

LF – PRAKTICKÉ CVIČENÍ 2

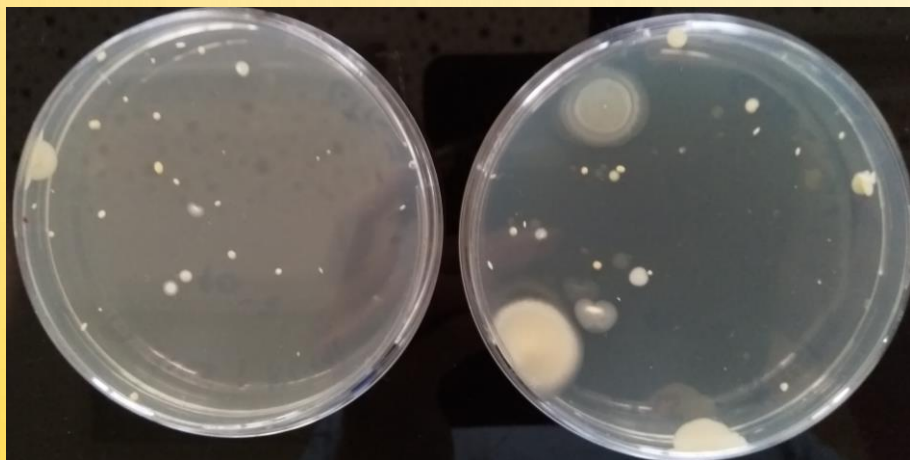
DISTANČNÍ FORMA VÝUKY

LS 2020/2021

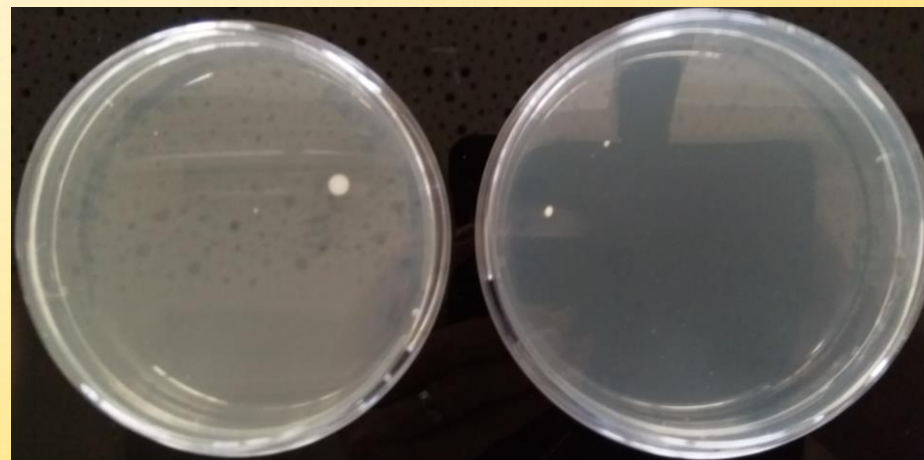
NÁPLŇ CVIČENÍ

1. CPM – ukázka narostlých Petriho misek
2. Vyhodnocení výsledků plotnových metod – teoretický úvod + procvičení
3. Ukázka typického růstu vybraných patogenních bakterií
4. Stanovení reziduí inhibičních látek v potravinách (RIL)

1. CPM – UKÁZKA PM

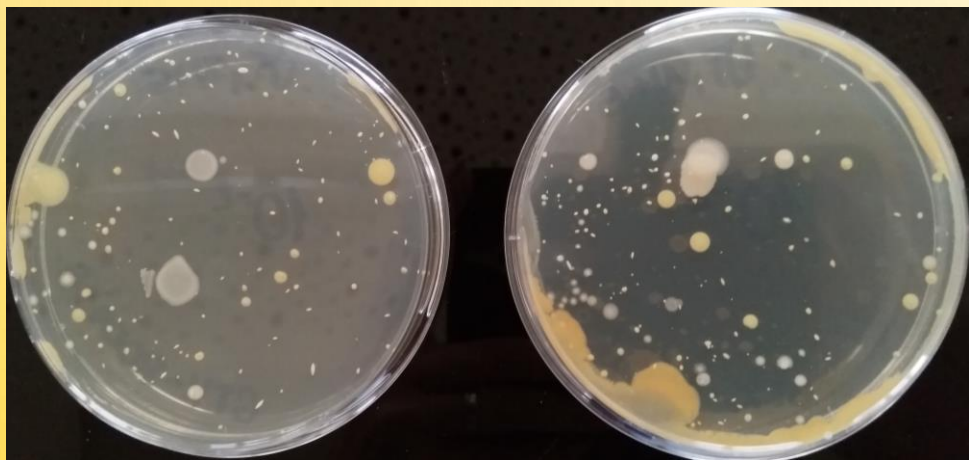


ředění 10^{-2} : 32 KTJ a 30 KTJ

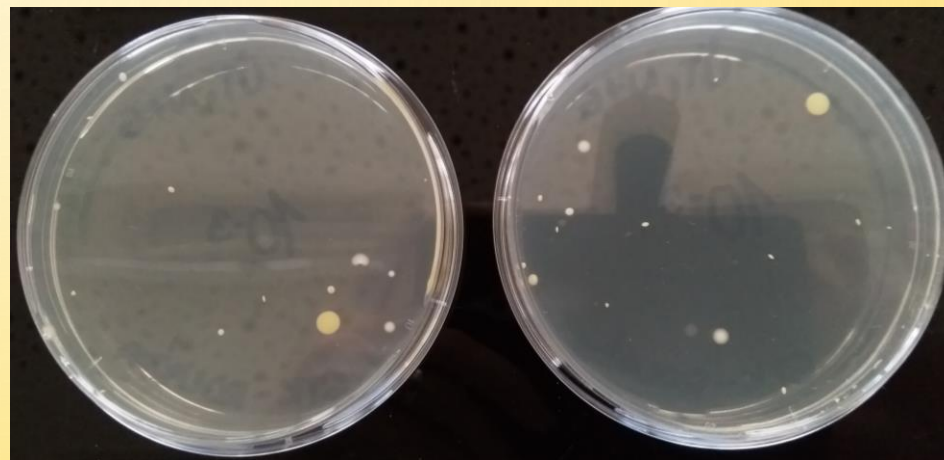


ředění 10^{-3} : 4 KTJ a 2 KTJ

VÍCE KONTAMINOVANÉ

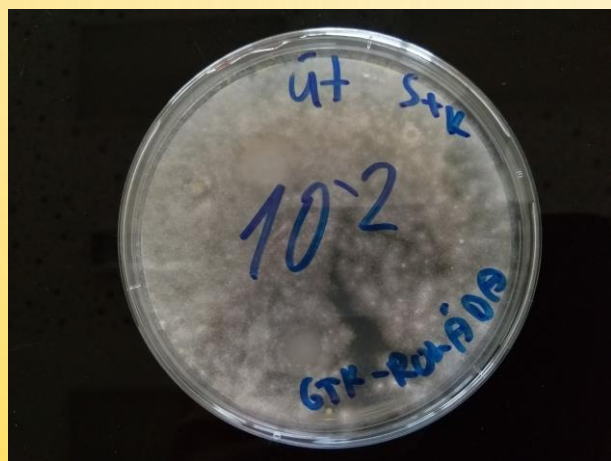


ředění 10^{-2}

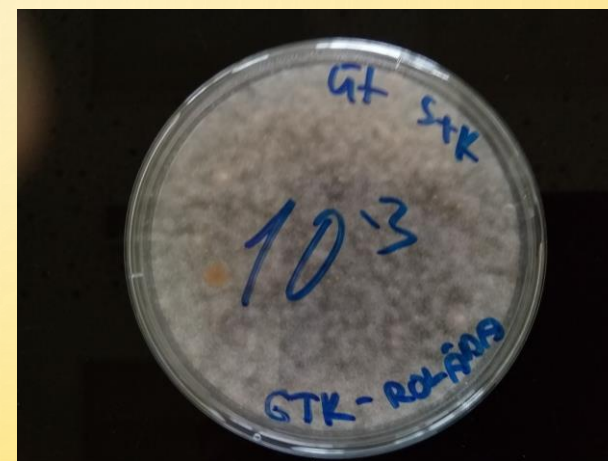


ředění 10^{-3}

NEHODNOTITELNÉ



ředění 10^{-2}



ředění 10^{-3}

2. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ PLOTNOVÝCH METOD

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE
Ústav hygieny a technologie mléka

VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ PLOTNOVÝCH METOD

Petra Tylšová
Karolína Hásková
MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

BRNO 2017

OBSAH

1.	STANOVENÍ POČTU MIKROORGANISMŮ (N)	3
1.1.	Obecné zásady	3
1.2.	Vzorové příklady	5
2.	ODHAD POČTU MIKROORGANISMŮ (N_E)	10
2.1.	Obecné zásady	10
2.2.	Vzorové příklady	12
3.	PŘÍKLADY NA PROCVIČENÍ	16
3.1.	Zadání příkladů	16
3.2.	Řešení příkladů	28

OBECNÉ ZÁSADY

Po skončení inkubace stanovené příslušnou metodikou se počítají kolonie narostlé na Petriho miskách, a to všechny kolonie nebo pouze kolonie s charakteristickou morfologií, které dávají charakteristické reakce se složkami půdy (záleží na stanovovaném parametru).

Pro vlastní výpočet vybereme misky obsahující ne více než 300 kolonií (CPM, BMK), resp. 150 kolonií (ostatní ukazatele) ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Je nutné, aby alespoň jedna z těchto misek obsahovala minimálně 10 kolonií.

Výsledek se zaokrouhlí tak, aby obsahoval pouze dvě platné číslice. Je-li třetí číslice čísla určeného k zaokrouhlení nižší než 5, předchozí číslice se nemění; je-li třetí číslice čísla určeného k zaokrouhlení vyšší nebo rovna 5, předchozí číslice se zvýší o hodnotu jedna.

Počet mikroorganismů – kolonie tvořících jednotek (KTJ) v 1 ml u tekutých výrobků nebo v 1 g u ostatních výrobků se vyjádří jako číslo **1,0 až $9,9 \cdot 10^x$** , kde **x** je příslušná mocnina 10.

VZOREC – 2 ŘEDĚNÍ

Počet mikroorganismů (N) přítomných ve vzorku se vypočítá jako vážený průměr ze dvou po sobě jdoucích ředění podle následující rovnice:

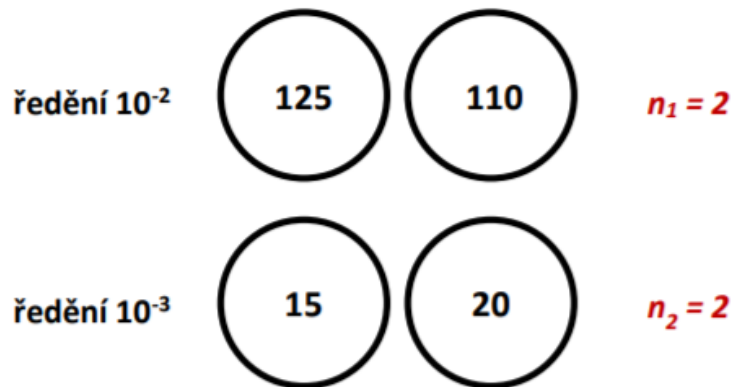
$$N = \frac{\Sigma C}{V (n_1 + 0,1 \cdot n_2) d}$$

Kde:

- Σ C** je součet kolonií ze všech ploten vybraných pro výpočet ze dvou po sobě následujících ředění, přičemž nejméně jedna z ploten obsahuje 10 kolonií,
- V** je objem inokula v ml očkovaného na každou z ploten,
- n₁** je počet ploten vybraných k výpočtu z prvního (nižšího) zvoleného ředění,
- n₂** je počet ploten vybraných k výpočtu z druhého (vyššího) zvoleného ředění,
- d** je ředící faktor prvního (nižšího) pro výpočet zvoleného ředění.

Vzorový příklad 1

Ve vzorku syrového mléka byl stanoven celkový počet mikroorganismů metodou zalití 1 ml, byla použita ředění 10^{-2} a 10^{-3} , každým ředěním byly inokulovány 2 Petriho misky. Po skončení inkubace byly na Petriho miskách spočítány všechny narostlé kolonie.



- pravidlo, že alespoň jedna Petriho miska použitá k výpočtu musí obsahovat minimálně 10 kolonií je splněno
- na žádné z Petriho misek nenarostlo více než 300 kolonií (limit pro CPM), proto do výpočtu započítáme výsledky ze všech misek – lze použít základní vzorec

$$\Sigma C = 125 + 110 + 15 + 20$$

$$V = 1$$

$$d = 10^{-2}$$

- byla použita metoda zalití 1 ml inokula
- první (nižší) použité ředění je ředění 10^{-2}
- jedná se o tekutý vzorek, výsledek uvedeme jako počet KTJ v 1 ml syrového mléka

$$N = \frac{\Sigma C}{V (n_1 + 0,1 \cdot n_2) d} = \frac{125 + 110 + 15 + 20}{1 (2 + 0,1 \cdot 2) 10^{-2}} = \frac{270}{1 \cdot 2,2 \cdot 0,01} = \frac{270}{0,022} = 12\,272,7$$

- výsledek zaokrouhlíme a upravíme následovně: $12\,272,7 = 12\,000 = 1,2 \cdot 10^4$ KTJ/ml

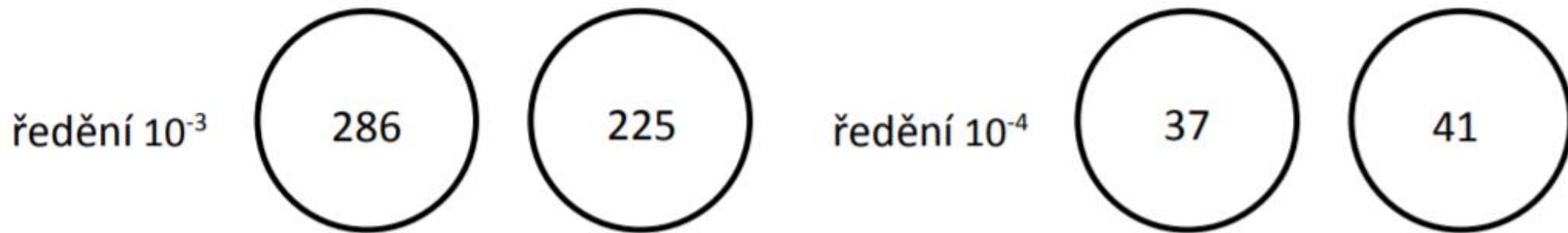
Ve vzorku syrového mléka byl stanoven celkový počet mikroorganismů $1,2 \cdot 10^4$ KTJ/ml.

PŘÍKLAD

VYPOČÍTEJTE – ZADÁNÍ

Příklad 1

Ve vzorku cukrářského výrobku byl stanoven celkový počet mikroorganismů metodou zalití 1 ml, byla použita ředění 10^{-3} a 10^{-4} , každým ředěním byly inokulovány 2 Petriho misky. Po skončení inkubace byly na Petriho miskách zjištěny následující počty kolonií:



Vypočítejte celkový počet mikroorganismů v cukrářském výrobku.

Výsledek napište na chat probíhající akce.

VYPOČÍTEJTE – ŘEŠENÍ

Příklad 1

Do výpočtu zahrneme výsledky ze všech Petriho misek (limit CPM max. 300 kolonií), pro výpočet použijeme základní vzorec.

$$N = \frac{\Sigma C}{V (n_1 + 0,1 \cdot n_2) d} = \frac{286 + 225 + 37 + 41}{1 (2 + 0,1 \cdot 2) 10^{-3}} = \frac{589}{1 \cdot 2,2 \cdot 0,001} = \frac{589}{0,0022} = 267\,727,2$$

Úprava výsledku: $267\,727,2 = 270\,000 = 2,7 \cdot 10^5$ KTJ/g

Kdo měl správně zapíše si bod 😊.

VZOREC – 1 ŘEDĚNÍ

Jestliže máme k dispozici počítatelné misky pouze z jednoho ředění, použijeme pro stanovení počtu mikroorganismů rovnici upravenou následujícím způsobem:

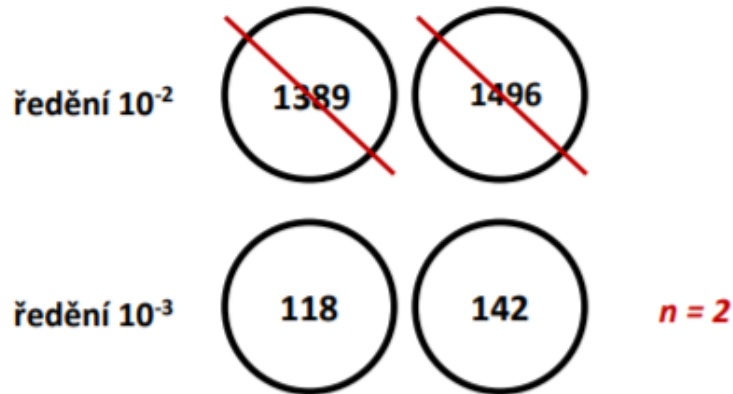
$$N = \frac{\Sigma C}{V \cdot n \cdot d}$$

Kde:

- ΣC** je součet kolonií ze všech ploten vybraných pro výpočet, přičemž nejméně jedna z ploten obsahuje 10 kolonií,
- V** je objem inokula v ml očkovaného na každou z ploten,
- n** je počet ploten vybraných k výpočtu ze zvoleného (počítatelného) ředění,
- d** je ředící faktor pro výpočet zvoleného ředění.

Vzorový příklad 5

Ve vzorku syrového mléka byl stanoven počet proteolytických mikroorganismů metodou roztěru 0,2 ml, byla použita ředění 10^{-2} a 10^{-3} , každým ředěním byly inokulovány 2 Petriho misky. Po skončení inkubace byly na Petriho miskách spočítány charakteristické kolonie proteolytických mikroorganismů.



- pravidlo, že alespoň jedna Petriho miska použitá k výpočtu musí obsahovat minimálně 10 kolonií je splněno
- na obou Petriho miskách z ředění 10^{-2} narostlo více než 150 kolonií (limit pro proteolyty), výsledky tohoto ředění do výpočtu nezařadíme – lze použít vzorec upravený pro 1 ředění

$$\Sigma C = 118 + 142$$

- byla použita metoda roztěru 0,2 ml inokula

$$V = 0,2$$

- jediné použitelné ředění je ředění 10^{-3}

$$d = 10^{-3}$$

- jedná se o tekutý vzorek, výsledek uvedeme jako počet KTJ v 1 ml syrového mléka

$$N = \frac{\Sigma C}{V \cdot n \cdot d} = \frac{118 + 142}{0,2 \cdot 2 \cdot 10^{-3}} = \frac{260}{0,2 \cdot 2 \cdot 0,001} = \frac{260}{0,0004} = 650\,000$$

- výsledek zaokrouhlíme a upravíme následovně: $650\,000 = 6,5 \cdot 10^5$ KTJ/ml

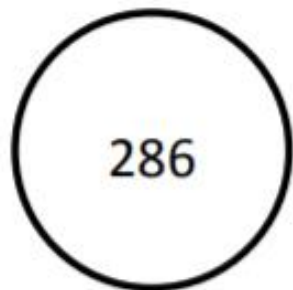
PŘÍKLAD

VYPOČÍTEJTE – ZADÁNÍ

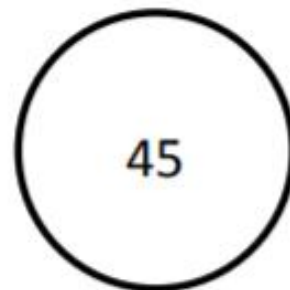
Příklad 2

Ve vzorku syrového mléka byl stanoven počet *Bacillus cereus* metodou roztěru 0,2 ml, byla použita ředění 10^0 a 10^{-1} , každým ředěním byla inokulována 1 Petriho miska. Po skončení inkubace byly na Petriho miskách zjištěny následující počty kolonií:

ředění 10^0



ředění 10^{-1}



Vypočítejte počet *Bacillus cereus* v syrovém mléce.

***B. cereus* max. 150 KTJ na PM**

Výsledek napište na chat probíhající akce.

VYPOČÍTEJTE – ŘEŠENÍ

Příklad 2

Do výpočtu nezahrneme výsledky ředění 10^0 , protože miska je přerostlá (limit *B. cereus* max. 150 kolonií), pro výpočet použijeme vzorec upravený pro 1 ředění.

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot n \cdot d} = \frac{45}{0,2 \cdot 1 \cdot 10^{-1}} = \frac{45}{0,2 \cdot 1 \cdot 0,1} = \frac{45}{0,02} = 2\,250$$

Úprava výsledku: $2\,250 = 2\,300 = 2,3 \cdot 10^3$ KTJ/ml

Kdo měl správně zapíše si druhý bod 😊.

ODHAD POČTU – MÉNĚ NEŽ 10 KTJ

Jestliže na Petriho miskách u obou použitých ředění vyrostlo **méně než 10 kolonií**, vypočítá se **hodnota N_E** (odhad počtu sledovaných mikroorganismů ve vzorku) jako aritmetický průměr počtu kolonií vybraného ředění podle následující rovnice:

$$N_E = \frac{\Sigma C}{V \cdot n \cdot d}$$

Kde:

ΣC je součet kolonií ze všech ploten vybraných pro výpočet,

V je objem inokula v ml očkovaného na každou z ploten,

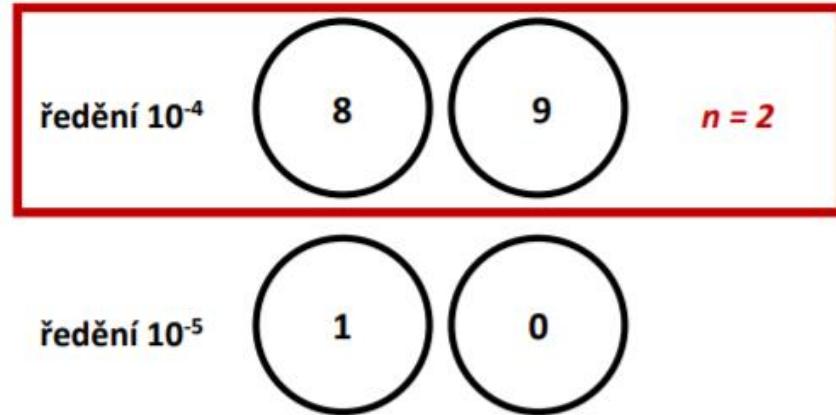
n je počet ploten zvoleného ředění (volíme ředění, ve kterém se zjištěné počty kolonií více blíží hodnotě 10),

d je ředící faktor pro výpočet zvoleného ředění.

Výsledek se zaokrouhlí a upraví obvyklým způsobem.

Vzorový příklad 1

Ve vzorku syrového mléka byl stanoven celkový počet mikroorganismů metodou zalití 1 ml, byla použita ředění 10^{-4} a 10^{-5} , každým ředěním byly inokulovány 2 Petriho misky. Po skončení inkubace byly na Petriho miskách spočítány všechny narostlé kolonie.



- pravidlo, že alespoň jedna Petriho miska použitá k výpočtu musí obsahovat minimálně 10 kolonií, není splněno – musíme provést odhad počtu
- počty kolonií v ředění 10^{-4} se výrazně blíží hodnotě 10, v tomto případě se nejedná o sekundární kontaminaci – provedeme odhad počtu aritmetickým průměrem
- použijeme hodnoty z prvního (nižšího) ředění $\Sigma C = 8 + 9$ $d = 10^{-4}$
- byla použita metoda zalití 1 ml inokula $V = 1$
- jedná se o tekutý vzorek, výsledek uvedeme jako odhad počtu KTJ v 1 ml syrového mléka

$$N_E = \frac{\Sigma C}{V(n)d} = \frac{8 + 9}{1(2)10^{-4}} = \frac{17}{1 \cdot 2 \cdot 0,0001} = \frac{17}{0,0002} = 85\,000$$

- výsledek zaokrouhlíme a upravíme následovně: $85\,000 = 8,5 \cdot 10^4$ KTJ/ml

V syrovém mléku byl stanoven odhadem celkový počet mikroorganismů $8,5 \cdot 10^4$ KTJ/ml.

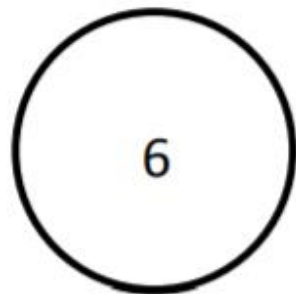
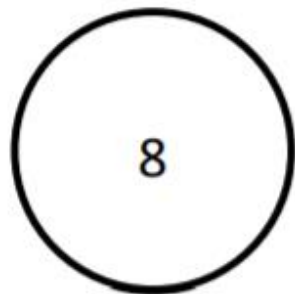
PŘÍKLAD

VYPOČÍTEJTE – ZADÁNÍ

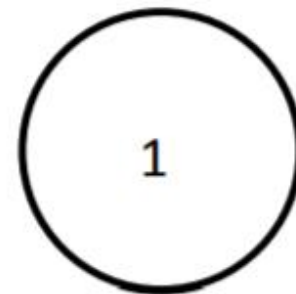
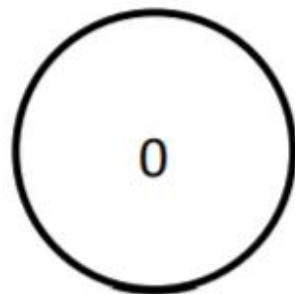
Příklad 4

Ve vzorku tvarohu byl stanoven počet kvasinek metodou roztěru 0,1 ml, byla použita ředění 10^{-1} a 10^{-2} , každým ředěním byly inokulovány 2 Petriho misky. Po skončení inkubace byly na Petriho miskách zjištěny následující počty kolonií:

ředění 10^{-1}



ředění 10^{-2}



Vypočítejte počet kvasinek v tvarohu.

Výsledek napište na chat probíhající akce.

VYPOČÍTEJTE – ŘEŠENÍ

Příklad 4

Ani jedna Petriho miska neobsahuje minimálně 10 kolonií, provedeme odhad počtu pomocí aritmetického průměru.

$$N_E = \frac{\Sigma C}{V \cdot n \cdot d} = \frac{8 + 6}{0,1 \cdot 2 \cdot 10^{-1}} = \frac{14}{0,1 \cdot 2 \cdot 0,1} = \frac{14}{0,02} = 700$$

Úprava výsledku: $700 = 7 \cdot 10^2$ KTJ/g

Kdo měl správně zapíše si další bod 😊.

ODHAD POČTU – MÉNĚ NEŽ

Jestliže na Petriho miskách u obou použitých ředění **nebyly zjištěny žádné kolonie** (nebo pouze ojedinele), vypočítá se **hodnota N_E** podle následující rovnice:

$$N_E = \frac{<1}{V \cdot d}$$

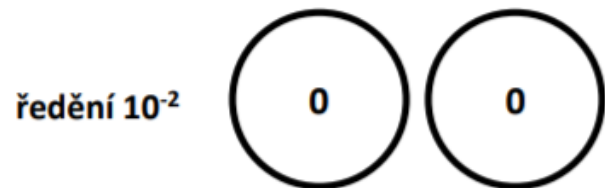
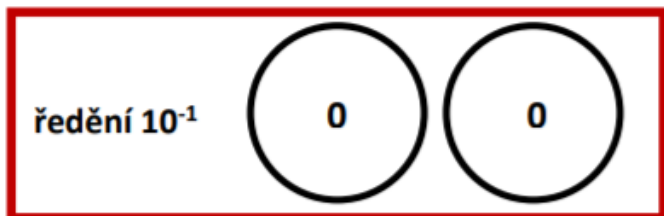
Kde:

- V** je objem inokula v ml očkovaného na každou z ploten,
- d** je ředící faktor prvního (nižšího) použitého ředění vzorku.

Výsledek se zaokrouhlí a upraví obvyklým způsobem.

Vzorový příklad 3

Ve vzorku čerstvého sýru byl stanoven počet *Escherichia coli* metodou roztěru 0,2 ml, byla použita ředění 10^{-1} a 10^{-2} , každým ředěním byly inokulovány 2 Petriho misky. Po skončení inkubace byly na Petriho miskách spočítány typické kolonie *Escherichia coli*.



- nebyl pozorován nárůst typických kolonií – provedeme odhad počtu „méně než“
- použijeme první (nižší) ředění vzorku $d = 10^{-1}$
- byla použita metoda roztěru 0,2 ml inokula $V = 0,2$
- jedná se o pevný vzorek, výsledek uvedeme jako odhad počtu KTJ v 1 g sýru

$$N_E = \frac{<1}{V \cdot d} = \frac{<1}{0,2 \cdot 10^{-1}} = \frac{<1}{0,2 \cdot 0,1} = \frac{<1}{0,02} = <50$$

- výsledek zaokrouhlíme a upravíme následovně: $<50 = <5 \cdot 10^1$ KTJ/g

V čerstvém sýru byl stanoven odhadem počet *Escherichia coli* $< 5 \cdot 10^1$ KTJ/g.

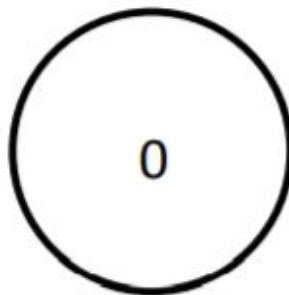
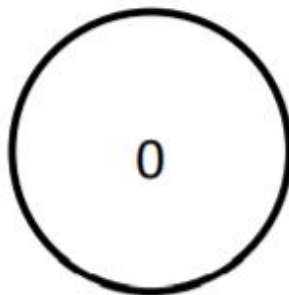
PŘÍKLAD

VYPOČÍTEJTE – ZADÁNÍ

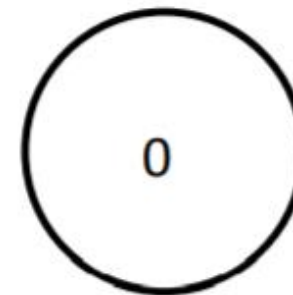
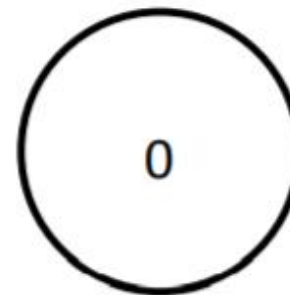
Příklad 3

Ve vzorku pasterovaného mléka byl stanoven počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* metodou zalití 1 ml, byla použita ředění 10^0 a 10^{-1} , každým ředěním byly inokulovány 2 Petriho misky. Po skončení inkubace byly na Petriho miskách zjištěny následující počty kolonií:

ředění 10^0



ředění 10^{-1}



Vypočítejte počet *Enterobacteriaceae* v pasterovaném mléce.

Výsledek napište na chat probíhající akce.

VYPOČÍTEJTE – ŘEŠENÍ

Příklad 3

Na Petriho miskách nenarostly žádné typické kolonie, provedeme odhad počtu „méně než“.

$$N_E = \frac{< 1}{V \cdot d} = \frac{< 1}{1 \cdot 10^0} = \frac{< 1}{1 \cdot 1} = < 1$$

Úprava výsledku: **< 1 KTJ/ml**

Kdo měl správně zapíše si bod 😊.

ODHAD POČTU – VÍCE NEŽ

Jestliže na Petriho miskách u obou použitých ředění **převýšil počet kolonií limit 150, resp. 300** (dle stanovovaného parametru), vypočítá se **hodnota N_E** podle následující rovnice:

$$N_E = \frac{> 150 \text{ nebo } > 300}{V \cdot d}$$

Kde:

V je objem inokula v ml očkovaného na každou z ploten,

d je ředící faktor druhého (vyššího) použitého ředění vzorku.

Výsledek se zaokrouhlí a upraví obvyklým způsobem.

Vzorový příklad 5

Ve vzorku syrového mléka byl stanoven počet enterokoků metodou roztěru 0,2 ml, byla použita ředění 10^0 a 10^{-1} , každým ředěním byly inokulovány 2 Petriho misky. Po skončení inkubace byly na Petriho miskách spočítány typické kolonie enterokoků.

ředění 10^0 1099 1025

ředění 10^{-1} 237 339

- na všech Petriho miskách narostlo více než 150 kolonií (limit pro enterokoky) – provedeme odhad počtu „více než“
- použijeme druhé (vyšší) ředění vzorku $d = 10^{-1}$
- byla použita metoda roztěru 0,2 ml inokula $V = 0,2$
- jedná se o tekutý vzorek, výsledek uvedeme jako odhad počtu KTJ v 1 ml syrového mléka

$$N_E = \frac{> 150}{V \cdot d} = \frac{> 150}{0,2 \cdot 10^{-1}} = \frac{> 150}{0,2 \cdot 0,1} = \frac{> 150}{0,02} = > 7\,500$$

- výsledek zaokrouhlíme a upravíme následovně: $> 7\,500 = > 7,5 \cdot 10^3$ KTJ/ml

V syrovém mléku byl stanoven odhadem počet enterokoků $> 7,5 \cdot 10^3$ KTJ/ml.

PŘÍKLAD

VYPOČÍTEJTE – ZADÁNÍ

Příklad 14

Ve vzorku sušeného mléka byl stanoven počet enterokoků metodou roztěru 0,2 ml, byla použita ředění 10^{-2} a 10^{-3} , každým ředěním byly inokulovány 2 Petriho misky. Po skončení inkubace byly na Petriho miskách zjištěny následující počty kolonií:

ředění 10^{-2}

698

416

ředění 10^{-3}

215

195

Vypočítejte počet enterokoků v sušeném mléce.

enterokoky max. 150 KTJ na PM

Výsledek napište na chat probíhající akce.

VYPOČÍTEJTE – ŘEŠENÍ

Příklad 14

Na všech Petriho miskách byl překročen limit pro enterokoky (max. 150 kolonií), provedeme odhad počtu „více než“.

$$N_E = \frac{> 150}{V \cdot d} = \frac{> 150}{0,2 \cdot 10^{-3}} = \frac{> 150}{0,2 \cdot 0,001} = \frac{> 150}{0,0002} = > 750\,000$$

Úprava výsledku: $> 750\,000 = > 7,5 \cdot 10^5$ KTJ/g

Kdo měl správně zapíše si opět bod 😊.

HODNOCENÍ SAMOSTATNÉ PRÁCE

- sečtěte si získané body a podívejte se, jak jste dopadli 😊

Body	Hodnocení
5	perfektní výsledek, asi vám odpustíme kontrolní test
4	výborně, můžete bez obav hned psát písemku
2 – 3	dobře, něco se povedlo, ale ještě to není ono
0 – 1	bohužel, je třeba důkladné samostudium

3. UKÁZKY TYPICKÉHO RŮSTU VYBRANÝCH PATOGENNÍCH BAKTERIÍ

Bakterie rodu *Salmonella* - průkaz



- **gramnegativní tyčinky** (*Enterobacteriaceae*)
- obvykle pohyblivé
- produkce sirovodíku
- laktóza negativní
- salmonelóza (zoonóza)

***Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis**

(2 druhy, 6 poddruhů, více než 2500 serovarů)

Průkaz bakterií rodu *Salmonella*

*neselektivní
pomnožení*

x g nebo ml vzorku + 9x ml **PPV**

37 °C, 16–20 h, aerobně



*selektivní
pomnožení*

0,1 ml kultury + 10 ml **RVS**

41,5 °C, 24 h, aerobně

1 ml kultury + 10 ml **MKTTn**

37 °C, 24 h, aerobně

z obou tekutých půd na oba agary



izolace

1. půda **XLD** agar

37 °C, 24 h, aerobně



2. půda např. **BR** agar

37 °C, 24 h, aerobně



konfirmace

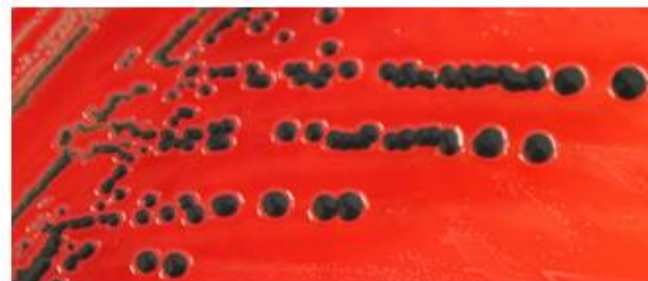
5 charakteristických kolonií (z každé misky)

biochemická konfirmace, serologická konfirmace a serotypizace

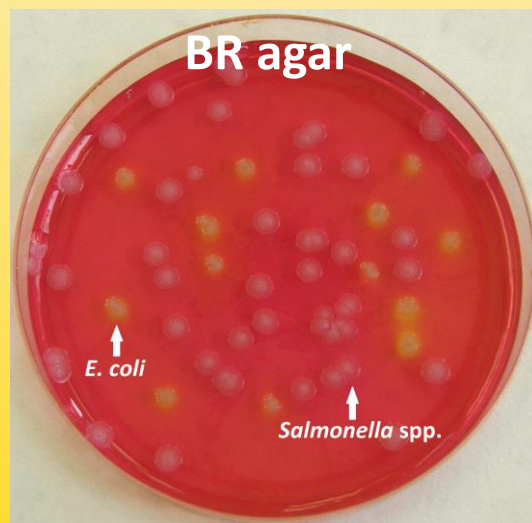
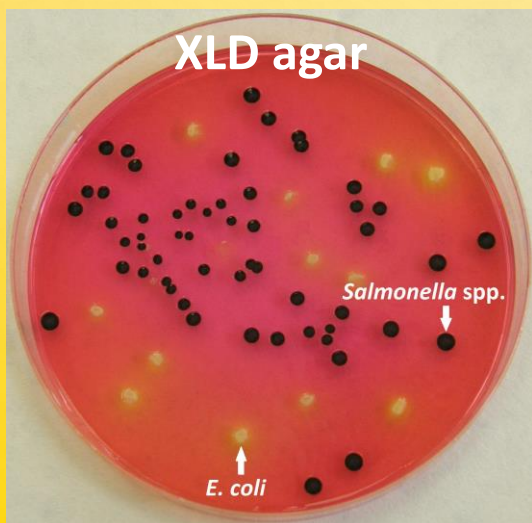
PPV: pufovaná peptonová voda; **RVS:** Rappaport Vassiliadis sója medium; **MKTTN:** Mueller-Kauffman tetrathionát novobiocin medium; **XLD:** agar s xylosou, lyzinem a deoxycholátem; **BR:** agar s brilantovou zelení a fenolovou červení

Typické kolonie *Salmonella* spp.

XLD agar: kolonie pravidelné, malé až středně velké (1 – 3 mm), okrouhlé, téměř průsvitné a narůžovělé (*negativní laktosa*) s černým středem (*produkce sirovodíku*), dochází ke změně barvy živného média - červenání



BR agar: kolonie pravidelné, malé až středně velké (1 – 3 mm), okrouhlé, bezbarvé či mléčně zakalené (*negativní laktosa*), dochází ke změně barvy živného média – pivoňkově červená



LISTERIA MONOCYTOGENES

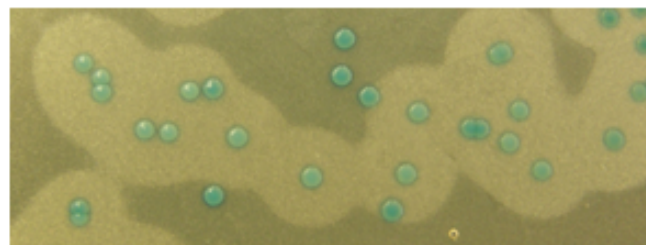
Listeria monocytogenes



- **grampozitivní krátké tyčinky** (*Listeriaceae*)
- pohyblivé do 25 °C
- listerióza (zoonóza)
- rizikové skupiny
- afinita k CNS a gravidní děloze

Typické kolonie *Listeria monocytogenes*

ALOA agar: kolonie pravidelné, malé až středně velké (1–3 mm), okrouhlé, modrozelené barvy (*aktivita galaktosidasy*) obklopené širokou kruhovou neprůhlednou zónou precipitace (*aktivita fosfolipázy C*)



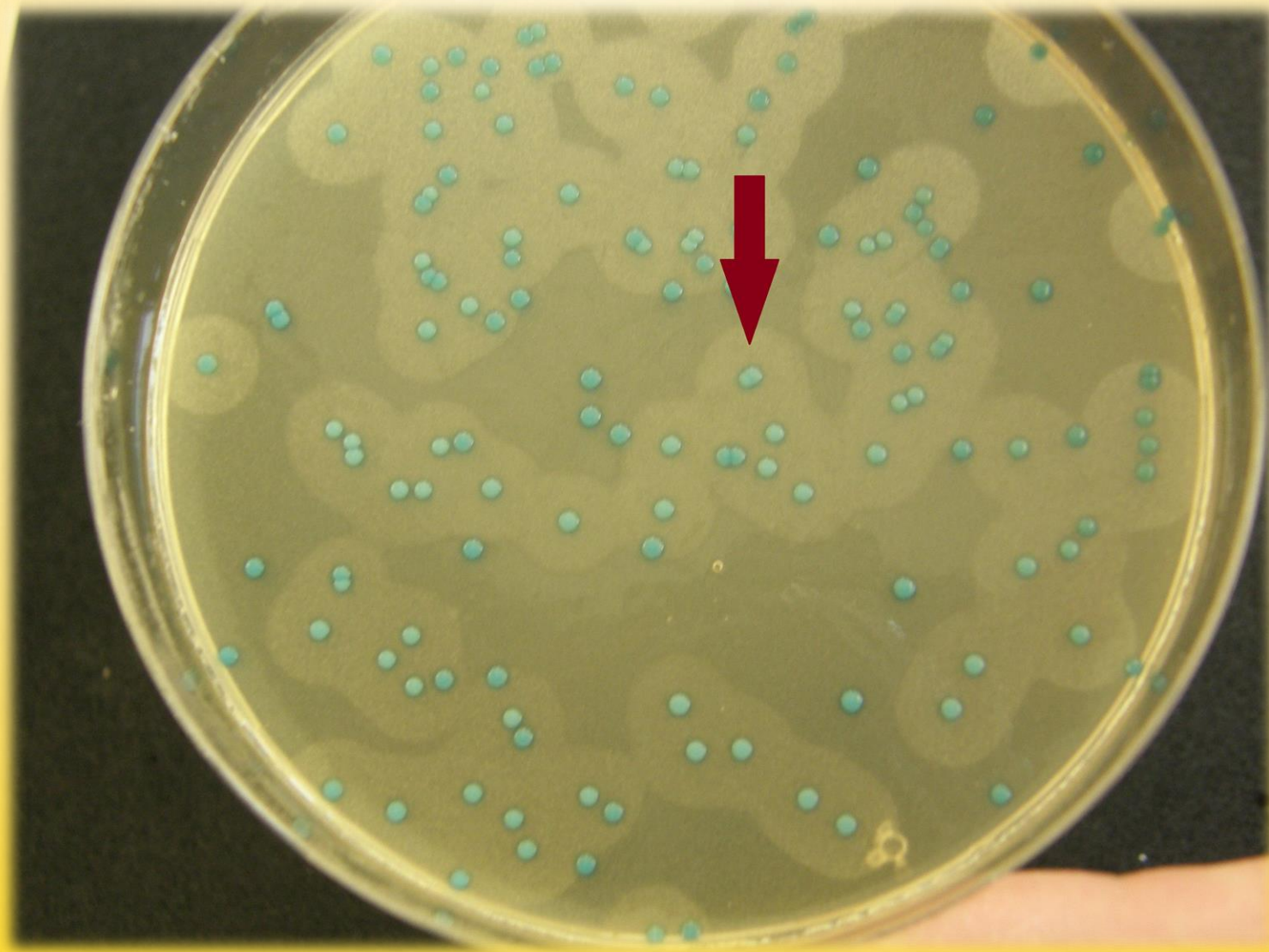
PALCAM agar: kolonie pravidelné, drobné (1,5–2 mm), okrouhlé, šedozelené nebo olivové barvy často s typickým propadlým středem (*starší kolonie*), kolonie jsou obklopeny hnědočernou až černou kruhovou zónou (*hydrolýza eskulinu*)



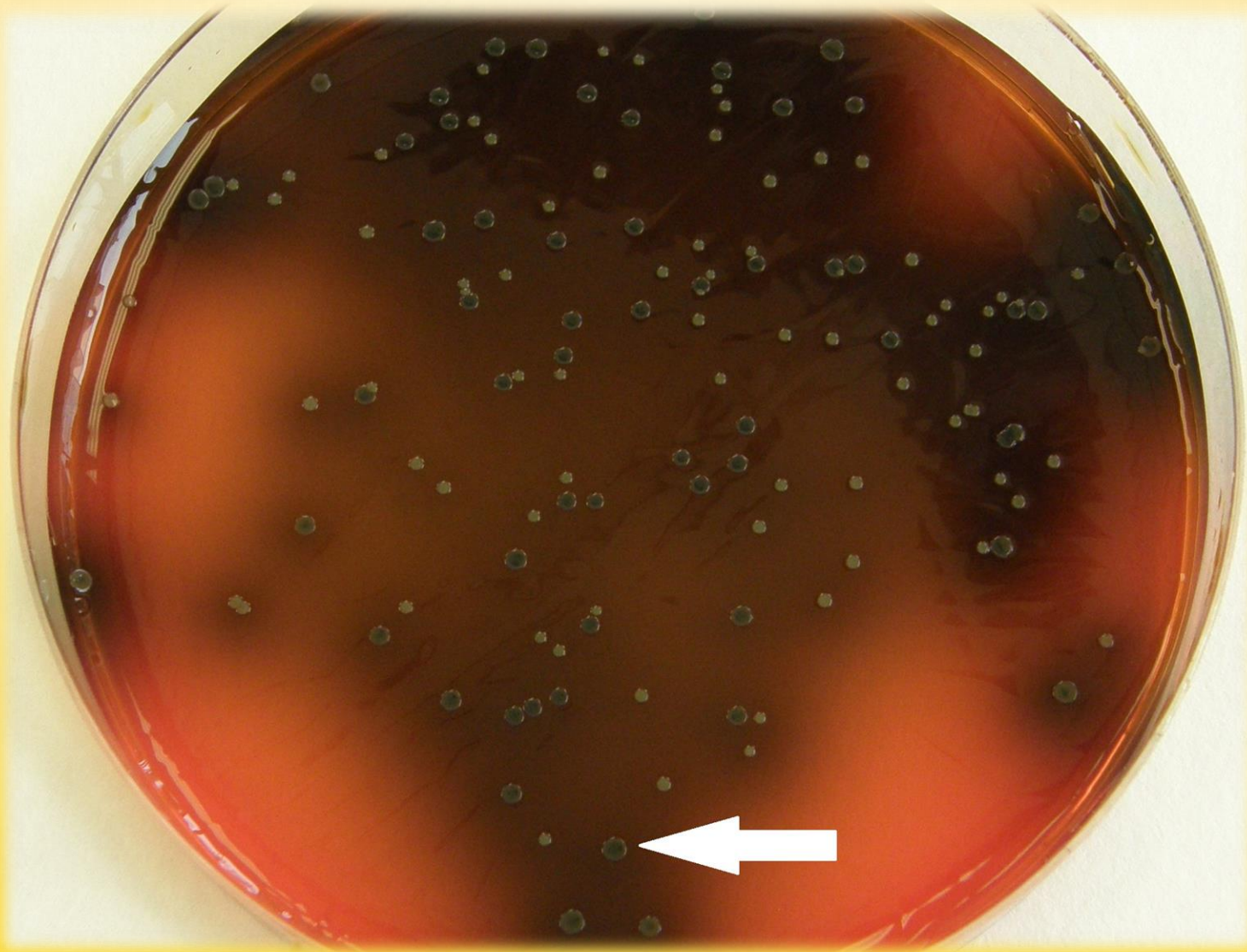
Identifikace druhů rodu *Listeria*

Druh	Hemolýza	Tvorba kyseliny		CAMP test	
		rhamnosa	xylosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i> *
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	-	-

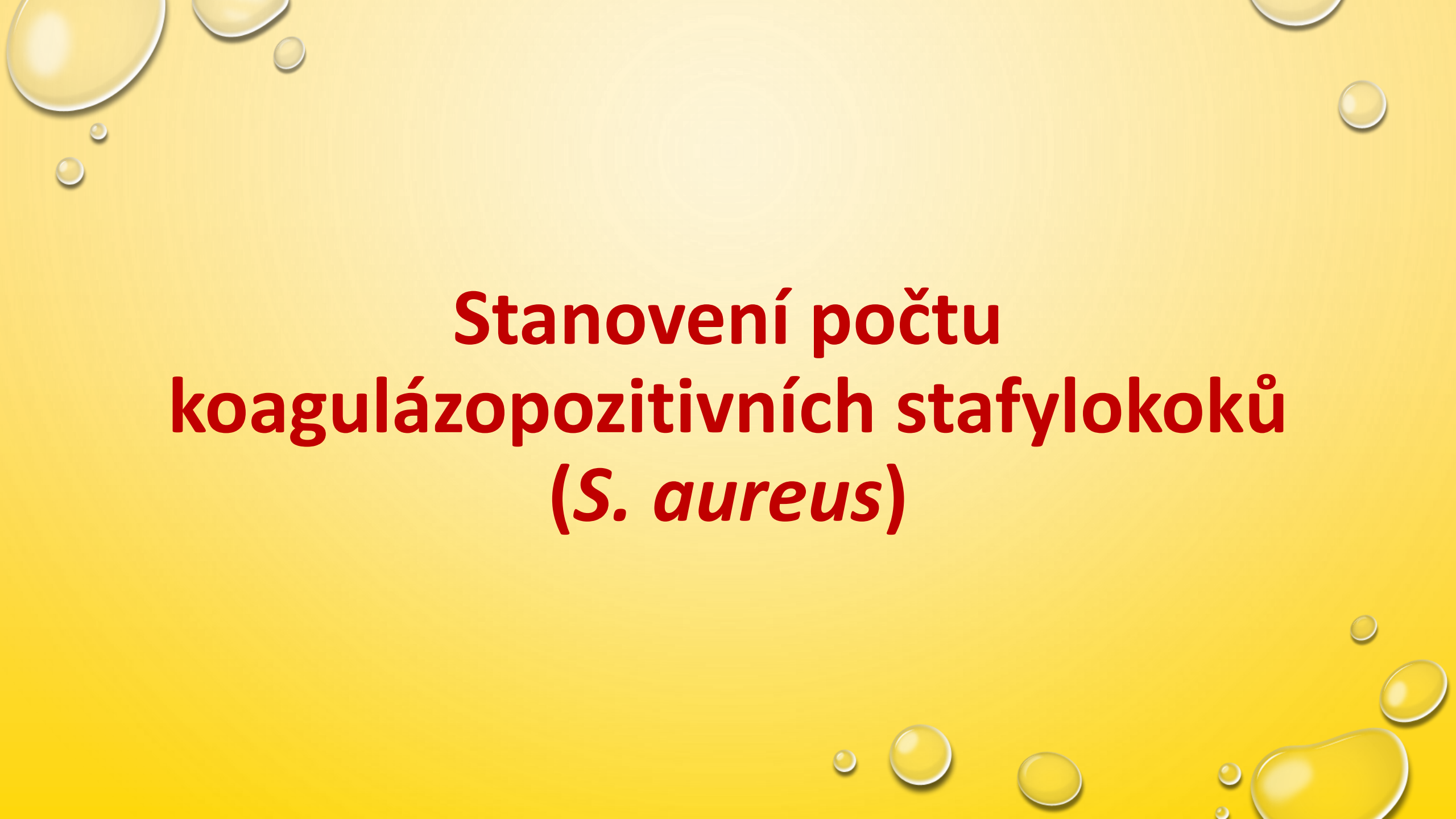
V: variabilní reakce; (+): slabá reakce; * *Rhodococcus equi*



ALOA agar

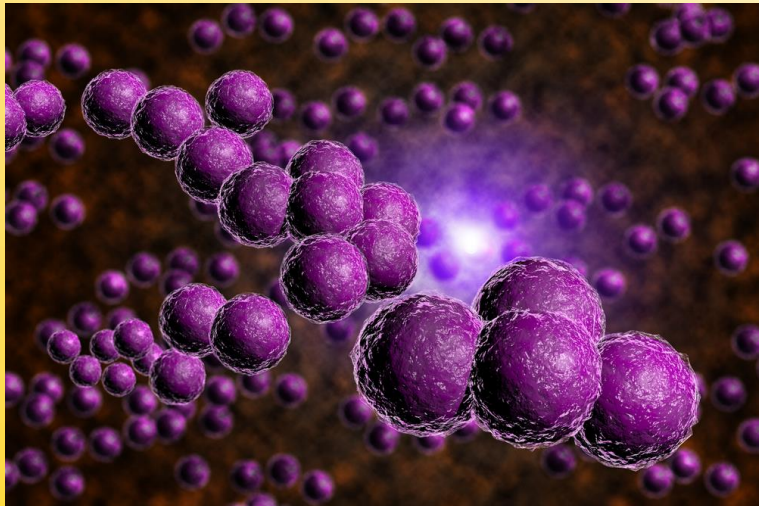


PALCAM agar

The background is a bright yellow gradient with several realistic water droplets of various sizes scattered around the edges. The droplets have highlights and shadows, giving them a three-dimensional appearance.

Stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*S. aureus*)

Staphylococcus aureus

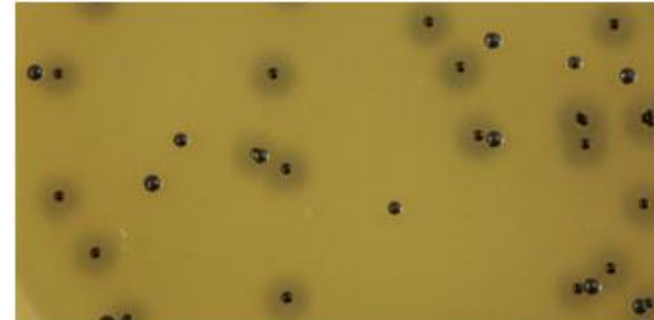


- **grampozitivní koky** (*Staphylococcaceae*)
- hroznovité shluky
- fakultativně anaerobní
- nepohyblivé
- produkuje žlutý pigment
- 10 % NaCl, aktivita vody 0,86
- stafylokoková enterotoxikóza (termostabilní SEs)
- alimentární intoxikace

Kolonie *Staphylococcus aureus* na B-P agaru

Typické kolonie: kolonie černé nebo černošedé barvy (*redukce teluričitanu*), lesklé a vypouklé, o průměru 1 – 1,5 mm, obklopené zónou projasnění (*aktivita lecitinasy*), v zóně projasnění se může objevit opalescentní prstenec

Atypické kolonie: kolonie černé, lesklé, s úzkým bílým okrajem nebo bez něj, zóna projasnění a opalescentní prstenec chybí nebo jsou sotva viditelné, příp. šedé kolonie bez zóny projasnění

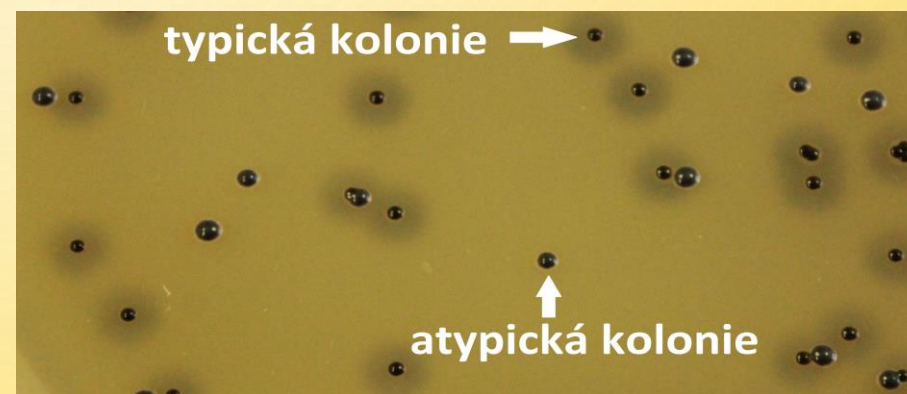
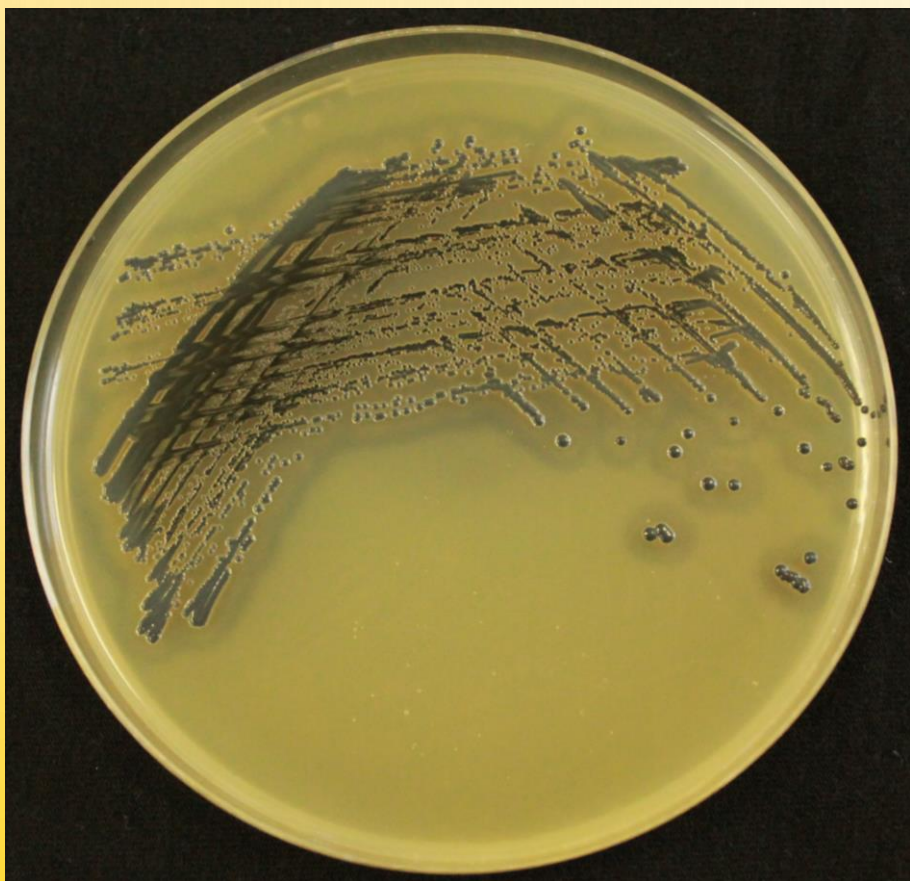


Konfirmace vybraných kolonií spočívá v provedení **koagulasového testu (volná koagulasa)**. Kolonie se přenese do zkumavky s mozkosrdcovou infuzí (BHI), inkubace 24 h při 37 °C. Ve sterilní zkumavce se smíchá 0,1 ml suspenze a 0,3 ml králičí plazmy, inkubace při 37 °C. Po 4 – 6 h, resp. 24 h, sledujeme, zda došlo ke koagulaci více než poloviny přidané plazmy. Současně provedeme negativní kontrolu se sterilní BHI.



U vybraných kolonií lze provést i test na průkaz **vázané koagulasy** (clumping faktor).

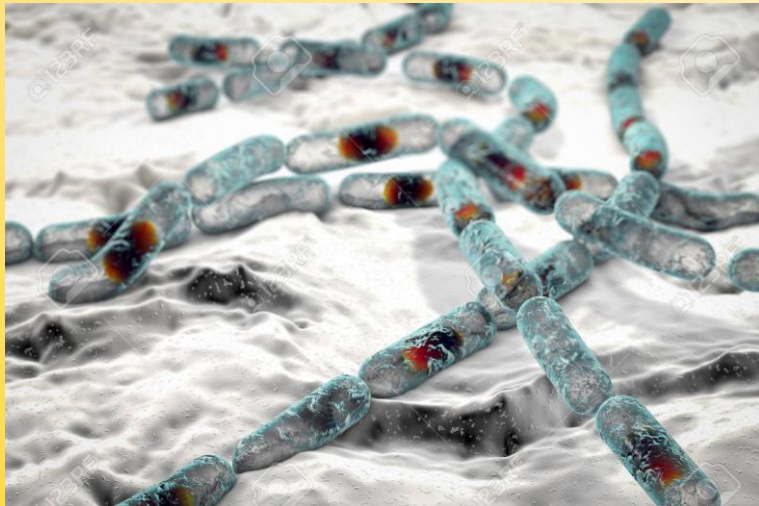
Alternativa: technika s použitím půdy s králičí plazmou a fibrinogenem (RPF agar), precipitace



Baird-Parker agar

Stanovení počtu *Bacillus cereus*

Bacillus cereus



- **grampozitivní tyčinky** (*Bacillaceae*)
- jednotlivě či krátké řetízky
- fakultativně anaerobní
- pohyblivý
- tvorba vysoce odolných endospor
- emetický syndrom (emetický toxin = cereulid)
- diarhogenní syndrom (různé enterotoxiny)

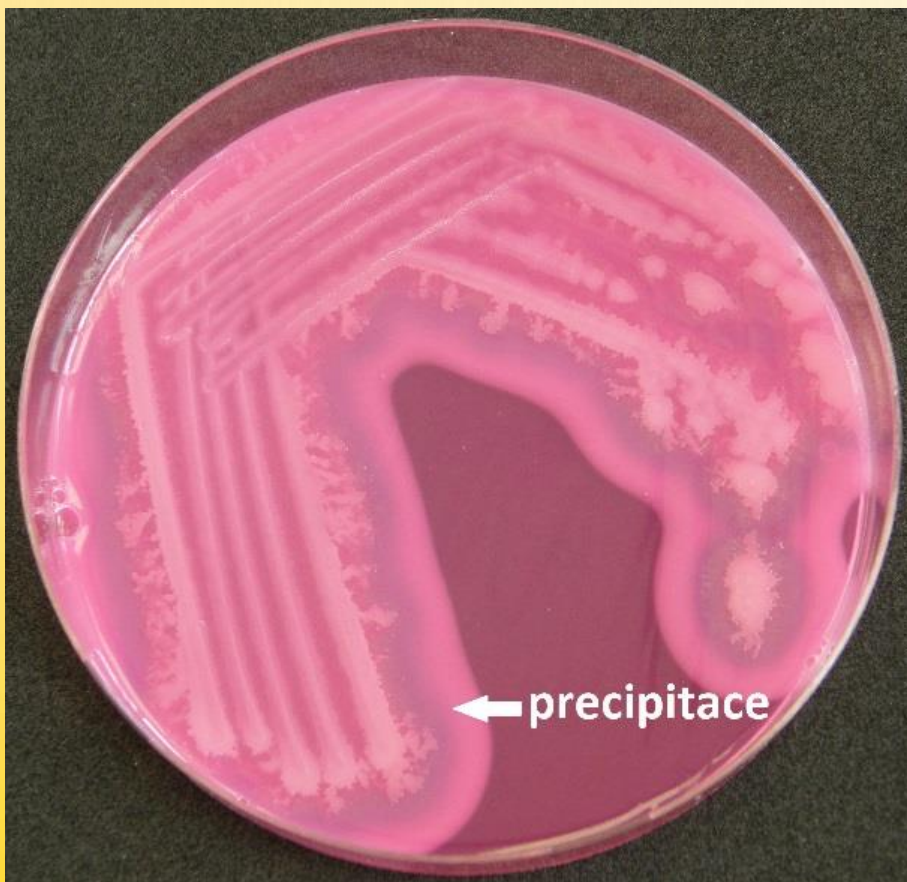
Typické kolonie *Bacillus cereus*

MYP agar: kolonie velké (3 – 5 mm), ploché, suché, drsné s nepravidelnými okraji, růžové barvy (*negativní mannitol*), obklopené širokou růžovou zónou precipitace (*aktivita lecitinasy*), změna barva média – růžová

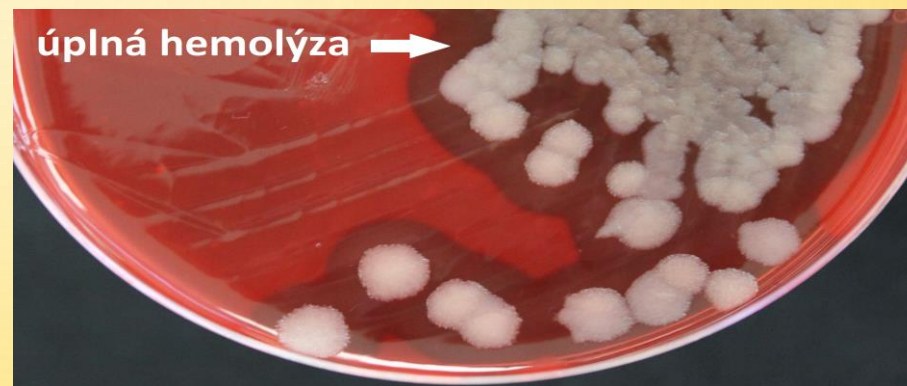


Krevní agar: našedlé velké kolonie (3 – 5 mm), ploché, suché, drsné s nepravidelnými okraji, obklopené různě širokou zónou úplné hemolýzy (*úplný rozpad erytrocytů a hemoglobinu*), typický zápach po myšíně





MYP agar



Krevní agar

The background is a solid yellow color with several realistic water droplets of various sizes scattered across it, primarily in the corners. The droplets have highlights and shadows, giving them a three-dimensional appearance.

Stanovení termotolerantních druhů *Campylobacter* spp.

Campylobacter spp.



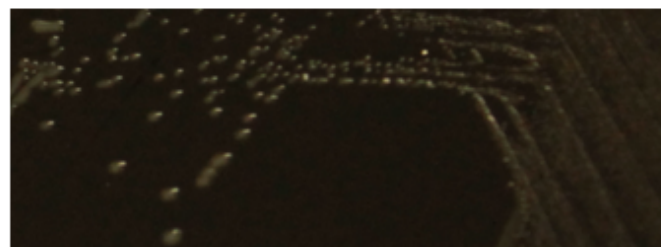
- **gramnegativní zakřivené tyčinky** (spirily)
- mikroaerofilní
- pohyblivé
- nefermentují sacharidy
- termotolerantní – optimální teplota růstu 42 °C
- *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*

Typické kolonie *Campylobacter* spp.

mCCDA agar: kolonie šedavě zbarvené, vlhké, ploché, středně velké (2 – 4 mm) často s kovovým leskem, příp. nazelenalým odstínem a s tendencí se rozrůstat



Karmali agar: kolonie středně velké (2 – 3 mm), šedé barvy, lesklé, ploché, s tendencí se rozrůstat



Vybrané znaky termotolerantních druhů rodu *Campylobacter*

Znak	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
oxidasa	+	+	+	+
katalasa	+	+	+	-
kyselina nalidixová	S	S	R/S	S
cephalotin	R	R	R	S
hydrolýza hippurátu	+	-	-	-
indoxylacetát	+	+	-	+

R: rezistentní; S: senzitivní



Bolton medium



mCCDA agar

Stanovení *Cronobacter* spp.

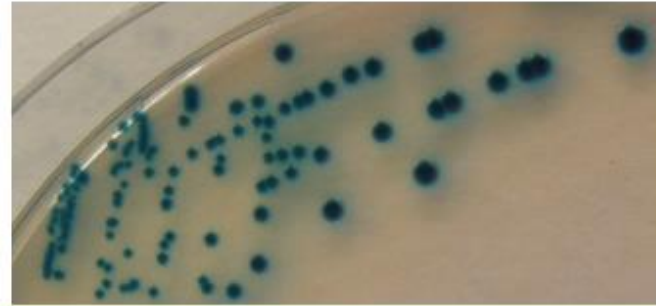
Cronobacter spp.



- **gramnegativní tyčinky** (*Enterobacteriaceae*)
- dříve *Enterobacter sakazakii*
- fakultativně anaerobní
- pohyblivý
- produkce žlutého pigmentu
- extrémní přežívání v suchém prostředí
- nekrotická kolitida a meningitida

Typické kolonie *Cronobacter* spp. na CCI agaru

Typické kolonie: pravidelné malé až středně velké (1 – 3 mm) kolonie modrozelené barvy (*hydrolýza chromogenu, kterým je 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glukopyranosid*)



4. Stanovení reziduí inhibičních látek (RIL) v potravinách

Používané metody

Inhibiční látky - látky, které omezují nebo zastavují růst mikroorganismů.

Metody stanovení:

- plotnové metody
- komerční širokospektrální testy (např. Eclipse 50 test, BR test)
- selektivní rychlotesty používané hlavně pro prvotní diagnostiku v mlékárnách (např. Beta-Star test, Delvo-X-Press test)



Metodický pokyn na stanovení reziduí inhibičních látek ve tkáních, mléce, vejcích a potravinách ze dne 1. 6. 2008

Plotnové metody

- **princip:** agarový difúzní test
- vzorky se kladou na Petriho misku obsahující agarovou půdu inokulovanou testovacím kmenem
- růst testovacího kmene se projeví zakalením agaru po inkubaci
- difúze RIL se projeví tvorbou **zóny inhibice růstu** testovacího kmene okolo vyšetřovaného vzorku

Používané plotny

1.
Bacillus subtilis
pH = 6,0
tetracykliny (TET)

2.
Bacillus subtilis
pH = 8,0
aminoglykosidy

3.
Kocuria rhizophila
pH = 8,0
beta-laktamy a
makrolidy

4.
Bacillus subtilis
+ trimethoprim
pH = 7,2
sulfonamidy a TET

5.
*Geobacillus
stearothermophilus*
pH = 8,0
beta-laktamy
aminoglykosidy

6.
Escherichia coli
pH = 8,0
chinolony

Inkubační podmínky

Plotna	Mikroorganismus	Inkubace	Pozitivní kontrola
1.	<i>Bacillus subtilis</i> (pH 8)	30 °C, 24 h	penicilin
2.	<i>Bacillus subtilis</i> (pH 6)	30 °C, 24 h	streptomycin
3.	<i>Kocuria rhizophila</i>	37 °C, 24 h	streptomycin
4.	<i>Bacillus subtilis</i> (pH 7,2)	30 °C, 24 h	sulfonamid
5.	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	64 °C, 5 h	penicilin
6.	<i>Escherichia coli</i>	37 °C, 24 h	ciprofloxacin

Kontrola citlivosti

- v den testování při použití jedné šarže půd dáváme kontrolní disk s pozitivní kontrolou jen na jednu testovací plotnu
- sterilní pinzetou umístíme na plotnu sterilní papírový disk o průměru **6 mm** (plotny 1-5) nebo **9 mm** (plotna 6)
- na povrch disku pipetujeme příslušný roztok antibiotika v množství **10 μ l** (plotny 1-5) nebo **30 μ l** (plotna 6)
- po inkubaci ploten změříme velikost vzniklých inhibičních zón a porovnáme s **doporučenými hodnotami**



Pracovní postup – mléko

- *vzorek mléka*: sterilní disk o průměru 12,7 mm uchopíme do sterilní pinzety → zčásti ponoříme do vzorku mléka → necháme zcela nasáknout → otřeme o hranu vzorkovnice a umístíme na Petriho misku; každý vzorek testujeme dvojmo a umístíme úhlopříčně



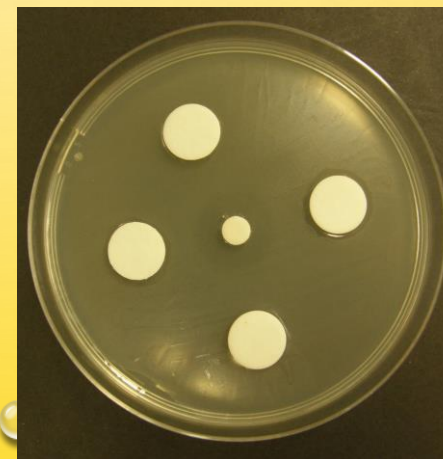
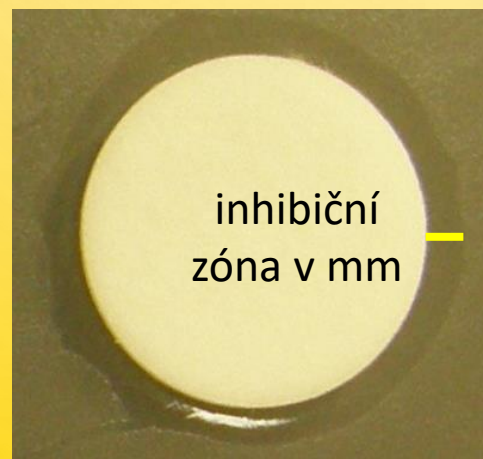
Pracovní postup tkáně, vejce

- sterilními nůžkami z hloubky tkáně vystříhneme vzorek o velikosti 7x7x7 mm
- vzorek umístíme na povrch agarů v Petriho misce
- plotny se inkubují dnem dolů (neobracet!)

- vzorek vajec (melanž) upravíme a tepelně inaktivujeme (70 °C / 20 minut)
- dávkujeme do sterilních kovových válečků (100 µl)

Vyhodnocení

Vyhodnocení:		plotna 1	plotna 2	plotna 3	plotna 4	plotna 5	plotna 6
<i>syrové mléko</i>	pozitivní	≥ 2 mm	≥ 2 mm	≥ 2 mm	≥ 2 mm	≥ 1 mm	≥ 2 mm
	negativní	< 2 mm	< 2 mm	< 2 mm	< 2 mm	< 1 mm	< 2 mm
<i>tkáň, orgány</i>	pozitivní	≥ 2 mm	≥ 2 mm	≥ 2 mm	≥ 2 mm	≥ 4 mm	≥ 2 mm
	negativní	< 2 mm	< 2 mm	< 2 mm	< 2 mm	< 4 mm	< 2 mm



DĚKUJI ZA POZORNOST

