

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Detekce *Cronobacter sakazakii*

Anastasiia Nazmutdinova

Bakalářská práce

2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Anastasiia Nazmutdinova**  
Osobní číslo: **C15248**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Název tématu: **Detekce Cronobacter sakazakii**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. V úvodu práce obecně charakterizujte bakterii Cronobacter sakazakii. Popište taxonomii, výskyt, vlastnosti, patogenezi a klinické obrazy onemocnění.
2. Dále vypracujte literární rešerši na jednotlivé způsoby detekce. Charakterizujte postup, který je dán normou ČSN EN ISO 22964. Dále popište dostupná fluorogenní a chromogenní média používaná pro kultivační vyšetření, metody biochemické, molekulárně-biologické a komerčně dodávané rychlé sety.
3. Uveďte konkrétní případy výskytu Cronobacter sakazakii a způsoby detekce publikované autory v odborných časopisech.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 ve znění dodatku č. 1 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Petra Motková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd


Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

**Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30. 6. 2019

.....

Anastasiia Nazmutdinova

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat především vedoucí mé bakalářské práce Ing. Petře Mořkové, Ph. D. za důležité rady a poskytnutí materiálů k napsání této práce. Dále bych poděkovala své rodině, kamarádům a kolegům za neocenitelnou podporu a víru, že to dokážu.

## **ANOTACE**

Práce je věnována problematice detekce bakterie *Cronobacter sakazakii*. Zahrnuje popis taxonomie, patogenezi, výskytu a vlastností tyto bakterie, na základě kterých jsou dále popsány jednotlivé způsoby detekce, metody a komerčně dodávané sety. Jsou také uvedeny různé kultivační média pro pomnožení a identifikaci *Cronobacter sakazakii*.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

cronobacter, sakazakii, detekce, patogeny, mikrobiologie, bakterie

## **TITLE**

Detection of *Cronobacter sakazakii*.

## **ANNOTATION**

The thesis deals with the detection of *Cronobacter sakazakii*. It includes a description of the taxonomy, pathogenesis, occurrence and properties of these bacteria. Based on these properties there are described various detection methods, and commercially available kits. The work also includes various culture media for the *Cronobacter sakazakii* identification.

## **KEYWORDS**

cronobacter, sakazakii, detection, pathogens, microbiology, bacteria

# OBSAH

OBSAH.....	10
SEZNAM ILUSTRACÍ.....	11
SEZNAM TABULEK.....	13
ÚVOD.....	12
1 CRONOBACTER SAKAZAKII .....	13
1.1    Taxonomie .....	13
1.2    Morfologie a biochemické vlastnosti .....	14
1.3    Vyskyt.....	16
1.4    Patogenita .....	17
1.5    Klinické obrazy onemocnění .....	18
2 DETEKCE CRONOBACTER SAKAZAKII.....	21
3.1    Postup daný normou ČSN EN ISO 22964.....	22
3.1.1.    Fáze před nabohacením (Pre-enrichment).....	22
3.1.2.    Fáze nabohacení (Enrichment) .....	23
3.1.3.    Selekce (Selection).....	23
3.1.4.    Izolace podezřelých kolonií a potvrzení (Confirmation) .....	23
3.2    Další způsoby.....	24
3.3    Dostupná cromogenní media pro kultivační vyšetření.....	24
3.4    Dostupná fluorogenní media pro kultivační vyšetření .....	28
3.5    Metody biochemické a komerčně dodávané rychlé sety.....	29
3.6    Metody molekulárně-biologické .....	30
ZÁVĚR.....	34
POUŽITÁ LITERATURA .....	35
PŘÍLOHY .....	38

## SEZNAM ILUSTRACÍ

<b>Obrázek 1</b> 16S rRNA gene phylogenetic tree of Cronobacter and related species [3].	14
<b>Obrázek 2</b> Coloured scanning electron micrograph (SEM) of Cronobacter sakazakii [4].	15
<b>Obrázek 3</b> Cronobacter sakazakii on TSA [5].	15
<b>Obrázek 4</b> Cronobacter spp. na ESIA ukazují charakteristické modro-zelené zbarvení [19].	25
<b>Obrázek 5</b> Cronobacter spp. na DFI agaru mají tmavězelené, světlazelené nebo nahnědlazelené zbarvení. Některé kolonie mohou mít pouze zelené centrum s bílým / žlutým okrajem [20].	26
<b>Obrázek 6</b> Cronobacter sakazakii a několik dalších zástupců rodu Cronobacter rostou na CCI agaru v malých až středních modrých nebo modrozelených koloniích [21].	26
<b>Obrázek 7</b> Miska vpravo ukazuje vzorek kojenecké výživy s Cronobacter a vedlejší flórou, která mění barvu pozadí agaru z červené na žlutou ve většině oblastí. Cronobacter spp. jsou zelené se žlutým pozadím a černé s červeným pozadím [20].	27
<b>Obrázek 8</b> Kolonie Cronobacter na COMPASS Enterobacter sakazakii agaru vykazuje modrozelenou barvu [26].	27
<b>Obrázek 9</b> Morfologie kolonií (a) Cronobacter spp. a (b) Cronobacter spp. + vedlejší organismy. Cronobacter spp. tvoří typické kolonie s fialově zbarveným centrem obklopeným průhledným až opaleskujícím okrajem, zatímco v přítomnosti jiných organismů jsou kolonie bezbarvé nebo fialově zbarvené bez okrajů [31].	28
<b>Obrázek 10</b> API® Rapid ID 32 E od výrobce bioMérieux SA [33].	29
<b>Obrázek 11</b> (A) Detekce C. sakazakii na sklíčku. (B) Vizualizace stejného mikroskopického pole v zeleném světle (negativní kontrola), ukazující autofluorescenci proteinů kojenecké výživy a nepřítomnost fluorescenčních buněk[22].	31
<b>Obrázek 12</b> Specifita HybriScanD E, sakazakii [25].	32



## **SEZNAM TABULEK**

<b>Tabulka 1</b> Kategorie potravin a vzorků z životního prostředí zkoumaných na přítomnost Cronobacter spp. [30].....	17
<b>Tabulka 2</b> Identifikace Cronobacter sakazakii podle ČSN EN ISO 22964.....	23

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

MRT – Methyl Red Test

TSA - Trypton-sojový agar

VRBGA – Violet Red Bile Glucose Agar

SZO – Světová Zdravotnická Organizace

WHO – World Health Organization

KTJ – kolonie tvořící jednotky

CFU – colony-forming unit

NEC – nekrotizující enterokolitida

ČSN – Česká technická norma

EN – Evropská norma

ISO – International Organization for Standardization

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Points (Systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů)

BPW – buffered peptone water (tlumivá peptonová voda)

CSB – Cronobacter selective broth (selektivní bujón pro Cronobacter)

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

CCI agar – chromogenic Cronobacter isolation agar (chromogenní agar pro izolaci Cronobacter)

FDA – Food and Drug Administration (USA)

ESIA<sup>®</sup> – Enterobacter sakazakii isolation agar

PCR – Polymerase chain reaction (Polymerasová řetězová reakce)

XaGlc – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid

DFI agar – Druggane-Forsythe-Iversen agar

ESPM – Enterobacter Sakazakii Plating Medium

FTIR spektroskopie – Fourier transform infrared spektroskopie

LAMP – loop-mediated isothermal amplification

FISH – fluorescence in situ hybridization

PFGE – pulsed field gel electrophoresis

MLSA – multilocus sequence analysis

CGI – comparative genomic indexing

# ÚVOD

Dětský organismus se vyznačuje vysokou labilitou mnoha životně důležitých systémů a predispozicí k rozvoji patologických stavů různých typů. V postnatálním období se téměř u všech novorozenců v procesu adaptace na mimoděložní existenční podmínky vyznačuje gastrointestinální trakt a jeho mikroflóra vysokou variabilitou a přítomností přechodné dysbiózy.

Organismus dítěte se však nedokáže vyrovnat se všemi patogenními organismy. Mezi takové bakterie řadíme *Cronobacter sakazakii*, na kterou se zaměřuji ve své práci. Při působení této bakterie v organismu může dojít k závažným onemocněním nekrotizující enterokolitidy, meningitidy a otravy s výjimečně vysokou mírou úmrtnosti až 80 % [1].

Druh je nazván na počest japonského mikrobiologa Riichi Sakazaki. Název “*Cronobacter*” [Cro.no.bac'ter] pochází z řeckého “Κρόνος” [Cronos] - jednoho z Titánů z mytologie, který spolkl všechny své děti, jakmile se narodily, a z latinského “Bacter” - tyč, což symbolizuje ve výsledku tyč, která může způsobit onemocnění u novorozenců.

Infekce způsobené *Cronobacter sakazakii* nejsou časté, ale jsou většinou fatální, proto jsou nezbytně nutné metody rychlé izolace a identifikace této bakterie, má-li být dosaženo včasné a vhodné opatření kontaminace nebo infekce.

Cílem této práce je rešerše různých literárních zdrojů a zhromáždění informace k problematice detekce *Cronobacter sakazakii*.

# 1 CRONOBACTER SAKAZAKII

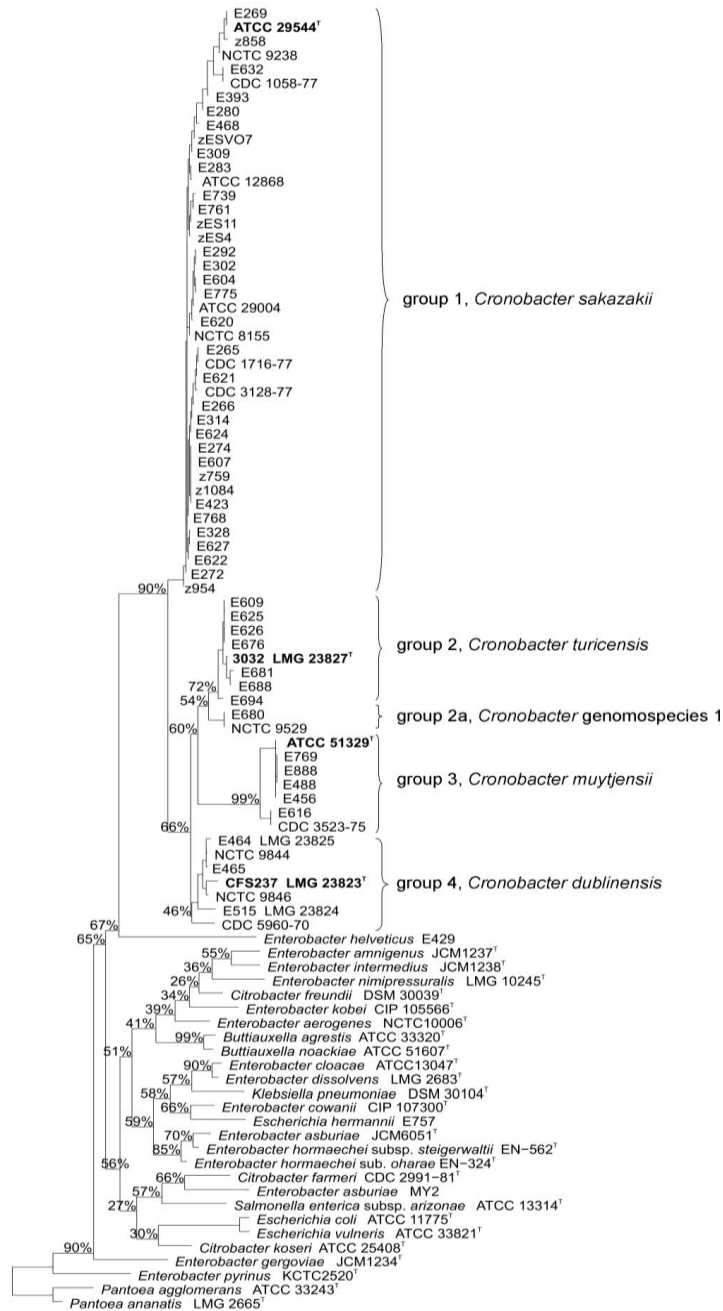
## 1.1 Taxonomie

*Enterobacter sakazakii* byl definován jako nový druh v roce 1980 mikrobiologem J. J. Farmerem a kol. [2]. DNA-DNA hybridizace neposkytla žádné jasné obecné přiřazení pro *E. sakazakii*, protože bylo prokázáno, že má genetickou shodu 53–54% se dvěma různými rody: *Enterobacter* a *Citrobacter*. Tento druh byl však zařazen do *Enterobacter*, protože se nacházel fenotypicky a genotypicky blíže k *E. cloacae* než k druhu *C. freundii*.

V roce 2007 Iversen a kol. [3] zveřejnili výsledky analýzy, podle které byl druh *Enterobacter sakazakii* rozdělen do pěti druhů. 210 kmenů *E. sakazakii* byly přiřazeny bioskupinám, jak bylo původně popsáno Farmerem a kol. s přidáním bioskupiny 16, jak je popsáno Iversenem a kol. Hodnoty homologie DNA mezi kmeny patřícími do různých skupin byly jasně pod 70%, proto v závěru této studie bylo rozhodnuto, že kmeny *E. sakazakii* představují pět různých druhů, z nichž rozsáhlejší je *Cronobacter sakazakii* (Obrázek 1).

Zařazení rodu *Cronobacter* do systému je následující:

doména:	Bacteria
kmen:	Proteobacteria
třída:	Gamma Proteobacteria
řád:	Enterobacteriales
čeleď:	Enterobacteriaceae
rod:	<i>Cronobacter</i>

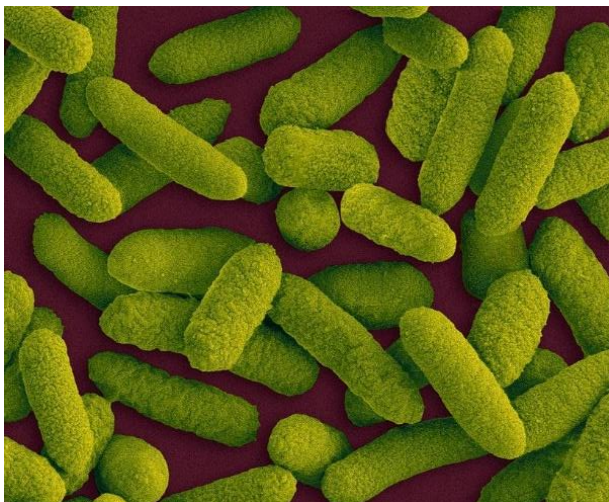


Obrázek 1 16S rRNA gene phylogenetic tree of *Cronobacter* and related species [3].

## 1.2 Morfologie a biochemické vlastnosti

*Cronobacter sakazakii* je gramnegativní tyčinka 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  široká a 1-3  $\mu\text{m}$  dlouhá, pohyblivá díky peritrichiálním bičíkům. Jsou to nesporulující, fakultativně anaerobní bakterie. Mají negativní oxidasovou a pozitivní katalasovou aktivitu. Redukují nitráty, využívají citráty, hydrolyzují esculin a arginin, produkují acetoin (Voges-Proskauer test) a jsou negativní pro Methyl Red test (MRT). Neprodukují sulfán, nehydrolyzují močovinu, nedekarboxylují

lysin [3]. Charakteristickou je tvorba žlutého pigmentu na Trypton-sojovém agaru (TSA) (Obrázek 3). Úplný přehled biochemických vlastností je uveden v Příloze A.



**Obrázek 2** Coloured scanning electron micrograph (SEM) of *Cronobacter sakazakii* [4].



**Obrázek 3** *Cronobacter sakazakii* on TSA [5].

Produkce pigmentů a velikost kolonií tvořených izoláty rodu *Cronobacter* pěstovanými na TSA jsou značně ovlivněny inkubační teplotou. Kolonie typu A nebo matné jsou suché nebo mukoidní, vroubkované a gumovité při dotyku očkovací kličkou. Tato vlastnost se přisuzuje heteropolysacharidovému pouzdru, které umožňuje snadnější přichycení k povrchu a tvorbu biofilmu. Environmentální kmeny na tomto médiu produkovaly vlnité, matné kolonie s gumovitou texturou. Kolonie typu B nebo lesklé jsou hladké a často vykazují malou produkci pigmentů.

Byly také pozorovány rozdíly v morfologii kolonií mezi environmentálními kmeny a klinickými kmeny [6]. Klinické kmeny na rozdíl od environmentálních produkovaly mukoidní kolonie na VRBG agáru (Violet Red Bile Glucose Agar).

Du X. a kol. popsali schopnost *Cronobacter sakazakii* tvořit biofilmy, což napomáhá bakterii zůstat na lžících, míchadlech, žincích na umývání nádobí a dalších věcech, kvůli kterým se mohou kontaminovat potraviny [1], [32].

### 1.3 Výskyt

Doposud rezervoár a způsob přenosu *Cronobacter* spp. zůstávají neznámé. Ovšem, vzhledem k tomu, že se patogeny nevyskytují přirozeně u zvířat a lidí, hlavním zdrojem kontaminace potravin jsou s největší pravděpodobností půda, voda a zelenina. *Cronobacter* spp. mohou být izolovány z prostředí a ze širokého množství potravin včetně mléka, sýrů, sušených potravin, masa, zeleniny, rýže, chleba, čaje, bylin, koření, práškové kojenecké výživy a vody.

Dále sekundárním zdrojem kontaminace mohou sloužit hlodavci a mouchy, neboť byly kmeny *Cronobacter* také izolovány z trávicích traktů mexické ovocné mušky *Anastrepha ludens* a bodalky stájové *Stomoxys calcitrans*.

V roce 2009 Jaradatem a kol. byla provedena rozsáhlá studie. 233 vzorků včetně kojenecké výživy, sušeného mléka, dětské výživy, zeleniny, ovoce, tradičních nápojů, obilovin, bylin a vzorků z životního prostředí bylo testováno na přítomnost *Cronobacter* spp. Tabulka 1 ukazuje kategorie vzorků potravin a životního prostředí analyzovaných na přítomnost *Cronobacter* spp. ve studii. Tabulka 1 také uvádí procenta *Cronobacter* spp. nalezených v každé kategorii potravin. Ze 76 vzorků kojenecké výživy, dětské výživy, sušeného mléka a mléčných výrobků byl pouze jeden vzorek kojenecké výživy byl pozitivní na *Cronobacter* spp. (1,4%). Nejvyšší procento *Cronobacter* spp. (39%) bylo nalezeno v bylinkách a kořenech, což dává 89% z celkového nálezu. Kromě toho byly nalezeny dva izoláty (18%) v prachu z vysavače (z domácností). Za zmínku stojí, že žádný z testovaných vzorků sušeného mléka neobsahoval *Cronobacter* spp [30].

Sušená mléčná výživa je jediným zdrojem potravy, který byl epidemiologicky spojen s vypuknutím onemocnění způsobeným *Cronobacter* [7]. V důsledku toho se většina výzkumů *Cronobacter* je zaměřena na potenciální přítomnost těchto patogenů v technologických zařízeních výroby kojenecké výživy, surovinách a finálních produktech [9].



**Tabulka 1** Kategorie potravin a vzorků z životního prostředí zkoumaných na přítomnost *Cronobacter* spp. [30].

Původ vzorku	Počet vzorků	Počet izolovaných <i>Cronobacter</i> spp.	% v kategorii	% celkově
Kojenecká instantní směs	69	1	1,4	3,5
Obiloviny a výrobky z obilovin	32	0	0	0
Bylinky a koření	67	26	39	89,6
Různé potravinářské výrobky	34	0	0	0
Nápoje	7	0	0	0
Mléčné výrobky	7	0	0	0
Zelenina a ovoce	6	0	0	0
Vzorky z životního prostředí	11	2	18,2	6,9
<b>Celkem</b>	<b>233</b>	<b>29</b>		<b>100</b>

## 1.4 Patogenita

Podle světové zdravotnické organizace (SZO, WHO) všechny šest druhů v rodu *Cronobacter* jsou patogenní [8].

Nyní existuje obecná shoda, že bakterie z rodu *Cronobacter* jsou organismy tolerantní vůči teple, ale je nepravděpodobné, že přetrvávají i po pasterizaci, což znamená, že ke kontaminaci pasterizovaných produktů pravděpodobně dochází během sušení, plnění nebo rekonstituce [9].

Ačkoliv existuje málo informací o rezistenci druhů *Cronobacter* vůči alkalickým podmínkám, byl ale zaznamenán růst při neutrálních hodnotách pH. Bakterie z rodu *Cronobacter* byly popsány jako středně odolné vůči kyselým podmínkám. Studie rezistence vůči kyselinám ukázaly, že tyto bakterie mohou vydržet vystavení hodnoty pH 3,5 po dobu

delší než 5 hodin. Však bylo zjištěno, že při hodnotách pH nižších než 3, jejich přežití je přechodné, přičemž mezi různými kmeny existuje značná diverzita v kyselinové rezistenci.

Bakterie vykazuje extrémně vysokou odolnost k vysoušení a tepelnému záhřevu. Buňky *Cronobacter* mají schopnost přežít v sušeném prostředí až dva roky a po hydrataci se mohou rychle množit. Studie buněčného metabolismu ukázaly, že bakteriální buňky náležící do rodu *Cronobacter* jsou schopny se během stacionární fáze chránit před dehydratací prostřednictvím intracelulární akumulace kompatibilních solutů, zejména trehalosy. Trehalosa je neredukující disacharid glukosy, o kterém se předpokládá, že podporuje toleranci vůči vysychání bakterií stabilizací proteinů a fosfolipidových membrán. Produkce vyšších hladin superoxiddismutasy a alkyhydroperoxidreduktasy v buňkách může také hrát důležitou roli v ochraně buněčných proteinů proti oxidaci [9].

Infekce vzniká v trávicím ústrojí. Ačkoliv neexistují žádné epidemiologické údaje o hodnotě infekční dávky, Iversen a Forsythe předpokládali její hodnotu jako  $10^3$  KTJ (kolonie tvořící jednotky; CFU – colony-forming unit), což je přibližná infekční dávka stanovená pro *E. coli* O157, *Neisseria meningitidis* a *Listeria monocytogenes*. Infekční dávka se ale může lišit v závislosti na minulosti organismu, zdravotním stavu hostitelského organismu a typu potraviny. Je ovšem velmi nepravděpodobné, že by infekci způsobil malý počet organismů v sušené mléčné výživě (méně než  $0,36 \text{ KTJ} \times 100 \text{ g}^{-1}$ ), z čehož vyplývá, že k nákaze dochází v důsledku hrubého teplotního porušení a / nebo křížové kontaminace nádobí (nedostatečným hygienickým podmínkám přípravy stravy). Havelaar a Zwietering (2004) argumentují, že každá jednotlivá buňka má diskrétní, nenulovou pravděpodobnost vyvolání infekce a pokud budeme brát v úvahu, že sušená mléčná výživa je kontaminovaná jedinou buňkou, pak podle výpočtu růstové rychlosti by bylo zapotřebí 13 h kultivace při pokojové teplotě, aby bylo dosaženo  $10^3$  KTJ [1], [9].

V jednom z nejvýznamnějších průzkumů mléčné výživy se zjistilo, že 52,2% ze 141 vzorků ze 35 zemí světa bylo pozitivních na kontaminaci kmeny rodu *Enterobacteriaceae*, z toho 14% obsahovalo bakterie z rodu *Cronobacter* [1], [10].

## 1.5 Klinické obrazy onemocnění

*Cronobacter sakazakii* je oportunistický patogen vyvolávající řadu onemocnění zahrnujících nekrotizující enterokolitidu, bakteriémií, meningitidu a mozkové abscesy zvláště u předčasně narozených dětí, dětí v prvních týdnech života, starých pacientů a u imuno-deficientních jedinců.

První hlášení o infekcích způsobených rodem *Cronobacter* se datují do roku 1958, kdy se v Anglii vyskytly dva smrtelné případy novorozenecké meningitidy a septikémie [2]. Tyto a další několik případů infekcí byly původně připsány druhu *Enterobacter cloacae*, nicméně v roce 1980 bylo zjištěno, že původcem infekcí byl *Enterobacter sakazakii*, kdy ho na základě DNA-DNA hybridizace definovali jako nový druh mikrobiolog J. J. Farmer a kolektiv [3]. Celkově mezi lety 1958–2003 bylo zaznamenáno 76 případů nákazy *Cronobacter sakazakii* u novorozenců, z toho 19 jedinců nepřežilo. Podle WHO pro rok 2008 se počet nahlašených případů u kojenců a malých dětí mladších než 3 roky stoupl na 120 [8].

Meningitida je akutní zánět mozkových blan (meninges) čili zánět ochranných membrán pokrývajících mozek a míchu. Tyto infekce jsou obvykle spojeny s akutním nástupem a progresí, a pokud jsou neléčeny, obvykle postupují do fatálního výsledku. K nejčastějším symptomům meningitidy patří bolesti hlavy a ztuhlost šíje spojené s horečkou, zmateností nebo poruchami vědomí, zvracením a fotofobií či fonofobií. U dětí se často vyskytují pouze nespécifické symptomy, jako je podrážděnost a ospalost. Meningitida může ohrozit život člověka, při bakteriální meningitidě je vývoj příznaků v řádu hodin. Proto je nemoc řazena mezi urgentní stavy [10], [11].

Při epidemii na Islandu byly kmeny *E. sakazakii* izolované ze třech pacientů s neonatální meningitidou velmi úzce příbuzné (profily plazmidů, restriční enzymová analýza, antibiogramy) s kmeny nalezenými v kojeneckých směsích používaných v nemocnici (Bierling et al., 1989). Možným vysvětlením tohoto ohniska by mohlo být, že láhve se směsmi byly příležitostně uchovávány při teplotě 35–37°C po delší dobu v ohřívacích přístrojích, což umožnilo množení organismu [10].

Jako komplikace meningitidy může nastat bakteriémie, což je přítomnost bakterií v krvi. Krev je normálně sterilním prostředím, proto je zjištění bakterií v krvi (nejčastěji její kultivací) vždy abnormální situací. Imunitní odpověď na bakterie může způsobit sepsi nebo septický šok s poměrně vysokou mortalitou. Bakterie se také mohou krví rozšířit do jiných částí těla a způsobit infekce mimo původní lokalizaci.

Bylo zjištěno, že *E. sakazakii* a *Leuconostoc mesenteroides* byly původci nozokomiální bakteriémie u dítěte ve věku 6 měsíců (Noriega et al., 1990). Zásobní směs byla zkoumána na *E. sakazakii* a *L. mesenteroides*, ale žádný z nich nebyl nalezen. Bylo však zjištěno, že míchadlo použitý k rehydrataci směsí byl silně kontaminován oběma organismy. V tomto případě je možné, že byly *E. sakazakii* a *L. mesenteroides* v sušené kojenecké výživě přítomny v nízkých

počtech, ale množství těchto organismů se zvyšovalo s každou další přípravou směsi. Není jasné, zda *E. sakazakii* nebo *L. mesenteroides* byl příčinou bakteriémie [10].

Clark et al. (1990) zkoumali dvě nesouvisející nemocniční epidemie zahrnující meningitidu, bakteriémii a kolonizaci novorozenců. V každém z ohnisek byl izolován *E. sakazakii* jak z pacientů, tak ze sušené kojenecké výživy. K vyhodnocení příbuznosti zúčastněných kmenů byla použita kombinace identifikačních metod (analýza plazmidů, antibiogramů, chromozomální restrikční endonukleázová analýza, ribotypizace a multilokusová enzymová elektroforéza). Tito vědci zjistili, že i když se kmeny bakterií mezi ohnisky lišily, v rámci každého případu původcem infekce byla bakterie ze směsi [10].

Nekrotizující enterokolitida (NEC) je závažné onemocnění novorozeneckého období způsobené hypoxicko-ischemickým poškozením, které přetrvává v postnatálním období s rozvojem lokálního ischemicko-reperfuzního procesu, ulcerací a nekrózou střevní stěny. Projeví se obvykle 3–7 dní po začátku enterální výživy. Míra úmrtnosti se pohybuje od 20 do 30%; ve skupině dětí, které podstoupily operaci - až 50% [12].

## 2 DETEKCE CRONOBACTER SAKAZAKII

Bezpečností potravin se v rámci EU zabývá Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority, EFSA), vlastními biologickými riziky pak vědecká skupina pro sledování biologického rizika (BIOHAZ Panel). Do mikrobiologického rizika dětské výživy byl v roce 2004 zahrnut také *Enterobacter sakazakii* (rod *Cronobacter*). Bylo konstatováno, že možný výskyt tohoto patogenu v dětské výživě představuje pro konzumenty velké zdravotní riziko. Proto EFSA doporučila sledování přítomnosti patogenních mikroorganismů jak při výrobě potravin, tak v potravinářských výrobcích.

V listopadu 2005 přijala Evropská komise regulační opatření č. 2073/2005, kterým se stanovují mikrobiologická kritéria pro potraviny. Cílem tohoto nařízení bylo snížit množství určitých mikroorganismů a zavést pravidla, která musí výrobci potravin dodržovat. Toto regulační opatření Evropské komise vyžaduje nepřítomnost *Enterobacter sakazakii* (rod *Cronobacter*) v 10 g vzorku sušené počáteční kojenecké výživy a v sušených dietních potravinách pro zvláštní léčebné účely určené pro kojence do šesti měsíců věku. Zmíněné nařízení bylo upraveno novým regulačním opatřením č. 2019/229 vydaným v únoru 2019, avšak limity pro *Cronobacter* zůstaly stejné. Jako referenční analytická metoda se používá klasická kultivační mikrobiologická metoda ISO EN 22964 (2017) [13], [14].

Hlavní obtížností při detekci *Cronobacter sakazakii*, a také jiných patogenů, je potřeba splnit legislativní nároky a prokázat jednu mikrobiální buňku v několikagramovém vzorku potravin, resp. naopak dokázat, že se v tomto vzorku žádný patogen nevyskytuje. Proto se používají klasické kultivační techniky, které umožní po několikadenní kultivaci namnožit a izolovat mikrobiální patogen.

Takový postup ale trvá obvykle 5 až 7 dní, což je z hlediska hygienických opatření (HACCP) zdlouhavé, neboť je potřebné vědět co nejrychleji, zda je potravina kontaminována. Proto jsou vyvíjeny tzv. rychlé metody, využívající různé principy detekce, umožňující dát výsledek za 24 až 48 h. Avšak ani použitím rychlých metod se nevyhneme kultivačnímu kroku, který musí umožnit pomnožení třeba jediné buňky mikroorganismu v analyzovaném vzorku o několik řádů. Mnohdy je třeba ještě mikrobiální buňky revitalizovat kultivací ve vhodném kultivačním médiu. Obvykle takové kultivace trvají 24 h [13].

### 3.1 Postup daný normou ČSN EN ISO 22964

Metoda pro izolaci a vyčet bakterií z rodu *Cronobacter* podle ČSN EN ISO 22964 zahrnuje sérii kultivačních kroků a trvá obvykle 5-7 dní [15]. Tento dokument byl validován pro množství vzorku 10 g. Menší množství vzorku může být použito bez nutnosti dodatečné validace / ověřování za předpokladu, že bude zachován stejný poměr mezi reakčními komponentami a vzorkem. Větší množství vzorku může být použito, pokud validační / ověřovací studie ukázala, že neexistují žádné negativní účinky na detekci *Cronobacter* spp.

#### Zařízení nutné pro detekci:

1. Zařízení pro suchou sterilizaci (trouba) nebo mokrou sterilizaci (autokláv).
2. Inkubátory, schopné provozu v rozmezí 34 - 38°C, 37 ± 1°C a 41,5 ± 1°C.
3. Sterilní kličky, o průměru přibližně 3 mm (objem 10 µl) a objemu 1 µl a inokulační jehlu nebo drátek.
4. pH metr, s přesností kalibrace 0,1 pH jednotky při 25°C.
5. Baňky a lahve, s uzávěry, o vhodných kapacitách pro použití při přípravě obohacujících bujónů a agarů a jejich skladování.
6. Sterilní odměrné pipety, o objemu 10 ml, 1 ml a 0,1 ml.
7. Trubky (ucpané nebo s víčkem) nebo lahvičky s plachtou, o vhodné kapacitě, s netoxickými kovovými uzávěry s vložkami nebo plastovými jednorázovými uzávěry.
8. Petriho misky o průměru přibližně 90 mm.
9. Spektrofotometr, schopný měřit absorpci světla s vlnovou délkou 405 nm.
10. Palička a malta.
11. Chladničky, schopné provozu při 5±3°C.
12. Vodní lázně, schopné provozu mezi 47°C a 50°C a 37±1°C.
13. Sušicí skříňka (nebo trouba větraná konvekci), která může být udržována mezi 25°C a 50°C.

#### **3.1.1. Fáze před nabohacením (Pre-enrichment)**

Nejprve 10 g nebo 10 ml vzorku se dává do 90 ml BPW (buffered peptone water) média. Před využitím se BPW předeřívá na pokojovou teplotu. Takhle naočkovaný vzorek se inkubuje 18 ± 2 hodin při teplotě 34 - 38°C. Dále následuje fáze nabohacení.

### 3.1.2. Fáze nabohacení (Enrichment)

BPW s naočkovaným vzorkem se pořádně promíchají a 0,1 ml z toho získané kultury se přenesou do 10 ml CSB (Cronobacter selective broth). CSB se promíchá a nechá se inkubovat  $24 \pm 2$  hodin při teplotě  $41,5^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.3. Selektce (Selection)

CSB se znovu zamíchá a pomocí 10  $\mu\text{l}$  kličky se naočkuje na CCI agar (chromogenic Cronobacter isolation agar), který se zase inkubuje  $24 \pm 2$  hodin při teplotě  $41,5^{\circ}\text{C}$ . Po inkubaci se chromogenní miska prozkoumá na přítomnost Cronobacter, které obvykle tvoří malé až střední kolonie (1-3 mm) modré až modro-zelené barvy. Ostatní bakterie bývají bílé a mohou mít zelený, šedý nebo černý kroužek uprostřed. Některé přirozeně zbarvené bakterie bývají žluté nebo červené.

### 3.1.4. Izolace podezřelých kolonií a potvrzení (Confirmation)

Pro potvrzení se berou 5 podezřelých kolonií a inkubují se  $21 \pm 3$  hodin na TSA při teplotě  $34 - 38^{\circ}\text{C}$ . Po inkubaci se kolonie mohou uchovávat při teplotě  $5^{\circ}\text{C}$  do 7 dnů. Identifikace se provádí pomocí biochemických testů (Tabulka 2).

Schematická reprezentace metody pro izolaci a identifikaci Cronobacter sakazakii dle ČSN EN ISO 22964 je znázorněna v Příloze B.

**Tabulka 2** Identifikace Cronobacter sakazakii podle ČSN EN ISO 22964.

Reakce	Interpretace
Oxidasa	Negativní
Hydrolyza 4-nitrofenyl $\alpha$ -D-glukopyranosy	Pozitivní (min. absorpce 0,3 při 405 nm)
L-lysin dekarboxylasa	Negativní (žlutý)
L-ornithin dekarboxylasa	Pozitivní (fialový)
Produkce kyseliny z D-arabitolu	U Cr. sakazakii negativní
Produkce kyseliny z D-sorbitolu	Negativní
Produkce kyseliny z D-sukrosy	Pozitivní
$\alpha$ -methyl-D-glukosid (nepovinný)	U Cr. sakazakii pozitivní
MRT (nepovinný)	Negativní (žlutý)
Voges-Proskauer (nepovinný)	Pozitivní (růžové pozadí)

## **3.2 Další způsoby**

### **3.2.1. FDA navržená metoda**

Dříve do přijetí postupu ISO/TS 22964 a později ISO EN 22964 existovala podobná metoda pro detekci *Cronobacter sakazakii* ve mléčných směsích navržená FDA. Tento způsob zahrnoval předběžné obohacení v neselektivní živné půdě (destilované vodě), obohacení v *Enterobacteriaceae* enrichment, kultivaci na VRBGA a subkultivaci na TSA. Předpokládané kolonie *Cronobacter* se vybíraly z TSA na základě produkce žlutého pigmentu (rys tradičně považovaný za typický pro *Cronobacter* spp.) a nechávaly se potvrdit pomocí oxidasových testů a biochemického profilování. Bylo ovšem zjištěno, že tento způsob má nízkou citlivost a relativně nízkou specifitu [9], [16]. Později destilovanou vodu vyměnily za BPW, přidaly sukrosu a zvedly teplotu na 42°C, což neinhibuje růst ostatních rodů z *Enterobacteriaceae*, ale dává výhodu *Cronobacter*.

### **3.2.2. Imunochemická a imunochromatografická detekce**

Javůrková B. a kol. popisují možnost detekce *Cronobacter sakazakii* pomocí nekompetitivní enzymové imunoanalýzy (ELISA) a také nekompetitivní imunochromatografickou detekci (ID). Obě metody využívají polyklonální protilátky AbCS. Jako vhodnější formát se ukázala metoda ELISA, která umožňuje dobré odlišení *Cronobacter sakazakii* od dalších bakterií rodu *Enterobacter*. Metoda ID je ale jednodušší a řádově rychlejší než ELISA. S použitou protilátkou však poskytovala u některých kmenů *Cronobacter* falešně negativní a u *Enterobacter* falešně pozitivní výsledky [17].

## **3.3 Dostupná chromogenní media pro kultivační vyšetření**

Jedním z nejvýznamnějších znaků *Cronobacter* je přítomnost enzymu  $\alpha$ -glukosidasy. Tento enzym ostatní zástupci enterobakterů nemají. Jsou to proteiny z povrchu bakteriálních buněk *Cronobacter* spp.  $\alpha$ -glukosidasa je skupina proteinů, které mohou vázat aminokyseliny, sacharidy a proteiny vnější membrány (OmpA, OmpC, Protein A) [13]. Aktivita  $\alpha$ -glukosidasy se stala definující charakteristikou pro diferenciaci *Cronobacter* spp. z jiných druhů čeledi *Enterobacteriaceae*. Tento biochemický znak byl použit jako selektivní marker ve vývoji diferenciálních chromogenních médií.



Mezi chromogenní substráty patří například neselektivní 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid (XaGlc), který je přeměňován  $\alpha$ -glukosidasou na pigment, který obarví kolonie *Cronobacter* na charakteristické modrozelené zbarvení. Jelikož substrát není selektivní, může poskytnout falešně pozitivní výsledky s *Escherichia vulneris*, *Pantoea* sp. a *Citrobacter koseri*.

Jiným chromogenním substrátem, který může být použit pro detekci *Enterobacter sakazakii*, je využití trypsinových štěpů sojového agaru a  $\alpha$ -D-glukopyranosidu. Působením přítomné  $\alpha$ -glukosidasy vznikají přeměnou přidaného substrátu žluté zóny p-nitrofenylového hydrolyzátu. Zástupcem je například ESIA<sup>®</sup> (Obrázek 4), který vykazuje dobrou specifitu, inkluze krystalické violeti snižuje jeho citlivost [9].



**Obrázek 4** *Cronobacter* spp. na ESIA ukazují charakteristické modro-zelené zbarvení [19].

Nejspolehlivější výsledky byly získány při použití selektivních chromogenních médií podle Druggan-Forsythe-Iversen (DFI) agaru (Obrázek 5) a Chromocult<sup>®</sup> *Cronobacter* isolation agar (CCI) by Merck (Obrázek 6). Případně falešně pozitivní výsledky poskytují vzorky obsahující mikroorganismy, které mají  $\alpha$ -glukosidasu.

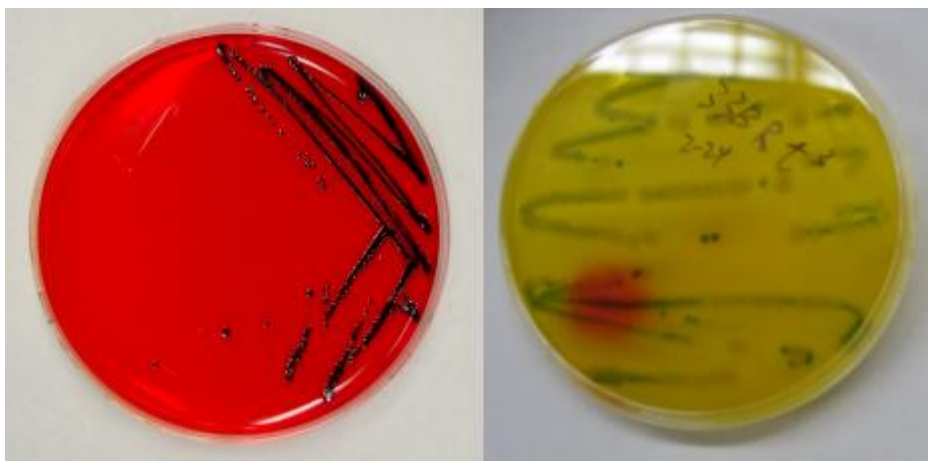


**Obrázek 5** *Cronobacter* spp. na DFI agaru mají tmavězelené, světlózelené nebo nahnědle-zelené zbarvení. Některé kolonie mohou mít pouze zelené centrum s bílým / žlutým okrajem [20].



**Obrázek 6** *Cronobacter sakazakii* a několik dalších zástupců rodu *Cronobacter* rostou na CCI agaru v malých až středních modrých nebo modrozelených koloniích [21].

Modifikovaný agar Druggane-Forsythee-Iversen (mDFI) je zlepšený Druggane-Forsythee-Iversen (DFI) agar a řeší omezení jak DFI, tak ESIA. Bylo prokázáno, že vyšší koncentrace XaGlc, snížená koncentrace deoxycholátu sodného a inkubace při 42°C zvyšuje citlivost mDFI pro detekci *Cronobacter*. Enterobacter Sakazakii Plating Medium (ESPM) je další chromogenní médium, které bylo vyvinuto společností R&F Products Inc (Obrázek 7). Toto médium zahrnuje XaGlc jako ostatní chromogenní média pro *Cronobacter* spp. Autoři také zahrnuli trisacharidový analog 5-brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ ,D-glukopyranosa- $\beta$ ,D-glukopyranosid (X-cellobiosa). Přidání druhé chromogenní sloučeniny se používá za účelem zvýšení citlivosti média pro *Cronobacter* spp [18]. *Cronobacter* spp. na ESPM agaru mají barvu od modré do černé nebo šedé s červeným pozadím. *Cronobacter* nemění červenou barvu pozadí, ale mění ji další mikroflóra přítomná ve vzorku (například sušené mléčné směsi) [20].



**Obrázek 7** Miska vpravo ukazuje vzorek kojenecké výživy s *Cronobacter* a vedlejší flórou, která mění barvu pozadí agaru z červené na žlutou ve většině oblastí. *Cronobacter* spp. jsou zelené se žlutým pozadím a černé s červeným pozadím [20].

Podobným způsobem funguje COMPASS Enterobacter sakazakii Agar od firmy Biokar diagnostics. Především inhibuje Gram-pozitivní bakterie a pak na základě barvy se dá odlišit kolonie *Cronobacter* od jiných druhů rodu *Enterobacter* (Obrázek 8) [26].

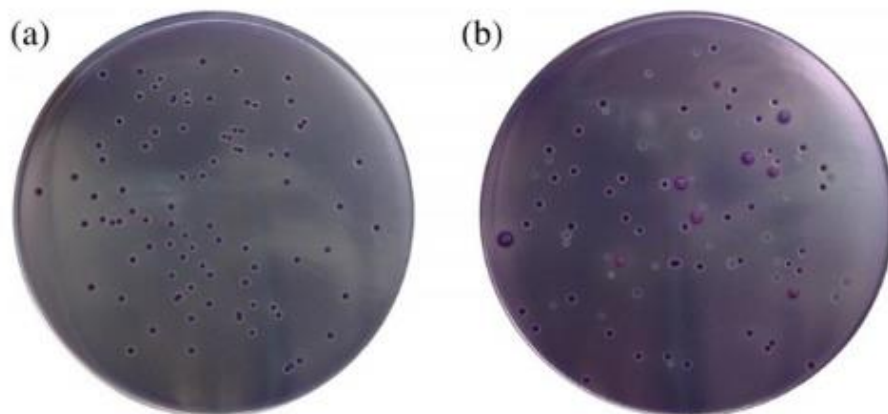


**Obrázek 8** Kolonie *Cronobacter* na COMPASS Enterobacter sakazakii agaru vykazuje modrozelenou barvu [26]

V roce 2011 Kim S. a Rhee M. navrhli nové selektivní médium pro izolaci *Cronobacter* spp. KR médium obsahuje salicin, složku, která usnadňuje diferenciaci *Cronobacter* spp. a neutrální červenou jako indikátor změny pH. Žlučová sůl č. 3 a krystalická violet inhibují většinu grampozitivních bakterií a chlorid sodný udržuje osmotickou rovnováhu. Salicin a pepton poskytují živiny potřebné pro růst bakterií.

Salicin fermentující organismy produkují kyselinu prostřednictvím katabolismu salicinu, čímž snižují pH média a produkují fialově zbarvené kolonie, zatímco salicin

nefermentující organismy vytvářejí bezbarvé kolonie [31]. Většina kmenů *Cronobacter* spp. (99%) je schopna fermentovat salicin a naproti tomu potravinové patogeny a bakterie zkázy potravin ve většině případů nejsou schopny fermentovat salicin. Autory uvádějí specifitu média 98% a citlivost 100%. Ačkoliv chromogenní a fluorogenní média mají výhody (vysoká citlivost a selektivita), jsou ale příliš drahé vzhledem k vysokým nákladům na požadované diferenciální látky, jako je například XaGlc. Výraznou výhodou zde navrhovaného média KR je jeho poměr nákladů a efektivity.



**Obrázek 9** Morfologie kolonií (a) *Cronobacter* spp. a (b) *Cronobacter* spp. + vedlejší organismy. *Cronobacter* spp. tvoří typické kolonie s fialově zbarveným centrem obklopeným průhledným až opaleskujícím okrajem, zatímco v přítomnosti jiných organismů jsou kolonie bezbarvé nebo fialově zbarvené bez okrajů [31].

### 3.4 Dostupná fluorogenní media pro kultivační vyšetření

Nejznámějším fluorogenním substrátem pro detekci *Enterobacter sakazakii* je methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-glukosid. Přítomná  $\alpha$ -glukosidasa přeměňuje substrát za vzniku třpytivých fluoreskujících kolonií *Enterobacter sakazakii*. Fluorescenčně značené vybrané sekvence genů pro ribosomální RNA *Enterobacter sakazakii* lze detegovat soupravou VIT-E.sakazakii od Vermicon Identification Technology. Fluoreskující buňky *Enterobacter sakazakii* jsou viditelné pod fluorescenčním mikroskopem. Velkou výhodou tohoto postupu je, že celá detekce trvá méně než tři hodiny. Detekční limit je 103 KTJ/ml. Fluorescenční techniky však zatím nedosáhly většího rozšíření [13].

### 3.5 Metody biochemické a komerčně dodávané rychlé sety

K detekci *Cronobacter* spp. jsou používány biochemické soupravy, založené na průkazu přítomnosti určitých enzymů, charakteristických pro tento mikroorganismus. Příkladem takové soupravy je komerčně dostupná API<sup>®</sup> Rapid ID 32 E od výrobce bioMérieux SA. Tento test je standardizovaný identifikační systém pro Enterobacteriaceae a další gramnegativní tyčinky, který využívá 32 miniaturizovaných biochemických testů a specifickou databázi (Obrázek 10). Proužek ID 32 E sestává z 32 jamek, které obsahují dehydratované testovací substráty. Po 24 hodinách inkubace se reakce v jednotlivých jamkách vyhodnocují buď vizuálně nebo pomocí přístrojů ATB Expression, nebo Mini API. Jako substrát pro zjištění přítomnosti  $\alpha$ -glukosidasy se používají syntetické sloučeniny D-glukosy s p-nitrofenylovými deriváty. Produkce žlutého p-nitrofenylu odlišuje *Cronobacter* spp. od dalších druhů [13].



*Obrázek 10 API<sup>®</sup> Rapid ID 32 E od výrobce bioMérieux SA [33].*

Byly také zkoumány alternativní metody identifikace *Cronobacter*. Pro analýzu buněčných methylesterů mastných kyselin *Cronobacter* spp. byla použita plynová chromatografie s detekcí plamenové ionizace. kmenů. Bylo zjištěno, že výsledné profily mastných kyselin vykazují dobrou opakovatelnost a potenciál pro identifikační účely. K rozlišení *Cronobacter* z *E. cloacae*, *E. coli* a *Klebsiella pneumoniae* byla také použita detekce Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopií. Jemné kompoziční rozdíly byly detekovány s FTIR v sacharidových složkách buněčných membrán mezi *Cronobacter* spp. a jiných druhů [9].



### 3.6 Metody molekulárně-biologické

Molekulární metody identifikace *Cronobacter* byly rozsáhle zkoumány a popsány ve vědecké literatuře. Do nich jsou vkládány velké naděje, neboť tyto metody využívají molekulárně-genetických technik, které jsou rychlejší, spolehlivější a hlavně specifičtější než klasické kultivační metody. Většina nových detekčních postupů využívá k průkazu *Cronobacter* spp. polymerázové řetězové reakce (PCR). PCR je umělý proces vícenásobného kopírování (amplifikace) specifické sekvence DNA prováděný *in vitro*. Kopírování DNA během PCR se provádí pomocí speciálního enzymu DNA-polymerasy, stejně jako v buňkách živých organismů. Jako primer se používá známý gen  $\alpha$ -glukosidasy (glu A) nebo také oblasti 16S rRNA, což umožnilo specifickou a velmi citlivou detekci *Cronobacter* (10 pg čistého DNA templátu). S využitím inhibitorů se podařilo sestavit detekční PCR rozlišující živé a mrtvé buňky *Cronobacter* spp. Ovšem, vzhledem k úzkému vztahu mezi *C. sakazakii* a *C. malonaticus* se nezdá možné rozlišit od sebe tyto dva druhy pomocí 16S rRNA sekvenčních dat [13].

Dokonce se dá rozlišit i jednotlivé druhy z rodu *Cronobacter*. Alternativní geny, jako je gen *rpoB*, mají potenciál pro identifikaci a diferenciaci druhů *Cronobacter*. Stoop navrhnul PCR testy založené na *rpoB* v kombinaci se specifickou pro rod *Cronobacter* PCR jako spolehlivou a časově úspornou metodu pro rozlišení zástupců různých druhů z rodu *Cronobacter* [23].

Real-time PCR popsaný v je rychlý, specifický a citlivý způsob detekce *Cronobacter* spp. v potravinových vzorcích různého původu. Citlivý a přesný test Taqman real-time PCR vyvinutý Seo a Brackettem (2005) byl zlepšen zavedením IAC (internal amplification control, vnitřní kontrola amplifikace), což může účinně eliminovat falešně negativní výsledky. Test může detekovat velmi nízké počty buněk *Cronobacter* ve vzorcích potravin kontaminovaných vysokým množstvím vedlejší flóry a běžnými inhibitory PCR vzorků potravin po 24 hodinách obohacení [24].

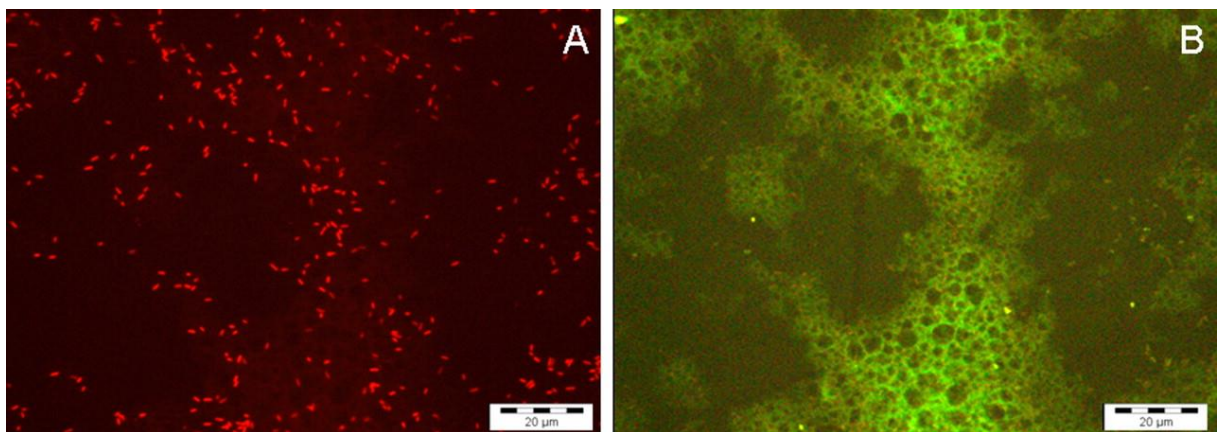
Na základě PCR funguje komerčně dodávaný CronoFast<sup>®</sup> Kit od firmy Microbial Systems. Výrobce uvádí citlivost jako 1 KTJ/10 g potravin. Je to poměrně rychlý způsob, který dává výsledky již do 24 hodin [27].

V roce 2011 Fricker-Feer a kol. provedli studium třech komerčně dostupných systémů pro detekci druhu *Cronobacter* založených na real-time PCR. Byly to: the BAX<sup>®</sup> System PCR Assay *Enterobacter sakazakii* (DuPont, Qualicon, Wilmington, USA), the Assurance GDS<sup>™</sup> *Enterobacter sakazakii* (BioControl, Bellvue, USA) and the foodproof<sup>®</sup> *Enterobacter sakazakii* Detection Kit (Biotecon Diagnostics, Potsdam, Germany). Specifičnost 100% byla pozorována

u dvou ze tří testovaných systémů: Assurance GDS™ Enterobacter sakazakii a foodproof® Enterobacter sakazakii Detection Kit. Použitím real-time PCR systému BAX® Test Enterobacter sakazakii sedm z osmi kmenů Cronobacter bylo identifikováno správně. Nicméně, Cronobacter dublinensis kmen CFS 237 nebyl systémem identifikován. Navíc byl získán falešně pozitivní výsledek s Enterobacter cloacae [28].

Mezi další biologické metody patří například metoda LAMP (loop-mediated isothermal amplification), která také umožňuje druhovou detekci bakterií [13], t. j. se může používat pro rozlišení Cronobacter sakazakii od ostatních zástupců Cronobacter spp. Je to rychlá, nenákladná, specifická. Citlivost je uvedena na 1,2 KTJ/100 g sušené mléčné výživy.

Úspěšně byla použita rovněž metoda detekce fluorescenční hybridizace in situ (FISH), která umožňuje detekci specifických míst na DNA nebo mRNA (Obrázek 11). Je to poměrně citlivá metoda (1 KTJ/10 g sušené mléčné výživy).

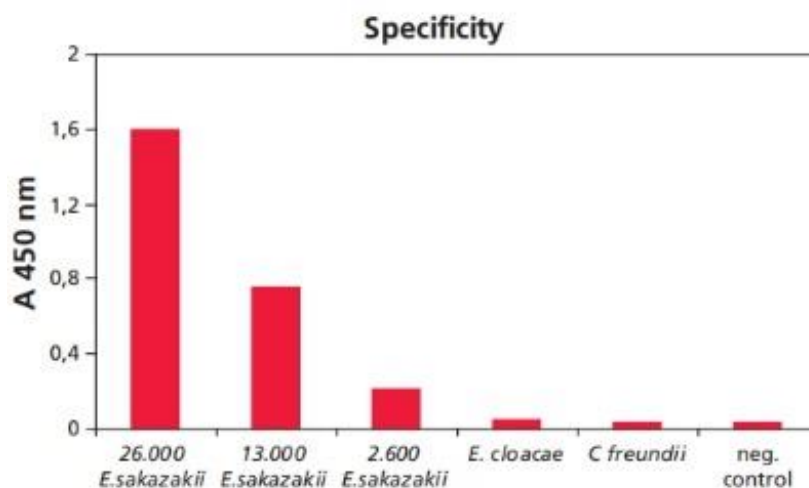


**Obrázek 11** (A) Detekce *C. sakazakii* na sklíčku. (B) Vizualizace stejného mikroskopického pole v zeleném světle (negativní kontrola), ukazující autofluorescenci proteinů kojenecké výživy a nepřítomnost fluorescenčních buněk[22].

Jinou možností je pulsní gelová elektroforéza (PFGE, pulsed field gel electrophoresis), která umožňuje analýzu velkého množství DNA fragmentů z celého bakteriálního genomu. PFGE analýza je poněkud zdlouhavá, trvá 2–3 dny, ale je považována za vysoký standard v subtypizaci bakterií.

Podobný význam má multilokusová sekvenční typizace (MLSA, multilocus sequence analysis). Genetické rozdíly bakteriálních kmenů jsou studovány na základě sekvenování nukleotidů chromosomálních genů pro enzymy nebo některé proteiny. Touto metodou autoři dokázali rozlišit jednotlivé druhy Cronobacter spp [13].

Z komerčně dodávaných setů je nutno zmínit HybriScan®D Enterobacter sakazakii Kit. Je to rychlý molekulární testovací systém pro detekci bakterií rodu Cronobacter v potravinách, zejména v sušených mléčných směsích pro kojence a jeho produkčním prostředí. Obrázek 12 ukazuje specifitu HybriScanD E. sakazakii. Validizační studie ukázaly relativní přesnost 95%, relativní specifitu 92,9% a relativní citlivost 95,7%. HybriScanD E. sakazakii umožňuje spolehlivou a komplexní kontrolu podezřelých produktů v kontextu klasické diagnostiky a zrychluje detekci (výsledky jsou již po 48 hodinách) [25].



Obrázek 12 Specifita HybriScanD E. sakazakii [25].

Hodně studií se zabývají rozlišením mezi rodem Cronobacter a ostatními rody z čeledi Enterobacteriaceae. Ovšem je také nutno zjistit druhovou specifitu uvnitř rodu Cronobacter. Takovou studii provedly Healy B. a kol. Ve své práci Microarray-based comparative genomic indexing (CGI) of the Cronobacter genus nebo-li Komparativní genomické indexování rodu Cronobacter (Enterobacter sakazakii) založené na mikročipech Healy a kol. hledají genotypové rozdíly mezi zástupci rodu Cronobacter.

Výsledkem studie je skutečnost, že některé geny a genové klastry byly variabilní v Cronobacter sakazakii a chyběly v jiných Cronobacter spp. Předpokládaný klastř stříbrné / měděné resistance (ESA\_04238–04242) byl přítomen ve více než polovině kmenů Cronobacter sakazakii a nebyl přítomen v žádném jiném druhu. Putativní fimbriální geny (ESA\_01970 a ESA\_01976) byly přítomny pouze u 14 ze 60 izolátů Cronobacter sakazakii. Dva izoláty C. sakazakii měly výrazné delece genových klastrů souvisejících s bičíkem (ESA\_01248–01259 a ESA\_01337–01352). Některé geny na plazmidu pESA2 byly přítomny ve 3 kmenech C. sakazakii a C. turicensis. Geny identifikované z mikročipu mohou být později využity jako



potenciální markery pro zahrnutí do molekulárního detekčního protokolu. Mullane a kol. (2008) charakterizovali lokus rfb v *C. sakazakii* a popsali první sérotypy, označované jako O:1 a O:2. Data z analýzy CGI podporují nálezy Mullane, že existuje několik O-antigenových sérotypů v rámci druhu *C. sakazakii*. V této studii bylo pozorováno, že 23 kmenů *C. sakazakii* sdílí společný genový klastř O-antigenů. Toto pozorování vyžaduje další zkoumání, protože ne všechny geny umístěné v O-antigenovém genovém klastřu byly zahrnuty do aktuálního mikročipu. Kromě toho existuje možnost přítomnosti neidentifikovaného sérokonverzního fagu schopného měnit sérotyp [29].

## ZÁVĚR

*Cronobacter sakazakii* zpravidla nevyvolává onemocnění u zdravých dospělých jedinců, ovšem je to extrémně nebezpečný původce takových onemocnění u novorozenců a imuno-deficientních lidí jako meningitida, bakteriemie a novorozenecká enterokolitida. Proto je tak nezbytné mít k dispozici vhodné a rychlé metody jeho detekce.

Doposud rezervoár *Cronobacter sakazakii* zůstává neznámým, ale z největší pravděpodobností jsou hlavními zdroji jsou půda, voda a zelenina. Je důležité brát to na vědomí pro možnou prevenci kontaminaci potravin.

Navíc je tento druh schopen tvořit silné biofilmy, což mu umožňuje lepší přichycení k nádobí a pomůckám. Je pak zapotřebí tohoto zohlednit a dodržovat hygienických pravidel osobních a zvláště v nemocničních institucích.

V roce 2017 byla Mezinárodní organizací pro normalizaci ISO navržena nová metoda pro identifikaci *Cronobacter* spp. zahrnující sérii kultivačních kroků. Její postup byl detailně popsán v této práci.

Vedle klasických kultivačních technik se postupně prosazují rychlé metody založené na biochemických a molekulárně-biologických principech, zejména polymerázová řetězová reakce PCR a její modifikace. Existuje také celá řada komerčně dodávaných setů pro izolaci a identifikaci *Cronobacter sakazakii*, což umožňuje ještě rychlejší jejich detekci, pokud je potřeba.

## POUŽITÁ LITERATURA

1. DEMNEROVÁ, K., PAZLAROVÁ J. *Enterobacter sakazakii* alias *Cronobacter sakazakii* – nová hrozba? *Chemicke Listy* 2009; roč. 103, č. 8, s. 641-646.
2. FARMER, J. J. *Enterobacter sakazakii*: A New Species of "Enterobacteriaceae" Isolated from Clinical Specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 7/1980; roč. 30, č. 3.
3. IVERSEN, C. et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. *BMC Evolutionary Biology*. 2007, roč. 7, č. 1, s. 64.
4. Coloured scanning electron micrograph (SEM) of *Cronobacter sakazakii* [online]. 2018 [cit. 2019-6-28]. Dostupné z <https://pixels.com/featured/4-cronobacter-sakazakii-dennis-kunkel-microscopyscience-photo-library.html>.
5. *Cronobacter sakazakii* on TSA [online]. [cit. 2019-6-28]. Dostupné z <https://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xcs/xcs02.html>.
6. BEUCHAT, L. R. *Cronobacter Sakazakii* in Foods and Factors Affecting its Survival, Growth, and Inactivation. *International Journal of Food Microbiology* 12/2009; roč. 136, č. 2, s. 204-213. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.029.
7. FAO/WHO. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report. [online]. 2004 [cit. 2019-6-25] Dostupné z <http://www.fao.org/3/a-y5502e.pdf>.
8. FAO/WHO. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae: meeting report. [online]. 2008 [cit. 2019-5-28]. Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44032>.
9. STRYDOM, A. et al. Species of *Cronobacter* – A review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk. *International dairy journal* 12/2012; roč. 27, č. 1-2, s. 3-12.
10. NAZAROWEC-WHITE, M., FARBER, J. M. *Enterobacter sakazakii*: a review. *International journal of food microbiology* 1997; roč. 34; č. 2; s. 103-113. doi: 10.1016/S0168-1605(96)01172-5.

11. Meningitida. [online], [cit. 2019-6-5]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Meningitida>.
12. Necrotizing enterocolitis. [online], [cit. 2019-6-5]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Necrotizing\\_enterocolitis](https://en.wikipedia.org/wiki/Necrotizing_enterocolitis).
13. BLAŽKOVÁ, M. Nebezpečný patogen *Enterobacter sakazakii* a jeho detekce. *Chemicke Listy* 2010; roč. 104; č. 2; s. 113 – 118.
14. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2019/229 ze dne 7. února 2019, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. [online], [cit. 2019-6-13]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0229&from=FR>.
15. ČSN EN ISO 22964. Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda průkazu bakterie rodu *Cronobacter*. 2017. Třídící znak: 560640.
16. CAWTHORN, D. Evaluation of different methods for the detection and identification of *Enterobacter sakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment. *International journal of food microbiology* 9/2008; roč. 127; č. 1-2; s. 129-138.
17. BLAŽKOVÁ, M. a kol. Immunochromatographic strip test for detection of genus *Cronobacter*. *Biosensors & bioelectronics* 02/2011; roč. 26; č. 6; s. 2828-2834.
18. DRUGGAN, P., IVERSEN C. Culture media for the isolation of *Cronobacter* spp. *International journal of food microbiology* 12/2009; roč. 136; č. 2; s. 169-178.
19. *Enterobacter sakazakii* isolation chromogenic agar (ESIA). [online], [cit. 2019-5-25]. Dostupné z: [www.condalab.com](http://www.condalab.com).
20. DFI agar a ESPM agar. [online], [cit. 2019-6-26]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-cronobacter>.
21. CCI agar. [online], [cit. 2019-6-26]. Dostupné z: [http://www.emdmillipore.com/Web-US-Site/en\\_CA/-/USD/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA\\_CHEM-120596&DocumentId=201711.103.ProNet&DocumentUID=289215296&DocumentType=DS&Language=EN&Country=NF&Origin=PDP](http://www.emdmillipore.com/Web-US-Site/en_CA/-/USD/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-120596&DocumentId=201711.103.ProNet&DocumentUID=289215296&DocumentType=DS&Language=EN&Country=NF&Origin=PDP).
22. FISH. [online], [cit. 2019-6-26]. Dostupné z: <https://aem.asm.org/content/75/9/2925>.
23. STOOP, B. Development and evaluation of *rpoB* based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. *International journal of food microbiology* 12/2009 roč. 136, č. 2, s. 165-168.

24. WANG, X. Real-time PCR with internal amplification control for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in food samples. *Food control* 05/2012 roč. 25; č. 1; s 144-149.
25. HybriScan®D *Enterobacter sakazakii* Kit. [online], [cit. 2019-6-21]. Dostupné z: [www.sigma-aldrich.com/hybriscan](http://www.sigma-aldrich.com/hybriscan).
26. COMPASS *Enterobacter sakazakii* Agar. [online], [cit. 2019-6-21]. Dostupné z: <http://www.biokar-diagnostics.com/>.
27. CronoFast. [online], [cit. 2019-6-21]. Dostupné z: <http://www.microbial-systems.com/>.
28. FRICKER-FEER, C. Evaluation of three commercially available real-time PCR based systems for detection of *Cronobacter* species. *International journal of food microbiology* 2011; roč. 146; č. 2; s. 200-202.
29. HEALY, B. Microarray-based comparative genomic indexing of the *Cronobacter* genus (*Enterobacter sakazakii*). *International journal of food microbiology* 12/2009; roč. 136; č. 2; s. 159-164.
30. JARADAT, Z. W. Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing. *BMC Microbiology* 10/2009; roč. 225; č. 9.
31. KIM, S., RHEE, M. A new cost-effective, selective and differential medium for the isolation of *Cronobacter* spp. *Journal of microbiological methods* 2011; roč. 85; č. 2; s. 149-154.
32. DU, X. Biochemical and genetic characteristics of *Cronobacter sakazakii* biofilm formation. *Research in microbiology* 2012; roč. 163; č. 6-7; s. 448-456.
33. Řada API® ID proužků. [online], [cit 2019-6-27]. Dostupné z: <https://www.biomerieux.cz/produkty/apir>.
34. Biochemické vlatnosti *Cronobacter sakazakii*. [online]. [cit. 2019-6-28]. Dostupné z <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/microbiology-focus/chronobacter-spp.html>.

## **PŘÍLOHY**

Příloha A – Biochemické vlastností Cronobacter sakazakii [...]. .....	39
Příloha B – Schematická reprezentace metody pro izolaci a identifikaci Cronobacter sakazakii dle ČSN EN ISO 22964 [13]. .....	39

Příloha A – Biochemické vlastností *Cronobacter sakazakii* [...].

Biochemical Test	Reaction of <i>Cronobacter</i>
Gram	-
oxidase	-
catalase	+
H <sub>2</sub> S production	-
nitrate reduction	+
citrate utilization	+
esculin hydrolyzation	+
arginine hydolysation	+
Lysine	-
L-ornithine decarboxylation	+
Urease	-
Indole	-
ONPG	+
D-adonitol	-
L-arabinose	+
D-arabitol	-
D-cellobiose	+
Dulcitol	-/+
D-fructose	+
D-glucose	+
D-galactose	+
galacturonate	+
Inositol	+/-
Inulin	+
Lactose	+
Malonate	+/-
D-maltose	+
D-mannitol	+
D-mannose	+
D-melibiose	+
x-methyl-D-glucoside	+
D-raffinose	+
L-rhamnose	+
Salicin	+
Sorbitol	-
D-sucrose	+
D-trehalose	+
Xylose	+
Acetoin production (VP test)	+
methyl red test	-
tryptic soy agar at 25 °C	yellow pigmented

Příloha B – Schematická reprezentace metody pro izolaci a identifikaci *Cronobacter sakazakii* dle ČSN EN ISO 22964 [13].

