



***Clostridium perfringens* v teplých pokrmech: Faktory ovlivňující klíčení spor a množení**

ALENA ZOUHAROVÁ

VETERINÁRNÍ UNIVERZITA BRNO

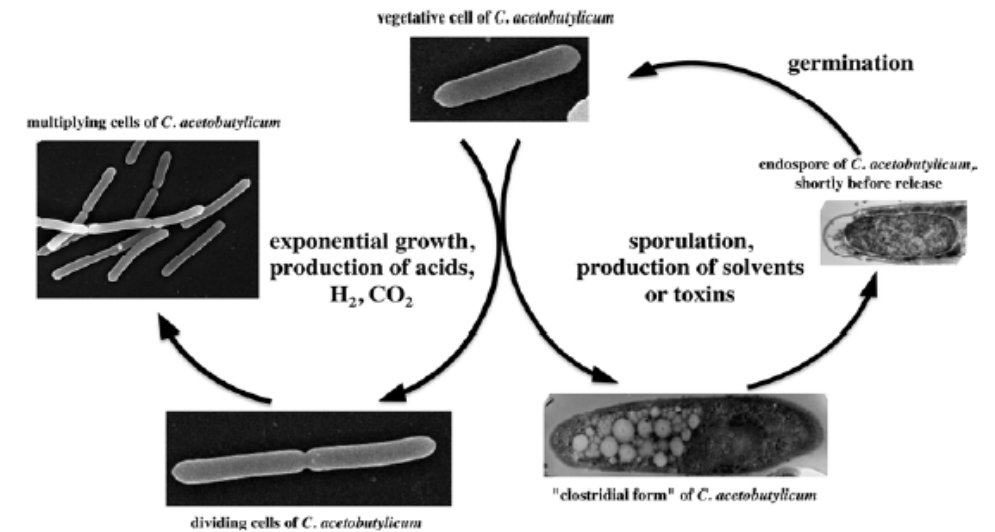
Prezentace vznikla s podporou projektu Ministerstva zemědělství NAZV QK23020061

Rod *Clostridium*

- Anaerobní bakterie
 - mnoho druhů toleruje kyslík v různé míře
- Jsou schopny tvořit ENDOSPORY.
 - Většina vykazuje pozitivní Gramovu reakci.
- U rodu *Clostridium* popsáno přibližně 180 druhů → jeden z největších bakteriálních rodů.
 - Pouze několik z těchto druhů je však patogenních
 - Velké množství druhů používá v biotechnologických aplikacích (výroba enzymů, chemikálií a biopaliv).
- Běžně se vyskytují v půdě, prachu, vodním prostředí a ve střevech zvířat i lidí

Endospory

- Vzniká uvnitř bakteriální buňky
 - Umístěné centrálně, terminálně nebo subterminálně
- Jsou metabolicky neaktivní
- Vysoce odolné vůči různým stresovým faktorům prostředí → včetně sucha, tepla, záření a toxických chemických látek → mohou přežívat v různých prostředích
- Když jsou spory vystaveny živinám a/nebo iontům při teplotě umožňující růst → zahájí postupné biologické reakce nazývané **klíčení** = **germinace**
- Během klíčení - bakteriální buňky aktivně produkují energii, biomolekuly a stavební složky vegetativních buněk → prasknutí obalů spor a z vnitřku spor se vynoří vegetativní buňky
- V různých prostředích → **kontaminace potravin** běžná
 - kontaminace působí kažení potravin a ztrátu jejich kvality
 - Onemocnění z potravin



Clostridium a onemocnění z potravin

- Druhy rodu *Clostridium*, které se nejčastěji podílejí na onemocnění z potravin, jsou:

Clostridium perfringens

- Přítomnost v potravinách poměrně častá
- Onemocnění způsobená toxiny *C. perfringens* jsou obvykle krátká a zřídka je smrtelná.

Clostridium botulinum

- V potravinách se vyskytuje méně často
- Neurotoxiny *C. botulinum* patří k nejtoxičtějším látkám vyskytujícím se v přírodě a způsobují závažná onemocnění z potravin, někdy smrtelná, s příznaky přetrvávajícími několik měsíců.

Mohou být přítomny v celé řadě potravin → **Správná zemědělská praxe a správná hygienická praxe** přispívají ke snížení počtu klostridií

Clostridium perfringens - historie

Po mnoho let byla tato bakterie nazývána:

- ***Clostridium welchii*** – v anglicky mluvících zemích
- ***Clostridium perfringens*** – ve francouzky mluvících zemích
- Jednotně od 1980

Spojení *C. perfringens* a alimentárního onemocnění

- **V 90. letech 19. století** se **F. W. Andrewes** a **E. Klein** zabývali spojením *Clostridium welchii* s otravou potravinami. Klein (1895) izoloval *Cl. welchii* ze stolice pacientů postižených dvěma epidemiemi průjmu, které zahrnovaly 59 a 144 případů.
- **Knox a MacDonald (1943)** popsali onemocnění školních dětí po konzumaci jídla ze školní jídelny - omáčka připravená předchozího dne byla silně kontaminována anaerobními sporulujícími bakteriemi.
- Od 40. let 20. století jsou hlášena ohniska nákazy

Clostridium perfringens

- Grampozitivní anaerobní (aerotolerantní) bakterie
- Řazena do III. skupiny čeledi *Bacillaceae*, rod *Clostridium*, druh *Clostridium perfringens*
- Nepohyblivá bakterie
- Tvoří oválné, subterminálně umístěné spory
 - Přesto, že ve střevě se spory vytvářejí snadno, v kultuře jsou zřídka k vidění, pokud nejsou kultivovány na speciálně připravených médiích.
- Optimální teplota pro růst je 43-45 °C.
- Generační doba je 7,1 min při teplotě 33-49 °C. Neroste pod 15 °C.
- pH pro růst je v rozmezí 5-9,0, může přežívat a růst v prostředí 4-6% NaCl



Clostridium perfringens

- Pro svůj růst potřebují 12 různých aminokyselin a vitamínů → velmi dobře roste v mase a masných výrobcích.
- Maso a drůbež jsou obecně považovány za nejčastější zdroj nákazy

Kontaminace - během porážky prostřednictvím kontaminovaného povrchu nebo kontaktu jatečně upravených těl s feces

- **Prevalence** ve vepřovém (0 – 38 %), hovězím (5 – 17 %) a drůbežím (13 – 31 %) mase – studie se různí
- Vysoké teploty při tepelném opracování inaktivují vegetativní buňky , ale spory mohou přežít a za vhodných podmínek vyklíčit a produkovat toxiny – ohrozit zdraví konzumentů

Clostridium perfringens - toxiny

- Produkuje 14 různých toxinů → rozlišujeme **5 typů (A až E)** na základě produkce enterotoxinu a 4 typů extracelulárních toxinů: alpha, beta, epsilon, iota – **zastaralé rozdělení!**

Nové studie uvádí:

- Schopen produkovat 20 různých toxinů a extracelulárních enzymů.
- Na základě produkce šesti hlavních toxinů, alfa (CPA), beta (CPB), epsilon (ETX), jota (ETX), enterotoxinu (CPE) a nekrotického enteritis- β -like toxinu (NetB), se dělí na **7 toxinotypů (A až G)**
- Všechny 7 produkuje CPA – umístěný na chromozomu.

Rood, J.I.; Adams, V.; Lacey, J.; Lyras, D. et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*. 2018, 53, 5-10.

The 2018 *C. perfringens* toxin-based typing scheme.^a

Toxinotype	α -toxin (<i>plc</i> or <i>cpa</i>)	β -toxin (<i>cpb</i>)	ϵ -toxin (<i>etx</i>)	ι -toxin (<i>iap</i> and <i>ibp</i>)	CPE (<i>cpe</i>)	NetB (<i>netB</i>)
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	$\pm$	-
D	+	-	+	-	$\pm$	-
E	+	-	-	+	$\pm$	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

^a The names of toxin structural genes are shown in parentheses.

Clostridium perfringens - toxiny

- Každý specifický toxinotyp je spojen s určitými nemocemi.
- **Typ A** je často zodpovědný za myonekrózu, enterokolitidu u prasat a koní nebo nekrotickou enteritidou u kuřat
- **Typ B** se podílí na vzniku úplavice, enteritidy u zvířat.
- **Typ C** je původcem nekrotické enteritidy u lidí a zvířat.
- **Typ D** je spojován s pulzním onemocněním ledvin u lidí
- **Typ E** je znám jako původce enteritidy u zvířat
- **Typ F** je zodpovědný za alimentární onemocnění
- **Typ G** je považován za hlavní příčinu nekrotické enteritidy u drůbeže

Typizace toxinů izolovaných kmenů *C. perfringens* je proto nezbytná k určení potenciální nebezpečnosti těchto izolátů a k identifikaci zdroje kontaminace v různých fázích výroby potravin.

Clostridium perfringens typu F

- *C. perfringens* **typu F** se dříve nazývaly **CPE pozitivní kmeny *C. perfringens* typu A**.
- Jsou definovány jako izoláty, které nesou gen pro **α -toxin** a **gen *cpe***
- Při sporulaci produkují enterotoxin (CPE)
- Bylo prokázáno, že tyto kmeny jsou zodpovědné za alimentární onemocnění

ENTEROTOXIN

- Termolabilní toxin inaktivovaný při 60 °C /10 minut
- Citlivý na kyselé pH, ale **rezistentní k trávicím enzymům** (trypsin a chymotrypsin)
 - Po kontaktu se střevními proteázami přechází na formu z vyšší biologickou aktivitou

Přítomnost genů zodpovědných za produkci CPE u *C. perfringens* izolovaných z potravin se ve studiích z posledních let vyskytují jen velmi zřídka – nejčastější je přítomnost toxinotypu A (pouze α -toxin), ale upozorňuje se na velmi častou přítomnost genů zodpovědných za rezistenci k antibiotikům.

Clostridium perfringens typu F

Vznik alimentárního onemocnění

- Po konzumaci velkého množství enterotoxin-produkujících vegetativních buněk (10^8 buněk)
- Vegetativní buňky, které přežijí kyselost žaludku → střevo → lýza mateřských buněk → uvolnění spor a současně také enterotoxinu (CPE)
- CPE přeměněn trypsinem a chymotrypsinem na aktivnější toxin → váže se na receptory přítomné na membráně střevních epitelálních buněk.
- Dochází k poškození membrán enterocytů → narušení resorpční schopnosti epitelu tenkého střeva, voda se nevstřebává a vznikají průjmy
- K tomu dochází několik hodin po konzumaci kontaminovaných potravin (**6 – 12 hodin**)

Potraviny spojované s onemocněním

- Potraviny bohaté na bílkoviny
 - Maso hovězí, vepřové, drůbež
 - Omáčka
 - Ryby a rybí výrobky zředka

Clostridium perfringens typu F

Rizikové faktory

- Toxoinfekce *C. perfringens* jsou běžně spojovány s pokrmy z provozoven hromadného stravování (pečovatelské domy, školy a podobná zařízení).
- Ohniska nákazy jsou důsledkem **pomalého chlazení** nebo skladování bez chlazení
- Nízký počet **spor *C. perfringens*** často přežívá vaření → pomalé chlazení a skladování pokrmů v nechlazených prostorách → klíčení spor a množení vegetativních buněk na úroveň, která způsobuje otravu z potravin.
- Větší množství potravin, velké kusy masa a velké nádoby s polévkou se obtížně rychle chladí.

Rizikovými faktory jsou proto rychlost chlazení a teplota skladování.

- **Prevence**: adekvátní tepelné opracování, udržování při teplotách ≥ 60 °C, rychlé chlazení

Clostridium perfringens

Enterotoxikóza

- Akutní střevní onemocnění, vyvolané enterotoxiny
- Onemocnění bylo poprvé popsáno v roce 1943 v Anglii.
- Tvoří až 15 % všech enterotoxikóz

Průběh

- Charakterizované náhlým vznikem břišních bolestí, nevolností a průjmem.
- Zvracení a horečka obvykle chybějí.
- Celkem jde o mírný klinický průběh s krátkým trváním: 12 – 24 hodin.
 - Pacienti nenavštíví lékaře → zaznamenaný počet nákaz je podhodnocený
 - Smrtelné případy ojediněle (staří lidé, v kombinaci s jiným onemocněním)
- Inkubační doba: 6 - 12 hodin

Detekce *Clostridium perfringens* v potravinách

Kultivační metoda

ISO 7937:2004

- Tryptone-sulphite-cycloserine agar (TSC agar) při 37 °C/48 hodin za anaerobních podmínek.

Identifikace suspektních kolonií

- Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS
- Multiplex PCR
 - Typizace izolátů na základě detekce genů kódující produkci toxinů

Vyhláška č. 121/2023 Sb. O požadavcích na pokrmu → limit < 10³ KTJ/g (ml)

The European Union One Health 2023 Zoonoses Report

Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) prezentuje **výsledky monitoringu zoonóz** prováděného ve **27 členských státech, Velké Británii a 11 ne-členských státech EU**

Zaznamenán velký nárůst případů onemocnění způsobených toxiny *Clostridium perfringens*

- 140 ohnisek onemocnění bylo nahlášeno 9 členskými státy
- Ve Španělsku 2 velká ohniska spadající do kategorie „strong-evidence“
 - 426 and 165 případů
 - Po konzumaci potravin z kategorie „**maso a masné výrobky**“
- „Nedostatečné chlazení“ a „nedostatečné tepelné zpracování“



The European Union One Health 2023 Zoonoses Report

2023					2019–2022			Evaluation
Rank ^a	Causative agent	Food vehicle	Cases (N)	Reporting MS (N cases)	Rank ^a	Cases (N/year) (range)	Reporting MS (N/year)	2023 vs 2019–2022 ^b
1	<i>Salmonella</i>	Eggs and egg products ^c	1101	Spain (336), Hungary (312), Netherlands (156), Poland (154), Sweden (82), Slovakia (20), Austria (19), Czechia (12), France (4), Italy (2), Lithuania (2), Malta (2)	1	630.3 (303–1307)	8.3	↑↑
2	<i>Salmonella</i>	Mixed foods ^d	839	Spain (211), Czechia (180), Poland (156), Slovakia (112), Hungary (52), Romania (50), Germany (42), Italy (16), Estonia (14), France (6)	2	604.5 (91–1595)	7.0	↑
3	Norovirus and other calicivirus	Water ^e	751	Spain (650), Finland (62), Greece (39)	5	355.0 (8–984)	2.8	↑↑
4	<i>Clostridium perfringens</i> toxins	Meat and meat products, unspecified	616	Spain (616)	16	148.0 (23–368)	2.0	↑↑
5	Norovirus and other calicivirus	Dairy products (other than cheeses) ^f	603	Germany (603)	48	30.5 (0–122)	0.50	↑↑
6	<i>Cryptosporidium</i>	Water ^g	569	Spain (569)	67	18.3 (0–73)	0.25	↑↑
7	Norovirus and other calicivirus	Crustaceans, shellfish, molluscs and products thereof ^h	414	Finland (150), France (120), Denmark (100), Sweden (22), Belgium (14), Spain (8)	3	521.8 (147–1152)	5.5	–
8	<i>Salmonella</i>	Broiler meat (<i>Gallus gallus</i>) and products thereof ⁱ	359	Greece (69), Hungary (56), Austria (54), Spain (49), France (46), Denmark (28), Lithuania (23), Romania (19), Slovakia (9), Poland (6)	19	100.8 (16–240)	5.3	↑↑
9	<i>Staphylococcus aureus</i> toxins	Mixed foods ^j	358	Portugal (172), Slovakia (60), Romania (34), Spain (33), Czechia (30), France (12), Poland (11), Hungary (6)	13	189.8 (3–466)	3.5	↑↑
10	Norovirus and other calicivirus	Mixed foods	335	Spain (148), Finland (130), Denmark (42), Belgium (15)	6	354.8 (223–487)	5.5	–

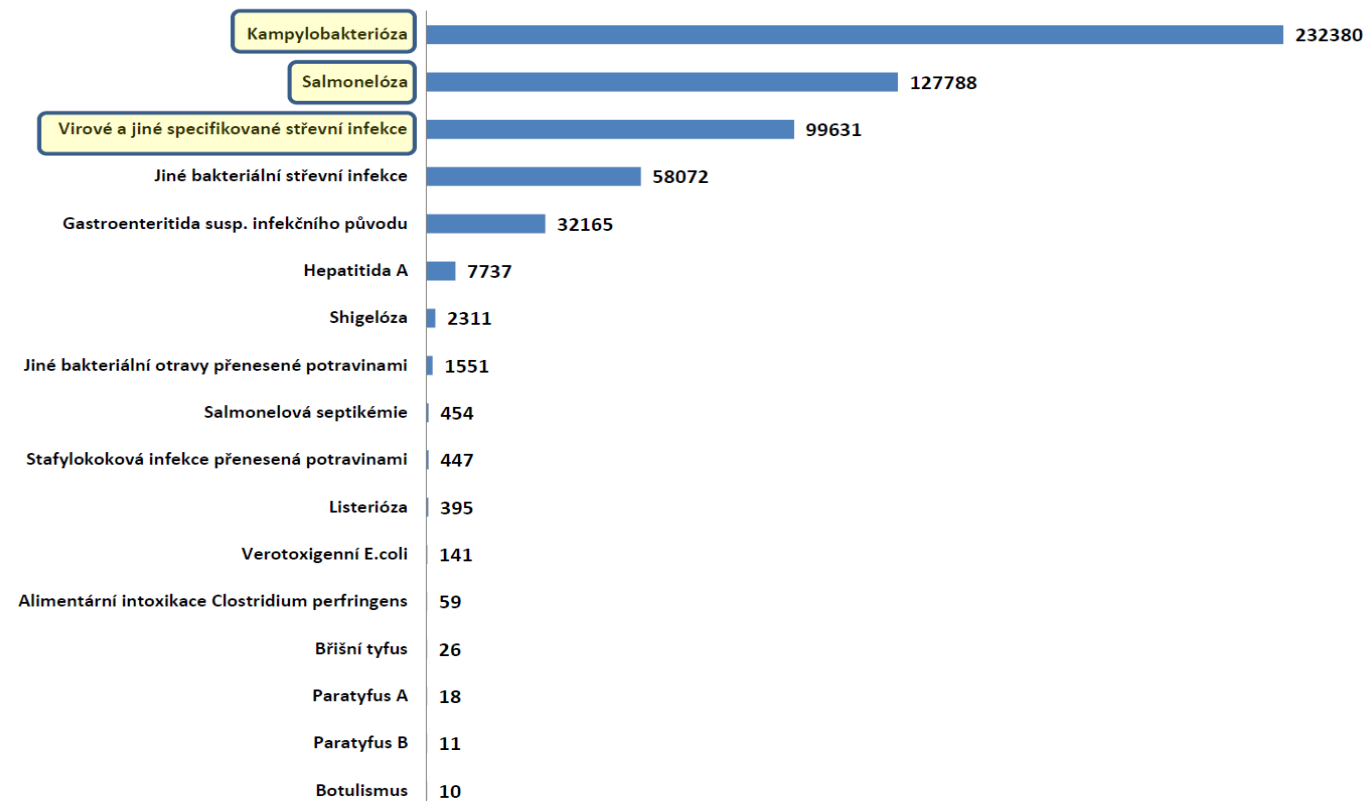
TABLE 53 Number of foodborne outbreaks, human cases, hospitalisations and deaths, by causative agent, in reporting EU MSs, 2022.

Type of agent		Outbreaks				Cases of illness					
		Total (strong-evidence)		Reporting rate per 100,000		Human cases		Mean outbreak size (cases) and range (min-max)	Hospitalisations		Deaths
									N	% of cases ^d	N
		N	% of total	2022 ^b	2018-2021 ^{b,c}	N	% of total		N		N
Bacteria	<i>Aeromonas</i>	2 (1)	0.03	< 0.01	< 0.01	8	0.02	4.0 (3–5)	1	12.5	0
	<i>Campylobacter</i>	255 (16)	4.4	0.06	0.08	1097	2.3	4.3 (2–32)	83	7.6	0
	<i>Enterococcus</i>	1 (0)	0.02	< 0.01	< 0.01	6	0.01	6.0 (–)	1	16.7	0
	<i>Escherichia coli</i> other than STEC	15 (5)	0.26	< 0.01	< 0.01	513	1.1	34.2 (2–123)	4	0.78	1
	<i>Listeria monocytogenes</i> ^e	35 (17)	0.61	0.01	< 0.01	296	0.61	8.5 (1–97)	242	81.8	28
	<i>Salmonella</i> ^f	1014 (200)	17.6	0.23	0.22	6632	13.6	6.5 (1–138)	1406	21.2	8
	Shiga toxin-producing <i>E. coli</i> (STEC) ^g	71 (1)	1.2	0.02	0.01	408	0.84	5.9 (2–45)	63	15.4	1
	<i>Shigella</i>	27 (2)	0.47	0.01	< 0.01	204	0.42	7.6 (2–47)	17	8.3	0
	<i>Streptococcus equi</i>	1 (1)	0.02	< 0.01	0	37	0.08	37.0 (–)	23	62.2	5
	<i>Vibrio cholerae</i> (non-toxigenic)	1 (1)	0.02	< 0.01	< 0.01	4	0.01	4.0 (–)	1	25.0	0
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	8 (2)	0.14	< 0.01	< 0.01	113	0.23	14.1 (2–78)	2	1.8	0
	<i>Yersinia</i>	14 (0)	0.24	< 0.01	< 0.01	96	0.20	6.9 (2–23)	4	4.2	0
	Subtotal ^{h,g}	1444 (246)	25.1	0.32	0.33	9414	19.4	6.5 (1–138)	1847	19.6	43
Bacterial toxins	<i>Bacillus cereus</i> toxins	306 (15)	5.3	0.07	0.02	3192	6.6	10.4 (2–383)	66	2.1	2
	<i>Clostridium botulinum</i> toxins	7 (2)	0.12	< 0.01	< 0.01	20	0.04	2.9 (2–5)	10	50.0	0
	<i>Clostridium perfringens</i> toxins	55 (22)	0.95	0.01	0.01	2897	6.0	52.7 (2–950)	11	0.38	3
	<i>Staphylococcus aureus</i> toxins	137 (38)	2.4	0.03	0.02	2199	4.5	16.1 (2–119)	148	6.7	4
	Bacterial toxins, unspecified	636 (2)	11.0	0.14	0.11	5594	11.5	8.8 (2–139)	181	3.2	2
	Subtotal	1141 (79)	19.8	0.25	0.16	13,902	28.6	12.2 (2–950)	416	3.0	11

Type of agent		Outbreaks				Cases of illness						
		Total (strong-evidence)		Reporting rate per 100,000		Human cases			Hospitalisations		Deaths	
		N	% of total ^a	2023	2019–2022	N	% of total ^a	Mean outbreak size (cases) and range (min-max)	N	% of cases ^b	N	% of cases ^b
Bacteria	<i>Campylobacter</i>	229 (27)	4.0	0.05	0.07	1174	2.3	5.1 (2–112)	90	7.7	0	0
	<i>Escherichia coli</i> other than STEC ^c	20 (6)	0.35	<0.01	<0.01	683	1.3	34.2 (2–197)	3	0.44	0	0
	<i>Listeria monocytogenes</i>	19 (8)	0.33	<0.01	0.01	133	0.26	7.0 (2–38)	84	63.2	11	8.3
	<i>Mycobacterium</i> spp.	1 (0)	0.02	<0.01	0	3	0.01	3.0 (–)	0	0	0	0
	<i>Salmonella</i>	1115 (258)	19.6	0.25	0.20	9210	17.7	8.3 (1–300)	1726	18.7	16	0.17
	Shiga toxin-producing <i>E. coli</i> (STEC)	66 (6)	1.2	0.01	0.01	270	0.52	4.1 (2–36)	48	17.8	1	0.37
	<i>Shigella</i>	24 (2)	0.42	0.01	<0.01	123	0.24	5.1 (2–24)	24	19.5	0	0
	<i>Vibrio cholerae</i> (toxigenic)	1 (0)	0.02	<0.01	0	3	0.01	3.0 (–)	0	0	0	0
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	9 (1)	0.16	<0.01	<0.01	43	0.08	4.8 (2–14)	8	18.6	0	0
	<i>Yersinia</i>	17 (2)	0.3	<0.01	<0.01	73	0.14	4.3 (2–20)	9	12.3	0	0
Subtotal		1501 (310)	26.4	0.33	0.30	11,715	22.5	7.8 (1–300)	1992	17.0	28	0.24
Bacterial toxins	<i>Bacillus cereus</i> toxins	474 (19)	8.3	0.11	0.03	4665	8.9	9.8 (2–251)	101	2.2	4	0.09
	<i>Clostridium botulinum</i> toxins	5 (3)	0.09	<0.01	<0.01	14	0.03	2.8 (2–4)	10	71.4	1	7.1
	<i>Clostridium perfringens</i> toxins	140 (30)	2.5	0.03	0.01	3342	6.4	23.9 (2–426)	20	0.60	8	0.24
	<i>Staphylococcus aureus</i> toxins	207 (32)	3.6	0.05	0.02	2268	4.4	11.0 (2–123)	113	5.0	1	0.04
	Bacterial toxins, unspecified	67 (4)	1.2	0.01	0.12	372	0.71	5.6 (2–43)	6	1.6	0	0
	Subtotal	893 (88)	15.7	0.20	0.18	10,661	20.5	11.9 (2–426)	250	2.3	14	0.13

Situace v ČR

Počet případů onemocnění na dané alimentární onemocnění
v ČR v letech 2007-2017, EPIDAT



Situace v ČR

Výskyt vybraných hlášených infekcí v České republice, leden - prosinec 2023

porovnání se stejným obdobím v letech 2014-2022 (počet případů)

Cases of selected infectious diseases in the Czech Republic, January - December 2023

compared with the corresponding period of preceding years 2014-2022 (number of cases)

Zdroj: Epidat 2014-2017 - dle data hlášení; ISIN 2018-2023 - dle data vykazání

Předběžná data ke dni 1.1.2024

Kód	Diagnóza	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
A00	Cholera	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
A01	Tyfus a paratyfus	6	3	2	6	0	6	1	1	2	4
A02	Salmonelóza	13 633	12 739	11 912	11 779	11 346	13 306	10 363	10 076	7 680	7 706
A03	Shigelóza	92	88	70	168	145	134	73	41	120	168
A04 †)	Jiné bakteriální střevní inf.	6 763	8 146	7 563	7 371	8 128	8 139	6 013	7 741	8 490	7 338
A04.3	Infekce vyvolané STEC/VTEC	28	20	28	36	29	34	31	46	74	57
A04.5	Kampylobakteriόza	20 903	21 102	24 291	24 508	23 778	23 169	17 786	16 382	14 488	13 632
A05	Alimentární intoxikace	178	794	127	3	237	38	60	59	12	63
z toho A05.1	Botulismus	1	1	0	1	0	0	0	0	2	0
A06	Amébiόza	16	9	21	4	4	15	2	3	14	16
A07.1	Giardiόza	42	33	45	28	42	51	21	14	23	37
A07.2	Kryptosporidiόza	1	2	2	5	6	13	3	2	10	16
A07.8	Jiné protozoární střevní onem.	12	1	5	3	5	33	12	4	11	56
A08	Virové střevní infekce	9 438	18 858	9 491	9 986	9 693	12 056	4 064	4 681	13 224	7 418
A09	Gastroenteritida susp.infekční	2 843	3 229	2 991	2 270	2 449	2 238	406	731	1 043	1 197
A21	Tularémie	49	59	59	51	34	102	70	52	46	50

Germinace a růst *Clostridium perfringens* v teplých pokrmech

Příprava pokrmů

Hovězí burger

- hovězí maso, sůl
- konvektomat – gril (71 °C)



Rybí filé

- aljašská treska, sůl, máslo
- pečení při 200 °C
- dle receptu Runštuk et al. (2015)



Další chystané pokrmy: kuřecí steak, vepřové sous-vide

Kontaminace pokrmu suspenzí spor *Clostridium perfringens*

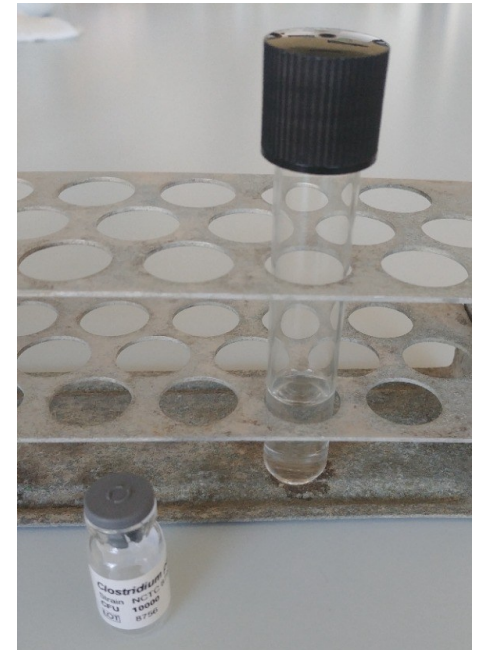
Vzhledem k neuspokojivým výsledkům při přípravě sporové suspenze → využita komerční směs spor BIOBALL (výrobce BioMerieux, distribuce O.K. SERVIS BioPro)

- Referenční kmeny z kategorie BIOBALL se vyrábí v několika variantách podle počtu KTJ v 1 kuličce
- Highdose 10K s obsahem 10.000 CFU v 1 kuličce (8.000-12.000 KTJ v 1 kuličce)

***Clostridium perfringens* NCTC 8798**

Pokrmu kontaminovány suspenzí spor na hladinu 40 spor/g pokrmu

Aktivace spor v kontaminovaných pokrmech proběhla tepelným záhřevem (80 °C/15 min)



Balení kontaminovaných pokrmů

Vzorky pokrmu vloženy do polypropylenových misek a zabaleny

- bez výměny atmosféry na baliče T-190 (MetalPack, dodavatel Maso-profit, s.r.o., Praha)
- s horní folií PET/PP 185 mm (síla 52 μm ; dodavatel Maso-profit s.r.o.)
- svařovací teplotou 180 °C

Temperování v termostatech na teploty 40; 50 a 60 °C a skladování v těchto teplotách



Odběry vzorků k mikrobiologickému vyšetření

V průběhu 4 h odebírány jednotlivé vzorky a sledována růstová aktivita *Clostridium perfringens*.

Vzorky odebrány bezprostředně po zabalení a dále po 1,0; 2,0; 2,5; 3,0 a 4,0 h z nastavených teplot.

Paralelně byla vyšetřena také nezaočkovaná kontrola daného pokrmu.

Mikrobiální analýzy

Stanoven počet *Clostridium perfringens*, celkový počet mikroorganismů (CPM) a počet bakterií *Escherichia coli*

- do sterilních homogenizačních sáčků naváženo 25 g vzorku a naředěno v poměru 1:9 pufrovanou peptonovou vodou
- Tryptone-sulphite-cycloserine agar (TSC agar; OXOID, UK) podle ISO 7937:2004 při 37 °C/48 h/anaerobně

Fyzikálně chemické analýzy

Hodnota pH byla měřena ve vodném roztoku vzorku (1:10) pomocí kombinované elektrody a pH metru 211 (Hanna Instruments, USA) při teplotě 25 ± 1 °C.

Aktivita vody (aw) byla stanovena v dobře homogenizovaném vzorku pomocí LabMaster aw-metru (Novasina AG, Švýcarsko) při teplotě $25,0 \pm 0,1$ °C.

Obsah sodíku byl stanoven atomovou absorpční spektrometrií

pH pro růst je v rozmezí 5-9,0 (6-7)

Může přežívat a růst v prostředí 4-6% NaCl.

Minimální hodnota aw pro růst 0,95-0,97

Hodnoty pH, vodní aktivity a podíly soli v připravených teplých pokrmech

Pokrm	pH	aw	NaCl (%)
Burgr	$6,06 \pm 0,22$	$0,966 \pm 0,017$	$1,39 \pm 0,06$
Filé	$6,61 \pm 0,09$	$0,977 \pm 0,003$	$1,31 \pm 0,08$

Germinace a růst *Clostridium perfringens* v teplých pokrmech

Hovězí burger

Růst *Clostridium perfringens* po umělé kontaminaci teplých pokrmů při 40, 50 a 60 °C po dobu 0–4 hodin (průměrné hodnoty v log KTJ/g)

teplota	kmen	0 h	1 h	2 h	2,5 h	3 h	4 h
40	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	2,0	3,2	5,9
50	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	2,2	<1,7	2,5	2,7	2,8	3,8
60	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7

Germinace a růst *Clostridium perfringens* v teplých pokrmech

Hovězí burger

Růst *Clostridium perfringens* po umělé kontaminaci teplých pokrmů při 40, 50 a 60 °C po dobu 0–4 hodin (průměrné hodnoty v log KTJ/g)

teplota	kmen	0 h	1 h	2 h	2,5 h	3 h	4 h
40	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	2,0	3,2	5,9
50	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	2,2	<1,7	2,5	2,7	2,8	3,8
60	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7

Germinace a růst *Clostridium perfringens* v teplých pokrmech

Hovězí burger

Růst *Clostridium perfringens* po umělé kontaminaci teplých pokrmů při 40, 50 a 60 °C po dobu 0–4 hodin (průměrné hodnoty v log KTJ/g)

teplota	kmen	0 h	1 h	2 h	2,5 h	3 h	4 h
40	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	2,0	3,2	5,9
50	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	2,5	2,7	2,8	3,8
60	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7

Germinace a růst *Clostridium perfringens* v teplých pokrmech

Hovězí burger

Růst *Clostridium perfringens* po umělé kontaminaci teplých pokrmů při 40, 50 a 60 °C po dobu 0–4 hodin (průměrné hodnoty v log KTJ/g)

teplota	kmen	0 h	1 h	2 h	2,5 h	3 h	4 h
40	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	2,0	3,2	5,9
50	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	2,2	<1,7	2,5	2,7	2,8	3,8
60	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7

Germinace a růst *Clostridium perfringens* v teplých pokrmech

Rybí filé

Růst *Clostridium perfringens* po umělé kontaminaci teplých pokrmů při 40, 50 a 60 °C po dobu 0–4 hodin (průměrné hodnoty v log KTJ/g)

teplota	kmen	0 h	1 h	2 h	2,5 h	3 h	4 h
40	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	2,8	3,0
50	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	2,7	3,0	2,3
60	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7

Germinace a růst *Clostridium perfringens* v teplých pokrmech

Rybí filé

Růst *Clostridium perfringens* po umělé kontaminaci teplých pokrmů při 40, 50 a 60 °C po dobu 0–4 hodin (průměrné hodnoty v log KTJ/g)

teplota	kmen	0 h	1 h	2 h	2,5 h	3 h	4 h
40	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	2,8	3,0
50	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	2,7	3,0	2,3
60	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7

Germinace a růst *Clostridium perfringens* v teplých pokrmech

Rybí filé

Růst *Clostridium perfringens* po umělé kontaminaci teplých pokrmů při 40, 50 a 60 °C po dobu 0–4 hodin (průměrné hodnoty v log KTJ/g)

teplota	kmen	0 h	1 h	2 h	2,5 h	3 h	4 h
40	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	2,8	3,0
50	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	2,7	3,0	2,3
60	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7

Germinace a růst *Clostridium perfringens* v teplých pokrmech

Rybí filé

Růst *Clostridium perfringens* po umělé kontaminaci teplých pokrmů při 40, 50 a 60 °C po dobu 0–4 hodin (průměrné hodnoty v log KTJ/g)

teplota	kmen	0 h	1 h	2 h	2,5 h	3 h	4 h
40	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	2,8	3,0
50	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	2,7	3,0	2,3
60	kontrola	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	NCTC 8798	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7

Závěry

- ❑ Důležité dělat pokusy v reálných vzorcích a ne jen in vitro
 - zkouška inokula X odběr vzorku v 0 h
- ❑ Teplota pokrmu **60 °C je nevhodná pro germinaci a růst *Clostridium perfringens***
- ❑ Při teplotě 50 °C vyklíčily spory dříve než ve 40 °C v obou testovaných pokrmech
- ❑ Při teplotě 40 a 50 °C spory vyklíčily, ale až po minimálně 2 hodinách
- ❑ Je zásadní, aby byl pokrm **ihned zkonzumován nebo rychle zchlazen!**

Děkuji za pozornost

Prezentace vznikla s podporou projektu Ministerstva zemědělství NAZV QK23020061