

**Univerzita Pardubice**

**Fakulta chemicko-technologická**

**Metody detekce toxinů *Bacillus cereus***

**Bakalářská práce**

**2021**

**Natálie Komínková**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Natálie Komínková**  
Osobní číslo: **C17561**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Metody detekce toxinů bakterie *Bacillus cereus***  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši na zadané téma. V úvodu práce se věnujte shrnutí základních informací o bakterii *Bacillus cereus*.
2. Vypracujte přehled toxinů tvořených bakterií *Bacillus cereus*, vč. jejich vlastností i onemocnění, která způsobují nebo na jejichž vzniku se podílejí.
3. Z publikovaných odborných textů vypracujte rešerši k možnostem detekce vybraných toxinů, a to metodami imunochemickými, analytickými, molekulárně-biologickými, aj.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnici č. 9/2012 Univerzity Pardubice a dále ve znění Dodatku č. 1 ke Směrnici č. 9/2012 „Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu“.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. David Šilha, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Práci s názvem Metody detekce toxinů *Bacillus cereus* 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 7. 2021

Natálie Komínková v.r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce panu Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D. za jeho velkou ochotu a trpělivost a za všechny cenné rady, které mi byly velmi nápomocné při zpracování mé bakalářské práce.

Zároveň bych také ráda poděkovala své rodině, která mi byla po celou dobu velkou oporou.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá toxinogenní bakterií *Bacillus cereus* a metodami detekce toxinů produkovaných touto bakterií. První část práce se zabývá základní charakteristikou a vlastnostmi *Bacillus cereus*, jeho výskytem v různých prostředích a potravinách a onemocněními spojenými s produkcí emetického toxinu a enterotoxinů. Tyto toxiny jsou popsány v další části práce, a to včetně popisu jejich toxinogenních účinků pro člověka. Závěr práce je věnován metodám detekce toxinů *Bacillus cereus* a využití těchto metod v praxi.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

*Bacillus cereus*, emetický toxin, enterotoxiny, metody detekce

## **TITLE**

Methods for Detection *Bacillus cereus* Toxins

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis be occupied with toxinogenic bacteria *Bacillus cereus* and the methods for detection of toxins produced by the bacteria. The first part by occupied with characteristics and properties of *Bacillus cereus*, the occurrence of bacteria in environments and foods and the diseases associated with the production of emetic toxin and enterotoxins. These toxins, including of their toxinogenic effects for human, are described at the next part of the work. The conclusion of the work is devoted to methods of detection of *Bacillus cereus* toxins and their use in practice.

## **KEYWORD**

*Bacillus cereus*, emetic toxin, enterotoxins, methods of detection

# OBSAH

ÚVOD.....	14
1 BAKTERIE <i>BACILLUS CEREUS</i> .....	15
1.1 Historie <i>Bacillus cereus</i> .....	15
1.2 Taxonomické zařazení .....	16
1.3 Morfologie a kultivace .....	18
1.4 Faktory virulence .....	20
1.4.1 Endospory <i>Bacillus cereus</i> .....	20
1.4.2 Enzymy produkované <i>Bacillus cereus</i> .....	20
1.5 Výskyt <i>Bacillus cereus</i> .....	22
1.6 Patogeneze a léčba alimentárních onemocnění způsobených <i>Bacillus cereus</i> .....	23
2 TOXINY <i>BACILLUS CEREUS</i> .....	25
2.1 Emetický toxin .....	25
2.1.1 Emetický syndrom a další onemocnění způsobená emetickým toxinem .....	26
2.2 Enterotoxiny.....	27
2.2.1 Hemolyzin BL.....	28
2.2.2 Nehemolytický toxin (Nhe) .....	30
2.2.3 Cytotoxin K (CytK) .....	31
2.2.4 Enterotoxin FM a enterotoxin T .....	31
3 METODY DETEKCE TOXINŮ <i>BACILLUS CEREUS</i> .....	33
3.1 Imunochemické metody pro detekci toxinů <i>Bacillus cereus</i> .....	34
3.1.1 Imunochemické metody s indikátory.....	34
3.1.2 Reverzní pasivní latexová aglutinace (RPLA).....	36

3.1.3	Imunodetekce v laterálním toku na membráně (LFIA) .....	37
3.2	Fyzikálně-chemické metody pro detekci toxinů <i>Bacillus cereus</i> .....	39
3.2.1	MALDI-TOF MS.....	39
3.2.2	Chromatografické metody .....	41
3.2.3	Biosenzory .....	42
3.3	Molekulárně-biologické metody pro detekci toxinů <i>Bacillus cereus</i> .....	44
3.3.1	Kvalitativní polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	44
3.3.2	Kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce (qPCR) .....	46
3.3.3	DNA čipy .....	48
3.3.4	Biotest založený na citlivosti motility kančích spermií .....	49
4	ZÁVĚR .....	50
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	51



## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Buňky <i>B. cereus</i> barvené Leifsonovou technikou pro zvýraznění bičíků ( <a href="http://www.phil.cdc.gov">www.phil.cdc.gov</a> ) .....	18
Obrázek 2 – Kolonie <i>B. cereus</i> na MYP agaru ( <a href="http://www.cit.vfu.cz">www.cit.vfu.cz</a> ) .....	19
Obrázek 3 – Kolonie <i>B. cereus</i> na krevní agaru ( <a href="http://www.cit.vfu.cz">www.cit.vfu.cz</a> ) .....	19
Obrázek 4 – Možné cesty přenosu <i>Bacillus cereus</i> (Abee a kol., 2011) .....	23
Obrázek 5 – Chemická struktura emetického toxinu (Ramarao a kol., 2020) .....	26
Obrázek 6 – Diskontinuální zóna hemolýzy kmene <i>B. cereus</i> F837/76 na krevním agaru s obsahem beraní krve (Beecher a Wong, 1994) .....	29
Obrázek 7 – Schéma principu sendvičové ELISA metody ( <a href="http://www.baria.cz">www.baria.cz</a> ) .....	35
Obrázek 8 – 96 jamková destička pro metodu ELISA ( <a href="http://www.enzolifesciences.com">www.enzolifesciences.com</a> ) .....	36
Obrázek 9 – Duopath® <i>Cereus Enterotoxins test</i> – pozitivní výsledek ( <a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a> ) .....	38
Obrázek 10 – Schéma MALDI-TOF MS ( <a href="http://www.cvuas.de">www.cvuas.de</a> ) .....	40
Obrázek 11 – Hmotnostní spektra standardu syntetického cereulidu v různých koncentracích a emetického kmene <i>B. cereus</i> měřených pomocí MALDI-TOF MS (Ulrich a kol., 2019) .....	40
Obrázek 12 – Schéma konstrukce DNA biosenzoru pro detekci buněk a toxinů <i>B. cereus</i> (Izadi a kol., 2016) .....	42
Obrázek 13 – Výsledek mPCR toxinů <i>B. cereus</i> znázorněný na agarózorovém gelu (Forghani a kol., 2015) .....	46
Obrázek 14 – Schéma microarray <i>Bacillus-1</i> (Sergeev a kol., 2006) .....	48

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Rozdělení skupiny <i>Bacillus cereus</i> do sedmi fylogenetických skupin (Kumari a Sarkar, 2016) .....	17
Tabulka 2 - Výsledky detekce toxinu <i>B. cereus</i> ve vzorcích mléčných výrobků (Izadi a kol., 2016). .....	43

## SEZNAM ZKRATEK

<b>BLAST</b>	Algoritmus používaný v bioinformatice za účelem srovnávání primárních sekvenčních informací ( <i>z angl.</i> Basic Local Alignment Search Tool)
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>bceT</i>	Gen, kódující enterotoxin T
<b>BYPTA</b>	Selektivně-diagnostická půda s obsahem vaječného žloutku, polymyxinu B a trimethoprimu ( <i>z angl.</i> Blood Yolk Polymyxin Trimethoprim Agar)
<b>CaCo-2</b>	Buněčná linie odvozená od kolorektálního adenokarcinomu
<b>CcpA</b>	Regulátor katabolitů ( <i>z angl.</i> Catabolite control protein A)
<b>CES</b>	Cereulid-syntetáza
<b>CNS</b>	Centrální nervová soustava
<i>cyt</i>	Gen, kódující cytotoxin K
<b>CytK</b>	Cytotoxin K
<b>cspA</b>	Protein chladového šoku ( <i>z angl.</i> coldshock protein A)
<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina
<b>ELISA</b>	Enzymem značený imunotest s využitím pevné fáze ( <i>z angl.</i> Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
<i>entFM</i>	Gen, kódující enterotoxin FM
<b>Fnr</b>	Regulátor redox potenciálu ( <i>z angl.</i> Fumarate and nitrate reductase)
<b>GIT</b>	Gastrointestinální trakt
<i>hbl</i>	Gen, kódující hemolyzin BL
<b>HBL</b>	Hemolyzin BL
<b>HPLC</b>	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ( <i>z angl.</i> High-Performance Liquid Chromatography)

<b>LC-MS</b>	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (z <i>angl.</i> Liquid Chromatography–Mass Spectrometry)
<b>LFIA</b>	Detekce v laterálním toku na membráně (z <i>angl.</i> Lateral Flow ImmunoAssay)
<b>MALDI-TOF</b>	Laserová desorpce/ionizace za účasti matrice (z <i>angl.</i> Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight)
<b>MLST</b>	Multilokusová sekvenační typizace (z <i>angl.</i> MultiLocus Sequence Typing)
<b>MS</b>	Hmotnostní spektrometrie (z <i>angl.</i> Mass Spectrometry)
<b>MYP</b>	Selektivně-diagnostická půda s obsahem vaječného žloutku, mannitolu a polymixinu B (z <i>angl.</i> Mannitol egg Yolk Polymyxin agar)
<b>mPCR</b>	Multiplexní polymerázová řetězová reakce
<b><i>nhe</i></b>	Gen, kódující nemeholytický enterotoxin
<b>Nhe</b>	Nehemolytický toxin
<b>PapR</b>	Peptid regulující aktivitu PlcR
<b>PCR</b>	Polymerázová řetězová reakce
<b>PEMBA</b>	Selektivně-diagnostická půda s obsahem vaječného žloutku, mannitolu, polymyxinu B a bromothymolové modře (z <i>angl.</i> Polymyxin pyruvate Egg yolk Mannitol Bromothymol Blue Agar)
<b>PlcR</b>	Pleiotropický regulátor
<b>qPCR</b>	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase
<b>ResDE</b>	Regulátor redox potenciálu
<b>RIA</b>	Radioimunoanalýza
<b>RPLA</b>	Reverzní pasivní latexová aglutinace
<b>rRNA</b>	Ribosomální RNA
<b><i>rrs</i></b>	Gen, kódující 16S rRNA <i>Bacillus cereus</i>

**UV**

**Ultrafialové záření**

## ÚVOD

„Teplé jídlo do lednice nepatří!“ – pravidlo, které zná a řídí se jím nejedna hospodyňka. Většina z nás proto nechává teplé pokrmy při pokojové teplotě nejprve vychladnout a až poté je uskladňuje v lednici. Málokdo už ale ví, že tímto způsobem uskladnění hotových pokrmů můžeme nejen zmařit několikahodinovou práci v kuchyni, ale také přivodit strávnickům nepříjemné zdravotní obtíže. Na první pohled nemusí být totiž patrné, že jsou potraviny kontaminované mikroorganismy. Mohou krásně vonět, hezky vypadat, a dokonce i dobře chutnat. V tom se skrývá zákeřná moc alimentárních intoxikací – vůbec je nečekáte a z ničeho nic se objeví v plné síle.

*Bacillus cereus* je toxinogenní, všudypřítomná bakterie, která produkuje dva typy toxinů. Emetický toxin je bakterií produkován přímo v potravě a otrava tímto toxinem je charakterizována nevolností a zvracením. Enterotoxiny jsou produkovány bakterií ve střevě a způsobují onemocnění charakterizované vodnatými průjmy. V nepříznivých podmínkách přežívá tato bakterie ve formě vysoce odolných spor. Z tohoto důvodu je prakticky nemožné zcela zamezit kontaminaci potravin, a proto je nezbytné zabránit jejímu množení v potravinách, především vhodným skladováním potravin a jejich úpravě. V opačném případě hrozí, že dojde v těchto potravinách k vyklíčení spor a masivnímu pomnožení buněk a následné produkci emetického toxinu.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na metody detekce toxinů *Bacillus cereus*. Vzhledem ke krátkému a mnohdy nekomplikovanému průběhu onemocnění nevyhledává většina pacientů lékařskou pomoc. Kvůli ojedinělému hlášení případů otrav z potravin je tato bakterie z hlediska nebezpečnosti velmi podceňována. Proto je vývoj nových diagnostických metod důležitým faktorem, jak dostat tuto bakterii a rizika spojená s ní do podvědomí široké veřejnosti.

# 1 BAKTERIE *BACILLUS CEREUS*

## 1.1 Historie *Bacillus cereus*

Poprvé byl *Bacillus cereus* izolován v roce 1887 ze vzduchu v kravíně. Pod mikroskopem byly tehdy bakterie pozorovány jako dlouhé, pohyblivé buňky se zaoblenými konci. U většiny buněk byly viditelné endospory. Po 12 hodinách docházelo ke ztrátě motility bakterií a k postupnému uvolňování spor z buňky. Po 48 hodinách byly buňky zcela nehybné a v okolí buněk se nacházely uvolněné spory (Frankland a Frankland, 1887). První zmínka o alimentárním onemocnění, které bylo způsobeno rodem *Bacillus*, byla zaznamenána v roce 1906 (Votava a kol., 2003). V tomto roce došlo propuknutí onemocnění v sanatoriu, kde se u 300 pacientů a zaměstnanců objevily hojné průjmy, žaludeční křeče a zvracení. Nákaza se rozšířila prostřednictvím kontaminovaného masa, z něhož byly izolovány sporotvorné bacily (Adams a kol., 2016). Mikroorganismus, způsobující toto onemocnění, byl tehdy taxonomicky řazen jako *Bacillus peptonificans*. Vlastnosti, kterými byla bakterie popsána, se podobají vlastnostem nynějšího *Bacillus cereus* (Adams a Moss, 2000). Tyto aerobní sporotvorné bakterie byly považovány za původce alimentárních onemocnění v Evropě mezi lety 1936 a 1943. Stockholmská zdravotnická rada udává, že způsobily 117 z 367 vyšetřovaných případů (Adams a kol., 2016). Do poloviny 20. století však neexistoval přímý důkaz, že je *Bacillus cereus* původcem alimentárních onemocnění (Adams a Moss, 2000).

Teprve v roce 1955 Hauge poprvé identifikoval *Bacillus cereus* jako původce střevních potíží (Tewari a Abdullah, 2015). Ve své studii popisoval ohnisko nákazy, které propuklo v roce 1948 v nemocnici v Oslu. Zde byl k večeři podáván kromě hlavního chodu i dezert – čokoládový puding s vanilkovou omáčkou. Obě položky dezertu byly připraveny ráno předchozího dne a skladovány při pokojové teplotě. Pouze u 19 osob z celkových 80 se neprojevíly žádné příznaky onemocnění – avšak 11 z nich dezert úplně vynechalo a 8 z nich snědlo jen malé množství dezertu. Příznaky otravy jídlem byly charakterizovány bolestí břicha, hojným vodnatým průjmem, rektálním tenesmem a mírnou nevolností, která však jen zřídka vedla ke zvracení. Příznaky odezněly do 12 hodin od požití kontaminované potravy. Analýza vzorků potravin s následnou mikroskopií ukázala, že vanilková omáčka byla kontaminována Gram-pozitivní, tyčovitou bakterií vytvářející spory. Vlastnosti této bakterie

byly typické pro *Bacillus cereus* (Hauge, 1955).

Do 70. let 20. století byly příznaky onemocnění, způsobeného *Bacillus cereus*, charakterizovány pouze vodnatým průjmem po 8 až 16 hodinách od požití kontaminované potravy. Alimentární onemocnění doprovázené nevolností a zvracením bylo poprvé popsáno až v roce 1971 ve Spojeném Království (Tewari a Abdullah, 2015).

## 1.2 Taxonomické zařazení

Z hlediska taxonomie je rod *Bacillus* velmi komplikovaný (Kotiranta a kol., 2000). *Bacillus cereus* se řadí do skupiny *Bacillus cereus sensu lato*, kam dále patří *B. mycoides*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* a *B. toyonensis* (Griffiths a Schraft, 2017). První šestice členů této skupiny byla identifikována již v průběhu 20. století. *B. cytotoxicus* a *B. toyonensis* byly objeveny a klasifikovány až v posledních letech. Členové této skupiny podstatně ovlivňují zemědělství a potravinářský průmysl a mohou mít také negativní dopad na lidské zdraví. Například *B. anthracis* je znám jako obligátní patogen a původce antraxu. *B. thuringiensis* je Gram-pozitivní bakterie, která produkuje řadu krystalických toxinů. Ty jsou v zemědělství využívány jako prostředky pro hubení hmyzu. *B. cereus* je toxinogenní bakterie, která produkuje řadu toxinů způsobující dvě formy alimentárních onemocnění (Liu a kol., 2015).

Jednotlivé členy v této skupině od sebe prakticky nelze rozlišit pomocí běžných fenotypových a biochemických charakteristik (Webb a kol., 2019), jelikož mají velmi podobný genom (Rasko a kol., 2007). Mezi *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. anthracis* a *B. thuringiensis* byla zaznamenána vyšší než 99 % podobnost sekvence v primárních strukturách 16S rRNA (Kotiranta a kol., 2000). Pro jejich odlišení je nezbytné definovat fenotypové znaky pomocí plazmidů, které kódují jejich specifické vlastnosti (Rasko a kol., 2007).

Skupina *Bacillus cereus* se dělí do sedmi fylogenetických skupin. Jednotlivé druhy byly rozděleny na základě molekulárních údajů získaných ze vzorců polymorfismu délek amplifikovaných fragmentů, ribosomálních genových sekvencí, částečné genové sekvence pantothenát-syntetázy a přítomnosti genotypů *rrs* a *cspA* a teplot ideálních pro růst jednotlivých



kmenů. Ve skupině I jsou zařazeny všechny mezofilní rhizoidní kmeny *Bacillus mycoides* a *Bacillus pseudomycoides*. Ve skupině VI nalezneme všechny psychrotolerantní kmeny *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis* a *Bacillus weihenstephanensis*. *Bacillus cereus sensu stricto* a *Bacillus thuringiensis* jsou vysoce polyfyletické bakterie a můžeme je nalézt ve skupině II, III, IV, V a VI. Kmeny *Bacillus anthracis* jsou seskupeny do skupiny III. Mírný termotolerant *Bacillus cytotoxicus* je zařazen do skupiny VII (Kumari a Sarkar, 2016).

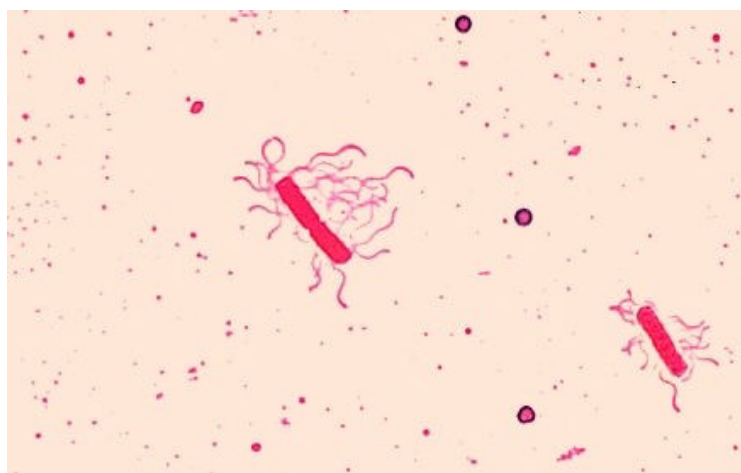
**Tabulka 1** – Rozdělení skupiny *Bacillus cereus* do sedmi fylogenetických skupin (Kumari a Sarkar, 2016)

Fylogenetická skupina	Růstová teplota (°C)	Přítomnost genů		Počet kmenů způsobujících alimentární onemocnění (%)	Druh
		<i>rrs</i>	<i>cspA</i>		
I	10–43	C	—	0	<i>B. mycoides</i> <i>B. pseudomycoides</i>
II	7–40	B	—	21	<i>B. cereus</i> s.s. <i>B. thuringiensis</i>
III	15–45	C	—	33	<i>B. cereus</i> s.s. <i>B. thuringiensis</i> <i>B. anthracis</i>
IV	10–45	D	—	22	<i>B. cereus</i> s.s. <i>B. thuringiensis</i>
V	8–40	B	—	12	<i>B. cereus</i> s.s. <i>B. thuringiensis</i>
VI	5–37	A	A	0	<i>B. mycoides</i> <i>B. cereus</i> s.s. <i>B. thuringiensis</i> <i>B. weihenstephanensis</i>
VII	20–50	—	—	50	<i>B. cytotoxicus</i>

A (100 % kmenů s genotypem *rrs* a *cspA*), B (vysoký počet kmenů nesoucích genotypy *rrs* a *cspA*), C (nízký počet kmenů nesoucích genotypy *rrs* a *cspA*), D (nízký počet kmenů nesoucích genotypy *rrs* a *cspA* v malém množství), — (kmeny s absencí genotypů *rrs* a *cspA*)

### 1.3 Morfologie a kultivace

*Bacillus cereus* je Gram-pozitivní, aerobní až fakultativně anaerobní, sporotvorná bakterie, která může dosahovat šířky až 1,2  $\mu\text{m}$  a délky 3  $\mu\text{m}$  a více. V mikroskopu ji pozorujeme jako tyčovitou, pohyblivou buňku. Spory jsou umístěné uvnitř bakteriální buňky centrálně nebo paracentrálně a mají elipsoidní tvar (Kumari a Sarkar, 2016). Na povrchu *Bacillus cereus* se nacházejí peritrichiální bičíky, které zajišťují pohyb bakterie a přispívají ke tvorbě biofilmu (Majed a kol., 2016). Mimo to má bakterie na svém povrchu i krystalický protein, který tvoří vnější vrstvu buněčné stěny, tzv. S-vrstvu (Kotiranta a kol., 2000). Ta může sloužit jako adhezin a usnadnit bakterii lépe přilnout na povrchu hostitelské buňky, kde následně kolonizuje. Další funkcí této struktury je ochrana bakterie před škodlivými enzymy, antimikrobiálními látkami nebo změnami pH prostředí (Jalapoor, 2011).



**Obrázek 1** – Buňky *B. cereus* barvené Leifsonovou technikou pro zvýraznění bičíků ([www.phil.cdc.gov](http://www.phil.cdc.gov))

Kultivace *Bacillus cereus* není náročná. Bakterie roste v širokém teplotním rozmezí od 10 do 50 °C. Optimum se pohybuje mezi 28 a 35 °C (Ultee a kol., 1999). Za aerobních podmínek a teplotě 37 °C roste *Bacillus cereus* na krevním agaru v neprůhledných koloniích s matným povrchem. Kolonie mají nepravidelné okraje a vykazují specifický plazivý růst. Dalším charakteristickým znakem je zóna  $\beta$ -hemolýzy kopírující tvar kolonií (Bottone, 2010).

Jako selektivně-diagnostické půdy slouží pro kultivaci *Bacillus cereus* MYP agar a PEMBA. MYP agar obsahuje mannitol, vaječný žloutek a polymyxin. PEMBA obsahuje polymyxin, pyruvát, vaječný žloutek, mannitol a je obohacena o agar obsahující bromothymolovou modř. Selektivita těchto půd je založena na schopnosti bakterií zkvašovat mannitol a hydrolyzovat lecitin obsažený ve vaječném žloutku (Amor a kol., 2018). Na těchto kultivačních půdách roste *Bacillus cereus* v růžových, modrých nebo oranžově-růžových koloniích, obklopených precipitační nebo „haló zónou“ (Kumari a Sarkar, 2016). Identifikace *Bacillus cereus* pouze pomocí výše zmíněných selektivně-diagnostických půd nemusí být vždy dostačující. V případě slabé žloutkové reakce se může bakterie jevit jako falešně lecitináza-negativní. Proto je třeba použít pro identifikaci *Bacillus cereus* navíc i krevní agar. Na základně tohoto faktu vyvinuli Kim a kol. (2013) speciální druh agaru, nazývaný jako BYPTA. Ten vykazoval vyšší selektivitu než výše zmíněné selektivně-diagnostické půdy, a to zejména díky použití krevního agaru a pyruvátu sodného pro zviditelnění hydrolyzy vaječného žloutku.



**Obrázek 2** – Kolonie *B. cereus* na MYP agaru  
([www.cit.vfu.cz](http://www.cit.vfu.cz))



**Obrázek 3** – Kolonie *B. cereus* na krevní agaru  
([www.cit.vfu.cz](http://www.cit.vfu.cz))

## 1.4 Faktory virulence

### 1.4.1 Endospory *Bacillus cereus*

V nepříznivém prostředí produkují vegetativní buňky *Bacillus cereus* endospory, které jsou vysoce odolné vůči vysokým teplotám i chemickým a fyzikálním jevům (Carlin a kol., 2010). Proces přeměny vegetativní buňky na sporu se nazývá sporulace. Během sporulace podléhá mateřská buňka lýze a uvolňuje zralou endosporu, přičemž každá vegetativní buňka vyprodukuje právě jednu endosporu. Sporulace je řízena řadou složitých a přísně regulovaných genetických programů (Wang a kol., 2015).

Endospory této bakterie jsou tvořeny dehydratovaným jádrem obklopeným několika vrstvami. Nejdálčenější vrstvou od jádra je exosporium, které zajišťuje vysoce hydrofóbní kontakt spor s vnějším prostředím a umožňuje přilnutí spory k hostitelským buňkám nebo abiotickým povrchům. Další strukturou je plášť sloužící jako bariéra pro degradační enzymy a eliminuje škodlivé chemikálie. Vnější membrána může akumulovat karotenoidy – pigmenty chránící spóru před UV zářením. Kůra je tvořena peptidoglykanem, který hraje důležitou roli v udržení dehydratace jádra. Nízká propustnost vnitřní membrány přispívá k ochraně před dezinfekčními prostředky a některými chemikáliemi poškozujícími DNA. Dehydratované jádro obsahuje DNA nasycenou  $\alpha$ -typy a  $\beta$ -typy SASP (malé, v kyselině rozpustné proteiny spor) chránících jádro před UV a  $\gamma$ -zářením, suchým teplem i vlhkým teplem, genotoxickými chemikáliemi a některými oxidačními činidly. Jádro spor má nízký obsah vody, vysokou hladinu kyseliny dipikolinové a obsahuje dvojmocné kovy chránící jádro před vysoušením a suchým a vlhkým teplem (Bressuire-Isoard a kol., 2018). Díky své hydrofóbní povaze jsou spory a vegetativní buňky *Bacillus cereus* schopné pevně přilnout k povrchům jako je například nerezová ocel, na kterých se běžně zpracovávají potraviny. Adherované vegetativní buňky a spory pak působí jako iniciační fáze pro tvorbu biofilmu, který může být zdrojem opakované kontaminace a snížené trvanlivosti potravin (Kumari a Sarkar, 2016).

### 1.4.2 Enzymy produkované *Bacillus cereus*

Během růstu produkuje *B. cereus* řadu enzymů, které přispívají k jeho patogenitě. Mezi nejznámější enzymy řadíme fosfolipázy, hemolyziny,  $\beta$ -laktamázy a kolegenázy.

**Fosfolipázy** štěpí fosfolipidy za vzniku vedlejších produktů, které jsou důležitou složkou buněčných procesů – proliferace, diferenciace, pohyblivosti, apoptóza a genová exprese (Eurtivong a kol., 2020). Enzymatickou degradací buněčné membrány dochází k poškození epitelu a subepiteliální matrice lidských buněk a k jejich následné hemolýze (Sergeev a kol., 2006). *Bacillus cereus* produkuje 3 druhy fosfolipáz – sfingomyelinázu a dva druhy fosfolipázy C. Účinek sfingomyelinázy produkované bakterií byl testován na myších, u kterých došlo ke zvýšení závažnosti infekce. Aktivita tohoto enzymu byla inhibována pomocí farmakologických přípravků (Enosi Tuipulotu a kol., 2020).

**Hemolyzin I**, také nazýván jako cereolyzin O, je termolabilní protein řadící se mezi cholesterol-dependentní cytolyziny. Jeho aktivita je inhibována cholesterolem a neutralizována anti-streptolysin-O globuliny z hyperimunního koňského séra. Hemolytickou aktivitu vykazuje již při koncentraci 1 ng/ml. Cereolyzin O indikuje uvolňování laktát-dehydrogenázy ze tkáně sítnice *in vivo* a tudíž může přispívat ke zhoršení nekrózy typické pro *endophthalmitis* typické pro *Bacillus cereus* (Ramarao a Sanchis, 2013). Byť není tento enzym zcela prozkoumán, je prokázáno, že se nepříznivě podílí na vzniku endoftalmitidy a srdečních či plicních nekrotázách (Berthold-Pluta a kol., 2015).

**Hemolyzin II** je oligomerní, termolabilní protein patřící do skupiny toxinů vytvářejících tazkvaný  $\beta$ -barel, složený z  $\beta$ -listů. Jedná se o strukturu, která tvoří hydrofobní část transmembránových proteinů (Visiello a kol., 2016). Narozdíl od cereolyzinu O není jeho aktivita inhibována cholesterolem. Mechanismus tvorby pórů je takový, že každý monomer hemolyzinu II vloží svůj, na glycin bohatý, segment do membrány. To vede ke tvorbě anion-selektivních transmembránových pórů o vnitřním průměru 1,5 až 2,0 nm, které způsobí depolarizaci membrány a následnou cytoplazmatickou destrukci cílové buňky (Kholodkov a kol., 2015). Hemolyzin II je jedním z mála virulencí faktorů *Bacillus cereus*, který není regulován PlcR, centrálním transkripčním regulátorem potřebným pro transkripci nehemolytického toxinu, cytotoxinu K, hemolyzinu BL a cereolyzinu O (Ramarao a Sanchis, 2013).

**Hemolyzin III** je tepelně labilní protein, jehož aktivita není inhibována cholesterolem (Ramarao a Sanchis, 2013). Tento enzym nebyl doposud purifikován. Gen pro tvorbu tohoto enzymu je však kódován 657-nukleotidovým genem charakteristickým pro *E. coli*. Prozatím nebyla ani zkoumána jeho enzymatická aktivita *in vivo* (Visiello a kol., 2016). Experimenty naznačují, že hemolyzin III vytváří trans-membránové póry o přibližném průměru 3 až 3,5 nm.

Hemolyzin nejprve naváže protein na povrch erytrocytů. Sestava monomerů pak vytváří trans-membránové póry, které způsobují rozpad erytrocytů (Ramarao a Sanchis, 2013).

**β-laktamázy** jsou bakteriální enzymy, které inaktivují β-laktamová antibiotika otevřením amidové vazby β-laktamového kruhu (Grace, 2013). Mezi různými kmeny *Bacillus cereus* byly hlášeny různé formy β-laktamáz. β-laktamáza I patří do β-laktamáz třídy A. Z hlediska struktury se jedná o penicilinázy se serinem v aktivním místě. β-laktamáza II patří do β-laktamáz třídy B. Tato třída je aktivována vazbou zinečnatých a kobaltnatých iontů v aktivním místě enzymu (Kotiranta a kol., 2000).

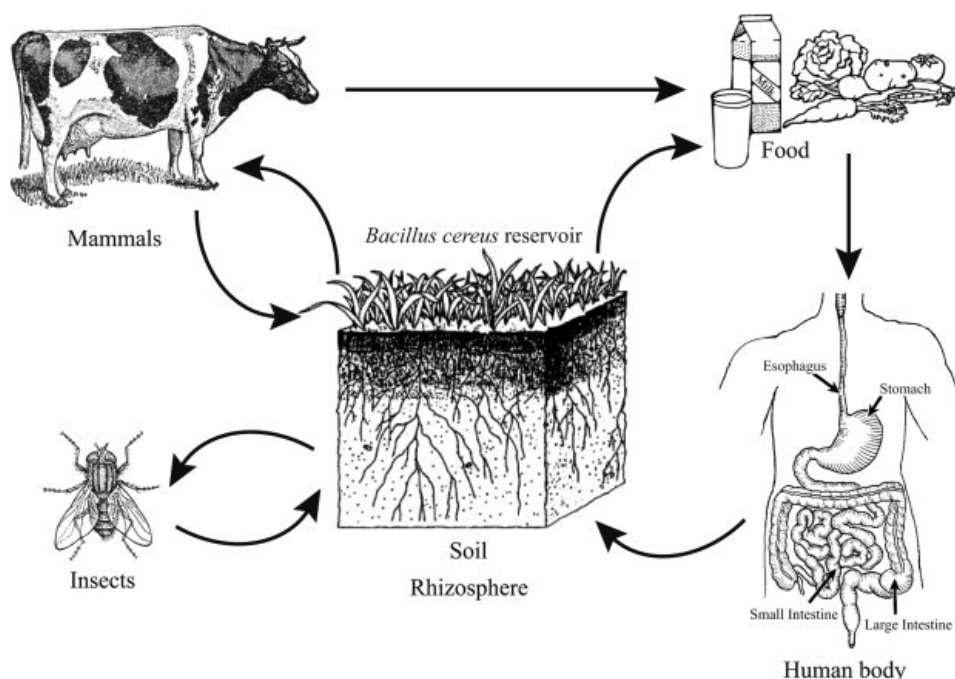
Bakteriální **kolagenázy** mají širokou substrátovou specifitu a degradují jak přírodní kolagen, tak želatinu (Lund a kol., 2013). Kolagenázy štěpí kolagen na malé peptidy, o nichž se předpokládá, že přitahují neutrofilny chemotaxí. Produkce extracelulární kolagenázy *Bacillus cereus* byla snížena v důsledku inhibice růstu bakteriálních buněk peroxidázou přítomnou ve slinách (Kotiranta a kol., 2000).

## 1.5 Výskyt *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* je všudypřítomná bakterie, jejíž přirozeným rezervoárem je především půda. Jelikož se jedná o kultivačně nenáročnou bakterii, nalézáme ji v půdách s nízkým obsahem živin. Zde také za nepříznivých podmínek přežívá ve formě vysoce odolných endospor (Kotiranta a kol., 2000). Po kontaktu s organickými látkami začínají endospory klíčit a přeměňují se zpět ve vegetativní buňku. Přirozeně je nalézáme i v GIT bezobratlých živočichů (Bottone, 2010). Ve střevním traktu některých členovců byl pozorován vláknitý růst *Bacillus cereus*. Během tohoto růstu ztrácí buňka bičíky, pomocí vláken adhezuje na epiteliální povrch střevních buněk a zde sporuluje (Margulis a kol., 1998). Endospory a vegetativní buňky *Bacillus cereus* se dostávají do půdy během defekace nebo smrti hostitele. Zde vegetativní buňky sporulují a vyčkávají, dokud nedojde k jejich absorpci jiným hostitelem (Bottone, 2010).

*Bacillus cereus* se ze svého přirozeného rezervoáru snadno šíří do různých druhů potravin a potravinářských výrobků jako jsou maso, zelenina, škrobové potraviny a mléčné výrobky (Uletee a kol., 1999). Touto cestou se tento potravinový, oportunní patogen dostává do GIT člověka, kde kolonizuje a vyvolává alimentární onemocnění. Jelikož má taková nákaza krátký a mírný průběh, většina pacientů nevyhledává odbornou lékařskou pomoc

a hlášení o výskytu těchto chorob nejsou řádně zdokumentovány. To je taky příčina nedostatečného provádění laboratorních testů, které by potvrdily, že za vznikem těchto onemocnění stojí právě *Bacillus cereus*. Proto je výskyt toho patogenu u lidí velmi podceňován (Enosi Tuipulotu a kol., 2020).



**Obrázek 4** – Možné cesty přenosu *Bacillus cereus* (Abee a kol., 2011)

## 1.6 Patogeneze a léčba alimentárních onemocnění způsobených *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* je znám především jako původce dvou různých forem alimentárních onemocnění (Ehling-Schulz a kol., 2015). Emetický syndrom je vyvolán emetickým toxinem, který se tvoří již v potravě (Granum a Lund, 1997). Průjmový syndrom je způsoben enterotoxiny, které vznikají při vegetativním růstu buněk *Bacillus cereus* v tenkém střevě (Granum a Lund, 1997). Rozdíly v hlášené incidenci *Bacillus cereus* se liší na základě stravovacích návyků v daných zemích. Například v Japonsku je emetický syndrom hlášen

až  $10\times$  častěji než v Evropě a Severní Americe, kde se naopak častěji setkáváme s průjmovým syndromem. Ve Velké Británii bylo v letech 1992 až 2003 hlášeno 43 ohnisek alimentárních intoxikací. U více než poloviny byla zdrojem nákazy smažená rýže a pokrmy z ní připravené. V Norsku je *Bacillus cereus* údajně hlavní příčinou otravy z potravin. Mezi lety 1991 až 2000 byla tato bakterie údajně původcem 113 z celkových 171 ohnisek nákazy přenášených potravinami na Tchaj-wanu (Blackburn a McClure, 2009). V České republice bylo k datu 22. 07. 2019 hlášeno 35 případů alimentárních intoxikací způsobených *Bacillus cereus* (NZIP, 2021). Ke vzniku alimentárních onemocnění ohrožujících zdraví člověka dochází až v momentu, kdy jsou buňky *Bacillus cereus* dostatečně pomnožené. Počet buněk *Bacillus cereus* potřebných pro vznik průjmového syndromu je  $10^5$  až  $10^7$ . K vyvolání emetického syndromu je zapotřebí, aby byla potrava kontaminována buňkami *Bacillus cereus* v počtu  $10^5$  až  $10^8$  na 1g potravy (Blackburn a McClure, 2009).

Kromě alimentárních intoxikací může tato bakterie vyvolat i mimostřevní infekce, a to jak u rizikových skupin, tak i zdravých jedinců (Onofrillo, 2016). Do rizikových skupin řadíme novorozence, narkomany, pacienty po chirurgickém zákroku a pacienty se zavedenými katétry, na kterých může bakterie kolonizovat (Bottone, 2010). Mezi tyto infekce patří bakteriémie, pneumonie, infekce CNS, infekce měkkých tkání a oční infekce (Acosta a kol., 2020).

Emetický a průjmový syndrom mají krátký a mnohdy nekomplikovaný průběh. Z tohoto důvodu lékař zvolí symptomatickou léčbu (Arslan a kol., 2014). Oproti tomu mimostřevní onemocnění způsobená touto bakterií mají rychlý a progresivní průběh. Celá léčba je navíc zkomplikovaná tím, že je většina kmenů rezistentní vůči  $\beta$ -laktamovým antibiotikům (Yu a kol., 2020). Nejvíce kmenů bylo rezistentních na penicilin a ampicilin (Kim a kol., 2011). Naopak u všech kmenů *Bacillus cereus* byla prokázána citlivost na vankomycin, gentamicin, tetracyklin, ciprofloxacin, azithromycin a klindamycin (Glasset a kol., 2018).



## 2 TOXINY *BACILLUS CEREUS*

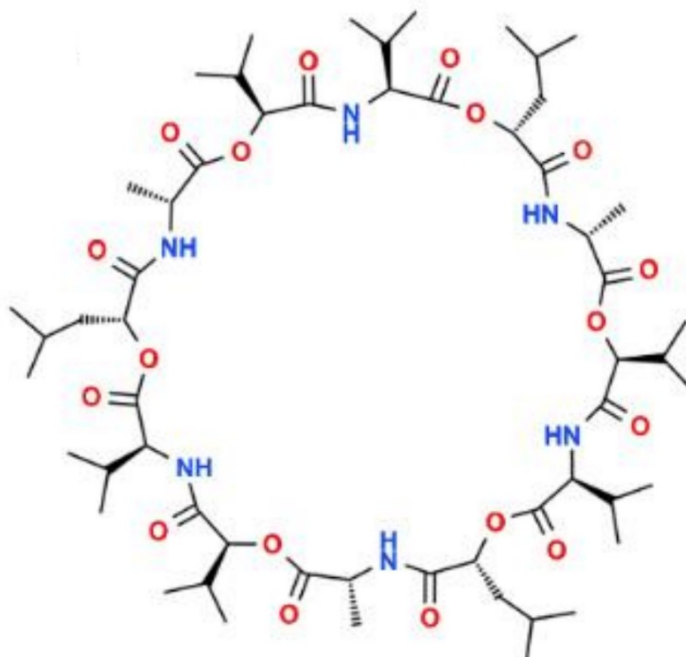
### 2.1 Emetický toxin

Emetický toxin, nazývaný také jako cereulid, je cyklický peptid o molekulové hmotnosti 1,2 kDa. Skládá ze šesti  $\alpha$ -aminokyselin a šesti  $\alpha$ -hydroxykyselin uspořádaných do tří opakujících se peptidových jednotek. Tyto peptidové jednotky se uzavírají do kruhu, jak můžeme vidět na Obrázku 5. Toxin vytváří vysoce afinitní komplex s alkalickými kovy (Marxen a kol., 2015), čímž podporuje růst *Bacillus cereus* v prostředí s vysokým deficitem draselných iontů. Draslík je hlavním intracelulárním kationtem v bakteriální cytoplazmě. Je velice důležitým pro život bakterie, neboť zajišťuje příjem a transport solutů, které se podílejí na regulaci pH a osmotického tlaku působícího na povrchové struktury buňky (Ekman a kol., 2012).

Toxin je odolný vůči různým proteolytickým enzymům a vysokým teplotám. Tepelná stabilita tohoto toxinu se ukázala být závislá na pH prostředí a koncentraci toxinu (Kim a kol., 2011). Rajkovič a kol. (2008) provedli studii, která ukázala, že k inaktivaci toxicity cereulidu je zapotřebí, aby byl toxin vytaven hodnotě pH vyšší než 9 a teplotě 121 °C po dobu 80 minut nebo 150 °C po dobu 60 minut. Průmyslově zpracované potraviny jsou ošetřovány za mnohem mírnějších podmínek. Z tohoto důvodu je emetický toxin velkou hrozbou pro potravinářský průmysl, kde nemusí vždy být vytvořeny dostatečné podmínky k tomu, aby docházelo k inaktivaci toxického účinku cereulidu, vyprodukovaného bakterií *Bacillus cereus* v potravě.

Syntéza cereulidu je zprostředkována cereulid-syntetázou. Cereulid-syntetáza je neribozomální peptidovou syntetázou, nacházející se na pXO1 jako plasmid sestavený ze sedmi kódujících DNA sekvencí (Dommel a kol., 2011). Gen *cesA* představuje adenylační doménu, která specificky rozpoznává a aktivuje určitý substrát. Gen *cesT* je peptidový nosný protein. Sekvence *cesC* slouží jako kondenzační doména, která zajišťuje růst peptidového řetězce. Dalšími strukturami tvořícími cereulid syntetázu jsou epimerizační nebo methylační domény a domnělá hydroláza (*cesH*). Expoziční a methylační domény přispívají ke strukturní rozmanitosti přírodních peptidových produktů. Funkce domnělé hydrolázy není zatím známá (Ehling-Schulz a kol., 2015). Cesta syntézy emetického toxinu a podmínky umožňující syntézu

tohoto toxinu jsou velmi komplikované a prozatím nebyly zcela a jasně popsány (Matthews a kol., 2017).



Obrázek 5 – Chemická struktura emetického toxinu (Ramarao a kol., 2020)

### 2.1.1 Emetický syndrom a další onemocnění způsobená emetickým toxinem

První zmínka o emetickém syndromu sahá na začátek 70. let minulého století, kdy bylo ve Velké Británii zaznamenáno několik ohnisek nákazy způsobených konzumací vařené rýže (Stenfors a kol., 2008). Emetický syndrom je zprostředkovaný serotoninovým 5-HT<sub>3</sub> receptorem a stimulací aferentního bloudivého nervu (Alonzo a kol., 2015). Vyšší riziko intoxikace emetickým toxinem se může vyskytovat u pacientů, kteří konzumovali kontaminované potraviny bohaté na škob, jako je rýže, těstoviny, brambory nebo pečivo (Webb a kol., 2019) a způsobuje u nich podráždění slizničních zakončení *nervus vagus* v žaludku (Votava a kol., 2003).

Pro dospělého člověk je toxická dávka cereulidu odhadována na 8 µg/kg tělesné hmotnosti (Webb a kol., 2019). Typickými příznaky intoxikace cereulidem je nevolnost a zvracení, které se dostaví v rozmezí 30 minut až 6 hodin po konzumaci kontaminované

potravy. Příznaky však většinou samovolně odezní do 24 hodin (Stenfors a kol., 2008).

Cereulid se může akumulovat v různých orgánech (Ducrest a kol., 2019). Zde působí jako ionofor draselný a poškozuje buněčný membránový potenciál, což má za následek expanzi mitochondrií v buňce a tvorbu vakuol v protoplazmě citlivých buněk a jejich následnou apoptózu (Naka a kol., 2020). Tyto pochody mají za následek například hepatotoxicitu, encefalopatii a dysfunkci  $\beta$ -buněk (Ducrest a kol., 2019).

## 2.2 Enterotoxiny

Enterotoxin je vegetativní růstový metabolit produkovaný do určité míry téměř všemi druhy skupiny *Bacillus cereus*. Enterotoxiny jsou obvykle produkovány v průběhu exponenciální růstové fáze a celé stacionární růstové fáze bakterie (Ceuppens a kol., 2013). Produkce enterotoxinů probíhá v tenkém střevě (Kim a kol., 2011). Zde enterotoxiny vytváří póry na buněčné membráně buněk střevního epitelu, čímž dochází ke ztrátě vody, sodných a chloridových iontů a ke vzniku iontové nerovnováhy (Reis a kol., 2013). Charakteristickými znaky průjmového syndromu jsou bolest břicha, hojné vodnaté průjmy a rektální tenesmus. Příznaky se objevují 8 až 16 hodin po konzumaci kontaminované potravy (Ehling-Schulz a kol., 2004).

Nejdůležitějšími enterotoxiny způsobující průjmová onemocnění jsou hemolyzin BL, nehemolytický enterotoxin a cytotoxin K (Stenfors a kol., 2008). Dalšími známými enterotoxiny, produkovanými *Bacillus cereus*, jsou enterotoxin T (Amor a kol., 2019) nebo enterotoxin FM, který se na vzniku průjmových onemocnění přímo nepodílí, ale podporuje cytotoxické účinky výše zmíněných enterotoxinů (Zhang a kol., 2016).

Exprese hlavních enterotoxinů hemolyzinu BL, nehemolytického enterotoxinu a cytotoxinu K je řízena pleiotropickým regulátorem PlcR (Jessberger a kol., 2014). Jeho funkcí je transkripce genů potřebných k adhezenci bakterie na hostitelské buňky a ochrana bakterie před obrannými systémy hostitele. Dalšími funkcemi jsou výživa bakterie a její ochrana před konkurenčními bakteriemi, které mohou také na hostitelské buňce kolonizovat (Ramarao a kol., 2015). Na začátku stacionární růstové fáze *Bacillus cereus* je aktivita PlcR závislá na přítomnosti PapR, sloužícího ke snímání kvora. Bakterie používají *quorum sensing* ke koordinaci bakteriálních procesů v reakci na buněčnou denzitu. Tyto komunikační systémy jsou založeny na sekreci a rozpoznávání signálních molekul mezi buňkami

(Doyel a Buchanan, 2013). PapR je malý signalizační peptid, který je nejprve buňkami vylučován, zpracován na heptapeptid, a poté opět importován zpět do buňky, kde interaguje s PlcR a usnadňuje tím vazbu na palindromatickou sekvenci umístěnou před cílovými geny (Clair a kol., 2010).

### 2.2.1 Hemolyzin BL

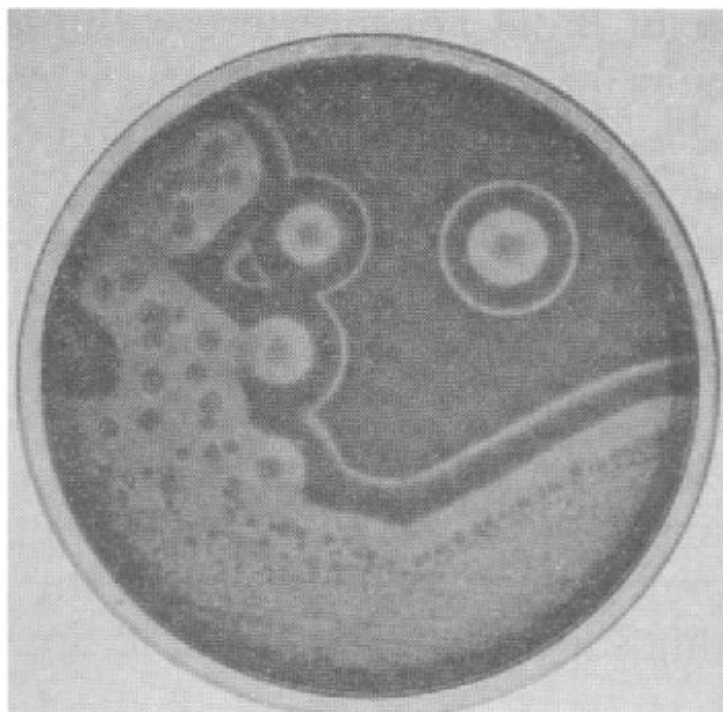
Hemolyzin BL je tříložkový enterotoxin, považovaný za primární faktor virulence u průjmového syndromu. Molekula tohoto toxinu se skládá z vazebné složky B a dvou lytických složek L1 a L2 (Wiwat a Thiramanas, 2014). Jednotlivé složky hemolyzinu BL jsou transkribovány následujícími geny – *hblA*, kódující složku B, *hblC*, kódující složku L1 a *hblD* (Arslan a kol., 2014). Tyto geny jsou pak uspořádány v operonu *hblCDA* (Jessberger a kol., 2019). Pro maximální hemolytickou a toxickou aktivitu toxinu je nutná přítomnost všech tří složek (Wiwat a Thiramanas, 2014), ideálně v poměru 1:1:1 (Kumari a Sarkar, 2016). Přebytek lytické složky L1 nebo vazebné složky B inhibuje hemolytickou aktivitu hemolyzinu BL (Jessberger a kol., 2019). Exprese genů je ovlivněna regulačními proteiny, kterými jsou hlavní regulátor virulence PlcR, dále pak CcpA, ResD a Fnr (Sofos, 2013).

Fnr a ResD jsou regulátory redox potenciálu ve střevech. Při nízkých hodnotách potenciálu (mezi -100 mV a -200 mV) dochází k výraznému zvýšení produkce hemolyzinu BL (Sofos, 2013). Regulátor Fnr detekuje změnu koncentrace kyslíku při aerobióze prostřednictvím oxidace thiolových skupin cysteinu, které spojují dva monomery v neaktivním dimeru. Aktivní dimery Fnr se naváží na promotorovou oblast cílových operonů nebo genů enterotoxinů, čímž aktivují nebo potlačují jejich transkripci (Duport a kol., 2016). Přítomnost dvousložkového regulátoru ResDE je nezbytná pro růst *Bacillus cereus* za podmínek nízkého redoxního potenciálu. Zároveň se za těchto podmínek podílí na produkci enterotoxinů *Bacillus cereus*, avšak na rozdíl od regulátoru Fnr není pro toxinogenezi nezbytný (Esbelin a kol., 2009). Produkce hemolyzinu BL je snížena při vysokých koncentracích glukózy, které jsou regulovány regulátorem CcpA (Sofos, 2013).

Jednotlivé kmeny *Bacillus cereus* produkují složky hemolyzinu BL o různé molekulové hmotnosti. U některých kmenů se dokonce vyskytovala více než jedna varianta každé složky

hemolyzinu. U kmene *Bacillus cereus* ATCC 14579 byla v roce 2010 prokázána transkripce operonu *hblCDAB*, který oproti výše zmíněnému operonu obsahuje navíc gen *hblB*. Tento gen byl do této doby považován pouze za pseudogen (Jessberger a kol., 2019). Studie prováděná Böhm a kol. (2015) dokonce ukázala, že operon *hblCDAB* je u *B. cereus* zastoupen ve značné míře, jelikož se vyskytoval u 64 % testovaných kmenů, zatímco zkrácená varianta *hblCDA* se vyskytovala pouze u 22 % sledovaných kmenů.

Hemolyzin BL má na buňky hemolytický, cytotoxický, dermonekrotický účinek a způsobuje vaskulární permeabilitu (Salveti a kol., 2011). Několik studií ukázalo, že tento enterotoxin způsobuje akumulaci tekutin v ileálních smyčkách u králíků, anebo cytotoxicky působí na buňky vaječnicků u čínského křečka. Také může vytvářet komplex vázající se na povrch erytrocytů a způsobující jejich lýzu (Jessberger a kol., 2019). Při diagnostice hemolyzinu BL je charakteristickým znakem tvorba diskontinuální zóny hemolýzy na krevním agaru, kterou můžeme vidět na Obrázku 6. Zóna hemolýzy je vzdálená od místa, kde docházelo k difúzi hemolyzinu BL. Tento jev byl odůvodněn rozdílnou difúzní rychlostí jednotlivých složek hemolyzinu BL a tvorbou kontinuálního koncentračního gradientu (Jessberger a kol., 2019).



**Obrázek 6** – Diskontinuální zóna hemolýzy kmene *B. cereus* F837/76 na krevním agaru s obsahem beraní krve (Beecher a Wong, 1994)

### 2.2.2 Nehemolytický toxin (Nhe)

První zmínka o nehemolytickém toxinu pochází z roku 1996 (Ramm a kol., 2020), kdy byl tento toxin izolován z kmene zodpovědného za propuknutí ohniska alimentární otravy v Norsku (Senesi a Ghelardi, 2010). Tehdy nebyly u tohoto toxinu prokázány žádné hemolytické vlastnosti, a proto byl pojmenován jako nehemolytický toxin (Ramm a kol., 2020). Avšak toto tvrzení bylo v pozdějších studiích vyvráceno (Senesi a Ghelardi, 2010).

Nehemolytický toxin je tvořený třemi složkami. Lytickou složkou NheA a dvěma vazebnými složkami NheB a NheC (Kumari a Sarkar, 2016). Jednotlivé složky nehemolytického toxinu jsou kódovány geny *nheA*, *nheB* a *nheC*, které jsou uspořádány v *nhe* operon (Senesi a Ghelardi, 2010). Toxin působí na epitelové buňky ve třech klíčových krocích. Prvním krokem je správná sekrece všech tří komponent NheA, NheB a NheC v určitém poměru. Tím je zaručená maximální cytotoxická aktivita nehemolytického toxinu. Po sekreci následuje krok dva, ve kterém dochází k navázání NheC na NheB, který má vysokou afinitu ke tvorbě NheBC oligomerů o různé velikosti. Ty následně vytvoří jakési „pro-póly“ na buněčných membránách (Liu a kol., 2017). Tvorba rozpustného komplexu mezi NheB a NheC je specifickou vlastností nehemolytického toxinu. Interakce těchto dvou složek ve vodném prostředí je nezbytná k vyvolání toxického účinku, ale samostatně nejsou pro buňku toxické (Zhu a kol., 2016). V posledním kroku dojde k navázání třetí složky (NheA) na ukotvené NheBC oligomery, čímž dochází ke zprostředkování tvorby pórů na buněčné membráně (Liu a kol., 2017).

Uvádí se, že až 90 % izolátů *Bacillus cereus* nese gen *nhe*, zatímco gen *hbl* nese pouhých 50 % izolátů (Didier a kol., 2016). Z tohoto důvodu je nehemolytický toxin teoreticky považován za klíčový enterotoxin, způsobující průjemová onemocnění. Avšak v praxi toto pravidlo platit nemusí a ve výsledku může hrát klíčovou roli ve vzniku a rozvoji onemocnění kombinace obou enterotoxinů (Dréan a kol., 2015). V jednom z výzkumných článků bylo pojednáváno o společném účinku sfingomyelinázy a nehemolytického toxinu, který údajně zvyšuje cytotoxický účinek sfingomyelinázy. Sfingomyelináza prostřednictvím vzniklých pórů lépe adsorbuje na povrch epitelálních buněk buněčné membrány cílové buňky a štěpením sfingomyelinu, přítomného v buněčné membráně, obměňuje její strukturu a tekutost (Doll a kol., 2013).

### 2.2.3 Cytotoxin K (CytK)

Cytotoxin K je jednosložkový enterotoxin, který patří do rodiny toxinů vytvářejících tazkvaný  $\beta$ -barel, složený z  $\beta$ -listů. Jedná se o strukturu, která tvoří hydrofobní část transmembránových proteinů (Visiello a kol., 2016). Má značný toxický účinek na lidské intestinální epiteliální buňky. Toxin vytváří póry v lipidových dvojvrstvách buněčné membrány, následkem čehož dochází k nekróze a hemolýze buňky. Byly identifikovány dva typy genů kódujících cytotoxin K – *cytK1* a *cytK2* (Castiaux a kol., 2015).

První zmínka o cytotoxinu K, konkrétně cytotoxinu K1 (Chaabouni a kol., 2015), byla zaznamenána v roce 1998. Tehdy byl tento toxin izolován z kmene *Bacillus cereus* NVH 391/98. Tento kmen byl zodpovědný za epidemické propuknutí průjmového onemocnění v pečovatelském domě ve Francii. Zde se u několika osob objevily krvavé průjmy a na následky tohoto onemocnění dokonce tři lidé zemřeli (Stenfors a kol., 2008). Na základě charakterizace kmene metodou MLST, DNA-DNA hybridizace, termotolerance a charakteristického profilu mastých kyselin, byl kmen *Bacillus cereus* NVH 391/98 v roce 2013 přiřazen k nově zvyklému druhu *Bacillus cytotoxicus* (Böhm a kol., 2015).

Aminokyselinová sekvence mezi oběma typy cytotoxinu K vykazuje 89% identitu (Chaabouni a kol., 2015). Kromě sekvenčních rozdílů mají cytotoxiny také rozdílné biologické účinky. Cytotoxin K2 tvoří póry s nižší vodivostí a je také méně toxický než cytotoxin K1 (Castiaux a kol., 2015). Cytotoxin K1 je údajně až pětkrát toxičtější (Glasset a kol., 2021) vůči lidským intestinálním buňkám než cytotoxin K2. Avšak donedávna bylo identifikováno pouze 5 kmenů *Bacillus cereus* produkujících vysoce toxický cytotoxin K1 (Castiaux a kol., 2015). Proto je tento cytotoxin považován za vzácný a s alimentárními intoxinacemi je spojována spíše méně toxická varianta cytotoxinu K2 (Glasset a kol., 2021).

### 2.2.4 Enterotoxin FM a enterotoxin T

**Enterotoxin FM** je kódovaný genem *entFM* (Kovac a kol., 2016). Stejně tak může být označován jako gen kodující domnělou peptidázu buněčné stěny proteinů NlpC/P60. U kmene *B. cereus* ATCC 14579 byla provedena analýza BLAST genu *entFM*. Sekundární struktura genu odhalila přítomnost čtyř domén – tří protein-protein interakčních SH3 domén a domény NlpC/P60. Tato doménová sktruktura je velmi podobná té u *Bacillus subtilis* CwIE.

U této bakterie je buněčná peptidáza zodpovědná za normální morfologii tyčinkovité bakterie. Proteiny NlpC/P60 modifikují buněčnou stěnu (Tran a kol., 2010). Na základě strukturální podobnosti enterotoxinu FM s domnělou peptidázou buněčné stěny lze usuzovat, že tento enterotoxin ovlivňuje tvar buňky, její pohyblivost, adhezi bakterie k epitelovým buňkám a tím i schopnost tvorby biofilmu (Kovac a kol., 2016).

**Enterotoxin T** je kódovaný genem *bceT*. Není však známo, jakým způsobem přispívá tento enterotoxin ke vzniku alimentárních onemocnění. Nedávné studie dokonce naznačují, že enterotoxin T nevykazuje biologickou aktivitu, a tudíž nemůže přispívat k propuknutí onemocnění. Lze se tedy domnívat, že se jedná o pouhý klonovací artefakt (Amor a kol., 2019).



### 3 METODY DETEKCE TOXINŮ *BACILLUS CEREUS*

Správná laboratorní diagnostika emetického toxinu a enterotoxinů *Bacillus cereus* je důležitým faktorem pro zemědělský a potravinářský průmysl a pro zvýšení bezpečnosti zpracovávaných potravin. Od počátku 20. století je tato bakterie potvrzeným původcem alimentárního onemocnění. Dle výsledků některých studií se jedná o druhou nejčastější bakteriální příčinu alimentárních intoxikací v Evropě, hned po *Staphylococcus aureus*. I přesto je tato bakterie stále velmi podceňována, a to zejména kvůli nepravidelnému a často i nepovinnému prokazování v mnoha vzorcích. Z tohoto důvodu je velmi důležitý vývoj nových diagnostických metod pro rychlou a přesnou detekci a kvantifikaci toxinů *Bacillus cereus* (Ramarao a kol., 2020).

Emetické kmeny *Bacillus cereus* představují velké riziko pro stravovací zařízení. Zde totiž může docházet ke vzniku ohnisek alimentárních intoxikací. Málokdy dochází ke tvorbě emetického toxinu přímo v zažívacím traktu člověka. Intoxikace je převážně způsobena požitím potravy, ve kterém byl emetický toxin předem vytvořen. Aby bylo možné eliminovat rizika kontaminace potravin v těchto zařízeních, je také zapotřebí včasná detekce životaschopných bakterií v potravinách. K tomu jsou zapotřebí rychlé a citlivé screeningové metody, které nebyly pro identifikaci emetických kmenů *B. cereus* doposud popsány (Ulrich a kol., 2019). Zlatým standardem pro detekci a kvantifikaci cereulidu je kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (Kalbhenn a kol., 2021). Detekce emetického toxinu může být provedena i za pomoci molekulárně-biologických metod (Ducrest a kol., 2019). Tyto metody však neumožňují přímou analytickou detekci samotného toxinu (Marxen a kol., 2015). Citlivé testy založené na principu PCR v reálném čase a systému profilování toxinových genů sice umožňují identifikovat samotné toxinogenní bakterie, ale zase nejsou schopny detekovat emetický toxin jako takový. *In vitro* testy (např. cytotoxický test využívajících buňky lidského karcinomu hrtanu, popř. jaterní buňky potkanů či test motility kančích spermií) jsou založeny na toxickém účinku cereulidu na mitochondrie eukaryotních buněk, čímž neumožňují přímé stanovení toxinu. Nevýhodou provedení těchto testů v praxi může být ovlivnění cytotoxických účinků jinými složkami potravin. Biologické testy jsou navíc časově náročné a finančně nákladné (Bauer a kol., 2010). Testy pro kvalitativní a kvantitativní stanovení enterotoxinů jsou založeny zejména na využití monoklonálních protilátek namířených proti jednotlivým složkám toxinů.

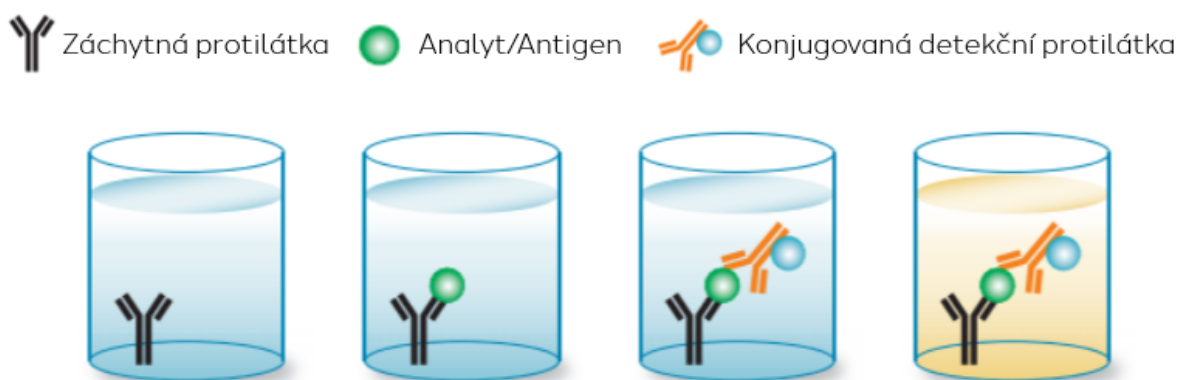
Aktuálně jsou na trhu dostupné 3 soupravy detekující hemolyzin BL a nehemolytický toxin. Momentálně však není dostupná žádná komerční souprava pro detekci cytotoxin K. Tento toxin je v běžných laboratořích detekován pomocí fyzikálně-chemických nebo molekulárně-biologických metod (Dietrich a kol., 2021).

### **3.1 Imunochemické metody pro detekci toxinů *Bacillus cereus***

#### **3.1.1 Imunochemické metody s indikátory**

Principem imunochemických metod je reakce antigenu s protilátkou, kdy je jedna z reagujících složek značena indikátorem. Historicky nejstarší je radioimunoanalýza (RIA), která se vyznačuje vysokou citlivostí a přesností. RIA metoda využívá protilátky značené radioizotopem. Jejich používání vyžaduje speciální vybavení a prostory, a proto se řadí mezi jedny z nejdražších (Bartůňková a kol., 2011). Jelikož je tato metoda potencionálně riziková pro personál a finančně nákladná (Gan a Patel, 2013), je nyní nahrazována cenově dostupnějšími metodami, jejichž citlivost a reprodukce je s RIA metodou srovnatelná. V posledních letech jsou v praxi nejvyužívanější imunoenzymové metody, u které je původní radioizotop nahrazen enzymem. EIA metody dělíme na homogenní a heterogenní. K detekci toxinů *Bacillus cereus* je využívána heterogenní EIA metoda, tzv. ELISA (Bartůňková a kol., 2011).

**ELISA**, z anglického názvu *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, je jednou z nejpoužívanějších metod ke stanovení a detekci antigenů nebo protilátek (Zhu a kol., 2016). K detekci toxinů *Bacillus cereus* je aktuálně k dispozici komerčně vyráběná souprava Tecra BDE-VIA, využívající princip sendvičové ELISA metody (Rajkovic a kol., 2020). Během této metody je protilátka navázána na povrchu pevného nosiče. Po přidání analyzovaného vzorku dochází ke vzájemné interakci mezi imobilizovanou protilátkou a buňkami mikroorganismu přítomných ve vzorku. Po odstranění nenavázaných složek se ve druhém kroku přidá druhá protilátka (konjugát), která je značená enzymem. V dalším kroku je do reakce přidán bezbarvý substrát. Ten je v konečné fázi přeměněn enzymatickou reakcí na barevný produkt, jehož intenzita zbarvení odráží kvantitu sledovaného analytu (Demnerová, 2011).



**Obrázek 7** – Schéma principu sendvičové ELISA metody ([www.baria.cz](http://www.baria.cz))

**Tecra BDE-VIA** využívá polyklonální protilátky (Krause a kol., 2010). Použití těchto protilátek může být do jisté míry problém. Polyklonální protilátky mohou totiž vykazovat zkříženou nespecifickou reakci s dalšími dvěma netoxickými proteiny, z nichž jeden pravděpodobně představuje složku nehemolytického toxinu (Dietrich a kol., 1999). Na základě těchto faktů Dietrich a kol. (1999) vyrobili a charakterizovali několik hybridizovaných buněčných linií, produkujících vysoce afinitní, monoklonální protilátky proti všem třem složkám hemolyzinu BL. Protilátky jsou třídy IgG a umožňují specifickou a citlivou detekci těchto složek v kultivačních supernatantech a mohou být použity pro kvantitativní vyhodnocení toxinového profilu kmenů *Bacillus cereus*. Testování je možné provádět v mikrotitrační destičce (Obrázek 8) potažené sériově řaděnými supernatanty různých kmenů *B. cereus*. Do všech jamek je přidán fyziologický roztok obsahující kaseinát sodný. Tímto krokem dojde k obsazení všech volných vazebných míst, kam by se mohly nespecificky navázat jiné proteiny. To by vedlo ke snížení specifity a citlivosti testu. Po 30 minutách je destička třikrát promyta. Následně je přidáno 100  $\mu$ l sériově řaděných supernatantů myšího séra nebo hybridomové buněčné kultury. Za hodinu je destička opět promyta a po promytí je přidán konjugát. Ten je tvořen králičími protilátkami značenými křenovou peroxidázou. Po hodině je destička naposledy promyta a do každé jamky je přidáno 100  $\mu$ l substrátu. Celá reakce je po 20 minutách zastavena 1M kyselinou sírovou. Absorbance je změřena při 450 nm. Samotná doba testu jsou téměř 3 hodiny. Monoklonální protilátky, vyvinuté v této studii, vykazovaly vysokou specifitu a citlivost. Přibližně 50 % testovaných kmenů produkovalo hemolyzin BL. U všech těchto kmenů byla následně prokázána vysoká toxicita.

O několik let později Dietrich a kol. (2005) vyrobili a charakterizovali další monoklonální protilátky, tentokrát proti všem třem složkám nehemolytického toxinu, které mohou být použity v kombinaci s dříve vyrobenými monoklonálními protilátkami proti hemolyzinu BL pro kvantitativní vyhodnocení exprese enterotoxinu *Bacillus cereus*. Ve výše zmíněných studiích byly vyvinuty vysoce afinitní monoklonální protilátky, které umožňují specifickou a citlivou detekci enterotoxinů *B. cereus* a lze je použít ke kvantitativnímu vyhodnocení toxinového profilu kmenů této bakterie.



**Obrázek 8** – 96 jamková destička pro metodu ELISA  
([www.enzolifesciences.com](http://www.enzolifesciences.com))

### 3.1.2 Reverzní pasivní latexová aglutinace (RPLA)

Principem RPLA je aglutinační reakce antigenu s protilátkou, přičemž je jedna z reagujících složek navázána na latexové částice, tzv. latexové kuličky. Ty jsou silně hydrofobní, a proto jsou ideální pro adsorpci látek, jako jsou proteiny (Mahat a kol., 2014).

Pro detekci toxinů *Bacillus cereus* se používá souprava **Oxoid BCET-RPLA**. Test využívá latexové částice senzibilizované králičími imunoglobuliny mířenými proti enterotoxinům *Bacillus cereus*. V případě, že je ve vzorku přítomen enterotoxin, dochází k aglutinaci a ke tvorbě imunokomplexu, který má mřížkovou strukturu. Tento proces je vizualizován tvorbou aglutinátu na dně mikrotitrační destičky. Pokud enterotoxin *Bacillus cereus* chybí, nebo je-li přítomen v koncentraci pod detekčním limitem,

mřížková struktura se nevytvoří, nedojde k aglutinaci a roztok zůstane zakalený (www.oxoid.com).

### Porovnání soupravy BCET-RPLA s metodou ELISA

Vyleťlová a Banyko (2010) srovnávali výsledky detekce enterotoxinů hemolyzinu BL a nehemolytického toxinu *Bacillus cereus* s identifikací genů všech tří složek, tvořících výše zmíněné enterotoxiny. Hemolyzin BL byl detekován metodou BCET-RPLA. Přítomnost nehemolytického toxinu (ve vzorcích kravského a kozí mléka, pasterovaného mléka a v mléčných výrobcích) byla stanovena metodou ELISA a jednotlivé geny *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB* a *nheC* byly detekovány metodou PCR. Testováno bylo celkem 41 kmenů *Bacillus cereus* získaných ze vzorků mléka a mléčných výrobků. Přítomnost hemolyzinu BL ve vzorcích byla pozitivní u 32 kmenů, nehemolytický toxin byl přítomen u všech 41 kmenů. Gen *nheA* byl identifikován u 40 kmenů, *nheB* a *nheC* (41), *hblA* (29), *hblC* (39), *hblD* (37). Přítomnost všech tří genů *nheA*, *nheB* a *nheC* byla zjištěna u 40 kmenů (98 %). Zatímco geny *hblA*, *hblC* a *hblD* byly prokázány pouze u 29 kmenů (71 %). Srovnáme-li výsledky přítomnosti enterotoxinů získané pomocí BCET-RPLA a ELISA s výsledky PCR, zjistíme, že jsou shodné ve 30 případech u BCET-RPLA a ve 40 případech u ELISA. Z této studie vyplývá, že ve srovnání s BCET-RPLA je ELISA citlivější metoda. Oběma metodami lze v praxi detekovat přítomnost enterotoxinů, avšak k testování jejich toxické aktivity je zapotřebí využít citlivější metody *in vivo* a *in vitro*.

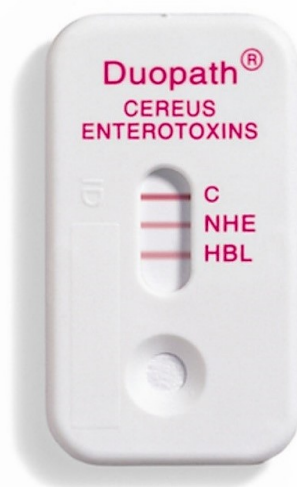
### **3.1.3 Imunodetekce v laterálním toku na membráně (LFIA)**

Imunodetekce v laterálním toku na membráně je druh imunotestu, který je založený na principu sendvičové ELISA metody. Během testu je vzorek unášen kapilárními silami podél analytické nitrocelulóзовé membrány. Pro detekci enterotoxinů slouží komerčně vyráběná souprava Duopath® *Cereus* Enterotoxins test, který můžeme vidět na Obrázku 9 (Rajkovic a kol., 2020).

V místě aplikace vzorku se nachází barevné činidlo tvořené antigenem (nebo protilátkou). Po aplikaci vzorku dochází k jeho smísení s barevným činidlem a komplex dále protéká membránou (Rajkovic a kol., 2020). Membrána je rozdělena na detekční zónu

s detekční linkou a kontrolní zónu s kontrolní linkou. Pokud je námi testovaný analyt přítomen ve vzorku, dojde k jeho zachycení v detekční zóně, což se projeví zbarvením linky. Přebytečná protilátka se zachytí v kontrolní zóně a kontrolní linka se také zbarví. Pokud ve vzorku nebyl přítomen testovaný analyt, dochází pouze ke zbarvení linky v kontrolní zóně, díky čemuž je ověřen správný průběh reakce (Göselová a kol., 2014). LFIA může sloužit jednak jako kvalitativní test s daným referenčním rozmezím nebo jako kvantitativní test v kombinaci s čtečkou fotometrických proužků (Rajkovic a kol., 2020).

**Duopath® Cereus Enterotoxins** test používá monoklonální protilátky značené zlatem (Rajkovic a kol., 2020). Výhodou těchto protilátek je, že brání vzniku falešně pozitivních výsledků v důsledku zkřížené reakce s netoxickými exoproteiny, které produkuje *Bacillus cereus* (Krause a kol., 2010). Velkou předností tohoto testu je možnost souběžně detekovat lytickou složku L2 hemolyzinu BL a NheB složku nehemolytického toxinu (Rajkovic a kol., 2020). Další výhodou tohoto LFIA testu je také jeho rychlost. Výsledky stanovení můžeme získat již do 30 minut a k jejich vyhodnocení není zapotřebí další instrumentace. Souprava je navíc cenově dostupná a vyznačuje se vysokou citlivostí (Krause a kol., 2010). Tento test lze v klinické praxi využít pro spolehlivé stanovení enterotoxinů (kromě cytotoxinu K) ve vzorcích potravin a vzorcích životního prostředí. Své uplatnění by mohl najít také jako účinný nástroj pro kontrolu kvality zpracovaných potravin. V tento moment však není na trhu dostupný komerčně vyráběný LFIA test pro detekci cytotoxinu K, produkovaného *Bacillus cereus* (Rajkovic a kol., 2020).



**Obrázek 9** – Duopath® Cereus Enterotoxins test – pozitivní výsledek ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com))

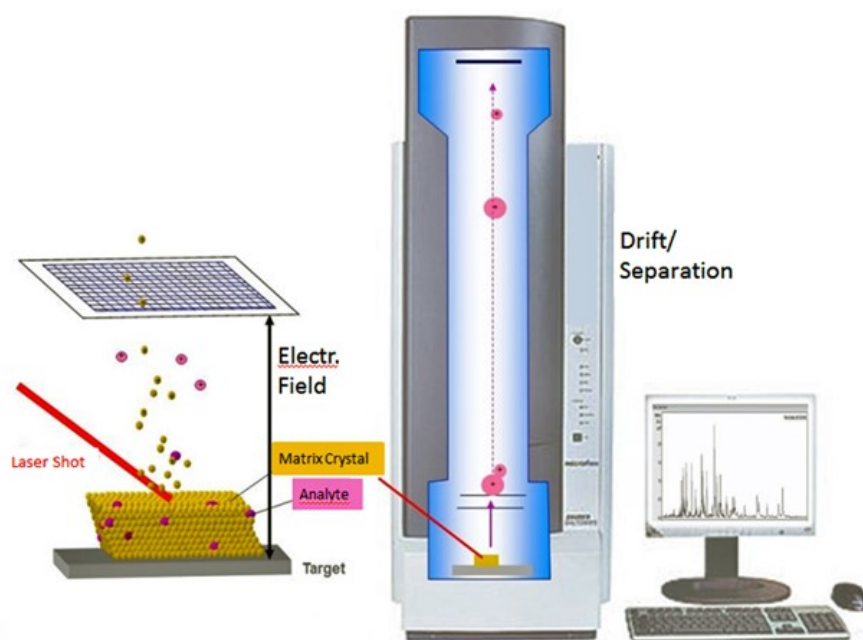
## 3.2 Fyzikálně-chemické metody pro detekci toxinů *Bacillus cereus*

### 3.2.1 MALDI-TOF MS

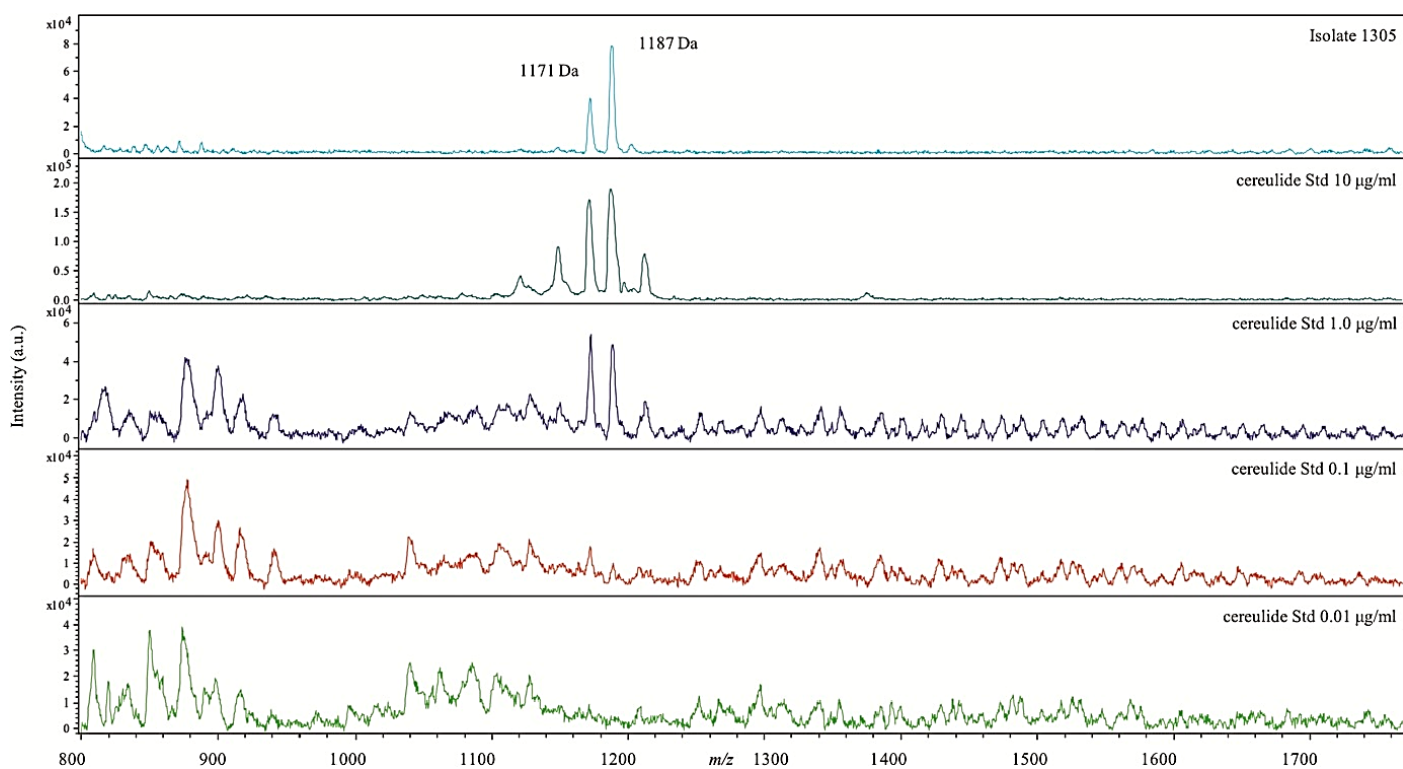
Princip metody spočívá v generování fingerprintů často se vyskytujících proteinů a následném srovnání s databázemi referenčních spekter (Pavlovic a kol., 2013). V posledních letech je tato metoda často využívána pro rutinní identifikaci mikroorganismů. Je velmi rychlá a vhodná do provozu v běžných klinických laboratořích. Výhodou také je, že k používání této metody nemusí být v laboratoři přítomen speciálně vyškolený personál s hlubokými znalostmi techniky jako takové. Výsledky jsou totiž automaticky generovány pomocí vysoce sofistikovaného statistického softwaru (Ulrich a kol., 2019).

Přístroj pro měření je sestaven ze tří částí – iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru, jak je vidět na Obrázku 10 (Pavlovic a kol., 2013). Proteiny ve vzorku jsou ionizovány na nabitě molekuly přidáním nebo ztrátou jednoho či více protonů a následně je změřen poměr hmotnosti k náboji. Analyzovaný vzorek je smíchán s roztokem absorbujícím energii. Matrice s navázaným vzorkem po vysušení krystalizuje. Krystaly vzorku jsou pak ionizovány laserovým paprskem za vzniku protonových iontů, které následně vstupují do letové trubice, kde zrychlují na stálý potenciál a jsou od sebe děleny na základě poměru hmotnosti ku náboji. Tento poměr získáme stanovením času potřebného pro to, aby každý iont prošel délkou letové trubice (Vrioni a kol., 2018). Výsledné spektrum (Obrázek 11) je pak porovnáváno s referenčními spektry v databázi (Pavlovic a kol., 2013).

Ulrich a kol. (2019) vytvořili rychlou a spolehlivou metodu pro odlišení emetických a neemetických kmenů *Bacillus cereus*, využívající metodu MALDI-TOF MS. Studované izoláty byly nejprve kultivovány 48 hodin při 37 °C na krevním agaru s 5 % ovčí krve. Po kultivaci byla menší část jedné kolonie přenesena na ocelový terčík, převrstveno 1 µl matrice (kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová) a vysušeno na vzduchu při laboratorní teplotě. Tento postup byl proveden ještě jedenkrát. Takto připravený vzorek byl změřen pomocí přístroje Autoflex Speed MALDI-TOF/TOF MS. Vyvinutá metoda se vyznačovala vysokou spolehlivostí. Ze 121 testovaných kmenů bylo 120 identifikováno správně. Jediný kmen, který reagoval falešně negativně, je dobře znám pro svou nízkou produktivitu toxinu (Ulrich a kol., 2019).



Obrázek 10 – Schéma MALDI-TOF MS ([www.cvuas.de](http://www.cvuas.de))



Obrázek 11 – Hmotnostní spektra standardu syntetického cereulidu v různých koncentracích a emetického kmene *B. cereus* měřených pomocí MALDI-TOF MS (Ulrich a kol., 2019)



### 3.2.2 Chromatografické metody

Dříve byly k průkazu emetického toxinu k dispozici pouze biologické testy založené na zkoumání cytotoxické aktivity toxinu pomocí buněčných kultur nebo na testování pohyblivosti spermií vystavených účinku emetického toxinu. Nevýhodou těchto testů je, že nejsou vždy snadno proveditelné (Delbrassinne a kol., 2012).

Velký zvrat nastal v roce 2002, kdy Häggblom a kol. (2002) vyvinuli kvantitativní a citlivý chemický test na přítomnost emetického toxinu ve vzorku, založený na vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) s hmotnostní spektrometrií (Häggblom a kol., 2002). Tento test umožňuje přesnou detekci cereulidu, který se může vyskytovat ve vzorku potravin ve velmi nízkých koncentracích. Aby bylo možné kvantifikovat množství emetického toxinu ve vzorku, je zapotřebí použít standardní roztok o známé koncentraci toxinu (Biesta-Peters a kol., 2010). Jelikož v té době nebyl cereulid komerčně dostupný, byl pomocí valinomycinu vytvořen kalibrační standard pro rutinní použití. Reakce valinomycinu a cereulidu během analýzy pomocí HPLC-MS byly velmi podobné (Häggblom a kol., 2002). Nicméně spolehlivost tohoto antibiotika, jakožto vnitřního standardu, je diskutabilní. Valinomycin a cereulid mají odlišnou chemickou strukturu, a proto mohou vykazovat různé chování během biologických a chemických testů (Ramaraao a kol., 2020).

Na základě tohoto poznatku vytvořili Bauer a kol. (2010) rychlý biosyntetický postup pro výrobu stabilního interního standardu cereulidu značeného izotopem  $^{13}\text{C}$ . Ten byl použit ke kvantifikaci emetického toxinu v matricích potravin prostřednictvím SIDA (stabilní analýza ředění izotopů) s následnou detekcí HPLC-MS/MS. Ačkoli tato metoda umožňuje přesnou kvantifikaci emetického toxinů ve vzorcích potravin, a  $^{13}\text{C}_6$ -cereulid je považována za dokonalý vnitřní standard, má i své nevýhody. Těmi jsou například finanční nákladnost metody nebo závislost na sofistikovaném vybavení. Pro provedení analýzy a následnou interpretaci výsledků je totiž zapotřebí speciálně vyškolený personál (Ramaraao a kol., 2020).

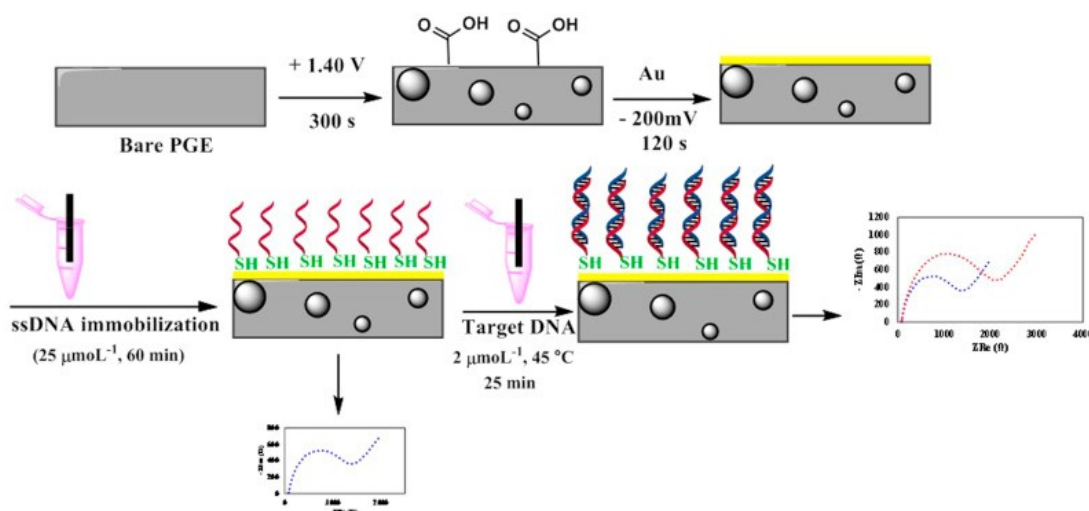
Ještě téhož roku proto provedli Biesta-Peters a kol. (2010) studii, ve které popisují nový způsob syntézy biologicky aktivního cereulidu. Cesta syntézy se sestávala z 10 kroků, které vedly k vysokému výtěžku čistšího syntetického cereulidu. Ten byl v průběhu studie použit jako standard při kvantifikaci obsahu emetického toxinu ve vzorku potravin. Výsledky experimentu ukázaly, že metoda LC-MS s cereulidem jakožto s vnitřním standardem je spolehlivá a přesná metoda pro kvantifikaci cereulidu v potravinách i při nízkých

koncentracích (5  $\mu\text{g}$  cereulidu / kg vzorku). Tuto metodu lze aplikovat při výkmunech či rutinní analýze potravinářských vzorků.

Vytvoření komerčně dostupného cereulidu je velkým mezníkem ve vývoji nových metod pro analýzu emetického toxinu jak pro experimentální účely, tak pro rutinní laboratorní diagnostiku. Použití syntetizovaného cereulidu umožňuje přímé stanovení koncentrace emetického toxinu ve vzorcích potravin namísto vyjádření koncentrace toxinu pomocí ekvivalentů valomycinu. Výsledky analýzy navíc nemusejí být extrapolovány kvůli použití neidentických standardů (Biesta-Peters a kol., 2010).

### 3.2.3 Biosenzory

Biosenzor je analytické zařízení schopné převádět biologické, chemické nebo biochemické signály na měřitelné elektrické signály. Využíván je k tomu biologický detekční materiál, který je navíc kombinován s převodníkem. Funkce biosenzoru je závislá na interakci mezi biologicky aktivními látkami, převodníkem a jednotkou převodu signálu. Díky řadě výhod jsou biosenzory považovány za jedny z neúčinnějších a nejpřesnějších metod v oblasti analýzy potravin a sledování bezpečnosti potravin (Ali a kol., 2020). Konkrétně jde o tyto výhody – analýza v reálném čase, rychlost provedení testu, dále specifita a detekce dalších nespécifických molekul ve vzorku a v neposlední řadě i jednoduchost analýzy (Zhang a kol., 2019).



**Obrázek 12** – Schéma konstrukce DNA biosenzoru pro detekci buněk a toxinů *B. cereus* (Izadi a kol., 2016)

Biosenzor se skládá ze dvou hlavních částí – bioreceptoru a fyzikálně-chemického převodníku. Úkolem bioreceptoru je rozpoznání cílové struktury, v našem případě toxinu. Bioreceptorem může být například enzym, protilátka, nukleonová kyselina nebo buňka (Singh a kol., 2014). Převodník převádí specifickou vazbu biosenzoru a cílového analytu (Ahmed a kol., 2014) na měřitelný elektrický signál (Singh a kol., 2014). Tento signál je následně shromažďován, zesilován a zobrazen na signálním procesoru (Ronkainen a kol., 2010).

Izadi a kol. (2016) vyrobili pro detekci toxinů *B. cereus* biosenzor (Obrázek 12) na bázi tužkové grafitové elektrody (sloužící jako převodník) modifikované zlatými nanočásticemi (sloužících jako snímač). Výhodou tužkové grafitové elektrody, jako převodníku, je její nízká cena, dostupnost, obnovitelnost a má také vhodný mechanický povrch, který nevyžaduje jeho regeneraci před dalším použitím. Na nanočástice se samovolně naváže jednovláknová DNA (v této studii se jednalo o ssDNA genu *nheA*), která byla na elektrodě imobilizována thiolovým linkerem. *B. cereus* je detekován na základě zvýšení odporu přenosu náboje biosenzoru v důsledku hybridizace ssDNA s cílovou DNA. V této studii jsou k detekci toxinu *B. cereus* použity vzorky mléčných výrobků (syrové mléko, pasterizovaná a kojenecká výživa), ze kterých je vytvořen extrakt. Do něj je pak po dobu 45 minut a při teplotě 45 °C ponořen vyvinutý DNA biosenzor. Navrhovaný biosenzor dokázal s vysokou přesností detekovat gen *nheA* ve vzorcích mléčných výrobků a výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 2.

**Tabulka 2 - Výsledky detekce toxinu *B. cereus* ve vzorcích mléčných výrobků (Izadi a kol., 2016).**

Vzorek	Množství přidaného toxinu (nmol/L)	Detekované množství toxinu (nmol/L)
Kojenecká výživa	1,5	1,48 ± 0,1
		1,47 ± 0,05
		1,43 ± 0,06
Pasterizované mléko	2	1,94 ± 0,20
		1,99 ± 0,11
		1,97 ± 0,03
Syrivé mléko	5	5,01 ± 0,10
		5,11 ± 0,18
		5,08 ± 0,16

Tento navrhovaný biosenzor se pyšní rychlou detekční schopností, vysokou citlivostí (detekční limit biosenzoru je  $10^0$  CFU/ml) na bakteriální kontaminaci a nízkou cenou. Navíc by mohl specificky detekovat cílovou sekvenci DNA *B. cereus* a tím ho odlišit od ostatních bakterií, které by případně mohly přispívat ke kontaminaci potravinových výrobků. K prověření selektivity byl vynalezený biosenzor použit k detekci i jiných bakterií, které běžně kontaminují mléčné výrobky (*E. coli*, *B. subtilis* a *S. aureus*). Výsledky měření ukázaly, že tyto bakterie neovlivňují detekci *B. cereus* a nebyla prokázána ani hybridizace DNA s imobilizovanou ssDNA. Další výhodou biosenzoru DNA je schopnost rozlišovat virulentní bakterie od avirulentních kmenů stejného druhu tím, že využívá jako DNA sondu gen toxinů spojovaného s virulencí. Díky vysoké reprodukovatelnosti a stabilitě se dá tento DNA biosenzor považovat za vhodný a přesný detekční systém pro kontrolu kvality potravin. Kromě identifikace vegetativních buněk mohou být tímto zařízením detekovány také spory (Izadi a kol., 2016).

### **3.3 Molekulárně-biologické metody pro detekci toxinů *Bacillus cereus***

#### **3.3.1 Kvalitativní polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Princip této metody je založen na amplifikaci genů, které jsou dále studovány. Pro každý z těchto genů je vyvinut speciální primer (Priyanka a kol., 2016). Primery jsou navrženy tak, aby na základě znalosti sekvence genomové DNA a jejího porovnání s DNA ostatních mikroorganismů, umožňovaly amplifikovat pouze takový úsek DNA, který je vysoce specifický pro námi detekovaný organismus (Demnerová, 2012).

Amplifikace probíhá ve 3 krocích. Nejprve je cílová dvouřetězová DNA denaturována na jednovláknovou DNA při vysoké teplotě. Na tyto DNA řetězce se následně naváží dva jednovláknové syntetické oligonukleotidy (specifické primery). Dalším krokem je polymerační proces, při kterém se primery komplementární k jednovláknové DNA prodlužují za přítomnosti deoxyribonukleotidů a termostabilní DNA polymerázy (Law a kol., 2015). Pro identifikaci produktů PCR se používá elektroforéza na agarózovém gelu a následné barvení ethidiumbromidem (Priyanka a kol., 2016).

Metoda je citlivá, specifická a umožňuje detekci malého množství bakteriální DNA ve vzorku. Nevýhoda PCR spočívá v návrhu primerů, významné falešně negativní reakci kvůli

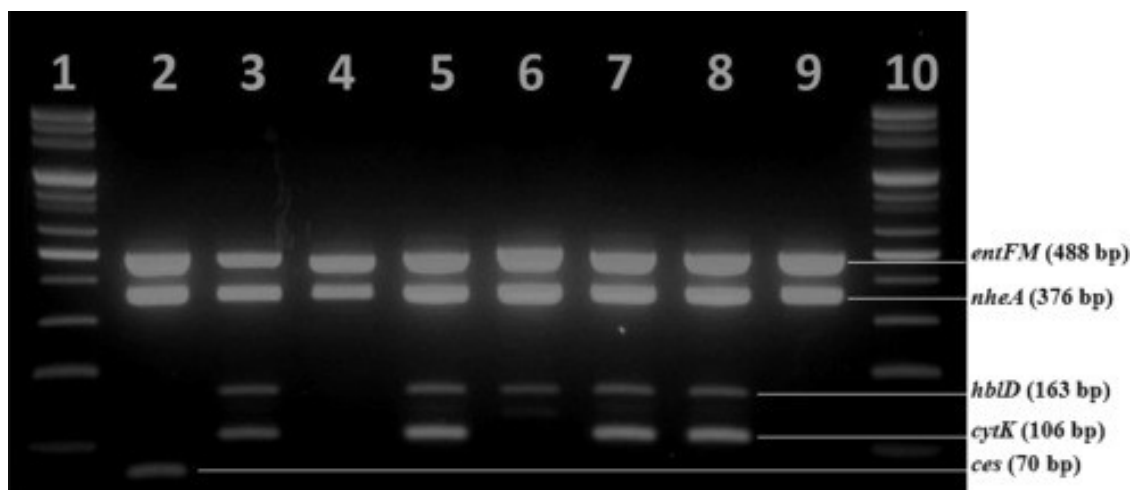
nedostatečné hybridizaci, inhibitech v PCR a neúspěšné extrakci bakteriální DNA (Oliwa-Stasiak a kol., 2010). Další nevýhodou je neschopnost metody rozlišovat mezi životaschopnými a mrtvými buňkami. DNA z mrtvých bakterií totiž může také sloužit jako templát během PCR amplifikace, což vede k falešně pozitivním výsledkům (Forghani a kol., 2015).

Na základě těchto faktů vytvořil Forghani a kol. (2015) multiplexní PCR test, ve kterém jsou použita interkalující barviva nukleových kyselin, jako je propidium monoazid, k předúpravě vzorku před samotnou analýzou. Propidium monoazid je barvivo, které může selektivně proniknout do mrtvých buněk a pomocí své azidové skupiny vytvořit komplex s DNA mrtvých buněk. Tato kovalentní vazba s vysoce reaktivním nitrenovým radikálem indukuje eliminaci amplifikace DNA pomocí PCR.

Základní princip mPCR je obdobný jako u konvekční PCR s tím rozdílem, že mPCR využívá několik sad specifických primerů, zatímco konvekční PCR používá pouze jednu sadu specifických primerů. Navržené primery jsou důležitým faktorem pro vytvoření úspěšného mPCR testu. Primery by měly mít podobnou teplotu anealingu. Dalším důležitým faktorem je také jejich koncentrace, aby nedocházelo k interakci mezi jednotlivými sadami v mPCR testu a ke vzniku dimerů primerů, které by mohly ovlivnit spolehlivost testu. Mimo to je důležité dbát také na koncentraci pufru PCR, udržování rovnováhy mezi chloridem hořečnatým a koncentrací deoxynukleotidu, množství templátu DNA, teploty cyklování a TaqDNA polymerázy (Law a kol., 2015).

Detekční schopnost nově vyvinutého PMA-mPCR testu na přítomnost toxinů *B. cereus* byla otestována na vzorcích cereálií, pasterizovaného mléka a rýže. Tyto vzorky byly naočkovány emetickým a enterotoxickým kmenem a detekce toxinů byla provedena pomocí PMA-mPCR. Vzorky cereálií, pasterizovaného mléka a rýže jsou nejprve extrahovány. Získané extrakty jsou následně předupraveny barvicím roztokem propidium monoazidem. Do extraktu je přidáno 20  $\mu$ l barvicího roztoku a celá zkumavka je inkubována na ledu ve tmě po dobu 10 minut za občasného míchání. Po inkubaci jsou vzorky ponechány na ledu a po dobu 5 minut vystaveny účinku halogenové lampy. Každých 30 sekund jsou vzorky protřepány, aby byla zaručena rovnoměrná expozice světla a nedocházelo k nadměrnému zahřívání vzorků. Z takto připravené bakteriální suspenze je extrahována DNA. Extrahovaná dvouvláknová DNA je pak denaturována na jednovláknovou DNA – nejprve při 95 °C, pak je teplota snížena na 56 °C a v konečné fázi denaturace je teplota zvýšena na 72 °C. Na ssDNA se pak naváží specifické

primery. V této studii jsou použity specifické a citlivé primery pro detekci emetických kmenů (*ces* primer) a čtyři sady pro detekci genů hlavních enterotoxinů *nheA*, *hblD*, *entFM* a *cytK*. Primery *ces* a *hblD* o koncentraci 100 nM a *nheA*, *entFM* a *cytK* primery o koncentraci 200 nM. Po mPCR následuje elektroforéza ampliconů na agarózovém gelu po dobu 40 minut při 100 V. Nakonec je agarózový gel obarven a výsledky reakce jsou vizualizovány pomocí UV transiluminátoru (Obrázek 13). Jako hmotnostní standard je použit 100 bp DNA Ladder. Na základě výsledků získaných během studie lze říct, že byl vyvinut specifický, citlivý, cenově dostupný a rychlý test pro detekci životaschopného emetického a enterotoxického *Bacillus cereus* v potravinách a potenciálně dalších matricích po provedení vhodné extrakce DNA (Forghani a kol., 2015).



**Obrázek 13** – Výsledek mPCR toxinů *B. cereus* znázorněný na agarózovém gelu (Forghani a kol., 2015)  
1 – DNA marker (DNA Ladder), 2-9 izoláty *B. cereus*, 10 – DNA marker (DNA Ladder)

### 3.3.2 Kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce (qPCR)

Velkým mezníkem v používání PCR bylo zavedení konceptu monitorování amplifikace DNA v reálném čase na základě sledování fluorescence. Každý cyklus měření fluorescence a fluorescenčního signálu odpovídá aktuálnímu množství ampliconů DNA ve vzorku (Kralík a Ricchi, 2017). K detekci signálů lze využít fluorescenční sondy nebo fluorescenční barviva (Wehrle a kol., 2010). Fluorescenční sonda je synteticky připravená krátká fluorescenčně značená sekvence nukleotidů, která je komplementární k hledanému úseku DNA.

Hybridizací mezi detekovaným úsekem nukleové kyseliny sledované bakterie a sondou dochází k nárůstu fluorescence (Demnerová, 2015). Fluorescenční barviva (Wehrle a kol., 2010), jako je například SYBR green (Demnerová, 2015), interkalují do jakékoliv části dvouvláknové DNA (Wehrle a kol., 2010). Barvivo nejprve emituje malý fluorescenční signál. Tento signál je zesílen až po navázání barviva na DNA (Law a kol., 2015).

Alternativou k SYBR green mohou být sondy TaqMan, jinak známé jako sondy s dvojitým barvivem. Jedná se o oligonukleotidy obsahující fluorofor (jako reportérové barvivo) a zhášecí barvivo (Law a kol., 2015). Během amplifikace vysílá reportérové barvivo fluorescenční signál. Tento signál je absorbován zhášecím barvivem. K uvolnění fluorescenčního signálu z reportéru dochází až po navázání TaqDNA polymerázy na TaqMan sondu. Tím dochází k rozštěpení oligonukleotidu a k oddělení zhášecího barviva od reportéru, který následně uvolní fluorescenční signál (Tajadini a kol., 2014). Z počátku jsou hodnoty fluorescence velmi nízké. Postupně se intenzita fluorescence zvyšuje, až dosáhne hodnot takzvaného prahového detekčního cyklu (Cq). V tomto bodě je intenzita fluorescence úměrná počátečnímu počtu templátových molekul DNA ve vzorku a umožňuje stanovení absolutního množství cílové DNA ve vzorku za pomoci kalibrační křivky sestavené ze sériově řaděných standardů, u kterých je předem známa koncentrace nebo počet kopií DNA (Kralik a Ricchi, 2017).

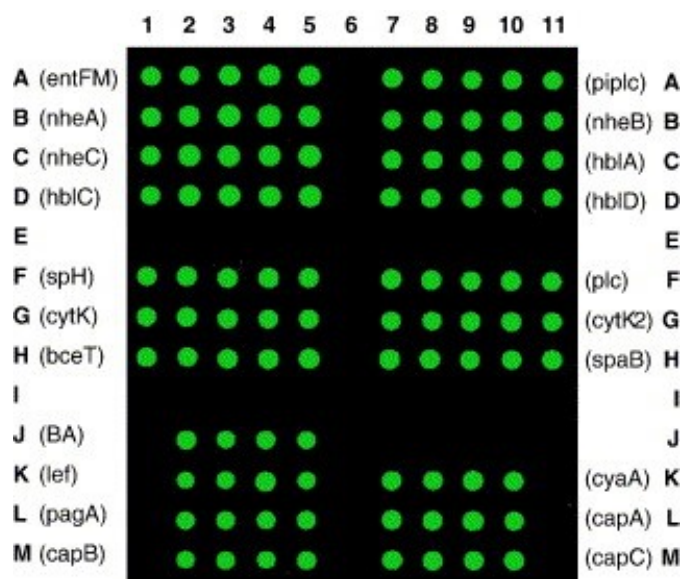
Fricker a kol. (2007) ve své studii využili nově objeveného biosyntetického kódu pro neribozomální syntézu emetického toxinu. Na základě této genetické informace vyvinuli PCR test v reálném čase založený na TaqMan sondách a SYBR green I. Stanovení pomocí TaqMan sondy zahrnuje navíc interní kontrolu amplifikace, která indikuje přítomnost inhibitorů amplifikace PCR nebo poruchu termálního cyklovače. Tím je zabráněno vzniku falešně negativních výsledků, a i díky tomu je tato metoda vhodná pro diagnostiku potravin v běžných laboratořích. Test založený na SYBR green I představuje ekonomicky zajímavou alternativu pro analýzu velkého počtu vzorků. Tyto nové diagnostické testy byly úspěšně použity i v praxi k identifikaci původce dvou ohnisek otravy jídlem v jižním Německu. V prvním případě se otrava jídlem projevila u 17 dětí v denním stacionáři, které konzumovaly ohřátý rýžový pokrm. Druhým případem byla alimentární otrava studenta, který konzumoval den předem uvařený květák. DNA byla izolována přímo ze zbytků kontaminované potravy a použita jako templát v testech TaqMan a duplex SYBR green I. Oba testy byly pozitivní na emetický kmen *B. cereus*. Tyto nově vyvinuté testy, založené na PCR v reálném čase, jsou rychlé, citlivé a spolehlivé

diagnostické nástroje, které doplňují stávající metody analýzy toxinů a mohou podstatně přispět ke stanovení skutečného počtu emetického typu alimentárního onemocnění způsobeného *B. cereus*.

### 3.3.3 DNA čipy

Princip detekce spočívá ve schopnosti těchto DNA čipů ukládat na svůj povrch až několik desítek tisíc různých sekvencí nukleové kyseliny. Různé fragmenty DNA jsou uspořádány v řádcích a sloupcích tak, že identita každého z fragmentů je známa díky jeho umístění v poli (Kaliyappan a kol., 2012).

K detekci a identifikaci toxinů *Bacillus cereus* vyvinuli Sergeev a kol. (2006) oligonukleotidový mikročip (*Bacillus-1*), na kterém je každý gen reprezentován pěti nezávislými sekvencemi pozorovanými v tripletu. Na povrchu mikročipů je 21 sond, které umožňují detekci až 7 vzorků (Sergeev a kol., 2006). Neznámé molekuly DNA jsou štěpeny restrikcí endonukleázami na jednotlivé fragmenty DNA, na které se naváží fluorescenční markery. Fragmenty dále reagují se sondami na DNA čipu a jsou na ně navázány pouze cílové fragmenty s komplementárními sekvencemi. Zbývající fragmenty DNA se vymyjí. Cílové fragmenty DNA jsou identifikovány podle jejich fluorescenční emise vznikající při průchodu laserového paprsku. Výsledné fluorescenční emise jsou počítačově zaznamenávány (Kaliyappan a kol., 2012).



Obrázek 14 – Schéma microarray *Bacillus-1* (Sergeev a kol., 2006)



### 3.3.4 Biotest založený na citlivosti motility kančích spermií

Dříve byl emetický toxin považován za nejnebezpečnější z toxinů *Bacillus cereus*, avšak kvůli nedostatku vhodných testů byl také nejméně známý. Proto vyvinul Andersson a kol. (1998) citlivý a levný biologický test pro detekci emetického toxinu. Stanovení je založeno na ztrátě motility kančích spermií, které byly po dobu 24 hodin vystaveny působení extraktů emetických kmenů *Bacillus cereus*, nebo vzorků potravy kontaminovaných těmito kmeny. Preparát byl po 24 hodinách odečten pomocí fázového světelného mikroskopu. U spermií, které byly vystaveny účinku toxinu, byla pozorována ztráta motility. Spermatické buňky měly navíc oteklé, narušené mitochondrie. Následná analýza tohoto toxinu pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie ukázala, že se jednalo o emetický toxin. Ten působil jako ionofor vytvářející membránový kanál, který blokoval oxidační fosforylaci v mitochondriích, potřebnou pro pohyblivost spermií (Andersson a kol., 1998).

Výše zmíněný test byl velmi časově náročný, jelikož samotnému stanovení předcházela desetidenní kultivace *Bacillus cereus* a následná expozice kančích spermií, která trvala jeden až čtyři dny. Proto Andersson a kol. (2004) vyvinuli nový mikroskopický test vycházející ze studie popsané v roce 1998. Biologický test je založen na známé citlivosti motility spermií na expozici emetického toxinu. K detekci toxicity emetického toxinu se používá standardní kančí sperma od dodavatelů umělé inseminace. Biomasa *Bacillus cereus* je z plotny odebrána do skleněné, uzavíratelné lahvičky a zahřívána methanolem. Získaný extrakt je vystaven komerčně dodávaným kančím spermiím po dobu pěti minut při 37 °C. Pokud extrakt obsahoval emetický toxin, spermatické buňky ztratily motilitu. Kvantitativní stanovení je provedeno ze sériově zředěného extraktu kančích spermií. Koncentrace emetického toxinu je vypočítána z nejvyššího ředění, které způsobilo ztrátu motility spermií. Chemický test je proveden ze stejných extraktů, za pomoci hmotnostní spektrometrie s iontovou pastí a za použití čtyř specifických iontů molekulové hmotnosti pro identifikaci a kvantifikaci (Andersson a kol., 2004).

## 4 ZÁVĚR

*Bacillus cereus* je Gram-pozitivní bakterie známá především jako původce alimentárních onemocnění. Pro širokou veřejnost je tato bakterie často „ve stínu“ známějších původců intestinálních onemocnění, kterými jsou například *Escherichia*, *Salmonella* či *Campylobacter*. Oproti těmto bakteriím mají onemocnění způsobená *Bacillus cereus* lehčí průběh a příznaky většinou samovolně po několika hodinách odezní. Proto většina nakažených nevyhledá lékařskou pomoc a nebezpečnost této bakterie je velmi podhodnocována. Cílem této bakalářské práce bylo seznámit čtenáře s metodami detekce toxinů *Bacillus cereus*.

Emetický toxin představuje hrozbu zejména pro stravovací zařízení. Zde může docházet v masivnímu pomnožení bakterie, které následně produkují tento toxin ve špatně skladovaných potravinách. Dříve byly k detekci emetického toxinu využívány biologické testy *in vitro*. Těmito testy je však zkoumána spíše cytotoxická aktivita, nikoliv množství vlastního toxinu. Zlatým standardem pro detekci a kvantifikaci emetického toxinu ve vzorcích potravin je vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Další spolehlivou metodou pro detekci emetického toxinu je MALDI-TOF MS. Tato metoda je v posledních letech využívána především v rutinních klinických laboratořích pro odlišení emetických a neemetických kmenů. Další využitelnou metodou pro detekci emetického toxinu je qPCR. Tato metoda umožňuje kvantifikovat množství toxinu ve vzorcích potravin.

K detekci hemolyzinu BL a nehemolytického toxinu jsou také využívány imunochemické metody. Souprava Terca BDE-VIA je založena na principu sendvičové ELISA metody. Dalším imunotestem založeným na principu sendvičové ELISA metody je Duopath® *Cereus* Enterotoxins. Velkou předností tohoto testu je možnost současné detekce hemolyzinu BL a nehemolytického toxinu. Další výhodou je rychlost testu, protože výsledek můžeme získat již do 30 minut. V kombinaci se čtečkou fotometrických proužků můžeme tento test použít i ke kvantifikaci toxinů. Souprava Oxoid BCET-RPLA využívá princip reverzní pasivní latexové aglutinace. V současné době není na trhu dostupná žádná souprava pro detekci cytotoxinu K. K jeho detekci jsou v běžných laboratořích využívány fyzikálně-chemické nebo molekulárně-biologické metody.

Dalším způsobem, jak detekovat toxiny *Bacillus cereus*, je využití biosenzoru na bázi grafitové tužky modifikované zlatými nanočásticemi. Současná detekce emetického toxinu a enterotoxinů *Bacillus cereus* je možná pomocí je multiplexní PCR nebo DNA čipů.

## 5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] **ABEE T., GROOT M. N., TEMPELAARS M., ZWIETERING M., MOEZELAAR R. a VAN DER VOORT M. (2011).** Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: Diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiology*, **28**(2), s. 199-208.
- [2] **ACOSTA PEDEMONTE N. B., ROCCHETTI N. S., VILLALBA J., TENENBAUMB D. L., SETTECASEA C. J., BAGILETA D. H, COLOMBOC L. G., GREGORINI E. R. (2020).** *Bacillus cereus* bacteremia in a patient with an abdominal stab wound. *Revista Argentina de Microbiología*. **52**(2), s. 115-117.
- [3] **ADAMS M. R. a MOSS M. O. (2000).** *Food Microbiology*. 2. vydání. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, ISBN 0-85404-611-9, s. 187-191.
- [4] **ADAMS M. R. a MOSS M. O. (2008).** *Food microbiology*. 3. vydání. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, ISBN 978-0-85404-284-5, s. 185-189.
- [5] **ADAMS M. R., MOSS M. O. a McCLURE P. J. (2016).** *Food microbiology*. 4. vydání. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, ISBN: 978-1-5231-1940-0, s. 214-219.
- [6] **AHMED A., RUSHWORTH J. V., HIRST N. A. a MILLNER P. A. (2014).** Biosensors for whole-cell bacterial detection. *Clinical Microbiology Reviews*. **27**(3), s. 631-646.
- [7] **ALI A. A., ALTEMIMI A. B., ALHELFI N. a IBRAHIM S. A. (2020).** Application of biosensors for detection of pathogenic food bacteria: A review. *Biosensors*. **10**(6), s. 1-23.
- [8] **ALONZO D. A., MAGARVEY N. A., SCHMEING T. M. a VIROLLE M.-J. (2015).** Characterization of cereulide synthetase, a toxin-producing macromolecular machine. *Plos One*. **10**(6), s. 1-19.
- [9] **AMOR M. G.-B., JAN S., BARON F., GROSSET N., CULOT A., GDOURA R., GAUTIER M. a TECHER C. (2019).** Toxigenic potential and antimicrobial susceptibility of *Bacillus cereus* group bacteria isolated from Tunisian foodstuffs. *BMC Microbiology*. **19**(1), s. 1-12.

- [10] **AMOR M. G.-B., SIALA M., ZAYANI M., SMAOUI S., MESSADI-AKROUT F., BARON F., JAN S., GAUTIER M. a GDOURA R. (2018).** Isolation, identification, prevalence, and genetic diversity of *Bacillus cereus* group bacteria from different foodstuffs in Tunisia. *Frontiers in Microbiology*. **9**(1), s. 35-44.
- [11] **ANDERSSON M. A., MIKKOLA R., HELIN J., ANDERSSON M. C. a SALKINOJA-SALONEN M. (1998).** A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(4), s. 1338-1343.
- [12] **ANDERSSON M., JÄÄSKELÄINEN E. L., SHAHEEN R., PIHONEN T., WIJNANDS L. M., SALKINOJA-SALONEN M. S. (2004).** Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. *International Journal of Food Microbiology*. **94**(2), s. 175-183.
- [13] **ARSLAN S., EYI A. a KÜCÜKSARI R. (2014).** Toxigenic genes, spoilage potential, and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* group strains from ice cream. *Anaerobe*. **25**(3), s. 42-46.
- [14] **BARTUŇKOVÁ J., PAULÍK M., HRUŠÁK O., SMETANA K., ŠEDIVÁ A., ŠPÍŠEK R., ŠPRONGL L. a VERNEROVÁ E. (2011).** *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-3533-7, 164 s.
- [15] **BAUER T., STARK T., HOFMANN T. a EHLING-SCHULZ M. (2010).** Development of a stable isotope dilution analysis for the quantification of the *Bacillus cereus* toxin cereulide in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**(3), s. 1420-1428.
- [16] **BEECHER D. J. a WONG A. C. (1994).** Identification of hemolyzin BL-producing *Bacillus cereus* isolates by a discontinuous hemolytic pattern in blood agar. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**(5), s. 1646-1651.
- [17] **BERTHOLD-PLUTA A., PLUTA A. a GARBOWSKA M. (2015).** The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract. *Microbial Pathogenesis*. **82**, s. 7-14.

- [18] **BIESTA-PETERS E. G., REIJ M. W., BLAAUW R. H., IN 'T VELD Paul H., RAJKOVIC A., EHLING-SCHULZ M. a ABEE T. (2010).** Quantification of the emetic toxin cereulide in food products by liquid chromatography-mass spectrometry using synthetic cereulide as a standard. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**(22), s. 7466-7472.
- [19] **BLACKRURN C. de W. a McCLURE P. J. (2009).** *Foodborne pathogens – hazards, risk analysis and control*. 2. vydání. UK: Woodhead Publishing, ISBN 978-1-84-569633-7, s. 844-868.
- [20] **BÖHM M.-E., HUPTAS C., KREY V. M. a SCHERER S. (2015).** Massive horizontal gene transfer, strictly vertical inheritance and ancient duplications differentially shape the evolution of *Bacillus cereus* enterotoxin operons *hbl*, *cytK* and *nhe*. *BMC Evolutionary Biology*. **15**(1), s. 1-17.
- [21] **BOTTONE E. J. (2010).** *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. **23**(2), s. 382-398.
- [22] **BRESSUIRE-ISOARD C., BROUSSOLLE V. a CARLIN F. (2018).** Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*. **42**(5), s. 614-626.
- [23] **CARLIN F., BRILLARD J., BROUSSOLLE V., CLAVEL T., DUPORT C., JOBIN M., GUINEBRETIERE M.-H., AUGER S., SOROKINE A., NGUYEN-THÉ C. (2010).** Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Research International*. **43**(7), s. 1885-1894.
- [24] **CASTIAUX V., LIU X., DELBRASSINNE L. a MAHILLON J. (2015).** Is Cytotoxin K from *Bacillus cereus* a bona fide enterotoxin? *International Journal of Food Microbiology*. **211**, s. 79-85.
- [25] **CEUPPENS S., BOON N. a UYTENDAELE M. (2013).** Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiology Ecology*. **84**(3), s. 433-450.

- [26] **CLAIR G., ROUSSI S., ARMENGAUD J. a DUPORT C. (2010).** Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions. *Mol Cell Proteomics*. **9(7)**, s. 1486-1498.
- [27] **DEMNEROVÁ K. (2012).** Mikrobiologická bezpečnost potravin: současné strategie pro efektivní kontrolu. *Chemické listy*. **106**, s. 920-925.
- [28] **DELBRASSINNE L., ANDJELKOVIC M., RAJKOVIC A., DUBOIS P., NGUESSAN E., MAHILLON J. a VAN LOCO J. (2012).** Determination of *Bacillus cereus* emetic toxin in food products by means of LC-MS<sup>2</sup>. *Food Analytical Methods*. **5(5)**, s. 969-979.
- [29] **DIDIER A., DIETRICH R., MÄRTLBAUER E. a GOLDMAN E. R. (2016).** Antibody binding studies reveal conformational flexibility of the *Bacillus cereus* non-hemolytic enterotoxin (Nhe) A-component. *Plos One*. **11(10)**, s. 1-19.
- [30] **DIETRICH R., FELLA C., STRICH S. a MÄRTLBAUER E. (1999).** Production and characterization of monoclonal antibodies against the hemolysin BL enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **65(10)**, s. 4470-4474.
- [31] **DIETRICH R., JESSBERGER N., EHLING-SCHULZ M., MÄRTLBAUER E. a GRANUM P. E. (2021).** The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*. **13(2)**, s. 1-48.
- [32] **DIETRICH R., MORAVEK M., BÜRK C., GRANUM P. E. a MÄRTLBAUER E. (2005).** Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *Bacillus cereus* non-hemolytic enterotoxin complex. *Applied and Environmental Microbiology*. **71(12)**, s. 8214-8220.
- [33] **DOLL V. M., EHLING-SCHULZ M., VOGELMANN R. a FREITAG N. E. (2013).** Concerted action of sphingomyelinase and non-hemolytic enterotoxin in pathogenic *Bacillus cereus*. *Plos One*. **8(4)**, s. 1-13.
- [34] **DOMMEL M. K., LÜCKING G., SCHERER S. a EHLING-SCHULZ M. (2011).** Transcriptional kinetic analyses of cereulide synthetase genes with respect to growth,

- sporulation and emetic toxin production in *Bacillus cereus*. *Food Microbiology*. **28**(2), s. 284-290.
- [35] **DOYEL M. P. a BUCHNAN R. L. (2013)**. Food microbiology-fundamentals and frontiers. *American Society for Microbiology (ASM)*. 4. vydání. ISBN: 978-1-55581-626-1, s. 491-502.
- [36] **DRÉAN P., MCAULEY C. M., MOORE S. C., FEGAN N. a FOX E. M. (2015)**. Characterization of the spore-forming *Bacillus cereus sensu lato* group and *Clostridium perfringens* bacteria isolated from the Australian dairy farm environment. *BMC Microbiology*. **15**(1), s. 1-10.
- [37] **DUCREST P. J., PFAMMATTER S., STEPHAN D., VOGEL G., THIBAUT P. a SCHNYDER B. (2019)**. Rapid detection of *Bacillus* ionophore cereulide in food products. *Scientific Reports*. **9**(1), s. 1-8.
- [38] **DUPORT C., JOBIN M. a SCHMITT P. (2016)**. Adaptation in *Bacillus cereus*: From stress to disease. *Frontiers in Microbiology*. **7**, s. 1-18.
- [39] **EHLING-SCHULZ M., FRICKER M. a SCHERER S. (2004)**. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Molecular Nutrition Food Research*. **48**(7), s. 479-487.
- [40] **EHLING-SCHULZ M., FRENZEL E. a GOHAR M. (2015)**. Food-bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology*. **6**(1), s. 23-27.
- [41] **EKMAN J. V., KRUGLOV A., ANDERSSON M. A., MIKKOLA R., RAULIO M. a SALKINOJA-SALONEN M. (2012)**. Cereulide produced by *Bacillus cereus* increases the fitness of the producer organism in low-potassium environments. *Microbiology*. **158**(4), s. 1106-1116.
- [42] **ENOSI TUIPULOTU D., MATHUR A., NGO C., MAN S. M. a RAINEY F. A. (2020)**. *Bacillus cereus*: Epidemiology, virulence factors, and host-pathogen interactions. *Trends in Microbiology*, **65**(10), s. 4606-4610.
- [43] **ESBELIN J., ARMENGAUD J., ZIGHA A. a DUPORT C. (2009)**. ResDE-dependent regulation of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus*:

- Evidence for multiple modes of binding for ResD and interaction with Fnr. *Journal of Bacteriology*. **191**(13), s. 4419-4426.
- [44] **EURTIVONG C., PILKINGTON L. I., VAN RENSBURG M., WHITE R. M., BRAR H. K., REES S., PAULIN E. K., XU C. S., SHARMA N., LEUNG I. K. H., LEUNG E., BARKER D. a REYNISSON J. (2020)**. Discovery of novel phosphatidylcholine-specific phospholipase C drug-like inhibitors as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **187**, s. 1-9.
- [45] **FORGHANI F., LANGAEE T., ESKANDARI M. a SEO K.-H., CHUNG M.-J. a OH D.-H. (2015)**. Rapid detection of viable *Bacillus cereus* emetic and enterotoxic strains in food by coupling propidium monoazide and multiplex PCR (PMA-mPCR). *Food Control*. **55**(1), s. 151-157.
- [46] **FRANKLAND G. C. a FRANKLAND P. F. (1887)**. XI. Studies on some new micro-organisms obtained from air. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London (B)*. **178**, s. 257-287.
- [47] **FRICKER M., MESSELHÄUSSER U., BUSCH U., SCHERER S. a EHLING-SCHULZ M. (2007)**. Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**(6), s. 1892-1898.
- [48] **GAN S. D. a PATEL K. R. (2013)**. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology*. **133**(9), s. 1-3.
- [49] **GLASSET B., SPERRY M., DERVYN R., HERBIN S., BRISABOIS A. a RAMARAO N. (2021)**. The cytotoxic potential of *Bacillus cereus* strains of various origins. *Food Microbiology*. **98**, s. 1-6.
- [50] **GÖSELOVÁ S., BLAŽKOVÁ M., HOLUBOVÁ B., KARAMONOVÁ L. a RAUCH P. (2014)**. Imunodetekce v laterálním toku na membráně. *Chemické listy*. **108**, s. 114-119.
- [51] **GRACE C. (2013)**. Multidrug-resistant bacteria. *Critical Care Secrets*. 5. vydání. ISBN 9780323085007, s. 246-251.
- [52] **GRANUM P. E. a LUND T. (1997)**. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*. **157**(2), s. 223-228.



- [53] **GRIFFITHS M. W. a SCHRAFT H. (2017).** *Bacillus cereus* food poisoning. *Foodborne Diseases*. **19**(1), s. 395-405.
- [54] **HÄGGBLOM M. M., APETROAIE C., ANDERSSON M. A. a SALKINOJA-SALONEN M. S. (2002).** Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**(5), s. 2479-2483.
- [55] **HAUGE S. (1955).** Food poisoning caused by aerobic spore-forming *Bacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*. **18**(3), s. 591-595.
- [56] **CHAABOUNI I., BARKALLAH I., HAMDY C., JOUINI A., SAIDI M., MAHILLON J. a CHERIF A. (2015).** Metabolic capacities and toxigenic potential as key drivers of *Bacillus cereus* ubiquity and adaptation. *Annals of Microbiology*. **65**(2), s. 975-983.
- [57] **IZADI Z., SHEIKH-ZEINODDIN M., ENSAFI A. A. a SOLEIMANIAN-ZAD S. (2016).** Fabrication of an electrochemical DNA-based biosensor for *Bacillus cereus* detection in milk and infant formula. *Biosensors and Bioelectronics*. **80**, s. 582-589.
- [58] **JALALPOOR S. (2011).** Survey role of nano structure surface layer in *Bacillus cereus* strains resistant to antibiotics (Iran-Azzahra Hospital and Esfahan University). *African Journal of Microbiology*. **5**(21), s. 3414-3421.
- [59] **JESSBERGER N., DIETRICH R., BOCK S., DIDIER A. a MÄRTLBAUER E. (2014).** *Bacillus cereus* enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. *Toxicon*. **77**, s. 49-57.
- [60] **JESSBERGER N., DIETRICH R., SCHWEMMER S., TAUSCH F., SCHWENK V., DIDIER A. a MÄRTLBAUER E. (2019).** Binding to the target cell surface is the crucial step in pore formation of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Toxins*. **11**(5), s. 1-16.
- [61] **KALBHENN E. M., BAUER T., STARK T. D., KNÜPFER M., GRASS G. a EHLING-SCHULZ M. (2021).** Detection and isolation of emetic *Bacillus cereus* toxin cereulide by reversed phase chromatography. *Toxins*. **13**(2), s. 1-14.

- [62] **KALIYAPPAN K., PALANISAMY M., GOVINDARAJAN R. a DURAIYAN J. (2012).** Microarray and its applications. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 4(6), s. 310-312.
- [63] **KHOLODKOV O. A., BUDARINA Z. I., ANDREEVA-KOVALEVSKAYA Z. I., SIUNOV A. V. a SOLONIN A. S. (2015).** Effect of *Bacillus cereus* hemolysin II on hepatocyte cells. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 51(2), s. 255-263.
- [64] **KIM D.-H., KIM H., CHON J.-W., MOON J.-S., SONG K.-Y. a SEO K.-H. (2013).** Development of blood–yolk–polymyxin B–trimethoprim agar for the enumeration of *Bacillus cereus* in various foods. *International Journal of Food Microbiology*. 165(2), s. 144-147.
- [65] **KIM J.-B., PARK J.-S., KIM M.-S., HONG S.-Ch., PARK J.-H. a OH D.-H. (2011).** Genetic diversity of emetic toxin producing *Bacillus cereus* Korean strains. *International Journal of Food Microbiology*. 150(1), s. 66-72.
- [66] **KOTIRANTA A., LOUNATMAA K. a HAAPASALO M. (2000).** Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*. 2(2), s. 189-198.
- [67] **KOVAC J., MILLER R. A., CARROLL L. M., KENT D. J., JIAN J., BENO S. M. a WIEDMANN M. (2016).** Production of hemolysin BL by *Bacillus cereus* group isolates of dairy origin is associated with whole-genome phylogenetic clade. *BMC Genomics*. 17(1), s. 1-16.
- [68] **KRALIK P. a RICCHI M. (2017).** A basic guide to real-time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*. 8, s. 1-9.
- [69] **KRANZLER M., STOLLEWERK K., ROUZEAU-SZYNALSKI K., BLAYO L., SULYOK M. a EHLING-SCHULZ M. (2016).** Temperature exerts control of *Bacillus cereus* emetic toxin production on post-transcriptional levels. *Frontiers in Microbiology*. 7, s. 1-10.
- [70] **KRAUSE N., MORAVEK M., DIETRICH R., WEHRLE E., SLAGHUIS J. a MÄRTLBAUER E. (2010).** Performance characteristics of the Duopath<sup>®</sup> *Cereus* Enterotoxins assay for rapid detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 144(2), s. 322-326.

- [71] **KUMARI S. a SARKAR P. K. (2016).** *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control*. **69**, s. 20-29
- [72] **LAW J. W.-F., AB MUTALIB N.-S., CHAN K.-G. a LEE L.-H. (2015).** Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*. **5**(3), s. 1-19.
- [73] **LIU X., DING S., SHI P., DIETRICH R., MÄRTLBAUER E. a ZHU K. (2017).** Non-hemolytic enterotoxin of *Bacillus cereus* induces apoptosis in *Vero* cells. *Cellular Microbiology*. **19**(4), s. 1-10.
- [74] **LIU Y., LAI Q., GÖKER M., MEIER-KOLTHOFF J. P., WANG M., SUN Y., WANG L. a SHAO Z. (2015).** Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports*. **5**(1), s. 1-11.
- [75] **LUND T., GRANUM P. E. a CARLIN F. (2013).** The 105-kDa protein component of *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin (Nhe) is a metalloprotease with gelatinolytic and collagenolytic activity: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiology Letters*. **178**(2), s. 355-361.
- [76] **MAHAT M., ABDULLAH W. Z. a CHE HUSSIN Ch. M. (2014).** Conventional rapid latex agglutination in estimation of von willebrand factor: method revisited and potential clinical applications. *Journal of Immunology Research*. **2014**, s. 1-10.
- [77] **MACHAIAH M. I. a KRISHNAN M. H. (2014).** Immunodetection of *Bacillus cereus* haemolytic enterotoxin (HBL) in food samples. *Analytical Methods*. **6**(6), s. 1841-1847.
- [78] **MAJED R., FAILLE Ch., KALLASSY M. a GOHAR M. (2016).** *Bacillus cereus* biofilms – same, only different. *Frontiers in Microbiology*. **7**(21), s. 1-16.
- [79] **MARGULIS L., JORGENSEN J. Z., DOLAN S., KOLCHINSKY R., RAINEY F. A. a LO S.-C. (1998).** The arthromitus stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **95**(3), s. 1236-1241.
- [80] **MARXEN S., STARK T. D., RÜTSCHLE A., LÜCKING G., FRENZEL E., SCHERER S., EHLING-SCHULZ M. a HOFMANN T. (2015).** Depsipeptide intermediates interrogate proposed biosynthesis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *Scientific Reports*. **5**(1), s. 1-14.

- [81] **MARXEN S., STARK T. D., RÜTSCHLE A., LÜCKING G., FRENZEL E., SCHERER S., EHLING-SCHULZ M. a HOFMANN T. (2015).** Multiparametric quantitation of the *Bacillus cereus* toxins cereulide and isocereulides A–G in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **63**(37), s. 8307-8313.
- [82] **MURSALIN M. H., LIVINGSTON E. T. a CALLEGAN M. C. (2020).** The *cereus* matter of *Bacillus endophthalmitis*. *Experimental Eye Research*. **193**, s. 1-44.
- [83] **MATTHEWS K. K., MONTVILLE K. E. a THOMAS J. (2017).** *Food microbiology-an introduction*. 4. vydání. American Society for Microbiology, ISBN 978-1-5231-1257-9, s. 145-155.
- [84] **NAKA T., TAKAKI Y., HATTORI Y., TAKENAKA H., OHTA Y., KIRIHATA M. a TANIMORI S. (2020).** Chemical structure of hydrolysates of cereulide and their time course profile. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **30**(9), s. 1-7.
- [85] **OLIWA-STASIAK K., MOLNAR C. I., ARSHAK K., BARTOSZCZE M. a ADLEY C. C. (2010).** Development of a PCR assay for identification of the *Bacillus cereus* group species: principles, applications, advantages and limitations. *Journal of Applied Microbiology*. **108**(1), s. 266-273.
- [86] **ONOFRILLO D. (2016).** *Bacillus cereus* disease in children. *The Diverse Faces of Bacillus Cereus*. 1. vydání. London, UK: Academic Press, an imprint of Elsevier, ISBN 978-0-12-801474-5, kapitola 7, s. 85-91.
- [87] **ORGANJI S. R., ABULREESH H. H., ELBANNA K., OSMAN G. E. H. a KHIDER M. (2015).** Occurrence and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* in food and infant feces. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **5**(7), s. 515-520.
- [88] **PAVLOVIC M., HUBER I., KONRAD R. a BUSCH U. (2013).** Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. *The Open Microbiology Journal*. **7**(1), s. 135-141.
- [89] **RAJKOVIC A., UYTTENDAELE M., VERMEULEN A., ANDJELKOVIC M., FITZ-JAMES I., VELD in't P., DENON Q., VÉRHE R. a DEBEVERE J. (2008).** Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Letters in Applied Microbiology*. **46**(5), s. 536-541.

- [90] **RAJKOVIC A., JOVANOVIC J., MONTEIRO S., DECLEER M., ANDJELKOVIC M., FOUBERT A., BELOGLAZOVA N., TSILLA V., SAS B., MADDER A., SAEGER De S. a UYTTENDAELE M. (2020).** Detection of toxins involved in foodborne diseases caused by Gram-positive bacteria. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **19**(4), s. 1605-1657.
- [91] **PRIYANKA B., PATIL R. K. a DWARAKANATH S. (2016).** A review on detection methods used for foodborne pathogens: A smart approach towards clinical diagnosis. *Indian Journal of Medical Research*. **144**(3), s. 385–404.
- [92] **RAMARAO N., LERECLUS D. a SOROKIN A. (2015).** The *Bacillus cereus* Group. *Molecular Medical Microbiology*. **10**(6), s. 1041-1078.
- [93] **RAMARAO N. a SANCHIS V. (2013).** The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: A review. *Toxins*. **5**(6), s. 1119-1139.
- [94] **RAMARAO N., TRAN S.-L., MARIN M. a VIDIC J. (2020).** Advanced methods for detection of *Bacillus cereus* and its pathogenic factors. *Sensors*. **20**(9), s. 1-23.
- [95] **RAMM F., DONDAPATI S. K., THORING L., ZEMELLA A., WÜSTENHAGEN D. A., FRENTZEL H., STECH M. a KUBICK S. (2020).** Mammalian cell-free protein expression promotes the functional characterization of the tripartite non-hemolytic enterotoxin from *Bacillus cereus*. *Scientific Reports*. **10**(1), s. 1-12.
- [96] **RASKO D. A., ROSOVITZ M. J., ØKSTAD O. A., FOUTS D. E., JIANG L., CER R. Z., KOLSTØ A. B., GILL S. R. a RAVEL J. (2007).** Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1: A review. *Journal of Bacteriology*. **189**(1), s. 52-64.
- [97] **REIS A. L. S., MONTANHINI M. T. M., BITTENCOURT J. V. M., DESTRO M. T. a BERSOT L. S. (2013).** Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. **44**(4), s. 1195-1198.
- [98] **RONKAINEN N. J., HALSALL H. B. a HEINEMAN W. R. (2010).** Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*. **39**(5), s. 1747-1763.

- [99] **SALVETTI S., FAEGRI K., GHELARDI E., KOLSTØ A.-B. a SENESI S. (2011).** Global gene expression profile for swarming *Bacillus cereus* bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**(15), s. 5149-5156.
- [100] **SENESE S. a GHELARDI E. (2010).** Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. *Toxins*. **2**(7), s. 1690-1703.
- [101] **SERGEEV N., DISTLER M., VARGAS M., CHIZHIKOV V., HEROLD K. E. a RASOOLY A. (2006).** Microarray analysis of *Bacillus cereus* group virulence factors. *Journal of Microbiological Methods*. **65**(3), s. 488-502.
- [102] **SINGH R., MUKHERJEE M. D., SUMANA G., GUPTA R. K., SOOD S. a MALHOTRA B. D. (2014).** Biosensors for pathogen detection: A smart approach towards clinical diagnosis. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **197**, s. 385-404.
- [103] **SOFOS J. (2013).** *Advances in microbial food safety*. 1. vydání. Elsevier, ISBN 978-0-85709-874-0, s. 70-96.
- [104] **STENFORS ARNESEN L. P., FAGERLUND A. a GRANUM P. E. (2008).** From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*. **32**(4), s. 579-606.
- [105] **TAJADINI M., PANJEHPOUR M. a JAVANMARD S. H. (2014).** Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Advanced Biomedical Research*. **3**(1), s. 1-7.
- [106] **TEWARI A. a ABDULLAH S. (2015).** *Bacillus cereus* food poisoning: international and Indian perspective. *Journal of Food Science and Technology*. **52**(5), s. 2500-2511.
- [107] **TRAN S.-L., GUILLEMET E., GOHAR M., LERECLUS D. a RAMARAO N. (2010).** CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence. *Journal of Bacteriology*. **192**(10), s. 2638-2642.
- [108] **ULRICH S., GOTTSCHALK C., DIETRICH R., MÄRTLBAUER E. a GAREIS M. (2019).** Identification of cereulide producing *Bacillus cereus* by MALDI-TOF MS. *Food Microbiology*. **82**, s. 75-81.

- [109] **ULTEE A., KETS E. P. W. a SMID E. J. (1999).** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(10), s. 4606-4610.
- [110] **VISIELLO R., COLOMBO S. a CARRETTO E. (2016).** *Bacillus cereus* hemolysins and other virulence factors. *The Diverse Faces of Bacillus cereus*. **10**(1), s. 35-44.
- [111] **VOTAVA M. (2003).** *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 80-902896-6-5. s. 132-134
- [112] **VRIONI G., TSIAMIS C., OIKONOMIDIS G., THEODORIDOU K., KAPSIMALI V. a TSAKRIS A. (2018).** MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Annals of Translational Medicine*. **6**(12), s. 240.
- [113] **VYLETĚLOVÁ M. a BANYKÓ J. (2010).** Detection of coding genes for enterotoxins in *Bacillus cereus* by PCR and their products by BCET-RPLA and ELISA Assay. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. **58**(5), s. 417-426.
- [114] **WANG C., STANCIU C., EHRHARDT CH. J. a YADAVALLI V. K. (2015).** Morphological and mechanical imaging of *Bacillus cereus* spore formation at the nanoscale. *Journal of Microscopy*. **258**(1), s. 49-58.
- [115] **WEBB M. D., BARKERA G. C., GOODBURN K. E. a PECK M. W. (2019).** Risk presented to minimally processed chilled foods by psychrotrophic *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science & Technology*. **93**(7), s. 94-105.
- [116] **WEHRLE E., DIDIER A., MORAVEK M., DIETRICH R. a MÄRTLBAUER E. (2010).** Detection of *Bacillus cereus* with enteropathogenic potential by multiplex real-time PCR based on SYBR green I. *Molecular and Cellular Probes*. **24**(3), s. 124-130.
- [117] **WIWAT C. a THIRAMANAS R. (2014).** Detection of hemolysin BL gene of *Bacillus cereus* isolates. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*. **41**(2), s. 22-30.

- [118] **YU S., YU P., WANG J., LI C., GUO H., LIU C., KONG L., YU L., WU S., LEI T., CHEN M., ZENG H., PANG R., ZHANG Y., WEI X., ZHANG J., WU Q. a DING Y. (2020).** A study on prevalence and characterization of *Bacillus cereus* in ready-to-eat foods in China. *Frontiers in Microbiology*. **10**(2), s. 115-117.
- [119] **ZHANG Z., FENG L., XU H., LIU Ch., SHAH N. P. a WEI H. (2016).** Detection of viable enterotoxin-producing *Bacillus cereus* and analysis of toxigenicity from ready-to-eat foods and infant formula milk powder by multiplex PCR. *Journal of Dairy Science*. **99**(2), s. 1047-1055.
- [120] **ZHANG Z., ZHOU J. a DU X. (2019).** Electrochemical biosensors for detection of foodborne pathogens. *Micromachines*. **10**(4), s. 1-15.
- [121] **ZHU K., DIDIER A., DIETRICH R., HEILKENBRINKER U., WALTENBERGER E., JESSBERGER N., MÄRTLBAUER E. a BENZ R. (2016).** Formation of small transmembrane pores: An intermediate stage on the way to *Bacillus cereus* non-hemolytic enterotoxin (Nhe) full pores in the absence of NheA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **469**(3), s. 613-618.
- [122] **ZHU L., HE J., CAO X., HUANG K., LUO Y. a XU W. (2016).** Development of a double-antibody sandwich ELISA for rapid detection of *Bacillus Cereus* in food. *Scientific Reports*. **6**(1), s. 1-10.
- [123] **www.baria.cz** Schéma principu sendvičové ELISA metody [cit. 2021-06-11]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/blog/metoda-elisa-aspekty-jednotlivych-usporadani/>
- [124] **www.cvuas.de** Schéma MALDI-TOF MS [cit. 2021-03-15]. Dostupné z: [https://www.uabw.de/pub/beitrag\\_printversion.asp?subid=1&Thema\\_ID=2&ID=2147&Pdf=No&lang=EN](https://www.uabw.de/pub/beitrag_printversion.asp?subid=1&Thema_ID=2&ID=2147&Pdf=No&lang=EN).
- [125] **www.cit.vfu.cz** Kolonie *Bacillus cereus* na krevním agaru [cit. 2020-03-05]. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xbc/xbc02.html>.
- [126] **www.cit.vfu.cz** Kolonie *Bacillus cereus* na MYP agaru [cit. 2021-04-01]. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xbc/xbc03-05.html>.
- [127] **www.enzolifesciences.com** 96 jamková destička pro metodu ELISA [cit. 2021-06-11]. Dostupné z: <https://www.enzolifesciences.com/platforms/immunoassay-and-assay-development/immunoassays-elisa-kits/>



- [128] **www.nzip.cz** Infekce vyvolané *Bacillus cereus*. *Národní zdravotnický informační portál (NZIP)* [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2021 [cit. 31.05.2021]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/220-bacillus-cereus-infekce>
- [129] **www.oxoid.com** BCET-RPLA Toxin Detection Kit. *ThermoFisher Scientific* [online]. UK: Oxoid Limited, 2001 [cit. 2020-05-27]. Dostupné z: [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=TD0950&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=TD0950&c=UK&lang=EN).
- [130] **www.phil.cdc.gov** Buňky *Bacillus cereus* barvené Leifsonovou technikou pro zvýraznění bičků [cit. 2021-04-06]. Dostupné z: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=1059> .
- [131] **www.sigmaaldrich.com** *Duopath<sup>®</sup> Cereus Enterotoxins* [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/104146?lang=en&region=CZ>.