:63-68.
- [9] Schleifer, K. H. 1986. Gram positive cocci, p. 999-1100. In P. A. Sneath (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed., vol. 2. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
- [10] Bryan, F. L. 1976. *Staphylococcus aureus*, p. 12-128. In M. P. deFigueiredo and D. F. Splittstoesser (ed.), *Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects*. AVI, Westport, CT.
- [11] HOLMBERG, Scott D., 1984. Staphylococcal Food Poisoning in the United States. *JAMA* [online]. **251**(4) [cit. 2020-07-08]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1984.03340280037024>
- [12] Buzby, J. C., T. Roberts, C. T. Lin, and J. M. McDonald. 1996. *Bacterial Foodborne Disease Medical Costs and Prouctivity Losses. Agricultural Economic Report 147*. U. S. Department of Agriculture, Washington, DC. <http://www.ers.usda.gov/publications/aer-agricultural-economic-report/aer741.aspx>.
- [13] Hu, D. L., K. Omoe, Y. Shimoda, A. Nakane, and K. Shinagawa. 2003. Induction of emetic response to staphylococcal enterotoxins in the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Infect. Immun.* **71**:567-570

- [14] BURSOVÁ, Šárka, Renáta KARPÍŠKOVÁ, Marta DUŠKOVÁ a Lenka NECIDOVÁ, 2014. *Mikrobiologie potravin – praktická cvičení I. Obecná mikrobiologie. Revidované vydání. 2.* Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-683-4.
- [15] GUINEBRETIERE, Marie-Hélène, Sandrine AUGER, Nathalie GALLERON, et al., 2013. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **63**(Pt\_1), 31-40 [cit. 2020-04-24]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.030627-0>
- [16] STENFORS ARNESEN, Lotte P., Annette FAGERLUND a Per Einar GRANUM, 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. **32**(4), 579-606 [cit. 2020-04-24]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>
- [17] Hauge, S. 1955. Food poisoning caused by aerobic spore forming bacilli, *J. Appl. Bacteriol.*, **18**:591-595
- [18] Mortimer, P. R., and G. McCann. 1974. Food poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. *Lancet* **i**:1043-1045.
- [19] Granum, P. E., and T. Lund. 1997. *Bacillus cereus* enterotoxins. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**:223-228.
- [20] KRAMER, J. M. a R. J. GILBERT, 1989. *Foodborne Bacterial Pathogens: Bacillus cereus and other Bacillus species.* New York: Marcel Dekker. ISBN 0-8247-7866-9.
- [21] ANDERSEN BORGE, Grethe I, Marianne SKEIE, Terje SØRHAUG, Thor LANGSRUD a Per Einar GRANUM, 2001. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **69**(3), 237-246 [cit. 2020-03-02]. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160501005001>
- [22] SHINAGAWA, Kunihiro, Hirotaka KONUMA, Hiroyuki SEKITA a Shunji SUGII, 1995. Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **130**(1), 87-90 [cit. 2020-03-24]. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07703.x>
- [23] SCHMIDT, K. a C. TIRADO, 2001. *WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe: Seventh Report 1993-1998.* Berlín: Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine (BgVV). ISBN 393167570X.
- [24] Shinagawa, K. 1993. Serology and characterization of *Bacillus cereus* in relation to toxin production. *Bull. Int. Dairy Fed.* **287**: 42-49.
- [25] EHLING-SCHULZ, Monika, Birgitta SVENSSON, Marie-Helene GUINEBRETIERE, et al., 2005. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology* [online]. **151**(1), 183-197 [cit. 2020-07-12]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.27607-0>

- [26] DIERICK, K., E. VAN COILLIE, I. SWIECICKA, et al., 2005. Fatal Family Outbreak of *Bacillus cereus*-Associated Food Poisoning. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **43**(8), 4277-4279 [cit. 2020-05-05]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <https://jcm.asm.org/content/43/8/4277>
- [27] Dierick, K., E. Van Coillie, I. Swiecicka, G. Meyfroidt, H. Devlieger, A. Meulemans, G. Hoedemackers, L. Fourie, M. Heyndrickx, and J. Mahillon. 2005. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4277-4279.
- [28] Mahler, H. A. Pasi, J. M. Kramer, P. Schuller, A. C. Scoging, W. Bar, and S. Krahenbuhl. 1997, Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *N. Engl. J. Med.* **336**:1142-1148.
- [29] SHIOTA, M., K. SAITOU, H. MIZUMOTO, et al., 2010. Rapid Detoxification of Cereulide in *Bacillus cereus* Food Poisoning. *PEDIATRICS* [online]. **125**(4), e951-e955 [cit. 2020-05-28]. ISSN 0031-4005. Dostupné: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2009-2319>
- [30] Nakamura, L. K. 1998. *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:1031-1035.
- [31] LECHNER, S., R. MAYR, K. P. FRANCIS, B. M. PRUSS, T. KAPLAN, E. WIESSNER-GUNKEL, G. S. A. B. STEWART a S. SCHERER, 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. **48**(4), 1373-1382 [cit. 2020-07-10]. ISSN 0020-7713. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-48-4-1373>
- [32] ASH, C, 1992. Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **94**(1-2), 75-80 [cit. 2020-04-01]. ISSN 03781097. Dostupné z: [http://doi.wiley.com/10.1016/0378-1097\(92\)90586-D](http://doi.wiley.com/10.1016/0378-1097(92)90586-D)
- [33] ASH, C., J. A. E. FARROW, M. DORSCH, E. STACKEBRANDT a M. D. COLLINS, 1991. Comparative Analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and Related Species on the Basis of Reverse Transcriptase Sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. **41**(3), 343-346 [cit. 2020-03-02]. ISSN 0020-7713. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-41-3-343>
- [34] Hoffmaster, A. R., J. Ravel, D. A. Rasko, G. D. Chapman, M. D. Chute, C. K. Marston, B. K. De, C. T. Sacchi, C. Fitzgerald, L. W. Mayer, M. C. Maiden, F. G. Priest, M. Barker, L. Jiang, R. Z. Cer, J. Rilstone, S. N. Peterson, R. S. Weyant, D. R. Galloway, T. D. Read, T. Popovic, and C. M. Fraser. 2004. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:8449-8454.
- [35] Carlson, C. R., D. A. Caugant, and A.-B. Kolstø. 1994. Genotypic diversity among *Bacillu cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Emviron. Microbiol.* **60**:1719-1725.
- [36] Claus, D., and R. C. W. Berkeley. 1986. Genus *Bacillus*, p. 1105-1139, vol. 2. In P. H. A. Seneath (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD.
- [37] JACKSON, S.G., R.B. GOODBRAND, R. AHMED a S. KASATIYA, 1995. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Letters in*

- Applied Microbiology* [online]. **21**(2), 103-105 [cit. 2020-05-01]. ISSN 0266-8254. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.1995.tb01017.x>
- [38] ANDERSSON, Annika, Ulf RÖNNER a Per Einar GRANUM, 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology* [online]. **28**(2), 145-155 [cit. 2020-04-10]. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160595000534>
- [39] Granum, P. E. 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. *J. Appl. Bacteriol.* **76**:61S-66S.
- [40] ELEY, Adrian, 1996. *Microbial Food Poisoning*. 2nd edition. Springer. ISBN 0412 64430 4.
- [41] Husmark, U. 1993. Adhesion mechanisms of bacterial spores to solid surfaces. Ph.D. thesis. Department of Food Science, Chalmers University of Technology and SIK, The Swedish Institute for Food Research, Göteborg, Sweden.
- [42] ANDERSSON, Annika, Per Einar GRANUM a Ulf RÖNNER, 1998. The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **39**(1-2), 93-99 [cit. 2020-05-10]. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160597001219>
- [43] WALKER-DANIELS, Jennifer, 2012. Current PCR Methods. *Materials and Methods* [online]. **2** [cit. 2020-07-13]. DOI: 10.13070/mm.en.2.119. ISSN 2329-5139. Dostupné z: <http://www.labome.com/method/Current-PCR-Methods.html>
- [44] Baird-parker agar, 2003. *Handbook of Culture Media for Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2003, s. 400-403 [cit. 2020-07-22]. Progress in Industrial Microbiology. DOI: 10.1016/S0079-6352(03)80030-9. ISBN 9780444510846. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079635203800309>
- [45] TYLŠOVÁ, Petra a Bursová ŠÁRKA, 2015. *Mikrobiologický atlas. Ukázky růstu vybraných původců alimentárních onemocnění*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita.
- [46] *HiMedia-Čaderský-Envitek, spol. s r. o.: Baird Parker Agar Base*. [cit. 2020-07-15]. Dostupné z: [https://www.himedia.cz/katalog/produkty/mikrobiologie/dehydratovana-kultivacni-media/product/M043\\_baird-parker-agar-base](https://www.himedia.cz/katalog/produkty/mikrobiologie/dehydratovana-kultivacni-media/product/M043_baird-parker-agar-base)
- [47] Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs, 2016. *EFSA Journal* [online]. **14**(7) [cit. 2020-07-22]. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4524. ISSN 18314732. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2016.4524>
- [48] VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie-vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-8.
- [49] *Bio-Vendor-Laboratorní medicína a.s.: PROLEX<sup>TM</sup>-STAPH LATEX KIT*, 2012. Zář. Brno-Řečkovice.
- [50] CUPÁKOVÁ, Šárka, Lenka NECIDOVÁ a Renata KARPÍŠKOVÁ, 2011. *Bakteriální původci alimentárních onemocnění: Staphylococcus aureus*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita.
- [51] YAMADA, S., OHASHI, E., AGATA, N., VENKATESWARAN, K. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, vol. 65, no. 4, p. 1483-1490.



- [52] HORWOOD, P.F., BURGESS, G.W., OAKEY, H.J. Evidence for non-ribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, vol. 236, no. 2, p. 319-324.
- [53] MARTINEAU, F., PICARD, F.J., ROY, PH., OULLETTE, M., BERGERON, MG. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, vol. 34, no. 12, p. 2888-2893.
- [54] ROWAN, N.J., CALDOW, G., GEMMELL, C.G., HUNTER, I.S. Production of diarrheal enterotoxins and other potential virulence factors by veterinary isolates of *Bacillus* species associated with nongastrointestinal infections. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, vol. 69, no. 4, p. 2372-2376.
- [55] GHELARDI, E., CELANDRONI, F., SALVETTI, S., BARSOTTI, C., BAGGIANI, A., SENESI, S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, vol. 208, no. 1, p. 129-134.
- [56] GUINEBRETIÈRE, M-H., BROUSSOLLE, V., NGUYEN-THE, CH. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, vol. 40, no. 8, p. 3053-3056.
- [57] MARTINEAU, F., PICARD, F.J., ROY, PH., OULLETTE, M., BERGERON, MG. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, vol. 36, no. 3, p. 618-623.
- [58] STEGGER, M., ANDERSEN, P. S., KEARNS, A., PICHON, B., HOLMES, M. A., EDWARDS, G., LAURENT, F., TEALE, C., SKOV, R., LARSEN, A.R. Rapis detection, differentiation and Tyliny of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA* (LGA251). *Clinical Microbiology and Infection*, 2012, vol. 18, no. 4, p. 395-400.
- [59] MONDAY, S.R., BOHACH, G.A. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, vol. 37, no. 10, p. 3411-3414.
- [60] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2001. 247 s. ISBN 80-902896-2-2.
- [61] Demirci M, Tombul F, Yiğın A and Altun SK, 2017. Investigation of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to E Via real-time PCR from various food samples in Turkey. *Pak Vet J*, 37(1): 100-104.
- [62] PETROVÁ, Jana, Ľubomíra JUHANIAKOVÁ, Margarita TEREŇTJEVA, Simona KUNOVÁ, Henrieta BLAŠKOVIČOVÁ a Miroslava KAČÁNIOVÁ, 2015. Microbiology of raw materials used for confectionary production. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* [online]. 52-56 [cit. 2020-07-23]. DOI: 10.15414/jmbfs.2015.4.special1.52-56. ISSN 13385178. Dostupné z: [http://www.jmbfs.org/issue/february-2015-vol-4-special-issue-1-microbiology/petrova1/?issue\\_id=3715&article\\_id=12](http://www.jmbfs.org/issue/february-2015-vol-4-special-issue-1-microbiology/petrova1/?issue_id=3715&article_id=12)

## Seznam použitých zkratk a symbolů

<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
PCR	Polymerázová řetězová reakce
NaCl	Chlorid sodný
MYP	Mannitol Yolk Polymyxin B agar
BP	Baird-Parker agar
KA	Krevní agar
SEs	Stafylokokové enterotoxiny
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
hbl	Hemolyzinu BL
<i>hblA</i>	Gen pro tvorbu hemolyzinu BL – komponenta B
<i>hblC</i>	Gen pro tvorbu hemolyzinu BL – komponenta L <sub>2</sub>
<i>hblD</i>	Gen pro tvorbu hemolyzinu BL – komponenta L <sub>1</sub>
nhe	Diarhogenní enterotoxin
<i>nheA</i>	Gen pro tvorbu diarhogenního enterotoxinu – komponenta A
<i>nheB</i>	Gen pro tvorbu diarhogenního enterotoxinu – komponenta B
<i>nheC</i>	Gen pro tvorbu diarhogenního enterotoxinu – komponenta C