

Identifikace bakterií vyskytujících se ve zrajících sýrech

Bc. Jiří Prosser

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jiří PROSSER**
Osobní číslo: **T080491**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Identifikace bakterií vyskytujících se ve zrajících sýrech**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Zpracujte literární rešerši shrnující poznatky o identifikaci bakterií.
2. Popište mikroflóru zrajících sýrů, zaměřte se na nežádoucí bakterie.

II. Praktická část

1. Stanovte množství bakterií (mezofilní, psychrotrofní, koliformní) a přítomnost *L. monocytogenes* u několika typů zrajících sýrů.
2. Izolujte zhruba 20 bakteriálních kmenů ze selektivně-diagnostických půd a pokuste se je identifikovat různými metodami.
3. Formulujte závěry vyplývající z výsledků.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] SEDLÁČEK, I. Taxonomie prokaryot. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.

[2] ICMSF -- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. Microorganisms in Foods 6. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. 763 s. ISBN 0-306-48675-X.

[3] BLACBURN, C. Food Spoilage Microorganisms. 1st ed. New York: CRC Press, 2006. 712 s. ISBN 0-8493-9156-3.

[4] GÖRNER, F., VALÍK, L. Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

4. ledna 2010

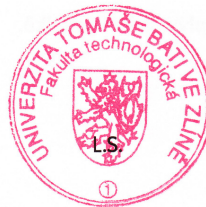
Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2010

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Prosser Jiří

Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 17.8.2010



.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jim dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na bakteriální identifikaci a mikroflóru vyskytující se ve zrajících sýrech. Teoretická část pojednává o identifikaci bakterií, o jejich klasifikaci, systematice a o metodách určování. Dále je popsáno rozdělení jednotlivých druhů sýrů se zaměřením na sýry zrající. V praktické části byly testovány zrající sýry dostupné v obchodní síti v ČR. Byly sledovány celkové počty mezofilních a psychrotrofních mikroorganismů, koliformních bakterií a *Listeria monocytogenes*. Ze vzorků byly izolovány čisté kmeny, které byly identifikovány dostupnými metodami. Některé vzorky překročily množství koliformních bakterií, avšak žádný vzorek neobsahoval nebezpečnou bakterii *L. monocytogenes*.

Klíčová slova: identifikace, sýry, zrající sýry, patogenní mikroorganismy

ABSTRACT

This thesis focuses on the bacterial identification and microflora of ripened cheeses. The theoretical part deals with the identification of bacteria, their classification, taxonomy and methods of identification. The next chapter describes the distribution of various types of cheese, focused on ripened cheeses. Ripened cheeses obtainable in the Czech Republic trade network were tested in the practical part. Total counts of mesophiles, psychrotrophs, coliforms and *Listeria monocytogenes* were observed. Isolates from ripened cheeses were identified by available methods. Some of cheeses exceeded limits for coliform bacteria, but any cheese contains hazardous bacteria *L. monocytogenes*.

Keywords: identification, ripened cheeses, pathogenic microorganisms

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat svojí vedoucí diplomové práce Mgr. Magdě Doležalové Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a čas, který mi věnovala při vypracovávání mé diplomové práce, jak části teoretické, tak i praktické. Dále bych chtěl poděkovat všem pracovníkům Ústavu technologie a mikrobiologie potravin FT UTB za pomoc v laboratořích.

Rád bych také poděkoval své přítelkyni, za všestrannou podporu po celou dobu mého studia.

Motto:

„Dělej tak, abys jednou mohl říkat, dělej jako já.“

Goethe

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| ÚVOD | 9 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 10 |
| 1 IDENTIFIKACE BAKTERIÍ | 11 |
| 1.1 KLASIFIKACE A SYSTEMATIKA..... | 11 |
| 1.2 METODY URČOVÁNÍ | 13 |
| 1.2.1 Morfologie..... | 14 |
| 1.2.2 Fyziologie..... | 14 |
| 1.2.3 Molekulární typizace..... | 15 |
| 2 SÝRY | 17 |
| 2.1 ROZDĚLENÍ SÝRŮ | 17 |
| 2.2 KYSELÉ SÝRY | 18 |
| 2.3 ZRAJÍCÍ SÝRY | 18 |
| 2.3.1 Rozdělení zrajících sýrů | 19 |
| 2.3.2 Technologie výroby zrajících sýrů | 20 |
| 2.3.3 Procesy probíhající při zrání..... | 20 |
| 2.3.4 Mikroflóra zrajících sýrů..... | 21 |
| 2.3.4.1 Startovací kultury..... | 21 |
| 2.3.4.2 Mikroorganismy způsobující kažení..... | 23 |
| 2.3.5 Patogenní mikroorganismy | 25 |
| 2.3.5.1 Listeria monocytogenes | 26 |
| 2.3.5.2 Salmonella | 29 |
| 2.3.5.3 Escherichia coli..... | 33 |
| 2.3.5.4 Staphylococcus aureus | 34 |
| 2.3.5.5 Clostridium botulinum..... | 36 |
| 2.3.6 Mikroorganismy produkující nebezpečné látky (biogenní aminy, mykotoxiny) | 37 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 39 |
| 3 CÍL PRÁCE | 40 |
| 4 MATERIÁL A METODY | 41 |
| 4.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY..... | 41 |
| 4.2 CHEMIKÁLIE..... | 41 |
| 4.3 METODY..... | 46 |
| 4.3.1 Použité vzorky..... | 46 |
| 4.3.2 Příprava vzorků sýrů | 47 |
| 4.3.3 Mikrobiologický rozbor | 47 |
| 4.3.4 Základní identifikační testy | 48 |
| 4.3.5 Izolace DNA z bakteriální kultury pomocí TRITON X – 100..... | 51 |
| 4.3.6 Izolace DNA varem..... | 51 |
| 4.3.7 Polymerázová řetězová reakce (PCR)..... | 52 |
| 5 VÝSLEDKY A DISKUZE | 54 |

| | | |
|-------|---|-----------|
| 5.1 | MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA | 54 |
| 5.1.1 | Experiment č. 1 | 54 |
| 5.1.2 | Experiment č. 2 | 55 |
| 5.2 | IDENTIFIKACE KMENŮ IZOLOVANÝCH ZE VZORKŮ SÝRŮ | 58 |
| 5.2.1 | Experiment č. 1 | 58 |
| 5.2.2 | Experiment č. 2 | 59 |
| 5.2.3 | PCR | 62 |
| | ZÁVĚR | 64 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 67 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK | 73 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 74 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 75 |
| | SEZNAM PŘÍLOH..... | 76 |

ÚVOD

Tato diplomová práce je zaměřena na teoretický i praktický výzkum možného výskytu patogenních mikroorganismů ve zrajících sýrech. Jedná se zejména o problematiku výskytu nebezpečných mikroorganismů jako jsou *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Clostridium botulinum* ve zrajících sýrech běžně dostupných v obchodních řetězcích.

Pro samotnou dělbou a typizaci sýrů neexistuje žádný univerzální systém, proto je to velmi složitá záležitost a v literatuře se toto dělení může lišit. Většinou je využíváno dělení podle vlastností, eventuelně podle použití ve výživě či podle základních kroků v technologii. Existují obecně uznávaná schémata dělení, ale potíže nastávají u některých druhů sýrů, jejichž parametry vyhovují několika skupinám, nebo se naopak k žádné skupině nehodí.

Práce je orientována na sýry zrající, mezi jejich nejdůležitější zástupce měkkých zrajících sýrů patří Camembert a Brie, které pochází z Francie. Česká varianta Camembertu je Sedlčanský Hermelín a v podstatě jakýkoliv sýr s bílou plísní na povrchu. Pro experimenty budou použity sýry jako Romadur, pravé Olomoucké tvarůžky, Niva, Blaťácké zlato, atd. Podle způsobu zrání je můžeme rozdělit na sýry zrající pod mazem a sýry zrající v chladu.

Dále jsou popsány patogenní mikroorganismy v sýrech. Jsou to *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Clostridium botulinum*. Důraz je kladem především na bakterii *Listeria monocytogenes*. Schopnost těchto mikroorganismů přežít v sýrech je ovlivněna několika mnoha faktory.

Jedno z klíčových slov provázejících celou diplomovou práci je tedy identifikace mikroorganismů. Její kritéria byla v 19. století postavena na morfologických znacích. V průběhu posledních 20 let však došlo k obrovskému rozvoji nových technologií v mikrobiologii jejichž výsledkem je větší objektivita a rychlost.

Cílem praktické části práce je, pokusit se identifikovat mikroorganismy izolované ze zrajících sýrů, zakoupených v obchodních řetězcích ČR, ze selektivních diagnostických půd a následně vyloučit výskyt *Listeria monocytogenes* u testovaných vzorků. Výstupem by mělo být vyhodnocení mikrobiologické kvality zrajících sýrů dostupných v obchodních řetězcích v ČR.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 IDENTIFIKACE BAKTERIÍ

Kritéria pro identifikaci mikroorganismů byla v 19. století postavena na morfologických znacích. V 50. letech 20. století přichází éra nových biochemických poznatků, zejména při studii metabolických drah. Od 80. let 20. století nabývají hlavního významu kromě fenotypových vlastností v identifikaci bakterií metody molekulární biologie a chemotaxonomických analýz – lze identifikovat i nekultivovatelné druhy a sledovat evoluční vztahy mezi nimi. Chemotaxonomie sleduje přítomnost a struktury charakteristických sloučenin u klasifikovaných zástupců systému [1].

Identifikace je proces dokazování, že nový izolát patří k jednomu již ustanovenému a pojmenovanému taxonu. Jde tak o praktickou aplikaci klasifikace a nomenklatury. V průběhu posledních 20 let došlo k obrovskému rozvoji nových technologií v mikrobiologii jejichž výsledkem je větší objektivita a rychlost. Původně identifikace mikroorganismů spočívala na biochemických testech založených na růstu bakterií, případně doplněné o stanovení antimikrobní citlivosti. Ve vybraných případech mohla být doplňkově dělána aglutinace, komplement fixační nebo neutralizační reakce. Bakteriální identifikace je nyní z velké části prováděna pomocí miniaturizovaných komerčních souprav, mikrotěstů, často polo či plně automatizovaných. Základní podmínkou pro provádění identifikace je práce s čistou kulturou [2].

1.1 Klasifikace a systematika

V současné době neexistuje oficiální klasifikace prokaryot, ale jejich řazení je neustále regulováno. Všeobecná pravidla ustanovuje International Code of Nomenclature of Bacteria.

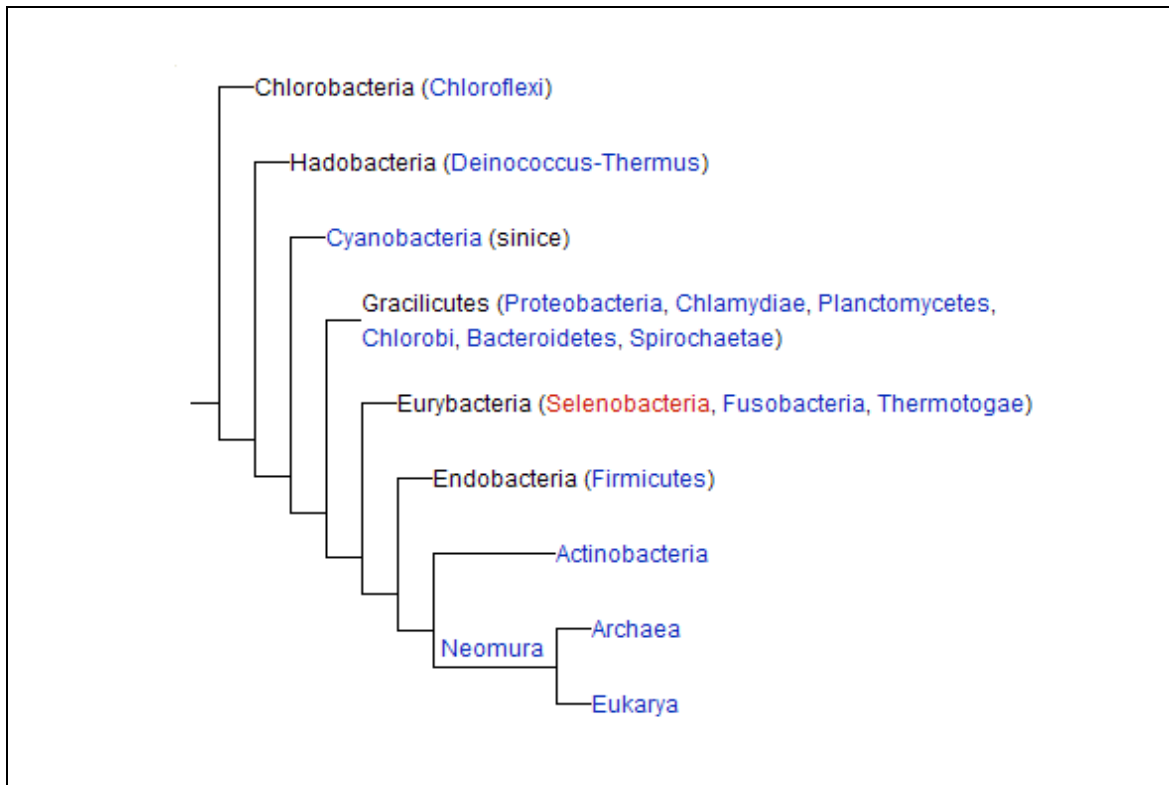
Bacteriological Code (revize v roce 1990) je novým konceptem platných jmen od roku 1975. Součástí je i Approved Lists of Bacterial Names (1980), který je základem současné nomenklatury. Aby byly taxony uznány za platné, musí být citovány v Approved Lists of Bacterial Names nebo publikovány v IJSB, IJSEM nebo publikovány v jejich Validation Lists. S využitím těchto zdrojů vytvořil List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature abecední a chronologické řazení prokaryot včetně změn v nomenklatuře. Zde pak můžeme najít sbírky prokaryot a typové kmeny a synonyma jmen. S každým vydáním IJSEM je doplňována úroveň současných poznatků [3].

Klasifikace založená pouze na fenotypových vlastnostech (morfológická, biochemická a fyziologická kritéria) je dnes již historická záležitost a byla podstatou tzv. praktické klasifikace. Aby byla fylogenetická příbuznost mezi prokaryoty přesnější, bylo nutno aplikovat výsledky studia jejich genomů – tzn. zahrnout genotypové vlastnosti. Tento v současné době využívaný přístup se nazývá fylogenetická klasifikace [2]. Projevují se i tendence některých mikrobiologů prezentovat klasifikaci z posledního Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, což je kniha vytvořená kolektivem nejuznávanějších taxonomů, jako tzv. oficiální klasifikaci, která by měla být v mikrobiologii používána [2]. Zde však na rozdíl od nomenklatury, kde má každý taxon jedno platné jméno stanovené podle mezinárodních pravidel, neexistuje žádná klasifikace bakterií ani archaeí.

Každá klasifikace je neustále modifikována podle toho, jak pokročily výzkumy a poznatky v daném oboru. Jako oficiální by pak mohla být používána ta, která by vyhovovala co největší části odborné mikrobiologické veřejnosti, alespoň po nějakou dobu. Klasifikace, kterou by používalo jen malé množství mikrobiologů, by neměla žádný význam, protože by byla velmi brzo modifikována a jako taková poté ignorována [2].

Systematiku lze vyjádřit jako studium diverzity mikroorganismů a vzájemné příbuznosti. Toto studium zahrnuje také ekologii, biochemii, genetiku, patologii a molekulární biologii [2].

Systematika byla dříve založena zejména na základě morfológických a analytických metod, které však v současné době vytlačují genetické metody, podobně jako v případě jejich určování. K používaným metodám patřilo i Gramovo barvení. Mezi další možnosti patří dělení na základě rozdílů v buněčném metabolismu, stavbě základních buněčných komponent (DNA, mastných kyselin, antigenů, a podobně). Těmito metodami však není zaručena přírozenost taxonů, které byly na základě nich vytvořeny. Současné bakteriální klasifikační metody se soustředí především na molekulární systematiku. Z genetických metod se používá sekvenace dlouhodoběji stabilních částí DNA, jako je rRNA nebo je měřen obsah GC (množství guaninu a cytosinu v rámci DNA) [4]. Na základě výše zmíněných genetických metod je v rámci domény bakterie identifikováno poměrně velké množství kmenů (*phylum*). Jejich počet není dán přesně a pohybuje se okolo 22 – 26 [5]. Příbuzné kmeny se skupují do vývojových linií, jedním ze známějších systémů je Cavalier-Smithův na Obr. 1. [6].



Obr. 1. Klasifikace bakteriálních kmenů podle Cavalier-Smithe [6].

1.2 Metody určování

Velký význam má určování bakterií hlavně v medicíně, kde je správným stanovením původce dané bakteriální infekce podmíněna následující léčba. Tato potřeba identifikovat bakterie byla hlavním impulzem k vyvinutí determinačních technik.

Mikroskopickým pozorováním bakterií v tělních tekutinách se bakterie určují jen zřídka, častěji jsou pak preparáty barveny [7]. Známým typem barvení je Gramovo barvení, které umožňuje rozlišovat bakterie grampozitivní (G+), gramnegativní (G-) a bez buněčné stěny (*Mollicutes*). Pro mykobakterie (*Mycobacteria*) a nokardie (*Nocardia*) se zase používá Ziehl-Neelsenovo barvení [8]. Často však nestačí vzorek barvit, ale musí se přistoupit ke kultivaci. Při identifikaci bakterií se čím dál častěji využívá také molekulárně-genetických metod, jako je např. polymerázová řetězová reakce. Jejich předností je jejich přesnost a rychlost v porovnání s kultivačními metodami [9].

1.2.1 Morfologie

Morfologické znaky dělíme na makroskopické a mikroskopické a zjišťujeme je při identifikaci mikrobiálních rodů a druhů, při kontrole čistoty kultury, případně také při posouzení fyziologického stavu kultury.

Makroskopické znaky se týkají způsobů růstu mikroorganismů v živných půdách. Jsou patrné pouhým okem. I když jsou silně ovlivněny použitou živnou půdou a stářím kultury, přinášejí nám velmi cenné informace o povaze mikroorganismu a o čistotě kultury. Tyto znaky jsou však vodítkem při identifikaci rodů nebo dokonce druhů mikroorganismů jen v některých případech [2]. Mezi makroskopické morfologické znaky náleží charakter růstu:

- po kultivaci mikroorganismů v tekuté půdě,
- po kultivaci na agarové půdě v Petriho misce – studium jednotlivých kolonií,
- po kultivaci svislých agarů zaočkovaných vpichem [10].

Mezi důležité mikroskopické morfologické znaky patří velikost, tvar, uspořádání buněk, způsob rozmnožování a přítomnost zvláštních útvarů [2]. Tyto znaky můžeme pozorovat světelným nebo elektronickým mikroskopem, případně lupou. Mikroskopické hodnocení doplňujeme vždy makroskopickým posouzením kultury [10].

1.2.2 Fyziologie

Mikroorganismy se od sebe navzájem liší svými nároky na výživu, na kyslík, způsobem získávání energie a jsou různě citlivé na fyzikální, chemické a biologické faktory. Tyto vlastnosti jsou využívány k základní charakteristice izolátu, který má být identifikován. Podle nároků na výživu mikroorganismy dělíme na autotrofní a heterotrofní, podle nároků na kyslík na aerobní, anaerobní, mikroaerofilní a fakultativně anaerobní, podle způsobu získávání energie na fototrofní a chemotrofní [11]. Často využívanými vlastnostmi jsou také fermentace sacharidů, teplotní rozmezí růstu, produkce pigmentů, enzymů (kataláza, cytochromoxidáza), tolerance k vyšší koncentraci NaCl (6,5 %) [2], citlivost ke žlučovým solím a rezistence na antibiotika.

1.2.3 Molekulární typizace

Vznik metod molekulární typizace umožnil rozvoj molekulárně biologických technik. Tyto metody jsou založeny na fyzikálních vlastnostech molekul produkovaných prokaryoty a jsou tedy univerzálně aplikovatelné. Obecně se můžeme domnívat, že jsou mikroorganizmy geneticky identické a že jsou klonálním potomstvem jedné buňky. Genetická diverzita, která existuje na úrovni bakteriálního druhu umožňuje diferenciaci odlišných klonů nebo klonálních skupin mezi izoláty shodného druhu získanými z různých zdrojů a míst a i v různých časech. Tento proces se nazývá subtypizace, což je dokazování, že např. původně rozeznatý virulentní klon je přítomen v souboru kmenů z nových ohnisek infekce [2].

Typizační techniky mohou být na základě typu cílové makromolekuly rozděleny do tří skupin [2]:

- Metody založené na lipopolysacharidech a mastných kyselinách – analýza lipopolysacharidů pomocí sodium-dodecyl-sulfátové polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-PAGE) a plynové chromatografie.
- Metoda založená na analýze složení proteinů buněčné stěny a vnější membrány – analýza SDS-PAGE [12], která je užitečná pro subtypizaci bakterií, a to většinou gramnegativních. Speciálním typem těchto metod je multilokus enzymová elektroforéza, jejíž výsledky dobře korelují s genotypem.
- Metody založené na nukleových kyselinách – patří sem např. DNA sekvencování, což je přímé stanovení sekvencí nukleotidů v molekule genomové DNA. Dále zde můžeme zařadit restrikční analýzu chromozomální DNA spočívající ve srovnání počtu a velikosti fragmentů vzniklých po působení restrikčního enzymu na nukleovou kyselinu. Třetí metodou je restrikční analýza plazmidů spočívající v extrakci plazmidu separací gelovou elektroforézou na základě jeho velikosti. Čtvrtou metodou této skupiny je pulzní gelová elektroforéza, při které se vytváří velké fragmenty DNA separované speciálním elektroforetickým postupem a analýza fragmentů je bez nutnosti hybridizačních metod. Tyto metody byly použity např. při identifikaci bakterií rodu *Lactobacillus* [13]. Poslední metodou je polymerázová řetězová reakce (PCR), což je v dnešní době již velmi rozšířená a dá se říci běžná metoda. Je to amplifikační metoda, která umožňuje zmnožení částí specifických úseků DNA i RNA. Existuje mnoho variant (real-time PCR, nested PCR, LAMP assay), ale u

všech platí, že jsou to velmi rychlé metody identifikace a detekce, které se využívají např. k detekci patogenů v potravinách [14].

2 SÝRY

2.1 Rozdělení sýrů

Při dělení sýrů neexistuje žádný univerzální systém, proto je to velmi složitá záležitost a v literatuře se toto dělení může lišit. Většinou se však používá dělení podle vlastností, eventuelně podle použití ve výživě či podle základních kroků v technologii. Existují obecně uznávaná schémata dělení, ale potíže nastávají u některých druhů sýrů, jejichž parametry vyhovují několika skupinám, nebo se naopak k žádné skupině nehodí. Z těchto důvodů musíme chápat předložené schéma (Obr. 2) jako orientační, a pokud se v literatuře setkáme s jiným dělením nemusí být špatné či kvalifikovanější [15].

| | | | | |
|--|-----------------------------|---|--|-------------------------------------|
| | <i>Kyselé</i> | | | |
| | <i>Sladké</i> | <i>Měkké</i> | <i>Čerstvé</i> <i>Termizované</i> | |
| | | | <i>Zrající</i> | <i>Pod mazem</i> <i>V chladu</i> |
| | | <i>Polotvrdé</i> | <i>S vytuženou syřeninou</i> <i>Lisované</i> | |
| | | <i>Tvrdé</i> | <i>S nízkou dohřívanou syřeninou</i> <i>S vysokou dohřívanou syřeninou</i> <i>S mletou syřeninou</i> <i>Speciální</i> | |
| | | <i>Plísňové</i> | <i>S plísní na povrchu</i> <i>S plísní uvnitř</i> <i>Kombinované</i> | |
| | <i>Bílé</i> | <i>Nelisované</i> <i>Lisované</i> | | |
| | <i>Podle způsobu balení</i> | <i>V hliníkové fólii nezatavené</i> <i>V hliníkové fólii zatavené</i> <i>V tuhých plastových obalech</i> <i>V plechových obalech</i> | | |
| | | <i>V jiných obalech tužby</i> <i>Plastová střížka</i> <i>Salámy</i> <i>Plátky</i> | | |
| | <i>Přírodní</i> | | | |

Obr. 2. Základní rozdělení sýrů [15].

2.2 Kyselé sýry

Kyselé sýry se vyrábí kyselým srážením mléčné bílkoviny. Jsou konzumovány v čerstvém stavu nebo jsou použity jako surovina pro výrobu. Nejznámějším zástupcem kyselých sýrů u nás jsou olomoucké tvarůžky.

Olomoucké tvarůžky

Základem pro výrobu olomouckých tvarůžků je průmyslový tvaroh. Je zde využíváno pouze kyselé srážení, kdy se na povrchu se utváří oranžový nebo zlatožlutý maz. Pravý výrobní proces začíná přípravou surovin, kdy se promíchává tvaroh, regulátory kyselosti, kuchyňská sůl, mlékárenské kultury, pitná voda na homogenní směs požadované konzistence. Přes formovače je směs promíchávána a vytlačována do forem. Poté následuje fáze sušení, které probíhá za předem daných rozmezí teplot a vlhkostí. Takto probíhá první proces zrání, kdy tvarůžky dosahují žádaného obsahu sušiny a rozvíjí se proteolytická mikroflóra na povrchu polotovaru. Koupáním se po dosažení optimálního povrchového pH odstraní povrchová oxidační mikroflóra. Později se tvarůžky ukládají do beden, kde následně zrají. To je složitý enzymový proces, při němž převažuje enzymové odbourávání laktosy a bílkovin, někdy i tuků. Typická vůně, chuť i maz tvarůžků vzniká rozpadem bílkovin. Při zralosti do 1/3 řezu se mohou vyexpedovat, přitom však stále dozrávají. Při delší době zrání dochází k výraznějšímu rozkladu bílkovin, což zintenzivňuje jejich organoleptické vlastnosti. Štiplavá chuť je způsobena rozpadem bílkovin až na amoniak. Zejména pokud jsou ve stádiu plné zralosti působí silně alkaligenně v trávicím traktu. Zralý sýr je typická pro svou vůni, chuť, ale i texturu. Nejlepší jsou tvarůžky ve třetím a čtvrtém týdnu zrání. Skladují se do 10 °C a datum minimální trvanlivosti je 35 dnů od data výroby. Díky výrobě z odtučněného mléka neobsahují téměř žádný tuk, jsou lehce stravitelné [16-19].

2.3 Zrající sýry

Zrající sýry patří do skupiny sladkých měkkých sýrů (*Obr. 2*). Charakteristickým znakem měkkých sýrů je měkkost, drobivost, soudržnost a roztíratelnost. Některé sýry z této skupiny tvoří plynulý přechod mezi sýry a tvarohy, technologií se více blíží k výrobě tvarohů než ke klasické výrobě sýrů. Při výrobě měkkých sýrů se sýřenina nepřihřívá ani nedosouší, odlučuje se syrovátka bez lisování [15]. Tato skupina sýrů je velmi hojně zastoupena.

Mezi nejdůležitější měkké zrající sýry patří Camembert a Brie, které pochází z Francie. Tyto sýry jsou charakteristické přítomností bílé plísně (způsobené *Penicillium camemberti*), která pokrývá povrch sýrů [20]. Česká varianta Camembertu je Sedlčanský Hermelín a v podstatě jakýkoliv sýr s bílou plísní na povrchu.

2.3.1 Rozdělení zrajících sýrů

Sýřenina zrajících sýrů dozrává pomocí urychlovačů zrání, což jsou bakterie, plísně (*Penicillium camemberti*, *P. roqueforti*), kvasinky nebo jejich kombinace [20]. Výsledkem je pak specifická chuť, textura a vnější vzhled. Musí být vyrobeny z pasterizovaného mléka a pokud tomu tak není, jsou skladovány nejméně 60 dní než se dostanou ke spotřebiteli [21]. Podle způsobu zrání sýry můžeme rozdělit na sýry zrající pod mazem a sýry zrající v chladu.

Sýry zrající pod mazem

Pro tento druh sýrů je typický postup při jejich zrání. To probíhá v místnostech s přesně stanoveným klimatem, vysokou relativní vlhkostí vzduchu a teplotou, která se v průběhu zrání mění. Přítomnost mikroorganismů zrací kultury způsobuje hlavní změny v procesu zrání sýra. Hlavní součástí zracích kultur je *Brevibacterium linens* a další specifické druhy kvasinek. Zde pak kultury vytváří na povrchu sýra žlutooranžový maz a vlastní zrání pokračuje od povrchu dovnitř sýra. V průběhu 3 týdnů celý obsah sýrů rovnoměrně prozraje, ale zůstává tuhý, neroztékavý. Někdy jsou sýry barveny neškodným barvivem annato, který při zrání vydává silnou vůni, kterou ne všichni dokáží ocenit. Kůra se mnohokrát omývá, např. bílým vínem *marc de Bourgogne* (epoisses), *marc de Bourgogne* (langres), pivem (rollot) či obyčejnou slanou vodou. Tímto se kůra vyhlazuje a dodává se jí na lesklosti. Příkladem takovýchto sýrů jsou např. maroilles, monster, herve a livarot. Sýry jsou pravidelně obraceny na zracích podložkách a omývány slaným roztokem s přísadkou zracích kultur tak, aby stejnoměrně prozrávaly a udržely si pravidelný tvar. Balení probíhá na konci zrání do částečně propustných obalových materiálů, skladují se v chladu, a dále mohou dozrávat až do doby konzumace. Typickým představitelem u nás je romadúr a dezertní sýr. V současnosti bývá tento výrobní postup často kombinován s výrobou některých polotvrdých i tvrdých sýrů [15], [20], [22].

Sýry zrající v chladu

Sýry zrající v chladu se odlišují od ostatních druhů zrajících sýrů svým výrobním procesem. Po vysolení jsou sýry ukládány do zracích prostorů s relativně nízkou teplotou. Tím je velmi omezen růst mikroorganismů. Takže vlastní zrání probíhá působením enzymů ze syřidla a v celé hmotě sýra současně. U některých pikantních druhů sýrů je záměrně zvyšován obsah soli, který jinak brání růstu zrací mikroflóry. Doba zrání zde může trvat i několik měsíců [15].

2.3.2 Technologie výroby zrajících sýrů

Primárním prvkem v technologii výroby zrajících sýrů je jejich vlastní zrání, které probíhá ve zracích sklepích a má několik fází. Samotné zrání sýrů je nákladný a dlouhý proces. Charakter každého sýra se vytváří během maturace. Proces zrání se dá urychlit přidáváním startovacích kultur.

Zrací proces lze také urychlit zvyšujícím se enzymovým fondem, který zároveň zlepšuje i chuť a texturu. Největším změnám během zrání podléhá laktóza a mléčné bílkoviny, tuk u některých sýrů a určitým změnám podléhají také soli. V závislosti na typu sýrů trvá tento proces od 4 týdnů do 2 až 3 let. Sýrová hmota se stává sušší, pevnější, vytváří se modré žilkování, dutiny, a vnější pevná krusta.

Sýr je žijící organismus s enzymy a bakteriemi, které vyžadují přísun vzduchu a potřebnou vlhkost.

Během maturace se některé sýry pravidelně koupou v solném roztoku, přidávají se další bakteriální kultury a koření. Tímto závěrečným procesem se sýry stávají jedinečným produktem na celosvětovém trhu [20], [23].

2.3.3 Procesy probíhající při zrání

Zrání sýrů můžeme dělit do dvou skupin a to podle proteolýzy, tedy podle rozpadů bílkovin, a podle uplatnění mikroflóry, a to na:

Primární zrání

Zrání převažuje při zrání sýrů tvrdých, polotvrdých a u sýrů s plísní v těstě. Probíhá v celé hmotě stejně, a pod vlivem enzymů bakterií mléčného kvašení [23].

Sekundární zrání

Převažuje u sýrů měkkých, a u většiny sýrů kyselých, je to zrání jehož se účastní aerobní mikroflóra z povrchu, probíhá převážně od povrchu dovnitř. Aerobní zrání často probíhá velmi rychle a u měkkých sýrů potlačí vliv zrání primárního. U většiny sýrů však probíhají oba tyto typy zrání. Při zrání dochází ke změnám bílkovin. Para- α -kasein, v mléku nejhojněji zastoupená bílkovina, se štěpí na polypeptidy, dipeptidy a aminokyseliny. Mohou zde však vznikat i nežádoucí až škodlivé produkty degradace aminokyselin – amoniak, močovina, kyselina máselná a další. Při rozkladu bílkovin vznikají i těžké mastné kyseliny, které se podílí na chuťových složkách sýrů. Bílkovina samotná je bez chuti, ale mnoho produktů rozkladu bílkovin chuť má. Uvolněné mastné kyseliny se rozpadají na různé aldehydy a metylketony. Na konzistenci, která ovlivňuje i chuť a vůni má vliv obsah vody a její vazba v sýru. Kvalitní sýry obsahují takové množství jednotlivých složek, aby byly ve vzájemné rovnováze. Nejdříve je chuť nevýrazná a nasládlá (pochází z laktózy). Pochází především z tuku a dalších složek mléka a brzy ustupuje. Poté nastupuje kyselá chuť, jejíž příčinou je mléčné kvašení, charakteristické pro takřka všechny druhy sýrů. Rozložení jednotlivých složek aroma do vodní a tukové fáze napomáhá vyrovnané chuti sýra [16], [23-25]. Zrání tedy ovlivňuje konzistenci, chuť i vůni. Tvrdé sýry (optimální stáří při konzumaci 3 měsíce a více) zrají od středu k povrchu a měkké sýry (tj. sýry, které se ke konzumentovi dostávají velmi mladé) zrají zvenku dovnitř. Mezi znaky zralosti sýrů patří tvorba kůrky, mazu či vytváření ok, povrchové či vnitřní plísně [21].

2.3.4 Mikroflóra zrajících sýrů

2.3.4.1 Startovací kultury

Přídavkem čisté kultury do mléka před sýřením je nutnou podmínkou zdárného průběhu celého technologického procesu. Mezi primární kultury, které se podílejí na tvorbě chuti a vůně v průběhu zrání sýrů patří bakterie rodů *Lactococcus*, *Lactobacillus* a *Streptococcus*.

V první části výroby až po fázi solení se podílejí laktobacily také na prokysání sýrů. *Lactobacillus casei* pomalu fermentuje laktózu a jeho účinek spočívá především v proteolýze během zrání sýrů [17], [21], [24].

Dále rozlišujeme kultury :

- mezofilní kultury s teplotním optimem mezi 20 – 40 °C,
- termofilní kultury, které vystoupí k 45 °C.

Nejčastěji používané kultury jsou mixovány s druhovými kulturami, ve kterých dva nebo více druhů mezofilních a termofilních bakterií vegetují v symbióze. Tyto kultury neprodukují pouze kyselinu mléčnou, ale také složky aroma a CO₂. Oxid uhličitý je důležitý pro vytvoření dutin v kulatých sýrech s oky a zrnitých typech sýrů např. Gouda, Tylsiter- mezofilní kultury, Emmental, Gruyer – termofilní kultury [25].

Mezi zástupce rodu *Lactococcus* patří:

- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*,
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Mezi zástupce rodu *Streptococcus* patří:

- *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

Mezi zástupce rodu *Lactobacillus* patří:

- *Lactobacillus brevis*,
- *Lactobacillus casei*,
- *Lactobacillus plantarum*,
- *Lactobacillus fermenti*,
- *Lactobacillus acidophilus*,
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*,
- *Lactobacillus helveticus*.

Uvedené druhy mikroorganismů působí vždy ve vzájemném vztahu, a to buď současně, nebo vedle přičemž jeden druh připravuje půdu druhému. Přitom zabraňují vývinu škodlivých mikroorganismů, což je velmi důležité z hlediska technologického a zajištění dobré jakosti sýra. Je-li narušena činnost užitečných mikroorganismů vznikají nejvážnější závady v jakosti sýrů. Jestliže tedy chceme aby výroba a zrání sýrů bylo úspěšné musíme dodržet základní podmínky:

- musí být přítomny potřebné druhy mikroorganismů,
- musí být dostatečný počet již zmíněných mikroorganismů,
- musí být uplatněny v pravý čas technologického postupu.

Čisté mlékárenské kultury jsou vyráběny ve specializovaných laboratořích, které je zasílají buď v suchém nebo tekutém stavu. Suché kultury jsou trvanlivější avšak z provozního hlediska mají nevýhodu, protože bakterie jsou oslabené a před použitím musí být nejdříve oživeny několikerým přeočkováním. Zlepšení u suchých kultur bylo docíleno lyofilizací, která s výjimkou směsných kultur nevyžadují před použitím přeočkování [21], [22], [25], [26].

Součástí přirozené mikroflóry mléka mohou být také bakterie, které nejsou startovací kultury. Jsou to zejména různé druhy a poddruhy laktobacilů, zástupci rodu *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Enterococcus*. Oranžově pigmentující bakterie *Brevibacterium linens* se používá pro tvorbu mazu u sýrů zrajících pod mazem [27]. Největší přínos bakterií v mazu (*B. linens*, *Corynebacterium* sp., *Microbacterium*, *Arthrobacter* sp., *Staphylococcus* sp.) je uvolňování vysoce aromatických sirných sloučenin, které vznikají při katabolismu aminokyselin [28]. Většina této mikroflóry je však eliminována pasterizací.

Pokud jsou v mléce přítomny vysoké počty těchto nekulturních laktobacilů či pediokoků, může během zrání sýrů kromě L-laktátu vznikat racemizací také D-laktát. Ten nemusí být na závadu organoleptickým vlastnostem, avšak může mít nežádoucí následky ve výživě, zejména dětí. Navíc, D-laktát je méně rozpustný a může v sýru krystalizovat a způsobovat nežádoucí skvrny. Nekulturní kmeny mléčných bakterií mohou dále způsobovat oxidaci laktátu na acetát, který je u některých sýrů (Čedar) součástí typické chuti [28].

Sekundární mikroflóra je tvořena aromatickými kvasinkami či plísněmi k dotvoření charakteristických organoleptických vlastností u některých sýrů. Kvasinky např. degradují kyseliny mléčné na povrchu sýrů a zvyšují tím pH prostředí tak, aby bylo vhodné pro korynebakterie (*B. linens*) [27].

2.3.4.2 Mikroorganismy způsobující kažení

Při výrobě sýrů se může z technologických, fyzikálních nebo mikrobiologických příčin vyskytnout řada vad. Obecně pak můžeme vady způsobené mikrobiologickými činiteli rozdělit

na vady působené plísněmi, kvasinkami, nežádoucí tvorbu plynu (bakterie, kvasinky) a nežádoucí barevné změny sýrů (bakterie, kvasinky, plísně). Nesmíme však zapomenout, že při kažení mléčných produktů se zúčastňuje rod *Lactobacillus*, ale jen dva z nich mají specifický účinek. *L. maltaromicus* způsobuje sladovou pachut' mléka (tvorba různých aldehydů a alkoholů) a *L. bifementans* způsobuje za určitých okolností nadýmání sýrů holandského typu [29].

Spóry plísní potřebují pro své klíčení kromě přiměřené relativní vlhkosti, teploty a živin také dostatečný přístup vzdušného kyslíku. Všeobecně se pak prostředím velmi snadno šíří. Sýry, u kterých není pro zrání požadován vzdušný kyslík, jsou baleny do ochranných folií s inertní atmosférou, která brání jejich plesnivění. V případě porušení fólie či její netěsnosti mohou spóry plísní pronikat k sýrům, kde se začnou množit zejména na kyslík méně náročné druhy a způsobují nežádoucí změny ovlivňující kvalitu produktů. Za těchto podmínek se pak jedná o plísně rodu *Penicillium* způsobující modrou plíseň nebo rodu *Cladosporium*, což je černá plíseň. Dále mohou sýry kontaminovat plísně rodů *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Monilia* [27], *Scopulariopsis* a *Verticillium*. Navíc mohou produkovat mykotoxiny (viz kapitola 2.3.6). Nekulturní plísně rodu *Penicillium* často kontaminují sýry zrající pod mazem a plísňové sýry. Tzv. rakovinu kůry sladkých zrajících sýrů, která se projevuje měkkými místy na kůře způsobují plísně rodu *Penicillium* společně s bakteriemi rodu *Proteus* [22].

Sýry kontaminované kvasinkami mají kvasničnou chuť, aroma chlebového těsta nebo nepříjemný zápach a povrch sýrů bývá oslizený s viditelnými nedostatky [27]. Častým zdrojem kontaminace bývají solné lázně, protože kvasinky se množí především na povrchích sýrů s nepřiměřeně vysokou vlhkostí (proto je nutné po solných lázních sýry dostatečně osušit). Kvasinky mají také lipolytickou aktivitu, proto způsobují i žluklou chuť, volné mastné kyseliny mohou esterifikovat s alkoholy a vytvářet ovocnou vůni a chuť. Mezi kvasinky nejčastěji kontaminující sýry patří kvasinky rodů *Candida*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces*, *Geotrichum*, *Debaryomyces* a *Pichia* [22].

Nežádoucí tvorba plynů u sýrů způsobuje jejich trhání a duření, to můžeme dále rozdělit na časné a pozdní. Časné duření u sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou je způsobeno především koliformními bakteriemi (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*) nebo *Bacillus subtilis* [27]. Zdrojem těchto bakterií je prostředí, které se vyskytuje v mléce i po jeho pas-

teraci. Nízká teplota dohřívání používaná při výrobě sýrů navíc neumožňuje jejich devitalizaci. Za normálních okolností bakterie zákysu potlačí ty plynotvorné. Pokud však bakterie zákysu nejsou dostatečně aktivní začnou koliformní bakterie intenzivně růst a zkvašovat laktózu za vzniku CO₂ a vodíku, které způsobují nežádoucí oka a trhliny.

Na pozdním dužení sýrů a nežádoucí tvorbě kyseliny máselné se podílejí zejména anaerobní sporulující bakterie rodu *Clostridium* z mléka (*C. tyrobutyricum* v zimním období, *C. butyricum* v letním období) [27], které jsou schopny přežívat jak pasterační teploty, tak teploty dohřívání [22].

Mezi mikroorganismy způsobující barevné změny na sýrech řadíme *Micrococcus luteus* a *Aspergillus flavus* - žluté skvrny, nekulturní propionibakterie a plíseň *Penicillium casei* - hnědé skvrny. Tzv. bílou hnilobu, která se projevuje bělavými dobře ohraničenými skvrnami s tmavším středem, způsobují bakterie *Clostridium sporogenes* a *Clostridium putrefaciens*. Bílé skvrny a změknutí v místech skvrn jsou způsobeny činností některých enterokoků a kvasinek. Velkým problémem projevujícím se v průběhu zrání je vznik hořké chuti, způsobené kumulací hořkých komponent v peptidových frakcích. Její eliminaci je možné, v některých druzích sýrů, řešit přidavkem *Brevibacterium linens* [22].

Měkké sýry umožňují růst širšímu spektru mikroorganismů, jelikož mají vyšší obsah vlhkosti (50 – 80 %) a vhodnější pH (5,0-6,5) než sýry tvrdé. Kažení zde způsobují nejčastěji psychrotrofní gramnegativní tyčinky rodů *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter* a *Flavobacterium*, které způsobují zjevné změny chuti a zápachu díky přítomnosti lipolytických a proteolytických enzymů [30]. Ve zracím láku se rozvíjí typická halo- a acidotolerantní mikroflóra (10⁴ až 10⁶ CFU/ml), hlavními druhy jsou často kvasinka *Debaryomyces hansenii* a *Staphylococcus equorum* [28]. Tato mikroflóra výrazně ovlivňuje zejména měkké sýry zrající pod mazem.

2.3.5 Patogenní mikroorganismy

Schopnost patogenů přežívat v sýrech je ovlivněna několika faktory. Jsou to zejména vlastnosti daného mikroorganismu (teplotní, acido a halo tolerance), počáteční počty a jejich fyziologický stav, dále technologický postup výroby sýru, použité teploty, přidavek soli či jiných inhibitorů [27]. V následujících kapitolách jsou popsány nejnebezpečnější zdravotní rizika asociovaná se sýry.

2.3.5.1 *Listeria monocytogenes*

| | |
|-----------------|------------------------------|
| Taxonomie Říše: | bakterie (<i>Bacteria</i>) |
| Oddělení: | <i>Formicutes</i> |
| Třída: | <i>Bacilli</i> |
| Řád: | <i>Bacillales</i> |
| Čeleď: | <i>Listeriaceae</i> |
| Rod: | <i>Listeria</i> [31] |

Rod je tvořen dvěma skupinami geneticky příbuzných druhů [32]:

1. *Listeria monocytogenes*

Listeria ivanovii

Listeria seeligeri

Listeria innocua

Listeria welshimeri

2. *Listeria grayi*

Listeria murrayi

Výskyt jednotlivých druhů *Listeria* je uveden v *Tab. 1* a na *Obr. 3* je znázorněna klasifikace listerií podle kultivačních vlastností a biochemických znaků.

Tab. 1. Výskyt jednotlivých druhů rodu Listeria [32].

| Druh | Výskyt, patogenita |
|---|--|
| <i>L. monocytogenes</i> | podmíněné patogenní pro člověka a pro zvířata |
| <i>L. ivanovii</i> | Vyskytuje se u zvířat, zejména u ovcí; u člověka vzácné |
| <i>L. seeligeri</i> | saprofytický druh, který byl jen ojediněle prokázán jako vyvolavatel lidské listeriózy |
| <i>L. innocua</i> , <i>L. welshimeri</i> | Patogenita prakticky nulová |
| <i>L. grayi</i> , <i>L. murrayi</i> | Rozšířeny v přírodě, nevyvolávají onemocnění |

Morfologie

Bakterie rodu *Listeria* jsou krátké, poměrně uniformní grampozitivní tyčky se zaoblenými konci. Délka nepřesahuje 0,5 až 2 μm . V mikroskopu je pozorujeme jednotlivé, v krátkých řetězcích nebo drobných shlucích. Ve tkáních a v patologickém materiálu můžeme pozorovat také kokobacilární tvary nebo několik desítek μm dlouhé tyčky. Netvoří spóry ani pouzdra. Exprese proteinu tvořících bičík je závislá na teplotě - listérie tvoří bičíky jen v teplotním rozmezí od 20 do 25 °C. Jeden až čtyři bičíky umožňují pohyb s přemety a rotací [32], [33].

Růstové a biochemické vlastnosti

Listérie nejsou příliš náročné na kultivační podmínky. Jsou aerobní. Běžně rostou v rozmezí teplot 5 až 45 °C, jejich růst však není úplně inhibován ani při teplotě 0 °C. Naproti tomu jsou schopné přežít teplotu 60 °C po dobu 30 minut, resp. teplotu 73 °C po dobu 2 minut. Nejsou acidorezistentní. Rostou na běžných kultivačních půdách v širokém teplotním rozmezí. Kultury vyrůstající v suboptimálních teplotách rostou pomaleji, úměrně s prodloužením generační doby. Generační doba je při teplotě 4 až 5 °C 13 až 25 hodin, při 10 až 13 °C 5 až 9 hodin, při 35 °C 0,6 hodiny. Schopnost růst a přežít nízké teploty je způsobena schopností adaptovat mastné kyseliny v buněčné membráně tak, aby zůstala zachována fluidita membrány.

Dobře snášejí vysoké koncentrace NaCl a žlučových kyselin. Velice nízká je citlivost k vysoušení. *L. monocytogenes* roste při hodnotách a_w 0,93 (10% NaCl) a některé kmeny dokonce při $a_w = 0,83$ (asi 20% NaCl). Na druhé straně však ve vodném prostředí přežívá až 300 dní.

Roste v poměrně širokém rozmezí hodnot pH 5,6 až 9,5. V kyselejším prostředí (pH < 3,5) je devitalizovaná. Některé kmeny *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* produkují do prostředí hemolyziny, jiné nejsou schopny hemolyziny tvořit. Nehemolytické listérie, včetně nehemolytických kmenů *L. monocytogenes* jsou zcela avirulentní. Listérie jsou aktivně sacharolytické. Pro jejich růst je esenciální přítomnost glukózy v substrátu. Fermentují D-xylózu a f-metyl-D-manosid. Produkují katalázu [32], [34-38].

| Druh | Hemolýza | Redukce nitrátů | CAMP test | | Okyselení | | | |
|-------------------------|----------|--------------------|------------------|----------------|---------------|--------------|---------------|--------------------------------|
| | | | <i>S. aureus</i> | <i>R. equi</i> | D- manitol | D- xylóza | L- ramnóza | α -methyl- D-manosid |
| <i>L. monocytogenes</i> | + | - | + | - | - | + | - | + |
| <i>L. ivanovii</i> | ++ | - | - | + | - | - | + | - |
| <i>L. innocua</i> | - | - | - | - | - | R | - | + |
| <i>L. welshimeri</i> | - | - | - | - | - | R | + | + |
| <i>L. seeligeri</i> | + | - | + | - | - | - | + | R |
| <i>L. grayi</i> | - | - | N | N | + | - | - | N |
| <i>L. murrayi</i> | - | + | N | N | + | R | - | N |

| | |
|--|--|
| + je přítomný (++ výrazná přítomnost) - není přítomný | N- není známo R- různé reakce CAMP – test: pozitivní test je zesílení hemolýzy v přítomnosti toxigenního kmene <i>Staphylococcus aureus</i> nebo <i>Rhodococcus equi</i> |
|--|--|

Obr. 3. Klasifikace listerií podle kultivačních vlastností a biochemických znaků [39].

Patogeneze

Jednotlivé druhy listerií se liší virulencí pro pokusná zvířata a pro člověka. Všechny kmeny patogenní pro myš produkují hemolyzin listeriolysin, O-antigen je příbuzný streptolyzinu O, což nasvědčuje tomu, že může být faktorem virulence [40].

Naočkování listerií bezmikrobním zvířatům perorální cestou navodí infekci ve střevní stěně, někdy s následným průnikem do sleziny a jater. Kolonizaci sliznice tlustého střeva brání rezidentní flóra. Pomocnými faktory listeriové kolonizace tlustého střeva u člověka jsou onemocnění trávicího ústrojí, dysmikrobie (po podávání antibiotik) nebo porušení tkáně tlustého střeva [41].

Metody detekce *L. monocytogenes* v potravinách

Stále nejčastějším způsobem stanovení *L. monocytogenes* v potravinách je použití klasických kultivačních metod. Na jejich základe je založena i metoda popsaná v ČSN EN ISO 11290 1:1999. Jedná se však o metody časově náročné (5 až 8 dnů) a včasná diagnostika je vzhledem k progresivnímu průběhu onemocnění velmi důležitá. V posledních letech je proto vyvíjen značný tlak na vývoj nových, rychlejších metod. Tyto metody je možno roz-

dělit podle principu stanovení na moderní kultivační techniky, metody molekulárně-genetické a metody imunochemické [42].

Klasické kultivační metody

ČSN ISO 11290-1:1999

Prvním krokem je primární pomnožení listerií v selektivním médiu Fraser se sníženou koncentrací antibiotik. Toto pomnožení částečně inhibuje růst doprovodné mikroflóry a současně umožňuje oživení poškozených buněk listerií. Potom následuje selektivní sekundární pomnožení buněk v médiu Fraser s plnou koncentrací antibiotik. Výsledně pomnožená kultura je vždy naočkována na dvě selektivně-diagnostická agarová média (Oxford a PALCAM). Po inkubaci při teplotě 30, 35 nebo 37 °C se po 24 hodinách (popř. 48 hodinách) zjišťuje přítomnost kolonií *L. monocytogenes*. Každá z vybraných kolonií se očkuje na povrch neselektivního tuhého média TSYEA. Následuje kultivace 18 až 24 hodin při 35 nebo 37 °C. Potvrzení identity se provádí vhodnými morfologickými, fyziologickými a biologickými testy (hemolýza, fermentace sacharidů). Celková doba stanovení se pohybuje mezi 5 až 8 dny a vzhledem k vyhledávání suspektních kolonií po sekundárním pomnožení vyžaduje zkušené pracovníky [42].

Moderní kultivační metody

Moderní kultivační metody využívají k potvrzení příslušnosti k jednotlivým druhům listerií jejich biochemických vlastností. Jsou založeny na průkazu charakteristického enzymu způsobujícího přeměnu substrátu. Přeměna substrátu je přímo či nepřímo doprovázena změnou zabarvení média. Substráty jsou obsaženy buď v sérii tekutých kultivačních médií (API *Listeria* test) nebo jsou součástí speciálních tuhých pud (Rapid L. mono test, ALOA a COMPASS L. mono agar) [39].

2.3.5.2 *Salmonella*

Salmonely zauímají už po radu let první místo v poradí původců alimentárních infekcí a intoxikací v epidemiologických statistikách industrializovaných zemí – cca 40 – 50 % epidemiologicky charakterizovaných onemocnění a přibližně stejné procento v hodnocení mikrobiálních infekcí a intoxikací způsobených pouze mlékem a mléčnými výrobky. *Salmo-*

nella Enteritidis se v posledních letech stává nejčastěji izolovaným sérotypem, izolovaným z humánních salmonelóz i z potravin v mnoha zemích.

Salmonely způsobují enteritidy trvající 8 – 28 dní doprovázené abdominálními křečemi a horečkou. Většina sérotypu vyvolává pouze lokální zánětlivý proces. Systematické infekce působí jen některé vysoce virulentní sérotypy (*S. Typhi*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin*).

Salmonelóza se téměř výhradně přenáší fekálně – orální cestou, pomocí potravy nebo pitné vody, kontaminované infikovanými fekáliemi. Jen výjimečně dochází k přímé infekci stykem s infikovaným hostitelem, např. ošetřovatelky telat s nemocnými telaty, nebo přenosem z infikované matky na novorozeně při porodu.

Rod *Salmonella* z celedi *Enterobacteriaceae*, je po genetické stránce zřejmě jen jeden druh zahrnující cca 2500 sérotypů. Je označován různými druhovými jmény, které se od sebe liší různými kombinacemi antigenu vnější buněčné steny (O-), bičíku (H-) a kapsulárních antigenů (Vi- pokud jsou přítomny) [43].

O antigen je termostabilní, vůči alkoholu rezistentní lipopolysacharid. H antigeny jsou termolabilní proteiny podléhající působení etanolu a kyselin. Vi antigen je termolabilní polysacharid, důležitý pro identifikaci *S. Typhi* [44].

Pomocí DNA hybridizace bylo zjištěno, že téměř všechny sérotypy tvoří stejnou skupinu (výjimkou je *S. bongori*). Na základě těchto studií byl rod *Salmonella* rozdělen do dvou druhů: *Salmonella enterica* a *Salmonella bongori*.

Druh *S. enterica* se dělí do 6ti poddruhů (širší specifikace v *Obr. 4*) [45], [46]:

I *S. enterica* subsp. *enterica*

II *S. enterica* subsp. *salamae*

IIIa *S. enterica* subsp. *arizonae*

IIIb *S. enterica* subsp. *diarizonae*

IV *S. enterica* subsp. *houtenae*

VI *S. enterica* subsp. *indica*

(u sérotypu *S. bongori* byl ponechán symbol V)

| Charakteristika | "Subgenus" | | | | |
|---|------------|-------|-------|-------|---|
| | I | II | III | IV | V |
| β -galaktosidáza (OPNG test) | - | - n.x | + | - | + |
| Tvorba kyseliny z: | | | | | |
| laktóza | - | - | + n.x | - | - |
| dulcitol | + | + | - | - | + |
| mukát | + | + | d | - | + |
| galakturonát | - | + | d | + | + |
| Využití: | | | | | |
| malonát (jablečnan) | + | + | + | - | - |
| D-tartrát (vinan) | + | - n.x | - n.x | - n.x | - |
| hydrolýza želatiny | - | + | + | + | - |
| růst v přítomnosti KCN | - | - | - | + | + |
| Hostitelské organismy většiny kmenů: | | | | | |
| teplokrevná zvířata, člověk | + | - | - | - | - |
| studenokrevná zvířata | - | + | + | - | - |
| prostředí, studenokrevná zvířata | - | - | - | + | + |

+ - pozitivní pro 90 % nebo více kmenů během 1 – 2 dnů;

d - pozitivní pro 11 – 89 % kmenů během 1 – 2 dnů;

- - pozitivní pro 0 – 10 % kmenů během 1 – 2 dnů;

n.x - pozdní, nepravidelně pozitivní reakce.

Teplota při všech testech 37 °C

Obr. 4. Specifikace poddruhů *S. enterica*.

Morfologie, biochemie, fyziologie

Salmonely jsou gramnegativní rovné tyčinky, 0,7 – 1,5 μm x 2,0 – 5,0 μm , pohyblivé (s výjimkou sérotypu *S. Gallinarum* a *S. Pullorum*, které jsou vždy nepohyblivé). Biochemicky jsou velmi aktivní. Optimální teplota růstu je 35 – 37 °C, tepelné maximum a minimum závisí na kmenu. Růst je možný od 5 °C do 47 °C. Salmonely nepřežívají pasteraci s výdrží 16 – 17 s při teplotě vyšší než 65 °C, s výjimkou termorezistentního sérotypu *S. Seftengerg*. Optimální pH pro růst je v rozmezí 6,5 – 7,5, minimální pH pro růst závisí na typu

kyseliny, která acidifikuje prostředí. Kyselina octová a propionová inhibovaly růst už při pH 5,5, kyselina mléčná a jablečná v rozmezí pH 4,2 – 4,7, kyselina vinná, citrónová a chlorovodíková teprve při pH 4,05. Minimální teplota růstu se uvádí 5,5 – 6,5 °C a závisí nejen na sérotypu, ale i na trvání inkubace. K růstu při těchto nízkých teplotách je zapotřebí inkubace nejméně 12 – 19 dní. Tolerance salmonel ke koncentraci NaCl v prostředí vzrůstá se stoupající teplotou. Při 8 °C roste *S. Typhimurium* jen při koncentracích NaCl do 2 %, při optimální teplotě 37 °C se pomnožuje ještě při 7 – 8 % NaCl v médiu [43].

Patogeneze

Salmonelóza začíná tím, že se do trávicího ústrojí dostanou salmonely v dostatečném počtu, aby se překonaly obranné mechanismy organismu, zejména kyselá reakce v žaludku, a usídlí se v tenkém střevě. Aby k infekci došlo, musí se salmonely dostat do jícnu. Potvrdily to pokusy, při nichž se osoby neinfikovaly, když suspenzí kmenu různých sérotypu jen kloktaly [39].

Metody průkazu a stanovení *Salmonella* sp.

Metodika Standardu ISO předepisuje předpomnožení ze vzorku v pufrované peptonové vodě, selektivní pomnožení z předpomnožené kultury v selenitovém bujónu při 37 °C, vyočkování na selektivně – diagnostický agar s brilantovou zelení a fenolovou červení a na další selektivně – diagnostický agar podle volby uživatele. Vzhledem k existenci cca 2500 sérotypu salmonel a k jejich biochemické i biologické variabilitě nelze očekávat, že jeden určitý kultivační postup, používající jedno pomnožovací a jedno selektivně – diagnostické médium, bude poskytovat optimální podmínky pro všechny sérotypy a jejich varianty. Z imunologických testů se v praxi osvědčily ELISA-testy, TECRA a Salmonella Tek. Rambachuv agar je určen k urychlené identifikaci izolátu salmonel. Selektivní průkaz spočívá ve schopnosti salmonel fermentovat propylenglykol v médiu. Také Oxoid Rapid Salmonella Test je biochemický test, při kterém se pomnožená kultura očkuje do selektivního média v jedné ze dvou komůrek testovací soupravy, ze které salmonely (pokud jsou přítomny a pohyblivé) migrují do druhé komůrky s druhým testovacím médiem. Biochemické změny vyvolané aktivitou salmonel v obou médiích jsou signalizovány změnou barev indikátoru v obou médiích [43].

2.3.5.3 *Escherichia coli*

Taxonomie

Druh *Escherichia coli* zahrnuje 2 biotypy, z nichž biotyp I tvoří 95 %, biotyp II tvoří 5 % kmenu. Jednotlivé kmeny jsou charakterizovány kombinacemi O (stěnový), K (kapsulární) a H (bičkový) antigenu. Kmeny EEC (enteropatogenní *Escherichia coli*) tvoří 32 skupin sérovaru. Některé jsou rozšířeny po celém světě, jiné sérovary se vyskytují pouze v určitých geografických oblastech.

Kmeny EEC lze rozdělit do dvou skupin podle typu onemocnění, které způsobují [43]:

- kmeny označované EPEC a ETEC vyvolávají gastroenteritidy obdobné salmonelózám,
- kmeny označované EIEC a EHEC jsou původci onemocnění typu shigelové dysenterie.

Kmeny EPEC (enteropatogenní *E. coli*) způsobují kojenecké průjmy. Adherují k buňkám střevního epitelu, ve kterém působením cytotoxinu narušují transport kapalin a elektrolytu.

Kmeny ETEC (enterotoxigenní *E. coli*) jsou endemické v zemích třetího světa, kde způsobují průjmová onemocnění kojenců, dětí a podvyživených dospělých s vysokým procentem úmrtnosti.

Kmeny EIEC (enteroinvazivní *E. coli*) vyvolávají u člověka onemocnění typu úplavice. Nemají živočišné hostitele. Biologicky i antigeně jsou blízce příbuzné shigelám.

Kmeny EHEC (enterohaemorrhagická *E. coli*), jejichž hlavním epidemiologickým reprezentantem je v současné době sérotyp O157 : H7, způsobují u člověka onemocnění typu dysenterie, často komplikované uremicko – hemorragickým syndromem. Jako původci alimentárních infekcí se začaly objevovat v posledních cca 25 letech.

Morfologie, biochemie, fyziologie

Escherichia coli je gramnegativní tyčinka rozměru 1,1 – 1,5 µm x 2,0 – 6,0 µm, se zaoblenými konci, vyskytuje se jednotlivě, ve dvojicích nebo v krátkých řetězcích. Některé kmeny tvoří slizová pouzdra. *E. coli* je fakultativně anaerobní a biochemicky velmi aktivní. Biochemické znaky jsou však u jednotlivých kmenu variabilní, protože jsou přenosné na plas-

midech nebo transportech mezi různými kmeny *E. coli* i mezi *E. coli* a jinými bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae*. Vyskytují se ureázo-pozitivní kmeny, kmeny, které využívají malonát. Z hlediska diagnostiky je zvláště závažná a obtížná variabilita schopnosti zkvašovat laktózu s tvorbou plynu. Kmeny EIEC jsou laktózonegativní nebo fermentují pomalu, ale vyskytují se i laktózo- pozitivní kmeny jejich sérotypu. Naproti tomu laktózo- negativní kmeny jsou značně rozšířeny i mezi EPEC, ETEC, EHEC [43].

Optimální teplota růstu je 30 – 37 °C, roste v rozsahu teplot 10 – 45 °C. Nepřežívá záhřev po dobu 16 – 17 s při teplotách vyšších než 64,5 °C. Optimální pH pro růst je 6,8 – 7,2 [43].

Patogeneze

Escherichia coli je také široce rozšířeným střevním patogenem savců a ptáku, a ačkoli je vázána na fekální kontaminaci, nevyskytuje se samostatně mimo živočišné tělo. Některé kmeny jsou patogenní pro člověka a zvířata a způsobují septické infekce a průjemová onemocnění [39].

Metody průkazu a stanovení *Escherichia coli*

Standardní metoda CSN ISO 7251: 1996 „Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu suspektních *Escherichia coli*. Technika nejvýše pravděpodobného počtu“ používá jako selektivní médium laurylsulfátový bujón. K potvrzení pozitivních zkušavek (tvorba plynu) se vyočkovává do druhého selektivního média a do tryptonové vody, inkubují se při 45 °C [43].

2.3.5.4 *Staphylococcus aureus*

Výrobky kontaminované toxigenními kmeny *Staphylococcus aureus* jsou v industrializovaných zemích nejčastější příčinou alimentárních intoxikací způsobených mikroorganizmy [43].

Taxonomie

Rod *Staphylococcus* z čeledi *Micrococcaceae* zahrnuje v současné době 19 druhů, vesměs kožních komenzálů teplokrevných živočichů. *S. epidermidis*, ačkoliv je také oportunní pa-

togen, má v mlékárenské výrobě pouze technologický význam jako běžný kontaminant a nejčastější příčina kažení slazených kondenzovaných mléčných výrobků [43].

Morfologie, biochemie, fyziologie

Buňky *S. aureus* jsou koky průměru 0,5 – 1,0 µm, nepohyblivé. Dělí se ve třech k sobě kolmých rovinách, čímž vznikají nepravidelné „hroznovité“ shluky, typické pro r. *Staphylococcus*. Mimo tyto shluky se koky vyskytují jednotlivě nebo ve dvojicích. Některé virulentní kmeny tvoří slizová pouzdra. Buňky *S. epidermidis* jsou koky o průměru 0,5 – 1,5 µm, převážně ve dvojicích nebo tetradách, nepohyblivé. *S. aureus* i *S. epidermidis* jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní, rostou lépe v aerobních podmínkách. Energetický metabolismus je respirativní i fermentativní. Minimální a maximální teplota růstu a tvorbu enterotoxinu pro *S. aureus* je 10 – 45 °C, optimální pak 30 – 37 °C. *S. epidermidis* roste v rozmezí teplot 15 – 45 °C s optimem 30 – 37 °C. Oba druhy rostou v rozmezí pH 4,2 – 9,3, optimální pH pro růst je 7,0 – 7,5 [43].

S. aureus je halotolerantní až mírně halofilní, roste dobře ještě při koncentraci 10 % NaCl v médiu, růst je inhibován při 15 % NaCl. *S. epidermidis* roste dobře při 7,5 % NaCl a je inhibován při koncentracích nad 10 % NaCl. Stafylokoky jsou také osmotolerantní a rostou při a_w tolerovaná nehalofilními bakteriemi [43].

Stafylokoky jsou poměrně rezistentní k vyšším teplotám, tj. vyšší jak 60 °C. Podle studií prováděných s různými kmeny za rozdílných podmínek mohou přežívat při 60 – 62 °C po dobu 30 – 120 min [43].

Patogeneze

Staphylococcus aureus je podmíněný patogen, přítomný v nose a na kůži. Infikuje nejčastěji místa se sníženou rezistencí, například poškozenou kůží, sliznice nebo hematomy v měkkých tkáních [39].

Metody průkazu stanovení *Staphylococcus aureus*

Metoda Standardu IDF pro mléko a mléčné výrobky uvádí dva kultivační postupy :

- pro vzorky s očekávaným nízkým počtem *S. aureus* < 150/ml nebo 150/g stanovení metodou MPN kultivací za anaerobních podmínek v selektivním bujónu s teluricitanem draselným a NaCl podle Giolitti – Cantoniho,
- pro vzorky s očekávaným počtem *S. aureus* > stanovení počítáním kolonií na Baird – Parkerově agaru.

Pro rychlé orientační vyšetření výrobku, ve kterých se předpokládá vysoký nárůst stafylokoků – např. při podezření, že výrobek způsobil stafylokokovou intoxikaci – doporučuje CSN vyočkování z neředěných vzorku na krevní agar nebo na některý ze selektivních krevních agarů. Přímé vyočkování vzorku mléka na krevní agar se používá také při vyšetření mastitidních mlék na přítomnost *S. aureus*. K nepřímému orientačnímu průkazu přítomnosti enterotoxinu ve vzorcích lze použít termonukleázový test [43].

2.3.5.5 *Clostridium botulinum*

Taxonomie

Druhy *Clostridium perfringens* a *Clostridium botulinum* jsou obligátně anaerobní, grampozitivní, sporulující bakterie r. *Clostridium*, čeledi *Bacillaceae*. *C. botulinum* (A – G) je umělý druh, vytvořený pro účely medicínské mikrobiologie zařazením několika morfologicky i fyziologicky odlišných druhů klostridií pod společné druhové jméno. Společnou charakteristikou této skupiny je působení jejich neurotoxinů které vyvolávají shodný typ onemocnění. K diferenciaci jednotlivých druhů uvnitř r. *Clostridium* pomocí morfologických znaku slouží tvar a uložení spor uvnitř buňky a tvary sporulujících buněk, k biochemické diferenciaci slouží sacharolytická a proteolytická aktivita. Nejčastější příčinou onemocnění botulismem jsou typy A, B a E [39], [43].

Morfologie, biochemie, fyziologie

Clostridium botulinum (typy A – G)

Jsou grampozitivní, sporulující tyčinky, jednotlivé, v párech nebo krátkých řetězcích. Průměr spor je větší než průměr vegetativní buňky, takže nadouvají sporulující buňku, která má tvar vřetena nebo rakety. Jednotlivé typy (A – G) se od sebe liší rozměry vegetativních buněk, přítomností exosporia, schopností rozkládat kasein, produkovat sirovodík, štěpit

různé glycidy, tvořit lecitinázu i rozdílnou optimální teplotou růstu. Vegetativní buňky nepřežívají pasteraci, spory pasterací poškozovány nejsou [43].

Patogeneze

Lidský botulismus je závažná, často smrtelná forma otravy z potravin, se zřetelnými neurotoxickými účinky. Onemocnění vzniká po požití různých potravin, obvykle šunky, velkých klobás, doma připravených masných pokrmů ze zeleniny a konzervovaných výrobků, jako je játrová paštika a pomazánka z lískových oříšků. Kmeny *Clostridium botulinum* typu E jsou obzvláště často spojeny s onemocněním z mořských ryb, zatímco zdrojem typu A a B je půda [39].

Metody průkazu a stanovení patogenních klostridií

Ke stanovení počtů *C. botulinum* se využívá standardní metoda ISO. Metodika Standardu se zakládá na vyočkování přímo ze vzorku na selektivně-diagnostický agar TSC. Ten obsahuje jako selektivní agens D – cykloserin a k diagnostickým účelům využívá schopnosti klostridií redukovat sulfity. Potvrzení se provádí několika biochemickými testy. Jestliže je podezření, že určitá potravina způsobila botulismus, provádí se průkaz toxinu a přítomnosti *C. botulinum* v potravine podle ČSN 560090 *Potravinářské výrobky. Průkaz botulinických toxinů a Clostridium botulinum* [39].

2.3.6 Mikroorganismy produkující nebezpečné látky (biogenní aminy, mykotoxiny)

Biogenní aminy

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární dusíkaté látky odvozené od aminokyselin. Aminokyseliny jsou přítomny ve všech živých organizmech, kde tvoří základní složku proteinů a peptidů. Biogenní aminy se přirozeně vyskytují u živočichů, rostlin a mikroorganismů, kde plní významné fyziologické funkce. V organismu jsou především zdrojem dusíku pro biochemické reakce. Biogenní aminy mohou mít význam nejen jako hormony, např. adrenalin, histamin, ale může se jednat i o stavební látky, které se účastní na biosyntéze dalších hormonů, např. fenyletylamin. Hornin a gramin se řadí mezi biogenní aminy působící v organismu jako protoalkaloidy. Ve vyšších koncentracích mohou mít však negativní vliv na lidský organismus a bývají náznakem kažení potravin. Proto se biogenní aminy občas vyu-

žívají jako indikátory jejich čerstvosti. Nejdůležitější biogenní aminy jsou uvedeny v Tab. 2. [47-50].

Tab. 2. Triviální názvy nejdůležitějších biogenních aminů, jejich systematický název a zařazení do skupin [48].

| Název triviál- | Název systematický | Zařazení |
|----------------|------------------------------------|---------------------------|
| Histamin | 2-(1H-imidazol-5-yl) etamin | Heterocyklické, monoaminy |
| Tyramin | 4-(2-aminoethyl) fenol | Aromatické, monoaminy |
| Fenyletylamin | 2-fenyletanamin | Aromatické, monoaminy |
| Tryptamin | 2-(1H-indol-3-yl) etanamin | Heterocyklické, monoaminy |
| Serptonin | 3-(2-aminoethyl)-1H-indol-5-ol | Heterocyklické, monoaminy |
| Putrescin | butan-1,4-diamin | Alifatické, polyaminy |
| Kadaverin | pentan-1,5-diamin | Alifatické, polyaminy |
| Spermidin | N-(3-aminopropyl) butan-1,4-diamin | Alifatické, polyaminy |
| Spermin | N,N'-bis(3-aminopropyl) butan-1,4- | Alifatické, polyaminy |

Mykotoxiny

Vznikají jako sekundární metabolity některých plísní. Do živočišných produktů se dostávají sekundárně, zkrmováním kontaminovaného krmiva.

Aflatoxiny, jejichž hlavními producenty jsou *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*, přecházejí z mléka až do sýrů. Při průchodu mléčnou žlázou se původní aflatoxiny B¹, B², G¹, G² přeměňují na metabolity M¹, M², které jsou podstatně toxičtější [36].

Méně běžným mykotoxinem v sýrech je kyselina cyklopiazonová produkovaná plísní *Penicillium camemberti*. Jde o látku středně toxickou, při otravě postihující trávicí ústrojí, ale i nervový a imunitní systém. Vzhledem k teratogenitě u celé řady druhů zvířat, je teratogenita pro člověka vysoce pravděpodobná. Kyselina cyklopiazonová může reagovat s blokátory vápenatých kanálků, což jsou léky podávané při vyšším krevním tlaku a chronických srdečních potížích. Zvýšená produkce této kyseliny je při kombinaci plísní *Penicillium camemberti* a *Penicillium roqueforti* [51], [52].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo:

- provést mikrobiologickou analýzu u různých druhů sýrů (mezofilní mikroorganismy, koliformní bakterie, psychrotrofní mikroorganismy a *L. monocytogenes*);
- izolovat kolonie ze selektivně diagnostických půd (Listeria Oxford Agar, Endův agar) a provést testy (morfologické, fyziologické a molekulárně biologické) vedoucí k identifikaci izolátů;
- vyhodnotit mikrobiologickou kvalitu zrajících sýrů dostupných v obchodních řetězcích v ČR.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Přístroje a pomůcky

- centrifuga laboratorní - chlazená Z 300 K, HERMLE, Labortechnik, Německo;
- fotoaparát Samsung PL 55;
- fotoaparát PowerShot G6 Canon, Japonsko;
- denzitometr DENZI-LA-METER, EMO Česká republika;
- inkubátor mikrobiologický Memmert, Německo;
- mikropipety: Nichipet (Japonsko), Hirschmann Laborgerate (Německo), Eppendorf;
- mikrovlnná trouba Electrolux EMM 2005, Švédsko;
- parní sterilizátor VARIOKLAV 75S, 135S, H+P Labortechnik, Německo;
- pH metr HANNA pH 211 Fisher Scientific, spol. s r.o., Česká republika;
- předvážky KERN 440-47N (Max 2000 g, d = 0,1 g), Německo;
- stomacher, Seward, Velká Británie;
- termoblok Bio TDB-100, Biotech, Česká republika;
- termocykler DNA Engine, Biotech, Česká republika;
- termostat BT120, Česká republika;
- transiluminátor (dokumentační systém pro elektroforézu), Česká republika;
- vortex Heidolph REAX top, Německo;
- zařízení pro elektroforézu model B1A, OWL Separation Systems, Inc., USA;
- zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Major Science MP-300N, Taiwan;
- běžné laboratorní sklo a mikrobiologické vybavení.

4.2 Chemikálie

Kultivační média

Média byla připravena rozpuštěním daných složek v destilované vodě a následnou sterilizací při 121 °C po dobu 15 minut.

MPA 2 (masopeptonový agar) :

10 g masový výtazek (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Indie)

| | |
|------|---|
| 10 g | pepton (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Indie) |
| 5 g | NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod) |
| 15 g | agar (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Indie) |

Endo agar (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Indie):

Byl připraven rozpuštěním 41,5 g v 1 l destilované vody.

Listeria Oxford Medium Base (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Indie):

| | |
|------------|---|
| 27,75 g | Listeria Oxford Medium Base |
| 1 lahvička | Oxford Listeria Supplement, Modified 029 (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Indie) |
| 5ml | etanol (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod) |
| 500ml | H ₂ O |

Fraser bujón:

| | |
|---------|---|
| 5 g | masový pepton (pepticky natrávená živočišná tkáň) |
| 5 g | trypton (pepticky natrávený kazein) |
| 5 g | masový extakt |
| 5 g | kvasničný extrakt |
| 20 g | chlorid sodný |
| 12 g | hydrogenfosforečnan disodný dihydrát |
| 1,35 g | dihydrogenfosforečnan draselný |
| 1,0 g | eskulin |
| 1000 ml | H ₂ O |

Medium pro fermentaci cukrů (pH 7,2):

| | |
|------|--|
| 3 g | masový výtazek (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie) |
| 10 g | pepton (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie) |

| | |
|-----------|--|
| 5 g | NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod) |
| 0,1 g | bromkrezolová červeň |
| 1000 ml | H ₂ O |
| 1 g cukr: | laktóza (Lachema a.s., Brno), rahmnóza (Lachema a.s., Brno), xylóza (Lachema a.s., Brno) |

Živný agar pro stanovení kvasinek a plísní „GKCHA“ (BIO-RAD, Francie)

Byl připraven rozpuštěním 41,1 g v 1 l destilované vody.

OF – Test s agarem:

| | |
|---------|--|
| 3 g | masový výtažek (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie) |
| 5,0 g | pepton (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie) |
| 3,0 g | NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod) |
| 10,0 g | D-glukóza (Lachema a.s., Brno), |
| 10,0 ml | bromthymolová modř – 1,5% alkoholický roztok |
| 15 g | agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie) |
| 1000 ml | H ₂ O |

Fyziologický roztok:

| | |
|---------|---|
| 8,5 g | NaCl (Ing. Petr Lukeš, Česká republika) |
| 1000 ml | H ₂ O |

Z biochemických testů Lachema Mikro-LA-Test byla použita souprava ENTEROtest 24. Identifikace byla doplněna testy od stejného výrobce, dodávanými ve formě detekčních proužků: OXItest. Pro detekci výsledku byla použita činidla k identifikačním soupravám Mikro-LA-Test (VPT I, VPT II, Indol, Fenylalanin).

Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

50x TAE pufr (Tris-acetátový pufr):

- 121 g TRISMA-base (Sigma, USA)

- 50 ml 0,5 M EDTA (pH 8, Lach. – Ner. s.r.o., Česká republika)
- 28,55 ml ledová kyselina octová (Lachema a.s., Česká republika)

Jednotlivé složky byly doplněny destilovanou vodou do 0,5 l.

Nanášecí pufr:

- 10 mg bromfenolová modř (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)
- 600 µl 10% SDS (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)
- 1,2 ml glycerol (PENTA, Ing, Petr Švec, Česká republika)

Vše bylo doplněno do 10 ml destilovanou vodou.

Agarózový gel (1,1%)

- 2,2 g agaróza pro elektroforézu DNA (SeaKem, USA)
- 200 ml 1x koncentrovaný TAE pufr
- 10 µl etidium bromid (roztok 10 mg/ml, SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)

Komponenty pro PCR

Reakční směs pro PCR je složena z teplotně-rezistentní DNA-polymerázy, pufru, dNTP, templátové DNA a dvojice primerů [53].

Teplotně rezistentní DNA-polymeráza

Termostabilita DNA-polymerázy je důležitou podmínkou reakce, protože jedním z kroků polymerázové řetězové reakce je denaturace. Denaturace je prováděna při teplotě asi 95 °C, při které jsou všechny běžné enzymy inaktivovány. Použitím termostabilní DNA-polymerázy je zajištěna dostatečná aktivita enzymu po celou dobu amplifikace. Nejčastěji používanou polymerázou je *Taq* DNA-polymeráza. Její název je odvozen z druhového názvu bakterie *Thermus aquaticus*, ze které byla polymeráza izolována. Tato bakterie se vyskytuje v která se vyskytuje ve vývěrech horkých minerálních pramenů [54], [55].

PCR pufr

Základem pufru pro PCR je síran amonný nebo chlorid draselný. V pufru je dále obsažena Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C) a chlorid hořečnatý, ale PCR pufr může být dodáván i bez něho, čímž je usnadněna optimalizace reakčních podmínek [53].

dNTP mix

dNTP mix je vodný roztok čtyř deoxyribonukleotidů (dATP: 2'-deoxyadenosin-5'-trifosfát, dCTP: 2'-deoxycytidin-5'-trifosfát, dGTP: 2'-deoxyguanosin-5'-trifosfát a dTTP: 2'-deoxythymidin-5'-trifosfát), které se komerčně dodávají většinou ve formě sodných solí o pH 7,0-7,5. Ve směsi bývá dle výrobce zpravidla každý z nukleotidů v koncentracích 2,5 mM; 10 mM (nejčastěji), 25 mM nebo např. 100 mM. dNTP směs se zpravidla uchovává při teplotách -20 °C ± 5 °C do expirační doby uvedené výrobcem a zpravidla snáší opakované zmrazování a rozmrazování [53].

Templátová DNA

Cílová DNA může být získána z různých zdrojů, z buněk prokaryot, eukaryot a virů. V této práci byla DNA získávána jednoduchou lyzí buněk za použití varu a dále metodou izolace pomocí Tritonu X [53].

Primery

Primery jsou krátké syntetické oligonukleotidy o známé sekvenci, které jsou zpravidla tvořeny 20-25 nukleotidy. Jsou komplementární ke koncovým oblastem fragmentu DNA, jenž má být amplifikován [55], [56]. Pro experimenty byly použity DNA primery uvedené v Tab. 3. V této práci byli použity primery PrfA1 R a F, které ohraničují gen pro transkripční faktor virulentních genů (např. hemolyzinu) [57].

Tab. 3. Použité primery pro PCR.

| Primery | Sekvence nukleotidů 5'-3' | Velikost PCR produktu |
|---------|---|-----------------------|
| PrfA1 R | CTG TTG GAG CTC TTC TTG GTG AAG CAA TCG | 1060 bp |
| PrfA1 F | AGC AAC CTC GGT ACC ATA TAC TAA CTC | |

4.3 Metody

Práce byla rozdělena na dva experimenty, které byly odděleny časově.

4.3.1 Použité vzorky

V Experimentech 1 a 2 byly testovány vzorky, které jsou popsány v *Tab. 4 a 5*.

Tab. 4. Tabulka vzorků sýrů použitých pro Experiment č. 1.

| Označení | Název sýru | Výrobce | Zakoupeno | Obchodní řetězec |
|----------|--|--------------------------------|----------------------------|------------------|
| 1 | Sedlčanský romadůžek | Povltavské mlékárny | 5.5.2010 | Kaufland |
| 2 | Romadur | Madeta a.s. | 5.5.2010 | Kaufland |
| 3 | Niva | Madeta a.s. | 5.5.2010 | Kaufland |
| 4 | Pivní sýr | Sýrárna bratří Brunnerů s.r.o. | 5.5.2010 | Kaufland |
| 5 | Syrovátkový sýr s kmínem – BREINTUNGEN | Sýrárna Breinturger – SRN | A 5.5.2010; B 19.5.2010 | Kaufland |
| 6 | Přírodní zrající sýr – jemné tvarůžky | Sýrárna Breinturger – SRN | 5.5.2010 | Kaufland |

Tab. 5. Tabulka vzorků sýrů použitých pro Experiment č. 2.

| Označení | Název sýru | Výrobce | Zakoupeno | Obchodní řetězec |
|----------|--------------------------|--------------------------|-----------|------------------|
| 1 | Romadur | Madeta a.s. | 26.5.2010 | Albert |
| 2 | Pravé Olomoucké tvarůžky | A.W. spol. s.r.o. | 26.5.2010 | Albert |
| 3 | Pivní sýr | Sýrárna bratří Brunnerů | 26.5.2010 | Albert |
| 4 | Romadůžek | Povltavské mlékárny a.s. | 26.5.2010 | Albert |
| 5 | Blaťácké zlato | Madeta a.s. | 26.5.2010 | Albert |
| 6 | Pepin | Povltavské mlékárny a.s. | 26.5.2010 | Albert |
| 7 | Hermadur | Pribina, spol. s.r.o. | 26.5.2010 | Albert |
| 8 | Sýr s bílou plísní Al- | Ahold s.r.o. | 26.5.2010 | Albert |

| | | | | |
|----|---------------------|----------------------------|-----------|--------|
| 9 | Stříbrňák | MW Oberfranken-West SRN | 26.5.2010 | Albert |
| 10 | Niva | Madeta a.s. | 26.5.2010 | Albert |
| | Sýr s modrou plísní | | 26.5.2010 | Albert |
| 11 | Albert | Madeta a.s. | | |
| 12 | Karel IV. | Lactalis CZ, s.r.o. | 26.5.2010 | Billa |
| | | Milex Nové Město na | 26.5.2010 | Billa |
| 13 | Camembert clever | Váhom a.s. | | |

4.3.2 Příprava vzorků sýrů

Při odběru vzorků byly dodrženy aseptické podmínky a používány sterilní nástroje. Pomocí pinzety a nůžek bylo odebráno cca 10 g vzorku sýru, který byl dán do sterilního sáčku se 90 ml fyziologického roztoku. Stejně se postupovalo u všech vzorků. Sáčky se vzorky sýrů se umístily na třepačku, kde po dobu 2 minut proběhla homogenizace. Ze získané suspenze bylo vytvořeno desítkové ředění do takového stupně, aby bylo možné stanovit počet mikroorganismů v 1 g daného vzorku. Bylo pipetováno 100 µl vzorku z vybraných ředění souběžně na dvě Petriho misky s příslušnou živnou půdou. Inokulum bylo rozetřeno sterilní hokejkou a následovala kultivace v podmínkách pro sledovanou skupinu mikroorganismů. Výsledky byly vyjádřeny jako CFU/g sýru a zlogaritmovány.

4.3.3 Mikrobiologický rozbor

U připravených vzorků byly stanovovány celkové počty mezofilních a psychrotrofních mikroorganismů, koliformních bakterií a bylo provedeno stanovení *Listeria monocytogenes*. Při testování byly použity následující typy půd (podrobný popis viz kapitola 4.2):

Maso-peptonový bujón č. 2

- pro stanovení mezofilních aerobních mikroorganismů, kultivace při teplotě 30 °C/48 hodin;
- pro stanovení psychrotrofních mikroorganismů, kultivace při teplotě 8 °C/10 dní.

Endův agar

- pro detekci a rozlišení laktóza pozitivních a laktóza negativních koliformních bakterií, kultivace probíhala při teplotě 37 °C/24 hodin.

Živný agar pro stanovení kvasinek a plísní (GKCHA)

- pro stanovení kvasinek a plísní, kultivace probíhala při teplotě 25 °C/72 hodin

Stanovení *L. monocytogenes* dle normy ČSN ISO 11290-1: 1996 [58]

- stanovení probíhalo dle normy – nejdříve bylo provedeno předpomnožení 25 g vzorku v 225 ml ½ Fraser bujónu, kultivace 30 °C/24 h,
- následně bylo přeočkováno 0,1 ml do 10 ml 1/1 Fraser bujónu, kultivace 37 °C/24 h,
- inokulace selektivně diagnostické půdy Listeria Oxford Agar, kultivace 37 °C/24h.

Stanovení *L. monocytogenes* dle normy ČSN ISO 11290-2: 1999 [59]

- homogenizovaný vzorek byl aplikován v množství 100 µl a v příslušném ředění na půdu Listeria Oxford Agar (LOA). Kultivace probíhala při teplotě 37 °C/24 hodin.

4.3.4 Základní identifikační testy

Gramovo barvení

Jde o barvení fixovaného preparátu krystalovou violetí a následující moření buněk jódem v roztoku KI. Vzniká komplex barvivo, jód a složky buněčné stěny. Tento komplex se tvoří v grampozitivních i v gramnegativních bakteriích. Rozdíl vzniká při promývání preparátu organickým rozpouštědlem (acetonem nebo alkoholem). Z gramnegativních bakterií se komplex vymývá a odbarvují se, grampozitivních bakterie si zbarvení ponechávají [60].

Postup barvení

- Na podložní sklo byla kápnuta kapka destilované vody a do ní rozetřena testovaná kultura.
- Po zaschnutí nátěru byla provedena fixace preparátu protažením podložního skla nesvítivým plamenem kahanu.

- Fixovaný preparát byl převrstven krystalovou violetí po dobu 60 sekund.
- Barvivo bylo slito, preparát byl krátce opláchnut vodou (cca 2 sekundy).
- Nátěr byl dále převrstven, Lugolovým roztokem, po dobu 30 sekund. Poté bylo barvivo slito a podložní sklo krátce opláchnuto vodou.
- Preparát byl následně odbarvován kyselým em po dobu 20-30 sekund.
- Nátěr byl posléze dobarven zředěným karbolfuchsinem po dobu 30–60 sekund.
- Sklo bylo opláchnuto vodou a osušeno přiložením filtračního papíru. Poté bylo dosušeno vysoko nad plamenem.
- Na usušený nátěr byl kápnut imerzní olej a bylo provedeno mikroskopické pozorování za použití imerzního objektivu (zvětšení 10×100) [61].

KOH test

Gramova reakce je u některých bakterií závislá na fyziologickém stavu buňky a na složení kultivačního prostředí. Mikroorganismy se tedy mohou jevit jako gramvariabilní nebo jako gramnegativní i když jejich složení buněčné stěny je grampozitivního typu. Pro ujištění, zda se jedná o gramnegativní bakterie slouží sklíčkový test pomocí 3% hydroxidu draselného. Principem je lyze vnější buněčné stěny a plazmatické membrány u gramnegativních bakterií. Dochází zde k zásadité hydrolýze [60].

- Na podložní sklíčko byla nanášena 1 kapka 3 % KOH.
- Sterilní kličkou byla přenesena 24 hod. kultura z pevného média do kapky 3% KOH a byla promíchána.
- Během 5 – 60 vteřin byla hodnocena viskozita (která je pozitivní reakcí).

OF test (Oxidačně-fermentační test)

Tento test slouží ke zjištění, zda mikroorganismy okyselují sacharidy oxidativně nebo fermentativně. OF test se hlavně využívá pro základní odlišení rodu *Pseudomonas* a jiných gramnegativních nefermentujících bakterií od čeledi *Enterobacteriaceae*. Obvyklým sacharidem použitým v médiu je glukóza, která je, v případě fermentace, štěpena na dvě molekuly trióz, ze kterých pak vzniknou dvě molekuly kyseliny pyrohroznové. Test se provádí paralelně ve dvou zkumavkách, kdy v jedné je médium překryté vrstvou parafinu. U fermentujících bakterií dojde ke kyselé reakci v obou zkumavkách, u bakterií okyselujících glukó-

zu oxidativně pak jen v případě u parafinem nepřekrytého média. Bromthymolová modř je acidobazickým indikátorem a přechází z kyselé žluté formy na zásaditou modrou v oblasti pH 6,0 - 7,6. Jelikož stupeň produkce kyseliny oxidativním metabolizmem je menší než u fermentace, a protože většina bakterií produkuje z peptonu zásadité látky, malé množství kyseliny produkované oxidativním metabolizmem může být úplně zneutralizováno. Proto se při přípravě média používá větších koncentrací sacharidu a minimálních koncentrací peptonu [60].

- Byla provedena inokulace vpichem do středu média ve zkumavce.
- Pozitivní reakcí byla žlutě zbarvená, negativní reakce zůstala beze změny (zeleně zbarveno) nebo modře zbarveno.

Test na produkci katalázy (KAT test)

Test slouží k detekci enzymu katalázy a primárně se užívá při rozlišení rodu *Streptococcus* (-) od *Micrococcus* (+) a *Staphylococcus* (V+), a dále např. *Bacillus* (+) od *Clostridium* (V-), z gramnegativních zejména *Kingella* spp. Za účasti katalázy dochází ke katalytické přeměně H_2O_2 na H_2O a O_2 . Kataláza se nachází ve většině aerobních a fakultativně anaerobních bakterií. Striktní anaerobové katalázu postrádají. Test se provádí při pokojové teplotě. Doporučuje se provádět sklíčkovou metodu, kdy na podložní sklíčko je nanášeno kličkou nebo inokulační jehlou malé množství bakteriální kultury, která je zakápnuta 3% H_2O_2 . Pozitivní reakcí je bezprostřední vývoj kyslíku v podobě drobných bublin po zakápnutí peroxidem [60].

Test na produkci cytochromoxidázy (OXI test)

Test slouží k diferenciaci druhů rodu *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas* aj. Přítomnost cytochromoxidázy je detekována barevnou reakcí N,N-dimethyl-1,4-fenylendiaminu s α -naftolem za vzniku indolfenolové modři. Provedení a hodnocení testu viz. návod výrobce (Příloha P I) [60].

Komerční diagnostická souprava

ENTEROtest 24 (PLIVA-Lachema Diagnostika)

Souprava obsahuje 24 biochemických testů a je schopna umožnit identifikovat 40 kmenů bakterií z čeledě *Enterobacteriaceae*. Provedení a hodnocení testu viz. návod výrobce (Příloha II).

Test na zkvašování cukrů

- Byla připravena média pro fermentaci cukrů obsahující 1 % daného cukru – laktóza, rhamnóza, xylóza.
- Média byla rozpipetována do zkumavek po 5 ml a vysterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.
- Po vychladnutí byly zkumavky naočkovány čerstvými kulturami pomocí sterilních kliček a byly kultivovány při 30 °C po dobu 2 dní.
- Byly zaznamenány barevné změny.

4.3.5 Izolace DNA z bakteriální kultury pomocí TRITON X – 100

- Přes noc narostlá suspenze bakteriální kultury v tekuté půdě (1,5 ml) byla odstředěna při 3000 ot./15 minut,
- sediment byl resuspendován ve 300 µl 0,5% sterilního roztoku TRITON X – 100 (Sigma Aldrich, USA),
- směs byla inkubována v suchém inkubačním bloku při teplotě 95 °C/10 minut,
- po vychladnutí bylo ke směsi přidáno 5 µl roztoku (20 mg/ml) proteinázy K (Sigma Aldrich, USA),
- směs byla inkubována při 55 °C/30 minut,
- po inkubaci byl obsah odstředěn při 6000 ot./10 minut,
- supernatant byl použit jako templátová DNA do PCR.

4.3.6 Izolace DNA varem

Kolonie z pevné agarové půdy byly resuspendovány ve 100 µl 1x ThermoPol reakčního pufru (NEB, USA), který je dodáván s DNA polymerázou. Po řádné homogenizaci byl takto připravený vzorek ošetřen v suchém inkubačním bloku teplotou 100 °C/10 minut. Po centrifugaci (3000 ot./10 minut) byl supernatant použit do PCR jako templátová DNA.

4.3.7 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je enzymová metoda umožňující namnožení definovaného úseku DNA *in vitro*. DNA je možno z buněk získat pouhou lyzí varem nebo pomocí chemikálií např. fenol-chloroform, Triton X. V této práci byly použity oba postupy přípravy vzorku (kapitoly 4.3.5, 4.3.6). Prvním krokem metody je oddělení vlákna dvoušroubovice DNA denurací teplem (94 °C). Následuje hybridizace primeru ke komplementárnímu úseku DNA (60 °C) a následně probíhá syntéza nového řetězce DNA DNA polymerázou (při 74 °C) [62].

PCR reakční směs – celkový objem 25 µl:

- 18,9 µl destilovaná voda
- 2,5 µl ThermoPol reakční pufr (NEB, USA)
- 2,5 µl matricové DNA
- 0,5 µl dNTP mix (Jena Bioscience, Německo)
- 0,25 µl každého primeru (*Tab. 3*)
- 0,1 µl *Taq* DNA polymeráza (NEB, USA)

Amplifikační reakce:

| | |
|-------------------|---------------|
| Úvodní denaturace | 94 °C/5 minut |
| Opakování cyklu | 35x |
| Denaturace | 94 °C/30 s |
| Annealing | 60 °C/30 s |
| Extenze | 74°C/1 minuta |
| Závěrečná extenze | 74 °C/5 minut |
| Chlazení | 4 °C/ ∞ |

PCR produkty byly detekovány elektroforézou v 1,1% agarózovém gelu v přítomnosti etidium bromidu. Po rozdělení v elektrickém poli byly gely pozorovány a dokumentovány pod UV světlem.

Příprava agarózového gelu (1,1%)

- Bylo naváženo 2,2 g agarózy a přidáno 200 ml 1x koncentrovaného TAE pufru.
- Směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě.

- Po zchlazení na 45 °C byly přidány 10 µl etidium bromidu (EtBr).
- Takto připravený agarózový gel byl nalit do předem nachystané formy s hřebínkem a nechal se zatuhnout ve vodorovné poloze při laboratorní teplotě.
- Po zatuhnutí byl hřebínek opatrně odstraněn.

Elektroforéza:

- Připravený gel byl vložen do elektroforetické vany a zalit 1x TAE pufrem tak, aby byl celý gel ponořen.
- Do první jamky gelu bylo nanášeno 15 µl 100 bp DNA markeru.
- Do ostatních jamek bylo nanášeno 25 µl vzorku smíchaného s 5 µl nanášecího puf-ru.
- Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji elektrického napětí a elektroforéza byla spuštěna po dobu 50 minut/90 V.

Vizualizace DNA:

- Po proběhnutí elektroforézy byl gel vyjmut z elektroforetické vany a umístěn na UV transiluminátor a prohlížen pod UV světlem.
- Pro dokumentaci byl gel vyfotografován.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Praktická část této diplomové práce byla rozdělena časově na dva experimenty. V Experimentu č. 1 bylo zakoupeno 6 různých vzorků zrajících sýrů (*Tab. 4*) od různých výrobců z obchodní sítě Kaufland. U těchto vzorků bylo provedeno stanovení celkového počtu mezofilních mikroorganismů, koliformních bakterií a kvantitativní stanovení *L. monocytogenes* (ČSN EN ISO 11290-2) [59]. Jeden sýr byl pro porovnání zakoupen opakovaně po 14 dnech a navíc bylo provedeno stanovení psychrotrofních mikroorganismů a kvalitativní analýza na stanovení přítomnosti *L. monocytogenes* (ČSN EN ISO 11290-1) [58].

V Experimentu č. 2 bylo zakoupeno celkem 13 zrajících sýrů (*Tab. 5*) dostupných v obchodních řetězcích Albert a Billa. U těchto vzorků bylo provedeno kvalitativní stanovení *L. monocytogenes* na půdě LOA. Pro rozšíření analýzy byly vybrány čtyři vzorky k následnému chladničkovému skladování. Po 30 dnech skladování byl proveden celkový mikrobiologický rozbor těchto čtyř vzorků.

5.1 Mikrobiologická analýza

5.1.1 Experiment č. 1

Celkové počty sledovaných mikroorganismů jsou uvedeny v *Tab. 6*.

Tab. 6. Množství sledovaných skupin mikroorganismů (CFU/g) u 6 druhů sýrů.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | 6 |
|------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | | | | A | B* | |
| Mezofilní mikroorganismy | $4,4 \cdot 10^8$ | $2,7 \cdot 10^7$ | $4,7 \cdot 10^5$ | $4,2 \cdot 10^7$ | $6,2 \cdot 10^8$ | $4,4 \cdot 10^8$ | $5,6 \cdot 10^5$ |
| Koliformní bakterie | — | $4,5 \cdot 10^6$ | — | — | $1,7 \cdot 10^6$ | $3,5 \cdot 10^4$ | $2,7 \cdot 10^4$ |
| 11290-1 | X | X | X | X | X | $2,6 \cdot 10^2$ | X |
| 11290-2 | — | — | — | — | — | X | — |
| Psychrotrofní mikroorganismy | X | X | X | X | X | $4,2 \cdot 10^8$ | X |

| | |
|-----------------|--|
| X: neděláno | 1 – Sedlčanský Romadůžek, 2 – Romadur, 3 – Niva, 4 – Pivní sýr, 5 |
| —: nedetekováno | – Syrovátkový sýr s kmínem BREINTUGEN, 6 – Přírodní zrající sýr – Jemné tvarůžky |
| | * - Sýr 5B byl zakoupen o dva týdny později |

Z výše uvedené Tab. 6 lze posoudit jednotlivé počty mikroorganismů (CFU/g) u testovaných sýrů. Z hlediska, že ČSN 56 9609 neuvádí u těchto druhů sýrů maximální CFU/g mezofilních mikroorganismů, nemůžeme tedy posoudit, zda dané sýry splňují tento parametr [63]. Celkové počty mezofilních mikroorganismů se pohybují mezi 10^5 - 10^8 CFU/g. Tato mikroflóra může být tvořena zejména startovacími kulturami *Lactobacillus* nebo *Lactococcus*, dále *Leuconostoc*, *Pediococcus*, v případě sýrů zrajících pod mazem také *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* [27].

Při hodnocení koliformních bakterií je však zřejmé, že daný limit (10^4) [63] byl u tří sýrů (2 - Romadur, 5 - Syrovátkový sýr s kmínem BREINTUGEN, 6 - Přírodní zrající sýr – jemné tvarůžky) překročen a tudíž tyto vzorky nevyhovují. Z agarových pěstí (Endo) s nárůstem koliformních bakterií bylo izolováno celkem 5 kolonií, 3 morfologicky rozdílné kolonie byly izolovány ze vzorku 2 (2A, 2B, 2C) a ze vzorku 5 a 6 po jedné kolonii.

Při stanovení *L. monocytogenes* metodou stanovení počtu [59] nevyrostly na půdě LOA žádné kolonie. V případě stanovení *L. monocytogenes* metodou průkazu [58] u vzorku 5B byl pozorován na půdě LOA nárůst bakterií podobné morfologie jako *L. monocytogenes*. Avšak v této fázi experimentu ještě není možné stanovit, zda se opravdu jedná o patogen. Výsledky mohou být potvrzeny až po dalších testech. Z půdy LOA (vzorek 5B) byly izolovány dvě kolonie s rozdílnou morfologií. Tyto dva suspektní izoláty (5B1, 5B2) byly podrobeny PCR zkoušce na identifikaci *L. monocytogenes* v kapitole 5.2.3.

5.1.2 Experiment č. 2

Homogenizované vzorky byly aplikovány na půdu Listeria Oxford Agar pro kvantitativní stanovení *L. monocytogenes*. Celkové počty bakterií, které byly schopné růst na této půdě jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7. Množství typických a výskyt netypických kolonií na půdě *Listeria Oxford Agar* po inokulaci vzorky sýrů.

| Vzorek | CFU/g tmavých kolonií | výskyt netypických kolonií |
|--------|-----------------------|----------------------------|
| 1 | - | ne |
| 2 | $>10^7$ | ne |
| 3 | $4 \cdot 10^2$ | ano – bílý, žlutý pigment |
| 4 | - | ano – bílý pigment, matné |
| 5 | $<10^2$ | ne |
| 6 | $<10^2$ | ano – drobné kolonie |
| 7 | $2 \cdot 10^3$ | ano – drobné kolonie |
| 8 | $4 \cdot 10^2$ | ano – bílý, žlutý pigment |
| 9 | $<10^2$ | ano – bílý pigment |
| 10 | $5 \cdot 10^2$ | ano – bílý pigment |
| 11 | $2 \cdot 10^3$ | ano – drobné kolonie |
| 12 | - | ne |
| 13 | 10^3 | ano – bílý pigment |

Stanovení *L. monocytogenes* naznačuje (Tab. 7), že by zde mohly být přítomny patogenní bakterie. Konfirmace může být provedena až po dalších testech provedených na čistých kmenech. Proto bylo z 10 vzorků (2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13) izolováno 17 bakteriálních kolonií z půdy LOA s morfologií typickou pro *Listeria monocytogenes*. Tyto kmeny byly dále zkoumány (kapitola 5.2.3) a suspektní kmeny byly následně podrobeny identifikaci na *L. monocytogenes* metodou PCR. U tohoto stanovení můžeme pozorovat na půdě LOA častý výskyt netypických kolonií, což zpochybňuje selektivitu tohoto média. Zřejmě se jedná o doprovodnou mikroflóru zrajících sýrů. Pouze u sýrů Romadur a Karel IV. (vzorek 1 a 12) nebyl pozorován nárůst mikroorganismů. U vzorku 4 byly pozorovány pouze netypické matné bílé kolonie, které by mohly patřit do rodu *Bacillus*.

V další fázi experimentu byly z původních 13 vzorků náhodně vybrány čtyři vzorky (1, 3, 4, 6), které byly zachovány a dále skladovány po dobu 30 dní při 8 °C. Po této době byla provedena opět mikrobiologická analýza. Byly stanoveny celkové počty mezofilních a psychrotrofních mikroorganismů, koliformních bakterií a bylo provedeno stanovení průka-
zu *L. monocytogenes* [58]. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 8.

Tab. 8. Množství sledovaných skupin mikroorganismů (CFU/g) u 4 druhů sýrů po 30 dnech skladování při teplotě 8 °C.

| | 1 | 3 | 4 | 6 |
|--------------------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|
| Mezofilní mikroorganismy | $2,9 \cdot 10^7$ | $3,3 \cdot 10^8$ | $2,2 \cdot 10^9$ | $2,1 \cdot 10^8$ |
| Koliformní bakterie | $7 \cdot 10^6$ | $1,0 \cdot 10^2$ | $4,0 \cdot 10^2$ | $2,6 \cdot 10^4$ |
| 11290-1 | Souvislý černý nárůst | — | — | — |
| Psychrotrofní bakterie | $3,0 \cdot 10^7$ | $1,0 \cdot 10^6$ | $2,9 \cdot 10^9$ | $4,9 \cdot 10^8$ |

X: neděláno 1 – Romadur, 3 – Pivní sýr, 4 – Romadůžek, 6 – Pepin

—: negativní

Tak jako v předešlém experimentu č. 1 není možné zhodnotit CFU/g u mezofilních mikroorganismů dle normy ČSN 56 9609 [63]. Počty mezofilních mikroorganismů u těchto vzorků jsou srovnatelné nebo mírně vyšší než při stanovení ihned po zakoupení v rámci Experimentu č. 1. Z toho můžeme usoudit, že mezofilní mikroflóra zrajících sýrů se po otevření daného balení a následném skladování v chladničce příliš nemění.

U koliformních bakterií je možno pozorovat opět překročení limitů daných normou ČSN 56 9609, když ze čtyř testovaných sýrů (Romadur, Pivní sýr, Romadůžek, Pepin) ji překročily dva (Romadur, Pepin). Ostatní dva vzorky i po měsíci skladování tyto hodnoty nepřesahovaly a byly vyhovující.

Psychrotrofní mikroflóra těchto sýrů se po 30denním skladování v 8 °C pohybovala v rozmezí 10^6 - 10^9 CFU/g. Může být složena z přirozené mikroflóry tvořené např. *Pseudomonas*, *Alcaligenes* nebo *Flavobacterium* [30]. Ve srovnání s výsledkem počtu psychrotrofních mikroorganismů nalezených u sýru Syrovátkový sýr s kmínem BREINTUGEN v Experimentu č. 1 jsou počty u sýrů skladovaných 30 dní v chladničce buď nižší nebo srovnatelné. Počty mezofilních a psychrotrofních mikroorganismů v rámci jednoho hodnoceného sýru jsou vždy srovnatelné.

Bylo provedeno stanovení *L. monocytogenes* metodou průkazu. U vzorku 1 byl proveden záchyt typických kolonií. Existuje tedy podezření, že tento vzorek po 30 dnech skladování

při 8 °C obsahuje patogenní bakterie. Jelikož nebyly na LOA půdě jednotlivé kolonie, byl pro confirmaci metodou PCR použit přímo vzorek připravený ze souvislého nárůstu. Vzorek byl připraven varem dle kapitoly 4.3.5. Přestože při prvním testování vzorků 3 a 4 byl na půdě LOA zachycen růst kolonií, po 30 denním skladování nebyla ve vzorcích prokázána přítomnost *L. monocytogenes*.

5.2 Identifikace kmenů izolovaných ze vzorků sýrů

5.2.1 Experiment č. 1

Pro tuto část byly vybrány kmeny, jejichž seznam a popis morfologie kolonií je uveden v *Tab. 9*. Celkem bylo izolováno z Endova agaru 5 kmenů, s nimiž byly provedeny následující testy: Gramovo barvení, KOH – test, oxidáza test, kataláza test, OF test, test na zkvašování laktózy a ENTEROtest 24. Výsledky testů jsou v *Tab. 10*.

Tab. 9. Popis vybraných kmenů izolovaných z Endova agaru.

| Označení | Popis kolonie |
|----------|--|
| 2A | plochá, vroubkovitá, mírně sektorová, lesklá |
| 2B | plochá, sektorová, lesklá |
| 2C | zvýšená, laločnatá, vroubkovaná, lesklá |
| 5 | vypouklá, okrouhlá, hladká, matná |
| 6 | vypouklá, okrouhlá, hladká, matná |

Tab. 10. Souhrn výsledků testů provedených u kmenů izolovaných z Endova agaru.

| Označení | Gram | Oxidáza | KOH | Kataláza | Laktóza | OF-Test | Enterotest |
|----------|----------------------------|---------|-----|----------|---------|---------|--------------------|
| 2A | G ⁻ kokotýčinky | N | P | P | P | OF | Neidentifi- |
| 2B | G ⁻ kokotýčinky | N | P | P | P | OF | <i>Proteus</i> sp. |
| 2C | G ⁻ kokotýčinky | N | P | P | P | OF | <i>Proteus</i> sp. |
| 5 | Velké, oválné buňky | P | P | P | X | X | X |
| 6 | Velké, oválné buňky | P | P | N | X | X | X |

N – negativní P – pozitivní X - neděláno

Již při sklíčkových testech bylo zjištěno, že výsledky vzorků 5 a 6 neodpovídají izolátům, které by měly růst na Endově agaru. Z celkových 5 vzorků byly tři G^- kokotýčinky a dva vzorky tvořily velké oválné buňky. Na základě mikroskopie byly tyto dva vzorky s velkými buňkami kultivovány na půdě GKCHA. Oba kmeny na této půdě po kultivaci při 25 °C/48 h rostly, tzn. že se jednalo o kvasinky. Byly proto z dalších identifikačních testů vyloučeny. Zbylé tři vzorky byly podrobeny dalším testům (Tab. 10), které se od sebe nelišily. ENTEROtest 24 identifikoval dva ze tří izolátů jako rod *Proteus* a poslední izolát zůstal neidentifikovaný. *Proteus* patří do čeledi *Enterobacteriaceae* [2], avšak není řazen mezi koliformní bakterie. Také záchytem kvasinek bylo prokázáno, že po kultivaci na Endově půdě nemusí růst pouze gramnegativní fermentující bakterie, ale také kvasinky, což výrazně zpochybňuje selektivitu této půdy jako média ke kultivaci koliformních bakterií.

5.2.2 Experiment č. 2

V této části experimentu byly vybrány bakteriální kolonie s morfologií připomínající růst *L. monocytogenes* (tmavě zabarvené kolonie, tmavé echo). Seznam a popis izolátů je uveden v Tab. 11.

Tab. 11. Vybrané bakteriální kolonie s morfologií typickou pro *Listeria monocytogenes*.

| Označení | Makroskopická morfologie |
|----------|---|
| 2 | hnědá barva, lesklá, vypouklá |
| 3 | běžovo-hnědá + drobná echa |
| 5 | běžová + echo, lesklá, vypouklá |
| 6 | tmavá, velká, lesklá, slizovitá |
| 7 | hnědá + echo, lesklá |
| 8A | tmavě hnědá + echo, lesklá, nepravidelné okraje |
| 8B | tmavá, matná, vypouklá, nepravidelné okraje |
| 9 | tmavá + echo, lesklá, velká |
| 10A | tmavá + echo, velká, lesklá |
| 10B | světle hnědá + echo, menší, lesklá |

| | |
|-----|--|
| 10C | hnědá + echo, lesklá, vypouklá, pravidelný okraj |
| 11A | tmavá + echo, lesklá |
| 11B | tmavá + echo, lesklá, světlejší než 11A |
| 13A | tmavá, matná, svraštělá |
| 13B | hnědá + echo, drobná, lesklá |
| 13C | světle hnědá + echo |
| 13D | světle hnědá + echo, drobná, matná |

Bylo tedy izolováno 17 kmenů z LOA, s nimiž byly provedeny následující testy: Gramovo barvení, KOH – test, test na produkci oxidázy, katalázy, testy na zkvašování cukrů. Výsledky testů jsou v *Tab. 12, 13*.

Tab. 12. Souhrn výsledků testů provedených u 17 kmenů izolovaných z LOA.

| Označení | Gramovo barvení | KOH | Kataláza | Oxidáza |
|----------|--|-----------|-----------|-----------|
| 2 | G ⁺ koky | Negativní | Pozitivní | Negativní |
| 3 | G ⁺ koky | Negativní | Pozitivní | Negativní |
| 5 | G ⁺ koky | Negativní | Pozitivní | Negativní |
| 6 | G ⁺ tyčinky | Negativní | Pozitivní | Negativní |
| 7 | G ⁺ koky | Negativní | Pozitivní | Negativní |
| 8A | G ⁺ tyčinky | Negativní | Pozitivní | Negativní |
| 8B | G ⁺ tyčinky | Negativní | Pozitivní | Negativní |
| 9 | G ⁺ tyčinky | Negativní | Pozitivní | Negativní |
| 10A | G ⁺ tyčinky, spóry | Negativní | Pozitivní | Negativní |
| 10B | G ⁺ tyčinky, spóry | Negativní | Pozitivní | Negativní |
| 10C | G ⁺ tyčinky, spóry | Negativní | Pozitivní | Negativní |
| 11A | G ⁺ tyčinky, spóry, pouzdra | Negativní | Pozitivní | Pozitivní |
| 11B | G ⁺ tyčinky, spóry, pouzdra | Negativní | Pozitivní | Pozitivní |
| 13A | G ⁺ tyčinky, spóry | Negativní | Pozitivní | Negativní |
| 13B | G ⁺ tyčinky, spóry | Negativní | Pozitivní | Pozitivní |
| 13C | G ⁺ tyčinky | Negativní | Pozitivní | Negativní |
| 13D | G ⁺ tyčinky dlouhé až vlákna | Negativní | Pozitivní | Negativní |

Mikroskopie prokázala grampozitivitu u všech 17 kmenů, z nichž 4 byly koky a ostatní byly tyčinky. Sedm kmenů produkovalo spóry a u dvou kmenů byla pozorována pouzdra. Z těchto výsledků může být usouzeno, že grampozitivní tyčinky produkující spóry mohou patřit do rodu *Bacillus*. KOH test potvrdil správnost Gramova barvení. Na základě provedených testů můžeme říct, že z hodnocených vzorků byly všechny na katalázu pozitivní a na oxidázu bylo 14 vzorků negativních a tři (11A, 11B, 13B) byly pozitivní. *L. monocytogenes* je kataláza pozitivní a oxidáza negativní [2]. Na základě těchto údajů vyhovuje popisu *L. monocytogenes* pouze 6 kmenů (6, 8A, 8B, 9, 13C, 13D). Na základě těchto výsledků byly tyto kmeny podrobeny PCR identifikaci (kapitola 5.2.3).

Jako doplňkové testy byly provedeny testy na fermentaci vybraných cukrů a OF test u všech izolovaných kmenů (Tab. 13).

Tab. 13. Souhrn výsledků testů provedených u 17 kmenů izolovaných z LOA.

| Označení | Rahmnóza | Xylóza | Laktóza | OF – test |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 2 | Pozitivní | Pozitivní | Pozitivní | Pozitivní |
| 3 | Pozitivní | Pozitivní | Pozitivní | Pozitivní |
| 5 | Pozitivní | Pozitivní | Pozitivní | Pozitivní |
| 6 | Pozitivní | Negativní | Negativní | Negativní |
| 7 | Pozitivní | Pozitivní | Pozitivní | Pozitivní |
| 8A | Pozitivní | Pozitivní | Pozitivní | Pozitivní |
| 8B | Pozitivní | Negativní | Pozitivní | Pozitivní |
| 9 | Pozitivní | Negativní | Negativní | Negativní |
| 10A | Negativní | Negativní | Negativní | Pozitivní |
| 10B | Negativní | Pozitivní | Negativní | Pozitivní |
| 10C | Pozitivní | Pozitivní | Pozitivní | Pozitivní |
| 11A | Pozitivní | Negativní | Pozitivní | Pozitivní |
| 11B | Negativní | Negativní | Negativní | Pozitivní |
| 13A | Negativní | Pozitivní | Negativní | Pozitivní |
| 13B | Negativní | Pozitivní | Negativní | Pozitivní |
| 13C | Pozitivní | Pozitivní | Pozitivní | Pozitivní |
| 13D | Pozitivní | Pozitivní | Pozitivní | Negativní |

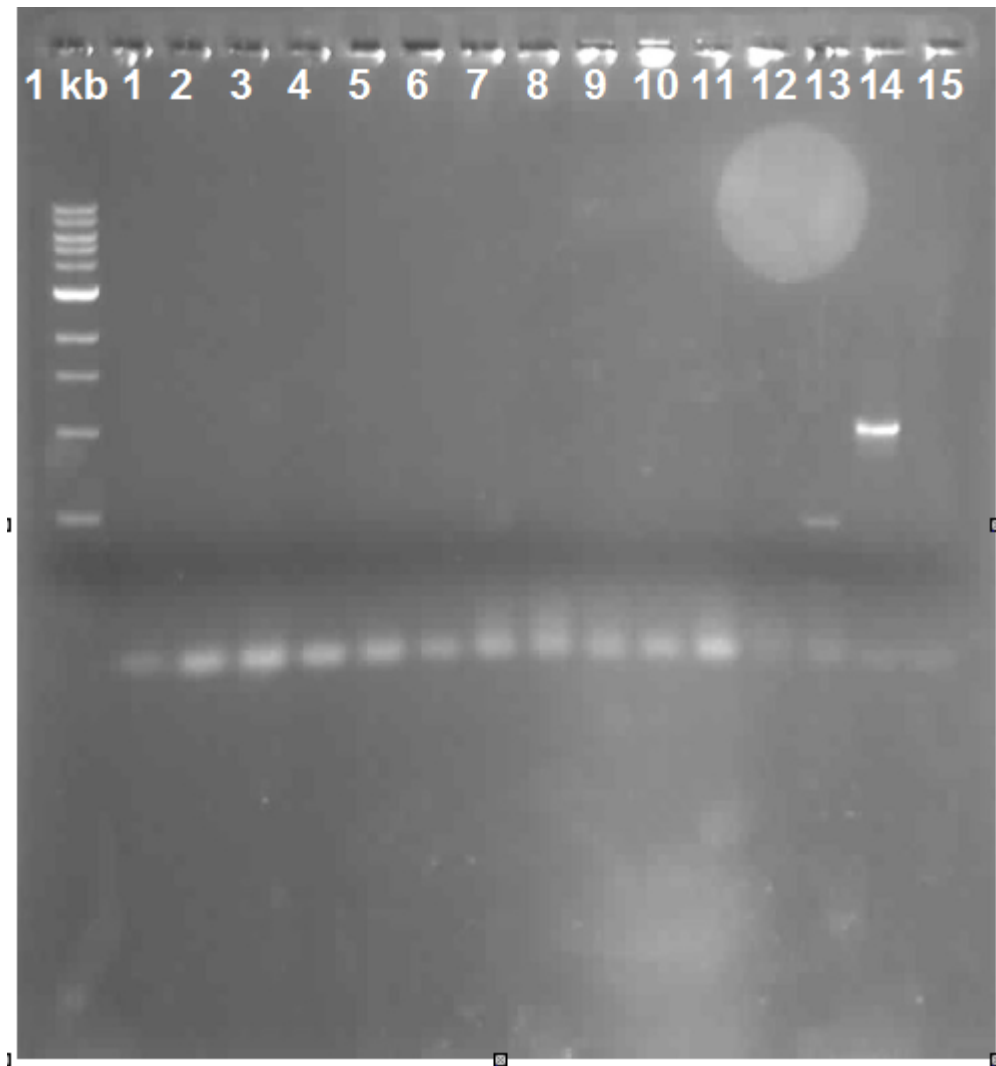
Po provedení testů u všech 17 vzorků bylo u rhamnózy 12 pozitivních a 5 (10A, 10B, 11B, 13A, 13B) negativních. U xylózy bylo 11 vzorků pozitivních a 6 (6, 8B, 9, 10A, 11A, 11B)

negativních. U laktózy bylo 10 vzorků pozitivních a 7 (6, 9, 10A, 10B, 11B, 13A, 13B) negativních a u OF testu bylo celkově 14 pozitivních a 3 (6, 9, 13D) negativních.

L. monocytogenes má OF test pozitivní (fermentuje glukózu), dále fermentuje laktózu a rhamnózu a nefermentuje xylózu [64]. Stejnému profilu odpovídají pouze dva kmeny (8B, 11A). Jelikož kmen 11A tvoří spóry, jedná se o sporulující tyčinku, což *L. monocytogenes* není. Nejvíce podezřelým izolátem zůstává tedy kmen 8B.

5.2.3 PCR

Pro potvrzení, zda se jedná o *Listeria monocytogenes*, byla provedena PCR se specifickými primery (Tab. 3). Na Obr. 5 jsou zobrazeny výsledky PCR s primery určujícími gen *prfA*, typickým znakem virulence *L. monocytogenes* vzorků vybraných k testování z Experimentů č. 1 i 2. Byly použity kmeny izolované Tritonem X (6, 8A, 8B, 9, 13C, 13D, 5B1, 5B2) a kmeny, které byly izolované varem (6, 8B a vzorek 1 po měsíci skladování při teplotě 8 °C). Specifický PCR produkt má mít velikost 1060 bp. Lze jej pozorovat u pozitivní kontroly – jamka 14 (Obr. 5).



Obr. 5. Výsledek PCR.

1 kb – 1 kb DNA marker, 1 – 7 izolace Tritonem X (1 - vzorek 6, 2 - vzorek 8A, 3 - vzorek 8B, 4 – vzorek 9, 5 - vzorek 13C, 6 - vzorek 13D, 7 – vzorek 5B1, 8 – vzorek 5B2, 9 - vzorek *Listeria innocua*), 10 - 13 izolace varem (10 –vzorek 6, 11- vzorek 8B, 12 – vzorek 1, 13 - *Listeria innocua*), 14 – pozitivní kontrola (1060 bp), 15 – negativní kontrola.

Žádný testovaný vzorek a *L. innocua* neobsahoval specifický PCR produkt (1060 bp). Pouze u vzorku *L. innocua*, který byl připraven varem, se objevil nespecifický produkt o velikosti asi 0,5 kb. Tento však neinterferuje se specifickým produktem.

Na základě PCR bylo potvrzeno, že žádný testovaný kmen izolovaný v této práci nebyl identifikován jako patogen *Listeria monocytogenes*.

ZÁVĚR

V současné době klademe na potraviny vysoké požadavky, aby měly dobrou chuť, nutriční hodnotu, výhodnou cenu, pohodlnou přípravu a zejména, aby byly bezpečné. Mohou však sýry splnit všechna tato kritéria?

Dle serveru finance.cz spotřeba sýrů a tvarohů v Česku v posledních letech neustále roste. V roce 2006 dle průzkumu Češi zkonzumovali v průměru 16,6 kg sýrů a tvarohů za rok na osobu, což bylo o dvě kila víc než v roce 2000. Ve spotřebě sýrů se tak Česko zařadilo na 8. místo v EU. Na celkové spotřebě se přírodní sýry podílejí 62 %, tavené sýry 17 % a konzumní tvarohy 21 %. Spotřeba tavených sýrů ve výši 2,7 kg na osobu za rok je v ČR nejvyšší na světě. Již z tohoto důvodu je dobré znát mikrobiologickou kvalitu zrajících sýrů dostupných v obchodních řetězcích v ČR.

Cílem mé práce bylo tedy ve dvou časově oddělených experimentech provést mikrobiologickou analýzu u různých druhů sýrů (mezofilní mikroorganismy, koliformní bakterie, psychrotrofní mikroorganismy a *L. monocytogenes*), izolovat kolonie ze selektivně diagnostických pěst (Listeria Oxford Agar, Endův agar) a provést testy (morfologické, fyziologické a molekulárně biologické) vedoucí k identifikaci izolátů.

Praktická část diplomové práce byla rozdělena na dva experimenty, které byly odděleny časově. Pro experiment č. 1 byly testovány tyto vzorky: Sedlčanský romadůžek, Romadur, Niva, Pivní sýr, Syrovátkový sýr s kmínem – BREINTUNGEN, Přírodní zrající sýr – jemné tvarůžky. V Experimentu č. 2 pak tyto následující: Romadur, Pravé Olomoucké tvarůžky, Pivní sýr, Romadůžek, Blatácké zlato, Pepin, Hermadur, Sýr s bílou plísní Albert, Stříbrňák, Niva, Sýr s modrou plísní Albert, Karel IV., Camembert Clever.

Při Experimentu č. 1 bylo zakoupeno 6 vzorků sýrů od různých výrobců, ty byly aplikovány na LOA, Endo a MPA 2. Celkové počty sledovaných mikroorganismů jsou uvedeny v Tab. 6. Souhrnně můžeme konstatovat, že i když byly zjištěny počty mezofilních mikroorganismů ve sledovaných sýrech (liší se počtem od $4,7 \cdot 10^5$ CFU/g u Nivy až po $6,2 \cdot 10^8$ CFU/g u prvního zakoupeného vzorku Syrovátkového sýra s kmínem BREINTUNGEN), tak norma ČSN 56 9609 neuvádí u těchto druhů sýrů maximální CFU/g mezofilních mikroorganismů a nelze tedy posoudit, jestli dané sýry splňují kritéria této normy. Naopak u koliformních bakterií bylo zjištěno, že sýry Romadur s $4,5 \cdot 10^6$ CFU/g, Syrovátkový sýr s kmínem BREINTUNGEN s $1,7 \cdot 10^6$ CFU/g a $3,5 \cdot 10^4$ CFU/g a Přírodní zrající sýr - jemné

tvarůžky s $2,7 \cdot 10^4$ CFU/g kritéria přesahují a tudíž požadavkům nevyhovují. Z těchto vzorků obsahujících koliformní bakterie bylo izolováno 5 kolonií, 3 morfologicky rozdílné byly izolovány ze vzorku 2, tj. Romadur, a ze vzorků 5 a 6 (Syravátkový sýr s kmínem BREINTUGEN, Přírodní zrající sýr – Jemné tvarůžky) po jedné kolonii. Byly provedeny následující testy: Gramovo barvení, KOH – test, oxidáza test, kataláza test, OF test, test na zkvašování laktózy a ENTEROtest 24. Z těchto testů bylo zjištěno, že kmeny 5 a 6 jsou kvasinky. ENTEROtest 24 identifikoval dva ze tří izolátů jako rod *Proteus* a poslední izolát zůstal neidentifikovaný. Také záchytem kvasinek bylo prokázáno, že po kultivaci na Endově půdě nemusí růst pouze gramnegativní fermentující bakterie, ale také kvasinky, což výrazně zpochybňuje selektivitu této půdy jako média ke kultivaci koliformních bakterií.

Důraz byl kladen na průkaz *L. monocytogenes* ve vzorcích, avšak při stanovení metodou stanovení počtu nevyrostly na půdě LOA žádné kolonie. V případě stanovení metodou průkazu bylo u vzorku 5B (Syravátkový sýr s kmínem BREINTUGEN) patrné, že po vyočkování vyrostly na půdě mikroorganismy podobné *L. monocytogenes*, avšak v této fázi experimentu nebylo ještě možné stanovit jestli se opravdu jedná o patogen. Z tohoto vzorku byly z půdy LOA izolovány 2 kolonie, které byly dále podrobeny zkoušce PCR.

K Experimentu č. 2 bylo zakoupeno 13 různých druhů sýrů (výše zmíněny). Homogenizované vzorky byly aplikovány přímo na půdu LOA. Množství typických kolonií při stanovení *L. monocytogenes* naznačuje, že by zde mohly být přítomny patogenní bakterie. Konfirmace mohla být provedena až po testech provedených na čistých kmenech. Proto bylo z 10 vzorků izolováno 17 bakteriálních kolonií z půdy LOA s morfologií typickou pro *Listeria monocytogenes*. Ty pak byly podrobeny zkoušce PCR (podrobněji níže).

Byly tedy vybrány bakteriální kolonie s morfologií připomínající růst *L. monocytogenes* (17 kmenů z LOA) a provedeny identifikační testy. Bylo prokázáno, že všech 17 vzorků je grampozitivních, z nichž jen 4 byly koky a zbytek vzorků tyčinky. 7 kmenů produkovalo spóry a u 2 kmenů byla pozorována pouzdra. Z těchto výsledků může být usouzeno, že grampozitivní tyčinky produkující spóry mohou patřit do rodu *Bacillus*.

Následující fázi Experimentu č. 2 byly z 13 vzorků náhodě vybrány 4 (Romadur, Pivní sýr, Romadůžek a Pepin). Tyto sýry byly skladovány 30 dní při 8 °C. Tak jako u experimentu 1 nebylo možné zhodnotit CFU/g u mezofilních mikroorganismů, tak sýr Romadur nevyhovoval maximálnímu počtu koliformních bakterií dle normy ČSN 56 9609. Množství koliformních bakterií bylo $7 \cdot 10^6$ CFU/g. Ostatní vzorky i po měsíci skladování hodnoty sta-

novené normou nepřesahují. Ze vzorků bylo provedeno stanovení *L. monocytogenes* metodou průkazu a dále testován metodou PCR. Ani po 30 denním skladování nebyla ve vzorcích prokázána přítomnost *L. monocytogenes*.

V této práci bylo prokázáno, že není možné při stanovení *L. monocytogenes* na selektivně diagnostické půdě Listeria Oxford Agar všechny kolonie, které mají morfologii podobnou s *L. monocytogenes* (tmavé kolonie, tmavé echo okolo) považovat za tento patogen. Byly zde nalezeny nejen grampozitivní sporulující tyčinky (zřejmě *Bacillus*), ale dokonce i grampozitivní koky. Celkově i s výsledky identifikací na Endově půdě je nutné brát hodnocení nárůstů na selektivně diagnostických půdách s rezervou a výsledky si vždy ověřit.

Závěrem je možno konstatovat, že ačkoli několik vzorků překročilo limit ČSN 56 9609 pro koliformní bakterie, žádný testovaný vzorek sýru nebyl kontaminován patogenními bakteriemi *L. monocytogenes*, které při výskytu způsobují velmi vážné ohrožení lidského zdraví.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BEDNÁŘ, M., et al. *Lékařská mikrobiologie : Taxonomie, nomenklatura, identifikace, klasifikace a systematika bakterií*. Vyd. 1. Praha : Marvil, 1996. 558 s.
- [2] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. Vyd. 1. Brno : Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 978-80-210-4207-0.
- [3] EUZÉBY (J.P.): *List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, **47**, 590-592.
- [4] OLSEN, G., WOESE, C., OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J Bacteriol*, 1994, roč. 176, čís. 1, s. 1–6.
- [5] *The Taxonomicon* [online]. 2009 [cit. 2010-07-13]. Taxon: Domain Bacteria. Dostupné z WWW: <<http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=71320>>.
- [6] CAVALIER-SMITH, T. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2006, roč. 361, čís. 1470, s. 969-1006.
- [7] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Vyd. 2. Brno : Neptun, 2005. 351s. ISBN 80-86850-00-5.
- [8] LOUIE, M., LOUIE L., SIMOR AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ*, 2000, roč. 163, čís. 3, s. 301–309.
- [9] WOODS, G., WALKER, D. *Clin Microbiol Rev*, 1996, roč. 9, čís. 3, s. 382–404.
- [10] ČECHOVÁ, L. *Základy obecné mikrobiologie*. Vyd. 1. Zlín : U.T.B. ve Zlíně, 2006. 142 s. ISBN 80-7318-487-7.
- [11] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie : pro potravináře a biotechnologi*. Vyd. 2. Praha : VICTORIA PUBLISHING, a.s., 1955. 361 s. ISBN 80-85605-71-6.
- [12] POT, B., HERTEL, C., LUDWIG, W., DESCHEEMAEKER, P., KERSTERS', K., SCHLEIFER, K. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. *Journal of General Microbiology*, 1993, 139, 513-517.
- [13] TYNKKYNNEN, S., SATOKARI, R., SAARELA, M., MATTILA-SANDHOLM, T., SAXELIN, M. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic

- DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 65 (9), 3908-3914.
- [14] LEVIN, Robert E. *Rapid detection and characterization of foodborne pathogens by molecular techniques*. Boca Raton : CRC Press, 2010. 592 s. ISBN 978-1-4200-9242-4.
- [15] PAVELKA, A. *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*. Vyd. 1. Brno : Littera, 1996. 105 s. ISBN 80-85763-09-5.
- [16] BŘEZINA, P., KOMÁR, A., HRABĚ, J. *Technologie, zbožížnalství a hygiena potravin*. Vyškov : VVŠ PV, 2001. 177 s. ISBN 80-7231-079-8.
- [17] KNĚZ, V. *Výroba sýrů*. Vyd. 2. Praha : Státní nakladatelství technické literatury, 1960. 377 s.
- [18] CALLEC, Ch. *Encyklopedie sýrů*. 1st ed. Čestlice : Rebo Productions, 2002. 256 s. ISBN 80-7234-225-8.
- [19] NEDOMOVÁ, Š., CWIKOVÁ, O. Změny senzorických a texturních vlastností olomouckých tvarůžků v průběhu zrání. *Výživa a potraviny*. 2006, 61, 5, s. 125-126.
- [20] ROBINSON, Richard K. *Dairy Microbiology Handbook : The Microbiology of Milk and Milk Products*. 3rd ed. New York : John Willy and Sons, Inc., 2005. 784 s. ISBN 987-0-471-38596-7.
- [21] HRABĚ, J., et al. *Technologie výroby potravin živočišného původu*. Vyd. 1. Zlín : U.T.B. ve Zlíně, 2006. 180 s. ISBN 80-7318-405-2.
- [22] TOMÁNKOVÁ, E., VOJTĚCH, R., KILLER, J. *Potravinářská mikrobiologie*. Vyd. 1. Praha : ČZU v Praze, 2006. 168 s. ISBN 80-213-1583-0.
- [23] ŽIŽKA, B., MARTINKOVÁ, Z. *Mikrobiológia pre 4. ročník stredných priemyselných škôl potravinárskych : študijný obor zpracovanie mlieka*. Vyd. 2. Bratislava : Alfa , 1990. 246 s. ISBN 80-05-00642-X.
- [24] ZIMÁK, E. *Technológia pre 4. ročník stredných priemyselných škôl potravinárskych študijného odboru zpracovanie mlieka*. Vyd. 1. Bratislava : Alfa , 1990. 389 s. ISBN 80-05-00309-9.

- [25] TEPLÝ, M. *Výroba sýrů, kaseinů a kaseinátů : Novinky v technice a technologii*. Vyd. 1. Praha : Státní nakladatelství technické literatury, 1985. 185 s.
- [26] MONTVILLE, T. J., MATTHEWS, K. R. *Food Microbiology : An Introduction*. 2 nd ed. Washington, D. C. : ASM Press, 2005. 380 s. ISBN 1-55581-308-990000.
- [27] ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). *Microorganisms in foods 6*. Second edition, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2005, 766 p.
- [28] FARNWORTH, E. R. *Handbook of fermented functional foods*. 2 nd ed. Boca Raton : CRC Press, 2008. 581 s. ISBN 978-1-4200-5326-5.
- [29] GÖRNER, F; VALÍK, L'. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1 th ed. Bratislava : MALÉ CENTRUM, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [30] BLACKBURN, Clive de W. *Food spoilage microorganisms*. Boca Raton : Woodhead Publishing, 2006. 712 s. ISBN 0849391563.
- [31] Listeria. In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 2007, last modified on 2010 [cit. 2010-07-05]. Dostupné z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Listeria>>
- [32] BEDNÁŘ, M. *Lékařská mikrobiologie : bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha : Marvil, 1996. 558 s.
- [33] PATOČKA, F. *Lékařská mikrobiologie*. Vyd. 2. Praha : Avicenum, 1972. 940 s.
- [34] GÖRNER, F; VALÍK, L'. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Vyd. 1. Bratislava : MALÉ CENTRUM, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [35] JULÁK, J. *Úvod lékařské bakteriologie*. Vyd. 1. Praha : Karolinum, 2006. 404 s. ISBN 80-246-1270-4.
- [36] KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. Vyd. 1. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. 145 s. ISBN 80-7157-757-X.
- [37] MACELA, A., et al. *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*. Vyd. 1. Praha : Grada, 2006. 215 s. ISBN 80-247-0664-4.
- [38] VOTAVA, M., et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno : Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

- [39] PEUTHRER, J. F., et al. *Lékařská mikrobiologie : Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Vyd. 1. Praha : Grada, 1999. 686 s. ISBN 80-7169-365-0.
- [40] BARTOŠOVÁ, D. *Dětské infekční choroby*. Vyd. 1. Praha : Galén, 2003. 284 s. ISBN 80-7262-206-4.
- [41] BONDARIANZEDAH, D., YEATMAN, H., CONDON-PAOLONI, D. Listeria education in pregnancy: lost opportunity for health professionals. *Australian and New Zealand journal of public health*. 2007, roč. 31, c. 5, s. 468 – 474.
- [42] BLAŽKOVÁ, M., KARAMONOVÁ, L. et al. Listeria monocytogenes – nebezpečný patogen a jeho detekce v potravinách. *Chemické listy*. 2005, roč. 99, č. 7, s. 467 – 473.
- [43] JÍČINSKÁ, E., HAVLOVÁ, J. *Patogenní mikroorganismy v mléce a mlékárenských výrobcích*. Vyd. 1. Praha : Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1995. 106 s. ISBN 80-85120-47-X..
- [44] LE MINOR, L., *The Genus Salmonella*, 2nd ed., Volume III. Springer-Verlag, New York, s 2760 – 2774, 1992.
- [45] KOMÁREK, L., *Antigenní formule sérovaru salmonel*, Příloha 3/1998, SZÚ, Praha, 1998.
- [46] THRELFALL, E. J., HAMPTON, M. D., RIDLEY, A. M., Application of Molecular Methods to the Study of Infections Cause by Salmonella spp., In N Woodford and A. P. Johnson (ed.), New Jersey, s. 355 – 368, 1998.
- [47] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. Tábor: Osis, 1996. ISBN 80-902391-5-3.
- [48] ROGINSKI, H., FUQUAY, J.W., FOX, P.F. *Encyclopedia of dairy sciences*. London: Academic press, 2002. ISBN 0-12-227235-8.
- [49] VALSAMAKI, K., MICHAELIDOU, A., POLYCHRONIEADOU, A. Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry*, 2000, 71 (2), 259-266.
- [50] KALAČ, P., KŘÍŽEK, M. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Potravinářská Revue*, 2005, 2, 40-42.

- [51] ŠIMŮNEK, J. - BŘEZINA, P. Problematika stanovení mykotoxinu kyseliny cyklopiazonové v sýrech s plísní na povrchu. *Sýrařské dny*, 1990, s. 428-433.
- [52] ŠIMŮNEK, Jan Plísně a mykotoxiny. In Plísně a mykotoxiny [online]. Brno : Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, 2004 [cit. 2010-07-4]. Dostupné z WWW: <http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/plisne_a_mykotoxiny.pdf>.
- [53] *Top-Bio, s.r.o. : DNA polymerázy pro PCR a pufry* [online]. 2010 [cit. 2010-08-4]. Dostupné z WWW: <<http://www.top-bio.cz/pdf/top-bio-katalog.pdf>>.
- [54] RUML, T., RUMLOVÁ M., PAČES, V. *Genové inženýrství*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.
- [55] KOČÁREK, E. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. Vyd. 1. Praha: Scientia, 2004. 211 s. ISBN 80-7183-326-6.
- [56] PAVLÍK, E. *Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část 3.* [online]. 2005 [cit. 2010-06-11]. Dostupné z WWW: <<http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/odborne/pcr3.pdf>>.
- [57] RENZONI, A., KLARSELD, A., DRAMSI, S., COSSART, P. Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infection and Immunity*, 1997, 65 (4), 1515-1518.
- [58] ČSN EN ISO 11290-1. *Mikrobiologie potravin a krmiv : Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu Listeria monocytogenes*. Česká republika : Český normalizační institut, 1996. 28 s.
- [59] ČSN EN ISO 11290-2. *Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu Listeria monocytogenes - Část 2: Metoda stanovení počtu*. Česká republika : Český normalizační institut, 1999. 28 s.
- [60] BURDYCHOVÁ, R., SLÁDKOVÁ, P. *Mikrobiologická analýza potravin*. Vyd. 1. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. 208 s. ISBN 978-80-7375-116-6.

- [61] CUPÁKOVÁ, Š., DUŠKOVÁ, M., KARPÍŠKOVÁ, R. *Mikrobiologie potravin - praktická cvičení. 1., Obecná mikrobiologie*. Vyd. 1. Brno : Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2008. 55 s. ISBN 978-80-7305-043-6.
- [62] HOLKO, I., URBANOVÁ, J., KANTÍKOVÁ, M., PÁSTOROVÁ, K., KMEŤ, V. PCR detection of *Listeria monocytogenes* in milk and milk products and differentiation of suspect isolates. *Acta Veterinaria Brno*, 2002, 71, 125-131.
- [63] ČSN 56 9609. *Pravidla správné hygienické a výrobní praxe - mikrobiologická kritéria pro potraviny : Principy stanovení a aplikace*. Česká republika : Český normalizační institut, 2008. 40 s.
- [64] FARBER, J. M., PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 1991, 55(3), 476-511.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|-------|---|
| IJSB | International Journal of Systematic Bacteriology |
| IJSEM | International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology |
| LOA | Listeria Oxford Agar |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| <i>Obr. 1. Klasifikace bakteriálních kmenů podle Cavalier-Smithe [6].</i> | 13 |
| <i>Obr. 2. Základní rozdělení sýrů [15].</i> | 17 |
| <i>Obr. 3. Klasifikace listerií podle kultivačních vlastností a biochemických znaků [39].</i> | 28 |
| <i>Obr. 4. Specifikace poddruhů S. enterica.</i> | 31 |
| <i>Obr. 5. Výsledek PCR.</i> | 63 |


SEZNAM TABULEK



| | |
|---|----|
| <i>Tab. 1. Výskyt jednotlivých druhů rodu Listeria [32].</i> | 26 |
| <i>Tab. 2. Triviální názvy nejdůležitějších biogenních aminů, jejich systematický název a zařazení do skupin [48].</i> | 38 |
| <i>Tab. 3. Použité primery pro PCR.</i> | 45 |
| <i>Tab. 4. Tabulka vzorků sýrů použitých pro Experiment č. 1.</i> | 46 |
| <i>Tab. 5. Tabulka vzorků sýrů použitých pro Experiment č. 2.</i> | 46 |
| <i>Tab. 6. Množství sledovaných skupin mikroorganismů (CFU/g) u 6 druhů sýrů.</i> | 54 |
| <i>Tab. 7. Množství typických a výskyt netypických kolonií na půdě Listeria Oxford Agar po inokulaci vzorky sýrů.</i> | 56 |
| <i>Tab. 8. Množství sledovaných skupin mikroorganismů (CFU/g) u 4 druhů sýrů po 30 dnech skladování při teplotě 8 °C.</i> | 57 |
| <i>Tab. 9. Popis vybraných kmenů izolovaných z Endova agaru.</i> | 58 |
| <i>Tab. 10. Souhrn výsledků testů provedených u kmenů izolovaných z Endova agaru.</i> | 58 |
| <i>Tab. 11. Vybrané bakteriální kolonie s morfologií typickou pro Listeria monocytogenes.</i> | 59 |
| <i>Tab. 12. Souhrn výsledků testů provedených u 17 kmenů izolovaných z LOA.</i> | 60 |
| <i>Tab. 13. Souhrn výsledků testů provedených u 17 kmenů izolovaných z LOA.</i> | 61 |

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha PI: **NÁVOD K TESTU NA PRODUKCI CYTOCHROMOXIDÁZY
(OXI TEST)**
- Příloha PII: **NÁVOD K ENTEROTESTU 24 (PLIVA-LACHEMA DIA-
GNOSTIKA)**


PŘÍLOHA PI: NÁVOD K TESTU NA PRODUKCI CYTOCHROMOXIDÁZY (OXI TEST)



Kat. č.: 10003324

OXItest



Pro mikrobiologii

OXItest je individuální test pro detekci cytochromoxidázy; balení OXItestu obsahuje 50 proužků umožňujících provést 50 stanovení na detekci oxidázy.

Princip:
Přítomnost cytochromoxidázy je detekována barevnou reakcí N,N-dimethyl-1,4-fenyldiaminu s o-naftolem za vzniku indofenolové modři. Citlivost reakce lze zvýšit použitím činidla pro test OXIDÁZA.

Balení OXItestu obsahuje:

- 50 ks proužků pro 50 stanovení
- pracovní návod

Skladování, expirace:
OXItest je třeba skladovat při teplotě (+2 až +8) °C. Expirace je vyznačena na každém balení.

Upozornění:

- Test je určen pouze k profesionálnímu použití

Pracovní postup:
Očkovací kličkou se odebere dobře izolovaná kolonie (ev. bakteriální masa v případě čisté kultury) testovaného kmene z agarové půdy a vetře se do impregnované zóny proužku. Barevná reakce se odečítá do 0,5 - 1 minuty; později může dojít ke vzniku falešně pozitivní reakce. Ev. lze otisknout zónu proužku přímo na kulturu na misce.
Činidlo pro test OXIDÁZA (Kat. č. 10003375) zvyšuje citlivost reakce: na zónu proužku se před nanesením testovaného kmene přikápně cca 10 µl činidla.

Likvidace:
Na použitý proužek je nutné pohlížet jako na potenciálně infekční a likvidovat ho podle vlastních interních předpisů jako nebezpečný odpad v souladu se Zákonem o odpadech. Prázdné obaly se předají do sběru k recyklaci, případně do komunálního odpadu.

Symboly na obalu: podle ISO 15223

Poznámka:
Pracujte platínovou očkovací kličkou - použití obyčejné kličky může vést k falešně pozitivním reakcím.

Hodnocení testu na detekci cytochromoxidázy

| Test | Zkratka testu | Výsledná barevná reakce | |
|---------|---------------|-------------------------|---|
| | | pozitivní | negativní |
| oxidáza | OXI | modrá, sv. modrá | bezbarvá, růžová, žlutá, žlutozelená |

Kontrolní kmeny

| Kmen | CCM | OXI |
|------------------------|------|-----|
| Enterobacter sakazakii | 3461 | – |
| Pseudomonas aeruginosa | 1960 | + |

Pro kontrolu kvality proužků OXItestu a hodnocení výsledné reakce se doporučuje použít standardní kontrolní kmeny, uvedené spolu s výsledky jejich reakcí v tabulce Kontrolní kmeny.

Tyto kmeny dodává
Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita, Tvrdého 14,
602 00 Brno, tel.: 549 491 430, fax: 543 247 339, e-mail: ccm@sci.muni.cz.
Kmeny jsou dodávány v lyofilizovaném stavu nebo na želatinových discích.

PŘÍLOHA PII: NÁVOD K ENTEROTESTU 24 (PLIVA-LACHEMA DIAGNOSTIKA)

MIKROLATEST®



IVD

ENTEROtest 24

Kat. č.: 10003391

Pro mikrobiologii

Souprava ENTEROtest 24 je určena pro rutinní identifikaci významných druhů střevních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. Souprava umožňuje provést identifikaci čtyřiceti kmenů, pomocí dvaceti-čtyř histochemických testů. Testy jsou umístěny v jamkách mikrotitrační destičky, vždy tři řady po osmi jamkách obsahují testy pro identifikaci jednoho kmene. Identifikaci je možné doplnit testy, dodávanými ve formě diagnostických proužků: OXItest, COLItest pro detekci *E. coli* průkazem aktivity β -glukuronidázy, PYRAtest.

Souprava ENTEROtest 24 obsahuje:

- 10 mikrotitračních destiček (každá pro identifikaci 4 kmenů) se sušidlem
- Návod na použití s diferenční tabulkou
- 40 formulářů pro záznam výsledků
- 10 PF sáčků pro inkubaci
- Sáček na uložení nepotřebované destičky, 1 ks
- Rámeček destičky s potlaštěným víčkem, sterilní

Skladování, expirace:

ENTEROtest 24 je třeba skladovat při teplotě (+2 až +8) °C. Expirace je vyznačena na každém balení.

DOPORUČENÝ PRACOVNÍ POSTUP PRO ENTEROtest 24

Potřeby pro práci s soupravou ENTEROtest 24:

- Činidlo pro test INDOL (kat. č. 10003372 – 360 stanovení)
- Činidlo pro test FENYLALANIN (kat. č. 10003370 – 360 stanovení)
- Činidlo pro test ACETOIN (kat. č. 10003369 – 360 stanovení)
- Parafinový olej sterilizovaný (kat. č. 10003371 – 90 stanovení)
- Petriho misky s kultivačním médiem
- Zkumavky (100x15) mm s 3 ml sterilního fyziologického roztoku
- Přístroj Densi-La-Meter II (kat. č. 50001529)
- Automatická mikropipeta 0,1 ml, sterilní špičky
- Termostat 37 °C
- Běžné laboratorní mikrobiologické vybavení (klíčky, popisovače, kahan)

Potřeby pro práci s doplňkovými testy:

- OXI test (kat. č. 10003324 – 50 stanovení)
- COLI test (kat. č. 10003326 – 50 stanovení)
- Činidlo pro test INDOL (kat. č. 10003372 – 75 stanovení)
- PYRA test (kat. č. 10003344 – 50 stanovení)
- Činidlo pro test PYR (kat. č. 10003379)
- UV lampa (kat. č. 50001471)

Identifikační pomůcky:

- Barevná srovnávací stupnice pro soupravu ENTEROtest 24
- Diagnostický seznam pro soupravu ENTEROtest 24 nebo
- Identifikační program TNW

Upozornění:

- Souprava je určena pouze k profesionálnímu použití

DODRŽUJTE ZÁSADY PRO PRÁCI S INFEKČNÍM MATERIÁLEM!

Izolace kultur:

- Izolace kultur se provádí konvenční bakteriologickou technikou na mediích, doporučených pro enterobakterie.
- Pro potvrzení příslušnosti ke střevním bakteriím proveďte test na detekci cytochromoxidázy (detekční proužek OXItest), případně test na fermentaci glukózy (O/F test).

Příprava inokula:

- Z čisté 24 h kultury připravte ve fyziologickém roztoku suspenzi. Suspenzi dobře homogenizujte.
- Zákal suspenze musí odpovídat 1. stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Slabší nebo hustší suspenze může vést k falešným reakcím.

Ověření čistoty inokula:

V případě, že si chcete ověřit čistotu inokula proveďte stejnou klíčkou jakou jste připravili suspenzi křížový rozěr. Čistotu kultury kontrolujte po 24 hodinách inkubace. V případě slabého nárůstu kultury prodlužte inkubaci o dalších 24 hod. Kontrolní kultura může být použita k provedení doplňkových testů.

Příprava destičky ENTEROtest 24:

- Připravte prázdný rámeček s víčkem.
- Otevřete aluminiový sáček odstříhnutím těsně vedle sváru a vyjměte destičku.
- Pomocí skalpelu odřízněte příslušný počet řad (stripů) destičky, odpovídající počtu testovaných kmenů (3 řady, tj. 3x8 testů, pro identifikaci jednoho kmene).
- Vyřiznuté řady vyjměte z panelu, sejměte ochrannou Al fólii, řady umístěte do připraveného prázdného rámečku.
- Zaznamenejte čísla vyšetřovaných kultur na příslušné stripy.

- Zbytek nepoužité destičky se sušidlem vložte do přiloženého Al sáčku na uložení nezužité destičky a uložte do chladničky pro další použití; dbejte na to, aby destička byla chráněna před vlhkostí. Doporučujeme destičku po prvním použití spotřebovat do 4 týdnů.
- V případě opakovaného použití rámečku s víčkem zajistěte vyšší stupeň jejich dezinfekce parami Persterilu.

Poznámka:

- Mezi jednotlivými řadami s testy ponechte v rámečku volné neobsazené pozice (pro snížení možnosti kontaminace sousedních řad inokulovanou suspenzí apod.)

Inokulace:

- Důkladně homogenizujte bakteriální suspenzi ve fyziologickém roztoku.
- Inokulujte 0,1 ml suspenze do všech jamek příslušných tří řad destičky.
- K jankám H, G, F, E, D a C prvního řádku (testy IND, H₂S, LYS, ORN, URE, ARG) přidejte po inokulaci po 2 kapkách parafinového oleje.

Poznámka:

- S každou sérií neznámých kmenů a při použití nové šarže destiček ENTEROtest 24 naočkujte současně kontrolní kmeny pro ověření barevného vyjádření pozitivních a negativních reakcí.
- Bezprostředně po inokulaci mohou testy lysin, ornithin vykazovat slabé modré zbarvení, které neovlivní výsledek reakce po 24 h inkubaci.

Inkubace:

- Vložte rámeček destičky s naočkovánými řadami do inkubačního PE sáčku.
- Otevřený konec sáčku zahněte pod destičku, aby nedošlo k vysychání inokula.
- Vložte destičku ENTEROtestu 24 do termostatu, nastaveného na teplotu 37 °C, a inkubujte po dobu 24 hodin.

Hodnocení:

- Proveďte zhodnocení reakcí:
 - Na destičce ENTEROtestu 24 zakapejte činnidly jamky:
 - 1. řada, jamka H (test Indol) – 2 kapky činidla pro IND,
 - 3. řada, jamka H (test Acetoin) – po 1 kapce činidla pro VPT I, VPT II.
 - Destičku nechte inkubovat 30 minut při teplotě 37 °C pro vývoj barevných reakcí.
 - Po uplynutí této doby zakapejte činidlem jamku:
 - 2. řada, jamka H (test Fenylalanin) – 1 kapka činidla pro PHE.
 - Ihned odečtěte test na fenylalanin (pozitivní reakce mizí do 2 minut po přikápnutí činidla).
 - Odečtěte ostatní testy ENTEROtestu 24 a výsledky reakcí zaznamenejte do formuláře pro záznam výsledků.

Poznámka:

- Pro hodnocení barevných reakcí použijte tabulku „Interpretace reakcí“. Barevnou srovnávací stupnicí pro soupravu ENTEROtest 24, nebo se orientujte podle barevných reakcí kontrolních kmenů.
- Víčko destičky je opatřeno potiskem s uvedenými zkratkami testů; symbol ● je uveden u testů, zakapávaných parafinovým olejem, a symbol kapky u testů, k nimž se přikapává činidlo.

Identifikace:

- Identifikaci proveďte pomocí identifikačního programu TNW ev. pomocí Diagnostického seznamu pro soupravu ENTEROtest 24.
- Při identifikaci posuzujte kulturu komplexně, vezměte v úvahu původ izolátu, charakter kolonií, pigmentaci, mikroskopii, ev. další znaky.
- Identifikaci salmonel a shigel potvrďte sérologicky.
- V případě neúspěšné identifikace opakujte ENTEROtest 24, případně identifikaci doplňte o další testy.

Poznámka:

- Pro identifikaci pomocí diagnostického seznamu umožňuje formulář pro záznam výsledků snadno vytvořit tzv. profil, tj. číselný kód, podle něž lze vyhledat výsledek identifikace v seznamu; postup při tvorbě profilu je popsán přímo v diagnostickém seznamu.

Likvidace použitého materiálu:

- Po použití vložte destičku do nádoby pro infekční materiál a autoklávujte nebo zničte spálením.
- Prázdné papírové obaly se předají do sběru k recyklaci.

Nejčastější možné příčiny neúspěchu při identifikaci:

- Smišená nebo kontaminovaná kultura.
- Použití inokula malé hustoty nebo malého objemu.
- Inokulum bylo rozstříknuto i do sousední řady, připravené pro další testovanou kulturu.
- Příslušné testy nebyly převrstveny parafinovým olejem.
- Při hodnocení bylo činidlo vkápnuto do sousední řady.
- Nedodržení některého bodu z doporučeného pracovního postupu.
- Může se jednat o atypický kmen nebo zástupce druhu nebo příbuzného rodu, který není uveden v databázi soupravy.

Vlastnosti soupravy:

Souprava byla testována na souboru 102 kmenů.
91,2% bylo správně identifikováno.
5,8% bylo identifikováno na úroveň rodu.
3% nebyly identifikovány.

Kontrola kvality testů:

Kvalita chemikálií používaných pro výrobu destiček ENTEROtest 24 je ověřována standardním testovacím postupem. Vyrobené série destiček jsou rovněž kontrolovány funkční zkouškou pomocí kontrolních bakteriálních kmenů. Pro práci s destičkami ENTEROtest 24 na Vašem pracovišti doporučujeme použít následujících kontrolních kmenů: *Serratia marcescens* CCM 303; *Proteus vulgaris* CCM 1799; *Salmonella enteritidis* CCM 4420; *Enterobacter cloacae* CCM 1903.

Tyto kmeny dodává Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita, Tvrdoého 14, 602 00 Brno, tel. 549 491 430, fax 543 247 339, e-mail: ccm@sci.muni.cz. Kmeny jsou dodávány v lyofilizovaném stavu nebo na želatinových discích.

Upozornění:

Na kontrolu funkčnosti soupravy je nutné použít vždy čerstvé izoláty kmenů CCM. Tyto kmeny slouží pro kontrolu funkčnosti soupravy, nikoli pro kontrolu správnosti, či úspěšnosti identifikace.

Kontrolní kmeny:

| Rádek | H | G | F | E | D | C | B | A |
|--|-----|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Serratia marcescens CCM 303 | | | | | | | | |
| 1 | IND | H ₂ S | LYS | ORN | URE | ARG | SCI | MAL |
| | - | - | + | + | - | - | - | - |
| 2 | PHE | ONP | INO | ADO | CEL | SUC | TRE | MAN |
| | - | + | s | + | - | + | + | + |
| 3 | VPT | ESL | SOR | RHA | MLB | RAF | DUL | GLU |
| | + | + | + | - | - | - | - | + |
| Proteus vulgaris CCM 1799 | | | | | | | | |
| 1 | IND | H ₂ S | LYS | ORN | URE | ARG | SCI | MAL |
| | + | + | - | - | + | - | - | - |
| 2 | PHE | ONP | INO | ADO | CEL | SUC | TRE | MAN |
| | + | - | - | - | - | + | s | - |
| 3 | VPT | ESL | SOR | RHA | MLB | RAF | DUL | GLU |
| | - | - | - | + | - | - | - | + |
| Salmonella enteritidis CCM 4420 | | | | | | | | |
| 1 | IND | H ₂ S | LYS | ORN | URE | ARG | SCI | MAL |
| | - | + | + | + | - | + | s | - |
| 2 | PHE | ONP | INO | ADO | CEL | SUC | TRE | MAN |
| | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 3 | VPT | ESL | SOR | RHA | MLB | RAF | DUL | GLU |
| | - | - | + | + | + | - | + | + |
| Enterobacter cloacae CCM 1903 | | | | | | | | |
| 1 | IND | H ₂ S | LYS | ORN | URE | ARG | SCI | MAL |
| | - | - | - | + | - | + | + | + |
| 2 | PHE | ONP | INO | ADO | CEL | SUC | TRE | MAN |
| | - | + | + | - | + | + | + | + |
| 3 | VPT | ESL | SOR | RHA | MLB | RAF | DUL | GLU |
| | + | - | + | + | + | + | - | + |

Vysvětlivky: + = pozitivní reakce - = negativní reakce s = slabě pozitivní reakce

ENTEROtest 24

INTERPRETACE REAKCÍ

| Sloupec | Test | Zkratka testu | Reakce | |
|----------------|-----------------|------------------|-------------------------|----------------------------|
| | | | pozitivní | negativní |
| Rádek 1 | | | | |
| H | Indol | IND | červená, růžová | nažloutlá |
| G | Sirovodík | H ₂ S | černá, tmavě šedá | bezbarvá, našedlá |
| F | Lysin | LYS | modrá, modrozelená | zelená, žlutozelená |
| F | Ornithin | ORN | modrá, modrozelená | zelená, žlutozelená |
| D | Ureáza | URE | červená, červenoranžová | žlutá, světle oranžová |
| C | Arginin | ARG | modrá, modrofialová | zelená, zelenomodrá |
| B | Simmons citrát | SCI | modrá, modrozelená | žlutá, žlutozelená |
| A | Malonát | MAL | modrá, modrozelená | žlutá, žlutozelená |
| Rádek 2 | | | | |
| H | Fenylalanin | PHE | tmavě zelená, zelená | žlutá, žlutohnědá |
| G | β-Galaktosidáza | ONP | žlutá, nažloutlá | bezbarvá |
| F | Inositol | INO | žlutá, žlutozelená | zelená |
| E | Adonitol | ADO | žlutá, žlutozelená | zelená |
| D | Cellobióza | CEL | žlutá, žlutozelená | zelená |
| C | Sacharóza | SUC | žlutá, žlutozelená | zelená |
| B | Trehalóza | TRE | žlutá, žlutozelená | zelená |
| A | Mannitol | MAN | žlutá, žlutozelená | zelená |
| Rádek 3 | | | | |
| H | Acetoin | VPT | červená, růžová | bezbarvá, mírně narůžovělá |
| G | Eskulin | ESL | černá, tmavě hnědá | bezbarvá, světle hnědá |
| F | Sorbitol | SOR | žlutá, žlutozelená | zelená |
| E | Rhamnóza | RHA | žlutá, žlutozelená | zelená |
| D | Melibióza | MLB | žlutá, žlutozelená | zelená |
| C | Raffinóza | RAF | žlutá, žlutozelená | zelená |
| B | Dulcitol | DUL | žlutá, žlutozelená | zelená |
| A | Glukóza | GLU | žlutá, žlutozelená | zelená |

ENTEROtest 24

IDENTIFIKAČNÍ TABULKA

v.1.0

| Řádek 1 | | | | | | | | | | Řádek 2 | | | | | | | | | | Řádek 3 | | | | | | | | | | Identifikace |
|---------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|---------|---------|-----------|---------|---------|---------|---------|-----------|-----------|---------|---------|---------|---------|-----|-----|--------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--|--|--|--|--------------|
| H I N D | G L Y S | F L O R N | E O R R E | D A R R G | C A R C I | B S M A L | A P H E | H O N P | G I N O | F A C E L | E D U C | D C B A | H V P T | G E S L | F S O R A | E R M A B | D R A F | C R A F | B U L U | A G L U | | | | | | | | | | |
| + | - | - | + | (+) | (+) | - | - | + | - | - | + | - | + | + | - | - | + | + | - | - | - | + | Citrobacter amalonaticus | | | | | | | |
| d | d | - | + | d | (+) | - | - | (+) | - | - | d | - | + | + | - | - | + | + | (+) | - | d | + | Citrobacter braakii | | | | | | | |
| + | - | - | + | d | (+) | - | - | + | - | - | + | + | + | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | Citrobacter farmeri | | | | | | |
| d | (+) | - | - | d | d | (+) | (-) | - | (+) | - | - | d | (+) | + | + | - | + | + | + | d | (-) | + | Citrobacter freundii | | | | | | | |
| + | - | - | + | (+) | (+) | + | (+) | - | + | - | + | + | d | + | + | - | - | + | + | - | - | d | + | Citrobacter koseri | | | | | | |
| (+) | - | - | + | + | + | (+) | + | - | + | - | - | + | - | + | + | - | (-) | + | + | + | - | + | + | Citrobacter sedlakii | | | | | | |
| - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | - | + | + | - | - | - | - | + | Citrobacter werkmanii | | | | | | |
| (-) | d | - | - | (+) | d | (+) | - | - | + | - | - | d | (-) | + | + | - | - | + | + | - | (+) | + | Citrobacter youngae | | | | | | | |
| + | + | + | + | - | - | (-) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | Edwardsiella tarda | | | | | | |
| - | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | Enterobacter aerogenes | | | | | | |
| - | - | - | + | d | + | + | (+) | - | + | (-) | (-) | + | + | + | + | + | d | + | + | + | + | (-) | + | Enterobacter cloacae | | | | | | |
| (-) | - | - | + | - | + | + | (-) | (-) | + | (+) | - | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + | Enterobacter sakazakii | | | | | | |
| + | - | + | d | - | (-) | - | - | + | - | - | - | d | + | + | - | d | + | (+) | (+) | d | d | + | + | Escherichia coli | | | | | | |
| + | - | + | + | - | - | (-) | d | - | (+) | - | + | + | - | + | + | - | d | - | + | - | - | d | + | Escherichia fergusonii | | | | | | |
| + | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | + | d | + | + | - | d | - | + | - | d | (-) | + | Escherichia hermannii | | | | | | |
| - | - | (+) | - | - | d | - | (+) | - | + | - | - | + | - | + | + | - | (-) | - | + | + | - | + | Escherichia vulneris | | | | | | | |
| - | - | + | + | - | - | (-) | d | - | + | - | - | - | + | + | (+) | - | - | + | + | - | - | - | + | Hafnia alvei | | | | | | |
| + | - | + | - | (+) | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | d | + | Klebsiella oxytoca | | | | | | |
| - | - | d | - | - | d | - | - | (+) | d | + | + | (-) | + | + | - | (+) | d | d | + | + | - | + | + | Klebsiella ozaenae | | | | | | |
| - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | d | + | Klebsiella pneumoniae | | | | | | |
| - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | + | (+) | + | + | - | d | + | + | + | + | - | + | + | Klebsiella rhinoscleromatis | | | | | | |
| + | - | + | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | + | - | + | d | + | + | + | (-) | + | + | Kluyvera ascorbata | | | | | | |
| + | - | - | - | d | - | - | + | - | + | + | + | d | + | + | - | + | - | + | + | d | (+) | + | + | Leclercia adecarboxylata | | | | | | |
| + | (-) | - | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | Morganella morganii ssp. morganii | | | | | | |
| d | - | d | d | + | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | Morganella morganii ssp. sibonii | | | | | | |
| - | - | - | d | - | (+) | + | (+) | + | (-) | - | d | + | + | + | + | - | d | - | (-) | - | - | - | + | Pantoea agglomerans | | | | | | |
| - | + | - | + | + | - | d | - | + | - | - | - | (-) | + | - | d | - | - | - | - | - | - | - | + | Proteus mirabilis | | | | | | |
| - | d | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - | + | d | - | - | - | - | - | - | - | - | + | Proteus penneri | | | | | | |
| + | + | - | - | + | - | (-) | - | + | - | - | - | - | + | d | - | - | d | - | - | - | - | - | + | Proteus vulgaris | | | | | | |
| + | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | + | - | (-) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | Providencia alcalifaciens | | | | | | |
| + | - | - | - | + | - | + | + | + | + | + | - | (-) | - | + | - | d | - | d | - | - | - | - | + | Providencia rettgeri | | | | | | |
| + | - | - | - | d | - | + | - | + | - | - | - | d | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | Providencia stuartii | | | | | | |
| - | + | + | + | - | d | (+) | - | - | - | d | - | - | - | + | + | - | - | + | + | - | + | + | + | Salmonella subgr. 1 | | | | | | |
| - | + | + | + | - | + | + | + | - | (-) | - | - | - | - | + | + | - | (-) | + | + | - | + | + | + | Salmonella subgr. 2 | | | | | | |
| - | + | + | + | - | d | + | + | - | + | - | - | - | - | + | + | - | - | + | + | - | - | - | + | Salmonella subgr. 3a, 3b (Arizona) | | | | | | |
| - | + | + | + | - | d | + | - | - | - | - | - | d | - | + | + | - | - | + | + | - | - | - | + | Salmonella subgr. 4 | | | | | | |
| - | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | + | + | - | - | + | (+) | + | - | + | + | Salmonella subgr. 5 | | | | | | |
| - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | d | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | Salmonella gallinarum | | | | | | |
| - | d | + | + | - | d | (-) | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | d | - | - | - | + | Salmonella choleraesuis | | | | | | |
| - | - | - | + | - | (-) | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | - | + | - | + | + | Salmonella paratyphi A | | | | | | |
| - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | - | - | - | - | + | Salmonella pullorum | | | | | | |
| - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | + | - | - | + | Salmonella typhi | | | | | | |
| - | - | - | - | - | + | - | - | + | d | - | + | + | + | (+) | + | + | d | d | d | - | - | - | + | Serratia ficaria | | | | | | |
| - | - | + | + | (-) | - | + | - | - | + | (+) | d | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | Serratia marcescens | | | | | | |
| d | - | + | + | - | - | + | - | - | + | + | d | + | + | + | + | d | + | + | + | + | + | - | + | Serratia odorifera biogroup 1 | | | | | | |
| d | - | + | - | - | + | - | - | + | + | d | + | - | + | + | + | d | + | + | + | - | - | - | + | Serratia odorifera biogroup 2 | | | | | | |
| - | - | d | - | - | - | + | + | - | + | (-) | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | - | + | Serratia rubidaea | | | | | | |
| d | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | (+) | + | - | - | d | - | d | d | - | + | Shigella A, B, C | | | | | |
| - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | (+) | (-) | - | - | - | + | Shigella sonnei | | | | | |
| d | - | - | (+) | (+) | - | - | - | - | + | d | - | (+) | + | + | + | - | (-) | + | - | - | - | - | - | + | Yersinia enterocolitica | | | | | |
| d | - | - | + | (+) | - | - | - | - | d | (-) | - | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | Yersinia kristensenii | | | | | |
| - | - | - | - | - | - | - | - | - | d | - | - | - | - | + | + | - | d | d | - | (-) | - | - | - | + | Yersinia pestis | | | | | |
| - | - | - | - | + | - | - | - | - | d | - | - | - | - | + | + | - | + | - | d | d | (-) | - | - | + | Yersinia pseudotuberculosis | | | | | |
| - | - | - | (-) | d | - | - | - | - | d | - | - | (-) | + | + | + | - | + | - | - | d | d | - | - | + | Yersinia rohdei | | | | | |
| - | - | + | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + | + | + | - | d | - | + | + | (-) | - | - | + | Yokenella regensburgei | | | | | |

Vysvětlivky: + = pozitivní reakce (+) = většinou pozitivní reakce
 - = negativní reakce (-) = většinou negativní reakce
 d = variabilní reakce

Ochrana zdraví: Komponenty soupravy neobsahují nebezpečné látky
 Datum poslední revize: 6. 2. 2008