

## MOŽNOSTI DETEKCE STAFYLOKOKOVÝCH ENTEROTOXINŮ

ZORA ŠTÁSTKOVÁ<sup>a</sup>, RENATA KARPÍŠKOVÁ<sup>a,b</sup>  
a IVANA BORKOVCOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav hygieny a technologie mléka, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, <sup>b</sup> Státní zdravotní ústav, Praha, Centrum zdraví, výživy a potravin Brno  
stastkovaz@vfu.cz; borkovcovai@vfu.cz ;  
karpiskova@chpr.szu.cz

Došlo 4.1.12, přijato 9.2.12.

Klíčová slova: *Staphylococcus aureus*, alimentární intoxikace, imunologické metody, fyzikálně-chemické metody, molekulárně biologické metody

### Obsah

1. Úvod
2. Stafylokokové enterotoxiny
3. Alimentární intoxikace
4. Aktuální možnosti detekce stafylokokových enterotoxinů
  - 4.1. Přímé metody
    - 4.1.1. Imunologické metody
    - 4.1.2. Fyzikálně-chemické metody
  - 4.2. Nepřímé metody
    - 4.2.1. Molekulárně biologické metody
5. Závěr

### 1. Úvod

Bakteriální druh *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) je považován za jednoho z nejspěšnějších lidských patogenů dnešní doby. Přibližně u třetiny lidí žije na kůži nebo na sliznicích ve vztahu podobném komenzalizmu a nevyvolává žádné zdravotní potíže. Pokud ale dojde k narušení

přirozené odolnosti hostitelského organismu, je tento mikrob schopen proniknout do tkání a vyvolat onemocnění sahající od banálních kožních infekcí až po závažné infekce vnitřních orgánů, které mohou končit i smrtí.

Významná je schopnost *S. aureus* produkovat celou řadu toxických exoproteinů, faktorů virulence a především enterotoxinů. *S. aureus* je díky jejich produkci v současné době jedním z nejvýznamnějších původců alimentárních intoxikací.

### 2. Stafylokokové enterotoxiny

V současnosti je známo 20 typů stafylokokových enterotoxinů – SEs (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET, SEU), přičemž SEC lze dále rozdělit na jednotlivé subtypy (SEC<sub>1</sub>, SEC<sub>2</sub>, SEC<sub>3</sub>, SEC<sub>hovězí</sub>, SEC<sub>ovčí</sub>, SEC<sub>kozi</sub>) podle odlišných izoelektrických bodů (pI). Těchto 20 typů SEs se rozděluje do dvou skupin. Toxiny SEA–SEE se označují jako skupina tzv. klasických SEs. Ostatní SEs se označují jako tzv. nové typy<sup>1–3</sup>.

SEs jsou proteiny o molekulové hmotnosti pohybující se v rozmezí 24–29 kDa, složené z jednoduchých polypeptidových řetězců s podobným zastoupením aminokyselin u jednotlivých typů SEs<sup>4</sup>. Polypeptidové řetězce obsahují jednu disulfidickou vazbu a jsou bohaté na lysin, kyselinu asparagovou, glutamovou a tyrosin<sup>1,5</sup>.

Schopnost produkovat stafylokokové enterotoxiny lze prokázat asi u poloviny kmenů *S. aureus* izolovaných z potravin<sup>6</sup>. Všechny dosud identifikované SEs se vyznačují několika společnými vlastnostmi, mezi něž patří vysoká termostabilita (snesou i půlhodinový var), odolnost vůči trávicím enzymům, podobná terciární struktura a u části SEs i schopnost vyvolat zvracení a průjem<sup>7</sup>. Optimální podmínky pro produkci SEs se liší podle typu SE a druhu potravin. Obecně lze říci, že podmínky vhodné pro pomnožování *S. aureus* jsou vhodné i pro produkci SEs (tabulka I)<sup>8</sup>.

Tabulka I  
Limity pro růst *S. aureus* a produkci enterotoxinů<sup>8</sup>

Faktor	Růst bakterií rozmezí	Produkce enterotoxinů	
		optimum	rozmezí
Teplota, °C	7–48	40–45	10–48
pH	4,0–10,0	7,0–8,0	4,5–9,6
Vodní aktivita	0,83–> 0,99	0,98	0,87–> 0,99

### 3. Alimentární intoxikace

Přítomnost *S. aureus* v potravinách představuje potenciální ohrožení zdraví konzumenta díky schopnosti produkovat SEs, které vznikají v potravině jako metabolické produkty při množení těchto bakterií. V průběhu výrobního procesu může být potravina kontaminována bakteriemi druhu *S. aureus*. Zdrojem kontaminace ve výrobním procesu může být surovina, prostředí nebo i člověk. Také nevhodné podmínky skladování a manipulace s potravinami během přípravy, hlavně v domácnostech a stravovacích zařízeních, kde nejsou důsledně dodržovány zásady správné hygienické praxe, mohou negativně ovlivnit zdravotní nezávadnost potravin<sup>9</sup>.

Různé studie ukazují, že ne všechny stafylokokové enterotoxiny vyvolávají u konzumentů intoxikaci z potravin. Jako toxiny schopné vyvolat gastroenterický syndrom byly zatím prokázány, vedle klasických SEs (SEA–SEE), pouze SEH<sup>10</sup>, nicméně i u SEG a SEI byla stanovena emetická aktivita<sup>11</sup>. Množství SE potřebného k vyvolání onemocnění u člověka není přesně známo. Informace o alimentárních intoxikacích ukazují, že pro nejvíce účinné SEs se minimální toxická dávka pro dospělého člověka pohybuje okolo 0,5 ng ml<sup>-1</sup> nebo g<sup>-1</sup> potraviny<sup>12</sup>.

Stafylokoková enterotoxikóza má rychlý nástup i průběh. Příznaky intoxikace jsou zvracení, bolesti hlavy a břicha, někdy také průjem. Na rozdíl od gastrointestinální infekce onemocnění probíhá obvykle bez zvýšené teploty. Tyto příznaky se objevují 2–6 hodin po konzumaci potraviny obsahující SEs. Symptomy obvykle samovolně vymizí po 24 hodinách, maximálně do 48 hodin (cit.<sup>1</sup>).

### 4. Aktuální možnosti detekce stafylokokových enterotoxinů

V současné době se pro stanovení SEs používá řada metod, které jsou založeny především na imunologických principech. Nicméně se v poslední době dostávají do popředí zájmu i metody založené na fyzikálně-chemických principech. Pomocí těchto metod je možná přímá detekce toxinu ve vyšetřované potravíně a lze je označit jako metody přímé. Jako nepřímé lze využít metody molekulárně-biologické. Pomocí těchto nepřímých metod není možné stanovit přítomnost SEs ve vyšetřované potravíně přímo, neboť zde musíme získat v první fázi izolát *S. aureus*, jehož DNA je následně použita pro detekci genů zodpovědných za produkci SEs. Některé ze současných metod využitelných pro detekci stafylokokových enterotoxinů jsou popsány v následujícím přehledu.

#### 4.1. Přímé metody

##### 4.1.1. Imunologické metody

##### RPLA (Reverse Passive Latex Agglutination assay)

Metoda je založena na reakci antigenu v roztoku s protilátkami, které jsou navázané na latexové částice.

Provádí se v mikrotitračních destičkách, po nanesení vzorku se destička inkubuje při pokojové teplotě 18–24 hodin. Detekční limit je 1–2 ng ml<sup>-1</sup> nebo g<sup>-1</sup>. Nevýhodou této metody je časová náročnost a omezený počet detegovatelných SEs, neboť komerčně prodávané kity jsou schopny detegovat pouze SEA, SEB, SEC a SED. SET-RPLA (Denka Seiken, Japonsko) neobsahuje specifickou protilátku pro SEE a tento toxin je nesprávně klasifikován jako SEA. Výhodou metody je její snadné použití. Test vykazuje dobrou citlivost a specifitu<sup>13</sup>.

##### Imunomagnetická separace v kombinaci s průtokovou cytometrií

Další z imunologických metod umožňuje rychlé vyšetření velkých množství vzorků a vykazuje i vysokou citlivost. Základem této kombinace metod je imunomagnetická separace (IMS). Metoda IMS využívá magnetické kuličky potažené specifickou protilátkou proti hledanému antigenu (toxinu). Tyto protilátky jsou značeny fluorescenčním barvivem. Pro vlastní detekci lze využít průtokovou cytometrii. Na základě typu použitých protilátek a fluorescenčního barviva bylo dosaženo detekčního limitu SEB již od 100 pg ml<sup>-1</sup> a to za méně než 45 min. Nevýhodou této metody je nezbytnost potřebného přístrojového vybavení. Tento postup byl zatím testován pouze pro detekci stafylokokového enterotoxinu B (cit.<sup>14–16</sup>).

##### ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Principem metody je vazba antigenu a protilátky značené enzymem, který štěpením substrátu vyvolá barevnou změnu. Pro stanovení SEs se používá tzv. sendvičová ELISA. Detekční limit této metody se podle způsobu přípravy vzorků před analýzou pohybuje v rozmezí 0,1–1 ng ml<sup>-1</sup> nebo g<sup>-1</sup>. Umožňuje detekci jednotlivých toxinů SEA–SEE nebo jejich sumy. V současnosti byly již vyvinuty soupravy pro stanovení nového typu – SEH, který byl také popsán jako původce alimentární intoxikace<sup>10,17</sup>. Nevýhodou testů ELISA jsou i křížové reakce s jinými typy antigenů a problematické stanovení částečně denaturovaných SEs, u kterých ovšem může zůstat zachována jejich aktivita. Výhodou je relativně krátká doba provedení pohybující se od 3 do 4 hodin (cit.<sup>18</sup>).

##### ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay)

Princip reakce je podobný jako u metody ELISA, rozdíl spočívá v použitém substrátu, který je enzymem štěpen na fluorescenční produkt. Vzniklé chemické změny jsou detegovány pomocí fotodiodového fluorimetru<sup>15</sup>. ELFA se prakticky využívá např. v systému VIDAS (VITEK, Francie), který má široké využití v klinické mikrobiologii. Metodou ELFA můžeme stanovit sumu toxinů SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED a SEE. Detekční limit se pohybuje v rozmezí od 0,5 ng ml<sup>-1</sup> nebo g<sup>-1</sup> (pro SEA a SEB) do 1,0 ng ml<sup>-1</sup> nebo g<sup>-1</sup> (pro SEC, SED a SEE). Tento limit lze snížit až o jeden řád při použití metody, využívající precipitace bílkovin pomocí kyseliny trichloroctové<sup>19</sup>. Velkou výhodou této metody je rychlost stanovení (cca 2 h) a jednoduchá příprava vzorků. Nevý-

hodami jsou detekce pouze klasických typů SEs a neschopnost rozlišení jednotlivých typů<sup>13</sup>.

#### Western blotting

Princip je založen na kombinaci metody elektroforetického rozdělení proteinů v polyakrylamidovém gelu, následném přenesení těchto proteinů na nitrocelulosovou membránu a převrstvení protilátkami značenými chromoforem. Vazba protilátky na antigen se projeví barevnou skvrnou. Metoda Western blottingu je vysoce citlivá, detekční limit je 100 pg ml<sup>-1</sup> nebo g<sup>-1</sup>. Western blotting rovněž překonává hlavní problém testu ELISA (křížové reakce s jinými typy antigenů) a lze ho použít pro stanovení jak nativních, tak denaturovaných SEs<sup>20,21</sup>. Nicméně specifita reakce opět závisí na specifitě použitých protilátek. Tyto protilátky, především pro nové typy SEs, nebyly stále připraveny v dostatečné kvalitě a omezují proto využití této metody jen pro detekci malého spektra SEs.

#### 4.1.2. Fyzikálně-chemické metody

##### Biosenzory

Biosenzory (biochips, chips, protein microarrays) jsou založeny na interakci mezi povrchově vázaným imobilizovaným receptorem, většinou protilátkou, ale využívají i interakce mezi proteiny, případně vazby mezi DNA a proteinem (tzv. záchytné sondy, angl. capture probe)<sup>22</sup>. Tvoří ideální alternativu k imunologickým metodám zmíněným výše. Detekční limit je srovnatelný s ELISA metodou, ale např. ve studii Labib a spol.<sup>23</sup> se detekční limit pro SEB uvádí již 0,3 pg ml<sup>-1</sup>.

Detekční metody mohou být založeny na sledování změny elektrického potenciálu, ke které dochází na detekční elektrodě, na principu optické detekce, či pomocí piezoelektrického systému. Optická detekční metoda je založena na principu povrchové plazmonové rezonance (SPR, surface plasmon resonance), kdy při dopadu světla na povrch senzorického čipu s navázaným komplexem antigen – protilátka dochází k měřitelné změně indexu lomu, ve srovnání s povrchem, kde k této vazbě nedošlo<sup>24</sup>. Další možnost spočívá v měření změny vlnové délky, ke které došlo při průchodu světla povrchem s navázaným komplexem<sup>25</sup>.

Velkou výhodou této metody je krátká doba provedení (celý test trvá pouze několik minut) a nízký detekční limit. Nevýhodou je, stejně jako u ELISA, výskyt křížových reakcí a problematické stanovení enterotoxinů ve vzorcích tepelně opracovaných potravin. Podobně jako u ELISA může být specifita reakce zvýšena pomocí sendvičové formy testu. Při této metodě je první komplex antigen – protilátka převrstven druhou specifickou protilátkou<sup>25</sup>.

Pro bližší určení jednotlivých toxinů lze po SPR v následujícím kroku použít MALDI-TOF MS (matrix – assisted laser desorption/ionization time – of – flight mass spectrometry). Tato metoda umožní přesnou analýzu testovaného toxinu, a to stanovením jeho molekulární hmotnosti a sekvencí jednotlivých aminokyselin. Princip spočívá v přenesení energie laseru do matrice. Tento přenos způsobí

rozštěpení bílkovin na menší části, které jsou poté analyzovány hmotnostní spektrometrií. Tuto metodu je možné využít i pro detekci SEs, pro které zatím nebyly připraveny vhodné protilátky využitelné v imunologických metodách<sup>25,26</sup>.

Pro detekci stafylokokových enterotoxinů se využívají především elektrické proteinové microarrays. Princip je založen na metodě sendvičové ELISA, kdy po navázání enzymově značené protilátky s antigenem a následném přidání substrátu dojde k enzymové přeměně neaktivního substrátu a tato interakce je transformována do elektrického signálu, který je následně analyzován<sup>24,25,27</sup>.

##### HPLC

Kapalinová chromatografie je jednou z dalších metod detekce SEs. Pro jejich stanovení byly zatím testovány metody využívající kolony s různými stacionárními fázemi. Např. u afinitní chromatografie je využíván specifický receptor (peptidový ligand YYWLHH), jenž má schopnost vázat SEB, ke kterému má vysokou afinitu. Po separaci jednotlivých toxinů můžeme pro ověření identity použít některou z imunologických metod, např. ELISA nebo Western blotting<sup>28</sup>. V současné době byly chromatografickými metodami stanoveny zatím jen SEA a SEB<sup>28–30</sup>. Výhodou této metody je možnost kvalitativního i kvantitativního průkazu široké škály toxinů. Zatím však nejsou dostupné standardy pro celé spektrum SEs v dostatečné čistotě. Vlastní analýze předchází časově náročná příprava vzorků, zahrnující složité extrakční postupy a následné čištění extraktů.

##### LC-MS

LC-MS kombinuje fyzikální separaci pomocí kapalinové chromatografie (LC) s detekcí hmotnostní spektrometrií (MS). S hmotnostně spektrometrickou detekcí LC-MS vykazuje velmi vysokou citlivost a specifitu. Pomocí této metody byl stanoven SEB (ve vzorku vody) již v koncentraci 3 pmol ml<sup>-1</sup>. Metoda LC-MS umožňuje přesné stanovení hledaného proteinu na základě jeho molekulové hmotnosti a také na základě pořadí aminokyselin po enzymatickém štěpení. Rovněž pro tuto metodu v současné době platí nedostupnost standardů pro celé spektrum SEs<sup>16</sup>.

##### SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

SDS-PAGE je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS). Umožňuje separaci proteinů na základě jejich pohyblivosti v elektrickém poli. Tato pohyblivost je závislá např. na délce polypeptidového řetězce (molekulární hmotnosti). Metoda je založená na schopnosti bílkovin vázat SDS hydrofobní interakcí. Množství navázaného SDS je tak velké, že náboje postranních zbytků aminokyselin jsou zanedbatelné vůči nábojům sulfátových skupin. SDS uděluje proteinům uniformní záporný náboj, a ty se pak všechny pohybují k anodě, přičemž pohyblivost je dána velikostí molekuly<sup>31</sup>. Tímto lze určit relativní molekulovou hmotnost

jednotlivých proteinů. Proteiny v gelu mohou být přeneseny na nitrocelulosovou, nylonovou anebo jinou podpůrnou membránu, které mohou být poté analyzovány imunologicky protilátkami, které se specificky naváží na daný protein a mohou být zviditelněny různými technikami (např. chemiluminiscenčně nebo radionuklidy). Pomocí SDS-PAGE byly již úspěšně detegovány i některé nové SEs<sup>32</sup>.

## 4.2. Nepřímé metody

### 4.2.1. Molekulárně biologické metody

#### PCR

PCR (polymerázová řetězová reakce, angl. polymerase chain reaction) je založena na principu klonování (zmnožení specifického úseku DNA) *in vitro*. Pro potvrzení toxigenity kmenů *S. aureus* lze použít PCR pro přímé stanovení genů zodpovědných za tvorbu toxinů. V současné době byly syntetizovány primery pro jednotlivé enterotoxiny. Reakce může být navržena jako „multiplex PCR“ a umožňuje stanovení všech dosud popsáných genů. Nevýhodou metody PCR pro stanovení genů kódujících tvorbu SEs je, že i potvrzení přítomnosti genu (*se*) neznamená, že příslušný SE bude také kmenem produkován. Např. Sharma a spol.<sup>33</sup> a Zschöck a spol.<sup>34</sup> detegovali přítomnost genů kódujících tvorbu klasických SEs, jejich přítomnost však nebyla potvrzena metodou ELISA ani RPLA. To se dá vysvětlit tím, že nedošlo k expresi genu, nebo produkované množství toxinu bylo pod detekční mezí použitých metod<sup>34</sup>.

PCR metoda pro určení genů zodpovědných za tvorbu toxinů, je zatím jednou z nejčastěji používaných metod detekce tzv. nových SEs, neboť pro všechny zatím nejsou dostupné protilátky pro imunochemické metody jako RPLA, ELFA, ELISA<sup>35</sup>.

Specifickým problémem je detekce SEs u tepelně opracovaných potravin. Na rozdíl od stafylokoků, jenž jsou v průběhu tepelného ošetření zničeny, jsou SEs termostabilní proteiny, které nedegraduje běžné tepelné ošetření při kulinární úpravě potravin a pokrmů. Z potravin pak není možné získat izolát *S. aureus* ani DNA pro vlastní detekci genů. V tomto případě je nutné použít přímé metody stanovení toxinů.

#### Real Time PCR

PCR v reálném čase (real time PCR) je založena na klasickém PCR s tím rozdílem, že speciální přístroj umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu (u klasického PCR se deteguje až finální produkt). Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu nespecifického nebo specifického (detekční sondy), který se váže na syntetizovanou DNA a úroveň detegované fluorescence pak odráží množství syntetizované nukleové kyseliny. Hlavní výhodou metody oproti „klasickému“ PCR je možnost kvantifikace syntetizovaného produktu, a to buď relativní, tj. porovnáním s jinou skupinou vzorků (např. kontrolní), nebo absolutní, tj.

z kalibrační křivky rekombinantní DNA o známém množství. Při hodnocení platí skutečnost, že čím vyšší je obsah nukleové kyseliny v testovaném vzorku (např. mRNA jako výraz úrovně exprese daného genu), tím rychlejší je přírůstek fluorescence. Právě možnost určení exprese hledaného genu a úrovně této exprese představuje velkou výhodu Real time PCR, především pro stanovení reálné schopnosti produkce SEs<sup>36</sup>. Z dalších výhod je nutno zmínit vysokou specifitu (zejména při použití sond) a citlivost. Ve srovnání s klasickou PCR je kratší i doba vlastního provedení reakce, neboť odpadá elektroforetická koncovka. V režimu fast real time PCR umožňují přístroje ukončit analýzu do 35 minut místo původních 2,5–3 hodin (cit.<sup>13</sup>).

#### DNA microarrays

Tato metoda, založená na principu hybridizace, probíhá na membráně nebo skleněné destičce, na které jsou mikrodávkovačem naneseny jednotlivé oligonukleotidy (DNA sondy). Po převrstvení testovaným vzorkem dojde v případě pozitivní reakce k navázání cílové DNA na DNA sondu. Tato cílová DNA je označena fluoroforem, který v případě navázání na DNA emituje světlo, jenž se projeví fluorescencí. Dle množství navázané cílové DNA se projeví i intenzita fluorescenčního signálu. Výhodou této metody je možnost kvantitativního i kvalitativního stanovení a sledování až stovek specifických úseků DNA v jedné reakci<sup>13</sup>.

## 5. Závěr

Současná legislativa (Nařízení EK č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny ve znění pozdějších předpisů), která začala v ČR platit od 1.1. 2006, zahrnuje i požadavky pro stanovení SEs ve specifických potravinách. Referenční metodou byla EK zvolena ELISA s dialyzační metodou zakoncentrování SEs a s detekčním limitem 0,1 ng ml<sup>-1</sup> nebo g<sup>-1</sup>. Případně lze použít i metodu jinou se stejnou prokázanou citlivostí. Takto nízkého detekčního limitu můžeme dosáhnout i pomocí přístroje VIDAS využívajícího metodu ELFA při využití zakoncentrování vzorku před vlastním stanovením toxinu. Obě metody se však omezují pouze na detekci enterotoxinů SEA-SEE (aktuálně u metody ELISA i SEH). Příprava vzorků metodou zakoncentrování je pracná a prodlužuje dobu potřebnou pro vlastní detekci SEs. V budoucnosti bude nutné tuto metodu nahradit jinou, umožňující specifickou kvalitativní i kvantitativní detekci širšího spektra SEs.

*Práce vznikla za finanční podpory projektů MZ-NAZVA č. QH81111 a GA ČR 203/09/0145.*

#### LITERATURA

- Loir Y., Baron F., Gautier M.: Genet. Mol. Res. 2, 63 (2003).
- Løvseth A., Loncarevic S., Berdal K. G.: J. Clin. Microbiol. 42, 3869 (2004).
- Ono H. K., Omoe K., Imanishi K., Iwakabe Y., Hu D.

- L., Kato H., Saito N., Nakane A., Uchiyama T., Shinagawa K.: *Infect. Immun.* 76, 4999 (2008).
4. Rusnak J. M., Kortepeter M., Ulrich R., Poli M., Boudreau E.: *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1544 (2004)
  5. Strickler M. P., Neill R. J., Stone M. J., Hunt R. E., Brinkley, W., Gemski, P.: *J. Clin. Microbiol.* 27, 1031 (1989).
  6. Normanno G., Firinu A., Virgilio, S., Mula G., D'Ambrosio A., Poggiu A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota S., Boloni G., Giannatale E., Salinetti A. P., Salandra G., Bartoli M., Zuccon F., Pirino T., Sias S., Parisi A., Quaglia N. C., Celano G. V.: *Int. J. Food Microbiol.* 98, 73 (2005).
  7. Dinges M. M., Orwin P. M., Schlievert P. M.: *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 16 (2000).
  8. Roberts T. A., Baier-Parker A. C., Tompkin R. B. (ed.): *Microorganisms in Food: Characteristics of Microbial Pathogens*. Chapman and Hall, London 1996.
  9. Lancette G. A., Tatini S. R., v knize: *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods* (Vanderzant C., Splittstoesser F., ed.), kap. *Staphylococcus aureus*. American Public Health Association, Washington 1992.
  10. Omoe K., Ishikawa M., Shimoda Y., Hu D. L., Ueda S., Shinagawa, K.: *Int. J. Food Microbiol.* 40, 857 (2002).
  11. Seo K. S., Bohach G. A., v knize: *Food Microbiology* (Doyle M. P., Beuchat, L. R., ed.), kap. *Staphylococcus aureus*. ASM Press, Washington D.C. 2007.
  12. Balaban N., Rasooly A.: *Int. J. Food Microbiol.* 61, 1 (2000).
  13. McMeekin T. A. (ed.): *Detecting Pathogens in Food*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge 2003.
  14. Kamikado M. T., Kobayashi H. H., Honjoh K., Iio M.: *J. Food Prot.* 66, 1222 (2003).
  15. Alefantis T., Grewal P., Ashton J., Khan A. S., Valdes J. J., Del Vecchio V. G.: *Mol. Cell. Probes* 18, 379 (2004).
  16. Ler S. G., Fook Kay Lee P.: *J. Chromatogr., A* 1133, 1 (2006).
  17. Sakai F., Ihara H., Aoyama K., Igarashi H., Yanahira S., Ohkubo T., Asao T., Kozaki S.: *J. Food Prot.* 71, 1855 (2008).
  18. Martin S. E., Myers E. R., v knize: *Foodborne Disease Handbook: Diseases Caused by Bakteria* (Hui Y. H., Richard Gorham J., Murrell K. D., ed.), sv.1, kap. 11. Marcel Dekker, Inc., New York 1994.
  19. Soejima T., Nagao E., Kubota T., Yamagata H., Kagi H.: *Int. J. Food Microbiol.* 93, 185 (2004).
  20. Rasooly A., Rasooly, R. S.: *Int. J. Food Microbiol.* 41, 205 (1998).
  21. Schlievert P. M., Case L. C.: *Methods Mol. Biol.* 391, 113 (2007).
  22. Stoevesandt O., Taussig M. J., He M.: *Expert Rev. Proteomics* 6 (2) :145-576, 145 (2009).
  23. Labib M., Hedström M., Amin M., Mattiasson B.: *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 1539 (2009).
  24. Rasooly L., Rasooly A.: *Int. J. Food Microbiol.* 49, 119 (1999).
  25. Nedelkov D., Rasooly A., Nelson R. W.: *Int. J. Food Microbiol.* 60, 1 (2000).
  26. Sospedra I., Soler C., Mañes J., Soriano J. M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 1525 (2011).
  27. Quiel A., Jürgen B., Piechotta G., Le Foll A. P., Ziebandt A. K., Kohler C., Köster D., Engelmann S., Erck C., Hintsche R., Wehland J., Hecker M., Schweder T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1619 (2010).
  28. Balaban N., Rasooly A.: *Int. J. Food Microbiol.* 64, 33 (2001).
  29. Williams R. R., Wehr C. T., Rogers, T. J., Bennett R. W.: *J. Chromatogr., A* 266, 179 (1983).
  30. Cristoni S., Zingaro L., Canton C., Cremonesi P., Castiglioni B., Morandi S., Brasca M., Luzzana M., Battaglia C.: *J. Mass Spectrom.* 44, 1482 (2009).
  31. Strange E. D., Malin E. L., Van Hekken D. L., Basch J. J.: *J. Chromatogr., A* 624, 81 (1992).
  32. Pan Y. Q., Ding D., Sun H. Y., Chen S. Q.: *YaoXue XueBao.* 42, 943 (2007).
  33. Sharma N. K., Rees C. E. D., Dodd C. E. R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1347 (2000)
  34. Zschöck M., Botzler D., Blöcher S., Sommerhäuser J., Hamann H. P.: *Int. Dairy J.* 10, 569 (2000).
  35. Letertre C., Perelle S., Dillasser F., Fach P.: *Mol. Cell. Probes* 17, 139 (2003).
  36. Valihrach L., Demmerova K., Karpiskova R., Melenova I.: *Czech J. Food Sci.* 27, 56 (2009).

**Z. Šťástková<sup>a</sup>, R. Karpíšková<sup>a,b</sup>, and I. Borkovcová<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>University of Veterinary and Pharmaceutical Science, Brno, <sup>b</sup>National Institute of Public Health, Brno): **Possibilities of Detection of Staphylococcal Enterotoxins**

*Staphylococcus aureus* is a major human pathogen, which produces a wide variety of exoproteins causing various types of disease symptoms. One of the most important characteristics of *S. aureus* is the production of heat-stable enterotoxins implicated in food-borne intoxications. Due to its stability, *S. aureus* is among the most frequent causative agents of food-borne intoxications in the world. Currently, a number of methods are used for direct determination of staphylococcal enterotoxins (SE); these methods are based primarily on immunological principles. Methods based on physicochemical principles and molecular-biological methods have also received attention. Some methods cannot be used for direct determination of SEs in food but just for detection of toxigenicity of *S. aureus* isolates. Some examples are described. Advantages and drawbacks of the methods were evaluated, including their detection limits, which were compared with the current EU legislation.