

Schéma 19: Průkaz bakterií *Escherichia coli* O157 v potravinách.

4.5. Stanovení *Cronobacter sakazakii*

Cronobacter sakazakii (dříve *Enterobacter sakazakii*) je řazen do rodu *Cronobacter*, čeled *Enterobacteriaceae* a patří mezi tzv. koliformní bakterie. Příslušníci tohoto rodu jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní, nesporotvorné tyčinky. Tvoří běžnou součást střevní mikroflóry zvířat a některých ptáků, v lidském střevě se obvykle nevyskytují. *Cronobacter sakazakii* vyvolává u novorozenců velmi těžká onemocnění - zejména meningitidy, bakteriemie a meningoencephalitidy. Nejčastějším zdrojem bývá sušené počáteční kojenecké mléko.

Stanovení *Cr. sakazakii* v potravinách se provádí kvalitativně, tzn. jedná se o průkaz nebo vyloučení jeho přítomnosti v předepsané navážce vzorku. Ke kultivaci se používají neselektivní pomnožovací média a dále selektivní tekuté půdy obsahující látky inhibující růst doprovodné mikroflóry (např. vancomycin), k vlastní izolaci se používají chromogenní půdy. Suspektní kolonie jsou konfirmovány na základě tvorby žlutého pigmentu a vybraných biochemických reakcí.

4.5.1. Metoda průkazu *Cronobacter sakazakii*

Průkaz bakterií *Cronobacter sakazakii* zahrnuje 4 po sobě jdoucí stupně: předpomnožení v neselektivní tekuté půdě, pomnožení v selektivní tekuté půdě, izolaci a konfirmaci.

4.5.1.1. Princip metody

Zkoušený vzorek se inokuluje do tekuté půdy pro neselektivní pomnožení – *pufrovaná peptonová voda* (PPV médium), a inkubuje se aerobně při 37 °C po dobu 16 – 20 hodin. Získaná kultura se přeočkuje do tekuté selektivní půdy – *modifikovaná laurylsulfát tryptózová půda s vancomycinem* (mLST médium) a inkubuje se aerobně při 44 °C po dobu 24 hodin. Ze selektivního pomnožení se provádí vyočkování na nevybrané...

půdu – *Enterobacter sakazakii* izolační agar (ESIA agar) nebo jiná chromogenní půda poskytující shodné výsledky (např. HiChrome Ent. sakazakii agar, CHES). Inokulované misky se inkubují aerobně při 44 °C po dobu 24 hodin a zjišťuje se přítomnost typických kolonií presumptivních *Cr. sakazakii*. Následně se u vybraných suspektních kolonií provede posouzení tvorby žlutého pigmentu a biochemická konfirmace. Výsledkem je průkaz přítomnosti či absence bakterií *Cronobacter sakazakii* v navázce vyšetřovaného vzorku.

4.5.1.2. Postup metody

- **Neselektivní pomnožení:** odebereme zkušební vzorek (obvykle 25 g nebo 25 ml) a připravíme výchozí ředění, jako ředící roztok použijeme devítinásobné množství (tj. 225 ml) PPV média. Inkubujeme aerobně v termostatu při 37 °C po dobu 16 – 20 hodin.
- **Selektivní pomnožení:** po ukončení inkubace přeneseme 0,1 ml výchozí suspenze do zkumavky s 10 ml mLST půdy a inkubujeme aerobně v termostatu při 44 °C po dobu 24 hodin.
- **Izolace:** z půdy pro selektivní pomnožení provedeme vyočkování sterilní bakteriologickou kličkou (plná klička, cca 10 µl) na chromogenní půdu (např. ESIA agar). Inokulované Petriho misky obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně v termostatu při 44 °C po dobu 24 hodin.

4.5.1.3. Konfirmace a hodnocení výsledků

Při hodnocení sledujeme nárůst kolonií charakteristických pro druh *Cronobacter sakazakii*, pro konfirmaci náhodně vybereme z každé plotny 5 charakteristických kolonií.

Kolonie vybrané pro konfirmaci subkultivujeme vyočkováním na sójový agar s tryptonem (TSA), po inkubaci sledujeme přítomnost žlutého pigmentu. Při biochemické konfirmaci standardně provedeme následující testy: průkaz oxidázy, průkaz lyzindekarboxylázy, průkaz ornitindekarboxylázy, průkaz argininihydrolázy, průkaz fermentace různých cukrů a využití citrátu (viz. tabulka 9). Pro biochemickou konfirmaci je dovoleno použít komerční identifikační soupravy. Na základě výsledků konfirmace potvrdíme nebo vyloučíme přítomnost bakterií *Cronobacter sakazakii* v navázce vyšetřovaného vzorku.

Tabulka 8: Interpretace biochemických testů.

Konfirmační test	Pozitivní nebo negativní reakce	% <i>E. sakazakii</i> projevujících reakci
Tvorba žlutého pigmentu	+	>99
Oxidáza	-	>99
L-lyzindekarboxyláza	-	>99
L-ornitindekarboxyláza	+	±90
L-argininhydroláza	+	>99
Kyselina z		
- fermentace D-sorbitolu	-	±95
- fermentace L-ramnózy	+	>99
- fermentace D-sacharózy	+	>99
- fermentace D-melibiózy	+	>99
- fermentace amygdalinu	+	>99
- hydrolýza citrátu	+	>95

Morfologie charakteristických kolonií:

Po 24 hodinách inkubace mají narostlé kolonie následující morfologii:

- *ESIA agar* – typické kolonie jsou malé až středně velké (1 – 3 mm), zelené až modrozelené barvy.
- *CHES agar* – typické jsou tmavě modré kolonie o průměru 1 – 3 mm.

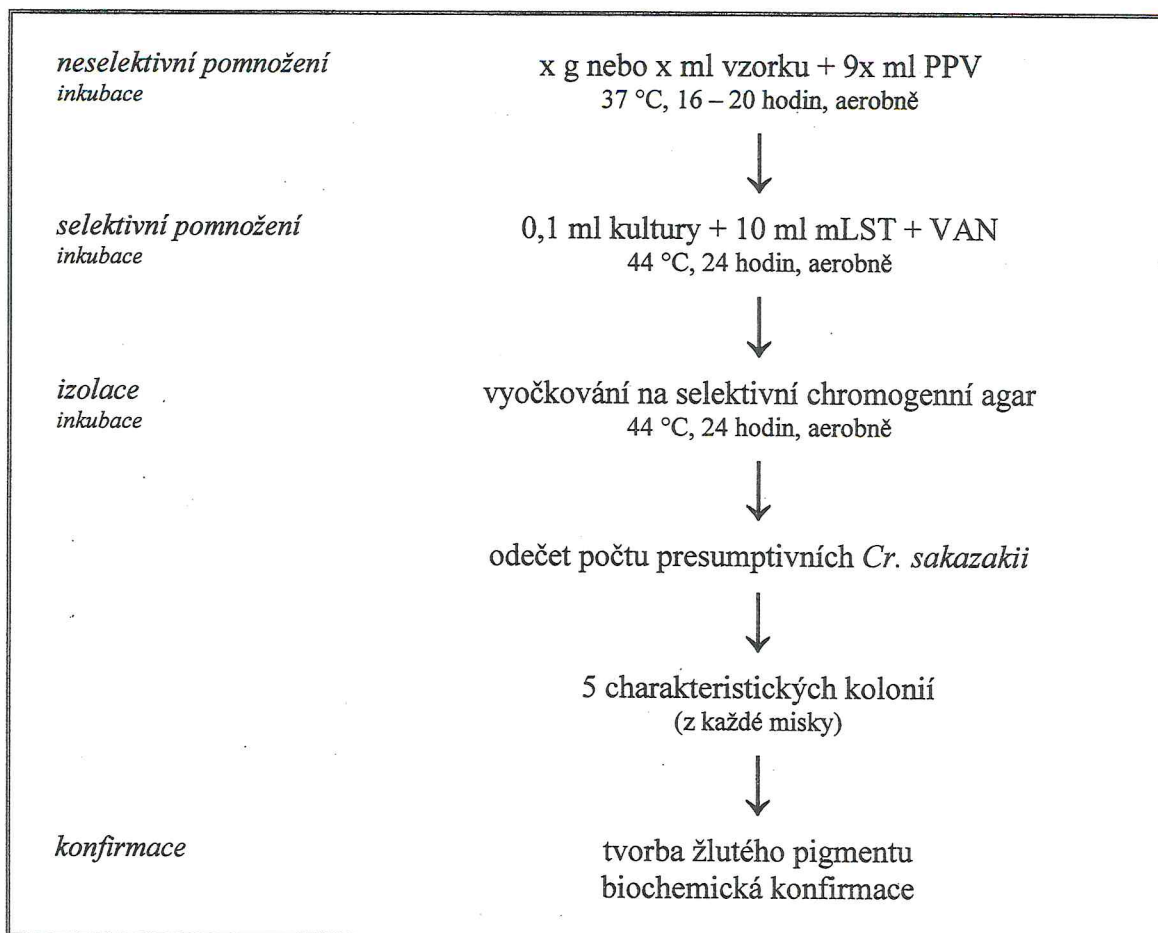


Schéma 20: Průkaz bakterií *Cronobacter sakazakii* v potravinách.

4.6. Stanovení *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens (čeleď *Clostridiaceae*) je grampozitivní, obligátně anaerobní, nepohyblivá, sporotvorná tyčinka dlouhá 3 – 9 μm. Vyskytuje se jednotlivě, ve dvojicích nebo krátkých řetězcích, spory jsou oválné, umístěné centrálně nebo paracentrálně. Klostridia jsou obecně značně biochemicky aktivní, důležitý diferenační znak je schopnost redukovat sulfity na sirovodík. Roste při teplotách 20 – 50 °C, optimální teplota růstu je 45 °C. Vegetativní buňky nepřežívají pasterační záhřev 72 °C, spory pasteračním záhřevem poškozovány nejsou.

Clostridium perfringens je součástí normální střevní mikroflóry člověka i zvířat. Produkuje asi 13 termolabilních toxinů, přičemž alimentární otravy vyvolává převážně sérotyp A. Ke vzniku onemocnění (otravy enterotoxinem) je zapotřebí, aby se *C. perfringens* v kontaminované potravíně nejprve dostatečně pomnožilo ($10^6 - 10^7$ KTJ/g).