

Sledování produkce enterotoxinu
***Staphylococcus aureus* v kozím sýru**

Mgr. Bohdana Janštová

Diplomová práce
2012

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Mgr. Bohdana JANŠTOVÁ**
Osobní číslo: **T100034**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Sledování produkce enterotoxinu *Staphylococcus aureus* v kozím sýru**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika *Staphylococcus aureus*
2. Stafylokokové enterotoxiny
3. Metody stanovení stafylokokových enterotoxinů
4. *Staphylococcus aureus* v kozím mléku a sýrech
5. Legislativa týkající se *S.aureus* a stafylokokových enterotoxinů v potravinách

II. Praktická část

1. Detekujte stafylokokové enterotoxiny ve vyrobených čerstvých kozích sýrech po zaočkování suroviny v různé fázi výroby a při skladování za různých časových a teplotních podmínek
2. Zhodnoťte změny počtů *S. aureus* v kozích sýrech v souvislosti s průběhem produkce enterotoxinů
3. Zhodnoťte možné riziko konzumace kozích sýrů z hlediska výskytu stafylokokových enterotoxinů

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. BALABAN, N., RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, vol. 61, no. 1, p. 1-10.
2. GOMÉZ – LUCIA, E., GOYACHE, J., BLANCO, J.L., GARAYZABAL, J.F.F., ORDEN, J.A., SUAREZ, A. Growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin production in homemade mayonnaise prepared with different pH values. *Journal of Food Protection*, 1987, vol. 50, no. 9, p. 872-875.
3. GÖRNER, F., VALÍK, L'. Aplikovaná mikrobiológia požívateľín. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
4. JABLONSKI L.M., BOHACH G. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE M.P., BEUCHAT L.R., MONTVILLE T.J. (eds.). *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*. ASM Press Washington, DC, 2001, p. 411-434.
5. LOIR, Y., BARON, F., GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2003, vol. 2, no. 1, p. 63-76.
6. ROBERTS, T. A., BAIRD-PARKER, A. C., TOMPKIN, R. B. *Microorganisms in food: Characteristics of microbial pathogens*. 1st printing, 1996. ISBN 0-412-47350-X.
7. VERNOZY-ROZAND, C., MAZUY-CRUCHAUDET, C., BAVAI, C., RICHARD, Y. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, vol. 39, no. 6, p. 490-494.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin


Datum zadání diplomové práce:

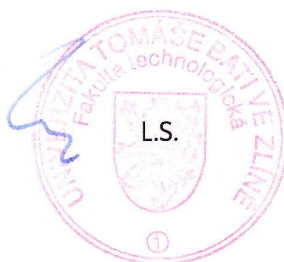
6. ledna 2012

Termín odevzdání diplomové práce:

21. května 2012

Ve Zlíně dne 15. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

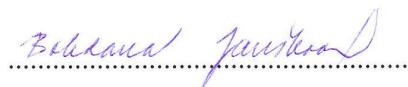
Příjmení a jméno: Bohdana Janštová
Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin

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 užit 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 18. 4. 2012



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 nevýdělečně 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 vzdělávacího 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 jím 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 přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

ABSTRAKT

V této práci byla sledována produkce stafylokokového enterotoxinu a množství bakterií *Staphylococcus aureus* v kozím sýru. *Staphylococcus aureus* byl zaočkován v různých fázích standardní výroby čerstvého kozího sýra. Nebyla zaznamenána žádná produkce enterotoxinu, ale byl zjištěn mírný rozdíl v počtech *S. aureus* v závislosti na koncentraci startovací kultury a skladovací teplotě. Dále byl experiment zopakován u vzorků bez přídavku startovací kultury. Zde byl růst *S. aureus* intenzivnější, než u vzorků standardních sýrů, a to v závislosti na teplotě skladování. Produkce enterotoxinu byla zjištěna při dosažení počtu $7 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. Použitá metoda stanovení ELFA je pro stanovení produkce enterotoxinů vhodná, ale finančně nákladná. Výsledky poukazují na velký význam kontroly úrovně počáteční kontaminace syrového mléka a pasteurace, nutnost eliminace sekundární kontaminace, použití správného výrobního postupu, monitorování průběhu kyselosti sýrů a nutnost dodržení stanovených skladovacích teplot sýrů. Počet *S. aureus* nemusí správně indikovat přítomnost stafylokokových enterotoxinů, proto je nutná také kontrola jejich produkce.

Klíčová slova: *Staphylococcus aureus*, stafylokokové enterotoxiny, ELFA, kozí sýr

ABSTRACT

The aim of this work was observing staphylococcal enterotoxin production and number *Staphylococcus aureus* in goat cheese. *Staphylococcus aureus* was inoculated in the various stages of standard fresh goat cheese production. Production of enterotoxin was not detected, but it was detected the small difference number of *Staphylococcus aureus* depending on the concentration of starter culture and storage temperature. The experiment was also repeated at the samples without addition of starter culture. Growth of *Staphylococcus aureus* was more intense than in standard cheese. It depended on storage temperature. Production of enterotoxin was detected at the number $7 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. ELFA method used for determining the production of enterotoxins seems suitable, but expensive. The result of this work shows the importance of control point of initial contamination of raw milk and pasteurization. It is also necessary to eliminate secondary contamination, use proper manufacturing process, monitor the acidity and the need of specified storage temperature of cheese. Numbers of *S. aureus* may not indicate the presence of staphylococcal enterotoxins, so it is also necessary to control their production.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, staphylococcal enterotoxins, method ELFA, goat cheese

Poděkování

Především velice děkuji vedoucí mé diplomové práce, Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D., za odborné vedení, poskytnuté rady, trpělivost a čas, které mi věnovala při vypracování diplomové práce.

Přednostce mého pracoviště, Ústavu hygieny a technologie mléka VFU Brno, prof. MVDr. Lence Vorlové, Ph.D., děkuji za umožnění zpracování a vyšetření vzorků, které bylo realizováno v rámci řešení Výzkumného záměru MSM 6215712402.

Kolegyním, zvláště MVDr. Lence Necidové, Ph.D., děkuji za podporu a pochopení.

Dík za trpělivost patří mé rodině.

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



OBSAH

ÚVOD	7
I TEORETICKÁ ČÁST	8
1 STAPHYLOCOCCUS AUREUS	9
1.1 CHARAKTERISTIKA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	9
1.1.1 Antigenní stavba <i>S. aureus</i>	10
1.1.3 Stafylokokové enterotoxiny.....	12
1.2 METODY PRŮKAZU A STANOVENÍ POČTU <i>S. AUREUS</i> A METODY DETEKCE STA- FYLOKOKOVÝCH ENTEROTOXINŮ.....	19
1.2.1 Metody průkazu a stanovení počtu <i>S. aureus</i>	19
<i>Využití selektivních půd</i>	19
2 KOZÍ SÝRY	27
2.1 KOZÍ MLÉKO.....	27
2.2 KOZÍ SÝRY.....	28
2.2.1 Technologie výroby sýrů.....	28
2.2.2 VÝSKYT <i>S. AUREUS</i> A STAFYLOKOKOVÝCH ENTEROTOXINŮ V KOZÍM MLÉCE A SÝRECH.....	30
2.3 LEGISLATIVA - <i>S. AUREUS</i> A STAFYLOKOKOVÉ ENTEROTOXINY V SÝRECH.....	33
3 CÍL PRÁCE	35
II PRAKTICKÁ ČÁST	36
4 METODIKA	37
4.1 MATERIÁL.....	37
4.2 METODY.....	38
4.2.1 Příprava vzorků.....	38
4.2.2 Skladování a odběry vzorků.....	41
4.2.3 Značení vzorků.....	42
4.2.4 Vyšetření vzorků.....	42
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	45
5.1 DYNAMIKA ZMĚN POČTU <i>S. AUREUS</i> A PRODUKCE ENTEROTOXINU V SÝRECH.....	45
5.2 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE.....	56
5.2.1 Vliv fáze zaočkování na růst <i>S. aureus</i> a produkci enterotoxinu v sýrech... 56	
5.2.2 Vliv startovací kultury na růst <i>S. aureus</i> a produkci enterotoxinu v sýrech 58	
5.2.3 Vliv teploty skladování na růst <i>S. aureus</i> a produkci enterotoxinu v sýrech	63
5.2.4 Zhodnocení vhodnosti použité metody detekce stafylokokových enterotoxinů.....	64
5.2.5 Riziko konzumace kozích sýrů a možnosti jeho eliminace.....	65
6 ZÁVĚR	67
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	69
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	83
SEZNAM OBRÁZKŮ	85
SEZNAM TABULEK	86
SEZNAM PŘÍLOH	87

ÚVOD

Otázce kvality a bezpečnosti potravin a surovin živočišného původu je dlouhodobě věnována trvalá pozornost. Produkce bezpečných a zdravých potravin a zajištění vysoké úrovně ochrany lidského života a zdraví je prioritou každé vyspělé společnosti.

Alimentární onemocnění jsou Světovou zdravotnickou organizací definována jako „onemocnění vyvolaná infekčním agens nebo toxinem po konzumaci potravin nebo vody“. Onemocnění se dělí na alimentární infekce a otravy (toxoinfekce a alimentární intoxikace) podle mechanismu vzniku onemocnění. V případě alimentární toxoinfekce kontaminovanými potravinami pronikají do gastrointestinálního traktu patogenní bakterie, které se ve střevech pomnožují a produkují metabolity, jejichž působení na makroorganismus se projevuje typickými klinickými příznaky, zejména průjemem a horečkou. Alimentární intoxikace způsobují exotoxiny, které se tvoří v potravinech při pomnožování bakterií. Výskyt hlášených alimentárních intoxikací je v České republice ve srovnání s alimentárními toxoinfekcemi malý, protože jsou hlášeny pouze případy vyskytující se v souvislosti s epidemiemi a ojedinělé případy, vzhledem k rychlému průběhu onemocnění, hlášeny nejsou.

Při hodnocení nebezpečí onemocnění z potravin je však třeba vzít v úvahu všechna hlediska potravinového řetězce jako celku, protože každý článek může mít potenciální dopad na bezpečnost potravin. Z hlediska vstupů mikrobiologických agens do jednotlivých fází potravinového řetězce vyplývá, že v každém úseku, od výroby přes distribuci po prodej, existuje možnost ovlivnění zdravotní nezávadnosti potravin. I když u mikrobiologických činitelů je sice možné, zejména tepelným zásahy, nebezpečí snížit, případně zcela eliminovat, v případě produkce termostabilních toxinů je nebezpečí vzniku alimentárního onemocnění reálné. Navíc situace může být výrazně zhoršena následným nesprávným zacházením spotřebitele s potravinami či v oblasti společného stravování.

Do oběhu je povoleno uvádět pouze potraviny bezpečné. Z mikrobiologického hlediska nesmí obsahovat mikroorganismy, jejich metabolity nebo toxiny v množstvích, které by mohly představovat riziko pro lidské zdraví, což je kontrolováno podle platné legislativy. Ke kontrole se využívají metody konvenční, vývoj nových metod však umožňuje využití metod alternativních, které mají řadu výhod.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Stafylokoky patří k nejdéle studovaným bakteriím. Mezi prvními mikrobiology, kteří si uvědomili souvislost mezi kokovitými bakteriemi a produkcí hnisu, byli koncem 19. století Louis Pasteur a Alexander Ogston. První druh, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), identifikoval německý bakteriolog F. Rosenbach v roce 1884, v roce 1891 Welch objevil a označil „*Staphylococcus epidermidis albus*“. Tyto dva stafylokoky se od sebe liší schopností redukovat enzym plazmakoagulázu. V dalších letech přibýval téměř každý rok jeden stafylokok za druhým a tento trend pokračuje. V současné době je popsáno 46 druhů a 24 poddruhů [1].

Stafylokoky jsou grampozitivní koky o průměru zhruba 1 μm , uspořádané jednotlivě, v párech, v tetrádách, ve velmi krátkých řetízích o nejvýše čtyřech buňkách a především v nepravidelných shlucích tvaru hroznů (řecky staphylé-hrozen). Jsou fakultativně anaerobní, pouze *S. saccharolyticus* a *S. aureus* subsp. *anaerobius* jsou striktně anaerobní [2]. Stafylokoky jsou nepohyblivé a netvoří spóry. Pouzdro netvoří nebo jen omezeně. Jsou kataláza pozitivní, rostou v přítomnosti 10 % NaCl. Patří mezi mikroby poměrně rezistentní k zevnímu prostředí, odolávají vyschnutí, především v hnisu, i zahřívání na teploty kolem 60 °C [3].

Nejvirulentnějším z 16 druhů stafylokoků, které se vyskytují u člověka, je *S. aureus* [2].

1.1 Charakteristika *Staphylococcus aureus*

S. aureus je grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporeující bakterie kokovitého tvaru, koagulázapozitivní a deoxyribonukleázapozitivní [4].

Je významným patogenem pro člověka i zvířata. Produkuje řadu toxinů, z pohledu mikrobiologie potravin je však jeho významnou negativní vlastností produkce termostabilních enterotoxinů, které způsobují alimentární intoxikace.

S. aureus roste v rozsahu teplot od 7 do 47,8 °C, některé kmeny *S. aureus* však mohou růst při teplotách nižších, než 6,7 °C [5]. Stafylokoky jsou schopny růst při nižších hodnotách aktivity vody, než jiné patogeny. Jako minimální a_w pro růst *S. aureus* je uvedena hodnota 0,86 [6], ale bylo prokázáno, že roste i při a_w 0,83 [7].

S. aureus je komenzální mikroorganismus, který se vyskytuje u 10 - 30 % lidské populace na kůži nebo na sliznicích a nevyvolává žádné potíže [8]. Stačí však sebemenší porucha přirozené odolnosti, aby se projevil jako patogen [3]. Při oslabení imunitního systému hostitele je *S. aureus* schopen vyvolat různá onemocnění - kožní záněty, pneumonie, osteomyelitidy, syndrom toxického šoku, syndrom opařené kůže, abscesy, bakteriální endokarditidy a sepse [8; 9]. *S. aureus* je také považován za jednoho z nejvýznamnějších původců alimentárních intoxikací.

1.1.1 Antigenní stavba *S. aureus*

Buněčná stěna stafylokoků obsahuje peptidoglykan, kyselinu teichoovou a protein A. Stafylokokový peptidoglykan (murein) má na všech zbytcích kyseliny N-acetyl-muramové tetrapeptidy, které jsou napříč pospojované pentaglycinovými můstky. Peptidoglykan účinkuje podobně jako endotoxin, podněcuje uvolňování cytokinů z mikrofágů, aktivaci komplementu a shlukování krevních destiček. Hlavní antigenní determinativou všech kmenů *S. aureus* je skupinově specifický polysacharid A složený hlavně z ribitolových podjednotek kyseliny teichoové. Uplatňuje se v adhezi na sliznice a rány, kde se kyselina teichoová váže na fibronectin. Protein A je hlavní bílkovinnou součástí buněčné stěny společným skupinovým antigenem většiny kmenů. Důležitá je jeho schopnost nespecificky reagovat s Fc-fragmentem imunoglobulinů, čímž chrání stafylokoka před opsonizací protilátkami, jakož i jeho schopnost působit proti účinku komplementu a fagocytů. U některých, zejména mukoidních kmenů, lze prokázat i kapsulární antigeny. Brání fagocytóze, existují v 11 antigenních typech a většina klinicky významných izolátů náleží typu 5 nebo 8 [3].

1.1.2 Virulence *S. aureus*

Buňky *S. aureus* jsou vybaveny mnoha faktory virulence, které lze zhruba dělit na povrchové a extracelulární. Z povrchových faktorů je to peptidoglykan, protein A a pouzdro. Z dalších pak vázaná koaguláza neboli clumping factor, která váže fibrinogen a mění jej na fibrin, čímž vyvolává shlukování stafylokoků. Další povrchové proteiny se vážou např. na kolagen, elastin nebo fibronectin a umožňují tak stafylokokům adherovat na tkáň hostitele. Extracelulární faktory virulence lze dělit na enzymy a toxiny. K enzymům patří koaguláza, kataláza, hyaluronidáza, lipázy, nukleázy, fibrinolysin a peniciláza.

Mezi stafylokokové toxiny se řadí cytolyziny (hemolyziny), enterotoxiny a toxin syndromu toxického šoku a exfoliativní toxiny [3].

Virulence *S. aureus* je postavena na základě schopnosti produkce velkého množství biologicky aktivních látek, které se dělí do tří následujících skupin [10].

Mezi *adhezivní faktory* se řadí plasmakoaguláza (volná koaguláza), clumping (shlukovací) faktor a několik produktů polysacharidové podstaty obvykle označovaných jako sliz [10]. Slizy jsou exopolysacharidy tvořené během růstu bakterií [11]. Tyto produkty hrají významnou roli při tvorbě biofilmů. Základní strukturní jednotkou biofilmu jsou mikrokolonie bakterií obklopené slizovitou mezibuněčnou matrix, která je tvořena polysacharidy produkovanými mikrobiálními buňkami ve formě pouzder nebo uvolňovanými do okolí jako exopolysacharid [12]. Buňky biofilmu se svými vlastnostmi zásadně liší od volně se vznášejících buněk planktonických, především jsou vysoce odolné k zevním vlivům. Lépe odolávají vysychání, fágům, toxickým látkám, látkám desinfekčním i antibiotikům. Biofilmy jsou obtížně odstranitelné a mohou být příčinou až 80 % infekcí v těle člověka [13].

Volná koaguláza je protein s výraznou enzymatickou aktivitou katalyzující polymeraci rozpustného fibrinogenu na fibrin. Patří také mezi faktory umožňující bakteriím přichycení k buňkám makroorganismu a dokáže inhibovat fagocytózu [14].

Vázaná koaguláza - clumping faktor - je povrchový protein stafylokoků, který váže fibrinogen. Výsledkem jeho působení je jako u volné koagulázy polymerace fibrinogenu na fibrin. Další povrchový antigen - protein A - má schopnost vázat imunoglobuliny [14].

Do skupiny *propagačních a transportních faktorů* virulence se řadí hemolyziny [10]. Jsou uváděny čtyři známé typy hemolyzinů - α , β , γ , δ [15]. Typické kmeny *S. aureus* produkují α -hemolyzin projevující se úplnou hemolýzou beraních erytrocytů v krevním agaru po 18hodinové inkubaci při 37 °C [14]. Ze studie infekcí u zvířat zahrnující pneumonie, mastitidy a ledvinové infekce vyplývá, že α -hemolyzin je důležitou výbavou buněk *S. aureus* a podílí se na různých onemocněních [16].

Ochranné faktory a toxiny - toxické exoproteiny, např. Panton-Valentinův leukocidin, chrání stafylokoky před obrannými mechanismy člověka nebo jsou původci toxikóz. Do této skupiny se řadí exfoliativní toxiny (ETs), toxin syndromu toxického šoku (TSST-1) a stafylokokové enterotoxiny (SEs) [10].

1.1.3 Stafylokokové enterotoxiny

Z hlediska rizika onemocnění z potravin je problémem schopnost přibližně 50 - 75 % kmenů *S. aureus* produkovat ve vhodných podmínkách extracelulární termostabilní enterotoxiny (SEs). SEs patří do velké skupiny stafylokokových a streptokokových pyrogenních exotoxinů zodpovědných za alimentární intoxikace a některá alergická onemocnění [17; 18; 19]. V současnosti je známo 22 typů stafylokokových enterotoxinů, které jsou označovány písmeny A – U2 (W) [20; 21; 22]. SEs jsou kódovány příslušnými geny (*sea - seu*). U jednotlivých kmenů *S. aureus* se může vyskytovat více genů současně, obvykle je zaznamenáván výskyt dvojice genů *seg* a *sei* současně, i když jsou popsány případy, kdy se vyskytoval pouze jeden z uvedených genů [23; 24]. Přítomnost enterotoxinogenního genu však ještě neznamená, že stafylokokový enterotoxin bude také produkován [18]. Hlavní charakteristiky vybraných SEs jsou uvedeny v Tab. 1 [20].

SEs jsou proteiny o molekulové hmotnosti pohybující se v rozmezí 24 - 29 kDa [25], jsou složeny z jednoduchých polypeptidových řetězců s podobným zastoupením aminokyselin u jednotlivých typů SEs. Polypeptidové řetězce obsahují jednoduché disulfidické vazby a jsou bohaté na lysin, kyselinu asparagovou a glutamovou a tyrosin [20; 26].

Tab. 1. Hlavní charakteristiky vybraných SEs [20]

SEs	Molekulová hmotnost (kDa)	pI	Umístění genu
SEA	27,100	7,30	profág
SEB	28,336	8,60	chromozom, plazmid, transpozon
SEC ₁	27,531	8,60	plazmid
SEC ₂	27,531	7,80	?
SEC ₃	27,563	8,10	?
SEC _{hovězí}	27,618	7,60	ostrovy patogenity
SEC _{ovčí}	27,517	7,60	?
SEC _{kozí}	27,600	7,00	?
SED	26,360	7,40	plazmid (pIB485)
SEE	26,425	7,00	defektní fág
SEG	27,043	5,70	enterotoxigenní klast (egc), chromozom
SEH	25,210	?	chromozom
SEI	24,928	?	egc, chromozom
SEJ	28,565	8,65	plazmid (pIB485)
SEK	25,539	6,50	ostrovy patogenity
SEL	24,593	8,66	ostrovy patogenity
SEM	24,842	6,24	egc, chromozom
SEN	26,067	6,97	egc, chromozom
SEO	26,777	6,55	egc, chromozom

? – údaje nebyly zjištěny

Nejčastěji se vyskytující SE, který je zodpovědný za vyvolání stafylokokové enterotoxikózy, je SEA. Gen *sea* kódující SEA je nesen profágem PS42D a je složený ze 771 párů bází, které kódují 257 aminokyselin [17; 27;]. SEB je protein složený z 239 aminokyselin, je snadno rozpustný ve vodě, stabilní vůči kolísavé teplotě a není inaktivován ani několikaminutovým varem. V podobě aerosolu může způsobit selhání mnoha orgánů a šok a při inhalaci vysokých dávek také smrt. V případě alimentárních intoxikací se LD50 pro člověka odhaduje na pikogramy SEB na kilogram tělesné hmotnosti člověka. SEB je studován také jako možná biologická zbraň [28].

SED je druhý nejrozšířenější SE spojovaný se stafylokokovou enterotoxikózou [17].

SEA a SED jsou nejčastější SEs vyvolávající alimentární intoxikace [29], přitom *sea* a *sed* patří k nejméně zastoupeným genům u izolátů z potravin.

SEA a SEJ jsou pravděpodobně produkovány během exponenciální fáze růstu *S. aureus*, maximální produkce SEB, SEC a SED je během přechodu z exponenciální do stacionární fáze růstu bakterií. Rozdíly v kinetice se také odrážejí v množství naprodukovaného enterotoxinu. Při stejných denzitách produkčních kmenů *S. aureus* jsou SEs (SEA, SED, SEE a SEJ) produkovány v koncentracích nižších než $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pomnožovacího média. SEB a SEC jsou produkovány ve větší kvantitě, a to obvykle ve $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pomnožovacího média [30].

Optimální podmínky pro produkci enterotoxinů se liší podle typu SE a druhu potravin. Podmínky vhodné pro pomnožování *S. aureus* jsou vhodné obvykle i pro produkci SEs (Tab. 2).

Tab. 2. Limity pro růst *S. aureus* a produkci enterotoxinů [31]

Faktor	Růst bakterií	Produkce enterotoxinů	
	Rozmezí	Optimum	Rozmezí
Teplota (°C)	7 - 48	40 - 45	10 - 48
pH	4,0 - 10,0	7,0 - 8,0	4,5 - 9,6
Vodní aktivita (a_w)	0,83 - > 0,99	0,98	0,87 - > 0,99

Produkce SEs je ovlivněna danými podmínkami jako jsou teplota, pH, ale také množství inokula a aktivita vody a_w [18]. Stafylokokové enterotoxiny jsou produkovány při teplotě mezi 10 - 46 °C, optimum je mezi 40 - 45 °C [32]. Jako rozmezí pro produkci SEs je uvá-

děno pH 4,5 - 9,6 [31]. Enterotoxin A je produkován při minimální a_w v rozsahu 0,79 - 0,90, zatímco pro produkci enterotoxinu B je minimální hodnota a_w 0,97 [6].

Vzhledem ke složení a struktuře jsou SEs velice stabilní a odolné vůči působení proteolytických enzymů jako je trypsin, chymotrypsin, renin a papain, ale jsou citlivé vůči pepsinu [3; 17].

SEs jsou také termostabilní. Přítomné patogenní mikroorganismy v surovině lze inaktivovat dostatečným tepelným záhřevem [33]. Termostabilní stafylokokové enterotoxiny, které byly za vhodných podmínek naprodukovány již v surovině, se však mohou vyskytovat i v potravinách vyrobených z tepelně upravené suroviny. Termostabilita toxinu je závislá zejména na vnitřních faktorech potraviny, ve které je SE přítomen, zejména na pH, koncentraci soli a vodní aktivitě [17]. Relativní tepelná rezistence z dále uvedených SEs je nejvyšší u SEC, nižší u SEB a nejnižší u SEA [34]. SEs snesou půlhodinový var [3]. SEA neztrácí svoji biologickou aktivitu ani po 28 minutovém záhřevu při 121 °C [17]. SEB si udrží biologickou aktivitu po zahřívání na 60 °C po dobu 16 hod a pH 7,3 [35]. Tepelnou úpravou SEC dochází v závislosti na použité teplotě a časové expozici ke změně serologických reakcí - zatímco po záhřevu na 60 °C po dobu 30 minut nedošlo ke změně, působení teploty 80 °C po dobu 3 minut nebo 100 °C po dobu 1 minuty na SEA způsobilo ztrátu funkce sérologické reakce [34].

Záhřev v kyselém prostředí může vést ke ztrátě imunologické a biologické aktivity SEs. V některých případech je v alkalickém prostředí tepelná inaktivace spontánně reverzibilní. Významná je skutečnost, že SEs odolávají podmínkám (záhřev, nízké hodnoty pH a vodní aktivita), při kterých dochází k usmrcení bakterií *S. aureus* [20].

1.1.4 Onemocnění vyvolaná *S. aureus*

Onemocnění vyvolaná *S. aureus* jsou nejčastěji hnisavá, případně s celkovými toxickými příznaky, nebo jde o otravy z potravin

Ke vzniku stafylokokových infekcí predisponují poranění (včetně popálenin a operačních ran, zvláště po dlouho trvajících břišních zákrocích), cizí tělesa (implantované pomůcky, stehy), virové infekce (stafylokoková bronchopneumonie po chřipce), diabetes mellitus a malignity (kvůli poruše funkce fagocytů), imunodeficity. Zatímco benigní kožní infekce jsou časté, závažné stavy s postižením vnitřních orgánů a sepsí se obvykle vyskytují jen

u disponovaných jedinců. Charakteristickým rysem stafylokokových infekcí je sklon k tvorbě ohraničených abscesů [3].

U *S. aureus* byly identifikovány a charakterizovány čtyři typy exfoliatinů - ETA, ETB, ETC a ETD. Tyto exotoxiny (epidermolytické toxiny) způsobují kožní infekce u člověka a některých zvířat. Nejčastějšími původci lidských epidermolýz jsou ETA a ETB. Syndrom opažené kůže („Staphylococcal Scalded Skin Syndrom“) je plně rozvinutou generalizovanou formou onemocnění projevující se tvorbou puchýřů, rozsáhlých erozí a odlupováním povrchových vrstev pokožky [10]. Onemocnění nazvané syndrom toxického šoku (TSS) projevující se horečkou, hypotenzí a polyorgánovým postižením způsobuje TSST-1. U těžkých případů může končit smrtí. TSST-1 je podobně jako enterotoxiny superantigenem. Již v nepatrných koncentracích zvyšuje permeabilitu endothelií a zesiluje letální účinek endotoxinu [3]. TSS lze podle typu *S. aureus* vyvolávajícího onemocnění rozdělit do dvou hlavních skupin: non-menstruální, který je vyvolán typem *S. aureus* způsobujícím infekce pokožky nebo slizničních membrán a menstruální spojovaný se *S. aureus* vyskytující se na cerviko-vaginálním anebo orálně-mukózním povrchu [36].

Alimentární onemocnění způsobené enterotoxiny *S. aureus* je označováno stafylokoková enterotoxikóza.

1.1.5 Stafylokoková enterotoxikóza

Přítomnost *S. aureus* v potravinách představuje potenciální riziko ohrožení zdraví konzumenta díky schopnosti produkce SEs, které vznikají v potravině jako metabolické produkty při množení těchto bakterií. Stafylokoková otrava z potravin byla poprvé studována v roce 1894 J. Denysem. Schopnost některých kmenů *S. aureus* způsobovat otravy z potravin byla konečně prokázána v roce 1930 G. M. Dackem [37]. Primárním zdrojem kontaminace *S. aureus* jsou savci a ptáci, 30 - 80 % lidské populace patří mezi nosiče *S. aureus* a u jedné až dvou třetin se u nich vyskytují kmeny enterotoxinogenní. Ke kontaminaci potravin pak dochází během výrobního procesu při nedodržování hygienických zásad [38]. Příčinami vzniku onemocnění z potravin jsou tedy v této souvislosti nedostatečné chlazení potravin, nedodržení postupu přípravy jídla, nedostatečná osobní hygiena, která vede ke kontaminaci potravin, nevhodný teplotní a časový režim úpravy potravin a uchovávání potravin ve varném zařízení při teplotách vhodných pro růst *S. aureus* a produkci toxinů. Negativní vliv na kvalitu potravin má také nevhodná manipulace s nimi během přípravy,

hlavně v domácnostech a v zařízeních s rychlým občerstvením, kde nejsou dodržovány hygienické zásady [39].

Mezi potraviny často dávané do souvislosti se stafylokokovou enterotoxikózou patří maso a masné výrobky, lahůdkové saláty, cukrářské výrobky s krémy i mléčné produkty. *S. aureus* je hlavním původcem intoxikace z mléka a mléčných výrobků a v Evropě je s konzumací této komodity spojováno 4,8 % stafylokokových intoxikací [40].

Výskyt kmenů *S. aureus* nesoucích některý z genů, které kódují SEs, se pohybuje od 16 do 86 % podle toho, zda kmeny pocházejí ze syrových nebo z tepelně upravených potravin [41]. Při nevhodném skladování potravin může dojít k pomnožení bakterií a již při počtech 10^5 KTJ.g⁻¹ potraviny může vytvořené množství toxinu představovat pro konzumenta zdravotní riziko [24]. Jsou uváděny dokonce hodnoty nižší, a to v rozmezí 10^3 - 10^5 KTJ.g⁻¹ [42]. Počet *S. aureus* 10^5 KTJ.g⁻¹ byl platnou legislativou - Nařízením Komise (ES) č. 2073/2005 a Nařízením komise (ES) č. 1441/2007 stanoven jako hodnota kritická s ohledem na produkci enterotoxinů [43; 44].

Množství SEs potřebného k vyvolání onemocnění u člověka není přesně známo, závisí to na individuální citlivosti a hmotnosti jedince [31]. Za příznivých podmínek (optimální teplota, pH, aktivita vody, koncentrace soli) je třeba alespoň 20 hodin k naprodukování dostatečného množství enterotoxinu [18]. Informace o alimentárních intoxikacích udávají, že pro nejúčinnější SEs se minimální toxická dávka pohybuje okolo 200 ng na 100 g potravin [45]. Je uváděna také minimální infekční dávka SEA 100 ng [17; 19].

Stafylokoková gastroenteritida je způsobena po přijetí potravy, která obsahuje jeden nebo více enterotoxinů. Produkce enterotoxinů je spojována především s kmeny *S. aureus*, které produkují koagulázu a termonukleázu (TNáza), ale i některé druhy stafylokoků, které je neprodukují, jsou známy produkcí enterotoxinů [37].

Stafylokoková enterotoxikóza má velice rychlý nástup i průběh. První příznaky intoxikace, kterými jsou zvracení, bolesti hlavy a břicha a průjem, se objevují již 2 až 6 hodin po konzumaci potraviny obsahující SEs. Symptomy onemocnění spontánně vymizí po 24 hodinách, maximálně do 48 hodin [46; 38; 20]. Mnoho případů stafylokokové enterotoxikózy je nezaznamenáno z důvodu rychlého průběhu stafylokokové enterotoxikózy a podobnosti tohoto onemocnění s jinými alimentárními intoxikacemi [42]. Při podezření na stafylokokovou enterotoxikózu je důležité zajistit vyšetření inkriminované potraviny jak na přítom-

nost *S. aureus*, tak na výskyt SEs. Ty mohou být v potravině přítomny i v případě, že bakterie *S. aureus* byly inaktivovány [30].

Podle výsledku monitoringu stafylokokových enterotoxinů provedeném Státními veterinárními ústavu v České republice v roce 2009 nebyly SEs detekovány ani v jednom případě z celkem 200 vyšetřených sýrů (100 měkkých sýrů a 100 pařených sýrů) [47].

1.1.6 Rezistence *S. aureus*

Světovým problémem 21. století se stává výskyt patogenních mikroorganismů, které získaly rezistenci na běžně používaná antibiotika. Mezi významné mikroorganismy se řadí především *S. aureus*, konkrétně jeho meticilin rezistentní kmeny - MRSA. Tyto kmeny byly izolovány poprvé v roce 1961 u nemocničních pacientů ve Velké Británii, od té doby je výskyt MRSA sledován celosvětově a je zaznamenán rostoucí trend výskytu. Počátkem 90. let byl popsán výskyt MRSA i v běžné populaci a v roce 2005 i u zvířat. Na základě epidemiologických a molekulárních charakteristik se kmeny MRSA dělí na „hospital acquired“ a „community-associated“, a odlišují se navzájem patogenitou a rezistencí k antimikrobiálním látkám [48]. V současné době jsou sledovány kmeny i v oblasti veterinárního lékařství, zejména u potravinových zvířat [49]. Infikovaná nebo kolonizovaná zvířata se mohou uplatnit při šíření MRSA kmenů na ošetřující personál i na suroviny určené k dalšímu zpracování [50].

Při sledování rezistence u kmenů *S. aureus* vyskytujících se v kozím a ovčím mléce zvířat s mastitidou byla detekována v 31,3 % rezistence k penicilínu, v 29,9 % k ampicilinu, v 1,5 % k erytromycinu a ve 3,0 % k tetracyklinu [51]. Dalším problémem je od roku 1997 zjištěná rezistence *S. aureus* na vankomycin, kmeny jsou označeny VRSA [52].

1.2 Metody průkazu a stanovení počtu *S. aureus* a metody detekce stafylokokových enterotoxinů

K průkazu a stanovení počtu *S. aureus* a k průkazu schopnosti produkce či přímo produkce stafylokokových enterotoxinů je možno využít celou řadu metod.

1.2.1 Metody průkazu a stanovení počtu *S. aureus*

Využití selektivních půd

Pro izolaci *S. aureus* se používá selektivní půda podle Baird-Parkera (BP) obsahující chlorid sodný a teluricitan draselný jako selektivní agens a žloutkovou emulzi s pyruvátem sodným pro revitalizaci stresovaných a poškozených buněk. Redukce teluricitanu bakteriemi *S. aureus* vytváří charakteristické černé kolonie, které jsou obklopeny zónou projasnění. Tato zóna je výsledkem působení lecitinázy na suplement - žloutkovou emulzi [30]. Půda je ale také určena k detekci ostatních koagulázapozitivních stafylokoků podle ČSN EN ISO 6888-1, 1999 [53].

S. aureus lze od ostatních stafylokoků odlišit na základě kombinace některých vlastností (morfologie a pigmentace kolonií, produkce volné koagulázy, termonukleázy a hemolyziny, detekce clumping faktoru a proteinu A v buněčné stěně, rezistence k novobiocinu a polymyxinu B atd.) [3; 14; 39].

Polymerázová řetězová reakce

K rychlé diagnostice alimentárních onemocnění slouží metody, které umožňují rychlou identifikaci patogenů a poskytují výsledky během několika hodin. Dané požadavky splňuje metoda polymerázové řetězové reakce (Polymerase chain reaction-PCR), kterou lze použít pro detekci různých patogenů v klinickém materiálu nebo potravinách [54]. Metoda PCR je založena na schopnosti nukleových kyselin za optimálních podmínek vytvořit párováním bázi komplementární řetězec, který je specifický k hledanému úseku genetického materiálu mikroorganismu. Specifické primery pro detekci *S. aureus* metodou PCR jsou zaměřeny na detekci genu pro termonukleázu (*nuc*), koagulázový gen (*coa*), 5-enolpyruvylshikimát-3-fosfát syntázový gen (*aroA*), polynukleotidfosforylázový gen (*pnp*) a další [55].

Pulzní gelová elektroforéza

Koncem 20. století se při epidemiologických studiích začala ve velké míře využívat pulzní gelová elektroforéza (PFGE), která umožňuje makrorestrikční analýzu mikrobiálního genomu [56]. Metoda je založena na gelové elektroforéze, při které se periodicky mění směr a/nebo intenzita elektrického pole. Periodické střídání (pulzování) elektrického pole má za následek změnu orientace DNA molekul v agarózové matrici, což vede k rozdělení jednotlivých fragmentů DNA. Větší molekuly DNA se hůře a pomaleji reorientují, než fragmenty malé, a proto je k jejich separaci nutné použít delší pulzní čas [57]. PFGE je sice časově náročná metoda, analýza trvá několik dní, ale pro svoji reprodukovatelnost a opakovatelnost je v porovnání s ostatními metodami zaměřenými na molekuly stále používána a je označována jako „zlatý standard“ mezi molekulárními typizačními metodami [58].

Systém TEMPO[®] STA

Kromě zmíněných metod je pro stanovení počtu *S. aureus* v potravinách možno využít i alternativní metodu TEMPO[®] systém za použití pracovní stanice TEMPO (bioMérieux, Francie). Výsledek je získán na principu metody nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů (MPN, Most Probable Number) (Cochran, 1950). Systém TEMPO[®] STA je automatizovaný test založený na enzymatickém principu. Je určen pro přímé stanovení počtu koagulázapozitivních stafylokoků (*S. aureus*) v potravinách. Výsledky hodnocení a vhodnost použití TEMPO[®] systému prezentovala řada autorů [59; 60].

1.2.2. Metody detekce stafylokokových enterotoxinů

Pro určení příčiny alimentárního onemocnění je dostatečným důkazem detekce enterotoxinů v potravině [30]. K tomu jsou běžně používány metody imunologické, molekulární biologické a fyzikálně-chemické.

Imunologické metody stanovení stafylokokových enterotoxinů

Základem imunologických metod je specifická reakce mezi antigenem a protilátkou. Antigenem bývá buněčná složka sledovaného organismu, např. specifický polysacharid na vnější straně buněčné stěny, bičíkový protein nebo produkt či toxin produkovaný organismem během růstu (Baylis, 2003). Zavedení imunologických metod, které detekují a potvrzují specifické mikroorganismy a jejich toxiny, do oblasti mikrobiologie umožnila snadná dostupnost různých komerčně vyráběných setů.

Používanými imunologickými metodami jsou: reverzní pasivní latexová aglutinace (RPLA), enzymimunologická metoda (ELISA), Western blot a fluorescenční imunologická metoda (ELFA)

Nevýhodou těchto metod je jejich využití obvykle jen pro detekci klasických SEs (SEA, SEB, SEC, SED, SEE). Detekovatelné množství se u jednotlivých metod liší v závislosti na jejich senzitivitě a specifitě [61].

- *Reverzní pasivní latexová aglutinace (RPLA)*

Princip metody RPLA je založen na reakci antigenu s protilátkami proti příslušným toxinům, které jsou navázány na latexové částice. Ve vzorku přítomný toxin reaguje s navázanou protilátkou za vzniku pouhým okem viditelné mřížkové struktury - vyvločkování. Není-li antigen ve vzorku přítomen nebo je pod detekčním limitem testu, mřížková struktura se nevytvoří a latexové částice vytvoří na dně jamky mikrotitrační destičky těsné uskupení v podobě „knoflíku“ [62]. Posuzování přítomnosti či nepřítomnosti toxinu ve vzorku závisí také na množství testovaného toxinu. Výsledky mohou být vyhodnoceny jako falešně negativní, a to v případě, kdy množství toxinu ve vzorku je nižší, než mez detekce RPLA [18].

SET-RPLA (Denka-Seiken, Japonsko) slouží k detekci SEA, SEB, SEC, SED přímo ve vzorcích potravin nebo v kultivačních médiích. Mezi SEA a SEE může docházet ke křížové reakci, a proto SET-RPLA neobsahuje specifickou protilátku pro SEE a kmeny s produkcí SEE jsou klasifikovány jako SEA produkující [18]. Citlivost této metody se pohybuje kolem 1 - 2 ng.g⁻¹ (ml⁻¹) vzorku [30].

Metoda RPLA byla použita pro detekci SEA-SED a metoda multiplex PCR pro stanovení genů sea, seec, sed, seg, seh, sei, sej a sel. Jen 52 % kmenů s geny pro produkci SEs je také produkovalo. SEC byl predominantní v kozím a ovčím mléce, zatímco v kravském mléce je to SEA a SED [63].

- *Enzymimunologická metoda (ELISA)*

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) je metoda využívající vysoce specifické reakce mezi antigenem a protilátkou s navázaným enzymem, který štěpením substrátu vyvolá barevnou změnu. Detekuje jednotlivé toxiny SEA - SEE nebo jejich sumy, ale i některé nové typy SEs. ELISA testy detekují 0,1 - 1,0 ng SE.g⁻¹ (ml⁻¹) potravin [30], a to podle metody přípravy vzorků před analýzou.

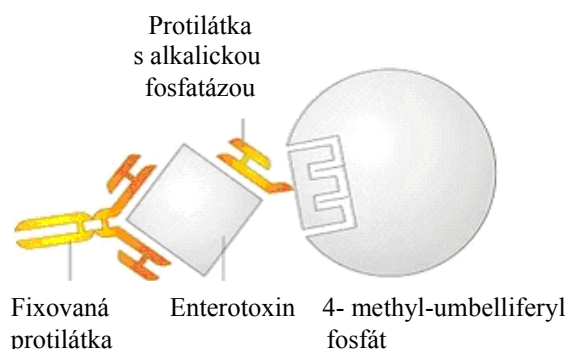
Specifická je sandwich ELISA. Princip této metody spočívá v použití dvou protilátek, které zachytí sledovaný antigen. Čas potřebný pro provedení a vyhodnocení sandwich ELISA je 2 - 3 hodiny [64].

- *Western blot*

Princip metody Western blot je podobný jako u metody ELISA, reakce probíhá na nitrocelulókové membráně. Metoda je vysoce citlivá a lze ji použít pro stanovení nativních i tepelně denaturovaných SEs. Detekční limit je 100 pg.ml^{-1} nebo g^{-1} . Metoda byla například úspěšně použita pro identifikaci monoklonálních protilátek proti stafylokokovému enterotoxinu SEI [65].

- *Fluorescenční imunologická metoda (ELFA)*

Metoda ELFA (Enzyme-linked immunofluorescent assay) je opět založena na specifické reakci antigen-protilátka, substrát je enzymem štěpen na fluorescenční produkt (Obr. 1).



Obr. 1. Komplex antigen – protilátka s imobilizovaným enzymem (bioMérieux, France)

Plně automatický systém založený na metodě ELFA využívá přístroj miniVIDAS[®] (Vitek Immuno Diagnostic Assay System), (bioMérieux, France). VIDAS SET 2 (bioMérieux, France) je test používaný přístrojem miniVIDAS[®] pro detekci SEs (SEA - SEE) v potravinách.

Výhodou přístroje miniVIDAS[®] je, že z výsledků se dá alespoň částečně určit množství SEs v potravine [66] a dalším kladem je, že se jedná o plně automatizovaný systém, díky čemuž ho lze využít k vyšetřování široké škály potravin [67].

Nevýhodou je, že SEs přítomné ve vzorku jsou detekovány jako suma a přístroj určí především jejich přítomnost či nepřítomnost. Z výsledků nelze vyvodit, který typ SE je ve vzorku přítomen.

Metoda ELFA má při využití přístroje MiniVIDAS[®] výrobcem deklarovanou hladinu citlivosti 0,5 ng.g⁻¹ potraviny pro SEA a SEB a 1,0 ng.g⁻¹ potraviny pro SEC - SEE. Pro SED je detekční limit u některých potravin vyšší, než 1,0 ng.g⁻¹ vzorku potraviny. Citlivost pro jednotlivé SEs se může lišit v závislosti na druhu potraviny. Totéž platí i pro testy TECRA založené na principu metody ELISA. Nejnižší hladina citlivosti byla u tohoto testu stanovena až na 0,25 ng.g⁻¹ vzorku. Protože této citlivosti nelze dosáhnout u každého z detekovatelných SEA - SEE a výsledky mohou být také ovlivněny maticí testované potraviny, je přesnější brát hladinu citlivosti tak, jak je uvedena u metody ELFA.

Z případů stafylokokových enterotoxikóz plyne, že i nízké koncentrace enterotoxinů mohou vyvolat onemocnění. Například v USA byla zjištěna hromadná alimentární intoxikace po konzumaci ochuceného mléka, které obsahovalo množství SEA 0,5 - 0,75 ng.ml⁻¹ [68]. Z tohoto důvodu je třeba využít právě metody, které jsou schopny detekovat velice nízké koncentrace SEs v potravině.

Molekulární biologické metody stanovení stafylokokových enterotoxinů

V současné době jsou nejužívanější metody v diagnostice založeny na polymerázové řetězové reakci (PCR). Výhody spočívají především ve vysoké specifčnosti, citlivosti, možnosti standardizovaného přístrojového provedení s minimálním množstvím biologického materiálu potřebného k vyšetření. Detekce nasyntetizovaného produktu lze provádět gelovou elektroforézou po rozštěpení specifickými DNAázami, sekvenací nebo specifickými sondami. Modifikací metodiky PCR je "real-time" PCR, která umožňuje na podkladě kontinuálního přírůstku fluorescence, měřit kvantitu syntetizované DNA během nebo po každém PCR cyklu. Metoda je rychlejší, přesnější, umožňuje kvantifikaci, nicméně vyžaduje specifický termocykler s možností detekce fluorescence v každé reakční jamce. [69].

- ***Polymerázová řetězová reakce (PCR)***

Nástup molekulárních metod v devadesátých letech 20. století a dostupnost informací o sekvencích DNA u všech známých SEs umožnily detekci specifických enterotoxigenních genů metodou PCR (Polymerase chain reaction). Tato metoda je specifická, citlivá a rych-

lá, ale poskytuje pouze informace o přítomnosti genů u izolátů *S. aureus*. Jedná se o přímé stanovení genů zodpovědných za tvorbu toxinů. Přítomnost specifických genů však automaticky neznamená, že příslušné SEs budou kmenem *S. aureus* produkovány. Pro potvrzení schopnosti produkce SEs je nutné použít další metody, například na bázi ELISA [58].

Sledování průběhu reakce v libovolném okamžiku umožňuje metoda Real time PCR.

Při porovnání výsledků získaných pomocí metody ELFA při použití přístroje VIDAS a pomocí PCR metody byla stanovena u řady mikroorganismů, včetně *S. aureus*, 100% shoda v detekci patogenů a jejich toxinů [70]. Při sledování prevalence genů enterotoxinů koagulázapozitivních stafylokoků izolovaných z nepasterovaného mléka a mléčných výrobků a porovnání s výsledky stanovenými pomocí SET - RPLA pro konkrétní toxiny (SAE - SED) byly geny byly zjištěny u 56,5 %, zatímco produkce toxinů byla zaznamenána pouze u 39 % vzorků. I když přítomnost enterotoxigenních kmenů nemusí znamenat ještě produkci toxinů, autoři přesto upozorňují na problém při zajištění veřejného zdraví a kombinaci metody RPLA a PCR považují za záruku úspěchu při analýze vzorků [71].

- *Metoda microarrays*

Nevýhodou výše uvedené PCR je poněkud omezená kapacita. PCR metoda je méně výhodná v tom, že je obvykle omezena na analýzu jednoho patogenu, malou skupinu příbuzných patogenů nebo malý počet relevantních genů. Tento problém je řešen zaváděním tzv. mikročipů (microarrays). Microarray technologie umožňuje výrazné rozšíření z hlediska počtu sekvencí DNA, které mohou být analyzovány současně, což umožňuje molekulární identifikaci a charakterizaci několika patogenů a mnoho genů v jednom testu [72].

DNA čip (DNA microarray) je technologie umožňující molekulárně-biologické analýzy paralelního rázu, DNA microarray technologie jsou nejvíce využívány pro sledování genové exprese, lze je využít také pro detekci mutací, analýzu genových polymorfismů, atd.

Princip technologie DNA čipu (GeneChip, DNA microarray) je poměrně jednoduchý. Základ microarrays tvoří tři části různého charakteru: nosič, cílové molekuly a molekuly sond uložené na definovaných místech (tzv. spoty) na microarray, jejichž souhra představuje klíčový aspekt pro funkci celého systému.

Sondy - úseky DNA (oligonukleotidy) nebo cDNA (úseky získané zpětným přepisem mRNA) se známou sekvencí jsou přichyceny – naspotovány v počtu tisíců - na skleněnou nebo silikonovou destičku do matrice řádků a sloupců. Fixované DNA s předvolenými

koordináty se označují také jako proby a reprezentují konkrétní gen. Cílem je obvykle zjistit, které geny jsou v zkoumaném biologické vzorku za určitých podmínek aktivní a které naopak nejsou. Při analýze se čip pokryje molekulami experimentální DNA nebo RNA z testovaného a referenčního vzorku značenými fluorescenční barvou, které se komplementárně váží k sondám. Nejjednodušší analýzou s použitím DNA čipů je diagnostika, tj. detekce přítomnosti nebo absence genové aktivity. V tomto případě jsou molekuly RNA v biologickém vzorku fluorescenčně označeny a inkubují se s čipem. V procesu tzv. hybridizace si označené molekuly ve vzorku najdou svoje páry (stejně sekvence) na čipu a vytvoří stabilní komplex. Ostatní, nespárované molekuly se vymyjí. Zbývající fluoreskující komplexy se detekují laserovým skenerem, přičemž právě tyto reprezentují geny, které ve vzorku byly aktivní. Naopak nefluoreskující odpovídají genům, které byly v daném vzorku „vypnuté“ [73].

Při simultánní detekci sedmi stafylokokových enterotoxinů A, B, C1, D, E, G a I nacházejících se v jednom vzorku byla použita metoda microarray s využitím hydrogelových mikročipů. Vývoj metody včetně exprese a purifikace rekombinantních toxinů zahrnoval i přípravu panelů monoklonálních protilátek (MABs) proti toxinům, výrobu experimentálního biočipu pro screening MABs a výběr optimálních dvojic primárních a sekundárních protilátek pro každý toxin. Vybrané MABs mají vysokou cílovou afinitu. Metoda je určena pro kvantitativní analýzu toxinů. Citlivost detekce dosáhla $0,1 - 0,5 \text{ ng.ml}^{-1}$, v závislosti na typu enterotoxinu. Hodnocení pokusu prokázalo, že citlivost, specifita a opakovatelnost navrhovaného testovacího systému plně splňují požadavky pro tradiční imunanalytické systémy. Diagnostické biočipy zkrátily dobu analýzy ze 17 na 2 hodiny bez ztráty citlivosti. Tato metoda byla úspěšně testována i na potravinách a biologických mediích [74].

Fyzikálně-chemické metody stanovení stafylokokových enterotoxinů

Alternativní metody vhodné pro stanovení SEs v potravinách stanovují SEs jako chemické agens - proteiny s nízkou molekulovou hmotností.

Pro purifikaci SEs byla zavedena metoda na principu klasické iontové výměnné chromatografie. Tímto způsobem získaný SE může být dále analyzován chromatografickými metodami, například kapalinovou chromatografií s vysokou účinností (HPLC - high performance liquid chromatography), kapalinovou chromatografií s reverzními fázemi a elektromi-

gračními analytickými metodami, jako je elektroforéza DSD-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) [26].

Tyto metody se jeví jako vhodné pro kvalitativní i kvantitativní stanovení všech známých typů SEs v potravinách. Jejich nevýhoda je v tom, že nejsou standardizovány.

2 KOZÍ SÝRY

Chov koz, produkce mléka jako potraviny a jeho zpracování především na sýry má v řadě oblastí světa i v České republice velmi dlouhou historii a tradici. Chov koz dnes i přes nízkou produkci mléka plní významnou ekonomickou a ekologickou úlohu. Kozí mléko a mléčné výrobky jsou hodnotnou a lehce stravitelnou potravinou a o zdraví prospěšných účincích kozího mléka se v poslední době velmi diskutuje. Zajištění bezpečnosti a jakosti mléka a mléčných výrobků, včetně kozích sýrů, stojí ve středu zájmu výrobců i konzumentů.

2.1 Kozí mléko

Kozí mléko, surovina pro výrobu kozích sýrů, obsahuje průměrně 87,8 % vody, 12,2 % sušiny, 3,8 % tuku, 3,5 % bílkovin, 4,1 % laktózy a 0,8 % popela. Ve srovnání s mlékem kravským obsahuje tuk v tukových kapénkách menší velikosti (1,5 - 3,0 μm), více vápníku, draslíku, hořčíku, fosforu a chloru, vitaminů skupiny B a vitamínu A, ale méně kyseliny listové a askorbové a vitamínu B12 [75; 76]. Obsah tukuprosté sušiny má být podle STN 57 0520 (1995) Kozie mlieko nejméně 8,3 % [77]. Kozí mléko se odlišuje od kravského hlavně tím, že hlavní α_{s1} -kasein kravského mléka je v kozím mléce zastoupen minimálně nebo chybí. Proto je jeho konzumace vhodnou alternativou pro jedince trpící alergií na kaseinovou bílkovinu kravského mléka [78]. Složením a vlastnostmi mléka u bílých krátkosrstých koz se zabývala řada autorů a všichni shodně uvádějí, že obsah základních složek vykazuje průkazné rozdíly v závislosti na plemeni a stadiu laktace [79; 80; 81; 82].

K produkci jakostních mléčných výrobků je třeba, aby mléko, základní surovina pro jejich výrobu, bylo co nejkvalitnější. Fyzikálně-chemické vlastnosti mléka závisejí nejen na jeho chemických složkách, ale zejména na jejich vzájemném působení. Podle požadavku STN 570520 (1995) Kozie mlieko má být průměrná specifická hmotnost nejméně 1,028 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a titrační kyselost mezi 5 - 8 SH [77]. Bod mrznutí je -0,5527 $^{\circ}\text{C}$ [83], počet somatických buněk 895 - 1875 $\cdot 10^3\cdot\text{ml}^{-1}$ [84].

Mezi základní technologické vlastnosti mléka patří syřitelnost, kysací schopnost, tepelná stabilita a mikrobiologická čistota mléka.

2.2 Kozí sýry

Kozí mléko bývá nejčastěji využito k výrobě kozích sýrů. Podle definice Vyhlášky č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje, jsou obecně sýry mléčné výrobky, vyrobené vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky. Sýry jsou touto vyhláškou klasifikovány do jednotlivých skupin, a to podle konzistence ve vztahu k obsahu vody, podle konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra, podle tuku v sušině a podle zrání (Tab. 3) [85].

Tab. 3. Klasifikace přírodních sýrů podle zrání [85]

Sýr	Charakteristika
Sýr nezrající	čerstvý termizovaný
Sýr zrající z toho plísňový sýr	na povrchu
	sýry s mazem na povrchu
	převážně v celé hmotě (anaerobně)
	s tvorbou charakteristické plísně na povrchu
	s tvorbou charakteristické plísně uvnitř hmoty
	dvouplísňový

2.2.1 Technologie výroby sýrů

Základní technologie výroby všech druhů sýrů je podobná a relativně malé změny procedur ve výrobě se projevují rozdíly ve finálních výrobcích. Mléko před zpracování na sýry prochází fázemi úprav, mezi které patří mechanické čištění a tepelné ošetření mléka pasteurací (obvykle šetrnou), která je významným krokem k zajištění bezpečnosti sýrů. Teplotní a časové parametry jsou legislativně stanoveny Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, Nařízením Komise (ES) č. 1662/2006 [86; 87]. Pasterace mléka se podle legislativy dosahuje ošetřením vysokou teplotou po krátkou dobu, nejméně 72 °C po dobu 15 sekund (šetrná pasterace) nebo nízkou teplotou po dlouhou dobu, nejméně 63 °C po dobu 30 minut (dlouhodobá pasterace) nebo jakoukoliv jinou kombinací teploty a času

vedoucí k rovnocennému účinku, tak, aby se bezprostředně po tomto ošetření byla reakce při testu na alkalickou fosfatázu, v případech, kdy je test použitelný, negativní [86; 87]. Modifikace režimu pasterace je prováděna podle příslušného technologického postupu pro konkrétní typ sýra. Každý sýr je charakterizován určitou hodnotou obsahu tuku v sušině, proto se v návaznosti na základní ošetření provádí také standardizace mléka. Na farmách se sýry vyrábějí obvykle z nestandardizovaného mléka. Homogenizace smetany se využívá při přípravě mléka zvláště pro výrobu čerstvých sýrů nebo sýrů, u nichž je žádoucí lipolýza. Přídavek chloridu vápenatého (5 - 20 g na 100 kg mléka) zlepší syřitelnost a pevnost gelu. Přídavek kyselých kultur bakterií mléčného kvašení je nezbytným předpokladem výroby všech sýrů a tvarohů. Funkce kultur lze shrnout následovně: fermentace laktózy a tvorba kyseliny mléčné - snížení pH má i jistý konzervační účinek, podílí se na koagulaci a podporuje odkapání sýřeniny, dále uplatnění proteolytické a lipolytické aktivity v průběhu zrání, utváření sensorických vlastností a vliv na texturu a konzistenci sýrů. Základní kulturou je mezofilní smetanová kultura, která je podle typu sýra doplněna dalšími kulturami. Přídavek kultur následuje po ohřátí mléka na teplotu sýření (obvykle 30 - 33 °C). Srážení kaseinu je základním procesem při výrobě sýrů. Kasein se sráží z mléka jednak při snížení pH na hodnotu blízkou izoelektrickému bodu (kyselé srážení), jednak působením enzymů (sladké srážení). Při kyselém srážení se uplatní kyselina mléčná vznikající in situ činností bakterií mléčného kvašení z laktózy. Při sladkém srážení dochází ke koagulaci mléka syřidlem (chymosin, pepsin, mikrobiální syřidla, rostlinná syřidla), jde o enzymové štěpení specifické peptidové vazby v kaseinové frakci κ . Po rozštěpení vazby vznikne para- κ -kasein a glykomakropeptid (primární fáze). V sekundární fázi dochází k tvorbě gelu, nutná je přítomnost vápenatých iontů. Následuje zpracování sýřeniny, výsledkem je vznik sýrových zrn a oddělení části syrovátky. Zpracování sýřeniny zahrnuje krájení, míchání, případně ještě dohřívání, dosoušení a praní zrn. Tyto operace podporují synerezi sýřeniny, tj. smršťování a uvolňování syrovátky. Další fází výroby je formování sýrů v tvořítkách. Tvrdé sýry se lisují lisovacím zařízením, měkké sýry se formují lisováním vlastní vahou a obracením. Solení zformovaných sýrů má vliv na chuť sýra, ale také ovlivňuje aktivitu kultur a enzymů při zrání sýrů a zpevňuje povrch sýrů - sýry se solí do zrna, na sucho či v solné lázni. S výjimkou čerstvých sýrů procházejí sýry procesem zrání [88]. Zráním jsou označovány všechny biochemické procesy, probíhající v sýrech působením mikrobiálních enzymů, případně i enzymů syřidla ovlivňujících vzhled, chuť, vůni a konzistenci sýru [89].

2.2.2 Výskyt *S. aureus* a stafylokokových enterotoxinů v kozím mléce a sýrech

Situace v produkci kozího a ovčího mléka, na rozdíl od kravského mléka, který má přísné hygienické předpisy a kontrolu kvalitu, je odlišnější. Navíc v chovech koz mohou být problémy s nízkou úrovní hygieny v chovech [90].

Kozí mléko může být zdrojem řady patogenních mikroorganismů, proto je pro výrobu sýrů zvláště důležité, aby syrové mléko a mléko k výrobě sýrů obsahovalo co nejmenší celkový počet mikroorganismů. Podle legislativy (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ve znění Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006 je vyžadován maximální celkový počet mikroorganismů v 1 ml syrového kozího mléka 1 500 000 (a v případě produkce výrobků ze syrového mléka 500 000) [86; 87]. Národní slovenská legislativa (STN 570520, 1995, Kozie mlieko) požaduje maximální celkový počet mikroorganismů jednoznačně, a to $5 \cdot 10^5$ v 1 ml a stanovuje také limitní počet *Staphylococcus aureus* $2 \cdot 10^3$ KTJ v 1 ml [77].

Při sledování výskytu čtyř významných patogenů - *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. a *Escherichia coli* O157:H7 v mléce krav, ovcí a koz použitým pro řemeslnou výrobu sýrů byl v mléce *S. aureus* nalezen na 67 % sledovaných farem. Na kvalitu mléka a výskyt mastitid má velký vliv systém chovu koz a produkce mléka [91].

Při studiu vlivu různých systémů produkce kozího mléka (intenzivní, polointenzivní a extenzivní) na farmách v okolí jihoafrické Pretorie na jeho mikrobiologickou kvalitu bylo celkem vyšetřeno 270 vzorků a v nejmenší míře byla zjištěna bakteriální kontaminace při extenzivním způsobu chovu (13,3 %) oproti 43,3 % v intenzivním a 36,7 % v polointenzivním chovu. Nejčastější příčinou mastitid byly shledány stafylokoky (85,7 %), z toho 14,3 % představoval *S. aureus* [92].

Mezi infekcí *S. aureus* a počtem somatických buněk je pozitivní korelace. V průběhu celé laktace stáda koz v Severní Itálii byl proveden monitoring a stanovena pozitivní korelace mezi chronickou infekcí *S. aureus* a počtem somatických buněk [93]. Jiní autoři však uvádějí, že počet *S. aureus* sice souvisí s počtem somatických buněk, ale zjistili korelaci nízkou ($r=0,40$), vyšší korelace byly s celkovým počtem mikroorganismů ($r=0,53$) [94].

Výskyt *S. aureus* v kozím mléce souvisí s rizikem tvorby SEs. Po izolaci *S. aureus* z mléčných filtrů a bazénových vzorků mléka, mj. také kozího mléka, byla v polovině izolátů prokázána produkce toxinů [95]. Z 5671 vzorků kozího mléka byl *S. aureus* detekován

pouze v 353 (6,2%), v 535 vzorcích kůže struků a v 569 vzorcích ze sliznice nosní. Produkce SEs byla zaznamenána v 71,9 % pozitivních vzorků [96].

SEC je uváděn jako predominantní toxin v kozím a ovčím mléce, zatímco v kravském mléce je to SEA a SED [63].

S. aureus v syrovém kozím mléce byl však také prokázán u 69 % vzorků a téměř všechny izoláty byly nosiči genu *sec* kódujícího tvorbu stafylokokového enterotoxinu typu C (SEC). Schopnost produkovat tento enterotoxin byla potvrzena metodou RPLA [97]. Při hodnocení 60 vzorků syrového koziho mléka určeného k výrobě sýra byly koaguláza-negativní stafylokoky nalezeny u 54 vzorků (90 %), průměrný zjištěný počet byl $1,3 \times 10^3$ KTJ.ml⁻¹. U 26 vzorků (43 %) byl zjištěn *S. aureus* v počtu $> 10^2$ KTJ .ml⁻¹, průměrný počet byl $1,2 \times 10^4$ KTJ.ml⁻¹. *S. aureus* byl v 23 % enterotoxinogenní, s převahou produkce enterotoxinu C [98].

Většina patogenních mikroorganismů, které se vyskytují v syrovém mléce, je zničena pasteurací, takže v sýrech se mohou vyskytnout převážně jen sporotvorné mikroorganismy a enterokoky. Příčinou výskytu patogenů jako je *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus* aj. je postpasterační kontaminace. Přežijí-li mikroorganismy proces výroby sýrů, mohou se vyskytnout ve finálních výrobcích. *Staphylococcus aureus* je v sýrech zjišťován z patogenů nejčastěji. Stafylokoky se pomnožují v počátečních stádiích výroby, kdy pH sýra ještě nedosahuje nízkých hodnot. Vzhledem ke specifčnosti těchto bakterií a složitosti výroby sýra je někdy velmi obtížné odhadnout počáteční hodnocení rizika přežívání *S. aureus* v různých druzích sýrů [99]. Literární údaje o frekvenci a podílu enterotoxigenních kmenů, které způsobují kontaminaci sýrů, jsou výrazně odlišné. Produkce stafylokokového enterotoxinu SEA v kozích sýrech typu Camembert byla prokázána v sýrech s inokulovaným kmenem *Staphylococcus aureus* při iniciálním počtu vyšších, než 10^3 KTJ.ml⁻¹ [100]. Jako infekční dávka potřebná k vyprodukování množství enterotoxinů schopných vyvolat alimentární intoxikaci je uváděna i hodnota vyšší $10^5 - 10^6$ KTJ.ml⁻¹ [24].

V sýrech vyrobených ze syrového mléka nebyla produkce SEs imunologickými testy prokázána, ale 14 vzorků z 33 vykazovalo geny *sea*, *sec*, *sed*, *seg*, *sel*, *sej* [101]. Při sledování výskytu *S. aureus* v 181 vzorcích kozích sýrů získaných v obchodech, na týdenních a zemědělských trzích bylo nalezeno 14 pozitivních vzorků. Z těchto vzorků bylo 64 izolátů charakterizováno biochemicky a geneticky, včetně jejich potenciálu produkovat stafyloko-

kové enterotoxiny. Jeden izolát produkoval SEA, 18 izolátů produkovalo SEK, zatímco SEB, SED a SEE nebyly nalezeny [102].

Oproti mléku jsou v sýrech podmínky pro růst *S. aureus* a produkci SEs do jisté míry odlišné. Bacteriociny produkované bakteriemi mléčného kvašení se přirozeně vyskytují i v sýrech a některé z bacteriocinů vykazují protistafylokokovou aktivitu [103].

Další bariérou jsou teplotní a časové podmínky skladování sýrů a jejich kyselost. V případě čerstvých sýrů působí jako inhibiční faktor růstu *S. aureus* obsah kyseliny mléčné, díky které je pH nižší, než 5,0 [99].

2.3 Legislativa - *S. aureus* a stafylokokové enterotoxiny v sýrech

Významným rizikem při konzumaci potravin živočišného původu jsou mikroorganismy a jejich toxiny způsobující alimentární infekce a intoxikace, ke kterým dochází po požití tepelně neošetřených, nedostatečně tepelně ošetřených nebo sekundárně kontaminovaných potravin. Vyšetřením zjištěné mikrobiologické ukazatele jsou hodnoceny podle legislativou daných mikrobiologických požadavků na mléčné výrobky, které jsou zahrnuty v Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ve znění Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007, o mikrobiologických kritériích pro potraviny [43; 44].

S ohledem na zajištění bezpečnosti potravin a zdraví konzumenta a vzhledem k riziku vzniku onemocnění stafylokokovou enterotoxikózou se nařizuje u vybraných kategorií potravin stanovovat počet koagulázopozitivních stafylokoků a prokazovat nepřítomnost stafylokokových enterotoxinů [43; 44].

Podle požadavku kapitoly 1. Kritéria bezpečnosti potravin výše uvedeného nařízení se stanovují stafylokokové enterotoxiny v sýrech, sušeném mléce a sušené syrovátce.

Plán odběru vzorků je: n-5, c-0, limity m a M stanovují, že SEs nesmějí být prokázány v 25 g potravin. Stanovení SEs se provádí pomocí Evropské screeningové metody ke zjišťování stafylokokových enterotoxinů v mléce a mléčných výrobcích, metody referenční laboratoře Společenství pro koagulázopozitivní stafylokoky.

Fází, na níž se kritérium vztahuje, jsou produkty uvedené na trh během doby údržnosti.

Stafylokokové enterotoxiny v mléčných výrobcích jsou vyhovující, pouze pokud nejsou zjištěny v žádné jednotce vzorku.

Podle požadavku kapitoly 2. Kritéria hygieny výrobního procesu se stanovují koagulázopozitivní stafylokoky ve čtyřech skupinách mléčných výrobků. Pokud je v nich zjištěn počet koagulázopozitivních stafylokoků $>10^5$ KTJ/g, musí následovat vyšetření na stafylokokové enterotoxiny, které nesmějí být v bezpečném výrobku přítomny.

V ČSN 56 9609 (2008) Pravidla správné hygienické a výrobní praxe - Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace jsou uvedeny pro koagulázopozitivní stafylokoky (*S. aureus* a další druhy), jakožto bakteriální původce onemocnění z potravin, nejvyšší mezní hodnoty na g (ml) potravin podle kategorie výrobků (10^2 - 10^5 KTJ). Dále jsou zde stanoveny tolerované hodnoty počtu koagulázopozitivních stafylokoků pro jednotlivé druhy, skupiny a podskupiny výrobků.

Stafylokokové enterotoxiny jsou v této normě uvedeny jako toxický produkt mikroorganismů, ve všech potravinách musí být výsledek vyšetření negativní - to znamená, že nesmějí být prokazatelné ve hmotnosti (objemu) vzorku určené použitou metodou zkoušení [104].

3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

- sledovat počty *S. aureus* v čerstvých kozích sýrech v průběhu výroby a skladování v souvislosti s produkcí enterotoxinů;
- detekovat současně stafylokokové enterotoxiny produkované bakteriemi *S. aureus* metodou ELFA pomocí přístroje miniVIDAS®;
- porovnat růst *S. aureus* a produkci stafylokokových enterotoxinů v kozích sýrech a ve srovnávacích vzorcích;
- posoudit vliv dávky startovací kultury, doby kontaminace a skladovacích podmínek na růst *S. aureus* a produkci enterotoxinů;
- posoudit vhodnost použité metody stanovení stafylokokových enterotoxinů;
- zhodnotit riziko konzumace kozích sýrů a možnosti jeho eliminace.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 METODIKA

4.1 Materiál

Staphylococcus aureus

Kmen *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) CCM 5974 s produkcí stafylokokového enterotoxinu C pocházel z České sbírky mikroorganismů Brno.

Suroviny a pomocné látky pro výrobu sýrů

- Syrové kozí mléko z farmy v Jihomoravském kraji České republiky, které bylo zpaste- rováno; z pasterovaného mléka byly vyrobeny čerstvé kozí sýry a srovnávací vzorky
- *Lactoflora*® smetanová - čistá mlékařská kultura (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Leu- conostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*), Milcom, a.s., Praha, Česká republika
- Smetanový zákys 2% (SK) připravený ze smetanové kultury a sterilního mléka
- Syřidlo Fromase 750 TL, tekutá forma, koagulační aktivita 750 IMCU/ml. DSM Food Specialities, Heerlen, Holandsko
- Syřidlo o aktivitě 1:1000 připravené ředěním z výše uvedeného syřidla
- Chlorid vápenatý CaCl₂, Ing. Petr Švec, Penta, Česká republika

Kultivační média

- M 043 Baird Parker agar base (BP), HIMEDIA, India
- Selektivní suplement FD 046 Egg Yolk Tellurite emulsion, HIMEDIA, India

Reagencie

- 70% ethanol
- Fyziologický roztok (9,0 g NaCl na 1000 ml aqua destillata)
- 1 M NaOH
- 5 M HCl
- Sterilní destilovaná voda
- Set k detekci stafylokokových enterotoxinů VIDAS Staph enterotoxin II (SET2) bio- Mérieux, France

Laboratorní přístroje a pomůcky

- předvážky KERN EMB 600-2, Kern&Sohn, GmbH, Germany
- biologické inkubátory, BMT, Brněnská medicínská technika, Česká republika
- centrifuga HERMLE 233 H2, Hermle Laborortechnik, Germany
- Densi-La-Meter, EMO, Brno, Česká republika
- chladnička, mraznička, Electrolux, Germany
- dvouplášťová nádoba s teploměrem a míchadlem o objemu 5 l - pastér, Tenez Chotěboř, Česká republika
- laboratorní autokláv, Sanyo, MLS 3781 L, Tega Sanyo Industry Co., Ltd., Japan
- přístroj miniVIDAS[®], bioMérieux, France
- mrazicí box, VIP Science -86 °C, Sanyo, Japan
- pH metr, pH 210, Microprocessor pH meter, Hanna-Instruments, Romania
- třepačka MINISHAKER, MS 1, IKA-Works, USA
- vodní lázeň, GFL, typ 1013, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Germany
- jednorázový plastový materiál (Petriho misky, mikroskopické skleničky typu Eppendorf, špičky, polyetylénové sáčky), pipety, laboratorní sklo a další pomůcky
- nerezové sterilní nádoby a pomůcky (hrnce, misky, naběračky, nože, plachetky)

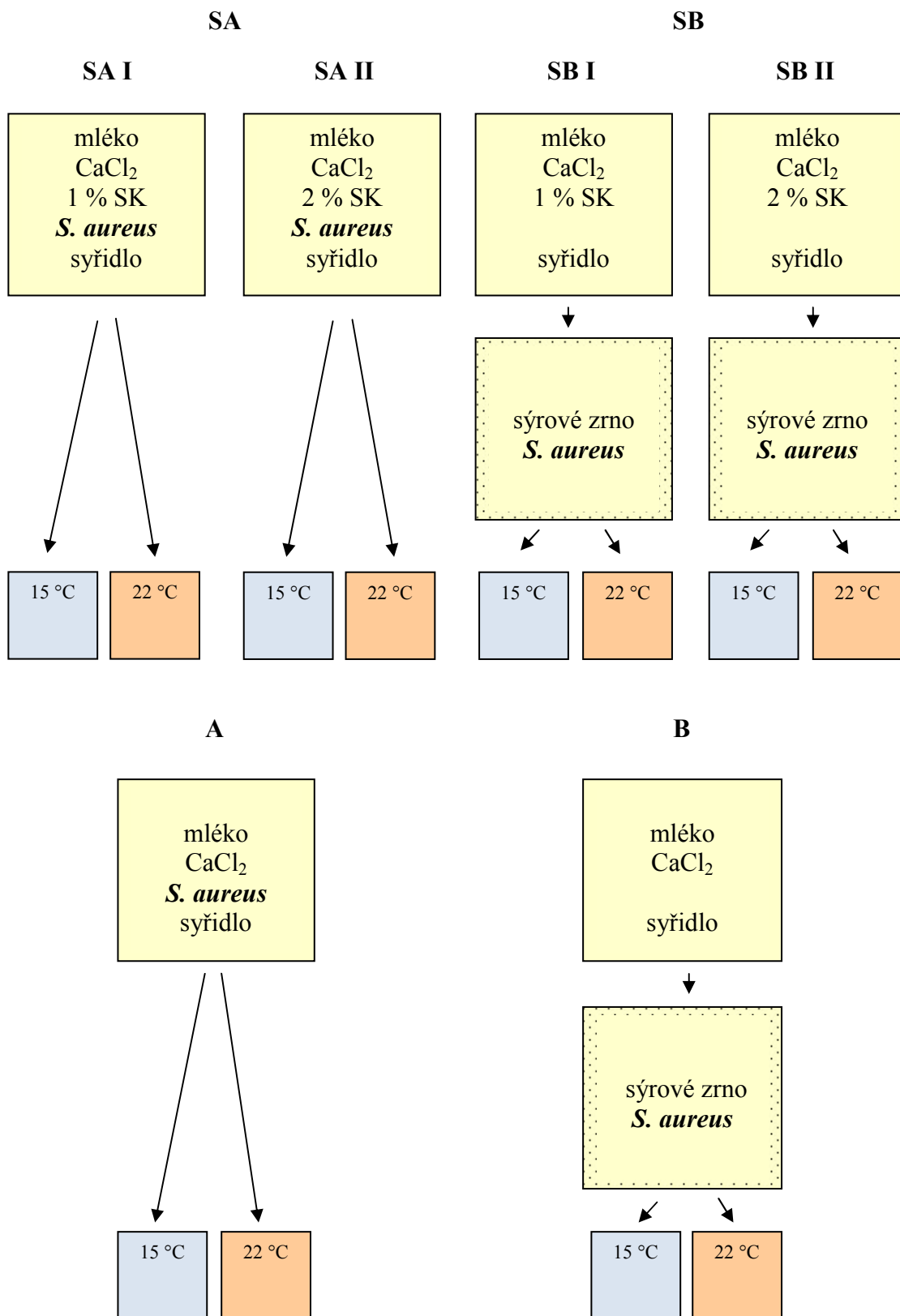
4.2 Metody

Dále je uveden postup výroby vzorků, metodika pokusu a metody vyšetření.

4.2.1 Příprava vzorků

Syrové kozí mléko bylo pasterováno při teplotě 80 °C po dobu 30 s. Z důvodu kontroly možné přítomnosti *S. aureus* v pasterovaném mléce byl proveden odběr mléka a vyšetření na přítomnost *S. aureus*, výsledek byl negativní.

Byly připraveny dvě série vzorků sýrů lišící se dávkou startovací kultury SK (I, II), obsahující *S. aureus* ve výchozím počtu 10^3 KTJ.ml⁻¹ v mléce (sýry SA) a 10^3 KTJ.g⁻¹ v sýrovém zrnu (sýry SB). Dále byly připraveny srovnávací vzorky A a B pro obě modelové situace způsobu kontaminace sýrů v témže počtu *S. aureus* (10^3 KTJ.ml⁻¹ resp.g⁻¹); jednalo se o „sladké sýry“ vyrobené bez přídavku startovací kultury. Schéma postupu při přípravě vzorků je na Obr. 2.



SA, SA I, SA II, SB, SB I, SB II, A, B - označení vzorků, SK startovací kultura, 15, 22 °C - skladovací teploty

Obr. 2. Postup přípravy vzorků

Popis postupu přípravy vzorků:

Příprava sýrů SA

Při přípravě vzorků kozích sýrů postupem A (SA I a SA II) byl *S. aureus* zaočkován do zpasterovaného mléka před sýřením.

Postup výroby:

Syrové mléko bylo zpasterováno při teplotě 80 °C 30 s a zchlazeno na teplotu sýření 30 °C. Do mléka byl zaočkován kmen *S. aureus* v takovém množství, aby bylo dosaženo výchozího počtu 10^3 KTJ. ml⁻¹. Do mléka byl přidán CaCl₂ v množství 0,18 g.l⁻¹ mléka, aby bylo dosaženo vhodné syřitelnosti. Dále byla do mléka zpracovávaného na sýry A I přidána smetanová kultura *Lactoflora* ve formě smetanového zákysu v množství 1 % z objemu zpracovávaného mléka, do sýrů A II pak v množství 2 %. Dále bylo přidáno syřidlo o aktivitě 1:1000 a mléko bylo sýřeno při 30 °C 1 hodinu. Poté proběhlo zpracování sýřeniny krájením na syrové zrno (kostky velikosti cca 3 x 3 cm). Po 30ti minutovém stání rozkrájené sýřeniny (synereze a uvolnění části syrovátky) bylo syrové zrno přemístěno do sterilní plachetky, která byla zavěšena nad odkapní mísu a za současného odkapávání syrovátky se sýr lisoval vlastní vahou. Teplotní a časové podmínky, za kterých probíhalo lisování a současně prokysání sýra, byly 22 °C po dobu 18 h. Vyroběný sýr byl zabalen do sterilního obalu, umístěn do termostatů a skladován.

Příprava sýrů SB

Při přípravě vzorků kozích sýrů postupem B (SB I a SB II) byl *S. aureus* zaočkován do fázového vzorku výroby sýrů - do syrového zrna.

Postup výroby:

Postupem uvedeným u sýrů SA byla vyrobena sýřenina a poté do zpracované sýřeniny, ve fázi vytvoření syrového zrna po odloučení části uvolněné syrovátky, byl zaočkován *S. aureus* v takovém množství, aby bylo dosaženo výchozího počtu 10^3 KTJ. g⁻¹ hmoty. Syrové zrno se zaočkováním *S. aureus* bylo přemístěno do sterilní plachetky, zavěšeno nad odkapní misku a sýr byl lisován vlastní vahou za současného odkapávání syrovátky. Teplotní a časové podmínky, za kterých probíhalo lisování a současně prokysání sýra, byly 22 °C po dobu 18 h. Vyroběný sýr byl zabalen do sterilního obalu, umístěn do termostatů a skladován.

Příprava srovnávacích vzorků

Pro porovnání dynamiky růstu počtu a tvorby toxinů v sýrech byl použit „sladký sýr“ vyrobený stejným způsobem, jako sýry SA a SB, ale bez přídavku startovací kultury - smetanového zákysu, takže se jednalo pouze o sraženinu.

Pro výrobu srovnávací vzorku A bylo zaočkováno kmenem *S. aureus* pasterované mléko, po přídavku chloridu vápenatého a syřidla proběhlo sýření (60 minut při teplotě 30 °C), zpracování sýřeniny na zrno, odloučení části syrovátky (30 minut při pokojové teplotě) (simulace stání rozkrájené sýřeniny) a lisování sýra.

U výroby srovnávacího vzorku B byla postupem uvedeným výše vyrobena sýřenina a poté do zpracované sýřeniny, ve fázi vytvoření sýrového zrna po odloučení části uvolněné syrovátky, byl zaočkován *S. aureus*.

Po zaočkování byl výchozí počet ve srovnávacích vzorcích obdobný jako u mléka pro výrobu sýrů SA a u sýrového zrna pro sýry SB, tj. 10^3 KTJ.ml⁻¹ resp. g⁻¹.

4.2.2 Skladování a odběry vzorků

Skladování vzorků

Vzorky sýrů SA a SB sýrů byly skladovány celkem 10 dní při teplotě 15 a 22 °C. Srovnávací vzorky byly skladovány za stejných teplotních a časových podmínek jako sýry SA a SB.

Odběry vzorků

K vyšetření byly vzorky sýrů sterilně odebrány na počátku pokusu - po zaočkování *S. aureus* do mléka (SA) a sýrového zrna (SB), v průběhu výroby sýrů a při skladování ve stanovených intervalech. Srovnávací vzorky byly odebírány v odpovídajících fázích. Vzorky určené k detekci SEC byly zamrazeny na teplotu -18 °C.

U sýrů SA a srovnávacích vzorků A byly provedeny odběry následujících vzorků:

- mléko po zaočkování *S. aureus*
- sýřenina po ukončení sýření (zrno)
- sýry po lisování
- syrovátka
- sýry skladované 1, 2, 5, 8, 10 dní

U sýrů SB a srovnávacích vzorků B byly provedeny odběry následujících vzorků:

- sýrové zrno po zaočkování *S. aureus*
- sýry po lisování
- syrovátka
- sýry skladované 1, 2, 5, 8, 10 dní

4.2.3 Značení vzorků

Vzorky sýrů byly označeny SA, SB (podle fáze zaočkování *S. aureus*), I, II (podle dávky startovací kultury), 15 a 22 (podle skladovací teploty). Vzorky srovnávací byly označeny A, B. Značení je použito v kapitole Výsledky a diskuze. Výrobní fáze a den skladování, kdy byly vzorky odebírány, jsou v textu popsány slovně. V obrázcích jsou výrobní fáze označeny písmeny a-h. Značení vzorků je vysvětleno v kapitole Seznam použitých symbolů a zkratek.

4.2.4 Vyšetření vzorků

Vyšetření vzorků sýrů SA a SB vzorků srovnávacích A a B zahrnovalo stanovení počtu *S. aureus* na půdě Baird-Parkera. Souběžně bylo provedeno měření aktivní kyselosti vzorků. Stanovení stafylokokového enterotoxinu SEC bylo provedeno metodou ELFA na přístroji miniVIDAS[®], bioMérieux, France.

Stanovení počtu *S. aureus* pomocí klasické kultivační metody

Zpracování vzorků sýrů pro mikrobiologické vyšetření bylo provedeno podle ČSN ISO 7218 (2008) [105]. Stanovení počtu *S. aureus* bylo prováděno plotnovou metodou podle ČSN EN ISO 6888-1 (1999) s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera, inkubace probíhala při teplotě 37 ± 1 °C po dobu 24 ± 2 hodiny a 48 ± 2 hodiny [53]. Zjištěné počty *S. aureus* byly převedeny na logaritmickou hodnotu (\log KTJ.ml⁻¹ resp. g⁻¹).

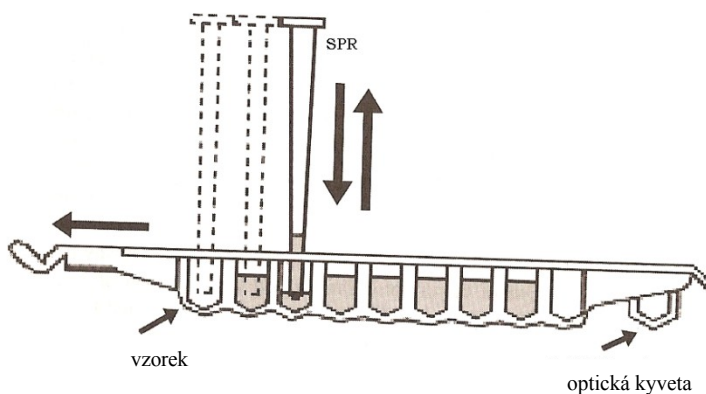
Stanovení aktivní kyselosti mléka fázových vzorků a sýrů

Kyselost mléka, fázových vzorků odebíraných při výrobě sýrů a sýrů skladovaných do 5. dne byla stanovována pomocí pH metru.

Stanovení produkce stafylokokových enterotoxinů metodou ELFA (miniVIDAS®)

Ke stanovení SEs byla použita fluorescenční imunologická metoda. Plně automatický systém založený na metodě ELFA (enzyme-linked immunofluorescent assay) využívá přístroj miniVIDAS®. ELFA je metoda založená na specifické reakci antigen-protilátka, SEs přítomné ve vzorku přístroj detekuje jako sumu, bez rozlišení a kvantifikace typu SEs.

Testy využívané přístrojem miniVIDAS® se skládají ze dvou částí. První částí jsou „pipety“, označované jako komůrka s pevnou fází (SPR), jejichž vnitřní část je potažena protilátkou specifickou k hledanému antigenu. Druhou částí je reagenční strip složený z deseti jamek (Obr. 3). První z nich je prázdná, do ní se pipetuje vzorek. Dalších osm jamek obsahuje promývací roztoky nebo reagenční roztoky, konjugát z části tvořený alkalickou fosfatázou a substrát 4-methyl-umbelliferyl fosfát. Hledaný antigen se naváže na protilátku uvnitř SPR a v průběhu promývacích kroků se odstraní nenavázané složky vzorku. Fluorogenní substrát 4-methyl-umbelliferyl fosfát používaný v testu je enzymem alkalickou fosfatázou navázanou na komplex antigen-protilátka konvertován na fluorescentní produkt 4-methyl-umbelliferon. Poslední jamka stripu je optická kyveta, ve které je změřena intenzita fluorescence pomocí fotodiodového fluorimetru [62].



Obr. 3. MiniVIDAS® reagenční strip s komůrkou s pevnou fází (SPR) [62].

Průkaz přítomnosti stafylokokových enterotoxinů metodou ELFA byl proveden následujícím postupem zpracování vzorků a stanovením:

Zpracování vzorků bylo provedeno podle pokyn výrobce testů. Odebrané vzorky sýrů a srovnávací vzorky byly zmrazeny a uchovávány v mrazničce. Po rozmrazení byly vzorky homogenizovány v poměru 10 g vzorku a 90 ml sterilního fyziologického roztoku. Následně bylo upraveno pH homogenátu na hodnotu mezi 3,5 - 4,0. Odstředováním po dobu 20 minut při 3000 rpm byl získán čirý supernatant, který byl odpipetován a bylo upraveno jeho pH pomocí 1 M NaOH na hodnotu v rozmezí 7,5 - 8,0. Po dalším odstředění byl získán konečný vzorek.

Tento vzorek byl aplikován přímo do reagenčního stripu VIDAS SET 2. 500 μ l vzorku bylo napipetováno do 1. jamky reagenčního stripu VIDAS SET 2 a strip vložen do přístroje miniVidas[®]. Produkce SEs byla vyjádřena jako hodnota relativní fluorescence (relative fluorescence value - RFV) a vyhodnocena jako pozitivní či negativní.

4.2.5 Vyhodnocení výsledků vyšetření

Ze zjištěných výsledků byla vyhodnocena dynamika růstu *S. aureus* a produkce SEC v závislosti na výrobní fázi, kdy byly vzorky zaočkovány, na dávce startovací kultury a na teplotě a době skladování vzorku. Bylo provedeno vzájemné srovnání výsledků vyšetření sýrů, srovnání s legislativou a s výsledky vyšetření srovnávacích vzorků.

Bylo provedeno statistické vyhodnocení - stanovena statistická významnost rozdílů zjištěných výsledků srovnáním vzájemných vztahů dvou výběrů pomocí Mann-Whitneyova neparametrického testu. Byly porovnávány rozdíly u souborů dat odrážejících vliv vždy jednoho sledovaného parametru (vliv fáze zaočkování *S. aureus*, vliv dávky startovací kultury, vliv skladovací teploty) [106].

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Dynamika změn počtu *S. aureus* a produkce enterotoxinu v sýrech

V průběhu deseti dní byla sledována dynamika změn *S. aureus* ve čtyřech modelových vzorcích kozích čerstvých sýrů vyrobených se změnami v technologickém postupu, lišících se i fází výroby, kdy došlo k zaočkování *S. aureus*. Skladováním vzorků ve dvou odlišných teplotních podmínkách se počet modelových vzorků znásobil na osm.

Startovací kultura ve formě smetanového zákysu byla přidána ke kozímu mléku v množství 1 % a 2 %, *S. aureus* byl zaočkován jednak do pasterovaného mléka, jednak do sýrového zrna. Skladovací teploty 15 °C a 22 °C simulovaly teploty při nedodržení chladicího řetězce či teplotu prostředí. Srovnávací vzorky byly připraveny jako vzorky sýrů, ale bez přídatku startovací kultury a byly skladovány za stejných podmínek jako sýry.

Výsledky modelových pokusů v následujících tabulkách a textu představují možnou sekundární kontaminaci čerstvých sýrů bakteriemi *S. aureus* během výroby, přičemž byla porovnána dynamika změn počtu *S. aureus* v závislosti na způsobu a fázi výroby, kdy ke kontaminaci došlo, pH a na teplotních podmínkách skladování. Souběžně se změnami počtu *S. aureus* byla sledována produkce stafylokokového enterotoxinu SEC vyjádřená jako RFV (hodnota relativní fluorescence) pomocí metody ELFA za použití přístroje miniVIDAS® (bioMérieux, France). Stafylokokové enterotoxiny přístroj stanovuje jako sumu, ale vzhledem k tomu, že testovaný kmen měl potvrzenou schopnost produkce pouze SEC, suma odpovídá tomuto enterotoxinu.

Dynamika změn počtu *S. aureus* a produkce SEC v sýrech byly porovnány vzájemně, dále se srovnávacími vzorky a s počtem *S. aureus* stanoveným legislativou jako rizikový pro produkci SEs (10^5 KTJ.g⁻¹) [43,44].

V následujících tabulkách (Tab. 4 - 15) jsou zaznamenány počty mikroorganismů vyjádřené v log KTJ.ml⁻¹ v mléce resp. log KTJ.g⁻¹ v sýrech a srovnávacích vzorcích. Průběh prokysávání sýrů do 5. dne skladování je vyjádřený hodnotami aktivní kyselosti (pH). Produkce enterotoxinů je uvedena jako negativní či pozitivní (neg., poz.).

Porovnání dynamiky změn počtu *S. aureus* a produkce toxinů (RFV) je patrné především z obrázků (Obr. 4 - 7).

5.1.1 Dynamika změn počtu *S. aureus* a produkce enterotoxinu v sýrech SA

Při přípravě modelových vzorků sýrů SA (SA I a SA II) bylo toxinogenním kmenem *S. aureus* s produkcí SEC zaočkováno po mléko po pasteraci a zchlazení na teplotu sýření. Při přípravě sýrů byla použita odlišná dávka startovací kultury (smetanového zákysu), při výrobě sýrů SA I 1 %, v případě sýrů SA II 2 %. Po zaočkování mléka proběhla fáze sýření mléka při teplotě 30 °C po dobu 1 hodiny, krájení a uvolňování syrovátky za syneze sýřeniny po dobu 30 minut. Poté proběhlo lisování sýra při teplotě 22 °C 18 hodin.

Zaočkování pasterovaného mléka *S. aureus* simulovalo důsledek nedostatečné pasterace mléka, kterou může *S. aureus* přežít, nebo důsledek sekundární kontaminace pasterovaného mléka z výrobního prostředí (kontaminované nádoby, nářadí, biofilmy či pracovníci s infekcí či nosičstvím *S. aureus*).

Dynamika změny počtu S. aureus a produkce enterotoxinu v sýru SA I

Při sledování růstu *S. aureus* a produkce SEC v sýru SA I (Tab. 4) bylo zjištěno, že při výrobě došlo po fázi sýření mléka jen k mírnému zvýšení počtu v rámci téhož log řádu. Zvýšení o více než 1 log řád je však patrné po vylisování sýru, tj. za dalších 18,5 hodiny po zaočkování mléka, a to z počáteční hodnoty v mléce 3,58 log KTJ.ml⁻¹ na hodnotu 4,88 log KTJ.g⁻¹. V syrovátce byl zjištěn mírně nižší počet *S. aureus*, než ve vylisovaném sýru. Za dobu lisování a současně prokysávání sýra došlo k poklesu pH sýra z 6,72 na 5,01 pH, v syrovátce byla zjištěna hodnota vyšší.

Tab. 4. Dynamika změn počtu *S. aureus* (log KTJ.ml⁻¹ resp g⁻¹) a produkce enterotoxinu v sýru SA I v průběhu výroby

Fáze výroby sýru	Sledované parametry		
	log	pH	SEC
Pasterované mléko	3,58	6,72	neg.
Sýrové zrno	3,62	6,28	neg.
Vylisovaný sýr	4,88	5,01	neg.
Syrovátka	4,76	5,05	neg.

log - log KTJ.ml⁻¹ resp. g⁻¹; pH - aktivní kyselost; SEC - stafylokokový enterotoxin C

Při skladování sýru SA I (Tab. 5) při 15 °C došlo k dalšímu zvýšení na 5,11 log KTJ.g⁻¹ (1. den), a také při skladování sýra při teplotě 22 °C byla překročena hranice 5 log KTJ.g⁻¹ (5,08 log KTJ.g⁻¹). Při dalším skladování při obou teplotách byly zaznamenány počty v 4 log KTJ a poté v 3 log KTJ.g⁻¹. Při vyšší teplotě byla redukce počtu v průběhu skladování rychlejší a byly zjištěny nižší hodnoty. Kyselost sýra klesala z počáteční hodnoty pH 6,72 při skladování při 15 °C na pH 4,66 a při 22°C až na pH 4,59.

Tab. 5. Dynamika změn počtu *S. aureus* (log KTJ.g⁻¹) a produkce enterotoxinu v sýru SA I v průběhu skladování

Doba skladování sýru (dny)	Teplota skladování sýru/sledované parametry					
	15 °C			22 °C		
	log	pH	SEC	log	pH	SEC
1	5,11	4,80	neg.	5,08	4,76	neg.
2	4,93	4,72	neg.	4,48	4,69	neg.
5	3,92	4,66	neg.	3,61	4,59	neg.
8	3,62	-	neg.	3,26	-	neg.
10	3,38	-	neg.	3,36	-	neg.

log - log KTJ.g⁻¹; pH - aktivní kyselost; SEC - stafylokokový enterotoxin C

Ve vzorcích SA I nebyla produkce SEC prokázána, i když v časovém úseku mezi vylisováním sýry a skladováním 1 den počty *S. aureus* dosáhly kritických hodnot 10⁵ KTJ.g⁻¹.

Dynamika změn počtu *S. aureus* a produkce enterotoxinu v sýru SA II

V případě výroby sýru SA II byl výchozí počet *S. aureus* v mléce, stejně jako u SA I, 3,58 log KTJ.ml⁻¹. Při výrobě sýru byla použita vyšší dávka smetanového zákysu (SK).

Jak je patrné z Tab. 6, po uplynutí doby sýření došlo k obdobnému mírnému zvýšení počtu *S. aureus* v rámci téhož log řádu a po vylisování sýru ke zvýšení o téměř 1 log řád (4,58 log KTJ.g⁻¹). V syrovátce byl zjištěn mírně vyšší počet *S. aureus*, než ve vylisovaném sýru. Za dobu lisování a současně prokysávání sýra došlo k poklesu pH sýru z 6,72 na 4,77 pH, zatímco u syrovátky byla zjištěna hodnota pH o málo vyšší.

Při porovnání sýrů SA I a SA II byly zjištěny nižší počty u SA II již v době sýření, ale zvláště ve vylisovaných sýrech a dále v prvních dnech skladování.

Tab. 6. Dynamika změn počtu *S. aureus* ($\log \text{KTJ.ml}^{-1}$ resp. g^{-1}) a produkce enterotoxinu v sýru SA II v průběhu výroby

Fáze výroby sýru	Sledované parametry		
	log	pH	SEC
Pasterované mléko	3,58	6,72	neg.
Sýrové zrno	3,60	6,23	neg.
Vylisovaný sýr	4,58	4,77	neg.
Syrovátka	4,63	4,78	neg.

log - $\log \text{KTJ.ml}^{-1}$ resp. g^{-1} ; *pH* - aktivní kyselost; *SEC* - stafylokokový enterotoxin C

V průběhu skladování sýru SA II při teplotě 15 °C pak došlo ke zvýšení počtu *S. aureus*: po jednom dni skladování na 4,91 $\log \text{KTJ.g}^{-1}$; od 2. dne je patrná stagnace počtu, následně pak pokles, který pokračoval až do konce sledování a dosáhl 3,28 $\log \text{KTJ.g}^{-1}$ (Tab. 7). Při skladování sýru SA I při teplotě 22 °C byla situace obdobná, zvýšení bylo mírné (4,85 $\log \text{KTJ.g}^{-1}$) a od druhého dne klesal počet až na 3,08 $\log \text{KTJ.g}^{-1}$ 10. den (Tab. 7). Průběh poklesu pH byl obdobný jako u sýra SA I, dosažené hodnoty byly ve srovnání s SA I nižší.

Tab. 7. Dynamika změn počtu *S. aureus* ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) a produkce enterotoxinu v sýru SA II v průběhu skladování

Doba skladování sýru (dny)	Teplota skladování sýru/sledované parametry					
	15 °C			22 °C		
	log	pH	SEC	log	pH	SEC
1	4,91	4,73	neg.	4,85	4,7	neg.
2	4,62	4,64	neg.	4,36	4,62	neg.
5	3,75	4,60	neg.	3,41	4,56	neg.
8	3,59	-	neg.	3,43	-	neg.
10	3,28	-	neg.	3,08	-	neg.

log - $\log \text{KTJ.g}^{-1}$; *pH* - aktivní kyselost; *SEC* - stafylokokový enterotoxin C

Produkce SEC nebyla prokázána v žádné fázi výroby sýra SA II, hodnota RFV byla vyhodnocena ve všech případech stanovení jako negativní.

5.1.2 Dynamika změn počtu *S. aureus* a produkce enterotoxinu v sýrech SB

Zaočkování sýrového zrna simulovalo možnost sekundární kontaminace, kdy vstupují do přímého kontaktu se surovinou pracovníci sýrárny při ručním rozhrnování zrna do tvořítek v sýrařské vaně a následně při manipulaci s vylisovanými sýry.

Při přípravě modelových vzorků sýrů SB (SB I a SB II) byla toxinogenním kmenem *S. aureus* zaočkována zpracovaná sýřenina - sýrové zrno - po odloučení části uvolněné syrovátky. Zpracování suroviny do fáze vylisování sýrů bylo tedy oproti sýrům A kratší o dobu sýření a částečného odloučení syrovátky, tedy o 1,5 hodiny. Stejně jako při výrobě sýrů SA, také při výrobě sýrů SB byly použity dvě odlišné dávky startovací kultury pro výrobu sýrů B I (1 %) a sýrů B II (2 %). Další postup výroby byl shodný s výrobou sýrů SA.

Dynamika změn počtu S. aureus a produkce enterotoxinu v sýru SB I

Při pokusech se sýry SB I byl výchozí počet *S. aureus* v sýrovém zrně 3,72 log KTJ.g⁻¹, ve vylisovaném sýru byl zjištěna obdobná dynamika růstu, jako u pokusu se sýry SA, což znamená dosažení 4 log KTJ.g⁻¹ zrna (Tab. 8).

Tab. 8. Dynamika změn počtu *S. aureus* (log KTJ.g⁻¹ resp ml⁻¹) a produkce enterotoxinu v sýru SB I v průběhu výroby

Fáze výroby sýru	Sledované parametry		
	log	pH	SEC
Sýrové zrno	3,72	6,62	neg.
Vylisovaný sýr	4,83	4,88	neg.
Syrovátka	4,85	4,94	neg.

log - log KTJ.ml⁻¹ resp. g⁻¹; pH - aktivní kyselost; SEC - stafylokokový enterotoxin C

O cca 0,25 log řádu se zvýšil počet *S. aureus* při skladování sýru při teplotě 15 °C i 22 °C, po skladování 1 den počet přesáhl hranici 5 log KTJ.g⁻¹, pak již ke zvyšování počtu nedošlo, následoval pokles počtu *S. aureus*. Obdobný pokles počtu, i když v rámci téhož log řádu, byl zjištěn při skladovací teplotě 22 °C, počty však byly (s výjimkou 8. dne) nižší. Hodnota pH se snižovala v závislosti na teplotě skladování až na hodnoty 4,63 a 4,59.

Tvorba toxinu nebyla ani u sýru SB I prokázána, i když počet *S. aureus* přesáhl mírně stanovenou kritickou hodnotu 10⁵ KTJ.g⁻¹ po jednom dni skladování (Tab. 9).

Tab. 9. Dynamika změn počtu *S. aureus* ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) a produkce enterotoxinu v sýru SB I v průběhu skladování

Doba skladování sýru (dny)	Teplota skladování sýru/sledované parametry					
	15 °C			22 °C		
	log	pH	SEC	log	pH	SEC
1	5,04	4,79	neg.	5,00	4,76	neg.
2	4,87	4,71	neg.	4,83	4,65	neg.
5	4,41	4,63	neg.	4,26	4,59	neg.
8	3,68	-	neg.	3,74	-	neg.
10	2,93	-	neg.	2,58	-	neg.

log - $\log \text{KTJ. g}^{-1}$; pH - aktivní kyselost; SEC - stafylokokový enterotoxin C

Dynamika změn počtu *S. aureus* a produkce enterotoxinu v sýru SB II

Jak je patrné z Tab. 10, v sýru SB II byl výchozí počet *S. aureus* v sýrovém zrnu 3,68 $\log \text{KTJ.g}^{-1}$. Po vylisování sýru bylo zjištěno zvýšení počtu *S. aureus* na 4,57 $\log \text{KTJ.g}^{-1}$. To je ve srovnání se sýrem SA II v této fázi výroby obdobné. Hodnota pH sýru byla vyšší.

Tab. 10. Dynamika změn počtu *S. aureus* ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$ resp. ml^{-1}) a produkce enterotoxinu v sýru SB II v průběhu výroby

Fáze výroby sýru	Sledované parametry		
	log	pH	SEC
Sýrové zrno	3,68	6,72	neg.
Vylisovaný sýr	4,57	4,82	neg.
Syrovátka	4,68	4,78	neg.

log - $\log \text{KTJ.ml}^{-1}$ resp. g^{-1} ; pH - aktivní kyselost; SEC - stafylokokový enterotoxin C

Z Tab. 11 vyplývá, že po jednom dni skladování sýru při teplotě 15 °C se zvýšil počet *S. aureus* na 4,83 $\log \text{KTJ.g}^{-1}$, pokles byl zjištěn pak 2. den a poté až do konce skladování byl počet v 3 \log řádu KTJ.g^{-1} . Při skladovací teplotě 22 °C byl po jednom dni skladování zjištěn počet *S. aureus* 4,79 $\log \text{KTJ.g}^{-1}$. Počet 4 $\log \text{KTJ.g}^{-1}$ byl zjištěn i 2. den skladování. Poté následoval pokles, ke konci skladování téměř o 2 \log řády, až k hodnotě 2,82 $\log \text{KTJ.g}^{-1}$. Při teplotě 22 °C byly stanoveny mírně nižší počty *S. aureus* a nižší hodnoty pH, než při teplotě 15 °C. Průběh kysání odpovídal průběhu u sýru SA II. Tvorba enterotoxinu nebyla ani u sýru SB II prokázána.

Tab. 11. Dynamika změn počtu *S. aureus* ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) a produkce enterotoxinu v sýru SB II v průběhu skladování

Doba skladování sýru (dny)	Teplota skladování sýru/sledované parametry					
	15 °C			22 °C		
	log	pH	SEC	log	pH	SEC
1	4,83	4,7	neg.	4,79	4,64	neg.
2	4,49	4,61	neg.	4,40	4,56	neg.
5	3,99	4,59	neg.	3,78	4,48	neg.
8	3,76	-	neg.	3,36	-	neg.
10	3,34	-	neg.	2,82	-	neg.

log - $\log \text{KTJ.g}^{-1}$; *pH* - aktivní kyselost; *SEC* - stafylokokový enterotoxin C

5.1.3 Dynamika změn počtu *S. aureus* a produkce enterotoxinů ve srovnávacích vzorcích A a B

Vzhledem k tomu, že růst *S. aureus* je při výrobě sýrů inhibován vyšší kyselostí (nižší hodnotou pH) působením enzymů startovací kultury a/nebo produkcí baktericinů, je nutné porovnání se situací ve vzorcích srovnávacích, „sýrech“ A a B, vyrobených bez přídavku startovací kultury - smetanového zákysu. Vzorky A a B se od sebe lišily fází, ve které byl *S. aureus* zaočkován (stejně jako vzorky SA a SB). Pro porovnání intenzity růstu a produkce toxinů byly tyto vzorky skladovány a vyšetřeny stejně jako vzorky SA a SB.

Dynamika změn počtu S. aureus a produkce enterotoxinu ve srovnávacím vzorku A

Srovnávací vzorek A (zaočkování do pasterovaného mléka) vykazoval v mléce na začátku sledování počet *S. aureus* $3,58 \log \text{KTJ.ml}^{-1}$. Při porovnání získaných hodnot počtu *S. aureus* s hodnotami získanými při vyšetření sýrů SA a SB je patrné, že růst *S. aureus* ve srovnávacím vzorku byl za stejných teplotních a časových podmínek intenzivnější. Ve vzorku nedošlo v době sýření k významnému zvýšení počtu *S. aureus* (pouze v rámci log řádu 3), ale po vylisování sýrů a odloučení části syrovátky již byly zjištěny počty v řádu $5 \log \text{KTJ.g}^{-1}$, tedy o cca 0,5 řádu vyšší, než bylo zjištěno u sýrů SA a SB v této fázi výroby a o 1,5 řádu vyšší, než v zaočkovaném mléce na začátku pokusu (Tab. 12).

Tab. 12. Dynamika změn počtu *S. aureus* ($\log \text{KTJ.ml}^{-1}$ resp g^{-1}) a produkce enterotoxinu ve srovnávacím vzorku A v průběhu výroby

Fáze výroby sýru	Sledované parametry		
	log	pH	SEC
Pasterované mléko	3,58	6,72	neg.
Sýrové zrno	3,72	6,70	neg.
Vylisovaný sýr	5,04	6,60	neg.

log - $\log \text{KTJ.ml}^{-1}$ resp. g^{-1} ; pH - aktivní kyselost; SEC - stafylokokový enterotoxin C

Diferenciace počtu *S. aureus* pak byla patrná u skladovaných při odlišných teplotách. Ve vzorku A po jednom dni skladování došlo ke zvýšení počtu *S. aureus* o 1 log řád ($6 \log \text{KTJ.g}^{-1}$), po dvou dnech při skladování při teplotě $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ byl zjištěn počet v řádu $7 \log \text{KTJ.g}^{-1}$, od 5. dne skladování je patrný pokles a 10. den byl zjištěn počet $4,50 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. U vzorku skladovaného při $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ byl zjišťován vyšší počet *S. aureus* ve srovnání se vzorkem skladovaným při $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, po dvou dnech $7,91 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. Zde byl tedy vliv příznivější - vyšší - teploty pro růst *S. aureus* prokázán, rozdíly byly statisticky významné ($P=0,05$). 5. den skladování byl zjištěn již pokles počtu ($7,00 \log \text{KTJ.g}^{-1}$), ke konci až na $4,58 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ (Tab. 13).

Kyselost vzorků se v průběhu pěti dní skladování výrazně nezvýšila (šlo výhradně o sladké srážení). Počáteční kyselost mléka byla $6,72 \text{ pH}$ a bylo dosaženo při $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ $6,30 \text{ pH}$ a při $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ $6,18 \text{ pH}$ (Tab. 13).

Tab. 13. Dynamika změn počtu *S. aureus* ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) a produkce enterotoxinu ve srovnávacím vzorku A v průběhu skladování

Doba skladování sýru (dny)	Teplota skladování sýru/sledované parametry					
	$15\text{ }^{\circ}\text{C}$			$22\text{ }^{\circ}\text{C}$		
	log	pH	SEC	log	pH	SEC
1	6,46	6,56	neg.	6,89	6,49	neg.
2	7,11	6,48	neg.	7,91	6,42	poz.
5	6,48	6,30	poz.	7,00	6,18	poz.
8	5,79	-	poz.	6,11	-	poz.
10	4,50	-	poz.	4,58	-	poz.

log - $\log \text{KTJ.g}^{-1}$; pH - aktivní kyselost; SEC - stafylokokový enterotoxin C

Produkce SEC byla zaznamenána. I když byl počet *S. aureus* v řádu 5 log KTJ.g⁻¹ překročen již po vylisování sýrů a v řádu 7 log KTJ.g⁻¹ po dvou dnech skladování, produkce SEC byla zjištěna při skladování při teplotě 15 °C až po pěti dnech (RFV 541). RFV se dále zvýšila na 723 a 968. Při teplotě 22 °C po 2 dnech skladování, tedy v době, kdy již počet *S. aureus* klesal, byla hodnota RFV 705 a dále vzrůstala na 2459, 4222 a 5224 (Obr. 4). I když byl počet *S. aureus* při skladování již klesající, hodnota RfV se zvyšovala.

Dynamika změn počtu S. aureus a produkce enterotoxinu ve srovnávacím vzorku B

U srovnávacího vzorku B byl *S. aureus* zaočkován do sýřeniny - zrna po odloučení části syrovátky. Doba přítomnosti *S. aureus* byly tedy oproti vzorku A zkrácena o dobu sýření. Oproti výchozímu počtu 3,58 log KTJ.g⁻¹ došlo ke zvýšení počtu na 5,0 log KTJ.g⁻¹ (Tab. 14).

Tab. 14. Dynamika změn počtu S. aureus (log KTJ.g⁻¹) a produkce enterotoxinu ve srovnávacím vzorku B v průběhu výroby

Fáze výroby sýru	Sledované parametry		
	log	pH	SEC
Sýrové zrno	3,58	6,70	neg.
Vylisovaný sýr	5,00	6,62	neg.

log- log KTJ.g⁻¹; pH - aktivní kyselost; SEC - stafylokokový enterotoxin C

Při skladování vzorku B při teplotě 15 °C byl po jednom dni počet *S. aureus* zvýšen cca o 1,5 log řádu, po dvou dnech byl zjištěn počet v řádu 7 log KTJ.g⁻¹, dále následoval pokles počtu *S. aureus* až na 4,32 log KTJ.g⁻¹. Při skladování při 22 °C byl růst *S. aureus* intenzivnější, po jednom dni se zvýšil téměř o 2 log řády, maximální počet byl dosažen po dvou dnech (7,81 log KTJ.g⁻¹), následoval pokles až na 4,70 log KTJ.g⁻¹. Aktivní kyselost za pět dní skladování poklesla z 6,70 pH při 15 °C pouze na 6,28 pH a při 22 °C na 6,19 pH (Tab. 15).

Výsledky u srovnávacích vzorků vypovídají o významu skladovací teploty a vlivu příznivější teploty pro růst *S. aureus*.

Tab. 15. Dynamika změn počtu *S. aureus* (\log KTJ. g^{-1}) a produkce enterotoxinu ve srovnávacím vzorku B v průběhu skladování

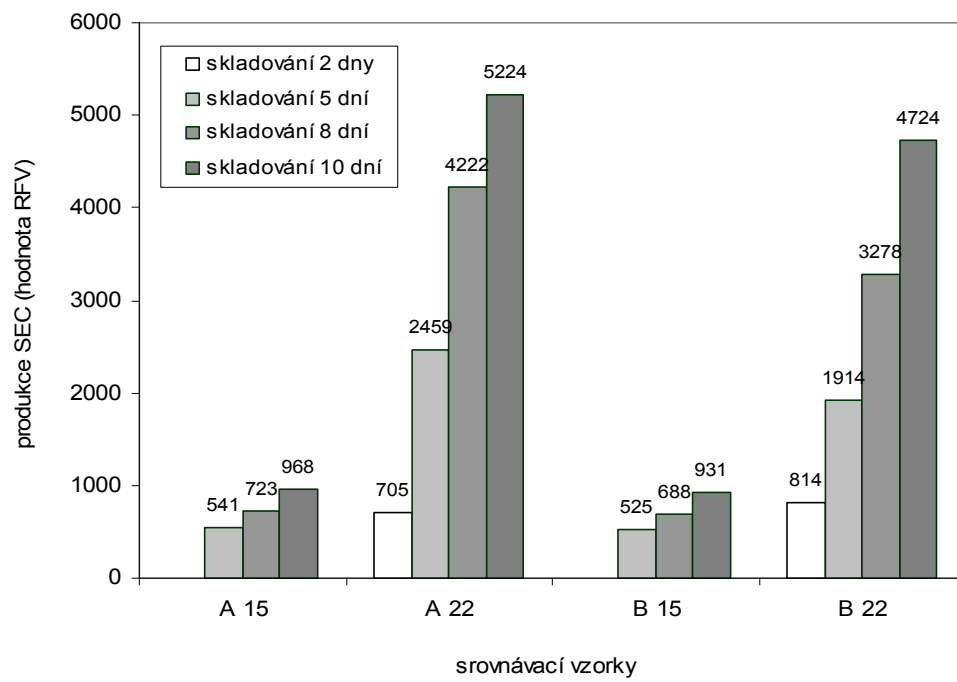
Doba skladování sýru (dny)	Teplota skladování sýru/sledované parametry					
	15 °C			22 °C		
	log	pH	SEC	log	pH	SEC
1	6,40	6,56	neg.	6,92	6,50	neg.
2	7,00	6,48	neg.	7,81	6,41	poz.
5	6,46	6,28	poz.	6,91	6,19	poz.
8	5,85	-	poz.	6,34	-	poz.
10	4,32	-	poz.	4,70	-	poz.

log - \log KTJ. g^{-1} ; *pH* - aktivní kyselost; *SEC* - stafylokokový enterotoxin C

Produkce SEC byla prokázána u vzorků skladovaných při teplotě 15 °C až při odběru vzorků po 5. dnech skladování (RFV 525), i když počet *S. aureus* v 5 \log KTJ. g^{-1} byl dosažen po vylisování sýra. Po 1. dni skladování byl překročen 6 \log KTJ. g^{-1} a po dvou dnech 7 \log KTJ. g^{-1} . RVF se zvyšovala na 688 (8. den) a 10. den skladování, kdy již poklesl počet na 4 \log KTJ. g^{-1} dosáhla 931. Při skladování při 22 °C byl SEC prokázán dříve, po dvou dnech skladování (RFV 814). Hodnoty RVF stoupaly při již klesajícím počtu *S. aureus* (5. den 1914, 8. den 3278) a dosáhly maxima 10. den - 4724 (Obr. 4).

Z rozdílu růstu *S. aureus* i z rozdílu hodnot RVF vyplývá vliv skladovací teploty. V případě vzorků A (A15 : A22) i B (B15 : B22) byly stanoveny významné rozdíly ($P=0,05$) mezi vzorky skladovanými při 15 a 22 °C, a to při porovnání počtu *S. aureus* i při porovnání hodnot RVF (produkci toxinů)

Rozdíly hodnot mezi vzorky A15 : B15 a A22 : B22 byly hodnoceny jako nevýznamné.



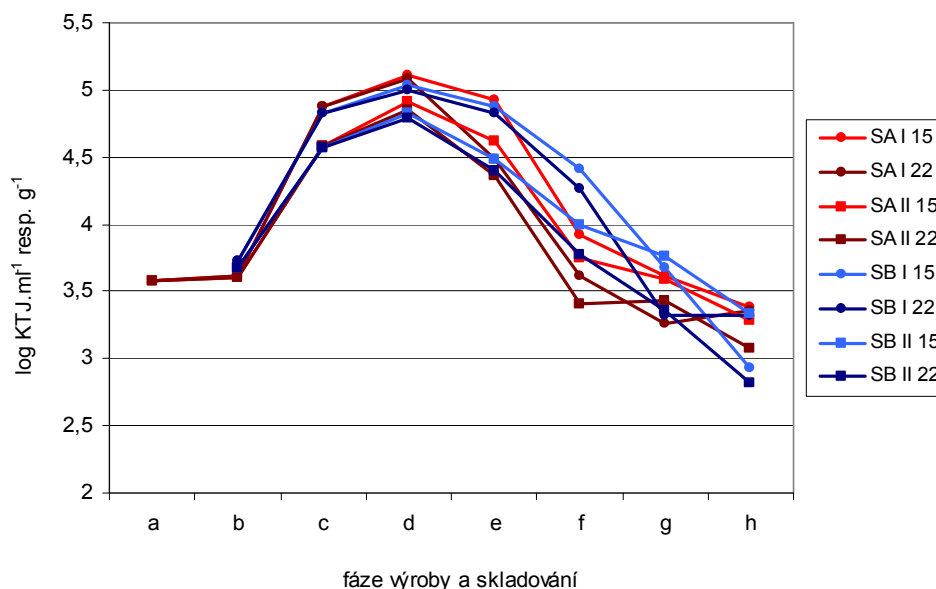
Obr. 4. Hodnota RFV (produkce SEC) ve srovnávacích vzorcích

5.2 Vyhodnocení výsledků a diskuze

Růst *S. aureus* a produkce stafylokokových enterotoxinů v potravinách jsou závislé na celé řadě vlivů, jako je individualita kmene, teplota, pH, ale také úroveň počáteční kontaminace a aktivita vody [18]. Vliv má i použitý technologický postup výroby. Růstové a produkční podmínky a je ovlivňující faktory je nutno vždy hodnotit současně. Pokusy byly některé z těchto vlivů v menší či větší míře potvrzeny. Zjištěné výsledky jsou vztaženy ke kritické hodnotě 10^5 KTJ.ml⁻¹ resp. g⁻¹ uvedené legislativou [43, 44] a porovnány u vzorků vzájemně.

5.2.1 Vliv fáze zaočkování na růst *S. aureus* a produkci enterotoxinu v sýrech

Při hodnocení vlivu výrobní fáze, kdy došlo k zaočkování (SA - do pasterovaného mléka; SB - do sýrového zrna), na růst *S. aureus*, byly sice zjištěny mírné rozdíly v počtu *S. aureus*, tyto však nebyly statisticky významné. Také při srovnání vzorků A a B nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v počtech *S. aureus*, který by vyplynul s odlišné fáze zaočkování. Jak je patrné z Obr. 5, byly při výrobě sýrů zjišťovány podobné hodnoty, což souvisí s fází růstu buněk. Mezi oběma způsoby kontaminace byl malý časový rozdíl (1,5 hodiny), proto bylo zjištěno po sýření zvýšení počtu *S. aureus* oproti počátečnímu stavu jen v rámci výchozího řádu (3 log KTJ. ml⁻¹ resp. g⁻¹).



a - mléko, b - sýrové zrnko, c - vylisovaný sýr, d - sýr skladovaný 1 den, e - sýr skladovaný 2 dny, f - sýr skladovaný 5 dní, g - sýr skladovaný 8 dní, h - sýr skladovaný 10 dní

Obr. 5. Srovnání dynamiky změn počtu *S. aureus* u vzorků SA a SB

Ke zvýšení počtu *S. aureus* o téměř 1 log řád došlo až ve fázi lisování sýrů ($4 \log \text{KTJ.g}^{-1}$), které probíhalo 18 hodin. U vzorků SB byly zjištěny počty mírně nižší, což může vypovídat o určitém, byť v tomto případě nevýznamném, vlivu okamžiku zaočkování.

Při masivní kontaminaci sýrů či výrobě sýrů ze syrového mléka by mohlo již při lisování sýrů být dosaženo počtu *S. aureus* kritického pro tvorbu SEs (10^5KTJ.g^{-1}), ovšem i kdyby se toxiny začaly tvořit již v této fázi, unikaly by ve větší či menší míře s odkapávající syrovátkou. SEs jsou proteiny s krátkým polypeptidovým řetězcem, které jsou rozpustné ve vodě a fyziologickém roztoku [20]. Po oddělení syrovátky vylisovaných sýrů a před solením sýrů byl i jinými autory zjištěn výrazný pokles hodnoty RFV, tedy snížení množství SEs ve výrobku [107]. Z tohoto důvodu by se jevila závažnější kontaminace již vylisovaných sýrů, než kontaminace těsně po pasteraci či zrna před lisováním, na druhou stranu, právě v průběhu lisování může být produkce toxinu již zahájena.

Ve fázi skladování došlo u všech vzorků SA i SB po jednom dni ke zvýšení počtu *S. aureus*, dokonce přesahující kritickou hranici 10^5KTJ.g^{-1} . Při dalším skladování bylo zaznamenáno snižování počtu až na $3 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ resp. $2 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. Dosažený log řád ovšem může být při použití jiných kmenů *S. aureus* i vyšší. Z našich pokusů vyplývá, že nejkritičtějšími fázemi v technologickém procesu výroby sýrů je fáze lisování a počátek skladování při daných teplotách.

V průběhu procesu výroby sýrů však jinými autory byla zjištěna hodnota vyšší, až $3,2 \cdot 10^6 \text{KTJ.g}^{-1}$, a to dokonce při nižších teplotách skladování [107], než byly použity v pokusu.

Produkce SEC nebyla v žádném z vzorků SA a SB zaznamenána, RFV byly vyhodnoceny vždy jako negativní. První fází výroby, kde byly jinými autory zjištěna produkce SEs (konkrétně SEA) byla fáze lisování, již 7 hod po zaočkování pasterovaného mléka, kdy počet *S. aureus* dosahoval hodnot $4,3 \cdot 10^5 \text{KTJ.g}^{-1}$, což potvrzuje mj. i vliv kmene *S. aureus*. Rychlost tvorby stafylokokových enterotoxinů je rozdílná a je výrazně závislá na konkrétních kmenech *S. aureus*. Při sledování produkce SEA, SEB a SEC v průběhu výroby čerstvých sýrů z kravského mléka byl pozitivní průkaz SEs zjištěn pouze při použití toxinogenního kmenu SA1185, nikoliv u kmenů SB a SC, což potvrzuje i vliv typu produkovaného enterotoxinu [107].

5.2.2 Vliv startovací kultury na růst *S. aureus* a produkci enterotoxinu v sýrech

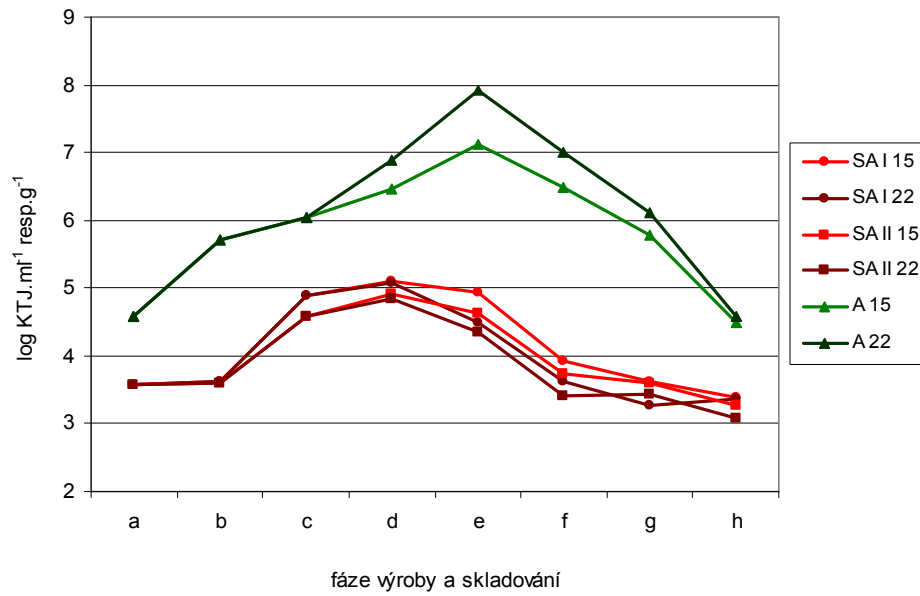
Pokusy byl potvrzen vliv startovací mlékařské kultury na růst *S. aureus* i produkci SEs. Po odkapání syrovátky, tz. ve fázi vyrobeného vylisovaného sýru se oproti pasterovanému mléku, cca po 18. hodinách, sice zvýšil počet *S. aureus* o 1 log řád, ale začaly se uplatňovat mikrobiální překážky vytvořené právě působením startovací kultury, a to snižující se pH sýru. To bylo příčinou jen nepříliš výrazného zvýšení počtu *S. aureus*. Teoreticky nelze vyloučit také produkci bakteriicínů bakteriemi mléčného kvašení startovací kultury.

Rozdíly v počtu *S. aureus* byly zjištěny při porovnání sýrů I a II, tedy s přidavkem startovací kultury v množství 1 % a 2 % na objem mléka. Startovací kultura ovlivnila růst *S. aureus* již ve fázi lisování a na počátku skladování. Při použití nižší koncentrace startovací kultury (1 %) byly u všech vzorků I (SA I : SA II a SB I : SB II) zjištěny vyšší počty *S. aureus* (obr. 5). Tyto rozdíly však nebyly statisticky významné. Použití startovací kultury v koncentraci 1 % se tedy jevilo jako dostačující. Rizikem by bylo nedostatečné prokysání sýru (např. při použití málo aktivní kultury) ve fázi lisování, kdy by mohlo, zvláště při větší kontaminaci, dojít k pomnožení *S. aureus* a produkci toxinů a následně, i při úbytku *S. aureus*, k enterotoxikóze.

Při skladování vzorků byl pokles počtu *S. aureus* u vzorků SAII a SB II oproti SA I a SB I zpočátku intenzivnější, od poloviny doby skladování nebyl shledán rozdíl, tzn. vliv vyšší použité koncentrace SK se v této fázi již neuplatnil.

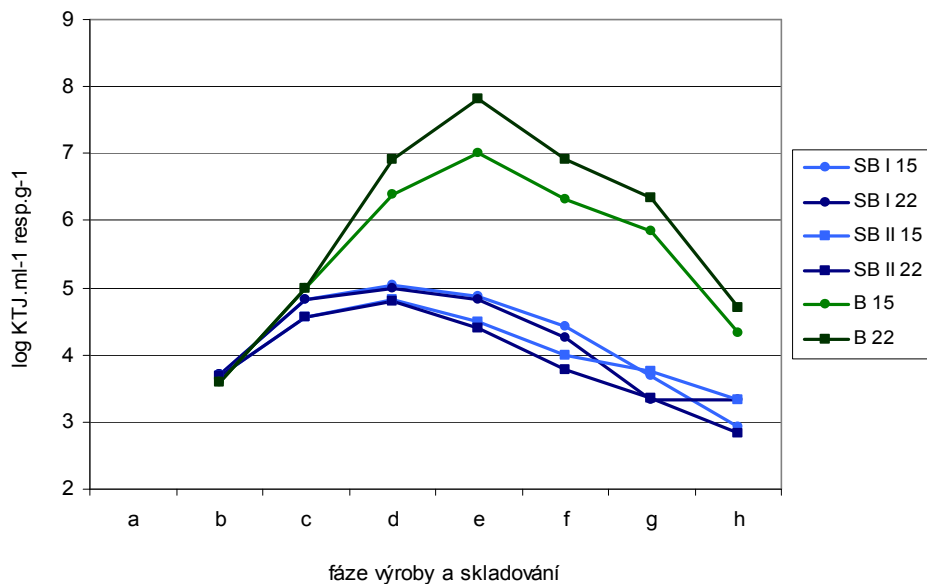
Situace s růstem *S. aureus* a produkcí SEC ve vzorcích SA a SB byla zcela odlišná v porovnání se situací při modelové kontaminaci srovnávacích vzorků. (Obr. 6 a Obr. 7). U vzorků A a B (zaočkování *S. aureus* do mléka či zrna zpracovaného bez přidavku startovací kultury) se jednalo o výhradně sladké srážení a v této sražené hmotě se neuplatnily mikrobiální překážky vytvořené činností bakterií mléčného kvašení - zvýšená kyselost, případně působení bakteriocínů.

Srovnávací vzorky také zadržely více tekutiny (příznivý vliv vyšší aktivity vody pro růst *S. aureus*). Růst počtu *S. aureus* ve vzorcích A a B byl intenzivní, nebyl omezen a docházelo k němu jen v závislosti na skladovací teplotě (viz dále). Ve fázi lisování byly zjištěny počty *S. aureus* v řádu $5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, po 1 dni skladování $6 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ a dále $7 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, od 5. dne docházelo k úbytku *S. aureus* až na počty v řádu $4 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Na konci skladování vzorky již velmi nepříjemně zapáchaly (sýrovitě-hnilobný pach).



a - mléko, b - sýrové zrno, c - vylisovaný sýr, d - sýr skladovaný 1 den, e - sýr skladovaný 2 dny, f - sýr skladovaný 5 dní, g - sýr skladovaný 8 dní, h - sýr skladovaný 10 dní

Obr. 6. Srovnání dynamiky změn počtu *S. aureus* u vzorků SA a A



a - mléko, b - sýrové zrno, c - vylisovaný sýr, d - sýr skladovaný 1 den, e - sýr skladovaný 2 dny, f - sýr skladovaný 5 dní, g - sýr skladovaný 8 dní, h - sýr skladovaný 10 dní

Obr. 7. Srovnání dynamiky změn počtu *S. aureus* u vzorků SB a B

Při porovnání vzorků sýrů se vzorky srovnávacími, tedy SA : A a SB : B, byl při obou skladovacích teplotách stanoven statisticky významný rozdíl ($P=0,05$).

U sýrů zaočkovaných nižší dávkou zákyso (SA I a SB I) bylo dosaženo počtu *S. aureus* v řádu $5 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ (velmi mírně překročení), produkce SEC však nebyla zaznamenána, resp. RFV bylo vyhodnoceno jako negativní.

Produkce SEC ve srovnávacích vzorcích byla naproti tomu zaznamenána (oproti vzorkům SA a SB statisticky vysoce významný rozdíl, $P=0,01$), zároveň s intenzivnějším růstem *S. aureus*, a to až při dosažení počtu $7 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. K produkci tedy došlo při počtech mezi $6 - 7 \log \text{KTJ.g}^{-1}$, zatímco v sýrech SA a SB tohoto počtu ani dosaženo nebylo. Hodnota RFV u vzorků A a B byla vyhodnocena jako pozitivní a pohybovala se v průběhu skladování v závislosti na skladovací teplotě (viz dále) až k hodnotě RFV 5224. Ke zvyšování hodnoty RVF docházelo při současném snižování počtu *S. aureus*. Z počtů *S. aureus* stanovených v době, kdy byla produkce SEC zaznamenána, je patrné, že použitý kmen *S. aureus* nevykazoval nijak intenzivní produkci enterotoxinu, zvláště při 15°C . Z tohoto zjištění ale také vyplývá možnost, že kdyby se počet *S. aureus* v sýrech zvýšil do těchto hodnot, byla by produkce toxinů reálná, a závisela by na dosažené kyselosti.

V literatuře jsou uváděny pro produkci SEs i nižší počty *S. aureus*, než legislativou dané jako kritické. Počty *S. aureus* v rozmezí již $10^3 - 10^5 \text{KTJ.g}^{-1}$ mohou vyprodukovat takové množství enterotoxinu, které už může představovat pro konzumenta riziko [42]. Problém je navíc v tom, že životaschopné buňky *S. aureus* nemusejí být v potravině detekovány, protože byly usmrceny některým z technologických kroků v průběhu výroby, ale stafylokokové enterotoxiny, které byly již naprodukovány, se těmito postupy nezničí a v potravině zůstávají. Příkladem je epidemie stafylokokové enterotoxikózy v Japonsku v roce 2000, kdy zdrojem SEs bylo sušené mléko vyrobené z pasterovaného mléka [108].

Množení mikroorganismů i produkce SEs závisí nejen na vnějších faktorech (teplota), ale velmi významný vliv mají i faktory vnitřní - např. hodnota pH. Růst *S. aureus* i produkce toxinů je omezena nízkou hodnotou pH v průběhu lisování a dále skladování sýrů, která souvisí s rozvojem startovací kultury - bakteriemi mléčného kvašení. Optimální kyselost je pro většinu mikroorganismů mezi 6 - 7 pH, přičemž *S. aureus* může růst v rozsahu 4 - 9,8 pH [109]. V našem pokusu se pH pohybovalo kolem 4,80 - 4,88 v době lisování sýrů, v době skladování kolísalo, mělo však klesající tendenci, až k hodnotě 4,60, zatímco u srovnávacích vzorků byly změny pH malé (snížení z 6,70 - 6,72 na hranici pH 6,18).

Bakterie mléčného kvašení jsou významnou skupinou mikroorganismů v sýrech a jsou schopny tlumit růst *S. aureus* [103]. Přídavek čistých mlékařských kultur do mléka před sýřením je nutnou zárukou zdárného průběhu celého technologického procesu. Výsledkem enzymatické činnosti kyselinotvorných bakterií je produkce kyselin, zvláště kyseliny mléčné z disacharidu mléka laktózy a jejích složek, glukózy a galaktózy, případně z kyseliny citronové, která je nativně přítomna v mléce. Bakterie kyseloty se účastní i vlastního zrání sýrů pomocí svých proteolytických enzymů při štěpení bílkovin a konverzi vzniklých aminokyselin na aromatické a chuťové látky sýra. Za kyselinotvorné se považují bakterie mléčného kvašení, které mají schopnost produkovat v mléce při 30 - 37 °C za 6 hodin tolik kyseliny mléčné, která sníží kyselost mléka z původního pH asi 6,87 na hodnotu nižší, než 5,3. *S. aureus* se rozmnožuje i na začátku kysání sýrů. Jeho rozmnožování a potenciální tvorba toxinů jsou inhibovány zvyšující se kyselostí. Rozmnožování *S. aureus* je inhibované při hodnotách pH 4,5 až 4,8, ale dříve, již při 5,2 pH, se zastaví tvorba toxinů [109].

Při posouzení rizika možného výskytu *S. aureus* v jednotlivých typech sýrů byl v případě čerstvých sýrů jako inhibičně působící faktor jeho růstu stanoven obsah kyseliny mléčné, a dosažení hodnoty pH nižší, než 5,2 [99].

Stejně tak je pH limitována i tvorba toxinů. Při hodnotě pH nižší než 4,7 nejsou SEs produkovány [110].

V sýrech SA a SB bylo nízké pH významným omezujícím faktorem, zatímco ve vzorcích A a B se uplatnit nemohlo. Srovnávací vzorky připravené výhradně sladkým srážením mléka (syřidlovým) bez přídavku ČMK odpovídaly, co se týká změn pH, průběhu změn v pasterovaném mléku. Pasterované mléko je dobrým substrátem pro produkci enterotoxinu. Bylo zjištěno, že se SEC vytvořil v měřitelném množství v mléce inkubovaném při teplotě 15 °C za 48 hodin inkubace, při teplotě 22 °C již po 24 hodinách skladování při zjištění 7,08 log KTJ.g⁻¹. V syrovém mléce, ve srovnání s pasterovaným mlékem, byl růst *S. aureus* výrazně omezen a k produkci SEC nedošlo [111]. Příčinou tohoto inhibičního efektu je přítomnost přirozené mikroflóry syrového mléka, především bakterií mléčného kvašení, která může interakcí zabránit růstu *S. aureus* a tím produkci enterotoxinů [112; 113].

Při výrobě sýrů se uplatňuje pozitivně startovací kultura působením proti produkci SEs. Při hodnocení vlivu startovací kultury obsahující laktokoky a laktobacily na růst *S. aureus*

bylo zjištěno, že po přidání kultury do mléka při výrobě sýrů vzrostl v období 5 až 10 dnů počet *Staphylococcus aureus* nad $6 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, ale enterotoxiny nebyly zjištěny [114].

Ve Švédsku byla zjištěna vysoká frekvence nálezu *S. aureus* v syrovém mléce a čerstvých sýrech vyrobených na farmách a v mlékárnách. U 70 % izolátů byl stanoven jeden či více genů pro produkci toxinů, nejčastěji *sec* a *sea*. Počty *S. aureus* však byly výrazně nižší, když byly použity startovací kultury. Proto je pro zvýšení bezpečnosti sýrů podmínkou využití startovací kultury a doporučeno monitorování procesu mléčného kysání a detekce produkce toxinů [115].

Z kravského, kozího a ovčího mléka zaočkováného kmenem *S. aureus* S6, který je považován za silného producent enterotoxinu B a slabého producenta enterotoxinu A, byly vyrobeny sýry typu Manchego. Při výrobě byly použity dvě koncentrace startovací kultury (1 % a 0,1 %). Růst stafylokoků byl pozorován v obou případech, ale výraznější byl v případě použití nižší koncentrace. SEB nebyl zjištěn v žádné fázi zrání všech testovaných sýrů, SEA zjištěn byl, a to při použití obou koncentrací startovacích kultur [110].

Nejen samotné startovací kultury (pH), ale i jejich produkty jsou schopny produkci SEs omezit. Tento ochranný potenciál představují bakteriociny. Byla sledována produkce bakteriocinů, které produkovaly bakterie mléčného kvašení přirozeně se vyskytující v tradičních sýrech. Metodikou pokusu byl vyloučen inhibiční vliv kyseliny mléčné. Přítomnost genů pro produkci bakteriocinů s potenciální protistafylokokovou aktivitou byla prokázána ve dvou slovinských tradičních sýrech vyrobených ze syrového mléka, „Tolminc“ a „Kraski ovčji sir“. Stejně bakteriocinové geny byly rovněž zjištěny u bakterií mléčného kysání. Cílem výzkumu bylo objasnit, zda tyto „sýry“, v nichž byly geny pro produkci bakteriocinů zjištěny, ve skutečnosti také vykazují protistafylokokovou aktivitu v mléce a v sýru. V mléce v průběhu teplotně-časového režimu výroby tradičních sýrů bylo zjištěno, že je efektivně inhibován růst *S. aureus* v rozsahu cca 2 až 3 log, v sýru inhibice stafylokoků byla méně výrazná, ale přesto evidentní, bylo zjištěno snížení o 1,5 log [103].

5.2.3 Vliv teploty skladování na růst *S. aureus* a produkci enterotoxinu v sýrech

S. aureus roste v rozsahu teplot 7,0 - 47,8 °C [31]. I když je *S. aureus* považován za mezofilní mikroorganismus, některé kmeny mohou růst při teplotách nižších, než 6,7 °C [5].

Z pokusu vyplynulo, že teplota má vliv na růst i produkci SEs. Při srovnání počtu *S. aureus* při skladování vzorků byl v průběhu 10 dní zjišťován ovšem nižší počet při skladovací teplotě 22 °C, než při 15 °C, i když tento rozdíl nepřesáhl 0,5 log řádu a nebyl statisticky významný.

I když je teplota skladování blízcí se optimální teplotě pro růst mikroorganismů a produkci jejich toxinů výhodnější, v našich pokusech se tento fakt uplatnil částečně. Teplota 22 °C se sice více blíží optimu teploty růstu i produkci SEs, zároveň je to zcela optimální teplota pro rozvoj bakterií mléčného kysání, které jsou pro *S. aureus* v sýrech se vyskytujících konkurenční a i jinými mechanismy tlumí jejich růst i produkci SEs. Pokles počtu *S. aureus* byl zpočátku skladování při 22 °C rychlejší a konečné počty nižší, než při 15 °C.

Výrazný vliv skladovací teploty byl však potvrzen při srovnání vzorků SA a SB se vzorky A a B, kde nebyl růst omezen startovací kulturou. Výsledky srovnávacích vzorků jednoznačně vypovídají o kladném vlivu příznivější teploty pro růst *S. aureus*.

Stafylokokové enterotoxiny jsou produkovány při teplotě mezi 10 - 46 °C, optimum je mezi 40 - 45 °C, při teplotě pod 10 °C již produkovány nejsou [31; 32].

Produkce toxinů byla v souvislosti se zvyšujícím se počtem *S. aureus* po lisování a v prvních dnech skladování u vzorků A a B zaznamenána v závislosti na skladovací teplotě. RFV se pohybovala v průběhu skladování při 15 °C mezi 5. - 10. dnem v hodnotách 541-968, a při skladování při 22 °C mezi 2. - 10. dnem v hodnotách 705-5224 (hodnoceny vzorky A a B současně). Rozdíl v produkci SEC při porovnání vzorků A15 : A22 a B15 : B22 byl vyhodnocen jako statisticky významný ($P=0,05$), při porovnání vzorků A15 : B15 a A22 : B22 jako nevýznamný.

Mléčné výrobky se skladují při teplotě 4 - 8 °C [116] a při nesprávném režimu skladování, případně při přerušení chladicího řetězce, může v potravině dojít k pomnožení bakterií *S. aureus* a již při počtech 10^5 KTJ.g⁻¹ potraviny může vytvořené množství enterotoxinů představovat zdravotní riziko pro člověka [24]. Při skladování při horní hranici uváděné normou pro skladování mléčných výrobků byl růst a produkce SEs v sýrech prokázán (SEA) [107].

5.2.4 Zhodnocení vhodnosti použité metody detekce stafylokokových enterotoxinů

V pokusu použitá metoda detekce SEs byla využita a hodnocena i jinými autory. Byly provedeny testy za účelem zjištění vlivu množství inokula *S. aureus* a výrobních postupů u zrajících sýrů typu Camembert ze syrového kozího mléka na růst *S. aureus*, a za účelem zjištění výskytu stafylokokového enterotoxinu (SEA) v těchto sýrech. Počáteční hodnoty počtu *S. aureus* inokulovaného na začátku výrobního procesu byly 2 až 6 log KTJ.ml⁻¹ mléka, sýr byl připraven podle výrobní normy a zrál 41 dní. K detekci enterotoxinů byl použit test SET miniVIDAS[®] a nepřímé dvojité sendvičové technice ELISA s použitím antienterotoxinové monoklonální protilátky. Bylo zjištěno, že počet mikroorganismů vzrostl ve stejné míře při výrobě všech sýrů až do fáze solení. V období zrání sýrů byly počty *S. aureus* stabilní, na konci zrání v porovnání se počtem po 22 hodinách byla zjištěna redukce počtu *S. aureus* o 1 log řád u sýrů s počáteční inokulací *S. aureus* vyšší, než 10³ KTJ.ml⁻¹. U sýrů vyrobených s počátečním inokulem *S. aureus* 10³ - 10⁶ KTJ.ml⁻¹ bylo množství stafylokokového enterotoxinu A v rozsahu 1,0 - 3,2 ng.g⁻¹. Žádné stopy SEA nebyly detekovány u sýrů s nejnižším inokulem *S. aureus* [100].

V některých případech však může být produkováno tak malé množství SEs, že je pod detekční mezí použité metody [117]. Některé kmeny *S. aureus* produkují nedetekovatelné množství SEs v laboratorních podmínkách, ale v potravině produkují takové množství SEs, které je pro vznik stafylokokové enterotoxikózy dostačující [118].

Použitá metoda ELFA a použitý VIDAS SET 2 na přístroj miniVIDAS[®] (bioMérieux, France) je vhodný pro zjištění produkce stafylokokových enterotoxinů (SEA - SEE) v potravinách. Nevýhodou ale je, že SEs přítomné ve vzorku jsou detekovány jako suma a přístroj určí pouze jejich přítomnost či nepřítomnost. Nelze vyvodit, který typ SE je ve vzorku přítomen, pokud není, jako v naší práci, vyšetřován kmen s produkcí určitého, již ověřeného typu SE. Výrobce testu deklaruje citlivost pro SEA a SEB 0,5 ng.g⁻¹ potravin a pro SEC - SEE 1,0 ng.g⁻¹ potravin. Pro SED je detekční limit u některých potravin vyšší, než 1,0 ng.g⁻¹ vzorku potravin. Nevýhodou je také vysoká cena testů.

Pokud je třeba znát, který typ stafylokokového enterotoxinu se v potravině vyskytuje, pak je nutné použít například metodu RPLA (Oxoid, Velká Británie). Citlivost této metody se pohybuje kolem 1 - 2 ng.g⁻¹ (ml⁻¹) vzorku [30].

Výhodná by byla kombinace metod, ovšem ne vždy jsou takto zjištěné výsledky v praxi nutné. Také je třeba zvážit časovou a finanční náročnost vyšetření.

5.2.5 Riziko konzumace kozích sýrů a možnosti jeho eliminace

Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ve znění Nařízení Komise č. 1441/2007 předepisuje limit pro koagulázo-pozitivní stafylokoky v potravinách $10^1 - 10^2$ KTJ.g⁻¹. Při zjištění počtu *S. aureus* > 10^5 KTJ.g⁻¹ je nutné provést další vyšetření na přítomnost stafylokokových enterotoxinů [43, 44].

Předpokladem výroby bezpečných čerstvých kozích sýrů je kvalitní syrové kozí mléko. Významným rizikem je použití mléka s počty *S. aureus* vyššími, než 10^5 KTJ.g⁻¹. Podle údajů literatury se vyskytuje *S. aureus* u více než poloviny vyšetřených vzorků kozího mléka [91]. Legislativou ES (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ve znění Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006) je stanovena limitní hodnota celkového počtu mikroorganismů u nakupovaného syrového kravského mléka $100\,000$ KTJ.ml⁻¹, není tedy reálné, že v syrovém mléce bude bezpečná hranice počtu *S. aureus* překročena [86; 87]. U kozího mléka je situace jiná: limit pro CPM je $1\,500\,000$ KTJ.ml⁻¹, při schválené výrobě kozích sýrů z nepasterovaného mléka pak $500\,000$ KTJ.ml⁻¹. Podle STN 570520/1995 Kozie mlieko je limitní počet *S. aureus* v syrovém kozím mléce $2 \cdot 10^3$ KTJ.ml⁻¹ [77].

Hlavním zdrojem kontaminace kozího mléka je mléčná žláza koz infikovaná *S. aureus*, který je zároveň nejčastějším původcem mastitid [92]. Tento stav by zodpovědný farmář měl včas zaznamenat a mléko z použití k výrobě sýrů vyloučit.

Dalším nepříznivým vlivem je nedodržení daných hygienických požadavků při chovu koz, získávání mléka a jeho uchovávání. Pro mléko kravské platí, že mléko po nadojení je nutné zchladit na teplotu max. $8\text{ }^\circ\text{C}$, při méně častém svozu, než denním, na $6\text{ }^\circ\text{C}$, pokud není zpracováno do 2 hodin po nadojení [86, 87]. Stejně požadavky je třeba dodržet i pro mléko kozí [77]. Na farmách, kde se v České republice mléko většinou na sýry zpracovává, se sýry vyrábějí obvykle každý den, přičemž se zpracuje mléko ze dvou dojení (tj. chlazené večerního dojení a čerstvé z ranního dojení).

Hygienu produkčních hospodářství a syrové kozí mléko je kontrolováno na registrovaných farmách podle stejných požadavků jako mléko kravské, ovšem kontrola na přítomnost patogenních mikroorganismů vč. *S. aureus* běžná není. Vhodným opatřením by bylo vytvoření české normy nebo zařazení limitní hodnoty pro *S. aureus* do příslušné vyhlášky.

Nejvýznamnějším krokem snižujícími počty mikroorganismů, včetně stafylokoků, v surovině, je tepelné ošetření mléka používaného k výrobě sýrů. Podmínky pasterace mlé-

ka jsou dány legislativou: teplota nejméně 72 °C po dobu 15 sekund nebo nejméně 63 °C po dobu 30 minut nebo jakákoliv jiná kombinaci teploty a času vedoucí k rovnocennému účinku [86, 87]. Při zvolení vhodného teplotně-časového režimu pasterace je připravena pro výrobu sýrů bezpečná surovina. Podle STN 570520/1995 Kozie mlieko nesmějí být *S. aureus* v pasterizovaném kozím mléce v době převzetí prokazatelné při roztěru 0,2 ml ředění 10^{-1} vzorku ($n=5$, $c=0$, $m=0_d$) [77].

Při nevhodném skladování mléka před pasterací může dojít k pomnožení *S. aureus* a k produkci vysoce termostabilních SEs, v těchto případech by ani pasterace nebyla dostatečným opatřením pro zajištění bezpečnosti mléka a sýrů. Rizikové by byly také kozí sýry vyráběné z mléka syrového, zvláště při vyšší mikrobiální kontaminaci.

Při použití pasterovaného mléka a za standardních výrobních podmínek přítomnost stafylokokových enterotoxinů v sýrech spíše svědčí o sekundární kontaminaci *S. aureus*. Základním předpokladem výroby bezpečné potraviny je tedy především zabránění sekundární kontaminaci a dodržování chladírenského řetězce. V mlékárnách s produkcí sýrů jsou vhodné podmínky zajištěny a kontrolovány, na farmách, kde jsou kozí sýry v České republice převážně vyráběny, záleží na znalostech provozovatele, jak vhodné podmínky pro produkci mléka a výrobu sýrů zajistit a na jeho zodpovědnosti. I když jsou farmy pod kontrolou, není možné výrobu a skladování kontrolovat nepřetržitě.

Při výrobě sýrů se uplatňuje inhibiční efekt bakterií mléčného kvašení. Použití startovací číse mlékařské kultury omezuje růst *S. aureus* i produkci SEs. Faktorem umožňujícím růst *S. aureus* a produkci SEs by bylo použití startovací kultury s nízkou aktivitou nebo mléka s obsahem reziduí inhibičních látek, takže v průběhu výroby sýrů by nebylo dosaženo potřebné bariérové kyselosti.

Dalším významným opatřením je jednoznačně nutné dodržení chladicího řetězce při skladování a distribuci sýrů. Při běžné kontaminaci syrového mléka, správné výrobní a hygienické praxi a dobrém skladování mléčných výrobků při teplotách 4 - 8 °C je nebezpečí účinně eliminováno [116].

Prodej kozích sýrů, především dovážených, se realizuje v obchodní síti. Produkce malovýrobců je k prodeji na farmách či na farmářských trzích, kde jsou podmínky prodeje pod kontrolou státních orgánů, nicméně nedostatky jsou stále hlášeny. Nebezpečí pro konzumenty však vyplývá ze skutečnosti, že i když při kontrole výrobků je nalezen počet *S. aureus* menší, než kritický, legislativou daný, není zaručena nepřítomnost SEs.

6 ZÁVĚR

Proiritou každé vyspělé společnosti je produkce bezpečných a kvalitních potravin a zajištění ochrany zdraví člověka. Sýry tvoří významnou součást konzumovaných potravin.

Cílem této diplomové práce bylo sledování počtu *S. aureus* průběhu výroby a skladování čerstvých kozích sýrů plotnovou metodou dle ČSN ISO 6888-1 s použitím agarové půdy Baird-Parkera v souvislosti s průběhem produkce enterotoxinů *S. aureus* metodou ELFA pomocí přístroje miniVIDAS[®]. Dále byly porovnány sledované parametry kozích sýrů a srovnávacích vzorků a posouzen vliv dávky startovací kultury, doby kontaminace a skladovacích podmínek na růst *S. aureus* a produkci enterotoxinů. Byla také ověřena vhodnost použité metody stanovení stafylokokových enterotoxinů a zhodnoceno riziko konzumace kozích sýrů, včetně možností jeho eliminace.

Souhrnně lze říci, že u vzorků čerstvých kozích sýrů zaočkovaných *S. aureus* s produkcí SEC byl oproti srovnávacím vzorkům zjištěn mnohem méně intenzivní růst a dosažení nižších počtu *S. aureus*. I když u sýrů zaočkovaných nižší dávkou zákyse bylo již v počáteční fázi výroby a skladování dosaženo legislativou uvedeného kritického počtu 10^5 KTJ.ml⁻¹ resp. g⁻¹ (log 5 KTJ. ml⁻¹ resp. g⁻¹), produkce SEC nebyla zaznamenána. Bylo zjištěno ovlivnění růstu počtu *S. aureus* především přidavkem startovací kultury, kdy došlo k uplatnění protistafylokokových mechanismů působením bakterií mléčného kysání a byl zjištěn i určitý vliv skladovací teploty.

Naproti tomu ve srovnávacích vzorcích sýrů bez přidavku startovací kultury byl zjištěn intenzivnější růst *S. aureus* a produkce toxinů SEC pouze v závislosti na teplotě skladování. SEC byl prokázán až při dosažení počtu 7 log KTJ.ml⁻¹, to znamená, že testovaný kmen není zřejmě výrazným producentem SEC. Zjištěné hodnoty RFV měly až do konce skladování stoupající charakter.

Použitá metoda ELFA a použitý VIDAS SET 2 na přístroj miniVIDAS[®] (bioMérieux, France) je vhodný pro zjištění produkce stafylokokových enterotoxinů (SEA - SEE) v potravinách. Nevýhodou ale je, že SEs přítomné ve vzorku jsou detekovány jako suma a přístroj určí pouze jejich přítomnost či nepřítomnost.

Výsledky této práce lze shrnout v závěr, že pro produkci kvalitních a bezpečných sýrů je nutný zásadní požadavek nízké úrovně mikrobiální kontaminace suroviny, účinné pastera-ce mléka, minimalizace rizika sekundární kontaminace, správného výrobního postupu

a z toho vyplývajících hodnot dosažené kyselosti a nutnost dodržení chladírenských teplot při skladování výrobků.

Dále z práce vyplývá oprávněnost požadavku kontroly počtu *S. aureus* v syrovém mléce, monitoringu průběhu kyselosti při výrobě sýrů, skladovacích podmínek i podmínek prodeje kozích sýrů a oprávněnost požadavku kontroly produkce SEs v sýrech, neboť stanovení počtu *S. aureus* ve finálním výrobku je sice významnou informací, která ale nemusí správně indikovat přítomnost stafylokokových enterotoxinů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus*. [online]. [cit. 2012-04-25]. Dostupný z WWW: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>.
- [2] MAYER-SCHOLL, A., AVERHOFF, P., ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact? *Current Opinion in Microbiology*, 2004, vol. 7, iss. 1, s. 1-5. ISSN 1369-5274.
- [3] VOTAVA, M. et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
- [4] ELEY, A. R. FISHER, T. A., SHARP, J. M. C. *Microbiol Food Poisoning*. 2nd ed. London: Chapman-Hall, 1996, 211 s. ISBN 0 412 64430 4.
- [5] ANGELOTTI, R., FOTER, M. J., LEWIS, K. H. Time-temperature effects on salmonelose and staphylococci in foods. *Americal Journal of Public Health*, 1961, vol. 51, iss. 1, s. 76-88. ISSN 0003-6919.
- [6] BEUCHAT, L. Microbial stability as affected by water activity. *Cereal Foods World*, 1981, vol. 26, iss. 7, s. 345-351. ISSN 0416-6283.
- [7] JAY, J. M. Use of a plating method to estimate extracellular protein production by Staphylococci. *Infection and immunity*, 1971, vol. 3, iss. 4, s. 544-. ISSN 0019-9567.
- [8] HOLTFRETER, S., BAUER, K., THOMAS, D., FEIG, C., LORENZ, V., ROSCHACK, K., FRIEBE, E., SELLENG, K., LÖVENICH, S., GREVE, T., GREINACHER, A., PANZIG, B., ENGELMANN, S., LINA, G., BRÖKER, B. M. *egc*-encoded superantigens from *Staphylococcus aureus* are neutralized by human sera much less efficiently than are classical staphylococcal enterotoxins or toxic shock syndrome toxin. *Infection and Imunity*, 2004, vol. 72, iss. 7, s. 4061-6071. ISSN 0019-9567.
- [9] PETRÁŠ, P., RŮŽIČKOVÁ, V. Zjištění kompletní sekvence genomu methicilin-rezistentního a vankomycin-rezistentního kmene *S. aureus*. *Zprávy CEM (SZÚ Praha)*, 2001, roč. 10, č. 5, s. 180-181. ISSN 1211-7358.
- [10] RŮŽIČKOVÁ, V., PETRÁŠ, P. Exfoliatiny *Staphylococcus aureus* - původci epidermolytických infekcí. *Zprávy CEM (SZÚ Praha)*, 2003, roč. 12, č. 4, s. 171-174. ISSN 1211-7358.

- [11] AGUILAR, B., AMORENA, B., ITURRALDE, M. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 2001, vol. 78, iss. 2, s. 183-191. ISSN 0378-1135.
- [12] DAVEY, M. E., O'TOOLE, G. A. Microbial film: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 2000, vol. 64, iss. 4, s. 847-867. ISSN 1092-2172.
- [13] LEWIS, K. Riedle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001, vol. 45, iss. 4, s. 999-1007. ISSN 0066-4804.
- [14] PETRÁŠ, P. Latexová detekce clumping (shlukovacího) faktoru u stafylokoků. *Zprávy CEM (SZÚ Praha)*, 2001, roč. 10, č. 10, s. 394-398. ISSN 1211-7358.
- [15] LEITNER, G., KRIFUCKS, O., GLICKMAN, A., YOUNIS, A., SARAN, A. *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis: virulence, antibody production and protection from challenge in a mouse model. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2003, vol. 35, iss. 2, s. 99-106. ISSN 0928-8244.
- [16] SCHWAN, W. R., LANGHORNE, M. H., RITCHIE, H., STOVER, C. K. Loss of hemolysin expression in *Staphylococcus aureus agr* mutants correlates with selective survival during mixed infections in murine abscesses and wounds. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2003, vol. 38, iss. 1, s. 23-28. ISSN 0928-8244.
- [17] BALABAN, N., RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, vol. 61, iss. 1, s. 1-10. ISSN 0168-1605.
- [18] SHARMA, N. K., REES C. E. D., DODD, C. E. R. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol. 66, iss. 4, s. 1347-1353. ISSN 0099-2240.
- [19] OMOE, K., ISHIKAWA, M., SHIMODA, Y., HU, D. L., UEDA, S., SHINAGAWA, K. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, vol. 40, iss. 3, s. 857-862. ISSN 0095-1137.

- [20] LOIR, Y., BARON, F., GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2003, vol. 2, iss. 1, s. 63-76. ISSN 1676-5680.
- [21] ARGUDÍN, M. A., MENDOZA M., C., RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*. 2010, vol. 2, iss. 7, s. 1751-1773. ISSN 2072-6651.
- [22] ONO H. K., OMOE K., IMANISHI K., IWAKABE Y., HU D. L., KATO H., SAITO N., NAKANE A., UCHIYAMA T., SHINAGAWA K. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infection and Immunity*, 2008, vol. 76, iss. 11, s. 4999-5005. ISSN 0019-9567.
- [23] McLAUHLIN, J., NARAYANAN, G. L., MITHANI, V., O'NEILL, G. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, 2000, vol. 63, iss. 4, s. 479-488. ISSN 0362-028X.
- [24] ERCOLINI, D., BLAIOTTA, G., FUSCO, V., COPPOLA, S. PCR-based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, vol. 96, iss. 5, s. 1090-1096. ISSN 1364-5072.
- [25] RUSNAK, J. M., KORTEPETER, M., ULRICH, R., POLI, M., BOUDREAU, E. Laboratory exposures to staphylococcal enterotoxin B. *Emerging Infectious Diseases*, 2004, vol. 10, iss. 9, s. 1544-1549. ISSN 1080-6040.
- [26] STRICKLER, M. P., NEILL, R. J., STONE, M. J., HUNT, R. E., BRINKLEY, W., GEMSKI, P. Rapid purification of staphylococcal enterotoxin-B by high-pressure liquid-chromatography. *Journal of Clinical Microbiology*, 1989, vol. 27, iss. 5, s. 1031-1035. ISSN 0095-1137.
- [27] BAYLES, K. W., IANDOLO, J. J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *Journal of Bacteriology*, 1998, vol. 171, iss. 9, s. 4799-4806. ISSN 0021-9193.
- [28] GILLIGAN, K., SHIPLEY, M., STILES, B., HADFIELD, T. L., IBRAHIM, M. S. Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B genes by PCR ELISA. *Molecular and Cellular Probes*, 2000, vol. 14, iss. 2, s. 71-78. ISSN 0890-8508.

- [29] LETERTRE, C., PERELLE, S., DILASSER, F., FACH, P. Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej*. *Molecular and Cellular Probes*, 2003b, vol. 17, no. 4, p. 139-147. ISSN 0890-8508.
- [30] STEWART, G. C. *Staphylococcus aureus*, s. 273-284. In FRATAMICO, P. M., BHUNIA, A. K., SMITH, J. L. *Foodborne pathogens: Microbiology and molecular biology*. Norfolk: Caister Academic Press, 2005, 454 p. ISBN 1-904455-00-X.
- [31] ROBERTS, T. A., BAIRD-PARKER, A. C., TOMPKIN, R. B. *Microorganisms in food: Characteristics of microbial pathogens*. 1st. printing, London: Blackie Academic & Professional. 1996, 524 p. ISBN 0-412-47350-X.
- [32] SMITH, J. L., BUCHANAN, R. L., PALUMBO, S. A. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: A review. *Journal of Food Protection*, 1983, vol. 46, iss. 6, s. 545-555. ISSN 0362-028X.
- [33] CONTRERAS, A., LUENGO, C., SÁNCHEZ, A., CORRALES, J. C. The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livestock Production Science*, 2003, vol. 79, iss. 2-3, s. 273-283. ISSN 1871-1413.
- [34] TIBANA, A. RAYMAN, K., AKHTAR, M., SZABO, R. Thermal stability of staphylococcal enterotoxins A, B and C in buffered system. *Journal of Food Protection*, 1987, vol. 50, iss. 3, s. 239-242. ISSN 0362-028X.
- [35] SCHANTZ, E. J., ROESSLER, W. G., WAGMAN, J., SPERO, L., DUNNERY, D. A., BERGDOLL, M. S. Purification of staphylococcal enterotoxin B. *Journal of Biochemistry*, 1965, vol. 4., iss. 6, s. 1011-1016. ISSN 0006-2960.
- [36] PETERSON, M. L., AULT, K., KREMER, M. J., KLINGELHUTZ, A. J., DAVIS, C. C., SQUIER, C. A., SCHLIEVERT, P. M. The innate immune system is activated by stimulation of vaginal epithelial cells with *Staphylococcus aureus* and toxic shock syndrome toxin 1. *Infection and Immunity*, 2005, vol. 73, iss. 4, s. 2164-2174. ISSN 0019-9567.
- [37] JAY, J. M. *Modern Food Microbiology*. 5th ed. New York: Chapman-Hall, 1996, 661 s. ISBN 0-412-07691-8.
- [38] ATANASSOVA, V., MEINDL, A., RING, C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham - a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, vol. 68, iss. 1-2, s. 105-113. ISSN 0168-1605.

- [39] LANCETTE, G. A., TATINI, S. R. *Staphylococcus aureus*, s. 533-550. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, F. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3rd. edn. Washington: American Public Health Association, 1992, 1219 p. ISBN 0-87553-173-3. LANCETTE, G. A., TATINI, S. R. *Staphylococcus aureus*, s. 533-550. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, F. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3rd. edn. Washington: American Public Health Association, 1992, 1219 p. ISBN 0-87553-173-3.
- [40] LOPEZ-PEDEMONTE, T., ROIG-SAGUES, A.X., DE LAMO, S., GERVILLA, R., GUAMIS, B. High hydrostatic pressure treatment applied to model cheeses made from cow's milk inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 2007, vol. 18, iss. 5, s. 5441-5447. ISSN 0956-7135.
- [41] ROSEC, J. P., GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, vol. 77, iss. 1-2, s. 61-70. ISSN 0168-1605.
- [42] JABLONSKI, L. M., BOHACH, G. *Staphylococcus aureus*. s. 411-434. In: DOYLE, M. P., BEUCHAT, L. R., MONTVILLE, T. J. (eds.): *Food microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington, DC: ASM Press, 2001, 768 s. ISBN 15-558-11175.
- [43] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kriteriích na potraviny. *Úřední věstník Evropské unie*, 2005, L 338, s. 1-26.
- [44] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1441/2007 ze dne 5. prosince 2007, kterým se mění Nařízení komise ES 2073/2005 o mikrobiologických kriteriích na potraviny. *Úřední věstník Evropské unie*, 2007, L 332, s. 12-29.
- [45] LUO, L., ZHANG, Z., CHEN, L., MA, L. Chemiluminescent imaging detection of staphylococcal enterotoxin C₁ in milk and water samples. *Food Chemistry*, 2006, vol. 97, iss. 2, s. 355-360. ISSN 0308-8146.
- [46] ZHANG, S., IANDOLO, J. J., STEWART, G. C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). *FEMS Microbiology Letters*, 1998, vol. 168, iss. 2, s. 227-233. ISSN 0378-1097.

- [47] ANONYM. Se stafylokokovými enterotoxiny nemáme v ČR problém. *Potravinářský zpravodaj*, 2010, roč. XI, č. 1, s. 4. Praha: Agral. ISSN 1801-9110.
- [48] HOSOSAKA, Y., HANAKI, H., ENDO, H., SUZUKI, Y., NAGASAWA, Z., OTSUKA, Y., NAKAE, T., SUNAKAWA, K. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2007, vol. 13, iss. 2, s. 79-86. ISSN 0163-4453.
- [49] ŠTÁSTKOVÁ, Z., MIŠUROVÁ, L., POSPÍŠILOVÁ, M., KARPÍŠKOVÁ, R. Výskyt meticilin rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* v chovu koz. Sborník *Konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí*. Brno: VFU: 28. 5. 2008, s. 28-30. ISBN 978-80-7305-038-2.
- [50] LEE, J. H. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes. *Veterinary microbiology*, 2006, vol. 114, iss. 1-2, s. 155-159. ISSN 0378-1135.
- [51] KUNZ, F., CORTI, S., GIEZENDANNER, N., STEPHAN, R., WITTENBRINK, M., ZWEIFEL, C. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from mastitis simplex from sheep and goats. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 2011, vol. 153, iss. 2, s. 63-69. ISSN 0036-7281.
- [52] KURODA, M., OHTA, T., UCHIYAMA, I., BABA, T., YUZAWA, H., KOBAYASHI, I., CUI, L., OGUCHI, A., AOKI, K., NAGAI, Y., LIAN, J., ITO, T., KANAMORI, M., MATSUMARU, H., MARUYAMA, A., MURAKAMI, H., HOSOYAMA, A., MIZUTANI-UI, Y., TAKAHASHI, N. K., SAWANO, T., INOUE, R., KAITO, C., SEKIMIZU, K., HIRAKAWA, H., KUHARA, S., GOTO, S., YABUZAKI, J., KANEHISA, M., YAMASHITA, A., OSHIMA, K., FURUYA, K., YOSHINO, C., SHIBA, T., HATTORI, M., OGASAWARA, N., HAYASHI, H., HIRAMATSU, K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 2001, vol. 357, iss. 4, s. 1225-1250. ISSN 0140-6736.
- [53] ČSN EN ISO 6888-1 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy) - Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera. Praha: Český normalizační institut, 1999, 16 s. Třídící znak 56 0089.

- [54] JOHNSON, E. A. Bacterial pathogens and toxins in foodborne disease, s. 25-45. In D'MELLO, J. P. F. *Food safety: Contaminants and toxins*. Oxford: CABI, 2003. 480 s. ISBN 0-85199-607-8.
- [55] ŠTĚPÁN, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., ROSYPAL, S., HÁJEK, V., DOŠKAŘ, J. Identification of *Staphylococcus aureus* based on PCR amplification of species specific genomic 826 bp sequence derived from a common 44 - kb *SmaI* restriction fragment. *Molecular and Cellular Probes*, 2001, vol. 15, iss. 5, s. 249-257. ISSN 0890-8508.
- [56] STRUELENS, M. J., RYCK, R., DEPLANO, A. Analysis of microbial genomic macrorestriction patterns by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing, s. 159-176. In DIJKSHOORN, L., TOWNER, K. J., STRUELENS, M. *New approaches for the generation and analysis of microbial typing data*. Amsterdam: Elsevier, 2001, 372 s. ISBN 0-444-50740-X.
- [57] RAPPOLD, G. A., RIED, K., KLINK, A., RAO, E., WEISS, B. Pulsed-field gel electrophoresis: Protocols, s. 103-113. In HILDEBRANDT, F., IGARASHI, P. *Techniques in molecular medicine*: Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1999. ISBN 3-540-57129-9.
- [58] BOEREMA, J. A., CLEMENS, R., BRIGHTWELL, G. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, vol. 107, iss. 2, s. 192-201. ISSN 0168-1605.
- [59] VERSETTI, D., RAGGI, G., COTTE-PATTAT, P. J., BRIDON, L., SOFIA, T. Evaluation of the TEMPO® System for total viable count, total coliforms and *E. coli* enumeration in meat products [online]. [cit. 2012-02-28]. Dostupný z WWW: [http://www://biomerieux-usa.com/upload/TVC TC and EC VS ISO in meat \(Inalca\)-1.pdf](http://www://biomerieux-usa.com/upload/TVC TC and EC VS ISO in meat (Inalca)-1.pdf).
- [60] KUNICKA, A. An automated method for food microbiological quality control. *Journal of Biotechnology*, 2007, vol. 131, iss. 2 supplement, s. S69. ECB 13, 13th European Congress on Biotechnology. Barcelona, Spain. ISSN 0168-1656.

- [61] LETERTRE, C., PERELLE, S., DILASSER, F., FACH, P. A strategy based on 5' nuclease multiplex PCR to detect enterotoxin genes *sea* to *sej* of *Staphylococcus aureus*. *Molecular and Cellular Probes*, 2003a, vol. 17, iss. 5, s. 227-235. ISSN 0890-8508.
- [62] BAYLIS, C. L. Immunological techniques immunochromatography, enzyme linked immunofluorescent assays and agglutination techniques, s. 217-240. In McMEEKIN, T. A., *Detecting pathogens in food*. 1st printing. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, Boca Raton. CRC Press LLC, 2003, 370 s. ISBN 0-8493-1756-8.
- [63] MORANDI, S., BRASCA, M., LODI, R, CREMONESI P, CASTIGLIONI, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Veterinary microbiology*, 2007, vol. 124, iss 1-2-, s. 66-72. ISSN 0378-1135.
- [64] McCARTHY, J. Immunological techniques: ELISA, s. 241-258. In McMEEKIN, T. A. *Detecting pathogens in food*. 1st printing. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; Boca Raton: CRC Press LLC, 2003, 370 s. ISBN 0-8493-1756-8.
- [65] XU, J. Y., DING, D., SUN H. V., CHEN, S. Q. Preparation and identification of monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxin I. *Zhejiang Da Xue Bao Yi Xue Ban*, 2009, vol. 38, iss. 3, s. 265-270. ISSN 1008-9292.
- [66] SOEJIMA, T., NAGAO, E., KUBOTA, T., YAMAGATA, H., KAGI, H. Comparison between ultrafiltration and trichloroacetic acid precipitation method for concentration of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in dairy samples. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, vol. 93, iss. 2, s. 185-194. ISSN 0168-1605.
- [67] VERNZOY-ROZAND, C., MAZU-CRUCHAUDET, C., BAVAI, C., RICHARD, Y. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, vol. 39, iss. 6, s. 490-494. ISSN 0266-8254.
- [68] EVENSON, M. L., HINDS, M. W., BERNSTEIN, R. S., BERGDOLL, M. S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology*, 1988, vol. 7, iss. 4, s. 311-316. ISSN 0168-1605.

- [69] MIČUDA, S., FUKSA, L., BRČÁKOVÁ, E., CERMANOVÁ, J., GERŠL, V. Molekulárně biologické metodiky ve farmakologii. Hodnocení genotypu [online]. [cit. 2001-12-28]. Dostupný z WWW: <<http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/DNA.htm>>
- [70] PRIEGO, R., MEDINA, L. M., JORDANO, R. Comparison between the Vitek Imunodiagnostic Assay system and PCR for the detection of pathogenic microorganisms in an experimental dry sausage during its curing process. *Journal of Food Protection.*, 2009, vol. 72, iss. 9, s. 1977-1981. ISSN 0362-028X.
- [71] BENDAHOU, A., ABID, M., BOUTELDOUN, N., CATELEJINE, D., LEBBADI, M. Enterotoxinogenic coagulase positive *Staphylococcus* in milk and milk products, lben and jben, in northern Moricci. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2009, vol. 30, iss. 3, s. 169-176. ISSN 1972-2680.
- [72] RASOOLY, A., HEROLD, K. E. Food microbial pathogen detection and analysis using DNA microarray technologies. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2008, vol. 5, iss. 4, s. 531-550. ISSN 1535-3141.
- [73] MATUŠÍKOVÁ, I, PIRŠELOVÁ, B. Technológia DNA čipov nielen v službách medicíny [online].[cit. 2012-01-14]. Dostupný z WWW: < <http://www.priroda.cz/clanky.php?detail=1090>>.
- [74] RUBINA, A. Y, FILIPPOVA, M. A, FEIZKHANOVA, G. U, SHEPELIAKOVSKAJA A. O, SIDINA E. I., BOZIEV, K. M, LAMAN A. G., BROVKO, F. A., VERTIEV, Y. V., ZASEDATELEV, A. S., GRISHIN, E. V. Simultaneous Detection of seven Staphylococcal Enterotoxins: Development of Hydrogel Biochips for Analytical and Practical Application. *Analytical Chemistry*, 2010, vol. 82, iss. 21, s. 8881-8889. ISSN 0003-2700.
- [75] FANTOVÁ, M., KACEROVSKÁ, L., MALÁ, G., MÁTLOVÁ, V., SKŘIVÁNEK, M., ŠLOSÁRKOVÁ, S. *Chov koz*. 1. vyd. Praha: Brázda, s.r.o., 2000, 191 s. ISBN 80-209-0328-3.
- [76] TZIBOULA-CLARKE, A. Goat milk. s. 1270-1279. In ROGINSKI, H., FUGUAY, J. V., FOX, P. F., Editors, *Encyclopedia of Dairy Science*. 1st. ed., London and San Diego: Academic Press, 2003, 2799 s. ISBN 0-12-227235-8.
- [77] STN 57 0520. Kozie mlieko. Vydal Úrad pre normalizáciu, metrologii a zkušeniectvo SR, 1995, s. 6.

- [78] EL-AGAMY, E. I. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research*, 2007, vol. 68, iss. 1-2, s. 64-72. ISSN 0921-4488
- [79] LARSON, B. L. The dairy goat as a model in lactation studies. *Journal of Dairy Science*, 1978, vol. 61, iss. 7, s. 1023-1029. ISSN 0022-0302.
- [80] KHALED, N. F., ILLEK, J., GAJDŮŠEK, S. Interactions between nutrition, blood metabolic profile and milk composition in dairy goats. *Acta veterinaria Brno*, 1999, vol. 68., iss. 4, s. 253-258. ISSN 0001-7213.
- [81] ZENG, S. S., ESCOBAR, E. N., PROPHAM, T. Daily variation in static cells fauna, composition and production of Alpine goat milk. *Small Ruminant Research*, 1997, iss. 26, s. 253-260. ISSN 0921-4488.
- [82] KUČHTÍK, J., SEDLÁČKOVÁ, H. Composition and properties of milk in White Short-haired goats on the third lactation. *Czech Journal of Animal Science*, 2003, vol. 48, iss. 12, s. 540-550. ISSN 1212-1819.
- [83] SZIJARTO, L., VANDEVOORT, F. R. Determination of added water and bovine milk to caprine milk. *Journal of Dairy Science*, 1983, vol. 66, iss. 3, s. 620-623. ISSN 0022-0302.
- [84] PŘIDALOVÁ, H., JANŠTOVÁ, B., CUPÁKOVÁ, Š., DRAČKOVÁ, M. NAVRÁTILOVÁ, P., VORLOVÁ, L. Somatic cells in goat milk. *Folia veterinaria*, 2009, vol. 53, iss. 2, s. 101-105. ISSN 0015-5748.
- [85] ČESKO. Vyhláška č. 77/2003 Sb. ze dne 6. března 2003, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. *Sbírka zákonů*, 2003, částka 32, s. 2488-2516.
- [86] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienické předpisy pro potraviny živočišného původu. *Úřední věstník Evropské unie*, 2004, L. 139, s. 14-74.
- [87] Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006, kterým se mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. *Úřední věstník Evropské unie*, 2006, L 320, s. 1-10
- [88] KADLEC, P., ČEPIČKA, J., ČURDA, L., DOSTÁLOVÁ, J., FILIP, V., MELZOK, K., PLOCKOVÁ, M., RYCHTERA M., ŠMIDRKAL, J., ŠTĚTINA J., VOLDŘICH, M. *Technologie potravin II*. 1.vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 236 s. ISBN 80-7080-510-2.

- [89] GAJDŮŠEK, S. *Mlékařství II.* 2 vyd. Brno: MZLU, 2002, 142 s. ISBN 80-7157-342-6.
- [90] KLINGER, I., ROSENTHAL, I. Public health and the safety of milk products from sheeps and goats. *Revue scientifique et technique de l'office international des epizooties*, 1997, vol. 16, iss 2, s. 482-488. ISSN 0253-1933.
- [91] D'AMICO D. J., DONNELLY, C. W. Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: effect of farm characteristic and practices. *Journal of Dairy Science*, 2010, vol. 93, iss. 1, s. 134-147. ISSN 0022-0302.
- [92] KYOZAIRE, J. K., VEARY, C. M., PETZER I. M., DONKIN, E., F. Microbiological quality of goats milk obtained under different production system. *Journal of the South African Veterinary Association-Tydskrif van die Suid Afrikaanse Veterinere Vereniging*, 2005, vol. 76, iss. 2, s. 69-73. ISSN 0038-2809.
- [93] MORONI, P., PISONI, G., VIMERCATI, C., RINALDI, M., CASTIGLIONI, B, CREMOSI P, BOETTCHER, P. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from chronically infected dairy goats. *Journal of Dairy Science*, 2005, vol. 88, iss. 10, s. 3500-3509. ISSN 0022-0302.
- [94] KOOP, G., DIK, N., NIELEN, M., LIPMAN, L. J. Short communication: Reproducibility of differential bulk milk culture and associations with somatic cell count, total bacterial count and standard plate count. *Journal of Dairy Science*, 2010, vol. 93, iss. 6. s. 2569-2573. ISSN 0022-0302.
- [95] MURPHY, B. P, O'MAHONY, E., BUCKLEY, J. F., O'BRIEN, S., FANNING, S. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy animals in Ireland. *Zoonose public Health* , 2010, vol. 57, iss. 4., s. 249-257. ISSN 1863-1959.
- [96] MØRK, T., KVITLÉ, B., MATHISEN, T, JØRGENSEN, H. J. Bacterological and molecular investigations of *Staphylococcus aureus* in dairy goats. *Veterinary microbiology*, 2010, vol. 141, iss. 1-2, s. 134-141. ISSN 0378-1135.
- [97] CUPÁKOVÁ, Š, POSPÍŠILOVÁ, M., LIPERTOVÁ, M., KOLÁČKOVÁ, I., KARPÍŠKOVÁ, R., JANŠTOVÁ, B. Mikrobiologická kvalita kozího mléka. (Microbiological Quality of Goat's Milk). In *Sborník příspěvků Mléko a sýry 2006*. VŠCHT Praha, leden 2006, s. 59-63. ISBN 80-7080-620-6.

- [98] FOSCHINO, R., INVERNIZZI, A., BARUCCO, R., STRADIOTTO, K. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *Journal of Dairy Research*, 2002, vol. 69, iss.2, s. 213-223. ISBN 0022-0299.
- [99] SAMARZIJA, D., DAMJANOVIC, S., POGACIC, T. *Staphylococcus aureus* in cheese. *Mljekarstvo*, 2007, vol. 57, iss 1, s. 31-48. ISSN 0026-704X.
- [100] MEYRAND, A., BOUTRAND-LOEI, S., RAY-GUENIOT, S., MAZUY, C., GASPARD, C. E, JAUBERT, G., PERRIN, G., LAPEYRE, C., VERNOZY-ROZAND, C. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, vol. 85., iss 3, s. 537-554. ISSN 1364-5072.
- [101] CREMONESI, P., PEREZ, G., PISONI, G., MORONI, P., MORANDI, S., LUZZANA, M., BRASCA, M., CASTIGLIONI, B. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, vol. 45, iss. 6, s. 586-91. ISSN 0266-8254.
- [102] AKINEDEN, O., HASSAN, A. A., SCHNEIDER, E., USLEBER, E. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, vol. 124, iss. 2, s. 211-216. ISSN 1068-1605
- [103] TRMCIC, A., OBERMAJER, T., MAJHENIC, A. C., ROGELJ, I., MATIJASIC, B. B. In-situ inhibition of *Staphylococcus aureus* by lactic acid bacteria consortia from two traditional Slovenian raw milk cheeses. *Mljekarstvo*, 2010, vol. 60, iss. 3, s. 183-190. ISSN 0026-704X.
- [104] ČSN 56 9609. Pravidla správné hygienické praxe - mikrobiologická kritéria-pro potraviny. Principy stanovení a aplikace. Český normalizační institut, Praha, 2008, 40 s.
- [105] ČSN ISO 7218. Mikrobiologie potravin a krmiv - Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení. 2008, 66 s. Třídící znak 56 0103.
- [106] MATOUŠKOVÁ, O., CHALUPA, J., CÍGLER, M., HRUŠKA, K. *STAT Plus - uživatelská příručka*, verze 1.01. Brno: Veterinary Researche institute, 1992, 168 p.

- [107] NECIDOVÁ, L., ŠTÁSTKOVÁ, Z., POSPÍŠILOVÁ, M., JANŠTOVÁ, B., STREJČEK, J., DUŠKOVÁ, M., KARPÍŠKOVÁ, R. Influence of soft cheese technology on the growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. *Czech Journal of Food Sciences*, 2009, vol. 27, iss. 2, s. 127-133. ISSN 1212-1800.
- [108] IKEDA, T., TAMATE, N., YAMAGUCHI, K., MAKINO, S. Quantitative analysis of *Staphylococcus aureus* in skimmed milk powder by real-time PCR. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2005, vol. 67, iss. 10, s. 1037-1041. ISSN 0916-7250.
- [109] GÖRNER, F., VALÍK, Ľ. *Aplikovaná mikrobiológia potravín*. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [110] GOMÉZ-LUCIA, E., GOYACHE, J., BLANCO, J. L., GARAYZABAL, J. F. F., ORDEN, J. A., SUAREZ, A. Growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin-production in homemade mayonnaise prepared with different pH values. *Journal of Food Protection*, 1987, vol. 50, iss. 9, s. 872-875. ISSN 0362-028X.
- [111] JANŠTOVÁ, B. ml., NECIDOVÁ, L., JANŠTOVÁ, B., JÍLKOVÁ, P., KOMÁRKOVÁ, R. Využití metody ELFA při stanovení stafylokokových enterotoxinů u různých druhů konzumního mléka. In *Zborník VI. Vedecká konferencia doktorandov s medzinárodnou účasťou*. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 24. 11. 2011, s. 113-116. ISBN 978-80-552-0693-6.
- [112] ALOMAR, J., LOUBIERE, P., DELBES, C., NOUAILLE, S., MOTEL, M. C. Effects of *Lactococcus garvieae*, *Lactobacillus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. *Food microbiology*. 2008, vol. 25, iss. 3, s. 502-508. ISSN 0740-0020.
- [113] CHARLIER C., EVEN, S., GAUTIER, M., LE LOIR, Y. Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk. *International Dairy Journal*. 2008, vol. 18, p. 197-203. ISSN 0958-6946.
- [114] OLARTE, C., SANZ, S., GONZALES-FANDOS, E., TORRE, P. The effect of a commercial starter culture addition on the ripening of an artisanal goat's cheese (Cameros cheese). *Journal of Applied Microbiology*, 2000, vol. 88, iss. 3, s. 421-429. ISSN 1364-5072.

- [115] ROSENGREN, A., FABRICIUS, A., GUSS, B., SYLVEN, S., LINDQVIST, R. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, vol. 144, iss 2, s. 263-269. ISSN 0168-1605.
- [116] ČSN 59 9601. Pravidla správné výrobní a hygienické praxe. Mléko a mléčné výrobky. Praha: Český normalizační institut, 2006, 23 s.
- [117] ZSCHÖCK, M., BOTZLER, D., BLÖCHER, S., SOMMERHÄUSER, J., HAMANN, H. P. Detection of genes for enterotoxins (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. *International Dairy Journal*, 2000, vol. 10, iss. 8, s. 569- 574. ISSN 0958-6946.
- [118] PEREIRA, J. L., SALZBERG, S. P., BERGDOLL, M. S. Production of staphylococcal enterotoxin D in foods by low-enterotoxin-producing staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 1991, vol. 14, iss. 1, s. 19-25. ISSN 0168-1605.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
ETs	Exfoliativní toxiny
TSST	Toxin syndromu toxického šoku
SE, SEs	Stafylokokový enterotoxin, stafylokokové enterotoxiny
KTJ	Kolonie tvořící jednotky
SEA-W	Stafylokokový enterotoxin (A-W)
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
RPLA	Reverzní pasivní latexová aglutinace, Reverse passive latex agglutination)
ELISA	Enzyme-linked immunoabsorbent assay
ELFA	Enzyme-linked immunofluorescent assay
HPLC	High performance liquid chromatography
DSD-PAGE	Sodium dodechl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
ČSN, STN	Česká technická norma, Slovenská technická norma
SK	Startovací kultura, smetanová kultura
SA	Vzorky sýrů připravené postupem A (zaočkování <i>S. aureus</i> do pasterovaného mléka)
SA I	Vzorky sýra připravené postupem A (zaočkování <i>S. aureus</i> do pasterovaného mléka), přídavek startovací kultury 1 %
SA II	Vzorky sýra připravené postupem A (zaočkování <i>S. aureus</i> do pasterovaného mléka), přídavek startovací kultury 2 %
SA I 15	Vzorky sýra připravené postupem A (zaočkování <i>S. aureus</i> do pasterovaného mléka), přídavek startovací kultury 1 %, skladovací teplota 15 °C
SA I 22	Vzorky sýra připravené postupem A (zaočkování <i>S. aureus</i> do pasterovaného mléka), přídavek startovací kultury 1 %, skladovací teplota 22 °C
SA II 15	Vzorky sýra připravené postupem A (zaočkování <i>S. aureus</i> do pasterovaného mléka), přídavek startovací kultury 2 %, skladovací teplota 15 °C
SA II 22	Vzorky sýra připravené postupem A (zaočkování <i>S. aureus</i> do pasterovaného mléka), přídavek startovací kultury 2 %, skladovací teplota 22 °C
SB	Vzorky sýrů připravené postupem B (zaočkování <i>S. aureus</i> do sýrového zrna

SB I	Vzorky sýra připravené postupem B (zaočkování <i>S. aureus</i> do sýrového zrna), přídavek startovací kultury 1 %
SB II	Vzorky sýra připravené postupem B (zaočkování <i>S. aureus</i> do sýrového zrna), přídavek startovací kultury 2 %
SB I 15	Vzorky sýra připravené postupem B (zaočkování <i>S. aureus</i> do sýrového zrna), přídavek startovací kultury 1 %, skladovací teplota 15 °C
SB I 22	Vzorky sýra připravené postupem B (C), přídavek startovací kultury 1 %, skladovací teplota 22 °C
SB II 15	Vzorky sýra připravené postupem B (zaočkování <i>S. aureus</i> do sýrového zrna), přídavek startovací kultury 2 %, skladovací teplota 15 °C
SB II 22	Vzorky sýra připravené postupem B (zaočkování <i>S. aureus</i> do sýrového zrna), přídavek startovací kultury 2 %, skladovací teplota 22 °C
A	Srovnávací vzorky připravené postupem A, bez přídavku startovací kultury (zaočkování <i>S. aureus</i> do pasterovaného mléka)
A 15	Srovnávací vzorek připravený postupem A, bez přídavku startovací kultury (zaočkování <i>S. aureus</i> do pasterovaného mléka), skladovací teplota 15 °C
A 22	Srovnávací vzorek připravený postupem A, bez přídavku startovací kultury (zaočkování <i>S. aureus</i> do pasterovaného mléka), skladovací teplota 22 °C
B	Srovnávací vzorky připravené postupem B, bez přídavku startovací kultury (zaočkování <i>S. aureus</i> do sýrového zrna), skladovací teplota 22 °C
B 15	Srovnávací vzorek připravený postupem B, bez přídavku startovací kultury (zaočkování <i>S. aureus</i> do sýrového zrna), skladovací teplota 22 °C
B 22	Srovnávací vzorek připravený postupem B, bez přídavku startovací kultury (zaočkování <i>S. aureus</i> do sýrového zrna), skladovací teplota 22 °C
RFV	Relative fluorescence value, hodnota relativní fluorescence

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Komplex antigen-protilátka s imobilizovaným enzymem (bioMérieux, France)

Obr. 2. Postup přípravy vzorků

Obr. 3. MiniVIDAS[®] reagenční strip s komůrkou s pevnou fází (SPR) [62]

Obr. 4. Hodnota RFV (produkce SEC) ve srovnávacích vzorcích

Obr. 5. Srovnání dynamiky změn počtu *S. aureus* u vzorků SA a SB

Obr. 6. Srovnání dynamiky změn počtu *S. aureus* u vzorků SA a A

Obr. 7. Srovnání dynamiky změn počtu *S. aureus* u vzorků SB a B

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1	Hlavní charakteristiky vybraných SEs [20]
Tabulka 2	Limity pro růst <i>S. aureus</i> a produkci enterotoxinů [31]
Tabulka 3	Klasifikace přírodních sýrů podle zrání [85]
Tabulka 4	Dynamika změn počtu <i>S. aureus</i> ($\log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ resp. g^{-1}) a produkce enterotoxinu v sýru SA I v průběhu výroby
Tabulka 5	Dynamika změn počtu <i>S. aureus</i> ($\log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$) a produkce enterotoxinu v sýru SA I v průběhu skladování
Tabulka 6	Dynamika změn počtu <i>S. aureus</i> ($\log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ resp. g^{-1}) a produkce enterotoxinu v sýru SA II v průběhu výroby
Tabulka 7	Dynamika změn počtu <i>S. aureus</i> ($\log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$) a produkce enterotoxinu v sýru SA II v průběhu skladování
Tabulka 8	Dynamika změn počtu <i>S. aureus</i> ($\log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ resp. ml^{-1}) a produkce enterotoxinu v sýru SB I v průběhu výroby
Tabulka 9	Dynamika změn počtu <i>S. aureus</i> ($\log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$) a produkce enterotoxinu v sýru SB I v průběhu skladování
Tabulka 10	Dynamika změn počtu <i>S. aureus</i> ($\log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ resp. ml^{-1}) a produkce enterotoxinu v sýru SB II v průběhu výroby
Tabulka 11	Dynamika změn počtu <i>S. aureus</i> ($\log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$) a produkce enterotoxinu v sýru SB II v průběhu skladování
Tabulka 12	Dynamika změn počtu <i>S. aureus</i> ($\log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ resp. g^{-1}) a produkce enterotoxinu ve srovnávacím vzorku A v průběhu výroby
Tabulka 13	Dynamika změn počtu <i>S. aureus</i> ($\log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$) a produkce enterotoxinu ve srovnávacím vzorku A v průběhu skladování
Tabulka 14	Dynamika změn počtu <i>S. aureus</i> ($\log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$) a produkce enterotoxinu ve srovnávacím vzorku B v průběhu výroby
Tabulka 15	Dynamika změn počtu <i>S. aureus</i> ($\log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$) a produkce enterotoxinu ve srovnávacím vzorku B v průběhu skladování

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P1. Obrázky 8 – 11

Obr. 8. Makrofoto *S. aureus*

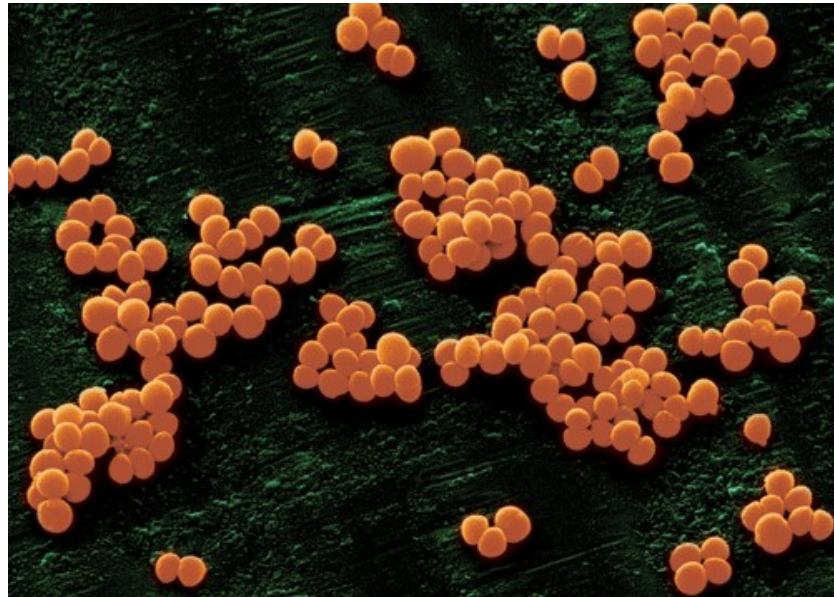
[http://www.bioquellus.com/technology/microbiology/vancomycin-resistant-staphylococcus-aureus-/](http://www.bioquellus.com/technology/microbiology/vancomycin-resistant-staphylococcus-aureus/)

Obr. 9. Kolonie *S. aureus* na Baird-Parker agaru

Obr. 10. Příprava vzorků kozích sýrů

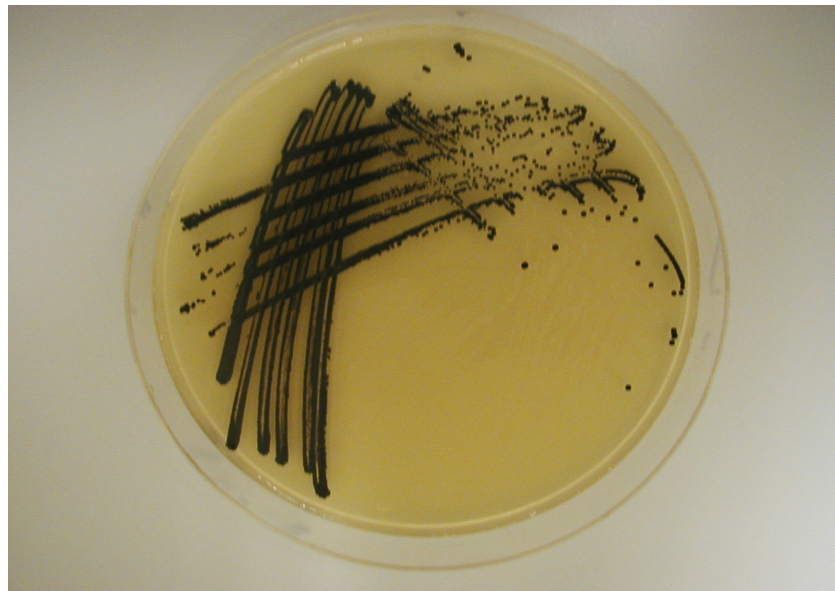
Obr. 11. Přístroj miniVidas®

PŘÍLOHA P I: OBR. 8-11



Obr. 8. Makrofoto Staphylococcus aureus

<http://www.bioquellus.com/technology/mikrobiology/vankomycin-resistant-staphylococcus-aureus/>



Obr. 9. Kolonie Staphylococcus aureus na Baird-Parker agaru



Obr. 10. Příprava vzorků kozích sýrů



Obr. 11 Příklad přístroje miniVidas®