Výskyt *Bacillus cereus* v sušených houbách: riziko produkce emetického toxinu během rehydratace?





Ing. Hana Sýkorová, Ph.D.

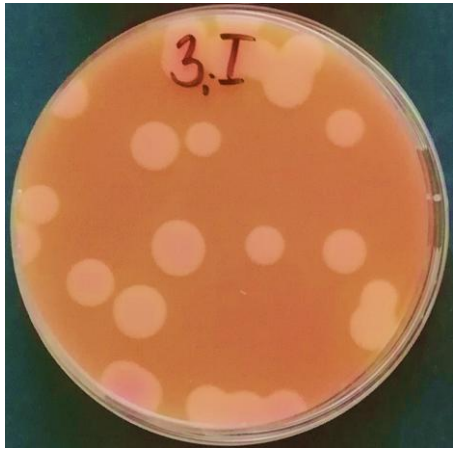
Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

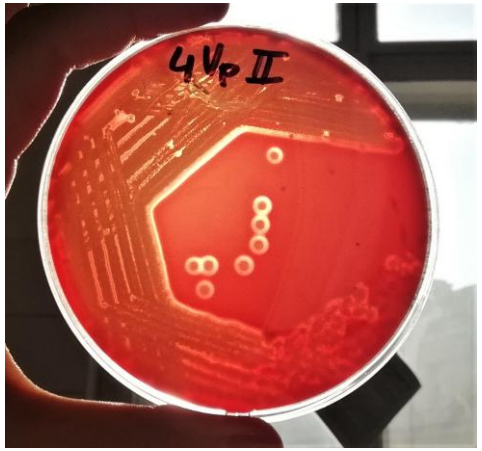
Data získána v rámci provedení experimentální studie pro SZPI

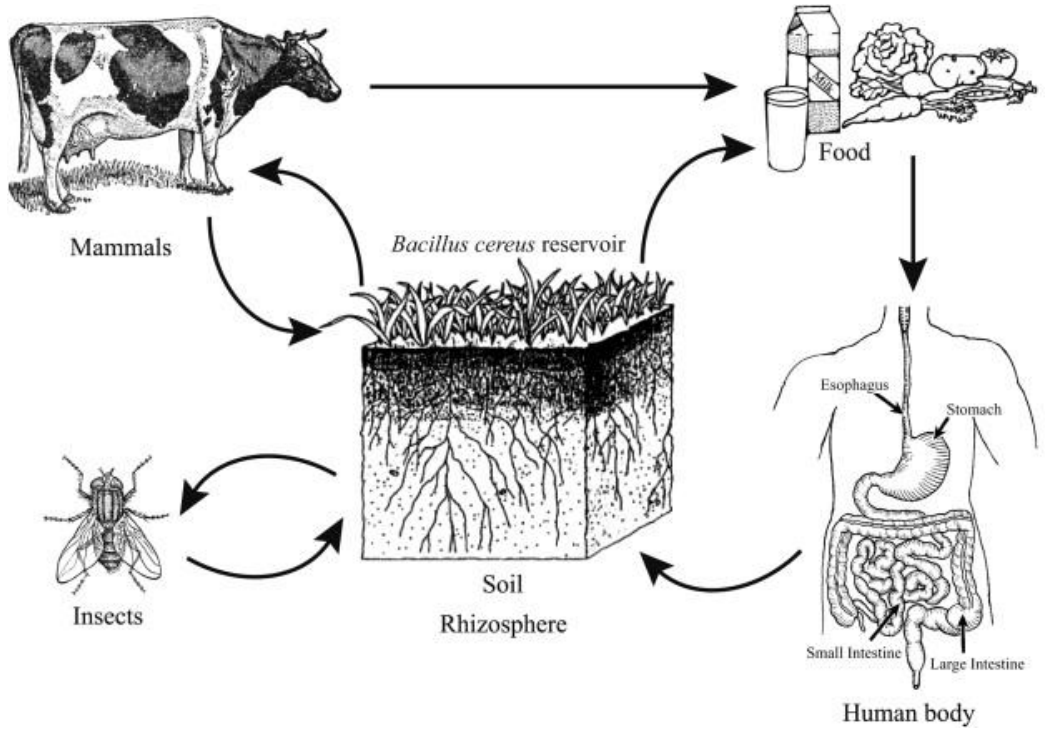
B. cereus - charakteristika

- G+ tyčinka
- Tvorba endospor
- Běžný výskyt
- Produkce enzymů
- Produkce toxinů
- MYP, krevní agar









https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0740002010000572-gr1.jpg

- běžně v půdě, prachu i ve vodě
- efektivní šíření životním prostředím
- častá kontaminace mléka, masa a potravin rostlinného původu
- perzistence v široké škále potravinářských komodit, včetně tepelně zpracovaných a sušených potravin

Toxiny *B. cereus*



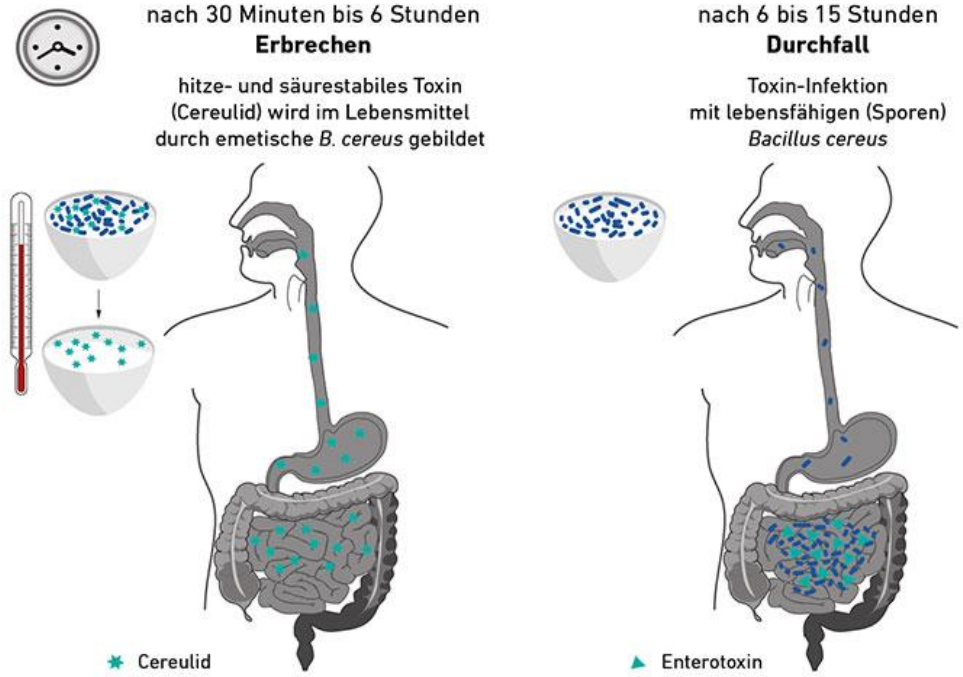
Diarhogenní toxiny (Hbl, Nhe a CytK)

- teplotně labilní, snadná se inaktivace
- vysoká citlivost vůči proteázám i nízkému pH
- mohou být syntetizovány i přímo v potravině - v této formě intoxikaci nevyvolávají
- klinický význam - syntéza toxinů *in situ* ve střevě hostitele (enterotoxiny)
- asociace obvykle s masnými výrobky



Emetický toxin – cereulid

- cyklický peptid
- vysoká termostabilita a odolnost vůči pH i účinkům trávicích enzymů
- produkován přímo v potravině
- Po konzumaci nepoškozený trávicím traktem a vyvolá nevolnost a zvracení typicky v krátké inkubační době 0,5–5 hodin.
- minimální množství 2–6 µg/g potraviny
- asociace nejčastěji s potravinami bohatými na škrob (vařená rýže, těstoviny či brambory)

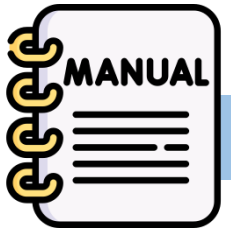


https://www.biofocus.de/fileadmin/Biofocus/Lebensmittel/bacillus-cereus-toxintypen.jpg

Cíle studie

„Zmapovat **výskyt *Bacillus cereus* v sušených houbách** dostupných na českém trhu a komplexně posoudit jejich potenciální zdravotní rizika, zejména s ohledem na možnou **přítomnost emetického toxinu** cereulidu a jeho produkci **v průběhu rehydratace**.“

- mikrobiologická analýza **30 vzorků** sušených hub dostupných na českém trhu
- hodnocení **četnosti výskytu a míry kontaminace** *B. cereus* ve vzorcích
- sledování dynamiky růstu *B. cereus* v závislosti na době a teplotě **rehydratace**
- molekulární **detekce genu** zodpovědného za produkci emetického toxinu (***ces***)
- **analytické stanovení koncentrace cereulidu** ve vzorcích



návrh doporučení pro zajištění bezpečnosti potravin při používání sušených hub v běžné kuchyňské praxi

Co se dozvíme z literatury

Výskyt *B. cereus* ve vzorcích hub a prevalence emetických kmenů

Počet analyzovaných vzorků	Počet vzorků s potvrzeným výskytem *B. cereus*	počet izolátů pro genovou analýzu	výskyt kmenů s genem *ces*	Citace
61 (sušené houby)	36 (tj. 59 %)	42	**0**	(Ludewig a kol., 2024)
135 (sušené houby)	110 (tj. 81 %)	neuvedeno	**11 vzorků** (tj. 8 % při přepočtu na celkový počet vzorků; 10 % při přepočtu na počet vzorků s potvrzeným *B. cereus*)	(Messelhäusser a kol., 2014)
699 (čerstvé houby)	198 (tj. 28 %)	247	**7 izolátů** (tj. 3 % z celkového počtu testovaných izolátů)	(Liu a kol., 2020)

- Jen 3 relevantní studie
- Výskyt BC běžný
- Potvrzení *ces* minoritně
- Nikde data k rehydrataci

Vzorky hub

30 vzorků balených sušených hub (kamenné i online obchody):

- **21 jednodruhových vzorků**, pokryly spektrum **10 druhů hub**: shiitake (5x), Jidášovo ucho (4x), hřib smrkový (3x), liška obecná (2x), stroček trubkovitý (2x), hlíva ústřičná (1x), smrž kuželovitý (1x), liška žlutavá (1x), korálovec ježatý (1x), maitake (1x).
- **Původ jednodruhových vzorků**: Česká republika (6 vzorků), Čína (6 vzorků), Slovensko (2 vzorky), Francie (1 vzorek), země EU bez bližší specifikace (2 vzorky). U čtyř vzorků nebyla země původu uvedena.
- **9 směsných vzorků**, v nichž převažovaly především hřibovité houby (hřib smrkový/hnědý/kovář, křemenáč osikový/březový, kozák, klouzek), často doplněné o lišky, žampiony či stroček. Jeden ze směsných vzorků byl v mleté formě.
- **Původ směsných vzorků**: ČR (3 vzorky), u jednoho vzorku nebyl původ uveden. U pěti směsných vzorků byly země původu detailně specifikovány pro jednotlivé druhy hub: Polsko (hřib hnědý, křemenáč, kozák, žampion), Čína (hlíva ústřičná, hřib smrkový, shiitake), Peru (klouzek obecný), Ukrajina (kozák), ČR (žampion zahradní).
- Do studie bylo zahrnuto **9 různých výrobců**.



https://www.dtest.cz/img/thumb/120323_910fbdeade.jpg?1598613224

Výskyt *B. cereus* ve vzorcích

- ČSN EN ISO 7932/A1
- maximální hodnoty v řádu **10^2 KTJ/g ;** nejčastěji 50-150 KTJ/g*
- **Prevalence pozitivních** nálezů činila **70 %** (**21 z 30 vzorků**)
- Nejvyšší úroveň kontaminace byla zaznamenána u vzorků
  - č. 18 (stroček trubkovitý, ČR) - $7{,}0 \cdot 10^2$ KTJ/g
  - č. 27 (stroček trubkovitý, ČR) - $5{,}0 \cdot 10^2$ KTJ/g
  - č. 29 (liška žlutavá, Francie) - $5{,}0 \cdot 10^2$ KTJ/g
- Jednoznačný vztah mezi druhem hub a mírou kontaminace prokázán nebyl.
- nicméně s určitou mírou opatrnosti lze konstatovat, že **vzorky obsahující stroček trubkovitý** vykazovaly tendenci k lehce vyšším počtům KTJ/g.
- Souvislost mezi mírou kontaminace a výrobcem/dodavatelem či zemí původu nebyla potvrzena.

*** Doporučený limit 10^5 KTJ/g pro potraviny neurčené k přímé spotřebě**



https://fotky.naturatlas.cz/5/strocek-trubkovity-101.jpg

Stroček trubkovitý (*Craterellus cornucopioides*)



https://lh6.googleusercontent.com/proxy/_j2aSSumqfhV_FwG1JCD9r5PmTG2pZDQkhfIlxQWdITEMrL6fHGUpD6r4Z_7Rq57LBFGBDS4bKMBPj4wCefGgPkjbiyfip3rhgDWXDktJ1zQA_GszLzn

Liška žlutavá (*Cantharellus aurora*)

Legislativa



Nařízení ES č. 2073/2005

- mezní hodnoty pro *B. cereus* pouze u kategorie „**Sušená počáteční kojenecká výživa** a sušené dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely určené pro kojence do šesti měsíců věku“, a to na úrovni **50 KTJ/g (limit *m*) až 500 KTJ/g (limit *M*)**

Česká Vyhláška MZe ČR č. 121/2023 Sb. o požadavcích na pokrmy

- kritérium pro přítomnost *B. cereus* **v hotových pokrmech** na úrovni **< 10^3 KTJ/g**



ČSN 56 9609, která se věnuje stanovení a aplikaci **mikrobiologických kritérií v rámci celého potravinového řetězce**

nejvyšší doporučené mezní hodnoty:

- 10^5 KTJ/g (ml) pro potraviny neurčené k přímé spotřebě,
- 10^4 KTJ/g (ml) pro potraviny určené k přímé spotřebě,
- 10^2 KTJ/g (ml) pro kojeneckou a dětskou výživu.

Z hlediska komodity „sušené houby“

Kategorie „B.5.2.7.3.1 Sušená zelenina a houby, sušené ovoce“, **ČSN 56 9609 doporučuje sledování** pouze **počtů *Escherichia coli* a plísní.**

Nález ve vzorcích:
maximální hodnoty v řádu **10^2 KTJ/g ;** nejčastěji 50-150 KTJ/g

Růst během rehydratace

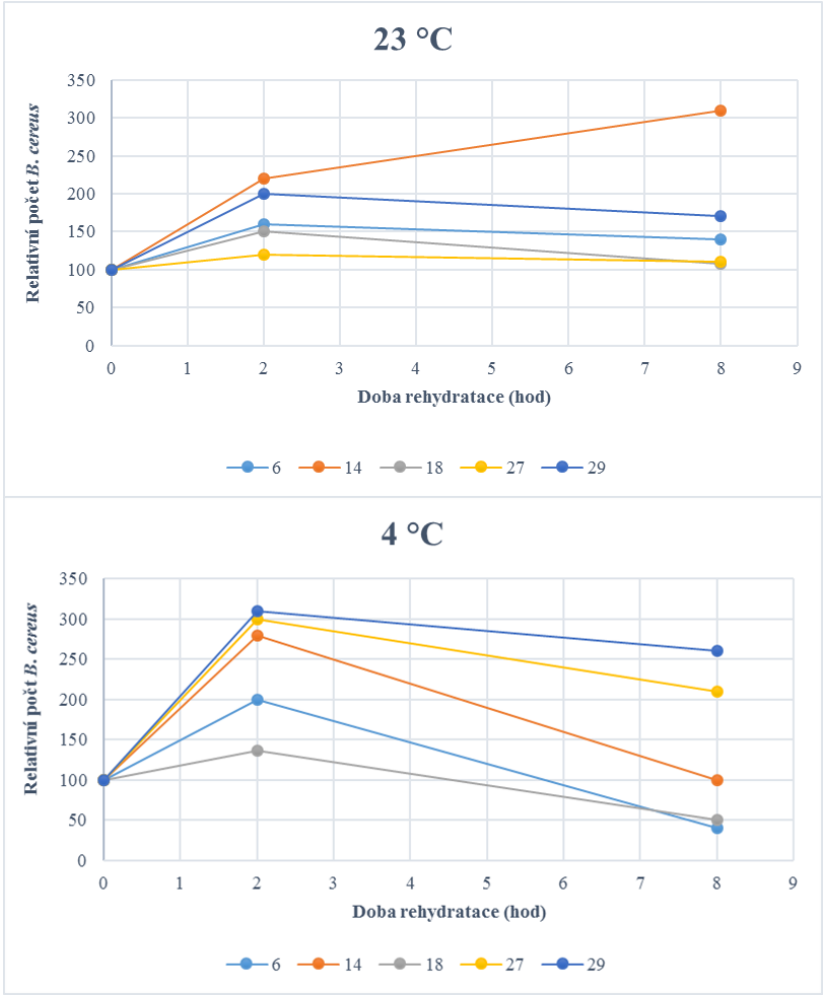
Předpoklad – rehydratace většinou ve vodě při pokojové teplotě; dochází k vyklíčení spor; **teoretické riziko produkce toxinu**

Podmínky:

- sterilní dest. voda (1+9)
- dvě teploty (pokojová a chladničková)
- dva časové intervaly (2 a 8 hodin)
- pět vzorků s nejvyšším výchozím počtem *B. cereus*
- posouzení míry klíčení a přežívání spor – odběr alikvotu, záhřev 85 °C po dobu 11 minut;
- kvantifikace dle ISO (MYP)

- **Maximální hodnota $1{,}6 \cdot 10^3$ KTJ/g**
  Vzorek č.29 (liška žlutavá), 2h, 4°C
- **Po záhřevu – ve všech případech < 50 KTJ/g**

- Nedošlo k překročení doporučeného limitu **10^5 KTJ/g** (potraviny neurčené k přímé spotřebě)
- Klíčení probíhá rychle, minimální riziko vnesení spor BC do pokrmu, vegetativní b. varem eliminovány



Relativní změna počtu *B. cereus* během rehydratace vzorků za daných podmínek. Hodnoty jsou vyjádřeny vůči výchozímu počtu v jednotlivých vzorcích (počet KTJ/g v čase T0 = 100 %).

Dynamika růstu

- mírné pomnožení po 2 h
- výraznější při 4 °C než při 23 °C
- Po 8 h zaznamenán klesající trend

? inhibiční účinek doprovodné mikroflóry, která může být při 23 °C metabolicky aktivnější?

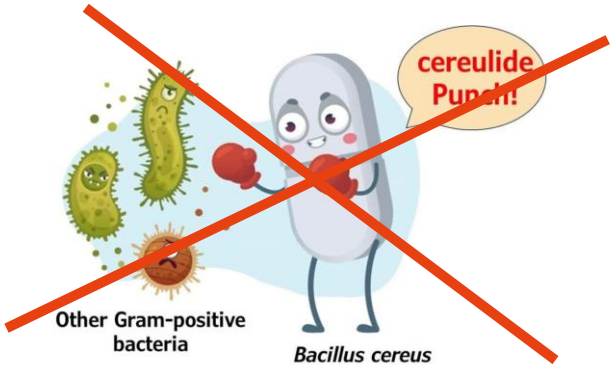
? přítomnost látek s antimikrobiálním účinkem přímo v houbách, respektive v jejich výluhu?

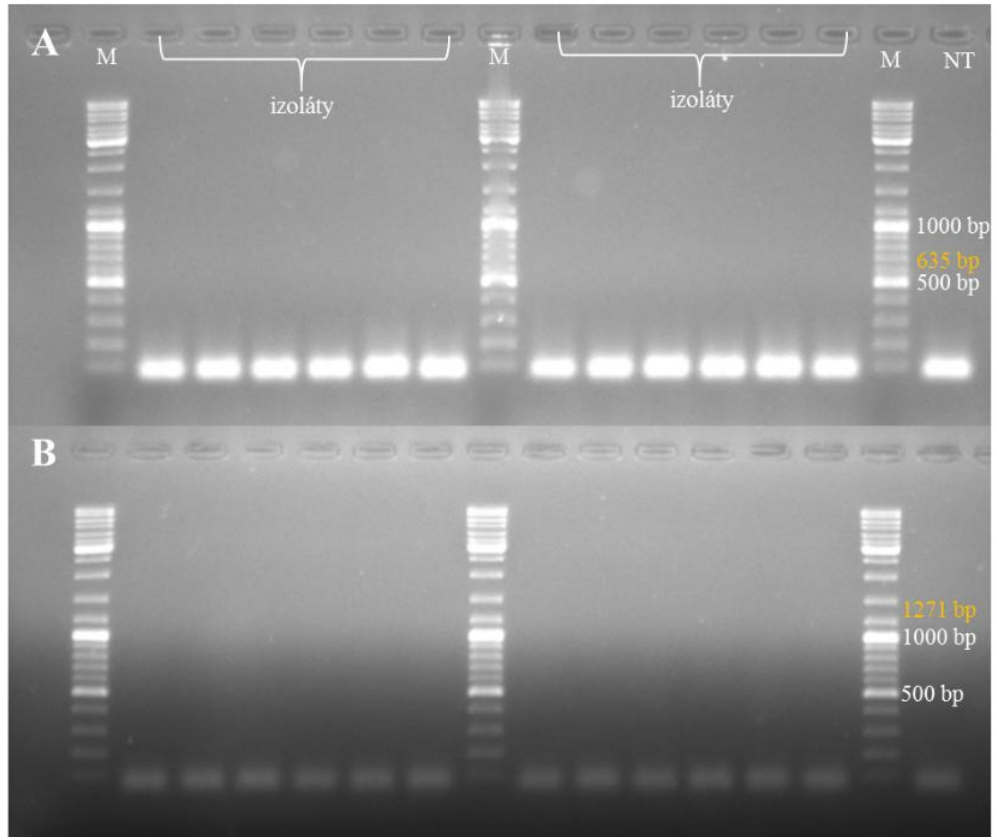
Prevalence emetických kmenů

Detekce genu *ces* (produkce cereulidu) - PCR

- **testováno 76 kolonií** izolovaných **z 21 vzorků**
- primery EM1F a EM1R - ČSN EN ISO 7932/A1
- nedostupnost referenčního kmene *B. cereus* WDCM 00219
- druhá sada primerů CESF1 a CESR2 (Ehling-Schulz a kol., 2006)

U žádného z testovaných izolátů nebyla detekována přítomnost genu *ces* pro syntézu emetického toxinu cereulidu





Ukázka gelové elektroforézy - stanovení genu *ces*.
A – varianta s primery EM1F a EM1R, velikost očekávaného produktu 635 bp
B – varianta s primery CESF1 a CESR2, velikost očekávaného produktu 1271 bp

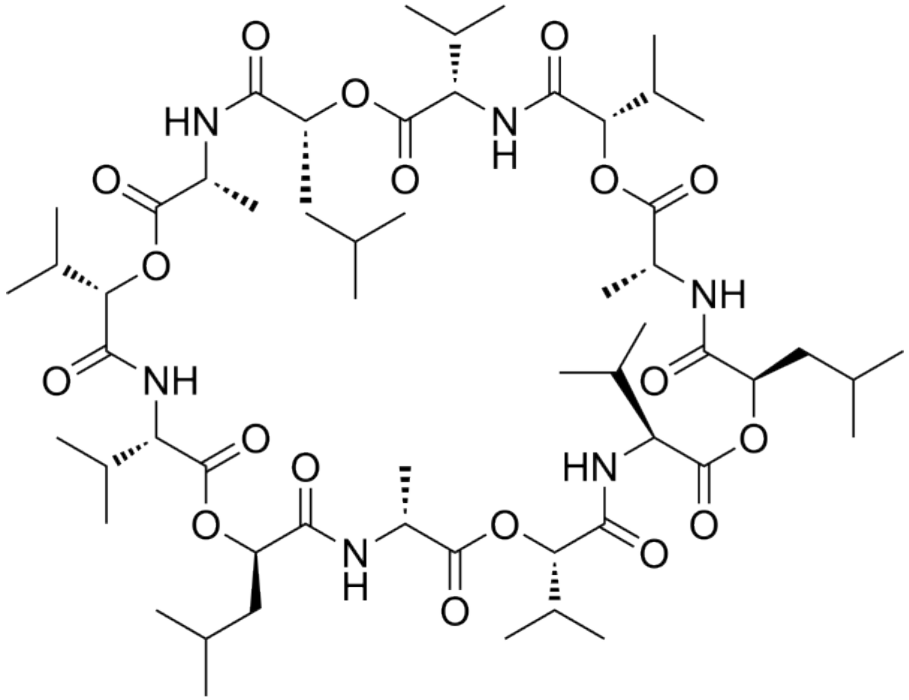
Analytické stanovení cereulidu

Metoda:

ČSN EN ISO 18465 Mikrobiologie potravinového řetězce - Kvantitativní stanovení emetického toxinu (cereulid) pomocí **LC-MS/MS**.

- vzorky s potvrzeným výskytem *B. cereus*
- suspenze všech vzorků po rehydrataci za různých podmínek
- Vzorek = pevný podíl i tekutá část (PPV nebo dest. voda); homogenizace
- Extrakce acetonitrilem

V žádné z analyzovaných suspenzí nebyl cereulid (emetický toxin *B. cereus*) detekován.



https://file.medchemexpress.com/product_pic/hy-p3003.gif

Provedl: SZPI, Inspektorát v Praze, Odbor zkušební laboratoře, ing. Petr Cuhra a kol.

Shrnutí

Na základě syntézy všech získaných dat:

1. monitoring výskytu *Bacillus cereus* ve vzorcích
2. hodnocení jeho růstové dynamiky během rehydratace
3. molekulární detekce toxigenních kmenů
4. analytické stanovení cereulidu

lze konstatovat, že **riziko vzniku emetického syndromu** po konzumaci pokrmů s přídavkem rehydratovaných sušených hub **je relativně nízké**.

Praktická doporučení:

- **rehydrataci provádět při pokojové teplotě po dobu 2 hodin** – v průběhu této doby dojde k vyklíčení většiny přítomných spor *B. cereus.*
- **rehydratované houby slít a propláchnout čistou vodou** – snížení počtu přítomných *B. cereus.*
- **připravené pokrmy s přídavkem rehydratovaných hub následně důkladně provařit (minimálně 10 minut)** – tento krok spolehlivě eliminuje vegetativní formy bakterií.







https://cdn.administrace.tv/2022/08/06/hd/01a3d24a3fabe60048ff35c6572f2fa1.jpg https://cdn.administrace.tv/2022/08/06/medium_169/436e403381b6ef8e221707dd7aeced06.jpg https://oohlalaitsvegan.com/wp-content/uploads/2023/03/red-lobster-brussel-sprouts-29.jpg

Děkuji za pozornost !

Poděkování spolupracovníkům, kteří se podíleli na realizaci:

ZL ÚBM
Prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc.
Ing. Jana Kadavá
Šárka Katolická
Gabriela Radová

SZPI, Inspektorát v Praze, Odbor zkušební laboratoře
Ing. Petr Cuhra
Ing. Soňa Baršová
Ing. Štěpán Czornyj
Jitka Vosecká

