

Co-funded by the
Erasmus+ Programme
of the European Union



Riziko kontaminácie potravín stafylokokovými enterotoxínmi – prípadové štúdie

podpora praktických cvičení

štruktúrované výukové programy pre študentov





1. Zavedenie

Kontaminácia ***Staphylococcus aureus*** má významný vplyv na bezpečnosť a kvalitu mlieka, mliečnych výrobkov, ako aj napríklad potravín s vysokým stupňom manuálnej práce počas ich prípravy. Táto baktéria je najčastejšou príčinou intoxikácie potravinami (stafylokoková enterotoxikóza) kvôli svojej schopnosti produkovať stafylokokové enterotoxíny (SE) priamo v potravinách (Hennekinne a kol., 2012).

S. aureus je komenzál teplokrvných zvierat, ktorý bol tiež izolovaný z prírodného prostredia. Je hlavnou príčinou **mastitídy** u kráv (Keefe, 2012; Vanderhaeghen et al., 2014) a do mlieka sa zavádza aj sekundárnou kontamináciou v dôsledku kvapôčkovej infekcie alebo z prostredia, povrchu vemena alebo rúk dojiča. Možnú prítomnosť patogénnych mikroorganizmov v surovom mlieku a riziká spojené s jeho konzumáciou zdôraznili napríklad Oliver et al. (2009) alebo Merz et al. (2016).

Lahôdky a jemné pečivo patria z pohľadu možného výskytu *S. aureus* medzi najrizikovejšie potraviny. Jedným z dôvodov je vysoký stupeň manuálnej práce počas ich prípravy, ktorý predstavuje hlavný zdroj kontaminácie *S. aureus* v týchto druhoch potravín. *S. aureus* prirodzene kolonizuje kožu a nosohltanovú oblasť u cca. 30–50 % populácie (Soriano et al., 2002). Alhashimi et al. (2017) preukázali prítomnosť *S. aureus* v výteroch z nosohltanu u 30,1 % osôb, ktoré manipulujú s potravinami. Chaves et al. (2018) izolované enterotoxigénne kmene stafylokokov z tampónov odobratých zo šiestich typov povrchov v stravovacích zariadeniach, ako aj v domácich kuchyniach (umývadlo, chladnička, sporák, doska na krájanie, nože, uteráky), ako aj z rúk a slizníc kuchárov / pracovníkov v týchto priestoroch. Ako uvádza Bogdanovičová et al. (2019) vo svojej štúdii o stravovacích zariadeniach, lahôdky a jemné pekárenské výrobky môžu byť kontaminované rukami zamestnancov a samotnými priestormi. *S. aureus* bol identifikovaný v 17,9 % výterov povrchov na priestoroch alebo rukách zamestnancov; gény kódujúce produkciu SE boli nájdené u 58,5 % z nich (70,0 % z výterov z rúk, 52,0 % z povrchov). Sundararaj et al. (2019) izolovali 34 vzoriek *S. aureus* zo 100 vzoriek potravín na priamu spotrebu; v 14 z nich boli zistené kmene schopné produkovať stafylokokový enterotoxín B (SEB). Štyridsaťdva prípadov stafylokokovej otravy jedlom bolo spôsobených potravinami z jediného stravovacieho zariadenia vyrábajúceho cestoviny, paradajky, rybie prsty a jogurt (Solano a kol., 2013). Soares et al. (2019) hodnotili mikrobiologickú kvalitu potravín podávaných v 20 stravovacích zariadeniach v severnom Portugalsku. Najvyšší počet ukazovateľov mikrobiologickej hygieny (*Escherichia coli*) a patogénov (*S. aureus*) bol zistený v sendvičoch, šalátoch a pečive. Dôvody takejto kontaminácie môžu zahŕňať:

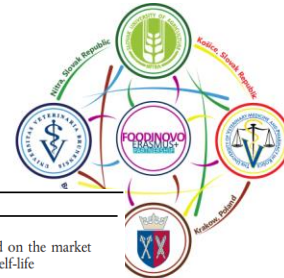


nevhodné dezinfekčné metódy, krížová kontaminácia a absencia akéhokoľvek tepelného spracovania.

Schopnosť približne 50 – 75 % kmeňov *S. aureus* produkovať za vhodných podmienok tepelne stabilné extracelulárne enterotoxíny predstavuje hlavný rizikový faktor infekcie prenášanej potravinami. **Stafylokokové enterotoxíny** sú členmi širokej rodiny stafylokokových a streptokokových pyrogénnych exotoxínov s potenciálom spôsobiť intoxikáciu potravinami a niektoré alergie (Balaban a Rasooly, 2000; Omoe a kol., 2003). V súčasnosti je známych 24 typov SE označených ako A až Y (Hennekinne et al., 2012). Klasické SE: SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED a SEE sú najčastejšími príčinami stafylokokovej enterotoxikózy. Výroba SE je nepravdepodobná pri teplotách nižších ako 10 °C (Bhunia, 2008). Hoci pasterizácia zabíja bunky *S. aureus*, tepelne stabilné SE si vo všeobecnosti zachovávajú svoju biologickú aktivitu (Asao et al., 2003). SE sú odolné voči zmrazeniu, sušeniu, tepelnému spracovaniu a nízkemu pH, dokonca aj voči proteolytickým enzýmom gastrointestinálneho traktu (Li et al., 2011). Ako uvádza Hu et al. (2018), SE predstavujú jedinečný, veľmi dobre prispôsobený faktor virulencie, hoci evolučná funkcia týchto toxínov zostáva nejasná. *S. aureus* patrí medzi najvýznamnejších pôvodcov intoxikácií spôsobených potravinami na svete (Normanno et al., 2005).

Mnohé prípady **stafylokokovej enterotoxikózy** zostávajú nehlásené kvôli rýchlemu priebehu a podobnosti s inými intoxikáciami prenášanými potravinami (Jablonski a Bohach, 2001). Stafylokoková enterotoxikóza má veľmi rýchly nástup a priebeh. Prvé príznaky intoxikácie, ako je vracanie, bolesť hlavy, bolesť brucha a hnačka, sa objavujú už jednu až šesť hodín po konzumácii potravín kontaminovaných SE. Príznaky spontánne vymiznú v priebehu 24–48 hodín (Loir a kol., 2003).

Bhunia (2008) uvádza, že pri počtoch v rozmedzí medzi log 5–8 (10,5 a 108) CFU.g⁻¹ je *S. aureus* schopný produkovať enterotoxín v množstvách, ktoré môžu predstavovať zdravotné riziko pre spotrebiteľov. S cieľom zaistiť bezpečnosť potravín, chrániť zdravie spotrebiteľov a zabrániť riziku stafylokokovej enterotoxikózy **sa v nariadení Komisie (ES) č. 2073/2005 z 15 . novembra 2005** o mikrobiologických kritériách pre potraviny ustanovuje potreba vyčíslit' koagulázopozitívne stafylokoky vo vybraných kategóriách potravín a vykonať skrining SE, ak počet koagulázopozitívnych stafylokokov prekročí 105 **JTK/g** (obrázky 1 a 2).



	Micro-organisms	Sampling plan ⁽¹⁾		Limits ⁽²⁾		Analytical reference method ⁽³⁾	Stage where the criterion applies	Action in case of unsatisfactory results
		n	c	m	M			
1.21. Cheeses, milk powder and whey powder, as referred to in the coagulase-positive staphylococci criteria in Chapter 2.2 of this Annex	Staphylococcal enterotoxins	5	0	Not detected in 25g		European screening method of the CRL for Milk ⁽³⁾	Products placed on the market during their shelf-life	

Obrázok 1: Nariadenie Komisie (ES) č. 2073/2005 z 15. novembra 2005 o mikrobiologických kritériách pre potraviny – kritériá pre stafylokokové enterotoxíny vo vybraných kategóriách potravín.

Food category	Micro-organisms	Sampling plan ⁽¹⁾		Limits ⁽²⁾		Analytical reference method ⁽³⁾	Stage where the criterion applies	Action in case of unsatisfactory results
		n	c	m	M			
2.2.7. Milk powder and whey powder ⁽⁴⁾	Enterobacteriaceae	5	0	10 cfu/g		ISO 21528- 1	End of the manufacturing process	Check on the efficiency of heat treatment and prevention of recontamination
	Coagulase-positive staphylococci	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g	EN/ISO 6888-1 or 2	End of the manufacturing process	Improvements in production hygiene. If values > 10 ⁵ cfu/g are detected, the batch has to be tested for staphylococcal enterotoxins.
2.2.3. Cheeses made from raw milk	Coagulase-positive staphylococci	5	2	10 ⁴ cfu/g	10 ⁵ cfu/g	EN/ISO 6888-2	At the time during the manufacturing process when the number of staphylococci is expected to be highest	Improvements in production hygiene and selection of raw materials. If values >10 ⁵ cfu/g are detected, the cheese batch has to be tested for staphylococcal enterotoxins.
2.2.4. Cheeses made from milk that has undergone a lower heat treatment than pasteurisation ⁽⁵⁾ and ripened cheeses made from milk or whey that has undergone pasteurisation or a stronger heat treatment ⁽⁵⁾	Coagulase-positive staphylococci	5	2	100 cfu/g	1 000 cfu/g	EN/ISO 6888-1 or 2		
2.2.5. Unripened soft cheeses (fresh cheeses) made from milk or whey that has undergone pasteurisation or a stronger heat treatment ⁽⁵⁾	Coagulase-positive staphylococci	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g	EN/ISO 6888-1 or 2	End of the manufacturing process	Improvements in production hygiene. If values > 10 ⁵ cfu/g are detected, the cheese batch has to be tested for staphylococcal enterotoxins.
Food category	Micro-organisms	Sampling plan ⁽¹⁾		Limits		Analytical reference method ⁽³⁾	Stage where the criterion applies	Action in case of unsatisfactory results
2.4.1. Shelled and shucked products of cooked crustaceans and molluscan shellfish	E.coli	n	c	m	M			
		5	2	1 cfu/g	10 cfu/g	ISO TS 16649-3	End of the manufacturing process	Improvements in production hygiene
	Coagulase-positive staphylococci	5	2	100 cfu/g	1 000 cfu/g	EN/ISO 6888-1 or 2	End of the manufacturing process	Improvements in production hygiene

⁽¹⁾ n = number of units comprising the sample; c = number of sample units giving values between m and M.

⁽²⁾ The most recent edition of the standard shall be used.

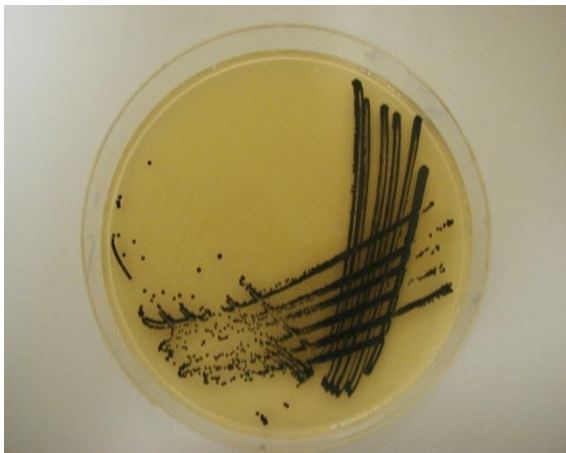
Obrázok 2: Nariadenie Komisie (ES) č. 2073/2005 z 15. novembra 2005 o mikrobiologických kritériách pre potraviny – kritériá počtu koagulázopozitívnych stafylokokov vo vybraných kategóriách potravín.

Dávka toxínu potrebná na vyvolanie intoxikácie je veľmi nízka. Balaban a Rasooly (2000) a Omoe et al. (2003) uviedli, že minimálna infekčná dávka SEA je 100 ng. V tomto ohľade by sa však mala zohľadniť aj individuálna citlivosť a telesná hmotnosť (Roberts a kol., 1996). Za priaznivých podmienok (optimálna teplota, pH, aw, koncentrácia soli) pre *S. aureus* trvá produkcia dostatočného množstva enterotoxínu na otravu jedlom najmenej 20 hodín (Sharma et al., 2000). Toxíny sa produkujú pri teplotnom rozmedzí od **10 °C do 48 °C**, s optimálnym

medzi 37 °C a 40 °C. Minimálne **pH vhodné na ich výrobu je asi 4,8**, pričom optimálny rozsah je medzi 6 a 7. **Minimum aw je 0,80–0,86**, ale optimálna produkcia sa dosahuje pri $aw = 0,99$ a vyššej. Vyššia produkcia toxínov sa pozoruje pri aeróbnych podmienkach ako za anaeróbných podmienok (Roberts a kol., 1996).

Stanovenie koagulázovo pozitívnych stafylokokov

Stanovenie počtu koagulázovo pozitívnych stafylokokov (*S. aureus* a iné druhy) v čiastkových vzorkách sa uskutočnilo horizontálnou metódou ISO 6888-1 (1999) s použitím **Baird-Parkerovho agaru** s emulziou vaječného žĺtka a teluritom (obrázok 3). Počas celého experimentu bol na identifikáciu **S. aureus** použitý test Staphylo La Seiken (*Denka Seiken Co., Ltd., Tokio, Japonsko*) (obrázok 4).



Obrázok 3: Príklad typických kolónií *S. aureus* na Baird-Parkerovom agare. (Foto: autor)



Obrázok 4: Staphylo La Seiken test - lacný a rýchly (2 minúty) test na detekciu *S. aureus* pomocou latexových aglutinačných kariet. Latexové častice v tejto sade sú senzibilizované fibrinogénnou a králičou plazmou, čo umožňuje rozlišovať medzi *S. aureus* a inými stafylokokmi. Pozitívna reakcia sa prejavuje aglutináciou. (Foto: autor)

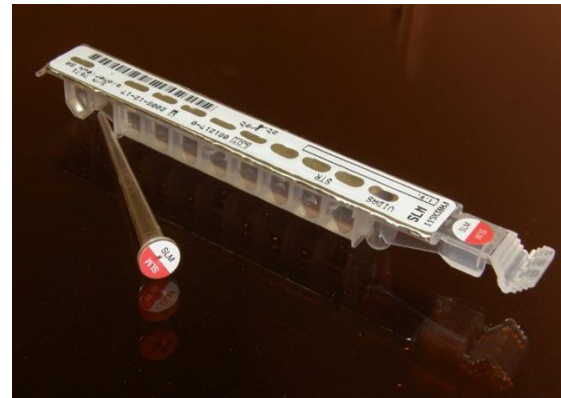
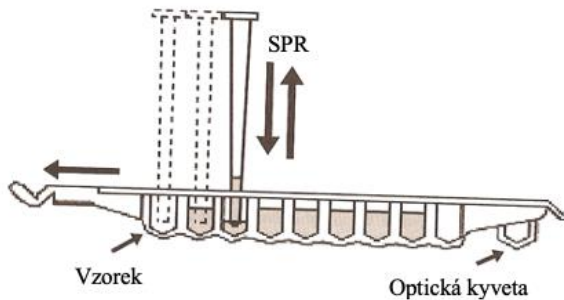
Dôkaz stafylokokových enterotoxínov

Detekcia stafylokokových enterotoxínov pomocou testu ELFA

Obsah SE je možné analyzovať enzýmovým imunofluorescenčným testom (ELFA) pomocou automatizovaného systému miniVIDAS® (Vitek Immuno Diagnostic Assay System, BioMérieux, Marcy l'Étoile, Francúzsko) (obrázok 5). Táto metóda je schopná detekovať enterotoxíny SEA–SEE (bez špecifikácie jednotlivých typov) s detekčným limitom 0,5 ng·g⁻¹ alebo ml⁻¹ v prípade potravín v prípade SEA a SEB a 1,0 ng·g⁻¹ alebo ml⁻¹ v prípade potravín v prípade SEC–SEE. Čiastkové vzorky (25 g) boli homogenizované extrakčným tlmivým roztokom (25 ml), spracované podľa pokynov výrobcu a analyzované pomocou testu prúžkov VIDAS SET2 (obrázok 6), pričom testovacie hodnoty (TV) $\geq 0,13$ indikovali pozitívny výsledok (obrázok 7).



Obrázok 5: Automatizovaný **prístroj VIDAS®**. Všetky kroky skúšky vykonáva prístroj automaticky po vložení **SPR®s** a **prúžkov**. (Fotografie: bioMérieux, Francúzsko; autor)



Obrázok 6: Nádoba **na tuhú fázu (SPR)**® je pipeta potiahnutá antistafylokokovými enterotoxínovými protilátkami. Reagenty na skúšku sú pripravené na použitie a vopred dávkované v zabezpečených **pásoch čidla**. Proces využíva plne automatizovaný stroj VIDAS.® (Foto: Baylis, 2003; bioMérieux, Francúzsko)

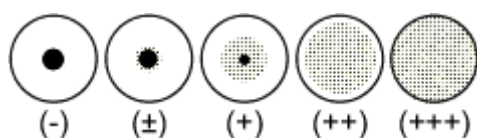
```

VFU BRNO
Section: A
Completed: 15:41:14 30Oct19
Staph enterotoxin II (SET2)
Ver: R5.6.1
Lot#: 200618-0
Standard used:
Completed: 15:41:14 30Oct19
RFV = 3899
TV Negative < 0.13
TV Positive >= 0.13
-----
Position: A1 Standard 1
Background: 152 RFV: 3847
Position: A2 Standard 1
Background: 150 RFV: 3952
Position: A3 Control 1
Background: 154 RFV: 3789
TV: 0.97 Result: Positive
Position: A4 Control 2
Background: 151 RFV: 13
TV: 0.00 Result: Negative
Position: A5
Sample ID: V25STA14
Background: 152 RFV: 2476
TV: 0.63 Result: Positive
Position: A6
Sample ID: V25STB14
Background: 153 RFV: 4078
TV: 1.04 Result: Positive
    
```

Obrázok 7: Na konci skúšky sú výsledky automaticky analyzované prístrojom, ktorý vypočíta test pre každú vzorku. **Vypočíta sa hodnota relatívnej fluorescence (RFV)** a interpretuje sa každý výsledok (**kladný, negatívny**). (Foto: autor)

Dôkaz stafylokokových enterotoxínov pomocou RPLA testu

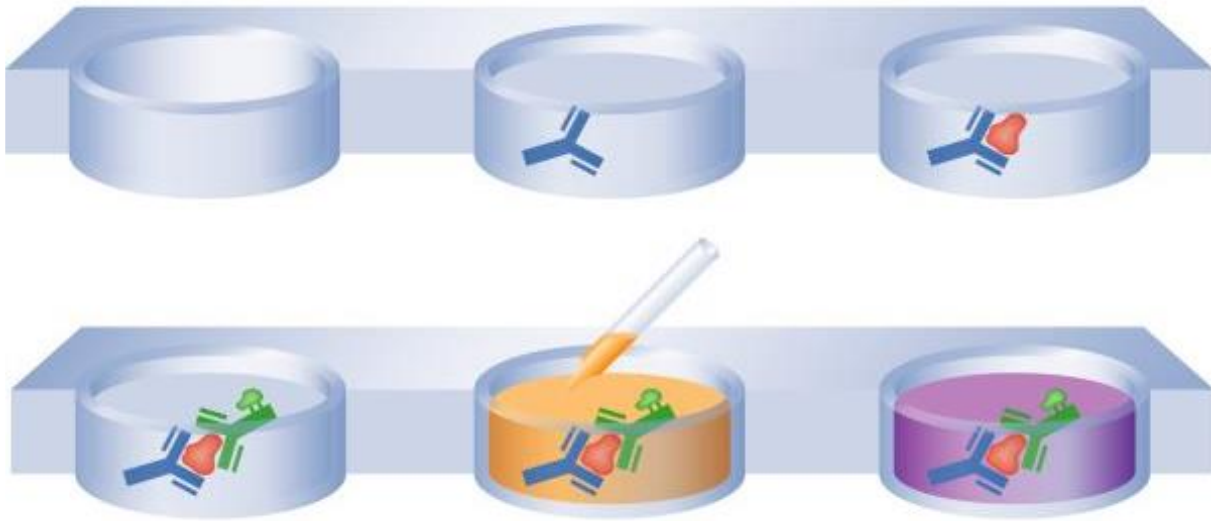
Produkcii enterotoxínov je možné testovať metódou **reverznej pasívnej latexovej aglutinácie (RPLA)** (Denka Seiken Co., Ltd., Japonsko). Polystyrénové latexové častice sú senzibilizované purifikovaným antisérom z králikov imunizovaných jednotlivou purifikovanými stafylokokovými enterotoxínmi A, B, C a D. Tieto latexové častice sa zhlukujú v prítomnosti zodpovedajúceho enterotoxínu. Poskytne sa kontrolné činidlo (latexové častice senzibilizované neimúnnymi králičími globulínmi). Test sa vykonáva na **mikrotitračných platničkách V-jamky**. Potravinový extrakt alebo kultúrny filtrát sa zriedi do piatich radov jamiek, do každej jamky sa pridá objem príslušnej latexovej suspenzie a obsah sa zmieša. Ak **sú prítomné stafylokokové enterotoxíny A, B, C alebo D, dochádza k aglutinácii**, čo vedie k tvorbe mriežkovej **štruktúry**. Po usadení sa vytvorí difúzna vrstva na základni studne. Ak stafylokokové enterotoxíny chýbajú alebo sú v koncentrácii nižšej ako úroveň detekcie skúšky, nemôže sa vytvoriť žiadna takáto mriežková štruktúra a **pozoruje sa tesné tlačidlo** (obrázok 8).



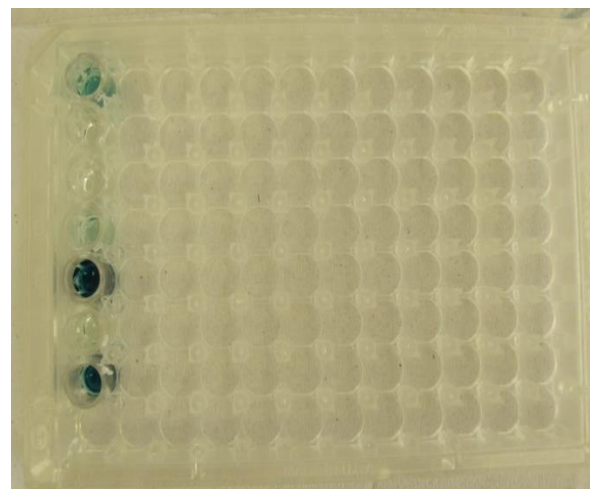
Obrázok 8: **Interpretácia výsledkov testov**. Aglutinačný vzor by sa mal posudzovať porovnaním s nasledujúcim obrázkom. Jamky označené (+), (++) a (+++) sa považujú za pozitívne.

Dôkaz stafylokokových enterotoxínov pomocou testu ELISA

V **enzýmovej imunosorbentnej skúške (ELISA)** enzým katalyzuje konverziu bezfarebného substrátu na farebný produkt, čo umožňuje vyhodnotenie výsledku testu voľným okom. Protilátky sa adsorbujú na povrchu (napr. jamky mikrotitračnej platničky) (obrázok 9). Sendvičový test ELISA, pozostávajúci z dvoch protilátok, ktoré zachytávajú alebo sendvičujú cieľový antigén, je najjednoduchší formát, ktorý sa najčastejšie používa v komerčne dostupných súpravách (obrázok 10).



Obrázok 9: ELISA test – schéma **testu ELISA**: testovacia jamka (vľavo hore) je potiahnutá špecifickými protilátkami (horný stred); protilátky zachytávajú cieľový antigén (vpravo hore), ak sú prítomné vo vzorke potraviny; označené detekčné protilátky viažu sa na antigén tvoriaci "sendvič" označený enzýmom schopným premeniť chromogénny substrát na farebný produkt sa pridá (vľavo dole); pridá sa chromogénny substrát (v strede dole); Enzým premieňa bezfarebný substrát na farebný produkt (vpravo dole).



Obrázok 10: Komerčne dostupný test ELISA; jamky so zeleným roztokom indikujú SE-
pozitívne vzorky. (Foto: autor)



Otázky:

- A. Prečo sa mlieko a mliečne výrobky považujú za rizikové z hľadiska *S. aureus* výskyt? S.
- B. Prečo *S. aureus* Vyskytujú sa častejšie v potravinách pripravovaných s vysokým stupňom manuálnej práce počas ich prípravy?
- C. Ako nazývame ochorenie spôsobené konzumáciou potravín obsahujúcich stafylokokové enterotoxíny (SE)?
- D. Koľko typov SE je známych, ako sú označené a ktoré z nich sú najbežnejšími činiteľmi pri intoxikáciách prenášaných potravinami?
- E. Tvorí sa SE v ľudskom gastrointestinálnom trakte alebo priamo v potrave? Aké podmienky sú potrebné na ich výrobu?
- F. Je každý *S. aureus* kmeň schopný vytvárať SE?
- G. Aká je suma *S. aureus* v potravinách, ktoré predstavujú riziko vzniku SE?
- H. Aké nariadenie podrobne opisuje kritériá počtu koagulázovo pozitívnych stafylokokov vo vybraných kategóriách potravín a na ktoré kategórie sa vzťahuje toto nariadenie?
- Ja. Aká metóda sa používa na stanovenie počtu koagulázovo pozitívnych stafylokokov (*S. aureus* a iné druhy)?
- J. Aké metódy možno použiť na detekciu SE?

Odpovede:

- A. *S. aureus* je jedným z hlavných činiteľov vo vývoji mastitídy.
- B. *S. aureus* je prirodzený komenzálny súbor ľudskej kože a sliznice, teda prítomný aj u zamestnancov potravinárskeho priemyslu.
- C. Ide o stafylokokovú enterotoxikózu.
- D. Existuje 24 typov, ktoré sú označené písmenami A – Y; stafylokoková enterotoxikóza je spôsobená klasickými SE: SEA–SEE.



- E. SE sú extracelulárne enterotoxíny vylučované baktériami priamo do potravy pri teplotnom rozmedzí 10–48 °C, minimálne pH je asi 4,8 a minimum aw cca 0,80–0,86.
- F. Nie, schopnosť tvoriť SE je prítomná len u približne 50 – 75 % kmeňov *S. aureus*.
- G. I je viac ako 10^5 JTK/g.
- H. nariadenie Komisie (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériách pre potraviny; Categories sú: syry, sušené mlieko a sušená srvátka, varené kôrovce a mäkkýše.
- Ja. Baird-Parkerova agarová metóda.
- J. ELFA, RPLA, ELISA.



2. Prípadové štúdie

Vo všetkých nižšie uvedených štúdiách sa použili nasledujúce metódy: stanovenie počtu *S. aureus* sa uskutočnilo použitím Baird-Parkerovej metódy počtu mikroorganizmov v súlade s ČSN EN ISO 6888-1 a platničky sa kultivovali pri teplote 37 ± 1 °C počas 24 ± 2 hodín a 48 ± 2 hodiny. Test Dry Spot Staphylect Plus (Oxoid, UK) bol použitý na potvrdenie podozrivých kolónií. Na detekciu produkcie SE bol použitý plne automatizovaný prístroj miniVIDAS® využívajúci technológiu ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

Štúdia 1 – Stafylokokové enterotoxíny v mlieku

Pani Schwarzová sa používa na nákup surového kravského mlieka z dávkovača mlieka na farme neďaleko jej domu. Doma vždy vykoná pasterizáciu mlieka pri 85 °C a následne mlieko uloží do chladničky. Posledný nákup uskutočnila cestou od svojho dermatológa, ktorého navštevuje kvôli hnisavým kožným léziám na rukách. Tentoraz pasterizovala iba polovicu zakúpeného mlieka, pretože nemala hrniec dostatočnej veľkosti. Pri odstraňovaní nečistôt z mlieka lyžičkou lyžica spadla do mlieka a rukami ju vytiahla. To isté sa stalo pri miešaní mlieka počas pasterizácie - lyžicu však vytiahla rukou až po vychladnutí mlieka. Okrem toho zabudla obe dávky mlieka na kuchynskom stole až do rána, keď z oboch pila. Prvé príznaky stafylokokovej enterotoxikózy (silné vracanie a hnačka) sa objavili po obede. Je pravdepodobné, že obe šarže mlieka boli kontaminované toxigénnymi kmeňmi *S. aureus*.

- A. Ktorý typ mlieka (surového alebo pasterizovaného) s väčšou pravdepodobnosťou obsahoval stafylokokové enterotoxíny?**
- B. Ako mala pani Schwarzová zabrániť tejto otrave jedlom?**

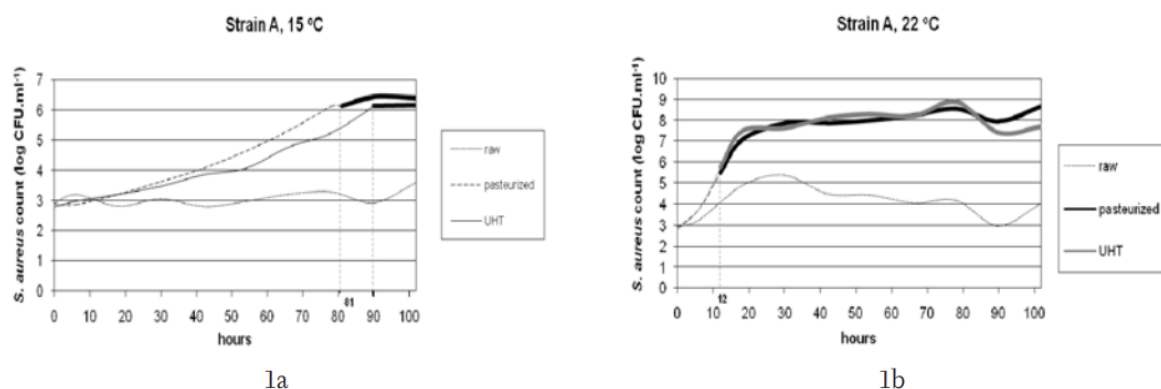
Odpovedzte na tieto otázky na základe výsledkov nasledujúcej štúdie.

Táto štúdia (Janštová et al., 2012) odhalila odchýlky v počte *S. aureus* počas kultivačného obdobia a doby produkcie SE v závislosti od kmeňa *S. aureus*, podmienok skladovania a druhu mlieka.

Použili sa kmene S. aureus produkujúce SEA, SEB a SEC (kmene A, B a C). Rôzne druhy mlieka, ktoré mali negatívny test na *S. aureus*, boli naočkované $2,0 \times 10^1$ – $1,4 \times 10^3$ CFU.ml⁻¹ vyššie uvedených kmeňov. Testované vzorky mlieka zahŕňali surové mlieko z

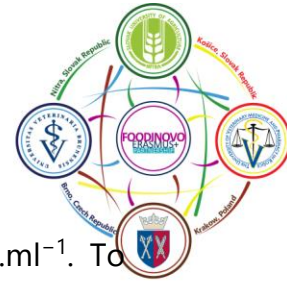
automat na mlieko (3,9 – 4,1 % tuku) a maloobchodné pasterizované a UHT polotučné mlieko. Naočkované vzorové vzorky mlieka boli inkubované pri teplote 15 °C a 22 °C (izbová teplota), aby sa simulovali nevhodné podmienky prepravy a skladovania. Experimenty sa vždy uskutočňovali paralelne. Dve skupiny platní v každom experimente boli naočkované s odstupom 12 hodín, aby pokryli 24 hodín. Na zisťovanie SE sa použil trojhodinový interval odberu vzoriek. Výpočet *S. aureus* sa uskutočnil v 12-hodinovom intervale a priemerné hodnoty boli vypočítané z výsledkov paralelných a opakovaných experimentov. Počas inkubácie sa pravidelne meralo pH modelových vzoriek.

Keď bolo surové mlieko naočkované kmeňom A a skladované pri teplote 15 °C (obr. 11a), počet *S. aureus* sa zvýšil z log 2,92 CFU.ml⁻¹ na log 3,61 JTK. ml⁻¹ a produkcia SEA nebola zistená počas celej doby skladovania (102 hodín). Po 102 hodinách inkubácie dosiahli počty *S. aureus* log 6,41 CFU.ml⁻¹ v pasterizovanom mlieku a log 6,18 CFU.ml⁻¹ v UHT mlieku. Prítomnosť enterotoxínu A sa zistila v pasterizovanom mlieku po 81 hodinách inkubácie a v UHT mlieku po 90 hodinách inkubácie, ako je znázornené na obrázku 11a a tabuľke 1. Výraznejšie zvýšenie počtu *S. aureus* a skoršej produkcie enterotoxínov sa pozorovalo, keď sa naočkované vzorky pasterizovaného a UHT mlieka kultivovali pri teplote 22 °C (obrázok 11b). Pri tejto teplote bola produkcia SEA zistená už 12 hodín po očkovaní. V surovom mlieku inkubovanom pri teplote 22 °C sa produkcia SEA nezistila počas celého obdobia inkubácie napriek skutočnosti, že počty *S. aureus* krátkodobo dosiahli limit 10⁵ CFU.ml⁻¹ (obrázok 11b).

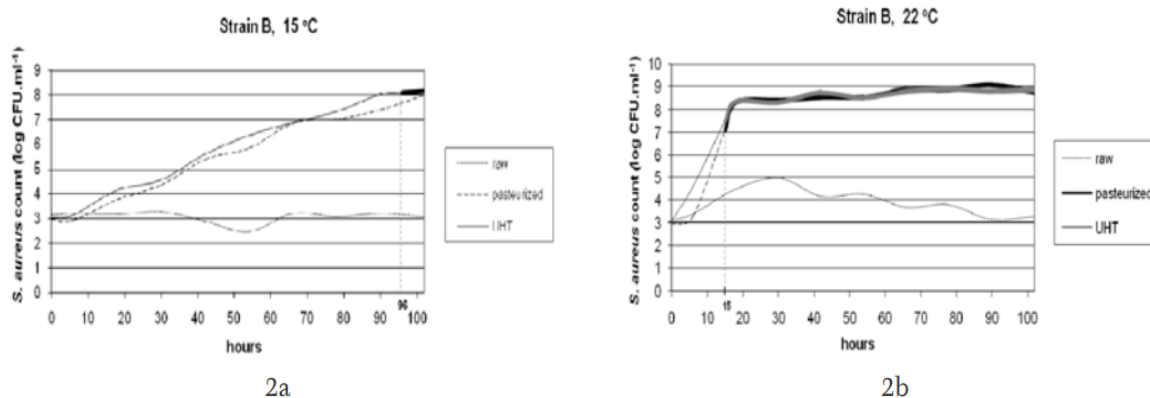


Obrázok 11: Rýchlosť rastu a čas *S. aureus* do prvej detekcie SEA, SEB, SEC v surovom, pasterizovanom a UHT mlieku skladovanom pri teplote 15 °C (1a) a 22 °C (1b).

V modelových vzorkách mlieka naočkovaných kmeňom B a kultivovaných pri teplote 15 °C bol kritický počet *S. aureus* 10⁵ JTK. ml⁻¹ prekročený pre pasterizované mlieko a UHT mlieko až po 30 hodinách kultivácie (obrázok 12a). Produkcia enterotoxínov sa zistila v UHT mlieku až po 96 hodinách kultivácie (tabuľka 1). V pasterizovanom mlieku nebola pozorovaná ani produkcia SEB



po 102 hodinách kultivácie, hoci počet *S. aureus* dosiahol $\log 8,00 \text{ CFU.ml}^{-1}$. To znamená, že skladovacia teplota 15°C nie je optimálna pre výrobu SEB v kmeni B. Ako uvádza Roberts et al. (1996), za určitých podmienok teploty, pH a a_w je možné, aby *S. aureus* rástol bez produkcie enterotoxínu. Pri kultivácii pri teplote 22°C *S. aureus* prekročil hodnotu 10^5 CFU.ml^{-1} skoro, t. j. počas prvých 24 hodín inkubácie, a produkcia SEB bola zistená po 15 hodinách inkubácie (obrázok 12b). V surovom mlieku kmeň B vykazoval podobné výsledky ako kmeň A. Produkcia SEB nebola zistená počas celého inkubačného času napriek skutočnosti, že pri 22°C počet *S. aureus* dosiahol limit rizika 10^5 CFU.ml^{-1} na krátky čas.



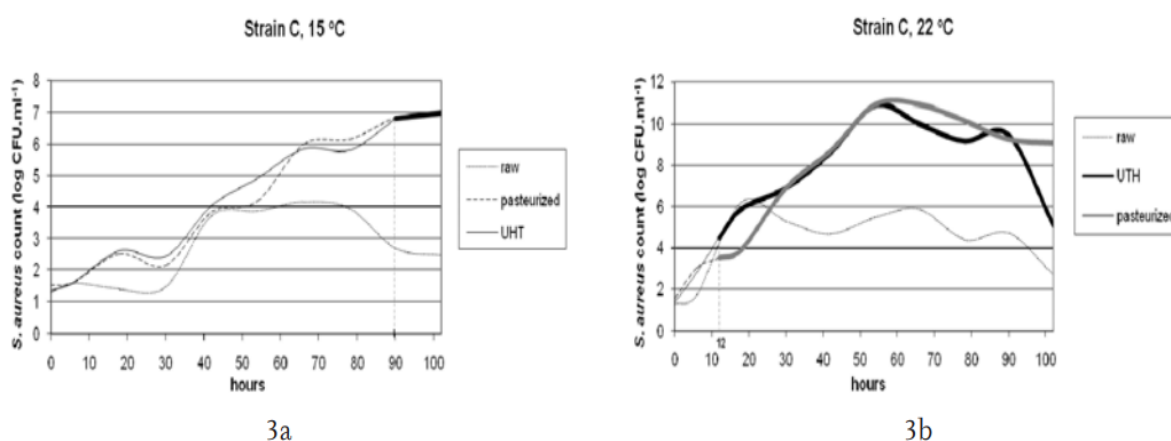
Obrázok 12: Rýchlosť rastu *S. aureus* a čas do prvej detekcie SEA, SEB, SEC v surovom, pasterizovanom a UHT mlieku skladovanom pri teplote 15°C (2a) a 22°C (2b).

Keď bolo pasterizované mlieko a UHT mlieko naočkované kmeňom C a kultivované pri teplote 15°C (obrázok 13a), počet *S. aureus* po 102 hodinách inkubácie dosiahol $\log 7,00 \text{ CFU.ml}^{-1}$ a $\log 6,99 \text{ CFU.ml}^{-1}$. Produkcia SEC bola zistená v UHT mlieku až po 90 hodinách kultivácie. Pri kultivácii pri teplote 22°C (obrázok 13b) vykazoval *S. aureus* vysokú rýchlosť rastu a produkcia SEC bola prvýkrát zistená po 12 hodinách inkubácie. V surovom mlieku vykazoval *S. aureus* nižšiu rýchlosť rastu pri 15°C aj 22°C a nebola zistená žiadna produkcia SEC napriek skutočnosti, že pri 22°C bol dosiahnutý rizikový limit 10^5 CFU.ml^{-1} .

Skutočnosť, že *S. aureus* vykazoval podstatne nižšiu mieru rastu v surovom mlieku v porovnaní s pasterizovaným mliekom a mliekom UHT, ktoré nesúviselo s produkciou SE, možno vysvetliť v súlade s Charlier et al. (2009) prítomnosťou prirodzenej mikroflóry, najmä baktérií mliečneho kvasenia, ktoré znižujú pH v surovom mlieku, čo môže zabrániť *S. aureus* rast a produkcia enterotoxínov. Tento inhibičný účinok pozorovali aj Alomar et al. (2008). *S. aureus* je údajne schopný rásť, keď



Hodnoty pH sa pohybujú od 4,6 do 10 s optimálnym rastom, keď je hodnota pH blízka neutrálnej hodnote (Charlier et al., 2008), čo potvrdili Necidová et al. (2009), ktorí zistili, že minimálne pH kompatibilné s produkciou SE je 4,8. pH vzorových vzoriek surového mlieka merané po 102 hodinách inkubácie pri 15 °C a 22 °C bolo v rozmedzí od 4,17 do 4,47. Príslušné hodnoty pH pre pasterizované a UHT mlieko boli oveľa vyššie, v rozmedzí od 6,11 do 6,89, čo bolo v optimálnom rozsahu pre výrobu SE. *S. aureus* je schopný rásť v širokom rozmedzí teplôt od 7 °C do 48,5 °C, s optimálnym rastom od 30 °C do 37 °C. Enterotoxíny sa produkujú medzi 10 a 46 °C (Schmitt a kol., 1990). V tejto štúdii bol zaznamenaný najvyšší počet *S. aureus* pre kmeň produkujúci enterotoxíny A, B a C, keď bol kultivovaný v pasterizovanom a UHT mlieku pri teplote 22 °C. Náš experiment preto potvrdil predpoklad, že čím nižšia je inkubačná teplota, tým nižšia je rýchlosť rastu *S. aureus* a tým dlhší je čas do produkcie SE.



Obrázok 13: Rýchlosť rastu *S. aureus* a čas do prvej detekcie SEA, SEB, SEC v surovom, pasterizovanom a UHT mlieku skladovanom pri teplote 15 °C (3a) a 22 °C (3b).

Tabuľka 1: Čas (v hodinách) do prvého zistenia SE v surovom, pasterizovanom a UHT mlieku naočkovanom kmeňmi *S. aureus* produkujúcimi enterotoxín a inkubovanom pri teplote 15 °C a 22 °C.

Druh mlieka	Produkcia enterotoxínov (v hodinách)					
	MORE		SEB		SEC	
	15 °C	22 °C	15 °C	22 °C	15 °C	22 °C
Surové mlieko	-	-	-	-	-	-
Pasterizované mlieko	81	12	-	15	-	12
UHT mlieko	90	12	96	15	90	12



Výsledky tejto štúdie ukazujú, že najnižšie riziko produkcie SE sa pozoruje v surovom mlieku, napriek kritickému počtu *S. aureus* 10^5 JTK/g, ktorý bol krátko dosiahnutý počas inkubačnej doby pri teplote 22 °C. Najvyššie riziko produkcie SE je spojené so sekundárnou kontamináciou pasterizovaného a UHT mlieka pri skladovaní pri izbovej teplote (tabuľka 1).

Odpovede:

- A. SE sa s väčšou pravdepodobnosťou vyvinuli v pasterizovanom mlieku. *S. aureus* vykazoval podstatne nižšie tempo rastu surového mlieka v porovnaní s pasterizovaným a UHT mliekom. Tieto nižšie rýchlosti rastu neboli spojené s produkciou SE vďaka prítomnosti prirodzenej mikroflóry, najmä baktérií mliečneho kvasenia, ktoré znižujú pH v surovom mlieku, čo môže brániť rastu *S. aureus* a produkciu enterotoxínov. Tieto výsledky však nepodporujú rizikovú konzumáciu surového kravského mlieka, pretože môžu byť prítomné aj iné patogény.
- B. Pani Schwarzová mala čo najskôr ochladiť surové aj pasterizované mlieko a skladovať ho pri teplote nižšej ako 8 °C. Rozhodne nemala ponoriť ruky do mlieka, najmä preto, že na nich boli hnisavé rany.



Štúdia 2 – Stafylokokové enterotoxíny v čerstvom syre

Pán Müller vyrába na svojej farme čerstvý syr. Mlieko pochádza z piatich kráv, ktoré chová. Niekoľko zákazníkov, ktorí od neho kupovali čerstvý syr, ho minulý týždeň informovalo, že trpia silnou hnačkou a vracaním, ktoré trvali 1 deň a potom sa zotavili. Spotrebitelia nešli k lekárovi a nezistili príčinu. Pán Müller používa proces pasterizácie pri teplote 72 °C počas 15 sekúnd na výrobu čerstvého syra.

- A. Mohla to byť stafylokoková enterotoxikóza spôsobená konzumáciou čerstvého syra pána Müllera?
- B. Zlepšilo by zvýšenie teploty pasterizácie na 85 °C bezpečnosť produktu?
- C. Ak bolo mlieko kontaminované *S. aureus* až po pasterizácii mlieka a skladovaní výrobkov podľa legislatívnych požiadaviek pri teplotách nižších ako 8 °C mohli *S. aureus* rásť v syre a produkovali stafylokokové enterotoxíny?

Odpovedzte na tieto otázky na základe výsledkov nasledujúcej štúdie.

Cieľom tejto štúdie (Necidová et al., 2009) bolo sledovať rastové charakteristiky piatich kmeňov *S. aureus* a ich potenciál produkovať enterotoxíny v rôznych štádiách výroby mäkkých syrov.

V modelových experimentoch bolo surové kravské mlieko naočkované oddelene piatimi kmeňmi *S. aureus*. Všetkých päť kmeňov bolo producentmi enterotoxínov typu A, B alebo C (SA1185 SEA, SA1200 SEB, SA1057 SEB, SA1089 SEB a SA843 SEC). Schopnosť kmeňov produkovať enterotoxíny bola testovaná metódou reverznej pasívnej latexovej aglutinácie (Denka Seiken Co., Ltd., Japonsko). Každá vzorka mlieka bola naočkovaná dvoma rôznymi dávkami *S. aureus*, nízkymi ($s < 5 \times 10^1$ až $4,8 \times 10^3$ JTK/ml) a vysokými ($5,3 \times 10^4$ – $2,9 \times 10^5$ JTK/ml). Očkovanie sa uskutočnilo dvoma spôsobmi: buď 12–16 hodín pred pasterizáciou (experiment 1) alebo po pasterizácii (experiment 2). Ošetrené mlieko sa použilo na výrobu mäkkého syra podľa štandardného postupu: mlieko sa pasterizuje pri rôznych teplotách, 72 °C a 85 °C, počas 15 s [ako sa uvádza v nariadení Komisie (ES) č. 853/2004], pridáva sa CaCl₂ a kultúra kyslej smotany (Milcom a.s., Laktoflora, Česká republika), po ktorých nasleduje syridlo (Milcom a.s., Laktoflora, Česká republika), zmes sa zráža pri teplote 30 °C počas 1 hodiny, tvaroh sa spracuje, lisuje do foriem a nechá sa cez noc odtečť pri izbovej teplote (24 °C), solí a okorení. Syr sa balí a skladuje pri teplote 4 °C a 8 °C počas 5 dní. Vzorky na bakteriálnu analýzu boli odobraté v rôznych štádiách výroby a skladovania



(tabuľky 1 a 2). Charakteristiky mäkkého syra boli nasledovné: pH = 4,6–4,8, aw = 0,98–0,99, NaCl = 2% (w/v).

V tabuľke 2 sú uvedené počty *S. aureus* stanovené v mlieku a v rôznych štádiách procesu výroby syra. V mlieku naočkovanom nízkym počtom *S. aureus* sa počas následných technologických operácií nepozorovala žiadna proliferácia činiteľa. Pasterizácia pri teplote 72 °C a 85 °C počas 15 sekúnd úplne eliminovala stafylokoky v mlieku. Keď bolo mlieko naočkované vysokým počtom *S. aureus*, ako bezpečná sa ukázala iba vyššia teplota pasterizácie. Nižšia teplota pasterizácie znížila počet stafylokokov približne o tri rády; kritický počet 10^5 JTK/ml však nebol prekročený v žiadnej vzorke v žiadnom štádiu technologického procesu (tabuľka 2). Žiadna z modelových vzoriek nebola pozitívna pri detekcii SE. Oba použité pasterizačné postupy boli dostatočne bezpečné na zníženie počtu *S. aureus* na úroveň, ktoré nie sú schopné produkovať stafylokokové enterotoxíny v takých vysokých množstvách, aké sú potrebné na to, aby spôsobili intoxikáciu potravinami.

Tabuľka 2: Počet *S. aureus* (JTK/g) v rôznych štádiách výroby mäkkého syra (mlieko naočkované kmeňom SA1057 pred pasterizáciou).

Production and storage stage	Innoculation with low counts of <i>S. aureus</i>		Innoculation with high counts of <i>S. aureus</i>	
	pasteurisation temperature per 15 s			
	72°C	85°C	72°C	85°C
Prior to pasteurisation (12 h after inoculation)	2.3×10^1	1.9×10^3	2.5×10^5	2.4×10^5
After pasteurisation	$< 5 \times 10^1$	$< 5 \times 10^1$	5.0×10^2	$< 5 \times 10^1$
After renneting	$< 5 \times 10^1$	$< 5 \times 10^1$	1.5×10^3	$< 5 \times 10^1$
During the pressing	$< 5 \times 10^1$	$< 5 \times 10^1$	4.1×10^3	$< 5 \times 10^1$
Prior to salting	$< 5 \times 10^1$	$< 5 \times 10^1$	1.7×10^4	$< 5 \times 10^1$
Storage day 1, at 4°C	$< 5 \times 10^1$	$< 5 \times 10^1$	2.6×10^3	$< 5 \times 10^1$
Storage day 1, at 8°C	$< 5 \times 10^1$	$< 5 \times 10^1$	4.1×10^3	$< 5 \times 10^1$
Storage day 2, at 4°C	$< 5 \times 10^1$	$< 5 \times 10^1$	6.3×10^3	$< 5 \times 10^1$
Storage day 2, at 8°C	$< 5 \times 10^1$	$< 5 \times 10^1$	6.9×10^3	$< 5 \times 10^1$
Storage day 5, at 4°C	$< 5 \times 10^1$	$< 5 \times 10^1$	3.3×10^3	$< 5 \times 10^1$
Storage day 5, at 8°C	$< 5 \times 10^1$	$< 5 \times 10^1$	5.9×10^3	$< 5 \times 10^1$

Modelový experiment opísaný v tabuľke 3 simuluje možnú sekundárnu kontamináciu mäkkého syra *S. aureus* počas výroby a skladovania alebo počas výroby syra z nepasterizovaného mlieka. Mlieko bolo po pasterizácii naočkované toxigénnymi kmeňmi. SE boli zistené len vtedy, keď toxigénny kmeň SA1185 (SEA



výroba) boli použité. S týmto kmeňom sa získali najvyššie stafylokokové počty zo všetkých experimentov (až do $3,2 \times 10^6$ JTK/g). Prvým výrobným štádiom, v ktorom boli SE zistené, bolo lisovanie 7 hodín po naočkovaní pasterizovaného mlieka, pričom počet *S. aureus* dosiahol $4,3 \times 10^5$ JTK/g. V tomto časovom intervale bol vyrobený mäkký syr vystavený teplote 30 °C počas jednej hodiny počas syrenia. Potom bol produkt lisovaný pri izbovej teplote 24 °C po dobu približne 12 hodín.

Tabuľka 3: Počet *S. aureus* (JTK/g) v rôznych štádiách výroby mäkkých syrov (mlieko naočkované po pasterizácii).

Table 2. *S. aureus* counts (CFU/g) at various stages of soft cheese making (milk inoculated after pasteurisation)

Production and storage stage	Inoculation with low counts of <i>S. aureus</i>					Inoculation with high counts of <i>S. aureus</i>				
	1057	1089	843	1200	1185	1057	1089	843	1200	1185
After pasteurisation	3.3×10^3	4.6×10^3	4.8×10^3	$< 5 \times 10^1$	3.2×10^3	5.3×10^4	1.8×10^5	2.5×10^5	1.3×10^5	2.9×10^5
After renneting	3.4×10^3	4.8×10^3	4.9×10^3	$< 5 \times 10^1$	3.7×10^3	6.5×10^4	2.4×10^5	2.4×10^5	3.6×10^5	1.4×10^5
During the pressing	2.1×10^3	5.5×10^3	5.3×10^3	$< 5 \times 10^1$	3.6×10^4	6.6×10^5	2.0×10^5	1.5×10^5	2.4×10^5	4.3×10^5
Prior to salting	1.5×10^4	1.8×10^4	3.0×10^3	$< 5 \times 10^1$	3.5×10^4	1.0×10^6	2.5×10^5	6.9×10^4	4.2×10^5	1.6×10^6
Storage day 1, at 4°C	$< 5 \times 10^2$	5.5×10^2	9.3×10^2	$< 5 \times 10^1$	2.2×10^4	3.4×10^5	$< 5 \times 10^3$	2.2×10^4	6.3×10^4	1.6×10^6
Storage day 1, at 8°C	3.5×10^3	4.2×10^3	9.3×10^2	$< 5 \times 10^1$	3.9×10^4	4.5×10^5	2.9×10^5	1.7×10^4	2.3×10^5	1.2×10^6
Storage day 2, at 4°C	2.9×10^3	$< 5 \times 10^1$	8.5×10^2	$< 5 \times 10^1$	4.9×10^4	2.0×10^5	1.5×10^4	2.6×10^4	8.5×10^4	1.6×10^6
Storage day 2, at 8°C	3.1×10^3	1.3×10^3	7.3×10^2	$< 5 \times 10^1$	6.9×10^4	7.3×10^4	5.3×10^4	2.7×10^4	1.8×10^5	3.2×10^6
Storage day 5, at 4°C	7.5×10^2	$< 5 \times 10^1$	$< 5 \times 10^1$	$< 5 \times 10^1$	4.7×10^4	$< 5 \times 10^3$	$< 5 \times 10^2$	$< 5 \times 10^2$	$< 5 \times 10^3$	$< 5 \times 10^4$
Storage day 5, at 8°C	1.6×10^3	$< 5 \times 10^1$	$< 5 \times 10^1$	$< 5 \times 10^1$	6.0×10^4	$< 5 \times 10^4$	3.9×10^4	$< 5 \times 10^2$	$< 5 \times 10^3$	$< 5 \times 10^4$

*samples positive for staphylococcal enterotoxins

Väčšina mäkkých syrov z modelových experimentov nebola v súlade s nariadením Komisie (ES) č. 2073/2005, v ktorom sa stanovuje limit pre koagulázovo pozitívne stafylokoky na $10^1 - 10^2$ JTK/g. Šesť z 28 vzoriek preukázalo počet *S. aureus* $> 10^5$



JTK/g a podľa nariadenia by sa mali ďalej vyšetrit' na prítomnosť stafylokokových enterotoxínov.

Výsledky štúdie potvrdili, že mlieko s obsahom *S. aureus* vyšším ako 10^5 JTK/g nie je vhodné na výrobu mäkkého syra. Keďže nariadenie Komisie (ES č. 853/2004) špecifikuje limit celkového počtu mikroorganizmov (TPC) pre dodané surové mlieko na 10^5 JTK/ml, neočakáva sa, že by sa bezpečný limit pre počet *S. aureus* v surovom mlieku prekročil. Za štandardných výrobných podmienok by prítomnosť stafylokokových enterotoxínov v mäkkých syroch naznačovala sekundárnu kontamináciu *S. aureus*. Hlavnými predpokladmi bezpečnej výroby sú predovšetkým prevencia sekundárnej kontaminácie a údržba chladiaceho reťazca počas skladovania, prepravy a distribúcie mäkkých syrov.

Odpovede:

A. *Áno, je to možné. Syr je vysoko riziková potravina z hľadiska výskytu S. aureus, ako vyplýva z nariadenia Komisie (ES) č. 2073/2005 z 15. novembra 2005 o mikrobiologických kritériách pre potraviny.*

2.2.3. Cheeses made from raw milk	Coagulase-positive staphylococci	5	2	10^4 cfu/g	10^3 cfu/g	EN/ISO 6888-2	At the time during the manufacturing process when the number of staphylococci is expected to be highest	Improvements in production hygiene and selection of raw materials. If values $>10^4$ cfu/g are detected, the cheese batch has to be tested for staphylococcal enterotoxins.
2.2.4. Cheeses made from milk that has undergone a lower heat treatment than pasteurisation (†) and ripened cheeses made from milk or whey that has undergone pasteurisation or a stronger heat treatment (†)	Coagulase-positive staphylococci	5	2	100 cfu/g	1 000 cfu/g	EN/ISO 6888-1 or 2		
2.2.5. Unripened soft cheeses (fresh cheeses) made from milk or whey that has undergone pasteurisation or a stronger heat treatment (†)	Coagulase-positive staphylococci	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g	EN/ISO 6888-1 or 2	End of the manufacturing process	Improvements in production hygiene. If values $> 10^1$ cfu/g are detected, the cheese batch has to be tested for staphylococcal enterotoxins.

B. *B. Áno, ako ukazuje tabuľka 2, teplota pasterizácie 85 °C úplne inaktivovala S. aureus, aj keď bol pred pasterizáciou prítomný vyšší počet baktérií. Ako vyplýva z tabuľky 3, hoci vyššia teplota pasterizácie by lepšie odstránila baktérie zo surového mlieka, aj nižšia teplota poskytla dostatočnú ochranu proti zvýšeniu počtu baktérií nad rizikú úroveň 10^5 JTK/ml. Preto je pravdepodobné, že ku kontaminácii v tomto prípade došlo až po pasterizácii a zvýšená teplota pasterizácie by pravdepodobne nemala žiadny účinok.*

C. *C. Ak by bolo mlieko kontaminované vyšším množstvom S. aureus po pasterizácii, SE by mohli byť prítomné v čerstvom syre, aj keď bol skladovaný pri teplotách nižších ako 8 °C, pretože SE by vznikli hneď na začiatku výrobného procesu, t. j. pri opätovnom sieťovaní a scedení pri vyšších teplotách.*



Štúdia 3 – Stafylokokové enterotoxíny v sušenom mlieku

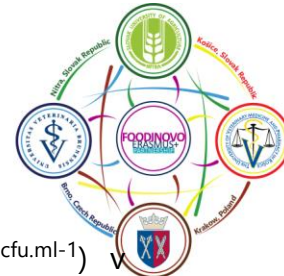
Jednotka intenzívnej starostlivosti detského oddelenia regionálnej nemocnice v Brne (Česká republika) lieči prípad 4-mesačného dieťaťa prijatého z dôvodu pretrvávajúcej hnačky a vracania. Jedinou potravinou, ktorú dieťa konzumuje, je sušená dojčenská výživa. Dieťa vyvinulo príznaky alimentárnej intoxikácie ihneď po konzumácii mlieka, ktoré matka pripravila o 8. hodine ráno, nechala ho na kuchynskom stole a krmila ho dieťaťom až o 18:00, po návrate z jednodňového výletu.

- A. Je možné, že dieťa trpí stafylokokovou enterotoxikózou? Mohla sušená dojčenská výživa obsahovať *S. aureus*?
- B. Pri akej teplote a čase by mohla *S. aureus* v rozriedenom mlieku dosiahli úroveň rizika uvedenú v log 5 ($> 10^5$) JTK/g od ktorého založenia SE?
- C. Pri akých skladovacích teplotách (tabuľka 2) boli SE zistené v rekonštituovanom mlieku? Ako mohla matka zabrániť tejto chorobe?

Odpovedzte na otázky na základe výsledkov nasledujúcej štúdie.

Cieľom štúdie Bogdanivičovej et al. (2017) bolo preskúmať dynamiku rastu *S. aureus* a produkciu stafylokokových enterotoxínov A, B a C v rekonštituovanom sušenom mlieku a vyhodnotiť potenciál produkcie SEA, SEB a SEC v rekonštituovanom sušenom mlieku, ktorý bude alebo nebude spĺňať parametre požadované európskou legislatívou (100 cfu.g⁻¹) a bude (4 °C) alebo nebude (15 °C, 25 °C) byť riadne skladované.

Vzorky sušeného mlieka (Hami počiatočná dojčenská výživa, Nutricia Inc.) boli kontaminované 1 ml suspenziou *S. aureus* vytvorenej pomocou McFarlandovho štandardu (prvá ekvivalencia zodpovedá počtu 3×10^8 baktérií/ml) a dôkladne premiešané. Naočkované sušené mlieko sa rekonštituovalo prevarenou vodou ochladenou na 40 °C v pomere odporúčanom výrobcou (13,5 g počiatočnej dojčenskej výživy + 90 ml vody). Táto situácia vytvorila rekonštitovaný model mlieka týkajúci sa spotrebiteľského hľadiska. Nižšie a vyššie počty *S. aureus* boli vopred navrhnuté pomocou matematického výpočtu. Skutočný a presný počet *S. aureus* v rekonštituovanom mlieku sa stanovil metódou špecifikovanou v každej vzorke (9 pre nízky počet a 9 pre vyšší). Tieto vzorky mlieka boli tiež naočkované dvoma riedeniami – nízkym počtom ($5,0 \times 10^0$ – $2,7 \times 10^1$ cfu.g⁻¹) alebo vysokým počtom ($1,3 \times 10^4$ – $2,0 \times 10^4$ cfu.g⁻¹) jedného z deviatich toxigénnych kmeňov *S. aureus* s produkciou SEA, SEB alebo SEC.



Tabuľka 4: Priemerné a maximálne hodnoty počtu *S. aureus* (log cfu.ml⁻¹) v rekonštituovanom mlieku (N = 9).

Čas (hodín)	Očkovanie s nízkym počtom <i>S. aureus</i> (5.0×100 – 2.7×101 KTJ.G-1)			Očkovanie s vysokým počtom <i>S. aureus</i> (1.3×104 – 2.0×104 KTJ.G-1)		
	Skladovacia (inkubačná) teplota					
	4 °C	15 °C	25 °C	4 °C	15 °C	25 °C
0	1.37 (2.45)	1.37 (2.45)	1.37 (2.45)	4.22 (4.30)	4.22 (4.30)	4.22 (4.30)
2	1.30 (2.00)	1.29 (1.60)	1.42 (1.70)	4.44 (5.52)	4.29 (4.57)	4.54 (4.75)
4	1.36 (1.70)	1.31 (1.60)	2.24 (2.58)	4.43 (5.20)	4.38 (4.59)	5.15 (5.45)
5	1.36 (1.70)	1.36 (1.78)	2.43 (2.72)	4.24 (4.51)	4.41 (4.75)	5.38 (5.82)
6	1.23 (1.85)	1.20 (1.70)	2.60 (2.93)	4.25 (4.52)	4.26 (4.59)	5.86 (6.30)
7	1.38 (1.85)	1.38 (1.78)	3.01 (3.30)	4.29 (4.45)	4.41 (4.60)	6.25 (6.75)
8	1.39 (1.60)	1.51 (1.90)	3.54 (4.90)	4.25 (4.46)	4.47 (4.71)	6.58 (7.04)
9	1.38 (1.78)	1.50 (2.08)	3.91 (4.40)	4.31 (4.45)	4.60 (4.90)	6.88 (7.43)
10	1.29 (1.60)	1.47 (1.95)	4.23 (4.60)	4.27 (4.38)	4.77 (4.87)	7.26 (7.73)
11	1.40 (1.85)	1.69 (2.18)	4.48 (5.18)	4.32 (4.51)	4.80 (4.93)	7.35 (7.70)
12	1.27 (1.60)	1.83 (2.11)	4.84 (5.38)	4.28 (4.52)	4.91 (5.23)	7.61 (7.87)
24	1.51 (1.70)	2.60 (3.18)	7.44 (7.76)	4.28 (4.54)	5.89 (6.23)	8.21 (8.58)
48	1.20 (1.70)	4.56 (4.95)	8.09 (9.00)	4.27 (4.41)	7.23 (7.52)	8.49 (8.64)

Tabuľka 5: Čas prvej detekcie (hodiny) SE v sušenom mlieku naočkovanom *S. aureus* po rekonštitúcii. Celková inkubačná doba bola 48 hodín.

Kmene (SE)	Očkovanie s nízkym počtom <i>S. aureus</i> (5.0×100 – 2.7×101 KTJ.G-1)			Očkovanie s vysokým počtom <i>S. aureus</i> (1.3×104 – 2.0×104 KTJ.G-1)		
	Skladovacia (inkubačná) teplota					
	4 °C	15 °C	25 °C	4 °C	15 °C	25 °C
SA 393 (MORE)	-	-	24	-	48	8
SA 562 (MORE)	-	-	24	-	48	8
SA 650 (MORE)	-	-	48	-	-	24
SA 536 (SEB)	-	-	48	-	-	48
SA 652 (SEB)	-	-	24	-	48	7
SA 879 (SEB)	-	-	-	-	-	-
SA 289 (SEK)	-	-	-	-	-	-
SA 315 (SEK)	-	-	48	-	-	24
SA 360 (SEK)	-	-	-	-	-	24



Všetkých 18 naočkovaných vzoriek s presne vypočítaným počtom *S. aureus* bolo rozdelených do 3 čiastkových vzoriek, ktoré sa potom skladovali pri teplote 4 °C, 15 °C a 25 °C, aby sa simulovali vhodné aj nevhodné podmienky skladovania. Vzorky z každej teploty boli analyzované individuálne. Experimenty boli vykonané bez replikácií, výsledkom čoho bolo celkovo analyzovaných 54 vzoriek (9 kmeňov *S. aureus* / 3 rôzne teploty / dve riedenia). *S. aureus* bol vymenovaný vo všetkých vzorkách v pravidelných intervaloch. Odber vzoriek sa uskutočňoval v hodinových intervaloch počas prvých 12 hodín skladovania a potom opäť po 24 a 48 hodinách. Vzorky boli vyšetrené na počet *S. aureus* a skrining na prítomnosť SEA, SEB a SEC. Súbežne sa analyzovali kontrolné vzorky rekonštituovaného mlieka, ktoré nebolo naočkované *S. aureus* (tabuľka 4 a 5).

Odpovede:

A. Áno, je to možné. V súlade s nariadením Komisie (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériách pre potraviny – kritériá pre počet koagulázopozitívnych stafylokokov v sušenom mlieku sú 10 – 100 KTJ/g.

Food category	Micro-organisms	Sampling plan (1)		Limits (2)		Analytical reference method (3)	Stage where the criterion applies	Action in case of unsatisfactory results
		n	c	m	M			
2.2.7. Milk powder and whey powder (*)	Enterobacteriaceae	5	0	10 cfu/g		ISO 21528- 1	End of the manufacturing process	Check on the efficiency of heat treatment and prevention of recontamination
	Coagulase-positive staphylococci	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g	EN/ISO 6888-1 or 2	End of the manufacturing process	Improvements in production hygiene. If values > 10 ⁵ cfu/g are detected, the batch has to be tested for staphylococcal enterotoxins.

B. Ako vyplýva z tabuľky 4, stupeň rizika by sa pri teplote 25 °C dosiahol za 11 hodín (nízka kontaminácia) alebo dokonca za 4 hodiny (vysoká kontaminácia); pri teplote 15 °C by sa nebezpečné úrovne dosiahli po 12 hodinách, ak by bolo mlieko vysoko kontaminované.

C. SE boli zistené pri teplotách 15 a 25 °C. Matka mala dať rekonštituované mlieko do chladničky.



Štúdiá 4 – Stafylokokové enterotoxíny v lahôdkach a jemnom pečive

Vo štvrtok ráno cestou do práce kúpil Harry svojim kolegom na oslavu narodenín sendviče a krémové lístky. Kvôli nečakaným pracovným záväzkom na strane väčšiny jeho kolegov však večierok odložili na piatok. Bol júl, vonku bola teplota takmer 30 °C. Pán Harry sa rozhodol nechať občerstvenie vo svojej kancelárii (25 °C) do nasledujúceho dňa. Párty sa konala v piatok po obede. Osem z jeho 13 kolegov začalo v piatok popoludní trpieť silnou nevoľnosťou, vracaním a hnačkou.

- A. Mohli byť tieto príznaky spôsobené stafylokokovou enterotoxikózou?
- B. Mohli sa stafylokokové enterotoxíny vytvoriť počas 24 hodín v sendvičoch a cukrovinkách?
- C. Sú tieto potraviny rizikové z hľadiska možných *S. aureus* kontaminácia a prečo?

Odpovedzte na tieto otázky na základe výsledkov nasledujúcej štúdie.

Cieľom predloženej štúdie (Necidová et al., 2022) bolo zhodnotiť rast a množenie enterotoxigénnych kmeňov *S. aureus* v modelových deli a jemných pekárenských výrobkoch. Osobitná pozornosť sa venovala posúdeniu podmienok skladovania a ich vplyvu na produkciu stafylokokových enterotoxínov, a teda na riziko, ktoré predstavujú potenciálni spotrebitelia takýchto potravín.

Vzorky potravín (otvorené sendviče a krémové lístky) boli naočkované tromi kmeňmi *S. aureus* produkujúcimi stafylokokové enterotoxíny. Otvorené sendviče obsahujúce francúzsky bochník, maslo, syr Eidam a šunku (počiatočné pH = 5,55–5,71; aw = 0,946–0,964) boli vybrané ako zástupcovia lahôdok. Otvorené sendviče boli pripravené v laboratóriu bezprostredne pred začiatkom experimentu z nakúpených maloobchodných produktov. Maslové krémové lístky, vybrané ako vzorové potraviny z kategórie jemných pekárenských výrobkov (počiatočné pH = 5,96–6,15; aw = 0,952–0,965), boli zakúpené na trhu u miestneho výrobcu s deklarováním týchto zložiek: pšeničná múka, vajcia, voda, soľ, rastlinný olej, sušené mlieko, maslo, cukor, sušené mlieko v prášku (kukuričná múka, aróma, β-karotén, citrónová žltá), vanílinový cukor (aróma - etylvanilín), a fondán (cukor, glukózový sirup, voda). Vzorky boli testované na prítomnosť *S. aureus*; baktérie neboli zistené v žiadnej z 25 g vzoriek.



Tri kmene *S. aureus* produkujúce stafylokokové enterotoxíny, konkrétne *S. aureus* No. 562 (kmeň produkujúci SEA), *S. aureus* CCM 5757 (SEB) a *S. aureus* CCM 5971 (SEC), boli aeróbne kultivované na krvnom agare pri teplote 37 °C počas 24 hodín. Následne bola pre každý kmeň pripravená bakteriálna suspenzia v sterilnom fyziologickom roztoku s hustotou približne $8 \log \text{ cfu.ml}^{-1}$; tieto čiastočné suspenzie boli následne zmiešané v pomere 1:1:1. Výsledná suspenzná zmes bola homogenizovaná miešaním, zriedená podľa potreby a použitá na očkovanie vzoriek potravín. Výsledné počiatkové koncentrácie *S. aureus* vo vzorkách boli 2,54–3,48 $\log \text{ cfu.g}^{-1}$ v otvorených sendvičoch a 1,7–3,58 $\log \text{ cfu.g}^{-1}$ v maslových krémových obláčikoch. Pre každú skladovaciu teplotu a typ vzorky boli pripravené štyri replikáty; Tri replikáty boli vždy naočkované zmiešanou suspenziou a štvrtá vzorka slúžila ako slepá vzorka.

Naočkované vzorky boli homogenizované pomocou stomacherového homogenizátora a uchovávané v sterilných vreckách pri teplotách simulujúcich narušenie postupov prepravy s chladením (15, 25 a 30 °C) počas 72 hodín. Čiastočné vzorky potravy boli asepticky odobraté okamžite (0 hodín) a 6, 12, 24, 31, 48, 55 a 72 hodín po očkovaní; V každom časovom bode sa odobralo 10 g.

Okrem stafylokokov boli v čiastkových vzorkách vymenované aj mezofilné baktérie mliečneho kvasenia pomocou horizontálnej metódy podľa ISO 15214 (2000) na agare De Man, Rogosa a Sharpe (Oxoid, Ltd., Basingstoke, UK).

Rast a množenie *S. aureus* v otvorených sendvičoch a jemnom pečive s maslovým krémom pri teplotách 15, 25 a 30 °C charakterizujú rastové krivky vytvorené pomocou Baranyi-Roberts a lineárnych modelov pre jednotlivé skladovacie teploty (obrázok 14). *S. aureus* nerástol v otvorených sendvičoch skladovaných pri teplote 15 °C a pri teplote 30 °C bol pozorovaný len zanedbateľný rast z 2,72 na 3,62 $\log \text{ cfu.g}^{-1}$. V otvorených sendvičoch skladovaných pri teplote 25 °C bol však rast výraznejší. V maslových krémových potiahnutiach bol rast *S. aureus* pozorovaný pri všetkých experimentálnych teplotách. Rast bol relatívne pomalší pri teplote 15 a 30 °C; podobne ako pri otvorených sendvičoch, rast bol najrýchlejší pri 25 °C (tabuľka 6). Predpoklad, že najrýchlejší rast populácie *S. aureus* nastane pri teplote 30 °C, sa preto nepotvrdil a najrýchlejší rast (ako aj najvyšší počet *S. aureus* na konci obdobia štúdie) bol pozorovaný u otvorených sendvičov a maslových krémových vláken pri teplote 25 °C (obrázok 14, tabuľka 6).

V našej štúdií bola produkcia SE zaznamenaná iba v jedinom scenári, a to v maslových krémových lístkoch skladovaných pri teplote 25 °C, tam bola zistená už po 24 hodinách. Vo všetkých ostatných scenároch počet *S. aureus* významne neprekročil rizikový limit 5



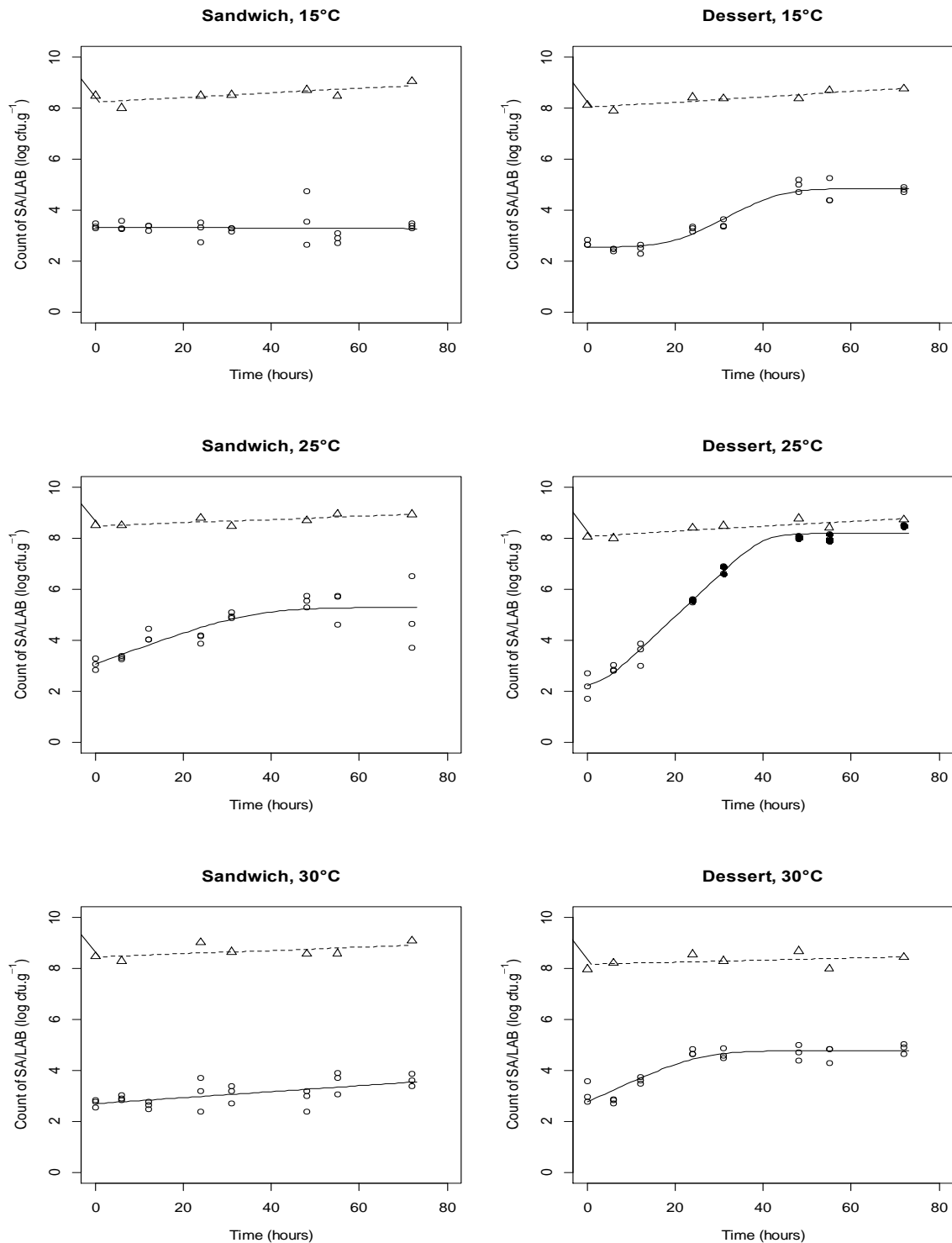
log cfu.g⁻¹, hoci hodnoty pH a *a_w*, ako aj skladovacia teplota podporovali rast *S. aureus* počas väčšej časti obdobia štúdie (tabuľka 6).

Výsledky tejto štúdie naznačujú, že ak sú otvorené sendviče alebo maslové krémové lístky kontaminované toxigénnymi kmeňmi *S. aureus* v koncentrácii približne 3 log cfu.g⁻¹, tieto toxigénne baktérie sú schopné rasti v krémových obláčikoch pri všetkých testovaných teplotách (15, 25 a 30 °C), zatiaľ čo v otvorených sendvičoch nebol pozorovaný žiadny rast pri 15 °C. Napriek tomu sa vo väčšine vzoriek nepozorovala produkcia stafylokokových enterotoxínov, ktorá sa očakávala pri teplote 25 °C a 30 °C. SE boli zistené až v krémových obláčikoch po 24 a viac hodinách skladovania pri teplote 25 °C. Výsledky našej štúdie naznačujú, že tvorba enterotoxínov závisí okrem potravinovej matrice aj od prítomnosti konkurenčnej mikroflóry, ako sú baktérie mliečneho kvasenia. Baktérie mliečneho kvasenia sú vysoko metabolicky aktívne pri teplote 30 °C a ich metabolické produkty môžu byť zodpovedné za nižšiu rast *S. aureus* pri teplote vyššej ako 25 °C.

Tabuľka 6: Priemerná ± smerodajná odchýlka počtu *S. aureus* (log cfu.g⁻¹) v sendvičoch a dezertoch naočkovaných 3 log cfu.g⁻¹ a skladovaných 72 hodín pri teplote 15 °C, 25 °C a 30 °C.

Čas (hodiny)	Gróf zo <i>S. aureus</i> (log cfu.g ⁻¹)					
	Sendvič			Dezert		
	15 °C	25 °C	30 °C	15 °C	25 °C	30 °C
0	3,37 ± 0,09	3,06 ± 0,23	2,72 ± 0,16	2,71 ± 0,10	2,19 ± 0,50	3,11 ± 0,42
6	3,37 ± 0,17	3,32 ± 0,06	2,93 ± 0,10	2,45 ± 0,05	2,89 ± 0,13	2,81 ± 0,10
12	3,33 ± 0,13	4,18 ± 0,24	2,64 ± 0,15	2,49 ± 0,18	3,51 ± 0,45	3,61 ± 0,13
24	3,20 ± 0,41	4,08 ± 0,17	3,09 ± 0,65	3,27 ± 0,11	5,54 ± 0,06*	4,72 ± 0,12
31	3,25 ± 0,09	4,96 ± 0,10	3,09 ± 0,36	3,47 ± 0,16	6,79 ± 0,16*	4,65 ± 0,21
48	3,64 ± 1,05	5,52 ± 0,22	2,86 ± 0,41	4,96 ± 0,24	8,02 ± 0,07*	4,70 ± 0,30
55	2,90 ± 0,21	5,35 ± 0,65	3,56 ± 0,43	4,69 ± 0,50	7,98 ± 0,15*	4,67 ± 0,32
72	3,39 ± 0,09	4,95 ± 1,43	3,62 ± 0,23	4,81 ± 0,09	8,49 ± 0,03*	4,86 ± 0,20

*vzorky s detegovanými stafylokokovými enterotoxínmi



Obrázok 14: Rastové krivky *baktérií S. aureus* (SA) a mliečného kvasenia (LAB) v otvorenom sendvičovom a maslovom krémovom dezerte skladovanom 72 hodín pri teplote 15 °C, 25 °C a 30 °C. Pozorované údaje *S. aureus* (symboly ○) a predpovedané Baranyiho modely (— krivky) alebo lineárne modely (— čiar) a čas detekcie toxínov (● plné symboly). Pozorované údaje o baktériách mliečného kvasenia (symboly △) a predpokladané lineárne modely (--- čiar).



Odpovede:

- A. *Áno, môžu to byť príznaky stafylokokovej enterotoxikózy, o čom svedčí rýchly nástup príznakov s vysokou intenzitou u veľkej časti osôb krátko po konzumácii kontaminovaných potravín.*
- B. *Áno, SE sa mohli tvoriť v uvedených potravinách, najmä v dezertoch (maslové krémy), ako ukazujú výsledky štúdie v tabuľke 6.*
- C. *Sendviče aj maslové krémové lístky sú vysoko rizikové potraviny z hľadiska možnej kontaminácie *S. aureus* kvôli vysokému stupňu manuálnej práce počas ich prípravy. Ruky a sliznice pracovníkov, najmä hnisavé rany a rozprávanie alebo kýchanie počas prípravy týchto potravín, môžu byť zdrojom *S. aureus*.*
- D. *Sendviče a vence sú vysoko rizikové potraviny z hľadiska možnej kontaminácie baktériami *S. aureus* v dôsledku vysokého stupňa manuálnej práce počas ich prípravy. Zdrojmi *S. aureus* môžu byť ruky a sliznice pracovníkov, najmä hnisavé rany a rozprávanie alebo kýchanie počas prípravy týchto potravín.*



3. Referencie

- ALHASHIMI, H. M. M., Nosový nosič enterotoxigénneho *Staphylococcus aureus* medzi osobami, ktoré manipulujú s potravinami v meste Kerbala. *Karbala Internationat Journal of Modern Science*, 2017, zv. 3, s. 69–74.
- ALOMAR, J., LOUBIERE, P., DELBES, C., NOUAILLE, S., MONTEL, M. C. Účinok *Lactococcus garvieae*, *Lactobacillus lactis* a *Enterococcus faecalis* na správanie *Staphylococcus aureus* v mikrofiltrovanom mlieku. *Potravinová mikrobiologia*, 2008, roč. 25, č. 3, s. 502–508.
- ASAO, T., KUMEDA, Y., KAWAI, T., SHIBATA, T., ODA, H., HARUKI, K., NAKAZAWA, H., KOZAKI, S. Rozsiahle prepuknutie stafylokokovej otravy jedlom v dôsledku nízkoúčného mlieka v Japonsku: Odhad enterotoxínu A v inkriminovanom mlieku a sušenom odstredenom mlieku. *Epidemiológia a infekcia*, 2003, roč. 130, č. 1, s. 33–40.
- BALABAN, N., RASOOLY, A. Stafylokokové enterotoxíny. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, roč. 61, č. 1, s. 1–10.
- BOGDANOVIČOVÁ, K., KAMENÍK, J., DOROTÍKOVÁ, K., STREJČEK, J., KŘEPELOVÁ, S., DUŠKOVÁ, M., HARUŠTIAKOVÁ, D. 2019. Výskyt potravinárskych látok v potravinárskych zariadeniach v Českej republike. *Journal of Food Protection*, 2019, roč. 82, č. 7, s. 1096–1103.
- BOGDANOVIČOVÁ, K., NECIDOVÁ, L., HARUŠTIAKOVÁ, D., JANŠTOVÁ, B. Hodnotenie rizika sušeného mlieka pomocou toxinogénnych kmeňov *Staphylococcus aureus*. *Kontrola potravín*, 2017, roč. 73, s. 2 – 7.
- BHUNIA, A. K. *Staphylococcus aureus*. In: BHUNIA, A. K. (Ed.): *Potravinové mikrobiálne patogény. Mechanizmy a patogenéza*. 1. vyd. New York, USA: Springer Science+Business Media, LLC. 2008. s. 125–134. ISBN: 978-0-387-74536-7.
- NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 2073/2005 z 15. novembra 2005 o mikrobiologických kritériách pre potraviny. Úradný vestník Európskej únie, 2007, L 332, s. 12 – 29.
- HENNEKINNE, J. A., DE BUYSER, M. L., DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* a jeho toxíny otravy jedlom: Charakterizácia a vyšetrovanie ohniska. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, roč. 36, č. 4, s. 815–836.
- HU, D.-L., WANG, L., FANG, R., OKAMURA, M., ONO, H. K. *Staphylococcus aureus* enterotoxíny. In: FETSCH, A. (vyd.). *Staphylococcus aureus*. Londýn, Spojené kráľovstvo: Academic Press, Elsevier, Inc. 2018. s. 39 – 55. ISBN: 978-0-12-809671-0.
- CHARLIER, C., CRETENET, M., EVEN, S., LE LOIR, Y. Interakcie medzi *Staphylococcus aureus* a baktériami mliečného kvasenia: Starý príbeh s novými perspektívami. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, roč. 131, č. 1, s. 30–39.
- CHARLIER C., EVEN, S., GAUTIER M., LE LOIR, Y. Acidifikácia sa nepodieľa na včasnej inhibícii rastu *Staphylococcus aureus* *Lactobacillus lactis* v mlieku. *International Dairy Journal*, 2008, roč. 18, č. 2, s. 197–203.



CHAVES, R. D., PRADELLA, F., TURATTI, M. A., AMARO, E. C., DA SILVA, A. R. FARIAS, A. S., PEREIRA, J. L., KHANEGHAH, A. M. Hodnotenie *stafylokokov* spp. v potravinárskych a kuchynských priestoroch Campinas, Brazília. *Kontrola potravín*, 2018, roč. 84, s. 463–470.

ISO 6888-1. (1999). Mikrobiológia potravín a krmív. Metóda horizontálnej enumerácie koagulázovo pozitívnych stafylokokov (*Staphylococcus aureus* a iných druhov). Časť 1: Technika pôdy na Baird-Parkerovom agare Praha: Český inštitút pre normalizáciu. 16 s.

ISO 15214. (2000). Mikrobiológia potravín a krmív – Horizontálna metóda výpočtu počtu mezofilných baktérií mliečného kvasenia – technika počítania kolónií kultivovaná pri 30°C. Praha: Český inštitút pre normalizáciu. 15 s.

JABLONSKI, L. M., BOHACH, G. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P., BEUCHAT, L. R., MONTVILLE, T. J. (Eds): Potravinová mikrobiológia: Základy a hranice, druhé vydanie. Washington, D. C., USA: ASM Press. 2001. s. 411–434. ISBN: 978-1-55581-208-9.

JANŠTOVÁ, B. ml., NECIDOVÁ, L., JANŠTOVÁ, B., VORLOVÁ, L. Rast *Staphylococcus aureus* a produkcia enterotoxínov v rôznych druhoch mlieka. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2012, roč. LX., č. 5., s. 103 – 108.

JANSTOVA, B. ml., NECIDOVA, L., SKOČKOVÁ, A., JANSTOVA, B. Produkcia stafylokokových enterotoxínov v modelových vzorkách mlieka a čerstvého syra. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2014, roč. 53, č. 4, s. 389–392.

KEEFE, G. Aktuálne informácie o kontrole *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus agalactiae* na liečbu mastitíd. *Veterinárne kliniky Severnej Ameriky: Food Animal Practice*, 2012, roč. 28, č. 2, s. 203–216.

LI, S. J., HU, D.-L., MAINA, E. K., SHINAGAWA, K., OMOE, K., NAKANE, A. Superantigénna aktivita toxínu syndrómu toxického šoku-1 je odolná voči zahrievaniu a tráviacim enzýmom. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, roč. 110, č. 3, s. 729–736.

LOIR, Y., BARON, F., GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* a otrava jedlom. Genetika a molekulárny výskum, 2003, roč. 2, č. 1, s. 63–76.

MERZ, A., STEPHAN, R., JOHLER, S. Zdá sa, že *Staphylococcus aureus* izolovaný z kozieho a ovčieho mlieka je úzko príbuzný a líši sa od izolátov zistených z kravského mlieka. *Hranice v mikrobiológii*, 2016, roč. 7, s. 319.

NECIDOVÁ, L., BURSOVÁ, Š., HARUŠTIAKOVÁ, D., BOGDANOVIČOVÁ, K. Hodnotenie rastu *Staphylococcus aureus* a produkcie stafylokokových enterotoxínov v lahôdkach a jemnom pečive. *Acta Veterinaria Brno*, 2022, roč. 91, č. 4, s. 417–425.

NECIDOVÁ, L., ŠŤÁSTKOVÁ, Z., POSPÍŠILOVÁ, M., JANŠTOVÁ, B., STREJČEK, J., DUŠKOVÁ, M., KARPÍŠKOVÁ, R. Vplyv technológie mäkkých syrov na rast a produkciu enterotoxínov *Staphylococcus aureus*. *Czech Journal of Food Science*, 2009, roč. 27, č. 2, s. 127–133.



NORMANNO, G., LA SALANDRA, G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N. C., CORRENTE, M., PARISI, A., SANTAGADA, G., FRINU, A., CRISSETTI, E., CELANO, G. V. Výskyt, charakterizácia a antimikrobiálna rezistencia enterotoxigénneho *Staphylococcus aureus* izolovaného z mäsa a mliečnych výrobkov. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, roč. 115, č. 3, s. 290–296.

OLIVER, S. P., BOOR, K. J., MURPHY, S. C., MURINDA, S. E. Riziká bezpečnosti potravín spojené s konzumáciou surového mlieka. *Potravinové patogény a choroby*, 2009, roč. 6, č. 7, s. 793–806.

OMOE, K., HU, D.-L., TAKAHASHI-OMOE, H., NAKANE, A., SHINAGAWA, K. Identifikácia a charakterizácia nového predpokladaného toxínu súvisiaceho so stafylokokovým enterotoxínom kódovaného dvoma druhmi plazmidov. *Infekcia a imunita*, 2003, roč. 71, č. 10, s. 6088–6094.

Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 z 29. apríla 2004, ktorým sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu. *Úradný vestník Európskej únie*, 2004, L 139, s. 55 – 205.

ROBERTS, T. A., BAIRD-PARKER A. C., TOMPKIN R. B. *Staphylococcus aureus*. In: MEDZINÁRODNÁ KOMISIA PRE MIKROBIOLOGICKÉ ŠPECIFIKÁCIE POTRAVÍN (ICMSF): Mikroorganizmy v potravinách 5: Charakteristiky mikrobiálnych patogénov. Londýn: Blackie Academic and Professional, 1996. s. 299 – 333. ISBN: 9780412473500.

SHARMA, N. K., REES, C. E. D., DODD, C. E. R. Vývoj jednoreakčného multiplexného typizačného testu PCR toxínov pre kmene *Staphylococcus aureus*. *Aplikovaná a environmentálna mikrobiológia*, 2000, roč. 66, č. 4, s. 1347–1353.

SCHMITT, M., SCHULER-SCHMID, U., SCHMIDT-LORENZ, W. Teplotné limity rastu, produkcia Tázy a enterotoxínu kmeňov *Staphylococcus aureus* izolovaných z potravín. *International Journal of Food Microbiology*, 1990, roč. 11, č. 1, s. 1–19.

SOARES, K., MOURA, A. T., GARCÍA-DÍEZ, J., OLIVEIRA, I., ESTEVES, A., SARAIVA, C. Hodnotenie hygienickej kvality potravín podávaných v univerzitných jedálňach Northem Portugal. *Indian Journal of Microbiology*, 2019, s. 1–8.

SOLANO, R., LAFUENTE, S., SABATE, S., TORTAJADA, C., DE OLALLA, P. G., HERNANDO, A. V., CAYLA, J. Produkcia enterotoxínu *Staphylococcus aureus*: Epidémia v barcelonskom športovom klube v júli 2011. *Kontrola potravín*, 2013, roč. 33, s. 114–118.

SORIANO, J. M., FONT, G., MOLTO, C., MANES, J. Enterotoxigénne stafylokoky a ich toxíny v reštauračných jedlách. *Trendy v potravinárskej vede a technológii*, 2002, zv. 13, s. 60–67.

SUNDARARAJ, N., KALAGATUR, N. K., MUDILI, V., KRISHNA, K., ANTONYSAMY, M. Izolácia a identifikácia enterotoxigénnych *Staphylococcus aureus* isilates z indických vzoriek potravín: hodnotenie internej metódy ELISA (ALISA) spojenej s vývojom aptamer. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, roč. 56, č. 2, s. 1016–1026.

Co-funded by the
Erasmus+ Programme
of the European Union



VANDERHAEGHEN, W., PIEPERS, S., LEROY, F., VAN COILLIE, E., HAESBROUCK, F., DE Vlieghe, S. Pozvané preskúmanie: účinok, perzistencia a virulencia koagulázovo negatívnych druhov stafylokokov spojených so zdravím vemena prežúvavcov. *Journal of Dairy Science*, 2014, roč. 97, č. 9, s. 5275–5293.



Co-funded by the
Erasmus+ Programme
of the European Union



**Táto práca bola spolufinancovaná z programu
Európskej únie Erasmus+**

Inovácia štruktúry a obsahu študijných programov
profilujúcich potravinárske študijné odbory s
cieľom digitalizácie výučby

**Táto publikácia bola spolufinancovaná
programom Európskej Únie Erasmus+**

Inovácia štruktúry a obsahového zamerania
študijných programov profilujúcich potravinárske
študijné odbory s ohľadom na digitalizáciu výučby

FOODINOVO | 2020-1-SK01-KA203-078333





Financované Európskou úniou. Vyjadrené názory a názory sú však len názormi autora (autorov) a nemusia nevyhnutne odrážať názory Európskej únie alebo Európskej výkonnej agentúry pre vzdelávanie a kultúru (EACEA). Európska únia ani agentúra EACEA za ne nemôžu nieť zodpovednosť.

Financované Európskou úniou. Vyjadrené názory a postoje sú názormi a vyhláseniami autora(-ov) a nemusia nevyhnutne odrážať názory a stanoviská Európskej únie alebo Európskej výkonnej agentúry pre vzdelávanie a kultúru (EACEA). Európska únia ani EACEA za ne nepreberajú žiadnu zodpovednosť.

FOODINOVO | 2020-1-SK01-KA203-078333