
ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

**SKRIPTUM PRO PRAKTICKÁ CVIČENÍ Z HYGIENY
A ZDRAVOTNÍ NEZÁVADNOSTI POTRAVIN**

Ing. Nikol Modráčková, Ph.D.

Praha 2025

2025

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

**SKRIPTUM PRO PRAKTICKÁ CVIČENÍ Z HYGIENY
A ZDRAVOTNÍ NEZÁVADNOSTI POTRAVIN**

Ing. Nikol Modráčková, Ph.D.

Praha 2025

Tato publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou

© Ing. Nikol Modráčková, Ph.D.

Lektorovala: Mgr. Ing. Hana Sechovcová, Ph.D.

Vydala Česká zemědělská univerzita ve svém nakladatelství

ISBN 978-80-213-3527-1

Předmluva

Skriptum pro praktická cvičení z předmětu Hygiena a zdravotní nezávadnost potravin představuje soubor teoretických informací a metodických postupů úzce navázaných na obsah jednotlivých laboratorních cvičení. Text objasňuje principy a metodiku práce potřebnou pro úspěšné zvládnutí praktické výuky tohoto předmětu, který je na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze vyučován v rámci magisterských studijních programů. Tento předmět je stěžejní zejména pro obory Výživa a potraviny a Kvalita a zpracování zemědělských produktů.

Cílem praktické výuky je poskytnout studentům přehled o metodách používaných ke kontrole hygienické kvality vybraných potravin živočišného i rostlinného původu. Kromě klasických mikrobiologických postupů jsou studenti seznamováni také s moderními metodami, které se uplatňují v současné laboratorní praxi. Získané znalosti a dovednosti jsou nezbytným předpokladem pro úspěšné splnění zápočtu a složení zkoušky. Studenti je navíc mohou využít v souvisejících předmětech a ve svém budoucím profesním uplatnění v oblasti hodnocení kvality a zdravotní nezávadnosti potravin.

Každá hlavní kapitola obsahuje formulované teoretické i praktické vzdělávací cíle. V dílčích kapitolách jsou doplněny užitečné odkazy pro možné detailnější studium. Součástí praktických částí jsou jasné definované úkoly s odkazy na příslušné výsledkové tabulky určené pro záznam získaných dat, výpočtů a interpretaci výsledků ve vztahu k platným legislativním limitům. Tento učební text vznikl za účelem podpory studentů při studiu a praktické výuce. Má sloužit jako přehledný průvodce, který studentům usnadní pochopení principů laboratorních metod, jejich praktické provedení a interpretaci výsledků z hlediska hygieny a bezpečnosti potravin.

Autorka těchto skript i všichni vyučující tohoto předmětu vítají případné připomínky a návrhy, které by mohly přispět ke zlepšení kvality výuky i učebního textu při jeho dalším vydání.

Obsah

1.	Mikrobiologická laboratoř, bezpečnost práce a základní pojmy	7
2.	Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF).....	13
2.1.	Zadání semestrálního úkolu – vypracování RASFF hlášení	16
3.	Mikrobiologické požadavky na potraviny	16
3.1.	Indikátorové mikroorganismy a metabolity	18
3.1.1.	Indikátory produkční kvality	19
3.1.2.	Indikátory bezpečnosti potravin	21
4.	Mikrobiologická analýza mletého masa	22
4.1.	Legislativní limity	22
4.2.	Zadání semestrálního úkolu – vytvoření zkušebního protokolu.....	25
4.3.	Kultivační stanovení mikrobiologických kritérií.....	27
4.3.1.	Potřebná média	27
4.3.1.1.	Masopeptonový agar.....	28
4.3.1.2.	MacConkey agar	29
4.3.1.3.	Rappaport-Vassiliadis bujón.....	30
4.3.1.4.	<i>Salmonella Shigella</i> agar	30
4.3.1.5.	Xylose Lysine Deoxycholate agar	31
4.3.2.	Metodika stanovení mikrobiologických kritérií ve vzorku mletého masa ...	32
4.3.2.1.	Kritérium hygieny výrobního procesu	33
4.3.2.2.	Kritérium bezpečnosti potravin	35
4.4.	Metodika izolace čistých bakteriálních kultur.....	38
4.4.1.	Popis kultivačních znaků kolonií.....	39
4.4.2.	Charakteristika morfologických znaků buněk a kontrola čistoty	40
4.4.2.1.	Gramovo barvení	41
4.4.2.2.	Další mikroskopické preparáty	43
4.4.3.	Ověření identity odebraných izolátů.....	44
4.4.3.1.	Použití chromogenních médií	44
4.4.3.1.1.	Tryptonový agar se žlučovými solemi a X-glukuronidem	45
4.4.3.1.2.	Brilliance <i>Salmonella</i> agar.....	46
4.4.3.1.3.	Chromogenní agar pro <i>Salmonella</i> spp. s esterázovou aktivitou....	47
4.4.3.1.4.	Metodika inokulace kultur na chromogenní média	48
4.4.3.2.	Použití konfirmačních testů	50

4.4.3.2.1.	Metodika k provedení COLItestu	51
4.4.3.2.2.	Metodika k provedení <i>Salmonella</i> Test Kitu	52
4.4.3.3.	Další imunochemické testy pro detekci bakterií.....	55
4.4.3.3.1.	ELISA	55
4.4.3.3.2.	Imunochromatografické testy	56
4.4.4.	Další metody detekce a identifikace bakterií	57
4.4.4.1.	Molekulárně-biologické metody	58
4.4.4.2.	Instrumentální metody – MALDI-TOF MS	59
4.4.4.2.1.	Princip	60
4.4.4.2.2.	Metodické postupy	62
4.4.4.2.3.	Metodika identifikace bakteriálních izolátů z mletého masa.....	65
4.5.	Shrnutí všech získaných výsledků	66
5.	Mikrobiologická analýza syrového mléka.....	68
5.1.	Legislativní limity.....	68
5.2.	Kultivační stanovení vybraných skupin mikroorganismů	73
5.2.1.	Metodika mikrobiologické analýzy deskovou metodou	73
5.2.2.	Metodika mikrobiologické analýzy miniaturizovanými testy	76
5.2.2.1.	Mikrobitesty	76
5.2.2.2.	Petrifilm	79
6.	Rezidua biologicky aktivních látek v potravinách.....	81
6.1.	Růstové stimulatory	83
6.2.	Veterinární léčiva.....	84
6.3.	Stanovení reziduí antibiotik v živočišných produktech.....	85
6.3.1.	Metodika stanovení reziduí antibiotik ve vzorcích kuřecího masa.....	87
7.	Dusitany a dusičnany	88
7.1.	Toxicita dusičnanů a dusitanů	89
7.2.	Legislativní limity.....	90
7.3.	Metodika stanovení dusičnanů a dusitanů v zelenině.....	92
8.	Falšování potravin	93
8.1.	Metody kontroly pravosti (autenticity) potravin.....	94
8.2.	Metodika průkazu přídavku škrobu v pepři.....	95
8.3.	Metodika průkazu přídavku škrobu v zakysané smetaně	97
9.	Použité zdroje	98
10.	Seznam obrázků a tabulek	102

1. Mikrobiologická laboratoř, bezpečnost práce a základní pojmy

Cílem této kapitoly je seznámit studenty s principy fungování mikrobiologické laboratoře, se zásadami bezpečné a aseptické práce, s používáním ochranných pomůcek a správným laboratorním postupem při práci s mikroorganismy. Součástí kapitoly je také objasnění základních mikrobiologických pojmů a terminologie, které jsou nezbytné pro porozumění následným praktickým cvičením.

Práce v mikrobiologické laboratoři se řídí zásadami správné laboratorní praxe (GLP; *Good Laboratory Practise*) a souborem řady norem ČSN a ISO, jejichž cílem je zajistit ochranu zdraví pracovníků a zároveň zabránit vnější kontaminaci vzorků. Provoz mikrobiologické laboratoře je podmíněn splněním legislativních a normativních požadavků. Zaměření laboratoře, používané metody i analyzované vzorky musí být vždy v souladu s platnými právními předpisy a technickými normami.

Každý mikroorganismus může představovat potenciální nebezpečí, proto je nezbytné dodržovat předepsané postupy a zásady bezpečnosti práce. Platí, že se všemi kulturami je nutné pracovat s takovou opatrností, jako by se jednalo o patogenní mikroorganismy. Podle rizika biologického materiálu, se kterým se pracuje, lze mikrobiologické laboratoře rozdělit do čtyř stupňů, konkrétně Biosafety Level (BSL) 1–4. Kategorie BSL-1 je určena pro práci s nepatogenními nebo jen minimálně rizikovými mikroorganismy (do této kategorie spadá většina studentských výukových laboratoří), BSL-2 je určena pro práci s mikroorganismy, které mohou vyvolat onemocnění u člověka, avšak obvykle nejsou vysoce nebezpečné a infekce je léčitelná (do této kategorie patří některé výzkumné laboratoře), BSL-3 je určena pro práci s vysoce rizikovými patogeny přenášenými vzduchem, které mohou způsobovat závažná nebo smrtelná onemocnění (např. *Mycobacterium tuberculosis*, virus západonilské horečky) a BSL-4 vyžaduje nejvyšší stupeň biologické bezpečnosti a je určena pro práci s vysoce nebezpečnými patogeny bez dostupné účinné léčby (např. virus eboly, virus Marburg).

Všechna laboratorní cvičení předmětu Hygiena a zdravotní nezávadnost potravin budou probíhat v mikrobiologické laboratoři stupně BSL-1. I přesto je nutné ke každému mikroorganismu přistupovat jako k potenciálně nebezpečnému a vždy dodržovat předepsané postupy bezpečnosti práce. Tyto zásady jsou pro všechny účastníky laboratorních cvičení závazné a jsou detailněji popsány v následujících odstavcích.

Do laboratoře vstupujte pouze se souhlasem a pod dohledem vyučujícího. Přístup je povolen jen proškoleným osobám. Před vstupem se přezujte a oblékněte čistý bílý pracovní plášť s dlouhými rukávy. Plášť musí být vyroben z tkaniny s omezenou hořlavostí a nesmí být používán mimo laboratoř. Podle povahy práce používejte i další osobní ochranné prostředky (rukavice, ochranné brýle, respirátor atd.). Dlouhé vlasy musí být sepnuté a před prací si odložte hodinky a šperky. V laboratoři je přísně zakázáno jíst, pít a kouřit.

Před zahájením práce i po jejím ukončení si vždy důkladně umyjte ruce teplou vodou a mýdlem, poté použijte dezinfekční prostředek. Na pracovní místo si odkládejte pouze nejnutnější pomůcky. Nikdy nepipetujte ústy a nekládejte si do úst žádné předměty. Při práci s kulturami se vyvarujte mluvení, kašlání nebo kýchání nad otevřenými vzorky a zabraňte tvorbě aerosolů (pipetováním, manipulací s kličkami). Všechny své vzorky vždy pečlivě označujte (název vzorku, den a čas cvičení, pracovní skupina).

Vždy pracujte asepticky v blízkosti zapáleného kahanu. Nádoby otevírejte pouze na nezbytně nutnou dobu a před uzavřením je krátce ožehněte v plamenu. Nedotýkejte se sterilních částí rukama. Používejte pouze sterilní pomůcky (kličky, pinzety, zátky apod.) a odkládejte je na vyhrazená místa, nikoli na pracovní desku. Pokud dojde ke kontaminaci materiálu, vždy ji nahlaste, kontaminovaný materiál označte a uložte ho stranou od sterilního. Se vzorky pracujte tak, aby nedocházelo k jejich rozptýlení do okolí.

V případě jakéhokoli poranění, nevolnosti nebo kontaminace pracovní plochy okamžitě informujte vyučujícího. Seznamte se s umístěním hlavního ventilu plynu, hasicích přístrojů a lékárničky.

Pracovní plochu dezinfikujte před začátkem, po skončení a také při jakékoliv kontaminaci vhodným dezinfekčním roztokem. V naší laboratoři se k dezinfekci a udržování aseptického prostředí používá **70% roztok etanolu**, který je považován za nejúčinnější dezinfekční koncentraci. Přítomnost vody zvyšuje schopnost etanolu pronikat buněčnou stěnou mikroorganismů a denaturovat jejich proteiny. Vyšší koncentrace ethanolu (např. 96–100 %) působí méně efektivně, protože způsobují okamžitou koagulaci proteinů na povrchu mikrobiální buňky, čímž se zabrání dalšímu průniku alkoholu dovnitř buňky. Sedmdesátiprocentní etanol účinně ničí vegetativní formy bakterií, kvasinky, plísně a obalené viry, avšak není účinný proti bakteriálním sporám. V laboratořích se pro dezinfekci běžně používá denaturovaný etanol, do kterého jsou přidávána malá množství denaturačních činidel (např. metanol, isopropanol, methylethylketon nebo bitrex). Tyto přísady činí etanol nepitným a toxickým, což zabraňuje jeho zneužití a zároveň osvobozuje výrobek od spotřební daně, a jeho používání v laboratořích je tedy

ekonomicky výhodnější. Požití denaturovaného alkoholu je vysoce nebezpečné. Může vést k těžké otravě, slepotě nebo i smrti, v závislosti na použitém denaturačním činidle. Pro práci v mikrobiologické laboratoři je dále důležité si uvědomit **rozdíl mezi dezinfekcí a sterilizací**. Zatímco 70% etanol je určen pro dezinfekci povrchů a pomůcek, nikoli pro jejich sterilizaci, absolutní etanol (96–100%) se používá pro opal kovových nástrojů, tedy jejich sterilizaci. Vyšší koncentrace alkoholu je v tomto případě nezbytná, protože voda v 70% ethanolu brání hoření. Absolutní etanol umožňuje vytvořit stabilní, čistý a dostatečně horký plamen o teplotách až 850 °C, který zajistí účinnou sterilizaci kovových nástrojů (např. bakteriologických kliček nebo jehel).

Kontaminované pomůcky ukládejte do speciálních nádob. Veškerý biologický odpad musí být před likvidací dekontaminován. Laboratoř opouštějte až po odevzdání své práce vyučujícímu a důkladném úklidu všech pracovních ploch, které jste používali. To platí také pro mikroskopy, které musí být po práci vždy vyčištěny a vypnuty. Dodržováním těchto zásad zajistíte bezpečný průběh cvičení a ochranu sebe i ostatních.

S rutinní prací v mikrobiologické laboratoři souvisí následující základní terminologie, kterou je nezbytné si osvojit, stejně tak je důležitá orientace v legislativních dokumentech, které přímo souvisí s kontrolou kvality a bezpečnosti potravin:

- **anaerostat** je uzavíratelná kultivační nádoba, ve které lze vytvořit a udržovat anaerobní podmínky, tedy bez přítomnosti kyslíku. Anaerobního prostředí lze dosáhnout chemickou reakcí (např. pomocí generátorů plynů) nebo odsátím vzduchu a jeho náhradou inertním plynem (např. dusíkem nebo oxidem uhličitým);
- **asepse** je soubor opatření zabráňujících vnesení nežádoucích mikroorganismů do prostředí, vzorku či kultury;
- **analytické váhy** jsou vysoce přesným přístrojem určeným k vážení malých množství látek s přesností na 0,1 mg nebo vyšší;
- **automatická pipeta** je přesný dávkovač malých objemů kapalin (μL – mL), vybavená vyměnitelnými plastovými špičkami;
- **bakteriologická jehla** je kovová nebo jednorázová plastová jehla používaná k inokulaci mikroorganismů, zejména při práci s pevnými médii (vpichová inokulace);
- **bakteriologická klička** je kovový nebo jednorázový plastový nástroj zakončený očkem, sloužící k přenosu mikroorganismů a roztírání vzorku po povrchu agarových médií;

- **centrifuga** je laboratorní přístroj využívající odstředivou sílu k oddělování částic podle jejich hustoty (např. buněk od média, sraženin od supernatantu);
- **dezinfekce** je proces ničení vegetativních buněk a méně odolných forem mikroorganismů (nikoliv všech spor) pomocí fyzikálních či chemických prostředků;
- **homogenizace vzorku** je proces rovnoměrného rozptýlení všech složek vzorku, obvykle mechanickým nebo fyzikálním způsobem (např. mícháním, třepáním, drcením). Cílem je získat reprezentativní, jednotnou suspenzi pro mikrobiologické, chemické nebo fyzikální analýzy;
- **injekční stříkačka** je pomůcka k přesnému dávkování kapalin, někdy využívaná v mikrobiologii k přenosu roztoků a inokulaci;
- **inkubace** je udržování inokulovaného vzorku v podmínkách (teplota, atmosféra, čas), které umožňují růst a množení mikroorganismů;
- **inkubátor** je zařízení s řízenou teplotou (případně i vlhkostí či obsahem CO₂), používané k inkubaci mikroorganismů za optimálních podmínek;
- **inokulace (očkování)** je aseptický přenos inokula (živých buněk určitého mikrobiálního kmene) do sterilního živného média;
- **inokulum** je množství mikrobiální kultury přenesené do sterilního média za účelem zahájení růstu;
- **izolace mikroorganismu** je oddělení a získání čisté kultury (kultury jednoho druhu) z mikrobiální směsi;
- **kolonie** je viditelný shluk buněk vzniklý pomnožením jediné mikrobiální buňky nebo malé skupiny buněk na pevném médiu;
- **kontaminace** je nežádoucí přítomnost cizích mikroorganismů v prostředí, vzorku nebo kultuře;
- **kultivace** je řízené pěstování mikroorganismů na speciálních živných půdách (pevné agary, tekutá média);
- **kultivační podmínky** jsou souhrnem faktorů, které ovlivňují růst, množení a metabolickou aktivitu mikroorganismů (například teplota, pH, obsah kyslíku, vlhkost, složení živného média, inkubační doba a intenzita osvětlení). Správné nastavení těchto parametrů je klíčové pro úspěšnou kultivaci cílového mikroorganismu;
- **kvalitativní analýza** je analytický postup, jehož cílem je zjistit přítomnost nebo nepřítomnost určitého mikroorganismu, látky nebo vlastnosti ve vzorku, bez určení jejího množství (např. průkaz salmonel v potravině);

- **kvantitativní analýza** je analytický postup, který umožňuje stanovit množství nebo koncentraci určitého mikroorganismu či látky ve vzorku. V mikrobiologii se obvykle vyjadřuje jako počet kolonií tvořících jednotku (KTJ; *Colony Forming Units, CFU*) na jednotku hmotnosti nebo objemu vzorku (např. KTJ/g, KTJ/mL).
- **legislativní dokumenty** jsou oficiální právní a technické předpisy, které stanovují požadavky na bezpečnost, kvalitu a postupy v potravinářství a mikrobiologii:
 - **evropské právní předpisy** – potravinové právo je v EU harmonizováno. To znamená, že všechny členské státy musí dodržovat právní rámec stanovený Evropskou unií (EU). Tyto právní akty mají různé stupně závaznosti:
 - **nařízení (*regulation*)** je přímo závazný právní akt, který platí ve všech členských státech EU bez nutnosti přijetí národní úpravy. Členské státy jsou povinny nařízení přímo uplatňovat;
 - **směrnice (*directive*)** stanovuje cíle, kterých musí členské státy dosáhnout, ale ponechává jim volnost při volbě způsobu provedení. Směrnice se tedy musí převést do národního práva (např. zákonem nebo vyhláškou);
 - **rozhodnutí (*decision*)** je závazné pouze pro ty subjekty (stát, organizaci, firmu), kterým je určeno;
 - **doporučení a stanoviska (*recommendations and opinions*)** jsou právně nezávazné dokumenty, které mají poradní nebo interpretační charakter, často vydávané Evropskou komisí nebo Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (např. vědecká stanoviska k ADI nebo MRL hodnotám);
 - **národní právní předpisy** – evropská legislativa má přednost před národní – tedy v případě rozporu platí přímo nařízení EU. Česká legislativa doplňuje a technicky provádí evropská ustanovení tam, kde EU ponechává prostor pro národní úpravu (např. stanovení dozorových orgánů, sankcí, implementace směrníc):
 - **zákon** je základní právní předpis schválený Parlamentem ČR, který stanovuje rámcové povinnosti a principy (např. zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích);
 - **vyhláška** je prováděcí právní předpis vydaný ministerstvem, který upřesňuje konkrétní požadavky stanovené zákonem (např. vyhláška č. 289/2007 Sb., o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné

produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství);

- **norma (ČSN, ISO, EN)** je technický dokument, který specifikuje standardizované postupy, definice a metody zkoušení (např. ČSN EN ISO 4833-1 – Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů – Část 1: Technika přelivem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C). Normy nejsou právně závazné, pokud na ně zákon či vyhláška výslovně neodkazuje;
- **odměrný válec** je skleněná nebo plastová válcovitá nádoba s ryskou určená k měření objemů kapalin;
- **pasteurova pipeta** je skleněná nebo plastová pipeta s kapilárním hrdlem, často používaná k přenosu menších objemů;
- **patogen** je mikroorganismus schopný vyvolat onemocnění u hostitele;
- **oportunní patogen** je mikroorganismus, který obvykle nezpůsobuje onemocnění, ale může vyvolat infekci u oslabeného hostitele nebo za specifických podmínek;
- **sérologická pipeta** je pipeta kalibrovaná pro přesné měření objemu (0,1–50 mL), používá se spolu s pipetovací pomůckou (balónek, pipetboy);
- **sterilizace** je úplné zničení všech mikroorganismů včetně spor (např. autoklávováním, suchým horkým vzduchem, filtrací či ionizujícím zářením);
- **sterilní materiál** je materiál, nástroj nebo pomůcka, který neobsahuje žádné živé mikroorganismy, včetně jejich spor. Sterilita se dosahuje fyzikálními (např. působením suchého či vlhkého tepla, autoklávováním, filtrací nebo zářením) nebo chemickými metodami. Veškerý sterilní materiál musí být po sterilizaci uložen v uzavřených, čistých obalech a otevírán pouze asepticky těsně před použitím, aby nedošlo ke kontaminaci;
- **vodní lázeň** je zařízení udržující konstantní teplotu pomocí ohřáté vody, využívané např. k udržení teploty kultivačních agarových médií, zahřívání vzorků nebo jejich inkubaci při definované teplotě;
- **vortex** je laboratorní přístroj sloužící k rychlému promíchání malých objemů kapalin ve zkumavkách pomocí vířivého pohybu.

Užitečné odkazy:

- *Laboratory Biosafety Manual, fourth edition. World Health Organization, Geneva (2020): <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/337956/9789240011311-eng.pdf?sequence=1>*
- *The principles of Good Laboratory Practice (GLP) ensure the quality and validity of data generated by testing chemicals. The principles were elaborated by the Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) and incorporated into EU law through the GLP directives, together with the revised OECD Guides for Compliance Monitoring Procedures for GLP: https://single-market-economy.ec.europa.eu/sectors/chemicals/good-laboratory-practice_en*

2. Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF)

Cílem této kapitoly je seznámit studenty se Systémem rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF), jeho historií, principy fungování, legislativním zakotvením a strukturou v rámci EU i České republiky. Důraz je kladen na význam systému pro ochranu zdraví spotřebitelů a na schopnost práce s hlášeními RASFF. Z těchto informací poté vyplývá zadání semestrální úkolu.

Evropská unie (EU) disponuje souborem platných právních předpisů, které jí umožňují kontrolovat a zajišťovat bezpečnost potravin. Tyto normy jsou značně přísné a samotná úroveň bezpečnosti potravin je v rámci světového měřítka v EU na velmi vysoké úrovni. V rámci nástrojů bezpečnosti potravin byl v roce 1979 zřízen Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF; *Rapid Alert System for Food and Feed*), který dodnes slouží k rychlé výměně informací mezi členskými zeměmi a orgány pro bezpečnost potravin o zdravotních rizicích pocházejících z potravin nebo krmiv pro okamžité přijetí opatření k odvrácení rizika. Původně byl RASFF pouze dobrovolným nástrojem spolupráce fungujícím na základě politické dohody Evropského společenství se zaměřením na naléhavá varování týkající se potravin, která se později rozšířila i na krmiva. Až v roce 2002 byla existence systému kodifikována s povinným zapojením členských států. Právním základem RASFF byl článek 50 Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 (*General Food Law*), kterým byly stanoveny obecné zásady a požadavky potravinového práva, byl zřízen Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA; *European Food Safety Authority*) a byly stanoveny postupy týkající se bezpečnosti potravin.

K výměně informací dochází nepřetržitě a naléhavá oznámení jsou odesílána, přijímána a efektivně zodpovězena hromadně v rámci celého systému. Řada rizik pocházejících z potravin je tímto způsobem tedy odvrácena dříve, než způsobí škodu, a je tak i součástí strategie „*From Farm to Fork*“. RASFF umožňuje rychlé a účinné sdílení informací o nebezpečných potravinách nebo krmivech mezi členy systému, do nichž patří Evropská komise (EK), členské státy EU,

EFSA a země Island, Lichtenštejnsko a Norsko patřící do Evropského sdružení volného obchodu (EFTA; *European Free Trade Association*) prostřednictvím členství v Evropském hospodářském prostoru (EHP; *European Economic Area, EEA*), s koordinací přes Sekretariát EFTA (*EFTA Secretariat*). Švýcarsko se od 1. 1. 2009 účastní RASFF pouze částečně, a to výhradně v případě odmítnutí dovozu živočišného původu na hranicích.

Ve všech členských státech a EK byla vytvořena kontaktní místa, mezi nimiž probíhá výměna informací o nebezpečích v potravinách a krmivech. Pokud má některý člen RASFF informace o závažném zdravotním riziku, musí prostřednictvím RASFF okamžitě informovat EK. EK poté vyhodnocuje všechna přichodící hlášení a předává je dál všem členům RASFF prostřednictvím jednoho ze čtyř typů oznámení (Tabulka 1). Členové systému pak provedou kroky podle typu oznámení a okamžitě informují EK o přijatých opatřeních.

Tabulka 1: Typy oznámení vydané EK

VAROVÁNÍ (<i>Allert Notification</i>)	Rizikový výrobek představující vážná přímá nebo nepřímá rizika pro zdraví lidí nebo zvířat jsou nabízena spotřebitelům ke koupi a je tedy nutné rychle jednat a okamžitě zajistit návazné kroky v souladu s právními předpisy a závaznými normami.
INFORMACE (<i>Information Notification</i>)	Rizikový výrobek nesplňuje některé chemické, fyzikální nebo biologické požadavky na zdravotní nezávadnost. Riziko není považováno za závažné, protože není pravděpodobný vznik akutních nepříznivých zdravotních následků, a proto se nevyžaduje bezprostřední zásah (rizikový výrobek již není na trhu nebo se na místní trh vůbec nedostal).
ODMÍTNUTÍ NA HRANICÍCH (<i>Border Rejection Notification</i>)	Zásilky potravin a krmiv, které byly testovány a odmítnuty z důvodu zdravotního rizika na vnějších hranicích EU (a EHP).
NOVINKY (<i>News Notification</i>)	Veškeré informace týkající se bezpečnosti výrobků, které nebyly oznámeny členským státem jako varování, informace nebo odmítnutí na hranicích, avšak jsou považovány za významné pro kontrolní orgány členských států.

Pozn.: Rizikový výrobek – potravina, krmivo nebo materiál či předmět určený pro styk s potravinami (FCM; *Food Contact Materials*); EHP (*European Economic Area, EEA*) – dohoda rozšiřující části jednotného trhu EU na některé země EFTA; zahrnuje Island, Lichtenštejnsko a Norsko, ale ne Švýcarsko; členské státy EHP musí dodržovat pravidla EU

týkající se vnitřního trhu, aby měly přístup k jednotnému trhu EU; EHP umožňuje volný pohyb zboží, služeb, kapitálu a osob mezi členskými státy EU a EHP.

V České republice je fungování RASFF upraveno Nařízením vlády č. 98/2005 Sb., kterým byl stanoven systém rychlého varování o vzniku rizika ohrožení zdraví lidí z potravin a krmiv. Systém RASFF v ČR funguje v souladu s ustanovením § 18 odst. 2 Zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a § 16b Zákona č. 91/1996 Sb., o krmivech, ve znění pozdějších předpisů. Dalším souvisejícím legislativním dokumentem je usnesení vlády ČR č. 323 ke Strategii bezpečnosti potravin a výživy 2030, jehož hlavním cílem je zajištění výroby a uvádění pouze bezpečných a kvalitních potravin na trh a posílení ochrany spotřebitelů. Strategie stanovuje opatření pro zajištění dlouhodobé udržitelnosti a funkčnosti systému bezpečnosti potravin a klade důraz na efektivní spolupráci mezi zapojenými subjekty a orgány státní správy.

Detailní úprava úkolů člena RASFF je poté upravena v dokumentu Metodický postup přenosu informací v rámci systému RASFF v ČR, který je závazný pro všechny členy sítě RASFF v ČR a jsou v něm také definovány vnitřní postupy jednotlivých ústředních orgánů státní správy. Českým národním kontaktním místem (NKM) pro RASFF je Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) se sídlem v Brně. Pracovník NKM zastupuje ČR na jednáních Pracovní skupiny pro RASFF při EK, kde je řešena organizace jednotných postupů systému RASFF v rámci EU. NKM dále soustřeďuje informace od všech dozorových orgánů nad potravinami a krmivy v ČR. Ministerstvo zemědělství (MZe), Ministerstvo zdravotnictví (MZ), SZPI, Státní veterinární správa (SVS), Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZUZ), Státní úřad pro jadernou bezpečnost (SÚJB), celní orgány, orgány veterinárního dozoru a orgány ochrany veřejného zdraví jsou členy sítě RASFF v ČR. Pokud některý z těchto dozorových orgánů zjistí výskyt nebezpečného výrobku, NKM neprodleně předává informace EK. ČR je poté zpětně informována o kontrolních zjištěních v členských státech EU. Celý systém v ČR je koordinován MZe (sekretariát Koordinační skupiny bezpečnosti potravin, Odbor bezpečnosti potravin) v součinnosti s MZ.

Na veřejně dostupných stránkách Informačního centra bezpečnosti potravin (součást Odboru bezpečnosti potravin MZe) jsou zveřejňovány týdenní přehledy notifikací v rámci systému RASFF zpracované na základě přehledů vydaných EK. MZe navíc pravidelně zpracovává také Zprávu o činnosti systému RASFF v ČR. Zpráva obsahuje vysvětlení fungování systému, zhodnocení funkčnosti systému, textové a grafické vyhodnocení jednotlivých typů oznámení a toxikologický slovníček.

Užitečné odkazy:

- Informační centrum bezpečnosti potravin – Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF): <https://bezpecnostpotravin.cz/system-rychleho-varovani-pro-potraviny-a-krmiva-rasff/>
- European Commission, Food, Farming, Fisheries, Food Safety – Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF): https://food.ec.europa.eu/safety/rasff_en
- European Commission – RASFF Window: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search>

2.1. Zadání semestrálního úkolu – vypracování RASFF hlášení

Na předem zvolený termín cvičení si připravte aktuální referát/zajímavost z hlášení v systému RASFF pro konkrétní týden. Referát zpracujte jako krátkou prezentaci či ústní sdělení. Pro nalezení požadovaných informací využijte užitečné odkazy z předchozí kapitoly. Předmět hlášení se nesmí opakovat v rámci cvičení, tedy smí být prezentován pouze jednou za semestr. Lze se například zaměřit i na hlášení s vysokou incidencí za určité časové období či naopak na vzácná hlášení a kuriozity s nízkou četností apod.

3. Mikrobiologické požadavky na potraviny

Cílem této kapitoly je seznámit studenty s mikrobiologickými požadavky na potraviny a jejich legislativním rámcem. Kapitola objasňuje význam mikrobiologických kritérií, terminologii a principy jejich stanovení. Součástí je vysvětlení pojmu indikátorové mikroorganismy a jejich role při hodnocení produkční kvality a bezpečnosti potravin, což tvoří teoretický základ pro následující laboratorní cvičení.

Bezpečnost potravin je základním principem evropské potravinové politiky, která zahrnuje hygienu výroby potravin, kontrolní mechanismy, monitoring potravních řetězců a bezpečnost krmiv. Na udržení funkčnosti tohoto systému se významně podílí řada státních organizací a institucí financovaných státem tvorbou legislativy, kontrolou zdravotní bezpečnosti a kvality, aplikací vědeckých stanovisek do praxe, informováním a vzděláváním spotřebitelů. Pro hodnocení kvality potravin a krmiv je nezbytné dodržovat limity a zásady stanovené platnou legislativou. Tyto předpisy je vždy nutné interpretovat v aktuálním znění, včetně všech pozdějších novelizací.

Požadavky na hygienu jsou stanoveny v tzv. **hygienickém balíčku**, což je soubor nařízení Evropského parlamentu a Rady a nařízení Komise upravujících hygienické postupy v potravinářství. Jeho cílem je zajistit, aby při výrobě, manipulaci a dalších činnostech

s potravinami nebyla ohrožena jejich zdravotní nezávadnost. Hygienický balíček je tedy souborem evropských nařízení, která jsou v praxi doplňována národními předpisy. Jako nejvýznamnější lze zmínit: Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004 o hygieně potravin, Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Z těchto dokumentů vychází následující informace popsané v této kapitole.

Obecně platným faktem je, že potraviny nesmí obsahovat mikroorganismy nebo jejich toxiny či metabolity v množstvích, která představují nepřijatelné riziko pro lidské zdraví. V rámci těchto nařízeních byly stanoveny obecné požadavky na bezpečnost potravin, podle nichž potravina nesmí být uvedena na trh, není-li bezpečná. Určení mikrobiologických kritérií je poté vhodné pro stanovení přijatelnosti potravin a postupu jejich výroby, manipulace a distribuce, a jejich aplikace v praxi by měla být nedílnou součástí provádění postupů založených na zásadách analýzy rizik a kritických kontrolních bodů (HACCP; *Hazard Analysis and Critical Control Points*) a dalších opatření na kontrolu hygieny. Mikrobiologická bezpečnost tedy musí být zajišťována zejména prevencí, tzv. **hygienou potravin** (opatření a podmínky nezbytné pro omezování nebezpečí a pro zajištění vhodnosti potraviny k lidské spotřebě s přihlédnutím k jejímu určenému použití) a provozovatelé potravinářských podniků poté musí mikrobiologická kritéria vždy dodržovat. Každý členský stát navíc musí zajistit také pravidelné úřední kontroly.

Pro správnou interpretaci těchto legislativních dokumentů, je nezbytné rozumět následujícím pojmům:

- **mikroorganismy** jsou bakterie, viry, kvasinky, plísňe, řasy, prvoci, mikroskopičtí cizopasní helminti a jejich toxiny a metabolity;
- **mikrobiologické kritérium** vymezuje přijatelnost produktu, partie potravin nebo procesu na základě nepřítomnosti, přítomnosti či počtu mikroorganismů a/nebo na základě množství jejich toxinů/metabolitů na jednotku/y hmotnosti, objemu, plochy či partie;
- **kritérium bezpečnosti potravin** vymezuje přijatelnost produktu nebo partie potraviny, které se vztahuje na produkty uváděné na trh;
- **kritérium hygieny výrobního procesu** udává přijatelné fungování výrobního procesu. Toto kritérium se nevztahuje na produkty uváděné na trh. Stanoví orientační hodnotu kontaminace, při jejímž překročení jsou vyžadována nápravná opatření s cílem udržet hygienu procesu v souladu s potravinovým právem;

- **partie** je skupina nebo soubor identifikovatelných produktů získaných na základě určitého procesu za prakticky totožných okolností a vyprodukovaných na určitém místě v rámci vymezeného produkčního období;
- **doba údržnosti** je období předcházející buď datu „spotřebujte do“, nebo datu minimální trvanlivosti;
- **potravina určená k přímé spotřebě** je potravina, která je producentem nebo výrobcem určena k přímé lidské spotřebě, aniž by bylo nutné ji tepelně upravovat či jinak zpracovávat za účelem účinného odstranění či snížení dotčených mikroorganismů na přijatelnou úroveň;
- **vzorek** je soubor tvořený jednou nebo několika jednotkami nebo část materiálu, který/á byl/a vybrán/ a různými způsoby z celku nebo z významného množství materiálu a který/á má poskytnout informace o daném znaku zkoumaného celku nebo materiálu a má tvořit základ pro rozhodnutí o dotyčném celku nebo materiálu nebo o procesu, který vedl k jeho vzniku;
- **reprezentativní vzorek** je vzorek, v němž jsou zachovány znaky partie, z níž je odebrán.

Vzhledem k tomu, že se mikrobiologie potravin během technologického zpracování a skladování mění jak z kvantitativního i kvalitativního hlediska, a protože není možné vyšetřovat všechny suroviny, produkty a nástroje na přítomnost všech nežádoucích mikroorganismů, byly definovány tzv. **indikátory mikrobiologické kvality a bezpečnosti potravin**. Jedná se o vybrané mikroorganismy a jejich metabolity, jejichž přítomnost koreluje s mikrobiologickým stavem a samotnými procesy probíhajícími v potravinách.

3.1. Indikátorové mikroorganismy a metabolity

Suroviny, potraviny, stroje a nástroje používané pro výrobu potravin musí být pravidelně mikrobiologicky vyšetřovány za účelem kontroly dodržení správných technologických postupů výroby pro zachování jejich trvanlivosti a hygienické nezávadnosti. Protože není možné vyšetřovat potravinářské produkty a předměty používané pro jejich výrobu na všechny nežádoucí mikroorganismy, byly vybrány tzv. indikátory mikrobiologické kvality a bezpečnosti potravin. Jedná se o vybrané mikrobiální druhy nebo rody, jejichž přítomnost a kvantita informuje o mikrobiologickém stavu a procesech probíhajících v potravinách. U potravin, které prošly technologickými procesy, kterými byly mikroorganismy zničeny (sterilace, pasterace, filtrace, ozařování, použití hydrostatického tlaku apod.), které tudíž není možné běžně používanými

kultivačními metodami detekovat, se jako indikátory mikrobiologické kvality používají mikrobiální metabolity. V některých případech se metabolity stanovují proto, že jejich stanovení je jednodušší a efektivnější než stanovení samotných mikroorganismů. Indikátorové mikroorganismy lze rozdělit na indikátory produkční kvality a na indikátory bezpečnosti potravin.

3.1.1. Indikátory produkční kvality

Indikátory produkční kvality jsou organismy a jejich metabolické produkty, které jsou v určitém množství přítomny v potravinách a indikují především kvalitu použitých surovin. Aby indikátory produkční kvality plnily své funkce, musí splňovat tato kritéria: přítomnost v detekovatelném množství ve všech potravinách (hlavně při zhoršení kvality); jejich růst a množství jsou v negativní korelaci s kvalitou produktů; snadná stanovitelnost a odlišitelnost od ostatních mikroorganismů; rychlá stanovitelnost, nejlépe během jednoho pracovního dne; rozvoj by neměl být negativně ovlivněn jinými mikroorganismy v potravíně.

Obecně platí, že nejspolehlivější indikátory produkční kvality se specificky vyskytují v určitém produktu a jsou většinou spojovány s rozvojem senzorických vad nebo technologických problémů. V následujícím textu jsou uvedeny vybrané typické příklady **mikrobiálních indikátorů produkční kvality** pro konkrétní skupinu potravin, případně nápojů.

Acetobacter spp. a bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou typickými indikátorovými mikroorganismy u alkoholických nápojů. *Acetobacter* spp. konkrétně oxiduje etanol na kyselinu octovou, která způsobí nežádoucí octovou pachut' a zvýší kyselost, zatímco BMK metabolizují sacharidy na kyselinu mléčnou, která mění aroma a ovlivní pH produktu, a může způsobit i jeho zákal a sediment. U chlebového kvásku je příkladem *Bacillus* spp., který způsobuje vady upečeného chleba, jak v konzistenci, tak chuti. Jako další běžně používané indikátory lze uvést *Clostridium* spp. u tvrdých sýrů a masových konzerv, ve kterých produkuje senzoricky nežádoucí plyny, *Lactococcus lactis* u syrového mléka, který zhoršuje jeho konzistenci a chuť, a také *Pseudomonas* spp. u chlazených masných, rybích a mléčných produktů, ve kterých svojí proteolytickou a lipolytickou aktivitou způsobuje osliznutí, barevné skvrny a zápach. Mikroskopická plíseň *Byssoschlamys* spp. poté mění nežádoucím způsobem konzistenci kompotů a způsobuje zákal a kvasinky, obecně metabolizující cukry na etanol a CO₂, které například u ovocných koncentrátů způsobují pění, zákal, změnu chuti a aroma. Konkrétně *Zygosaccharomyces bailii* je poté používaným indikátorovým mikroorganismem u majonéz a dresinků.

Celková mikrobiologická kvalita daného produktu je pak funkcí počtu příslušného mikroorganismu, který způsobuje vady nebo kažení produktů. Trvanlivost potravin je možné prodloužit omezením rozvoje těchto mikroorganismů. Lze tedy konstatovat, že mikrobiální indikátory produkční kvality jsou nežádoucí mikroorganismy, jejichž rozvoj způsobuje ztrátu kvality produktu.

Mikrobiologická kvalita potravin může být dále hodnocena nebo předpovězena také na základě stanovení **metabolických produktů**, jakožto **indikátorů produkční kvality**, specifických pro určitý mikroorganismus. Typické příklady těchto metabolitů v konkrétní skupině potravin a nápojů jsou uvedeny v následujícím textu.

Metabolitem indikujícím kvalitu mražených ovocných koncentrátů je diacetyl, který je metabolickým produktem bakteriální či kvasinkové fermentace způsobující nežádoucí máselné aroma. Dalším příkladem je etanol, který je produkován mikroorganismy fermentující sacharidy, které se podílejí na kažení konzervovaných rybích produktů a ovocných džusů, u kterých způsobuje chuťové vady. Kyselina mléčná je poté nejčastěji detekovanou organickou kyselinou ve zkažených zeleninových konzervách. Těkavé dusíkaté látky (např. amoniak, metylamin a dimethylamin) jsou nežádoucími vedlejšími metabolickými produkty rozkladu bílkovin v masných a rybích produktech, u kterých způsobují nepříjemný zápach. Dalším příkladem jsou těkavé mastné kyseliny v mléčných výrobcích, které vznikají rozkladem tuků a způsobují žluknutí (aldehydy u másla a zmrzlin) nebo jako produkty mikrobiální fermentace (butyrát, acetát apod.). Všechny tyto zmiňované metabolity mohou v potravinách způsobovat nežádoucí senzorické vady. Jako další příklad může být uveden i acetoin, vznikající jako vedlejší produkt fermentace, který významně ovlivňuje změnu aroma, která není vždy žádoucí. A stejně tak sulfan, vznikající při mikrobiální fermentaci sirných aminokyselin v masných, vaječných a mléčných produktech, způsobuje nežádoucí zápach po zkažených vejcích.

Některé zdroje řadí k metabolickým indikátorům produkční kvality i toxické biogenní aminy (putrescin, kadaverin a histamin). Jedná se o metabolity často detekované zejména v potravinách živočišného původu, jako jsou masové a rybí konzervy. Vznikají jako produkty rozkladu bílkovin a mikrobiální fermentace. Histamin vzniká dekarboxylací aminokyselin (zejména histidinu) působením bakteriálních enzymů během rozkladu potravin, zejména ryb. Při konzumaci potravin s vysokým obsahem histaminu může dojít k hypersenzitivní reakci organismu, neboť histamin působí jako lokální mediátor alergických reakcí. Vzhledem k tomu, že histamin představuje riziko vysokého toxického účinku na lidské zdraví, lze ho zařadit na pomezí s indikátory bezpečnosti potravin.

3.1.2. Indikátory bezpečnosti potravin

Druhou skupinou indikátorových mikroorganismů jsou indikátory bezpečnosti potravin, které se stanovují pro zajištění zejména hygienické kvality a zdravotní nezávadnosti potravin. Jedná se o mikroorganismy, které v potravinách nebo nápojích doprovází patogeny. Stejně jako indikátory produkční kvality musí být snadno a rychle zjistitelné a jasně a jednoduše odlišitelné od ostatních mikroorganismů v potravinách. Mezi další kritéria, která musí tyto mikroorganismy splňovat, patří ještě další podmínky: musí být přítomny vždy, když jsou v potravine přítomny patogenní mikroorganismy; jejich počet by měl být v pozitivní korelaci s počtem patogenů; mají stejné požadavky na prostředí a stejnou růstovou rychlost jako patogeny; mají životnost nejméně stejnou, nebo o něco delší než patogeny; nesmí být přítomny v potravinách, které neobsahují patogenní mikroorganismy.

Jako příklad mikroorganismů indikujících bezpečnost potravin lze uvést **indikátory fekálního znečištění**. Kontaminace potravin a pitné vody fekálními bakteriemi představuje velmi závažné zdravotní riziko, protože většina patogenních bakterií způsobujících alimentární onemocnění pochází právě z trávicího traktu. Jako indikátory fekálního znečištění se využívají nejčastěji enterokoky, koliformní bakterie, zejména pak *Escherichia coli* (*E. coli*). Výhodou těchto bakterií je jejich rychlá a snadná detekce a zejména to, že jsou pravidelnou a početnou součástí střevní mikrobioty.

Užitečné odkazy:

- Online portál Ministerstva zemědělství, Potraviny – Hygiena potravin: <https://mze.gov.cz/public/portal/mze/potraviny/hygiena-potravin>
- Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:02005R2073-20200308>
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004 o hygieně potravin: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX%3A32004R0852>
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 o zvláštních hygienických pravidlech pro potraviny živočišného původu: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=celex%3A32004R0853>

4. Mikrobiologická analýza mletého masa

Cílem této kapitoly je seznámit studenty s legislativními požadavky na mikrobiologická kritéria v mletém masu a s metodikou jejich laboratorního stanovení. Studenti si prakticky osvojí postupy kultivační analýzy, izolace čistých bakteriálních kultur a jejich konfirmační identifikace pomocí biochemických a chromogenních testů i dalších moderních metod, jako je MALDI-TOF MS. Součástí kapitoly je také vypracování zkušebního protokolu simulujícího výstup z akreditované laboratoře, v němž si studenti procvičí schopnost správně interpretovat a porovnávat získaná data s platnými legislativními limity.

4.1. Legislativní limity

Mikrobiologickou kvalitu masa stanovuje Nařízení Komise (ES) č. 1831/2003, kterým se mění nařízení (ES) č. 1831/2003 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. V rámci praktického laboratorního cvičení bude proveden mikrobiologický rozbor mletého vepřového masa, ve kterém budou stanoveny kritéria hygieny výrobního procesu a bezpečnosti potravin. Pro jednotlivé analýzy musí být vždy dodrženy metodické postupy uvedené v nejnovějším vydání příslušných norem. Stejně tak výsledky musí být srovnány s aktuálně platným nařízením. V tabulkách jednotlivých kapitol daného nařízení týkajících se mikrobiologických kritérií jsou obsaženy pojmy a zkratky, kterým je důležité rozumět:

- **n** = rozsah výběru (počet jednotek tvořících vzorek), tj. počet vzorků určených k vyšetření, jehož účelem je rozhodnout, zda posuzovaná šarže výrobku (nebo její kontrolovaná část) bude posouzena jako vyhovující nebo nevyhovující stanoveným mikrobiologickým požadavkům;
- **m** = množství mikroorganismů, které se připouští u všech vzorků n;
- **M** = množství mikroorganismů, které se ještě připouští u počtu vzorků, který je nižší nebo se rovná c;
- **c** = rozhodné číslo, tj. počet vzorků z výběru n, u nichž se připouští hodnota M;
- pokud se u všech vzorků z výběru n připouští pouze hodnota m (M se nepřipouští), je hodnota c vyjádřena nulou a hodnota M proškrtnutím.

V Kapitole 2. Kritéria hygieny výrobního procesu Nařízení Komise (ES) č. 1831/2003 je obsaženo pět dílčích podkapitol, konkrétně 2.1 Maso a výrobky z něj, 2.2 Mléko a mléčné výrobky, 2.3 Vaječné výrobky, 2.4. Produkty rybolovu a 2.5 Zelenina, ovoce a výrobky z nich.

Vzhledem k zaměření praktického cvičení na mikrobiologickou analýzu mletého masa bude v následujícím textu prezentována a detailněji rozebrána podkapitola **2.1 Maso a výrobky z něj**, která obsahuje osm dílčích podkapitol. Limity pro mleté maso, které jsou uvedeny v Tabulce 2, se nicméně zabývá pouze jedna z nich.

Tabulka 2: Kritéria hygieny výrobního procesu týkající se mletého masa

Kategorie potravin	Mikro-organismy	Plán odběru vzorku		Limity		Analytická referenční metoda
		n	c	m	M	
2.1.6 Mleté maso	Počet kolonií aerobních mikroorganismů ¹	5	2	5×10^5 KTJ/g	5×10^6 KTJ/g	EN/ISO 4833
	<i>E. coli</i> ²	5	2	50 KTJ/g	500 KTJ/g	EN/ISO 16649-1/2

Pozn.: Uvedená mikrobiologická kritéria se vztahují na produkty na konci výrobního procesu. n = rozsah výběru; m = množství mikroorganismů, které se připouští u všech vzorků n; M = množství mikroorganismů, které se ještě připouští u počtu vzorků, který je nižší nebo se rovná c; c = rozhodné číslo, tj. počet vzorků z výběru n, u nichž se připouští hodnota M; ¹Kritérium počet kolonií aerobních mikroorganismů se nevztahuje na mleté maso vyrobené na úrovni maloobchodu, pokud je údržnost výrobku nižší než 24 hodin; ²Kritérium *E. coli* slouží jako indikátor fekální kontaminace ve vzorku.

Výsledky vyšetření vypovídají o mikrobiologické jakosti vyšetřovaného procesu. Interpretace výsledků vyšetření – počet kolonií aerobních mikroorganismů a *E. coli* v mletém mase, masných polotovarech a strojně odděleném mase:

- **vyhovující**, pokud jsou všechny zjištěné hodnoty $\leq m$;
- **příjatelny**, pokud se nejvýše c/n hodnot nachází mezi m a M a zbývající zjištěné hodnoty jsou $\leq m$;
- **nevyhovující**, pokud je jedna nebo více zjištěných hodnot $> M$ nebo se více než c/n hodnot nachází mezi m a M.

V případě nevyhovujících výsledků je opatřením zlepšení hygieny výroby a zlepšení v oblasti výběru a/nebo původu surovin.

V Kapitole 1. Kritéria bezpečnosti potravin Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 je uvedeno 27 dílčích kategorií potravin, ve kterých se sledují různá kritéria bezpečnosti potravin, konkrétně *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter*

sakazakii), *E. coli* a histamin. Limity pro mleté maso, které jsou uvedeny v Tabulce 3, jsou stanoveny pro tři kategorie potravin.

Tabulka 3: Kritéria bezpečnosti potravin týkající se mletého masa

Kategorie potravin	Mikro-organismy	Plán odběru vzorku		Limity		Analytická referenční metoda
		n	c	m	M	
<i>1.4 Mleté maso a masné polotovary určené ke spotřebě za syrova</i>	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	Nepřítomnost v 10 g		EN/ISO 6579
<i>1.5 Mleté maso a masné polotovary vyrobené z drůbežního masa určené ke spotřebě v tepelně upraveném stavu</i>	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	Nepřítomnost v 25 g		EN/ISO 6579
<i>1.6 Mleté maso a masné polotovary vyrobené z jiných druhů než z drůbeže, určené ke spotřebě v tepelně upraveném stavu</i>	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	Nepřítomnost v 10 g		EN/ISO 6579

Pozn.: Uvedená mikrobiologická kritéria se vztahují na produkty uvedené na trh během doby údržnosti výrobku. Tučně je v tabulce zvýrazněna kategorie potravin a mikrobiologické kritérium, které bude při praktickém laboratorním cvičení hodnoceno u vzorku mletého masa. m = množství mikroorganismů, které se připouští u všech vzorků n; M = množství mikroorganismů, které se ještě připouští u počtu vzorků, který je nižší nebo se rovná c; c = rozhodné číslo, tj. počet vzorků z výběru n, u nichž se připouští hodnota M.

Interpretace výsledků vyšetření – *Salmonella* spp. v různých kategoriích potravin:

- **vyhovující**, pokud všechny zjištěné hodnoty poukazují na nepřítomnost příslušné bakterie;
- **nevyhovující**, pokud je přítomnost této bakterie určena v kterékoli jednotce vzorku.

V případě nevyhovujících výsledků vyšetření, musí provozovatelé potravinářských podniků učinit opatření. Příslušný produkt nebo partie potravin nesmí být uvedena na trh nebo musí být okamžitě stažena nebo převzata zpět podle článku 19 Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002. Dále musí provozovatelé vyšetřit příčinu vzniku kontaminace a zajistit další nápravná opatření, aby bylo zabráněno opětovnému výskytu nepřijatelného mikrobiologického znečištění a zdravotního rizika (např. úprava postupů založených na zásadách HACCP, úprava opatření na kontrolu hygieny potravin). Pokud nevyhovující produkty uvedené

na trh, doposud nejsou na úrovni maloobchodu, mohou být podrobeny dalšímu zpracování ošetřením, které odstraní dotyčné nebezpečí. Toto ošetření ale mohou provádět pouze provozovatelé potravinářských podniků jiní než na úrovni maloobchodu.

Užitečné odkazy:

- Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:02005R2073-20200308>
- Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32007R1441>
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 ze dne 28. ledna 2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=celex:32002R0178>

4.2. Zadání semestrálního úkolu – vytvoření zkušebního protokolu

Výstupem stanovení mikrobiologických kritérií mletého masa bude sepsání zkušebního protokolu simulujícího výstup z akreditované laboratoře. Představte si, že zastupujete akreditovanou laboratoř a vyučující Vám zadal/a analýzu vzorku mletého masa, u kterého musíte vyhodnotit, zda vyhovuje platným legislativním limitům. Pro vypracování protokolu byla vytvořena zjednodušená šablona, která Vám bude poskytnuta v elektronické verzi. V šabloně modifikujte odpovídající údaje v částech, které jsou označeny červeně (Obrázek 1).

Pro správnou interpretaci výsledků a jejich srovnání s limity definovanými v Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 nezapomeňte zohlednit i výsledky konfirmačních testů (detailně popsáno v navazujících kapitolách), konkrétně pro *E. coli* a *Salmonella* spp. Pokud nebyly tyto taxony konfirmovány, počty a případnou detekci nelze považovat za spolehlivé. V tomto případě uveďte namísto získaných hodnot detekční limity (např. $< 10^1$ KTJ/g)/ nebo v případě *Salmonella* spp., že přítomnost nebyla prokázána.

Obrázek 1: Šablona zkušebního protokolu

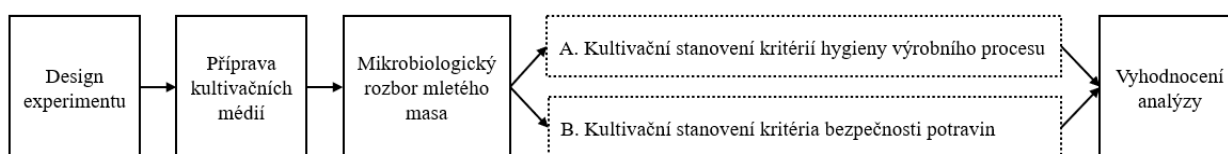
Zkušební protokol: Hygiena a zdravotní nezávadnost potravin (den, čas cvičení)					
Skupina číslo: JMÉNA VŠECH STUDENTŮ VE SKUPINĚ					
Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů					
Kamýcká 129, 165 00 Praha - Suchbát					
IČO: 60460709					
Protokol o zkoušce 1/RRRR					
Majitel	JMÉNO VYUČUJÍCÍ/HO				
Odebral	Majitel				
Číslo vzorku	1-5(6)	Zahájeno			DD.MM.RRRR
Doručeno	DD.MM.RRRR	Vyšetření ukončeno			DD.MM.RRRR
Číslo protokolu	Popis vzorku - čerstvé mleté maso z pultu				
1	Vepřové mleté maso 100 %	1			
2	Vepřové mleté maso 100 %	2			
3	Vepřové mleté maso 100 %	3			
4	Vepřové mleté maso 100 %	4			
5	Vepřové mleté maso 100 %	5			
(6	Vepřové mleté maso 100 %	6)			
VÝSLEDKY					
Číslo protokolu	Zkušební metoda	Stanovení <i>E.coli</i> kultivační metodou na selektivním mediu KTJ/g	Průkaz bakterie rodu <i>Salmonella</i> v 10 g		
1	X,XX × 10 ^x	X,XX × 10 ^x	prokázána/neprokována		
2	X,XX × 10 ^x	X,XX × 10 ^x	prokázána/neprokována		
3	X,XX × 10 ^x	X,XX × 10 ^x	prokázána/neprokována		
4	X,XX × 10 ^x	X,XX × 10 ^x	prokázána/neprokována		
5	X,XX × 10 ^x	X,XX × 10 ^x	prokázána/neprokována		
(6	X,XX × 10 ^x	X,XX × 10 ^x	prokázána/neprokována)		
Hodnocení	Vzorek o počtu pěti (šesti) kusů <u>mikrobiologicky vyhovuje/(je přijatelný)/nevyhovuje</u> dle nařízení ES 2073/2005 v platném znění.				
Vyřízeno dne:	DD.MM.RRRR	Protokol vyplnil:			JMÉNA STUDENTŮ
Na vědomí:	majitel vzorku	Protokol schválil:			ZODPOVĚDNÝ STUDENT

Pozn.: Pro správnou interpretaci výsledků je nezbytné jejich srovnání s limity definovanými v Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 a provedení konfirmačních testů pro potvrzení stanovených počtů *E. coli* a případně detekované *Salmonella* spp. Všechny tyto postupy jsou detailně popsány v následujících kapitolách.

4.3. Kultivační stanovení mikrobiologických kritérií

Pro stanovení mikrobiologických kritérií v mletém mase, konkrétně počtů aerobních mikroorganismů a *E. coli* spolu s kvalitativní detekcí *Salmonella* spp., definovaných v Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007, bude provedena kultivační analýza deskovou metodou s použitím tekutých a polotuhých pěstebních prostředí s použitím selektivních faktorů a nastavením různých kultivačních podmínek podle stanovované skupiny mikroorganismů. Některé z nich poté musí být dále confirmovány. Pro mikrobiologický rozbor je nezbytné si předem důkladně danou analýzu naplánovat (Obrázek 2).

Obrázek 2: Plán experimentu stanovení kritérií sledovaných u mletého vepřového masa



4.3.1. Potřebná média

Média, která jsou používána pro kultivační stanovení mikroorganismů jsou **elektivní** (tzn. neselektivní, obecná) umožňující stanovení všech přítomných mikroorganismů za dané kultivační podmínky nebo **selektivní**, která obsahují selektivní složky umožňující stanovení pouze určité skupiny, rodu nebo dokonce druhu mikroorganismů. Selektivně může působit extrémní hodnota pH, limitace některé z živin a solí nebo přídavek antimikrobiální látky (antibiotika, rostlinného extraktu apod.). Velmi často bývají součástí selektivních médií i barevné indikátory, které umožňují diferenciaci mikroorganismů na základě specifických kultivačních znaků narostlých bakteriálních kolonií. Samotné kultivační podmínky, například přítomnost/nepřítomnost kyslíku v prostředí, teplota, světlo apod., mohou působit selektivně. Po kultivační detekci je nicméně důležité pamatovat na ověření selektivity médií, pokud není pro použité médium definováno jinak, ať už zařazením doporučených konfirmačních testů či dalších identifikací.

Pro získání úředně platných výsledků jsou mikrobiologické rozborů zadávány akreditovaným laboratořím, které používají validované metody přesně definované v příslušných ČSN, ISO a EN normách odrážejících platnou legislativu na evropské i národní úrovni. Výsledky jsou poté zaznamenány v protokolu akreditované laboratoře, který má úřední váhu a je právně vymahatelný.

V rámci praktického cvičení předmětu Hygiena a zdravotní nezávadnost potravin si v neakreditované mikrobiologické laboratoři vyzkoušíte modifikovaný způsob kultivačního stanovení vybraných skupin mikroorganismů pomocí neselektivního, semiselektivního a selektivního média (Tabulka 4).

Tabulka 4: Kultivační média potřebná stanovení konkrétní skupiny mikroorganismů

Kultivační médium	Cílená skupina mikroorganismů
Masopeptonový agar	Počet aerobních mikroorganismů
MacConkey agar (Oxoid)	Koliformní bakterie (<i>E. coli</i>)
Rappaport-Vassiliadis bujón (Oxoid)	Semiselektivní pomnožení salmonel
SS agar (Oxoid)	<i>Salmonella</i> spp.

Získané výsledky nebudou mít úřední platnost a poslouží výhradně pro výukové účely. Kromě kultivačních médií je nezbytné si předem připravit také sterilní ředící roztok do zkumavek s víčkem, konkrétně 0,9% roztok NaCl (Sigma-Aldrich, USA).

4.3.1.1. Masopeptonový agar

Masopeptonový agar (MPA) je základní neselektivní kultivační médium, které umožňuje růst širokého spektra mikroorganismů s nenáročnými nutričními požadavky. Obsahuje masový extrakt, pepton, chlorid sodný a agar. Slouží nejen pro přímou kultivaci, ale také jako základ pro přípravu obohacených nebo selektivních médií, kdy dle potřeby může být doplněn například krví, sérem, jinými biologickými tekutinami nebo antimikrobiálními látkami. V mikrobiologické praxi se běžně používá také pro sub-kultivaci bakteriálních izolátů určených k biochemickým a sérologickým testům. Na trhu je dostupná celá řada komerčních variant tohoto typu média.

V rámci praktického cvičení bude pro stanovení počtu kolonií aerobních mikroorganismů v mletém mase použit Nutrient Agar (Oxoid). Pro přípravu 1 litru média rozpustíte 28 g dehydratované směsi v destilované vodě, promíchejte a sterilujte v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Takto připravené médium obsahuje 1 g masového extraktu („Lab-Lemco“ prášek), 2 g kvasnicového extraktu, 5 g peptonu, 5 g NaCl, 15 g agaru. Při 25 °C má médium pH 7,4 ± 0,2.

Po vytemperování média ve vodní lázni (50 °C) může být agar použit k zalití inokul v Petriho miskách. Dále může být agar asepticky nalit do sterilních velkých Petriho misek a ponechán utuhnout při laboratorní teplotě. Takto připravené misky lze poté ihned použít pro inokulace nebo je lze krátkodobě skladovat v chladničce. Pokud jsou misky tímto způsobem skladovány, je nutné je před plánovaným použitím nejprve vysušit.

4.3.1.2. MacConkey agar

MacConkey agar (MCA) je selektivně-diferenciační kultivační médium určené pro detekci, izolaci a stanovení počtu koliformních bakterií a některých střevních patogenů z potravin, vody, mléka a dalších biologických materiálů. MCA obsahuje pepton jako zdroj živin, chlorid sodný udržující osmotickou rovnováhu a agar. Dále obsahuje žlučové soli, které inhibují růst nestřevních bakterií, a kombinaci laktózy spolu s barevným indikátorem neutrální červení, která umožní diferenciaci vykultivovaných bakterií na základě odlišných kultivačních znaků jejich kolonií. Neutrální červeně je bazické (kationické) fenazinové barvivo fungující jako acidobazický indikátor, doplňující selektivitu média vůči grampozitivním bakteriím. Bakterie fermentující laktózu produkují kyseliny, které sníží pH způsobující změnu barvy kolonie ze žluté na růžovo-červenou a většinou i vytvoří zóny precipitovaných žlučových solí kolem bakteriálních kolonií. Kolonie ostatních bakterií, které laktózu nevyužívají mají jiné než červené zbarvení (Tabulka 5).

Tabulka 5: Charakteristiky kolonií na MacConkey agaru po 24h kultivaci při 37 °C

Bakterie	Popis kolonie
<i>E. coli</i>	červené velké
<i>Enterococcus</i> spp.	červené malé
<i>Aerobacter</i> spp.	růžové mukoidní
<i>Staphylococcus</i> spp.	světle růžové
<i>Salmonella</i> spp.	slámové žluté
<i>Proteus</i> spp.	slámové žluté
<i>Pseudomonas</i> spp.	zelenohnědé

V rámci praktického cvičení bude MCA (Oxoid) použit pro kvantifikaci kolonií koliformních bakterií a možnou diferenciaci *E. coli* z mletého masa. Pro přípravu 1 litru média rozpustíte 52 g dehydratované směsi v destilované vodě, promíchejte a sterilujte v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Takto připravené tmavě červené médium obsahuje 20 g peptonu, 10 g laktózy, 5 g žlučových solí, 5 g NaCl, 0,075 g neutrální červeně a 12 g agaru. Při 25 °C má pH $7,4 \pm 0,2$.

Po vytemperování média ve vodní lázni (50 °C) asepticky nalijte agar do velkých Petriho misek a nechte utuhnout při laboratorní teplotě. Připravené misky lze poté ihned použít nebo krátkodobě skladovat v chladničce. Pokud jsou misky tímto způsobem skladovány, je nutné je před plánovaným použitím nejprve vysušit.

4.3.1.3. Rappaport-Vassiliadis bujón

Rappaport-Vassiliadis bujón je semiselektivní pomnožovací médium určené především pro stanovení salmonel z potravin, vzorků trávicího traktu a dalších biologických či environmentálních materiálů. Médium je navrženo tak, aby potlačilo růst většiny grampozitivních bakterií, a bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* kromě salmonel, a to kombinací několika selektivních faktorů. Vysoký osmotický tlak způsobený zvýšenou koncentrací chloridu hořečnatého salmonely dobře tolerují, stejně jako nižší hodnotu pH (5,2) a přítomnost malachitové zeleně, která inhibuje růst citlivějších bakterií. Malachitová zeleň je bazické (kationické) trifenylmetanové barvivo, které se váže na buněčné stěny, narušuje membrány a může interferovat s enzymy. Toxické je i pro člověka. V Rappaport-Vassiliadis bujónu funguje také jako slabý barevný indikátor, kdy při kyselém pH dochází ke změně jeho ionizačního stavu způsobujícího změnu barvy ze zelené na žlutozelenou až žlutohnědou. Salmonely mají navíc i nižší nutriční nároky než většina ostatních enterobakterií, což jim v tomto prostředí poskytuje růstovou výhodu.

V rutinní praxi bývá suspenze získaná po předchozím pomnožení v peptonové vodě naočkována do Rappaport-Vassiliadis bujónu (Oxoid) a kultivována při 41 °C po dobu 24 hodin. Růst salmonel (ale i některých příbuzných bakterií) se projevuje snížením pH v důsledku tvorby organických kyselin, což způsobí zmiňovanou změnu barvy média z původní zelené na žlutozelenou až žlutohnědou. Pro následnou detekci salmonel se běžně využívá kultivace rozetřené suspenze pomnožených bakterií na selektivním *Salmonella Shigella* agaru nebo Xylose Lysine Deoxycholate agaru s následnou nezbytnou confirmací identity.

Pro přípravu 1 litru bujónu rozpustěte 30 g dehydratované směsi v destilované vodě, promíchejte, rozplňte po 50 mL do 100ml Erlenmeyerových baněk s přídavkem 4–5 skleněných perel pro lepší homogenizaci vzorku a sterilujte v autoklávu při 115 °C po dobu 15 minut.

Médium obsahuje 5 g sójového peptonu, 8 g NaCl, 1,6 g KH₂PO₄, 40 g hexahydrátu chloridu hořečnatého a 0,04 g malachitové zeleně. Při 25 °C má pH 5,20 ± 0,2.

Připravený bujón lze použít po jeho zchlazení na pokojovou teplotu, případně lze krátkodobě skladovat v chladničce.

4.3.1.4. *Salmonella Shigella* agar

Salmonella Shigella agar (SSA) je selektivně-diferenciační kultivační médium určené pro izolaci a odlišení bakterií rodů *Salmonella* a *Shigella* z potravin, vody, klinických vzorků a dalších biologických materiálů. V některých případech může médium detekovat i jiné

enterobakterie, například některé kmeny *E. coli*. Selektivní účinek zajišťují žlučové soli, citrát sodný a brilantová zeleň, které inhibují růst grampozitivních bakterií, většiny koliformních bakterií a bakterií rodu *Proteus*. Brilantová zeleň je bazické (kationické) triarylmetanové barvivo, které je v SSA selektivním činidlem, nikoliv acidobazickým indikátorem, které narušuje permeabilitu membrán a proteosyntézu. Diferenciační funkce média je poté založena na přítomnosti laktózy a barevného indikátoru neutrální červeně, která je bazické (kationické) fenazinové barvivo v tomto médiu fungující jako acidobazický indikátor. Bakterie fermentující laktózu (např. většina kmenů *E. coli*) produkují kyseliny, které snižují pH a způsobují změnu barvy kolonií na růžovo-červenou. Naopak bakterie rodu *Salmonella* laktózu nefermentují a zároveň produkují sirovodík (H_2S) z thiosulfátu sodného, který je v médiu také obsažen. H_2S poté reaguje s citrátem železitým za vzniku černého sulfidu železnatého, což vede k tvorbě kolonií se světlým (až bezbarvým) okrajem a černým středem. Naproti tomu bakterie rodu *Shigella* laktózu nefermentují a H_2S neprodukují, proto tvoří světlé, růžové až bezbarvé kolonie bez černého zbarvení.

V rámci praktického cvičení bude SSA (Oxoid) použit pro detekci a odlišení *Salmonella* spp. od ostatních enterobakterií ze vzorku mletého masa. Pro přípravu 1 litru média rozpustíte 63 g dehydratované směsi v destilované vodě, za stálého míchání přivedete k varu a mírně provařte, dokud se agar zcela nerozpustí (neautoklávuje se).

Takto připravené médium obsahuje 5 g masového extraktu („Lab-Lemco“ prášek), 5 g peptonu, 10 g laktózy, 8,5 g žlučových solí, 10 g citrátu sodného, 8,5 g thiosulfátu sodného, 1 g citrátu železnatého, 0,00033 g brilantové zeleně, 0,025 g neutrální červeně a 15 g agaru. Při 25 °C má pH $7,0 \pm 0,2$.

Po vytemperování média ve vodní lázni (50 °C) asepticky nalijte agar do velkých Petriho misek a nechte ztuhnout při laboratorní teplotě. Připravené misky lze ihned použít nebo krátkodobě skladovat v chladničce. Pokud jsou misky tímto způsobem skladovány, je nutné je před použitím nejprve vysušit.

4.3.1.5. Xylose Lysine Deoxycholate agar

Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD) je selektivně-diferenciační kultivační médium, kterým lze cílit na kultivaci stejné skupiny mikroorganismů jako s SSA. Navíc je dle aktuálně platné normy ISO 6579-1:2017 použití XLD povinné pro izolaci rodu *Salmonella* z masa a masných výrobků. Dále se běžně používá i pro izolaci a odlišení bakterií rodu *Salmonella* a *Shigella* a dalších gramnegativních střevních bakterií z potravin, vody, klinických vzorků

a dalších biologických materiálů. Selektivní účinek zajišťují žlučová sůl deoxycholát sodný a v menší míře i nízké pH média, které inhibují růst grampozitivních bakterií a omezují množení také části gramnegativní střevní mikrobioty. Diferenciační funkce média je založena na přítomnosti xylózy, laktózy, sacharózy, aminokyseliny lyzinu a thiosulfátu sodného. Většina enterobakterií (kromě *Shigella* spp.) totiž fermentuje xylózu, což vede k počátečnímu snížení pH a žlutému zbarvení kolonií a okolního média. *Salmonella* spp. nicméně po vyčerpání xylózy využívá i lyzin, který je dekarboxylován na kadaverin, čímž alkalizuje prostředí (změna barvy kolonií zpět ze žluté na červenou). Vyprodukovaný H₂S z thiosulfátu navíc zreaguje s citrátem železitým za vzniku černého sulfidu železnatého, který způsobuje vznik červených kolonií s černým středem. *Shigella* spp. xylózu nefermentuje, proto jejich kolonie zůstávají od počátku červené. Jako acidobazický indikátor v XLD působí fenolová červen (slabě anionické sulfonftaleinové barvivo), která způsobuje při slabě kyselém pH žluté zbarvení, zatímco při alkalickém pH červené až růžové.

V rámci praktického cvičení může být při kultivačním rozboru mletého masa XLD agar (Oxoid) použit jako alternativa k SSA pro odlišení *Salmonella* spp. a *Shigella* spp. od ostatních enterobakterií. Pro přípravu 1 litru média rozpust'ete 55 g dehydratované směsi v destilované vodě, zahřívajte za stálého míchání a přiveďte k varu, dokud se agar zcela nerozpustí (neautoklávuje se).

Takto připravené médium obsahuje 3,0 g kvasničného extraktu, 5 g L-lyzinu, 7,5 g sacharózy, 7,5 g laktózy, 3,5 g xylózy, 5 g NaCl, 6,8 g thiosulfátu sodného, 0,8 g citrátu železitého, 2,5 g deoxycholátu sodného, 0,08 g fenolové červeně a 13,5 g agaru. Při 25 °C má pH 7,4 ± 0,2.

Po vytemperování média ve vodní lázni (50 °C) asepticky nalijte agar do velkých Petriho misek a nechte ztuhnout při laboratorní teplotě. Připravené misky lze ihned použít nebo krátkodobě skladovat v chladničce. Pokud jsou misky tímto způsobem skladovány, je nutné je před použitím nejprve vysušit.

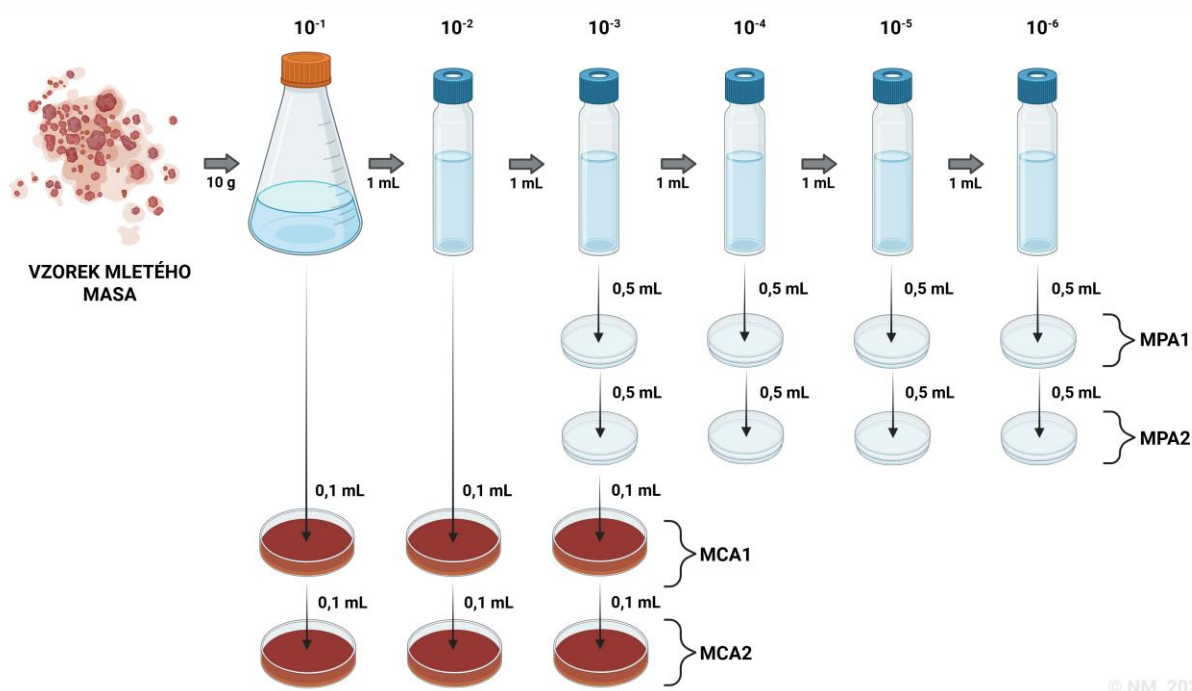
4.3.2. Metodika stanovení mikrobiologických kritérií ve vzorku mletého masa

Pro mikrobiologický rozbor vzorku mletého masa a stanovení kritérií hygieny výrobního procesu je důležité si vše důkladně naplánovat, předem si připravit veškerá potřebná média (sterilní ředící roztok a kultivační půdy) a sterilní materiál.

4.3.2.1. Kritérium hygieny výrobního procesu

Kritéria týkající se mletého masa jsou uvedeny v Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 v podkapitole 2.1 Maso a výrobky z něj v kategorii potravin 2.1.6 Mleté maso. Cílem je tedy stanovit počet kolonií aerobních mikroorganismů a *E. coli*. Design experimentu, konkrétně příprava ředící řady, selekce stanovovaných ředění, a s tím související inokulace Petriho misek, pro stanovení těchto kritérií je uveden v Obrázku 3.

Obrázek 3: Schéma kultivačního stanovení kritérií hygieny výrobního procesu



Pozn.: MPA – masopeptonový agar; MPA1 – první kopie MPA; MPA2 – druhá kopie MPA;
MCA – MacConkey agar; MCA1 – první kopie MCA; MCA2 – druhá kopie MCA.

Každá skupina na cvičení zanalyzuje jeden vzorek mletého masa, čímž bude dosaženo rozsahu výběru (n) pěti vzorků. Pro získání co nejpřesnější výsledků by mělo být stanovení provedeno v co nejkratší době po odebrání vzorku. Prvním krokem mikrobiologické analýzy deskovou metodou je navážení 10 g vzorku mletého masa do sterilní váženky a následná příprava ředící řady. Do Erlenmayerovy baňky s 90 ml fyziologického roztoku a perlami je asepticky přidáno 10 g naváženého vzorku, který je důkladně homogenizován. Tímto způsobem je vytvořeno ředění 10^{-1} . Dále je vzorek sériově naředěn ve zkumavkách s 9 ml fyziologického roztoku do konečného poměru $1:10^6$ g/mL. Tzn., z ředění 10^{-1} je asepticky odebrán pipetou se sterilní špičkou 1 ml zhomogenizované suspenze, který je převeden do další zkumavky, a vzniká

tak ředění 10^{-2} . Dále se postupuje analogicky až do vytvoření ředění 10^{-6} . Na přípravu každého ředění je nutné použít vždy novou sterilní špičku, aby nebyla ovlivněna koncentrace.

Po přípravě ředící řady jsou naředěná a vždy zhomogenizovaná inokula po 0,5 mL umístěna pipetou se sterilní špičkou do malých Petriho misek. Inokulaci misek provádějte postupně od nejvyššího po nejnižší ředění, tedy od nejnižší koncentrace mikrobiálních buněk po nejvyšší, a paralelně, tedy ve dvou kopiích. Následně jsou inokula zalita neselektivním MPA a před jejich utuhnutím je ještě nutné inokula s agarem krouživým pohybem promíchat pro homogenizaci. Tímto způsobem budou stanoveny počty kolonií aerobních mikroorganismů (ředění 10^{-3} až 10^{-6}) s aerobní kultivací při 30 °C po dobu 72 hodin.

Pro stanovení koliformních bakterií a *E. coli* je použit MCA. V tomto případě nejsou inokula zalévána médiem, ale jsou očkována na velkou Petriho misku s předem nalitým a ztuhlým médiem. Na povrch agaru je asepticky naočkováno 100 μ L naředěného inokula (ředění 10^{-1} až 10^{-3}) a vzorek je poté rozetřen po povrchu agaru sterilní plastovou mikrobiologickou hokejkou. Inokulace Petriho misek je prováděna paralelně, tedy ve dvou kopiích. Při roztírání inokul se postupuje opět od nejvyššího ředění po nejnižší a lze použít pouze jednu hokejku, protože tímto způsobem není ovlivněna koncentrace. Misky jsou poté kultivovány aerobně dnem vzhůru při 37 °C po dobu 24 hodin.

Po proběhlé době kultivace jsou spočítány kolonie narostlé na jednotlivých kultivačních půdách, kdy každá spočtená kolonie je označena lihovým popisovačem. Teoreticky z každé bakterie vzniká jedna okem viditelná kolonie, která je přítomna v původním vzorku. Kolonie jsou po kultivaci spočteny. Obecně je uváděno, že počitatelné misky s koloniemi jsou takové, které obsahují 10–150 kolonií v případě použití malých Petriho misek (v našem případě s MPA) a 30–300 v případě velkých Petriho misek (v našem případě s MCA). Přítomnost pouze několika kolonií může indikovat kontaminaci při nedostatečně aseptické práci, nicméně pokud detekovaný počet, přestože malý, dává matematicky smysl, mohou být i tyto počty kolonií zahrnuty do výpočtu. V případě počtů kolonií aerobních mikroorganismů jsou spočítány kolonie všech kultivačních znaků, zatímco pro vyjádření kvantity *E. coli*, jsou spočítány pouze kolonie s typickými znaky, tedy pouze červené velké kolonie.

V případě počtů kolonií aerobních mikroorganismů je pak nutné výsledek vynásobit $2 \times$ a u *E. coli* $10 \times$, protože na agar bylo očkováno pouze 0,5 mL a 100 μ L inokula, nikoliv 1 mL. Konečné množství bakterií je poté vypočteno podle vztahu $P = [(P_1 + P_2)/11] \times F$ (P_1, P_2 – počet kolonií na dvou po sobě jdoucích počitatelných plotnách, F – převrácená hodnota vyššího ředění); a výsledky jsou vyjádřeny jako počet kolonie tvořících jednotku v 1 gramu vzorku

mletého masa (KTJ/g). Získané výsledky vypovídají o přítomnosti a počtu pouze živých mikroorganismů ve vzorku.

Úkol: Proveďte kultivační stanovení kritérií hygieny výrobního procesu ve vzorku mletého masa, tedy kultivačních počtů kolonií aerobních mikroorganismů a *E. coli*. Všechna získaná data, včetně výsledků výpočtů, uveďte do Tabulky 6.

Tabulka 6: Počty stanovených kolonií pro výpočet KTJ/g vzorku

Kultivační médium	Ředění						KTJ/g	KTJ/g
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶		
MPA1	nt	nt						
MPA2	nt	nt						
MCA1				nt	nt	nt		
MCA2								

Pozn.: Spočítané reálné množství kolonií musí být vynásobeno číslem zohledňujícím objem počátečního inokula. Pro stanovení počtu kolonií aerobních mikroorganismů byl použit masopeptonový agar (MPA) ve dvou kopiích, konkrétně Nutrient agar, a pro stanovení počtů *E. coli* MacConkey agar (MCA) ve dvou kopiích. MPA1 – první kopie MPA; MPA2 – druhá kopie MPA; MCA1 – první kopie MCA; MCA2 – druhá kopie MCA; nt – netestováno; KTJ/g – počet kolonií tvořících jednotku vztažených na gram vzorku mletého masa.

Vzhledem k použití selektivně-diferenciačního média pro stanovení *E. coli*, bude pro následující confirmaci izolována čistá kultura (detailně popsáno v kapitole 4.4. Izolace čistých kultur).

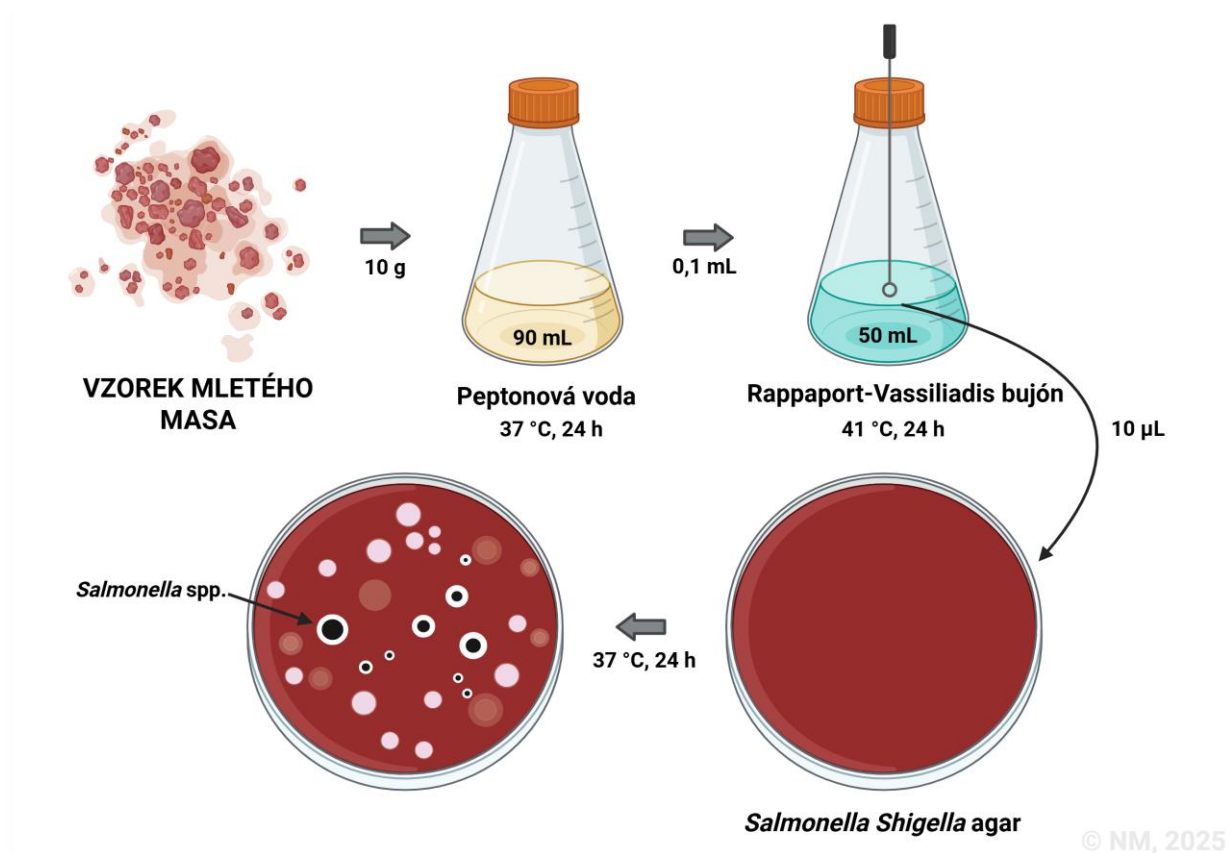
4.3.2.2. Kritérium bezpečnosti potravin

Kritérium bezpečnosti potravin týkající se analyzovaného vzorku mletého masa je uvedeno v Kapitole 1 v kategorii potravin 1.6 Mleté maso a masné polotovary vyrobené z jiných druhů než z drůbeže, určené ke spotřebě v tepelně upraveném stavu. Cílem je tedy prokázat přítomnost nebo nepřítomnost bakterií rodu *Salmonella*.

Obsah salmonel v mletém mase je stanovován ve vzorku o hmotnosti 10 g, v nichž nesmí být přítomna ani jedna buňka této bakterie. Protože není technicky možné stanovit jednu buňku

v tak velké navážce vzorku, veškeré bakterie přítomné v mletém masu nejprve pomnožíme jejich kultivací v peptonové vodě a v případě, že vzorek salmonely obsahuje, dojde tak k jejich namnožení do stanovitelného množství. Dalším krokem je přeočkování suspenze do Rappaport-Vassiliadis bujónu, ve kterém dojde k semiselektivnímu pomnožení salmonel. Posledním krokem je poté natření a kultivace suspenze bakterií z Rappaport-Vassiliadis bujónu na selektivně-diferenciační kultivační médium SSA. Schéma stanovení kritéria bezpečnosti potravin, tedy *Salmonella* spp., je uveden v Obrázku 4.

Obrázek 4: Schéma kultivačního stanovení kritéria bezpečnosti potravin



Pozn.: Na selektivně-diferenciačním kultivačním médiu *Salmonella Shigella* agar mohou narůst kolonie s variabilními kultivačními znaky: bílé kolonie s různě velkým černým středem jsou typické pro *Salmonella* spp., zatímco světle růžové kolonie pro *Shigella* spp.

Do Erlenmayerovy baňky s 90 ml peptonové vody je asepticky přidáno 10 g vzorku mletého masa a vzorek je homogenizován a následně kultivován při 37 °C po dobu 24 hodin. Následně je převedeno 0,1 mL suspenze s pomnoženými mikroorganismy do baňky s 50 mL semiselektivního Rappaport-Vassiliadis bujónu a vzorek je opět důkladně homogenizován a ponechán aerobně kultivovat při 41 °C po dobu 24 hodin. Pokud dojde k pomnožení bakterií,

které produkují kyseliny, sníží se pH média a jeho barva se změní ze zelené na žlutozelenou až žlutohnědou. Pro detekci a konfirmaci případně pomnožených salmonel je poté ještě použita selektivně-diferenciační kultivační půda SSA předem nalitá ve velké Petriho misce, do které je asepticky rozetřena kličkou suspenze bakterií pomnožených v Rappaport-Vassiliardis bujónu. Takto připravené SSA s inokulem je poté aerobně kultivováno při 37 °C po dobu 24 hodin.

Pokud na SSA narostou salmonely, mají bílé kolonie s černým středem. Bakterie rodu *Shigella* pak mají menší světle růžové kolonie. Při zapisování výsledků si запиšte kultivační znaky narostlých kolonií a vyhodnoťte, zda odpovídají charakteristickým znakům.

Úkol: Proved'te kultivační stanovení kritéria bezpečnosti potravin ve vzorku mletého masa, tedy prokázání či neprokázání přítomnosti *Salmonella* spp. Získaná data uveďte do Tabulky 7.

Tabulka 7: Ověření přítomnosti *Salmonella* spp.

Kultivační médium	Bílá kolonie s černým středem (+/-)	Přítomnost <i>Salmonella</i> spp. (ANO/NE)
SSA		

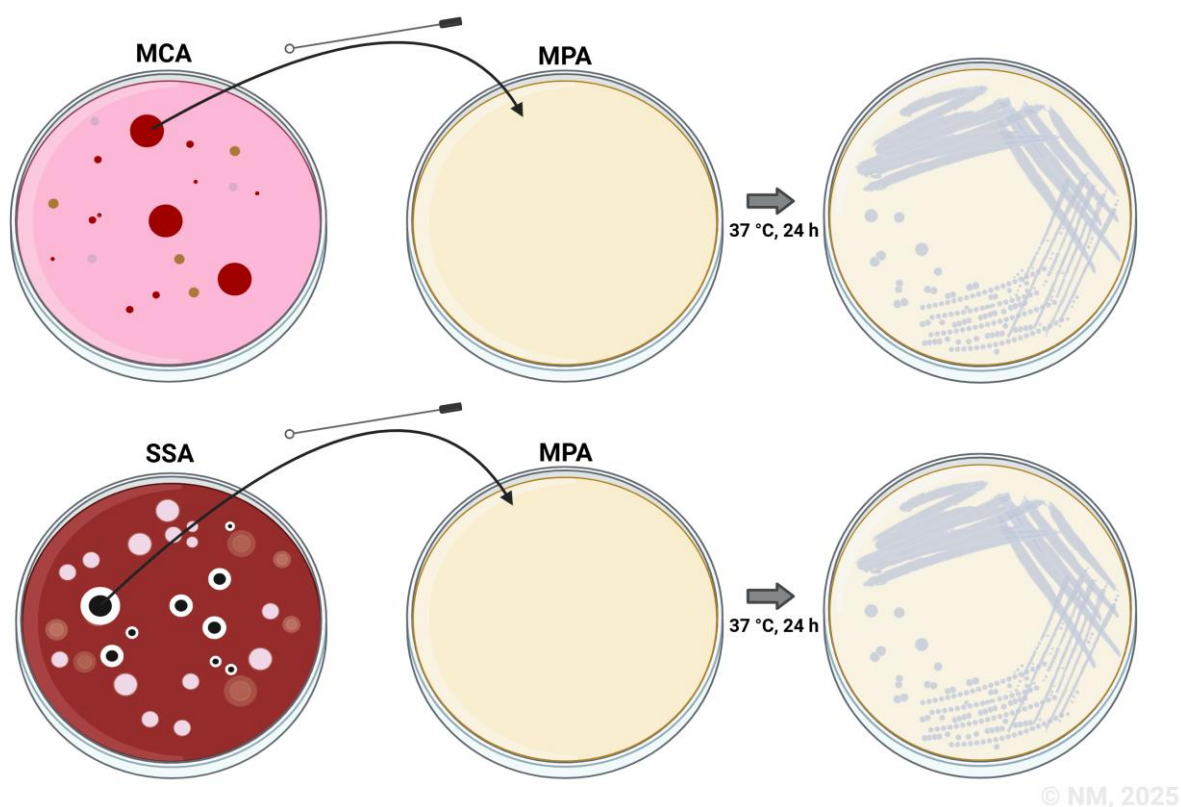
Pozn.: SSA – *Salmonella Shigella* agar.

Vzhledem k použití selektivně-diferenciačního média pro stanovení *Salmonella* spp., bude pro její následnou konfirmaci izolována čistá kultura (detailně popsáno v kapitole 4.4. Izolace čistých kultur).

4.4. Metodika izolace čistých bakteriálních kultur

Vzhledem k tomu, že pro stanovení přítomnosti a kvantity některých skupin mikroorganismů v mletém masu byla použita selektivní média (MCA, SSA), je nutné jejich detekci potvrdit dalšími konfirmačními testy pro potvrzení jejich příslušnosti k daným taxonům a vyloučit tak chybnou interpretaci výsledků. Pro další testování je tedy nezbytné získat čistou kulturu dané bakterie, a to izolací narostlé kolonie ze selektivního média na sterilní neselektivní médium (MPA). Konkrétně bude izolována **velká červená kolonie z MCA** (*E. coli*) na MPA a **bílá kolonie s černým středem z SSA** (*Salmonella* spp.) na MPA (Obrázek 5).

Obrázek 5: Izolace čistých kultur pro konfirmaci detekovaných mikroorganismů



Pozn.: Velká červená kolonie narostlá na MCA odpovídá charakteristickému nárůstu *E. coli*, zatímco bílá kolonie s černým středem na SSA *Salmonella* spp. Po jejich přetření a vykultivování na neselektivní MPA bez acidobazických indikátorů budou mít narostlé kolonie mléčně průhlednou barvu. Technikou křížového roztěru budou získány izolovaně narostlé kolonie v kvadrantu s nejnižší koncentrací buněk. Z této části bude pro každou variantu vybrána jedna kolonie, která bude zaočkována do neselektivního bujónu a dále kultivována za optimálních podmínek růstu. MCA – MacConkey agar; SSA – *Salmonella Shigella* agar; MPA – neselektivní masopeptonový agar.

Pro izolaci čistých kultur bude použito předem nalité a utužené MPA ve velkých Petriho miskách. Sterilní mikrobiologickou kličkou odeberte část bakteriální kolonie na MCA (SSA), kterou rozetřete křížovým roztěrem na MPA. Během práce s kulturou je nezbytné dodržovat zásady aseptické práce, aby nedošlo k její kontaminaci cizími bakteriemi z prostředí. Takto zaočkovaná Petriho miska bude aerobně kultivována při 37 °C po dobu 24 hodin (stejně tak varianta s inokulem z SSA na druhé Petriho misce připravená analogicky).

Primárním testem předcházejícím všem identifikacím je analýza kultivačních znaků kolonie a morfologických znaků buňky. Po ověření čistoty mohou být stanoveny také fyziologické vlastnosti kultury, která může být podrobena i dalším testům, například molekulárně-genetickým a chemotaxonomickým.

Primárním testem předcházejícím všem dalším identifikacím je analýza kultivačních znaků kolonie a morfologických znaků buněk. Tyto základní charakteristiky poskytují první orientační informace o rodu či skupině mikroorganismů detekovaných na kultivačních médiích. Po nezbytném ověření čistoty kultury lze dále přistoupit i k hodnocení fyziologických vlastností (např. schopnost růstu při různých teplotách, schopnost využití substrátů a tvorby enzymů) a následně i k molekulárně-genetickým nebo chemotaxonomickým testům (např. stanovení G+C obsahu v DNA, sekvenace genu 16S rRNA, analýza mastných kyselin).

4.4.1. Popis kultivačních znaků kolonií

Kultivační znaky lze pozorovat makroskopicky, tedy pouhým okem nebo lupou, u mikroorganismů kultivovaných na pevných nebo v tekutých živných médiích. Tyto znaky jsou důležité pro popis a předběžné určení mikroorganismů, neboť se liší podle druhu mikroorganismů, typu média a podmínek kultivace (teplota, doba, přítomnost kyslíku, pH, obsah živin apod.).

Při popisu bakteriální kolonie na pevném médiu se hodnotí především tvar (kulatá, nepravidelná, vláknitá, rhizoidní), okraj (hladký, zvlněný, laločnatý, vláknitý), povrch (hladký, lesklý, matný, vrásčitý), elevace – neboli profil kolonie nad povrchem agaru (plochá, vyvýšená, konvexní, kráterovitá), barva (bílá, krémová, žlutá, červená), průhlednost (čirá, zakalená, neprůsvitná), struktura (slizká, máslovitá, suchá), zápach. Naopak v případě bakteriálního růstu v tekutém médiu lze popsat typ zákalu (rovnoměrný, vločkovitý, sedimentující, povrchový), barvu a změnu charakteru média po růstu.

Při každé laboratorní práci je žádoucí si výsledky zaznamenávat do laboratorního deníku, včetně nákrešů či fotografií kolonií. Správné rozpoznání kultivačních znaků je klíčové pro úspěšnou diferenciální diagnostiku a výběr vhodných následných identifikačních testů.

Úkol: Zcharakterizujte kultivační znaky vybraných mikrobiálních kolonií narostlých na MCA a SSA, které jste použili pro získání čisté kultury (přetření na MPA) pro další confirmace jejich identity. Stejně tak si poté zaznamenejte kultivační znaky stejných kultur narostlých na MPA. Kultivační znaky uveďte do Tabulky 8.

Tabulka 8: Kultivační znaky bakteriálních izolátů

Kultivační médium	Barva	Tvar	Povrch	Elevace	Průhlednost	Struktura	Zápach
MCA							
MPA (z MCA)							
SSA							
MPA (z SSA)							

Pozn.: MCA – MacConkey agar; SSA – *Salmonella Shigella* agar; MPA – neselektivní masopeptonový agar.

4.4.2. Charakteristika morfologických znaků buněk a kontrola čistoty

Morfologie buněk představuje druhý základní krok při primární identifikaci mikroorganismů. Po ověření čistoty kolonie se provádí mikroskopické pozorování barveného nebo nebarveného (nativního) preparátu, které umožňuje popsat typické znaky buněk.

Pomocí nebarveného nativního preparátu lze pozorovat tvar, pohyb a uspořádání buněk v jejich přirozeném stavu. Pro jejich pozorování je však nutné použít fázově kontrastní mikroskopii nebo jinou formu kontrastního zobrazení, protože neobarvené buňky mají velmi nízký optický kontrast. Princip fázového kontrastu spočívá v přeměně nepatrných rozdílů v lomu světla (fázi), které vznikají při průchodu světla buněčnými strukturami, na rozdíly v intenzitě (světlosti a tmavosti) viditelné pro lidské oko. Tímto způsobem lze pozorovat tvar, vnitřní strukturu i pohyb živých buněk bez nutnosti jejich usmrcení a barvení. Prakticky to znamená, že fázově kontrastní mikroskop je vybaven speciálními optickými prvky, jako jsou fázový prstenec

v objektivu a fázová clona v kondenzoru, které upravují dráhu a fázi procházejícího světla a vytvářejí tak požadovaný kontrast.

Naopak barvené preparáty poskytují výrazně lepší kontrast a rozlišení a lze je pozorovat i běžným světelným mikroskopem s klasickými objektivy, které využívají rozdíly v absorpci a rozptylu světla k vytvoření kontrastu mezi objektem a pozadím. Tento způsob zobrazení je tedy vhodný především pro barvené nebo přirozeně pigmentované preparáty, protože neobarvené buňky mají velmi nízký kontrast a jsou pod klasickým objektivem prakticky neviditelné. Barvení zároveň umožňuje odlišit některé skupiny mikroorganismů (např. pomocí Gramova barvení) nebo zvýraznit specifické buněčné struktury, jako jsou spory, pouzdra či bičíky.

Mikroskopické preparáty lze obecně rozdělit na živé (nefixované) a neživé (fixované). U nefixovaných preparátů jsou pozorovány živé neobarvené mikroorganismy. Tyto preparáty jsou vhodnější pro sledování morfologie větších mikroorganismů, jako jsou kvasinky, plísně nebo prvoci. Jak již bylo popsáno výše, běžné tvar a vnitřní struktura bakterií jsou z důvodu velmi malých rozměrů a nízkého kontrastu bez barvení ve světelném mikroskopu obtížně rozlišitelné.

Pro pozorování bakterií se proto obvykle používají barvené fixované preparáty. Během fixace dochází k usmrcení buněk, jejich přichycení ke sklíčku a následné možnosti barvení. Fixaci lze provést buď tepelně (prudkým zahřátím v plameni kahanu), nebo chemicky (např. metanolem). Před tepelnou fixací je nutné preparát dokonale vysušit, jinak při zahřátí dojde k odpaření vody a prasknutí buněk vlivem vzniklé páry.

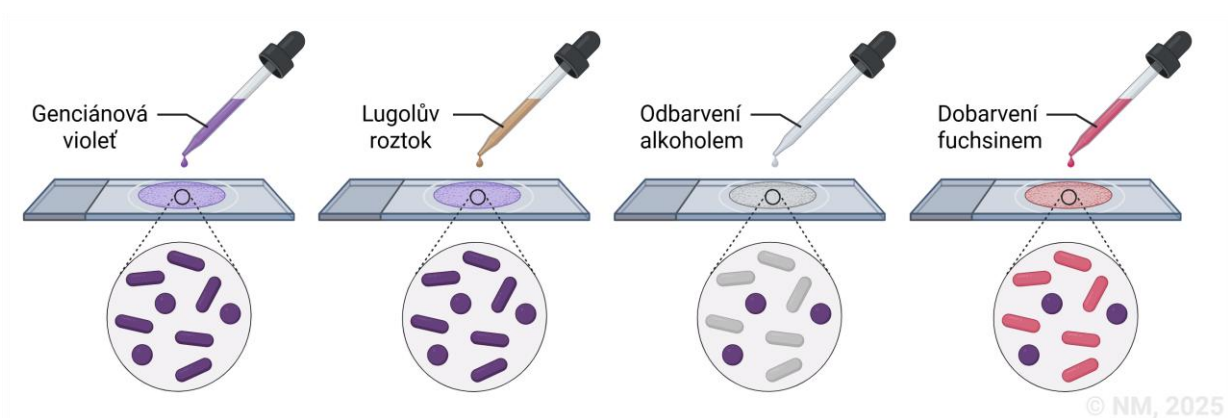
Při mikroskopickém hodnocení buněk se typicky zaznamenávají znaky jako je tvar buňky (základní morfologické tvary bakterií jsou koky a tyčinky), velikost a uspořádání buněk (jednotlivě, v párech, řetízích apod.), Gramova reakce (pozitivní/negativní) a přítomnost specifických struktur (spory, bičíky, pouzdra).

4.4.2.1. Gramovo barvení

Prvním krokem pro ověření čistoty a identity kultury je Gramovo barvení, které poskytuje základní informace o morfologických znacích buněk a Gramově charakteru daného mikroorganismu. Gramovo barvení je diagnostická a diferenciální mikroskopická metoda, která rozlišuje grampozitivní a gramnegativní bakterie. Princip spočívá v rozdílné struktuře buněčné stěny umožňující odlišnou barvitelnost. Grampozitivní bakterie mají silnou vrstvu peptidoglykanu, která zadrží komplex genciánové violeti a jodu (vznik komplexní sloučeniny jodpararosnilinu), zatímco u gramnegativních je tato vrstva tenká a obsahuje také vnější

membránu, a komplex je tedy při působení polárního rozpouštědla (alkoholu) vyplaven. Postup barvení je schematicky znázorněn na Obrázku 6.

Obrázek 6: Postup a princip Gramova barvení



Na podložním skličku připravte nátěr bakteriální suspenze do kapky fyziologického roztoku, usušte jej a fixujte teplem (3× krátké protažení plamenem). Po zchlazení obarvete nátěr genciánovou violetí po dobu 30 s. Poté přidejte Lugolův roztok a nechte působit dalších 30 s. Nátěr slijte a odbarvujte etanolem (3× po 3 s), poté opláchněte tekoucí vodou. Nakonec dobarvete kontrastním barvivem fuchsinem nebo safraninem po dobu 2 min, znovu opláchněte vodou a usušte. Takto připravený preparát pozorujte s kapkou imerzního oleje pod imerzním objektivem s celkovým 1000násobným zvětšením.

U preparátu důkladně vyšetřete jednotnost pozorovaných buněk, jejich morfologii a barvu. Grampozitivní bakterie se barví fialově, gramnegativní růžově až červeně. Pokud jsou přítomny rozdílné buněčné morfologie nebo kombinace grampozitivních a gramnegativních bakterií, kultura je kontaminovaná a není vhodná pro další testování. Konkrétně *E. coli* je gramnegativní bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* s morfologií krátkých tyčinek, často velmi drobných až kokobacilárních tvarů. Také *Salmonella* spp. patří mezi gramnegativní bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* s morfologií středně dlouhých tyčinek, jejichž tvary se mohou mírně lišit v závislosti na druhu a sérotypu. Je však třeba zdůraznit, že morfologie bakteriálních buněk není absolutně neměnná. Významně ji mohou ovlivňovat samotné kultivační podmínky, typ média, růstová fáze populace a stresové faktory. Proto je nutné brát výsledky mikroskopického vyšetření vždy jako doplňkový znak, který je nutno používat v kombinaci s dalšími testy.

Úkol: Vytvořte preparát podle Grama u kultur originálně izolovaných z MCA a SSA nyní narostlých na MPA, a dále také z originálně vybraných kolonií narostlých na MCA a SSA, jejichž část biomasy byla použita pro izolaci čisté kultury. Mikroskopicky zkontrolujte jejich čistotu (případně specifikujte znaky kontaminace), proveďte morfologickou analýzu a kultury zařaďte do skupiny bakterií dle Grama. Morfologické znaky uveďte do Tabulky 9.

Tabulka 9: Morfologické znaky bakteriálních izolátů

Kultivační médium	Barva	Gram (+/-)	Tvar	Upořádní	Přítomnost spor	Aggregace	Čistota (info)
MCA							
MPA (z MCA)							
SSA							
MPA (z SSA)							

Pozn.: MCA – MacConkey agar; SSA – *Salmonella Shigella* agar; MPA – neselektivní masopeptonový agar.

4.4.2.2. Další mikroskopické preparáty

Pro mikroskopické vyšetření vzorku je možné volit i další typy preparátů. Vždy je ale důležité zohlednit, které mikroorganismy, případně které jejich části, a z jaké matrice je chcete pozorovat, a zda je nutné, či nikoliv nátěr vzorku zafixovat. V následujícím odstavci jsou uvedeny vybrané příklady preparátů s postupy, se kterými se setkáte v naší laboratoři.

Nativní preparát – Na podložním sklíčku vytvořte suspenzi mikroorganismů ve vodě nebo jiném vhodném médiu (např. laktofenol) a překryjte krycím sklíčkem. Pozorujte suchými objektivy. **Vitální barvení** – Tento preparát slouží pro odlišení živých a mrtvých buněk mikroorganismů, nejčastěji kvasinek. K vodní suspenzi buněk, která je vytvořena na podložním sklíčku, přidejte barvu (methylenová modř) a preparát překryjte krycím sklíčkem. Pozorujte suchými objektivy. Živé buňky jsou nezbarvené, naopak mrtvé jsou obarveny. **Preparát na rychlo** – Na podložním sklíčku vytvořte nátěr suspenze bakterií v kapce vody, který nechte uschnout na vzduchu. Následně ho zafixujte 3x protažením plamenem a preparát zchlaďte na laboratorním stole. Poté ho barvěte 1 minutu violetí nebo fuchsinem, opláchněte pod proudem vody a usušte. Pozorujte imerzním objektivem. **Preparát z mléčných kultur** – Na dvě třetiny plochy podložního sklíčka natřete kulturu bakterií kultivovanou v mléce a ponechte dokonale

uschnout na vzduchu. Poté nátěr fixujte alkoholéterem, který zároveň rozpouští tuk, po dobu 1 minuty. Nátěr během této doby zcela zaschne. Následně mořte polovinu suchého nátěru 1% roztok NaOH, který naruší bílkoviny mléka, po dobu 10 s (při delším působení NaOH totiž může dojít i k porušení bílkovin bakterií). Poté preparát omyjte proudem vody a obarvete metylenovou modří po dobu 2 minut a znovu opláchněte a usušte. Pozorujte imerzním objektivem.

4.4.3. Ověření identity odebraných izolátů

Pro stanovení počtů *E. coli* a detekci *Salmonella* spp. byly použity selektivně-diferenciační média. Tato média však nejsou stoprocentně specifická a mohou vést k falešně pozitivním výsledkům, například v případě, kdy kolonie vykazují vzhled typický pro cílový mikroorganismus, ale tento fenotyp může být vyvolán i jinými necílenými koliformními bakteriemi nebo může být ovlivněn samotnými kultivačními podmínkami. Z tohoto důvodu je nezbytné vždy provádět konfirmaci podezřelých izolátů, a to zejména u rodů s fenotypově podobnými zástupci. V akreditovaných laboratořích jsou dle norem tyto postupy konfirmací vždy důsledně dodržovány.

Základem úspěšné a validní konfirmace je práce s čerstvě narostlou čistou kulturou. Pokud je test prováděn s kontaminovanou nebo přestálou kulturou, mohou být výsledky zkreslené a vést k falešně pozitivním či nesprávným závěrům.

Pro stanovení některých mikroorganismů lze namísto klasických selektivně-diferenciačních médií využít **média chromogenní**, která poskytují vyšší specifitu a usnadňují identifikaci cílových bakterií. V některých případech výsledky z těchto médií nemusí vyžadovat další konfirmaci, vždy však záleží na konkrétních normách a požadavcích akreditace. V rámci praktického cvičení budou kromě konfirmačních imunochemických a biochemických testů použita i chromogenní média, pro simulaci jejich aplikace v rutinní laboratorní praxi.

4.4.3.1. Použití chromogenních médií

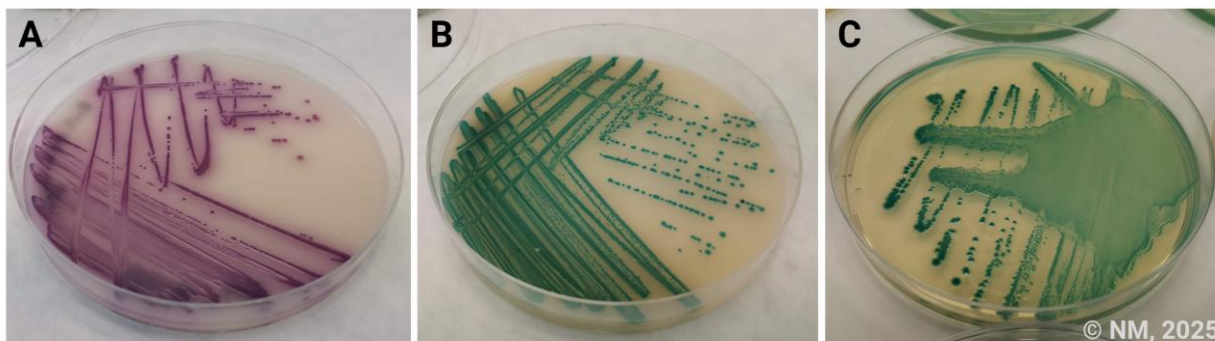
Chromogenní média obsahují specifický substrát navázaný na barevnou (chromogenní) látku. Pokud mikroorganismus produkuje enzym charakteristický pro daný druh, rod nebo skupinu, tento enzym substrát hydrolyzuje a uvolněný chromogen způsobí vznik typického zbarvení kolonie. Díky tomu lze cílové mikroorganismy snadno odlišit od ostatní mikrobioty a následně spočítat pouze kolonie s odpovídajícím zbarvením. Přídavek chromogenní látky se většinou kombinuje i s dalšími selektivními faktory.

Tato média jsou poměrně často využívána například k detekci *E.coli*, koliformních bakterií, rodů *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, ale také k identifikaci některých kvasinek (*Candida* spp.). Výhodou je jednoduchá a rychlá interpretace výsledků a to, že další konfirmace často není nutná, nicméně její povinnost závisí na příslušných normách a požadavcích akreditovaných laboratoří.

Hojně jsou dnes například používány indoxylové chromogeny, které po odštěpení zůstávají uvnitř bakteriálních buněk a nedifundují do média, což usnadňuje vyhodnocení. Jednotlivé indoxylové chromogeny mají typická zbarvení. Příkladem modrého je 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl, purpurového 5-jodo-3-indoxyl, lososového 6-chloro-3-indoxyl a zeleného *N*-methyloxyindoxyl.

V rámci praktického cvičení budou pro dílčí ověření identity izolovaných kultur použita vybraná chromogenní média pro stanovení a diferenciaci *E. coli* a *Salmonella* spp. blíže popsána v následujících podkapitolách. Ukázka růstu bakteriálních kolonií na selektivně-diferenciačních chromogenních médiích je znázorněna na Obrázku 7.

Obrázek 7: Kolonie *Salmonella* spp. a *E. coli* po kultivaci na chromogenních médiích



Pozn.: A – Purpurové kolonie *Salmonella* spp. na mléčně zbarveném médiu Brilliance *Salmonella* agar (BSA); B – modrozelené kolonie *Salmonella* spp. na mléčně zbarveném médiu Harlequin Chromogenic Agar for *Salmonella* Esterase (CASE); C – zelenomodré kolonie *E. coli* na čířem slámově zbarveném médiu Tryptone Bile X-Glucuronide Chromogenic Agar (TBX).

4.4.3.1.1. Tryptonový agar se žlučovými solemi a X-glukuronidem

Tryptonový agar se žlučovými solemi a X-glukuronidem (TBX; *Tryptone Bile X-Glucuronide Chromogenic Agar*) je chromogenní selektivně-diferenciační kultivační médium, které se používá k průkazu a stanovení β -glukuronidáza pozitivních kmenů *E. coli* v potravinách, vodě, klinických vzorcích a dalších biologických materiálech. Princip média je založen na

kombinaci selektivního působení žlučových solí a chromogenního substrátu 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glukuronidu (X-glukuronid).

Selektivní účinek zajišťují žlučové soli, které inhibují růst grampozitivních bakterií a většiny ostatních enterobakterií bez β -glukuronidázové aktivity. Diferenciační funkce je založena na přítomnosti X-glukuronidu, který je hydrolyzován enzymem β -glukuronidázou. Tento enzym je vysoce specifický pro *E. coli* (ačkoli přibližně 3–4 % kmenů *E. coli* jej neprodukuje). Při štěpení substrátu dochází k uvolnění nerozpustného indoxylového chromoforu, který je akumulován v bakteriálních buňkách a způsobuje charakteristické zelenomodré zbarvení kolonií. Ostatní koliformní bakterie a bakterie rezistentní ke žluči, které β -glukuronidázu neprodukují, tvoří bílé až bezbarvé kolonie. Tím je zajištěna jasná vizuální diference mezi *E. coli* a ostatními enterobakteriemi.

V rámci praktického cvičení bude TBX agar (Oxoid) použit k přetření a případnému potvrzení detekce *E. coli* z narostlé kultury na MPA (původně na MCA při mikrobiologickém rozboru mletého masa). Pro přípravu 1 litru média rozpusťte 36,6 g dehydratované směsi v destilované vodě, promíchejte a sterilujte v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Takto připravené médium obsahuje 20 g tryptonu, 1,5 g žlučových solí, 0,075 g X-glukuronidu, 15 g agaru. Při 25 °C má pH $7,2 \pm 0,2$.

Po vytemperování média ve vodní lázni (50 °C) asepticky nalijte agar do velkých Petriho misek a nechte utuhnout při laboratorní teplotě. Připravené misky lze poté ihned použít nebo krátkodobě skladovat v chladničce. Pokud jsou misky tímto způsobem skladovány, je nutné je před použitím nejprve vysušit.

4.4.3.1.2. Brilliance *Salmonella* agar

Brilliance *Salmonella* agar (BSA) je chromogenní selektivně-diferenciační kultivační médium, které se používá k izolaci a předběžné identifikaci bakterií rodu *Salmonella* z potravin, klinických a environmentálních vzorků. Princip média je založen na kombinaci selektivního působení látky s obchodním názvem Inhibigen™, antibiotik a na chromogenní diferenciaci cílových mikroorganismů.

Selektivní účinek zajišťuje především složka Inhibigen™. Jedná se o látku skládající se ze dvou chemických komponent, které jsou na sebe vázány a tato látka sama o sobě není toxická pro mikroorganismy. Pokud však bakterie disponuje specifickým enzymem, který tuto vazbu rozštěpí, uvolněné molekuly působí toxicky a vedou k porušení buněčné stěny a zániku buňky. V BSA působí Inhibigen™ selektivně proti *E. coli*. K dalším selektivním složkám patří

antibiotika novobiocin a cefsulodin, která inhibují růst většiny kmenů bakterií rodů *Proteus* a *Pseudomonas*. Díky tomu je zajištěn potlačený růst většiny nežádoucích enterobakterií. Diferenční funkce média je poté založena na přítomnosti dvou chromogenních substrátů, které detekují aktivitu kaprylát esterázy a β -glukosidázy.

Kaprylát esteráza je enzym typický pro salmonely (i když se může vyskytovat i u některých druhů rodů *Klebsiella* a *Enterobacter*). Její aktivita vede k odštěpení specifického substrátu a uvolnění chromogenu purpurového zbarvení. Oproti tomu enzym β -glukosidáza se běžně vyskytuje u bakterií rodů *Klebsiella* a *Enterobacter*, nikoliv však u rodu *Salmonella*. Při štěpení příslušného substrátu dochází k uvolnění chromogenu tmavě modré barvy. Pokud bakterie produkují oba enzymy současně, barva purpurového chromogenu je překryta tmavě modrým chromogenem, což vede k výslednému modrofialovému zbarvení. Výsledná morfologie kolonií tedy umožňuje jednoznačnou diferenciaci. *Salmonella* spp., která tvoří purpurové kolonie, *Klebsiella* spp. a *Enterobacter* spp. tmavě modré, zatímco ostatní bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* jsou na médiu inhibovány. Některé kmeny *Proteus* spp. mohou výjimečně tvořit kolonie slámové barvy, *Pseudomonas* spp. růžové a *E. coli* krémové.

V rámci praktického cvičení bude BSA agar (Oxoid) použit k přetření a případnému potvrzení detekce *Salmonella* spp. z narostlé kultury na MPA (původně na SSA při mikrobiologickém rozboru mletého masa). Pro přípravu 500 mL média rozpustíte 27 g dehydratované směsi v destilované vodě. Poté před zahřátím přidejte 1 lahvičku selektivního suplementu (*Salmonella* Selective Supplement) rekonstituovaného dle pokynů výrobce. Za častého míchání přiveďte k varu do úplného rozpuštění složek média.

Takto připravené médium obsahuje 14 g *Salmonella* InhibigenTM mixu, 25 g mixu chromogenů a 15 g agaru. Při 25 °C má pH $7,3 \pm 0,1$.

Po ochlazení na 45–50 °C médium dobře promíchejte a nalijte asepticky do sterilních Petriho misek a nechte ztuhnout při laboratorní teplotě. Připravené misky lze ihned použít, případně krátkodobě skladovat v chladničce. Před použitím je nutné povrch médií vysušit.

4.4.3.1.3. Chromogenní agar pro *Salmonella* spp. s esterázovou aktivitou

Chromogenní agar pro *Salmonella* spp. s esterázovou aktivitou (CASE; Harlequin® *Chromogenic Agar for Salmonella Esterase*) je selektivní chromogenní kultivační médium určené pro detekci a diferenciaci bakterií rodu *Salmonella* v potravinách, vodě a dalších biologických materiálech. Není určen k diagnostice onemocnění u lidí.

Princip média je založen na použití duálního chromogenního systému. První chromogenní substrát je hydrolyzován enzymem esterázou, který je charakteristicky exprimován všemi druhy *Salmonella* spp., což vede k tvorbě typických modrozelených kolonií. Druhý chromogenní substrát je cílem β -glukosidázové aktivity, přítomné u některých necílových enterobakterií (např. *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp.). Tyto mikroorganismy tak tvoří černě zbarvené kolonie, čímž je zajištěno jejich odlišení od *Salmonella* spp. Ostatní mikroorganismy jsou inhibovány nebo rostou jako bezbarvé kolonie (např. *E. coli*, *Shigella* spp., *Proteus* spp.). Přítomnost složek zvyšujících opacitu kultivačního média poskytuje bílé pozadí a usnadňuje čtení výsledků. Pomocí CASE lze detekovat i nepohyblivé kmeny *S. Pullorum*, a *S. Gallinarum*, monofázické varianty a sérovary s nízkou esterázovou aktivitou (např. *S. Dublin*) či laktóza-pozitivní kmeny (např. *S. Arizonae*).

V rámci praktického cvičení může být CASE agar (Neogen Culture Media, USA) alternativně použit namísto BSA pro konfirmaci *Salmonella* spp. na chromogenním médiu. Pro přípravu 1 litru média rozpustíte 49,9 g dehydratované směsi v destilované vodě. Za častého míchání přivedete k varu, dokud nedojde k úplnému rozpuštění složek.

Takto připravené médium obsahuje 10,5 g růstového mixu, 11 g selektivního mixu, 7 g pufu, 7,5 g činidel pro úpravu opacity, 1,4 g chromogenního mixu a 12,5 g agaru. Při 25 °C má pH $7,3 \pm 0,2$.

Po ochlazení na 45–50 °C médium dobře promíchejte, asepticky nalijte do sterilních Petriho misek a nechte ztuhnout při laboratorní teplotě. Připravené misky lze ihned použít, případně krátkodobě skladovat v chladničce. Před použitím je nutné povrch médií vysušit.

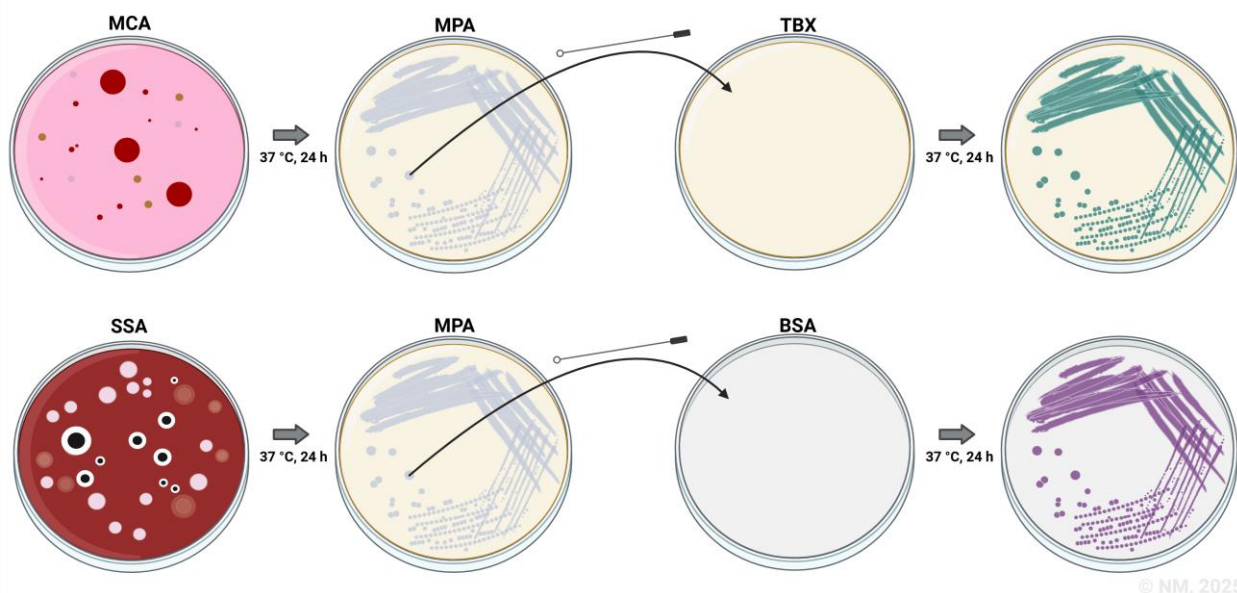
4.4.3.1.4. Metodika inokulace kultur na chromogenní média

V rámci cvičení bude identita čistých bakteriálních kultur narostlých na neselektivním médiu MPA, které byly původně detekovány a izolovány ze selektivně-diferenciačních médií MCA a SSA při rozboru mletého masa, ověřována nejen klasickými konfirmačními testy, ale také pomocí chromogenních médií. Pro verifikaci *E. coli* bude použito TBX médium a pro *Salmonella* spp. médium BSA.

Do předem připravených, nalitých a utužených velkých Petriho misek s TBX a BSA (případně po vysušení povrchu po vyjmutí z chladničky) provedte inokulaci bakteriálních izolátů z MPA metodou křížového rozetření. Na MPA si vyberte izolovanou bakteriální kolonii. Asepticky odeberte její část sterilní bakteriologickou kličkou a rozetřete bakteriální biomasu ve čtyřech kvadrantech. Po pohybu kličkou v každém kvadrantu použijte nově sterilizovanou

kličku, abyste snížili hustotu inokula a dosáhli finálního výsevu samostatných kolonií. Takto zaočkované Petriho misky s chromogenními médii a inokuly budou následně aerobně kultivovány při 37 °C po dobu 24 hodin (Obrázek 8).

Obrázek 8: Re-inokulace kultur ze selektivně-diferenciačních médií



Pozn.: MCA – MacConkey agar; SSA – *Salmonella Shigella* agar; MPA – masopeptonový agar; TBX – Tryptone Bile X-glucuronide agar; BSA – Brilliance *Salmonella* agar.

Po proběhlé kultivaci proveďte vyhodnocení kultivačních znaků narostlých kolonií dle pokynů výrobce chromogenního média a potvrďte, či vyvráťte příslušnost narostlých bakterií k cíleným taxonům (*E. coli*, *Salmonella* spp.). Poté mikroskopickým vyšetřením ověřte, zda dané morfologické znaky odpovídají detekovanému bakteriálnímu taxonu.

Úkol: Zcharakterizujte kultivační znaky kolonií narostlých na TBX a BSA a vyhodnoťte, zda odpovídají cíleným bakteriálním taxonům. Dále proveďte morfologickou analýzu obou kultur. Všechny výsledky zaznamenejte do Tabulky 10.

Tabulka 10: Kultivační a morfologické znaky bakteriálních izolátů

Kultivační médium	Kultivační znaky						
	Barva	Tvar	Povrch	Elevace	Průhlednost	Struktura	Zápach
TBX							
BSA							
	Morfologické znaky						
	Barva	Gram (+/-)	Tvar	Upořádání	Přítomnost spor	Aggregace	Čistota (info)
TBX							
BSA							

Pozn.: TBX – Tryptone Bile X-glucuronide agar; BSA – Brilliance *Salmonella* agar.

4.4.3.2. Použití konfirmačních testů

V případě použití selektivně-diferenciačních médií, a také některých chromogenních, je nezbytné pro získání validních a reprodukovatelných výsledků provést další konfirmaci identity detekovaných mikroorganismů. K tomuto účelu se využívají tzv. konfirmační testy. Jedná se o rychlé identifikační metody, které umožňují odlišit cílové bakterie od podobných necílových mikroorganismů. Tyto testy jsou obvykle založeny na detekci specifických enzymů (např. β -glukuronidáza u *E. coli*, ureáza u *Proteus* spp., kataláza a koaguláza u *Staphylococcus aureus*, esculin-hydroláza u *Enterococcus* spp.), průkazu metabolitů (např. tvorba sirovodíku u *Salmonella* spp. a *Proteus* spp., fermentace laktózy a dalších cukrů u koliformních bakterií, produkce acetoinu u *Enterobacter* spp. a *Klebsiella* spp.), případně mohou být založeny na imunologických metodách (např. aglutinace, latexové testy, imunochromatografie), které prokazují přítomnost druhově či sérovarově specifických antigenů (např. O a H antigeny u *Salmonella* spp., enterotoxiny u *S. aureus*, specifické antigeny u *Listeria monocytogenes*).

V rámci praktického cvičení budou identifikovány bakterie izolované z mletého masa za použití již zmíněných chromogenních médií a také klasickými konfirmačními testy určenými pro potvrzení *E. coli* (COLItest) a *Salmonella* spp. (*Salmonella* Test Kit).

Nezbytnou součástí konfirmace je vždy mikroskopické vyšetření čisté kultury, které slouží k ověření absence kontaminantů a k popsání základní morfologie bakteriálních buněk

(Gramovo barvení, tvar, uspořádání) viz Tabulka 9. Čistota výchozí kultury je klíčovým předpokladem pro správnou interpretaci výsledků konfirmačních testů.

4.4.3.2.1. Metodika k provedení COLItestu

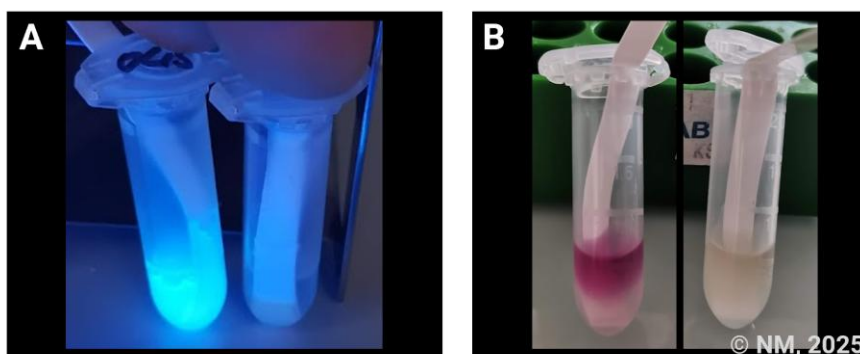
COLItest konfirmační test sloužící k rychlé identifikaci *E. coli* založený na detekci aktivity specifického enzymu β -glukuronidázy a průkazu tvorby indolu. Enzym β -glukuronidáza hydrolyzuje substrát 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glukuronid, jímž je napuštěna reakční zóna testovacího proužku. Jeho produktem je 4-methyl-umbelliferon, který modře fluoreskuje v UV světle. Indol poté vzniká štěpením aminokyseliny L-tryptofanu enzymem tryptofanázou. Jeho detekce je zajištěna reakcí s p-dimethylaminobenzaldehydem (součást indolového činidla) a vznikem červeného zbarvení. Přestože současná detekce enzymu s tvorbou metabolitu představuje 95% specifitu pro *E. coli*, je při interpretaci velmi důležité zohlednit i další výsledky získané jinými přístupy, protože některé kmeny *E. coli* mohou být β -glukuronidáza negativní. Pro zajištění správné interpretace výsledků je nutné vždy zahrnout také pozitivní kontrolu (sbírkový β -glukuronidáza pozitivní kmen *E. coli*) a negativní kontrolu (jiný bakteriální taxon).

Test se provádí vložení testovacího proužku do vytvořené bakteriální suspenze čisté kultury testovaného izolátu a jeho inkubací při 37 °C po dobu 4 hodin. Již po 1 hodině lze orientačně odečíst fluorescenci β -glukuronidázy pod UV lampou (365 nm). Po 4 hodinách je do zkumavky přikápnuto činidlo pro detekci indolu a je hodnocena barevná změna. Pozitivní výsledek fluorescence a změny barvy jsou uvedeny v Tabulce 11 a znázorněny v Obrázku 9.

Tabulka 11: Interpretace reakcí v COLItestu

Reakce	β -glukuronidáza	Detekce tvorby indolu
Pozitivní	Modrá fluorescence	Růžové až červené zbarvení
Negativní	Nevykazuje fluorescenci	Nažloutlé až žluté zbarvení

Obrázek 9: Vyhodnocení COLItestu pro konfirmaci *E. coli*



Pozn.: A – Pozitivní (vlevo) a negativní (vpravo) reakce při detekci aktivity enzymu β -glukuronidázy; B – Pozitivní (vlevo) a negativní (vpravo) reakce pro detekci tvorby indolu.

V rámci praktického cvičení bude COLItest (Erba Lachema, ČR) použit ke confirmaci identity bakteriálního izolátu čerstvě narostlého na neselektivním MPA (původně izolovaného ze selektivně-diferenciačního MCA s cílem detekovat a kvantifikovat počty *E. coli* v mletém masu). Pro provedení testu nejprve připravte 1 mL suspenze čisté kultury testovaného kmene ve fyziologickém roztoku. Poté do suspenze ponořte testovací proužek COLItestu, který inkubujte v termostatu při 37 °C po dobu 4 hodin. Následně zkontrolujte aktivitu β -glukuronidázy ozářením proužku UV lampou a zaznamenejte výsledek. Poté přidejte 4–5 kapek indolového činidla a opět zaznamenejte výsledek reakce.

Úkol: Proved'te COLItest pro ověření identity izolátu *E. coli* ze vzorku mletého masa originálně vykultivovaného na MCA. Do testování zahrňte i pozitivní a negativní kontrolu. Výsledky zaznamenejte do Tabulky 12 a zhodno'te, zda byla *E. coli* confirmována, a zda lze získané kultivační počty (KTJ/g) považovat za spolehlivé.

Tabulka 12: Výsledky COLItestu

Vzorek	Fluorescence (β -glukuronidáza: +/-)	Detekce tvorby indolu (červená +/- žlutá -)	Konfirmace <i>E. coli</i> (pozitivní/negativní)
A (MCA kmen)			
B (+ CTRL)			
C (- CTRL)			

Pozn.: MCA – MacConkey agar; + CTRL – pozitivní kontrola; - CTRL – negativní kontrola.

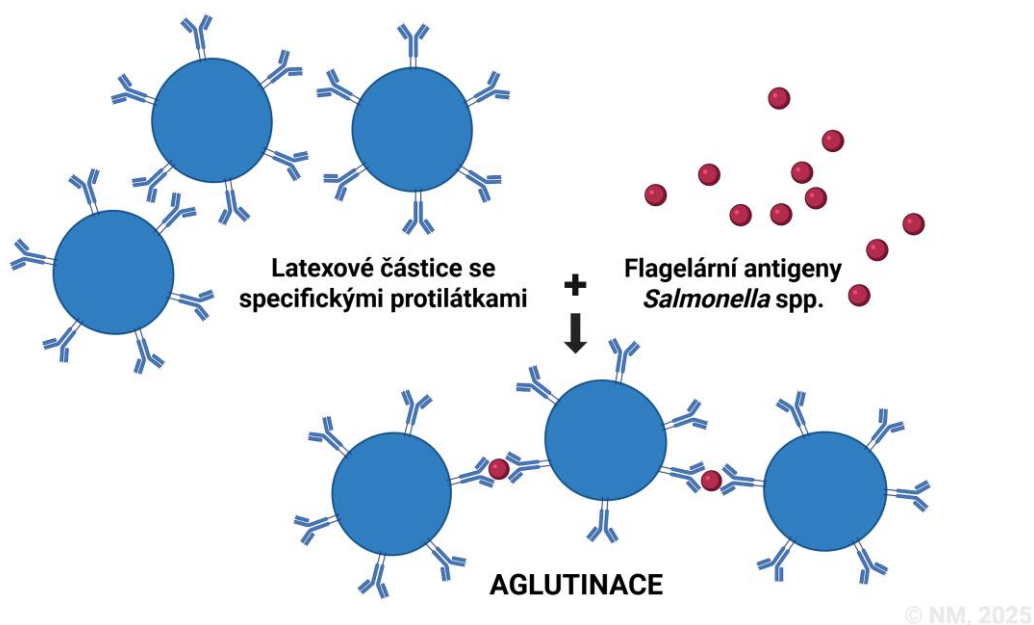
4.4.3.2.2. Metodika k provedení *Salmonella* Test Kitu

Salmonella Test Kit je rychlý imunochemický confirmační test založený na principu latexové aglutinace. Aglutinační testy fungují na principu vysrážení vzorku po reakci antigenu (obsažen v analyzovaném vzorku) a specifické protilátky, která je ke vzorku přidána. Pro provedení aglutinačního testu není nutné použítou protilátku nijak značit a test se vyhodnocuje buď jako pozitivní (proběhla aglutinace, tedy vysrážení) nebo negativní (aglutinace neproběhla). Konkrétně *Salmonella* Test Kit je určený k presumptivní identifikaci *Salmonella* spp.

v klinických, potravinářských i veterinárních vzorcích. Test lze provádět z bakteriálních kolonií nebo kultur a lze jím detekovat většinu běžných druhů *Salmonella* spp.

Na latexové částice jsou navázány specifické protilátky proti povrchovým (zejména flagelárním) antigenům *Salmonella* spp. Pokud jsou latexové částice smíchány se suspenzí buněk *Salmonella* spp., dochází během několika minut k okem viditelné aglutinaci, protože antigeny bakterií se vážou na protilátky fixované na latexových kuličkách. Vznik sraženiny tedy značí pozitivní konfirmaci *Salmonella* spp. Pokud roztok latexových částic s bakteriální suspenzí zůstanou homogenní, jedná se o negativní výsledek a *Salmonella* spp. není konfirmována. Princip testu je schematicky znázorněn na Obrázku 10.

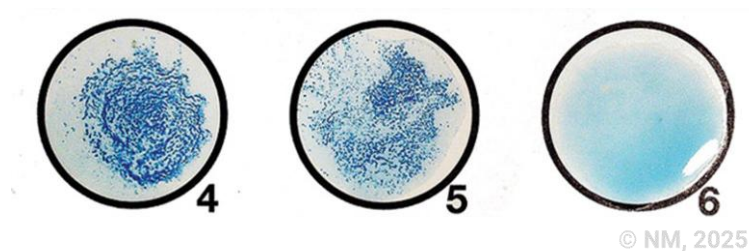
Obrázek 10: Princip imunologického aglutinačního testu



Pozn.: Na latexové částice jsou navázány protilátky proti flagelárním antigenům *Salmonella* spp. Pokud je do roztoku částic přimíchána suspenze *Salmonella* spp., dojde ke vzniku vazby mezi protilátkou a antigenem a výsledné aglutinaci.

Ukázka pozitivní a negativní reakce je znázorněna na Obrázku 11. Pro správnou interpretaci výsledků je důležité vždy do testování zahrnout také pozitivní (sbírkový kmen *Salmonella* spp.) a negativní kontrolu (jiný bakteriální taxon, např. *E. coli*).

Obrázek 11: Vyhodnocení *Salmonella* Test Kit pro confirmaci *Salmonella* spp.



Pozn.: 4 – Kmen *Salmonella* spp. vykultivovaný z reálného vzorku mletého masa; 5 – kontrolní sbírkový kmen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium LT2; 6 – kontrolní sbírkový kmen *E. coli* J13. U varianty 4 a 5 došlo k aglutinaci, tedy confirmaci *Salmonella* spp., zatímco u varianty 6 nikoliv.

V rámci praktického cvičení bude *Salmonella* Test Kit (Oxoid) použit ke confirmaci identity bakteriálního izolátu čerstvě narostlého na neselektivním MPA (původně izolovaného ze selektivně-diferenciačního SSA s cílem kvalitativně detekovat *Salmonella* spp. v mletém mase). Pro provedení testu nejprve kápněte suspenzi latexových kuliček s navázanými antiséry. Poté asepticky vmíchejte suspenzi testovaných bakterií (10–15 s). Po 2 minutách ponechání suspenze v klidu vyhodnoťte reakce a zaznamenejte výsledek confirmace.

Úkol: Proveďte *Salmonella* Test Kit pro ověření identity izolátu *Salmonella* sp. ze vzorku mletého masa originálně narostlého na SSA. Do testování zahrňte i pozitivní a negativní kontrolu. Výsledky zaznamenejte do Tabulky 13 a zhodnoťte, zda byl rod *Salmonella* confirmován, a zda lze detekci kultivační cestou považovat za spolehlivou.

Tabulka 13: Výsledky *Salmonella* Test Kitu

Vzorek	Vznik sraženiny (+/-)	Confirmace <i>Salmonella</i> spp. (pozitivní/negativní)
A (SSA kmen)		
B (+ CTRL)		
C (- CTRL)		

Pozn.: SSA – *Salmonella Shigella* agar; + CTRL – pozitivní kontrola; - CTRL – negativní kontrola.

4.4.3.3. Další imunochemické testy pro detekci bakterií

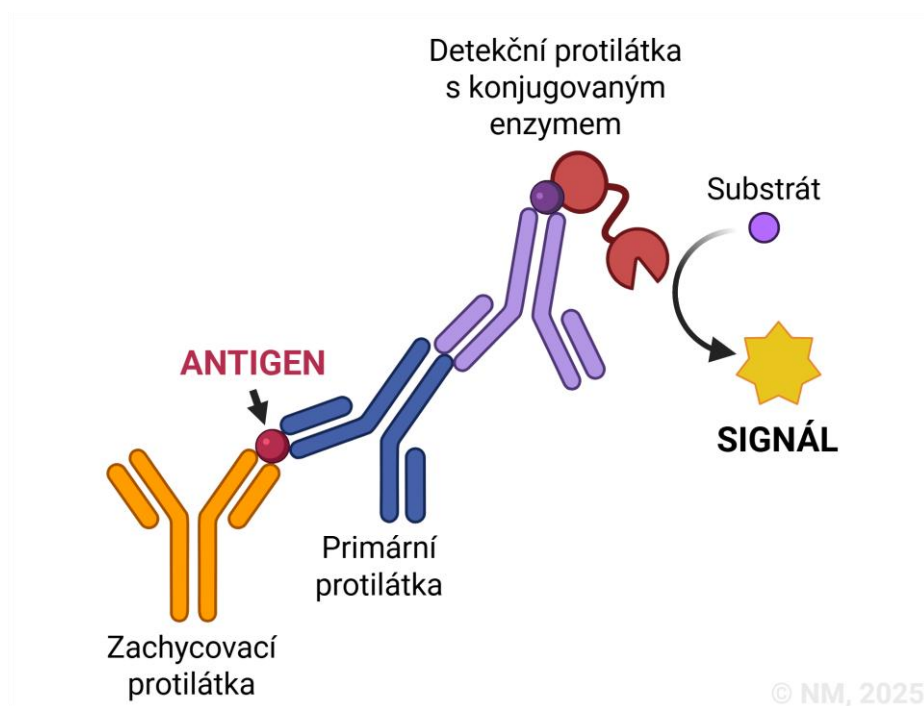
Imunochemické testy obecně představují významnou skupinu metod využívaných v klinické, veterinární i potravinářské mikrobiologii. Jsou založeny na vysoce specifické vazbě antigen–protilátka, což umožňuje rychlou a spolehlivou detekci i v komplexních vzorcích bez nutnosti předchozí izolace nebo kultivace mikroorganismů. Kromě mikrobiologie nacházejí tyto metody uplatnění i v dalších oblastech biomedicíny a analytiky, například při stanovení hladiny hormonů (těhotenské testy), detekci drog v biologických tekutinách, při určování krevní skupiny nebo při sledování mykotoxinů v potravinách a krmivech.

Mezi hlavní výhody imunochemických metod je rychlost provedení a jednoduchost jejich provedení, nenáročnost na laboratorní vybavení, relativně nízká cena a široká komerční dostupnost, vysoká specifita a citlivost. Díky těmto vlastnostem se staly běžnou součástí rutinní diagnostiky i kontroly hygieny potravin.

4.4.3.3.1. ELISA

Metoda ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) patří mezi nejrozšířenější imunochemické testy používané pro kvalitativní i kvantitativní analýzu biomolekul. Využívá značené imobilizované protilátky navázané na pevnou matrix (např. dno jamky v mikrotitrační destičce), na které se vážou cílové antigeny mikroorganismů přítomné ve vzorku. K navázanému antigenu se poté přidají další sekundární protilátky, které jsou konjugované s enzymem (např. peroxidáza nebo alkalická fosfatáza). Po následném přidání specifického substrátu dochází k enzymatické reakci, jejímž výsledkem je barevná změna. Podle použitého enzymu a substrátu je poté volena vhodná vlnová délka nezbytná k detekci barevného produktu. K barevné změně nedojde, pokud nevznikl komplex protilátka–antigen–protilátky–enzym. Intenzita zbarvení (stanovená většinou spektrofotometricky) je přímo úměrná koncentraci antigenu, a tedy i množství cílových mikroorganismů. V tomto případě se jedná o sendvičový typ ELISA testu, který je znázorněn na Obrázku 12. Existuje ale i řada dalších variant testu s různými modifikacemi.

Obrázek 12: Princip sendvičového typu ELISA testu



Pozn.: Pro úspěšné použití sendvičového typu ELISA testu je nutné, aby mikrobiální antigeny obsahovaly alespoň dvě odlišná vazebná místa umožňující vytvoření tzv. sendvičového komplexu.

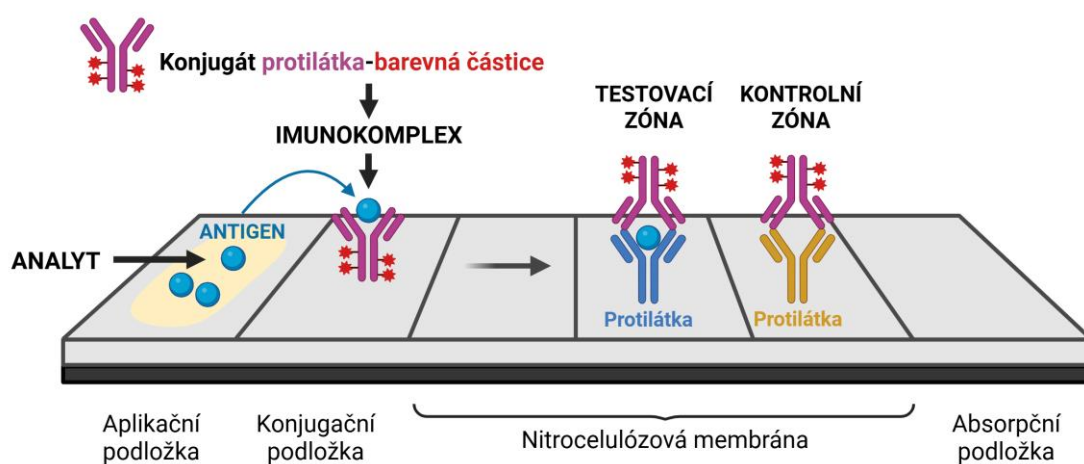
ELISA se využívá například k detekci patogenních bakterií a jejich antigenů (*L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli*, *Campylobacter* spp.), někdy také ke stanovení přítomnosti virových antigenů (např. rotavirus, norovirus), k detekci a kvantifikaci bakteriálních toxinů (stafylokokové enterotoxiny, klostridiální botulotoxiny), mykotoxinů, alergenů a dalších metabolitů v potravinách.

4.4.3.3.2. Imunochromatografické testy

Další variantou imunochemických metod jsou v současné době velmi rozšířené imunochromatografické testy (LFIA; Lateral Flow ImmunoAssay). Jsou dostupné ve formě testovacího proužku (stripu), jehož hlavní část tvoří nitrocelulosová membrána. Na této membráně jsou imobilizovány protilátky reagující s cílovým antigenem a test je dále tvořen třemi funkčními podložkami. Aplikační podložka slouží k nanesení vzorku, konjugační podložka obsahuje konjugát specifické protilátky s barevnou částicí (nejčastěji koloidní zlato nebo uhlík) a absorpční podložka zajišťuje vztlínání tekutiny a odvádí přebytek vzorku. Celý systém je obvykle uzavřen v plastovém pouzdře, které chrání membránu a umožňuje snadnou manipulaci.

Po aplikaci vzorku, který musí být ve formě roztoku nebo suspenze, začne kapalina vzlínat membránou. Nejprve se dostává do kontaktu s konjugátem (barevná částice–protilátka). Pokud je ve vzorku přítomen hledaný antigen, naváže se na protilátku v konjugátu a vzniklý imunokomplex putuje dál membránou. V testovací zóně imunokomplex interaguje s imobilizovanou specifickou protilátkou, což se projeví vznikem barevné linky v testovací zóně. Přebytek konjugátu vzlíná membránou dál do kontrolní zóny, kde se váže na jiný imobilizovaný protein s afinitou k použité barevné částici. Výsledkem je vznik druhého proužku, který potvrzuje správné provedení testu. Princip fungování LFIA je znázorněn na Obrázku 13.

Obrázek 13: Princip imunochromatografického testu



© NM, 2025

Pozn.: Na konjugační podložce je imobilizovaný konjugát protilátky s barevnou částicí. Pouze pokud je v analytu přítomen antigen, vznikne imunokomplex, který dále vzlíná membránou až k interpretačním zónám.

Nejznámějším příkladem LFIA v běžné praxi je těhotenský test. V mikrobiologii potravin se tyto testy využívají zejména pro rychlou detekci patogenních mikroorganismů (např. *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Campylobacter* spp.) a také pro stanovení bakteriálních toxinů, (např. verotoxinů VT1 a VT2).

4.4.4. Další metody detekce a identifikace bakterií

Základní taxonomickou jednotkou je v mikrobiologii druh. V potravinářské praxi je však často nutná identifikace bakterií až na úroveň kmene (např. probiotické kmeny, sérotypy

Salmonella spp. nebo *E. coli*). Pro spolehlivé taxonomické zařazení je nezbytné kombinovat různé metodické přístupy, a uplatňovat tak tzv. polyfázický přístup.

Do nedávna, kromě imunochemických testů, a často i v současnosti, byly pro rutinní identifikace bakterií používány **biochemické testy** založené na studiu rozdílné enzymové výbavy jednotlivých skupin mikroorganismů. Nevýhodou těchto testů je však časová, finanční a pracovní náročnost. Jejich výsledky navíc často nejsou zcela spolehlivé, zejména u některých skupin bakterií a blízkce příbuzných druhů. Pro spolehlivější, rychlejší a citlivější taxonomické zařazení bakterií se proto v současnosti stále častěji využívají moderní metody.

Molekulárně-biologické metody jsou založeny na analýze nukleových kyselin (DNA nebo RNA) a umožňují detekovat specifické geny nebo analyzovat celé genomy mikroorganismů. Některé z těchto metod lze využít i pro přímou detekci bakterií ve vzorku bez nutnosti jejich předchozí kultivace a izolace. U instrumentálních metod jsou využívány fyzikálně-chemické principy k určení charakteristických znaků mikroorganismů. Nejvýznamnějším zástupcem je **MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie**, která umožňuje identifikaci na základě proteinového profilu. Obě skupiny těchto metod přinášejí zásadní výhody oproti tradičním postupům, a to především rychlost, vyšší citlivost a možnost získat detailnější informace o vlastnostech mikroorganismů. Každá z metod má ale zároveň svá omezení, a proto se v praxi často vzájemně doplňují.

4.4.4.1. Molekulárně-biologické metody

Molekulárně-biologické metody (například PCR, real-time PCR, sekvenace) umožňují rychlou, citlivou a specifickou identifikaci patogenů i technologicky významných mikroorganismů přímo v potravinách. Oproti klasickým kultivačním metodám odpadá nutnost dlouhé inkubace, což je klíčové zejména v případě, pokud je vyžadována rychlá reakce (např. při epidemiích nebo při podezření na přítomnost vysoce rizikových patogenů). Tyto metody navíc umožňují detekovat i poškozené nebo nekultivovatelné buňky, které by na živných médiích nebylo možné prokázat. Dalšími výhodami jsou jejich vysoká citlivost a specifita, možnost detekce specifických genů (jak pro identifikaci, tak i pro průkaz genů virulence a rezistence) a také možnost paralelní detekce více mikroorganismů v rámci jedné analýzy.

Prvním krokem je vždy izolace DNA, buď z čisté kultury vyizolovaného kmene bakterie, nebo z celkové DNA získané přímo ze vzorku potravin. Následně je DNA analyzována podle cíle detekce různými metodami, například rodově či druhově specifickou PCR, kvantitativní PCR (qPCR), případně sekvenací vybraných specifických genů nebo celého genomu. Každá

metoda má odlišné nároky na provedení a interpretaci výsledků, a proto je nezbytné, aby analýzy prováděl zkušený pracovník. Nevýhodou těchto metod je také značná finanční a technická náročnost, zejména na přístrojového vybavení. Zejména z těchto důvodů se často využívají mezilaboratorní spolupráce nebo služby komerčních firem.

V současné době se za referenční metodu identifikace bakterií považuje **sekvenace genomu**, tedy určení pořadí nukleotidů v DNA daného mikroorganismu. Tyto metody jsou ale náročné na přístrojové vybavení a zkušenosti pracovníků. Jejich masivní rozšíření nicméně umožnilo zefektivnění procesu sekvenování a rozvoj řady specializovaných společností nabízejících tuto službu, což vedlo k výraznému zlevnění a zlepšení dostupnosti. Nevýhodou však zůstává závislost na bioinformatické analýze, která vyžaduje zkušeného bioinformatika.

Pro běžnou rutinní identifikaci mikroorganismů však není nutné sekvenovat celý genom, ale postačí cílená analýza části DNA. Nejčastěji se využívá **sekvenace genu kódujícího 16S rRNA** (součást 30S podjednotky ribozomů prokaryot). Tento gen o délce přibližně 1500 bp obsahuje jak konzervované oblasti (společné pro všechny bakterie), tak hypervariabilní úseky umožňující druhovou identifikaci. Získaná sekvence se ukládá do veřejně dostupných databází a porovnává se s referenčními sekvencemi typových kmenů. Podobnost s databázovým záznamem pak umožňuje spolehlivou identifikaci neznámého mikroorganismu. Porovnání sekvencí genu 16S rRNA se také využívá k tvorbě fylogenetických stromů, které znázorňují evoluční příbuznost jednotlivých mikroorganismů.

4.4.4.2. Instrumentální metody – MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry), tedy hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem, je moderní instrumentální metodou, která umožňuje velmi rychlou a přesnou identifikaci mikroorganismů. Na rozdíl od molekulárně-biologických metod není založena na analýze nukleových kyselin, ale na stanovení charakteristického proteinového profilu, zejména ribozomálních bílkovin. Každý rod či druh mikroorganismu má své specifické hmotnostní spektrum, které je následně porovnáno s databází referenčních spekter.

Velkou výhodou metody je její rychlost, jednoduchá příprava vzorku a nízké náklady na jedno stanovení. Analýza probíhá v řádu minut od získání čisté kultury, což činí metodu vhodnou pro rutinní laboratorní praxi. Nevýhodou je nutnost předchozí kultivační analýzy daného vzorku, izolace kolonie a kultivace získaného izolátu, a také závislost na kvalitě databáze hmotnostních spekter mikroorganismů.

MALDI-TOF MS se dnes uplatňuje především v klinické a veterinární mikrobiologii, ale stále častěji také v oblasti potravinářství, zejména při kontrole hygienické kvality potravin a při identifikaci technologicky významných mikroorganismů. I když se jedná o relativně levnou metodu z hlediska provozních nákladů, pořizovací cena samotného přístroje a softwaru je velmi vysoká, což je hlavní limitující faktor její širší dostupnosti.

4.4.4.2.1. Princip

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda založená na rozdělení nabitých částic (iontů) podle jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z) v elektrickém poli. V případě MALDI-TOF MS je ionizace dosažena pomocí laseru v přítomnosti matrice. Pokud by byly molekuly ozařovány laserem přímo, docházelo by k jejich nežádoucí fragmentaci. Proto je při MALDI-TOF MS používána matrice (nízkomolekulární látka – například kyselina skořicová), která absorbuje energii laseru, chrání molekuly vzorku před rozkladem a zároveň přenáší energii potřebnou k jejich desorpci a ionizaci.

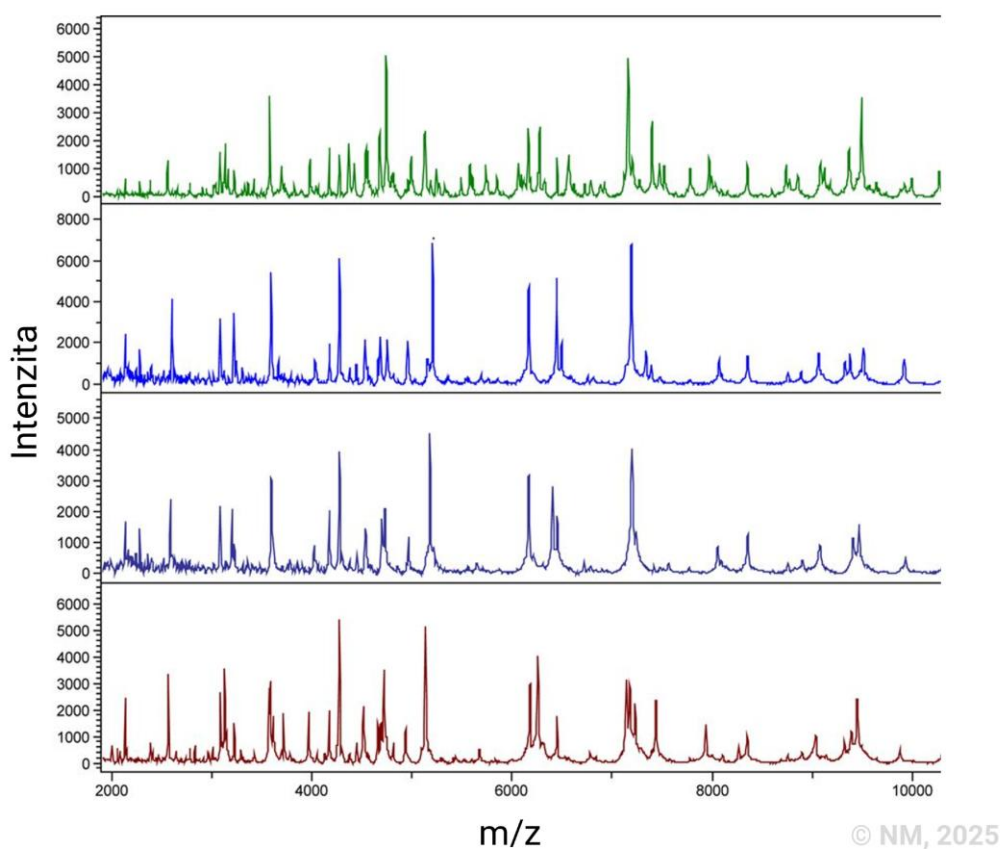
Směs matrice a vzorku je nanášena na kovovou nerezovou destičku (nosič) a po zasáhnutí laserovým pulsem dochází k excitaci matrice, která následně uvolní (desorbuje) a ionizuje molekuly vzorku. Vzniklé ionty jsou urychleny silným elektrickým polem a vstupují do letové trubice ve vakuu, kde se pohybují rychlostí závislou na jejich poměru m/z . Detektor měří dobu průletu ionizované částice, z níž je vypočítán poměr m/z . Lehčí ionty dopadají na detektor rychleji než těžší, a tak je doba průletu využita k výpočtu hodnot m/z . Výsledkem je hmotnostní spektrum, které odráží složení analyzovaného vzorku.

Při identifikaci mikroorganismů se z jejich buněk získávají převážně ribosomální proteiny, které tvoří dominantní a reprodukovatelné signály v nízkomolekulové oblasti spektra (cca 2–20 kDa). Spektra těchto proteinů jsou stabilní a dobře porovnatelná. Každý rod či druh má charakteristický proteinový profil. Ukázka spekter bakterií je znázorněna na Obrázku 14. Získané spektrum je poté porovnáno s referenčními spektry uloženými v databázi, na jejichž základě je mikroorganismus identifikován.

Výhodou metody MALDI-TOF MS je vysoká rychlost, jednoduchá příprava vzorků a nízké provozní náklady. Nicméně pořizovací náklady na přístroj a software jsou značně vysoké. Pro identifikaci lze použít jak bakteriální biomasu kolonií, tak narostlou kulturu v tekutém bujónu. Příprava vzorku se poté liší podle vstupujícího materiálu a vždy musí být dodržovány pokyny výrobce (například volba extrakčních činidel apod.). Samotná analýza poté trvá v řádu minut. Metoda je navíc velmi citlivá a poskytuje reprodukovatelné výsledky.

Nevýhodou bakteriálních identifikací touto metodou je nutnost práce s čistým kmenem, který je spojen s předcházející kultivační analýzou, nezbytnou izolací a kultivací. Samotná databáze obvykle obsahuje omezený počet referenčních spekter, jejichž aktualizaci provádí pouze výrobce. To sice zajišťuje kvalitu a reprodukovatelnost dat, ale zároveň to neumožňuje identifikaci taxonů, které nejsou součástí databáze. Tyto mikroorganismy, jejichž spektra nejsou v databázi obsažena, lze dodatečně dodat a databázi tak rozšířit o vlastní kmeny. Pouze ale za předpokladu, že budou striktně dodrženy metodické pokyny výrobce. Takto vytvořená rozšířená databáze může sloužit jako velmi efektivní a levný nástroj pro identifikaci širokého spektra rutinně identifikovaných mikroorganismů.

Obrázek 14: Hmotnostní spektra bakteriálních izolátů



Pozn.: Na obrázku jsou prezentována hmotnostní spektra čtyř bakteriálních kmenů stejného druhu. Přestože byly všechny kmeny úspěšně zidentifikovány na úroveň druhu, je zjevné, že u prvního z nich je viditelný značně odlišný profil píků, ať už v samotné pozici či intenzitě. To poukazuje na kmenovou variabilitu v rámci druhu. Pro její hodnocení je nicméně nezbytné analyzovat získaná spektra podrobněji, nikoliv pouze s vygenerovanými výsledky s interpretacemi.

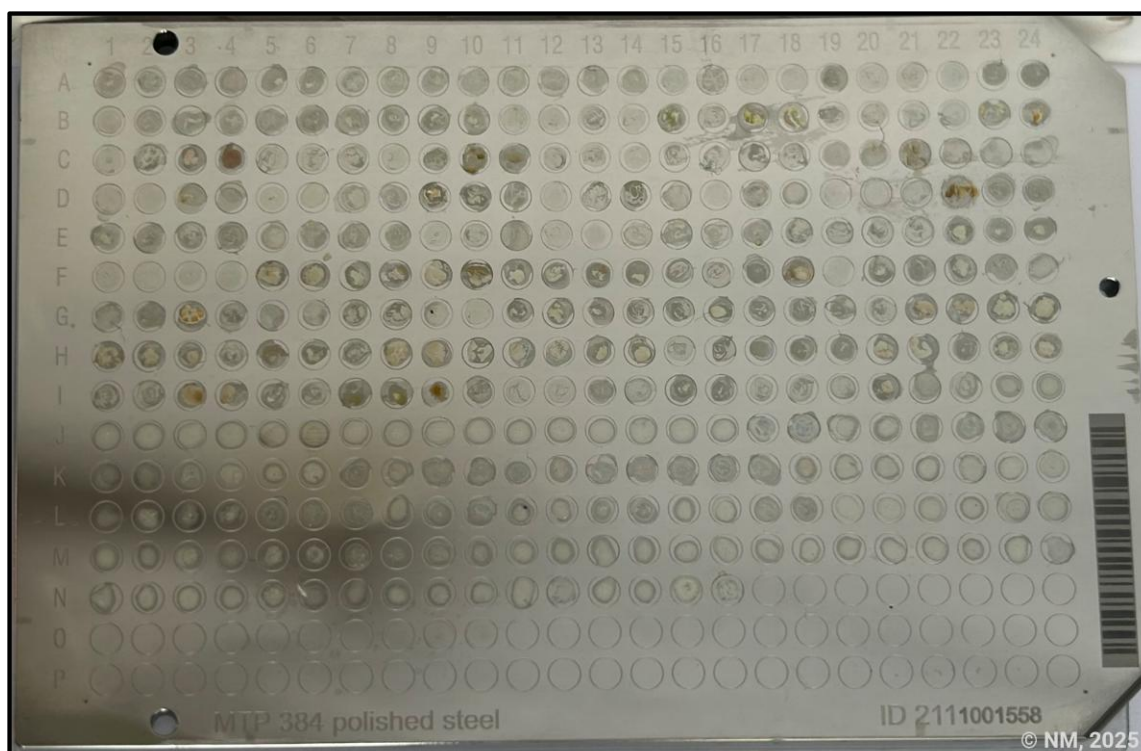
4.4.4.2.2. Metodické postupy

Jak již bylo uvedeno, pro MALDI-TOF MS identifikaci bakterií je nutné pracovat s čerstvě narostlou čistou kulturou. Při použití kultur uchovaných při 4 °C dochází k rapidnímu zhoršení získaných spekter. Aby se předešlo kontaminaci spekter, je nezbytné pracovat s kvalitním plastovým materiálem. Zároveň je nezbytné si předem připravit všechny potřebné chemikálie podle typu použité metody. Pro každou v následujících odstavcích prezentovanou metodu je vždy nezbytné si nejprve připravit matrici, která umožňuje ionizaci vzorku.

V naší laboratoři používáme jako **matrici roztok kyseliny alfa-kyan-4-hydroxyskořicové**. Pro její přípravu musí být nejprve připraven roztok organického rozpouštědla (OR), který se skládá z 50 % acetonitrilu (AN), 47,5 % vody a 2,5% trifluoroctové kyseliny (TFA). Pro přípravu 1 mL roztoku ve sterilní 1,5mL Eppendorf zkumavce aplikujte 500 µL 100 % AN, 475 µL HPLC vody a 25 µL 100 % TFA a důkladně promíchejte na vortexu. Poté do tuby s HCCA Matrix Portioned (Bruker, Německo) přidejte 250 µL OR a míchejte na vortexu do úplné rozpustění všech žlutých krystalů. Takto připravená matrice musí vždy být uchována v temnu při laboratorní teplotě ideálně ne déle než 2 týdny. Alternativní variantou přípravy matrice je navážení alfa-kyan-4-hydroxyskořicové kyseliny do sterilní 1,5mL Eppendorf zkumavky na analytických vahách a přidání roztoku OR v poměru 1:1. Další postup je poté identický.

Pro analýzu je nezbytné zkontrolovat, zda je na MALDI destičce (Obrázek 15) je dostatek prázdných spotů. Destička musí být vždy uložena v obalu. Sahejte na ni vždy pouze v rukavicích. V případě potřeby **je možné destičku umýt a připravit pro další identifikace** podle následujícího postupu. Povrch destičky, kterou položte do mycí misky, překryjte 70% etanolem, který nechte působit 5 minut. Následně destičku oplachujte pod tekoucí horkou vodou z vodovodu. Poté namočte ubrousek pro čištění MALDI destičky do 70% etanolu a otírejte jím povrch destičky. K tomu poté destičku znovu oplachujte pod tekoucí horkou vodou. Poté položte destičku zpět do mycí misky a v digestoři naneste 100 µL 80% TFA na její povrch destičky a intenzivně poté otřete všechny spoty novým ubrouskem. Hned poté oplachtěte destičku destilovanou vodou a vysušte novým ubrouskem. Pokud je destička dokonale suchá, může být uložena zpět do obalu a je takto připravena k použití.

Obrázek 15: Lesklá nerezová MALDI-TOF MS destička



Pozn.: Na obrázku je MALDI-TOF MS destička – typ MTP 384 Target Plate Polished Steel BC (Bruker, Německo). Na pozicích A1–N16 byly změřeny vzorky bakteriálních kultur. Pozice N17–P24 představují volné spoty pro nanesení nových vzorků pro další analýzy.

Pro úspěšnou identifikaci musí být mikrobiální kultura vždy kultivována v neselektivním médiu. Lze ji identifikovat přímo z kolonie narostlé na agaru v Petriho misce nebo z kultury narostlé v tekutém bujónu. Podle druhu vzorku a předpokládané identity je nutné zvolit vhodnou metodu přípravu vzorku s možným zařazením extrakce. Všechny následující návody a postupy vyházejí z pokynů výrobce a školení ke správnému používání přístroje a jsou aplikovatelné na MALDI-TOF MS identifikace z kolonií narostlých na agaru v Petriho miskách.

Nejzákladnější metodou přípravy vzorku je **Přímý přenos mikroorganismů (DT; *Direct Transfer*)**. Na MALDI destičku rozetřete pipetovací špičkou či plastovou kličkou nebo párátkem přímo bakteriální biomasu (ideálně část jedné kolonie) jako tenký film. Hustota nátěru nesmí být příliš vysoká. Pokud je na spotu destičky okem vidět alespoň nějaký biologický materiál je to pro měření dostačující. Poté biomasu překryjte napipetováním 1 μ L roztoku matrice, který nechte uschnout. Následně destičku se vzorky změřte bez dalšího skladování.

Další metodou zahrnující i krok extrakce je poté **Rozšířený přímý přenos mikroorganismů (eDT; *Extended Direct Transfer*)**. Na MALDI destičku naneste bakteriální

biomasu. Poté aplikujte 1 μ L 70 % kyseliny mravenčí jako extrakčního činidla a nechte zaschnout. Následně pipetujte 1 μ L roztoku matrice, nechte ji zaschnout a destičku se vzorky změřte.

Metoda **Extrakce pomocí trifluoroctové kyseliny (TFA; *Trifluoroacetic Acid*)** je vhodná pro sporulující mikroorganismy, u nichž selhala identifikace metodou DT. Do 1,5mL Eppendorf zkumavky přeneste 5–10 mg bakteriální biomasy. Poté k ní přidejte 50 μ L 80% TFA (s TFA pracujte vždy v digestoři) a promíchejte pipetováním až do vytvoření suspence a úplného rozpuštění/denaturace materiálu. Poté vzorek inkubujte při laboratorní teplotě po dobu 10–30 minut. Následně přidejte 150 μ L destilované vody, 200 μ L 100% AN a promíchejte na vortexu. Vzorek stočte na centrifuze při maximálních otáčkách po dobu 2 minut. Následně pipetujte 1 μ L supernatantu na spot MALDI destičku, nechte uschnout a poté hned překryjte 1 μ L roztoku matrice. Po uschnutí destičku se vzorky změřte.

Metoda **Extrakce pomocí etanolu a kyseliny mravenčí (FA; *Formic Acid*)** je také vhodná pro všechny nesporulující mikroorganismy, u nichž selhala metoda DT. Je také velmi vhodná pro identifikaci kvasinek. Do 1,5mL Eppendorf zkumavky napipetuje 300 μ L HPLC vody, do které mikrobiologickou kličkou přidejte bakteriální biomasu (zhruba 5–10 mg) a vytvořte suspenzi. Poté přidejte 900 μ L absolutního etanolu a důkladně promíchejte. Vzorek stočte na centrifuze při maximálních otáčkách po dobu 2 minut, poté slijte supernatant a znovu za stejných podmínek zopakujte centrifugování. Poté odstraňte zbytkový etanol pipetováním bez narušení pelety a nechte 5–10 minut schnout při laboratorní teplotě. Následně přidejte 80 μ L 70% FA a důkladně promíchejte. Poté přidejte stejné množství 100% AN a opět promíchejte. Vzorek stočte na centrifuze při maximálních otáčkách po dobu 2 minut. Následně pipetujte 1 μ L supernatantu na spot MALDI destičku, nechte uschnout a poté hned překryjte 1 μ L roztoku matrice. Po uschnutí destičku se vzorky změřte.

Metoda **Extrakce pomocí etanolu a FA může být modifikována i pro přípravu vzorku kultury narostlé v tekutém médium.** V následujícím odstavci je popsán tento modifikovaný postup. Do 1,5mL Eppendorf zkumavky odeberte 1 mL kultury. Zkumavku stočte na centrifuze při maximálních otáčkách po dobu 2 minut. Následně slijte supernatant a pelety resuspendujte pipetou v 70% etanolu. Vzorek poté znovu stočte při maximálních otáčkách po dobu 2 minut, slijte supernatant a centrifugování za stejných podmínek zopakujte. Poté odstraňte zbytkový etanol pipetováním bez narušení pelety a nechte 5–10 minut schnout při laboratorní teplotě. Následně přidejte 15 μ L 70% FA a důkladně promíchejte. Následně přidejte 15 μ L 100% AN a opět promíchejte. Vzorek stočte při maximálních otáčkách po dobu 2 minut. Následně

pipetujte 1 µL supernatantu na spot MALDI destičku, nechte uschnout a poté hned překryjte 1 µL roztoku matrice. Po uschnutí destičku se vzorky změřte.

Pro samotné měření na přístroji je používán software MALDI Biotyper (Bruker). Naměřená spektra jsou pomocí statistické analýzy porovnávána s referenčními spektry dostupnými v databázi výrobce. Mikroorganismy jsou poté identifikovány na úroveň druhu, případně rodu. Vzorkům jsou podle podobnosti s referenčními spektry přiděleny identity spolu s identifikačními score a konzistentními kategoriemi. Interpretace těchto výstupů je vysvětlena v Tabulce 14.

Tabulka 14: Interpretace výsledků MALDI-TOF MS identifikace

Rozsah	Interpretace	Symboły
2,00–3,00	Identifikace s vysokou mírou jistoty	(+++)
1,70–1,99	Identifikace s nízkou mírou jistoty	(+)
0,00–1,69	Identifikaci organismu nelze provést (NRI)	(-)

Kategorie	Interpretace
A	Druhá konzistence – Nejlepší shoda byla klasifikována jako „zelená“. Je-li druhá nejlepší shoda také „zelená“, patří ke stejnému druhu jako první. Pokud je druhá nejlepší shoda „žlutá“, má s první shodou přinejmenším shodný rod.
B	Rodová konzistence – Nejlepší shoda byla klasifikována jako „zelená“ nebo „žlutá“. Je-li druhá nejlepší shoda také „zelená“ nebo „žlutá“, má s první shodou přinejmenším shodný rod. Podmínky druhové konzistence (viz výše) nebyly naplněny.
C	Žádná konzistence – Nebyly naplněny podmínky druhové ani rodové konzistence.

Pozn.: Pokud jsou získány výsledky identifikací s vysokou mírou jistoty (zelené skóre) lze spoléhat na identifikaci na úroveň druhu, zatímco při identifikaci s nízkou mírou jistoty (žluté skóre) pouze na identifikaci na úroveň rodu a při získání výsledku identifikaci organismu nelze provést (červené skóre), neboli NRI, nelze analyzovaný vzorek identifikovat. Pro validní interpretaci je nicméně důležité zvážit také kategorii, která je platná pro daný výsledek.

Výsledky MALDI-TOF MS identifikací mohou být významně ovlivněny celou řadou faktorů od samotné kultivace a působení stresových faktorů, případné kontaminace kultury, metody přípravy vzorku, čerstvosti matrice či chybějícího referenčního spektra daného taxonu v databázi výrobce apod.

4.4.4.2.3. Metodika identifikace bakteriálních izolátů z mletého masa

V rámci praktického cvičení bude MALDI-TOF MS použito k identifikaci bakteriálních izolátů narostlých na neselektivním MPA. Původně byly tyto kmeny izolovány ze selektivně-diferenciačních médií, konkrétně z MCA s cílem detekce *E. coli* a z SSA s cílem detekce

Salmonella spp. ze vzorku mletého masa. Pro ověření identity narostlých bakteriálních kultur proveďte MALDI-TOF MS identifikaci metodou Rozšířeného přímého přenosu mikroorganismů (eDT) s použitím FA jako extrakčního činidla. Na MALDI destičku aplikujte vzorky duplikátně a zaznamenejte si pozice spotů. Získané výsledky poté řádně zinterpretujte a porovnejte s výsledky konfirmačních testů a mikroskopického vyšetření.

Úkol: Proveďte identifikaci bakteriálních izolátů čerstvě narostlých na MPA, které originálně pocházejí z MCA a SSA. Do testování zahrňte i kontrolní sbírkové kmeny o známé identitě odpovídající cíleným taxonům. Výsledky zaznamenejte do Tabulky 15.

Tabulka 15: Výsledky MALDI-TOF MS identifikace

ID vzorku	Identifikace 1 (skóre)	Identifikace 2 (skóre)
Kmen Xa (orig. z MCA)		
Kmen Xb (orig. z MCA)		
Kmen Ya (orig. z SSA)		
Kmen Yb (orig. z SSA)		
Kontrola K1a (<i>E. coli</i>)		
Kontrola K1b (<i>E. coli</i>)		
Kontrola K2a (<i>Salmonella</i> sp.)		
Kontrola K2b (<i>Salmonella</i> sp.)		

Pozn.: Všechny analyzované vzorky byly identifikovány v duplikátech, proto varianta a a varianta b ve sloupci ID vzorku. Pro každý vzorek interpretujte první a druhou nejlepší shodu, které zaznamenejte do sloupce Identifikace 1 (skóre) a sloupce Identifikace 2 (skóre).

MCA – MacConkey agar; SSA – *Salmonella Shigella* agar.

4.5. Shrnutí všech získaných výsledků

V rámci mikrobiologického rozboru vzorku mletého masa deskovou metodou s použitím neselektivních a selektivně-diferenciačních médií byla stanovena mikrobiologická kritéria hygieny výrobního procesu a bezpečnosti potravin. Skupiny mikroorganismů, které byly stanoveny na selektivně-diferenciačních médiích byly dále konfirmovány pomocí antigenního

a biochemického testu, dále také použitím chromogenních medií a identifikací pomocí MALDI-TOF MS. Laboratorní práce v rámci cvičení Hygieny a zdravotní nezávadnosti potravin simulovala vzorkování 5(–6) nezávislých opakování. Výsledky celého cvičení jsou tedy zdrojem dat pro vytvoření zkušebního protokolu (vzor uveden v kapitole 4.2., Obrázek 1) a srovnání získaných výsledků s Nařízením Komise (ES) č. 1441/2007 o mikrobiologické kvalitě masa.

Úkol: Do Tabulky 16 doplňte všechna data, která byla získána v rámci praktických cvičení zaměřených na stanovení mikrobiologické kvality vzorku mletého masa (od všech pracovních skupin). Uveďte, zda získané hodnoty/detekce byly verifikovány a zhodnoťte, zda vzorek mletého masa splňuje platné legislativní limity u sledovaných kritérií.

Tabulka 16: Souhrnné výsledky potřebné pro vypracování zkušební zprávy

	Kritérium hygieny výrobního procesu			Kritérium bezpečnosti potravin	
	Aerobní mikroorganismy	<i>E.coli</i> (KTJ/g)		<i>Salmonella</i> spp.	
	Počet (KTJ/g)	Počet (KTJ/g)	Konfirmace (+/-)	Detekce (+/-)	Konfirmace (+/-)
Pracovní skupina 1					
Pracovní skupina 2					
Pracovní skupina 3					
Pracovní skupina 4					
Pracovní skupina 5					
(Pracovní skupina 6)					
Hodnocení					

Pozn.: Počet aerobních mikroorganismů byl stanoven na neselektivním masopeptonovém agaru (MPA), počet *E. coli* na selektivně-diferenciačním MacConkey agaru (MCA) a *Salmonella* spp. byla stanovena na selektivně-diferenciačním *Salmonella shigella* agaru (SSA). Pokud nebyly stanovené počty pro *E. coli* konfirmovány COLitestem, případně nárůstem na chromogenním selektivně-diferenciačním médiu TBX, nebo identifikací na MALDI-TOF MS, uveďte detekční limit, tedy $< 10^1$ KTJ/g. Pokud nebyla přítomnost *Salmonella* spp. konfirmována *Salmonella* Test Kitem, případně nárůstem na chromogenním

selektivně-diferenciačním médiu BSA, nebo identifikací na MALDI-TOF MS, detekce nebyla verifikována a přítomnost *Salmonella* spp. tedy nebyla prokázána. Závěrem zhodnoťte, zda vzorek mikrobiologicky vyhovuje či nevyhovuje dle platného Nařízení. Získané výsledky využijte pro vyplnění zkušebního protokolu (Obrázek 1).

5. Mikrobiologická analýza syrového mléka

Cílem této kapitoly je seznámit studenty s legislativním rámcem a metodami stanovení mikrobiologických kritérií v syrovém mléce. Praktická část je zaměřena na stanovení vybraných skupin mikroorganismů pomocí klasické kultivační metody a miniaturizovaných testů, konkrétně mikrobitestů a petrifilmů. Studenti se naučí hodnotit mikrobiální zátěž vzorků, porovnávat výsledky získané různými metodami a interpretovat je ve vztahu k požadavkům legislativy.

Mléko je svým složením a vysokým obsahem vody velmi vhodným prostředím pro růst mikroorganismů, které mohou svou činností významně ovlivnit kvalitu mléka a mléčných výrobků. Za fyziologických podmínek je mléko v mléčné žláze sterilní, pokud dojnice netrpí zánětem. Ke kontaminaci mléka mikroorganismy dochází zejména během dojení a při následné manipulaci. Za primární kontaminanty syrového mléka lze považovat mikroorganismy ze strukových kanálků, povrchu vemene, těla a výkalů dojnic. Dalšími zdroji mikrobiálních kontaminací jsou krmivo, prach, voda, ruce ošetřovatelů, dojící technika, nádoby, kde je mléko uchováváno, a další technologická zařízení. K sekundární kontaminaci dochází po tepelném ošetření mléka při jeho dalším zpracování. Zatímco v syrovém kravském mléce se mohou koliformní bakterie přirozeně vyskytnout (jejich zdrojem je trávicí trakt dojnic), u tepelně ošetřeného mléka indikuje jejich přítomnost buď nedodržení pasteračních či sterilizačních teplot a časů, nebo porušení hygienických postupů při následném zacházení s mlékem.

5.1. Legislativní limity

Definice a jednotlivá kritéria pro syrové mléko jsou legislativně zakotveny v Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým jsou stanoveny zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. V Oddílu IX: Syrové mléko a mléčné výrobky jsou v Kapitole I: Syrové mléko – Prvovýroba uvedeny hygienické požadavky na výrobu syrového mléka (I.), na hygienu zemědělských podniků určených k produkci mléka (II.) a na kritéria pro syrové mléko (III.), jejichž splnění musí provozovatelé potravinářských podniků, kteří vyrábějí, popřípadě svážejí syrové mléko, zajistit. Kritéria pro syrové mléko jsou uvedena v Tabulce 17.

Tabulka 17: Kritéria pro syrové mléko

Kritérium	Limit
Obsah mikroorganismů při 30 °C (na 1 mL)	≤ 100 000 (*)
Obsah somatických buněk (na 1 mL)	≤ 400 000 (**)

Pozn.: (*) Klouzavý geometrický průměr za dvouměsíční období, alespoň dva vzorky za měsíc. (**) Klouzavý geometrický průměr za tříměsíční období, alespoň jeden vzorek za měsíc, pokud příslušný orgán neurčí jinou metodiku s cílem zohlednit sezónní variace v úrovni výroby. Pokud je mléko od jiných druhů zvířat než od krav, limit je mírnější – konkrétně ≤ 1 500 000 (*). To ale neplatí v případě, že je toto mléko určeno na produkci výrobků ze syrového mléka postupem nezahrnujících tepelnou úpravu. V tomto případě je limit striktnější – ≤ 500 000 (*).

Na národní úrovni je syrové mléko definováno v § 13 Vyhlášky č. 289/2007 Sb., o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství. Tato vyhláška umožňuje chovateli, se souhlasem krajské veterinární správy, prodávat syrové mléko v malých množstvích přímo spotřebiteli pro spotřebu v jeho domácnosti, a to buď v místě výroby, nebo prostřednictvím prodejního automatu. Pro přímý prodej syrového mléka stanovuje vyhláška hygienické požadavky na prostory a vybavení, hygienu při dojení, sběr, přepravu a také hygienu personálu. Přímý prodej syrového mléka v místě výroby musí probíhat v místnosti oddělené od stájí, vybavené chladicím zařízením, a na viditelném místě musí být uvedeno upozornění „*Syrové mléko, před použitím tepelně opracovat nebo pasterovat.*“.

Pokud syrové mléko určené k přímému prodeji není prodáno do 2 hodin po nadojení, musí být zchlazeno na 8 °C a prodáno do 24 hodin, nebo zchlazeno na 6 °C a prodáno do 48 hodin. Za malé množství syrového mléka, určené k přímému prodeji jednomu konečnému spotřebiteli, se považuje množství odpovídající obvyklé denní spotřebě dané domácnosti. Požadavky na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje jsou dále uvedeny ve Vyhlášce č. 397/2016 Sb.

Mléčné výrobky jsou poté definovány v Nařízení č. 853/2004 jako zpracované výrobky získané přímo ze syrového mléka nebo dalším zpracováním takto zpracovaných výrobků. Konkrétní mikrobiologická kritéria pro bezpečnost potravin a hygienu výrobního procesu jsou stanovena v Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Příklad konkrétního limitu týkajícího se kritéria

bezpečnosti potravin vyrobených ze syrového mléka s nižší než pasterační úpravou jsou uvedeny v Tabulce 18.

Tabulka 18: Kritérium bezpečnosti potravin pro výrobky z mléka s nižší než pasterační úpravou

Kategorie potravin	Mikro-organismy	Plán odběru vzorku		Limity		Analytická referenční metoda
		n	c	m	M	
<i>1.11 Sýry, máslo a smetana vyrobené ze syrového mléka nebo mléka, které bylo podrobeno nižšímu tepelnému ošetření než pasterizaci</i>	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	Nepřítomnost ve 25 g		EN/ISO 6579

Pozn.: n = rozsah výběru; m = množství mikroorganismů, které se připouští u všech vzorků n; M = množství mikroorganismů, které se ještě připouští u počtu vzorků, který je nižší nebo se rovná c; c = rozhodné číslo, tj. počet vzorků z výběru n, u nichž se připouští hodnota M. Uvedené mikrobiologické kritérium se vztahuje na produkty uvedené na trh během doby údržnosti výrobku. Uvedené kritérium se netýká výrobků, u nichž je výrobce schopen prokázat, že v důsledku případné doby zrání a a_w výrobku neexistuje riziko *Salmonella* spp.

Interpretace výsledků vyšetření – *Salmonella* spp.:

- **vyhovující**, pokud všechny zjištěné hodnoty poukazují na nepřítomnost příslušné bakterie;
- **nevyhovující**, pokud je přítomnost této bakterie určena v kterékoli jednotce vzorku.

V případě nevyhovujících výsledků vyšetření, musí provozovatelé potravinářských podniků učinit opatření detailněji popsaná v kapitole 4.1 těchto skript.

Dále prezentované příklady limitů týkajících se kritérií hygieny výrobního procesu vycházejí z podkapitoly 2.2 *Mléko a mléčné výrobky*. Vzhledem k zaměření této kapitoly na syrové mléko budou nejprve uvedeny limity pouze pro potraviny vyrobené ze syrového mléka nebo mléka upraveného nižší než pasterační teplotou v Tabulce 19. V Tabulce 20 jsou poté uvedeny limity pro potraviny vyrobené z pasterovaného mléka.

Tabulka 19: Kritéria hygieny výrobního procesu pro výrobky z mléka s nižší než pasterační úpravou

Kategorie potravin	Mikro-organismy	Plán odběru vzorku		Limity		Analytická referenční metoda
		n	c	m	M	
2.2.3 Sýry vyrobené ze syrového mléka	Koaguláza pozitivní stafylokoky ¹	5	2	10 ⁴ KTJ/g	10 ⁵ KTJ/g	EN/ISO 6888-2
2.2.4 Sýry vyrobené z mléka, které bylo podrobeno nižšímu tepelnému ošetření než pasterizaci, a zrající sýry vyrobené z pasterizovaného či silněji tepelně ošetřeného mléka nebo z pasterizované či silněji tepelně ošetřené syrovátky	Koaguláza pozitivní stafylokoky ¹	5	2	100 KTJ/g	1 000 KTJ/g	EN/ISO 6888-1/2
2.2.6 Máslo a smetana vyrobené ze syrového mléka nebo z mléka, které bylo podrobeno nižšímu tepelnému ošetření než pasterizaci	<i>E. coli</i> ²	5	2	10 KTJ/g	100 KTJ/g	ISO 16649-1/2

Pozn.: n = rozsah výběru; m = množství mikroorganismů, které se připouští u všech vzorků n; M = množství mikroorganismů, které se ještě připouští u počtu vzorků, který je nižší nebo se rovná c; c = rozhodné číslo, tj. počet vzorků z výběru n, u nichž se připouští hodnota M;

¹ Uvedené mikrobiologické kritérium se vztahuje na produkty v takovém okamžiku během výrobního procesu, kdy se předpokládá nejvyšší počet stafylokoků. Opatření v případě nevyhovujících výsledků je zlepšení hygieny výroby a výběru surovin; pokud jsou zjištěny hodnoty >10⁵ KTJ/g, musí být příslušná partie sýra vyšetřena na stafylokokové enterotoxiny.

² Uvedené kritérium se vztahuje na produkty na konci výrobního procesu. Opatření v případě nevyhovujících výsledků je zlepšení hygieny výroby a výběru surovin.

Tabulka 20: Kritéria hygieny výrobního procesu pro výrobky z mléka s pasterační úpravou

Kategorie potravin	Mikro-organismy	Plán odběru vzorku		Limity		Analytická referenční metoda
		n	c	m	M	
2.2.1 Pasterizované mléko a další pasterizované tekuté mléčné výrobky	<i>Enterobacteriaceae</i> ¹	5	2	<1 KTJ/mL	5 KTJ/mL	ISO 21528-1
2.2.2 Sýry vyrobené z tepelně ošetřeného mléka či tepelně ošetřené syrovátky	<i>E. coli</i> ²	5	2	100 KTJ/g	1 000 KTJ/g	ISO 16649-1/2
2.2.5 Nezrající měkké sýry (čerstvé sýry) vyrobené z pasterizovaného či silněji tepelně ošetřeného mléka nebo z pasterizované či silněji tepelně ošetřené syrovátky	Koaguláza pozitivní stafylokoky ³	5	2	10 KTJ/g	100 KTJ/g	EN/ISO 6888-1/2

Pozn.: n = rozsah výběru; m = množství mikroorganismů, které se připouští u všech vzorků n; M = množství mikroorganismů, které se ještě připouští u počtu vzorků, který je nižší nebo se rovná c; c = rozhodné číslo, tj. počet vzorků z výběru n, u nichž se připouští hodnota M;

¹ Uvedené mikrobiologické kritérium se vztahuje na produkty na konci výrobního procesu. Opatření v případě nevyhovujících výsledků je kontrola účinnosti tepelného ošetření a prevence opětovné kontaminace, jakož i jakosti surovin. ² Uvedené kritérium se vztahuje na produkty v takovém okamžiku během výrobního procesu, kdy se předpokládá nejvyšší počet bakterií *E. coli*. Opatření v případě nevyhovujících výsledků je zlepšení hygieny výroby a výběru surovin. ³ Uvedené kritérium se vztahuje na produkty na konci výrobního procesu. Opatření v případě nevyhovujících výsledků je zlepšení hygieny výroby; pokud jsou zjištěny hodnoty >10⁵ KTJ/g, musí být příslušná partie sýra vyšetřena na stafylokokové enterotoxiny.

Výsledky vyšetření vypovídají o mikrobiologické jakosti vyšetřovaného procesu. Interpretace výsledků vyšetření – *Enterobacteriaceae*, *E. coli* a koagulázopozitivní stafylokoky v mléce a mléčných výrobcích:

- **vyhovující**, pokud jsou všechny zjištěné hodnoty ≤ m;
- **příjatelny**, pokud se nejvýše c/n hodnot nachází mezi m a M a zbývající zjištěné hodnoty jsou ≤ m;

- **nevyhovující**, pokud je jedna nebo více zjištěných hodnot > M nebo se více než c/n hodnot nachází mezi m a M.

Užitečné odkazy:

- Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 o zvláštních hygienických pravidlech pro potraviny živočišného původu: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=celex:32004R0853>
- Vyhláška č. 289/2007 Sb. o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2007-289>
- Vyhláška č. 397/2016 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2016-397>
- Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:02005R2073-20200308>
- Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32007R1441>

5.2. Kultivační stanovení vybraných skupin mikroorganismů

Kritéria pro syrové mléko jsou legislativně zakotvena v Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004. V rámci praktického cvičení předmětu Hygiena a zdravotní nezávadnost potravin bude v neakreditované mikrobiologické laboratoři stanoveno pouze vybrané mikrobiologické kritérium z tohoto Nařízení, a to konkrétně obsah mikroorganismů při 30 °C. Přestože nejsou kritéria *Enterobacteriaceae* a *E. coli* určena pro syrové mléko, ale pro mléko tepelně ošetřené dle Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007, budou pro účely výuky také zahrnuty do stanovení pro demonstraci fekálního znečištění syrového mléka, tedy primární kontaminace.

Obsah mikroorganismů při 30 °C, *Enterobacteriaceae* a *E. coli* budou stanoveny různými metodami – kultivační analýzou deskovou metodou s použitím polotuhých pěstebních prostředků a miniaturizovanými kultivačními testy, konkrétně použitím mikrobiotestů a petrifilmů. Miniaturizované testy mohou být jednoduše použity v potravinářské praxi pro rutinní screening mikrobiální zátěže.

5.2.1. Metodika mikrobiologické analýzy deskovou metodou

Postup pro stanovení vybraných skupin mikroorganismů v syrovém mléce vychází z metodiky pro stanovení mikrobiologických kritérií ve vzorku mletého masa (detailně popsáno

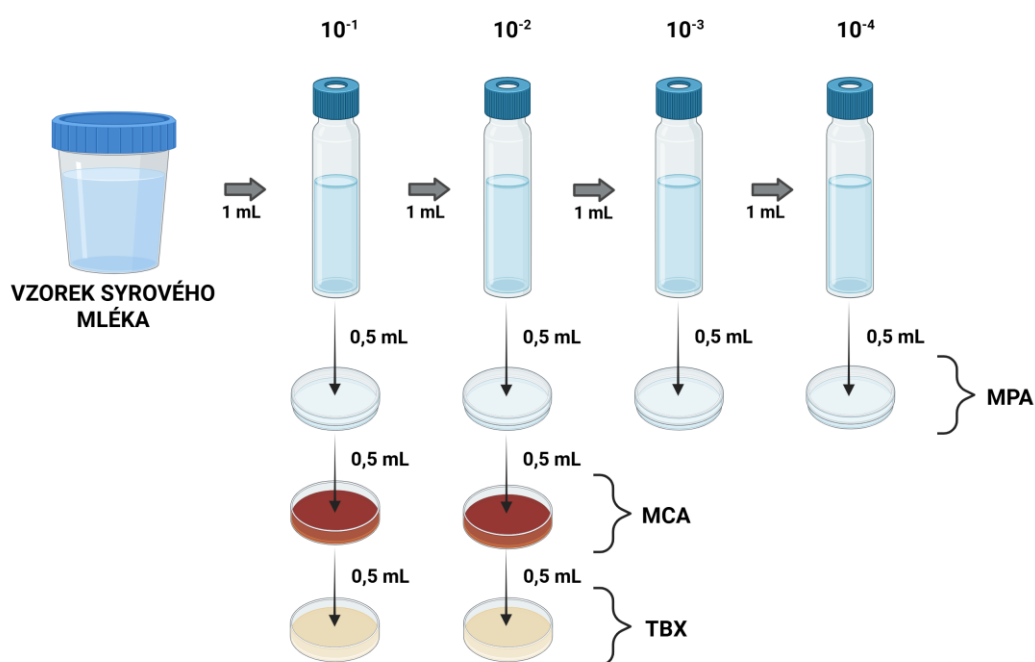
v kapitole 4.3.2.). Před samotnou analýzou je důležité si vše důkladně naplánovat, předem si připravit veškerá potřebná média a sterilní materiál. Pro provedení analýzy je nezbytná příprava sterilního ředícího 0,9% roztoku NaCl ve zkumavkách. Potřebná kultivační média pro stanovení vybraných skupin mikroorganismů jsou uvedena v Tabulce 21. Cílem je tedy stanovit obsah mikroorganismů při 30 °C, *Enterobacteriaceae* a *E. coli*. Získané výsledky analýzy nebudou mít úřední platnost a poslouží výhradně pro výukové účely.

Tabulka 21: Kultivační média potřebná pro kultivační analýzu vzorku syrového mléka

Kultivační médium	Cílená skupina mikroorganismů
MPA – Nutrient Agar	Obsah mikroorganismů při 30 °C
MCA – MacConkey Agar	Koliformní bakterie (<i>E. coli</i>)
TBX – Tryptone Bile X-Glucuronide Chromogenic Agar	<i>E. coli</i>

Design zjednodušeného experimentu, konkrétně příprava ředící řady, selekce stanovovaných ředění, a s tím související neparalelní inokulace Petriho misek v jedné kopii, pro stanovení těchto kritérií je uveden v Obrázku 16.

Obrázek 16: Kultivační stanovení vybraných mikrobiologických kritérií v syrovém mléce



© NM, 2025

Pozn.: MPA – masopeptonový agar; MCA – MacConkey agar, TBX – Tryptone Bile X-Glucuronide Chromogenic Agar.

Každá skupina na cvičení zanalyzuje jeden vzorek syrového mléka. Nejprve musí být vzorek sériově rozředěn. Do zkumavky s 9 mL fyziologického roztoku je asepticky přidán 1 mL

promíchaného vzorku a následnou homogenizací. Tímto způsobem je vytvořeno ředění 10^{-1} . Dále je vzorek analogicky sériově naředěn až do konečného poměru $1:10^4$ mL/mL. Na přípravu každého ředění je nutné použít vždy novou sterilní špičku.

Po přípravě ředící řady jsou naředěná a vždy zhomogenizovaná inokula po 0,5 mL umístěna pipetou se sterilní špičkou do malých Petriho misek. Inokulaci misek provádějte postupně od nejvyššího po nejnižší ředění, tedy od nejnižší koncentrace mikrobiálních buněk po nejvyšší. Následně jsou inokula zalita neselektivním MPA, selektivně-diferenciační MCA a chromogenní selektivně-diferenciační TBX. MPA misky s inokulem kultivujte aerobně při 30 °C po dobu 72 hodin, MCA aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin a TBX aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin (všechny varianty dnem vzhůru po utuhnutí).

Po proběhlé době kultivace jsou spočítány kolonie narostlé na jednotlivých kultivačních půdách, kdy každá spočtená kolonie je označena lihovým popisovačem. V případě obsahu mikroorganismů při 30 °C jsou spočítány kolonie všech kultivačních znaků na MPA, stejně tak pro *Enterobacteriaceae* na MCA, zatímco pro vyjádření kvantity *E. coli* na TBX, jsou spočítány kolonie s typickými znaky, tedy pouze zelenomodré. V případě počtů všech kolonií je poté nutné výsledek vynásobit 2×, protože na agar bylo očkováno pouze 0,5 mL, nikoliv 1 ml. Konečné množství bakterií je poté vypočteno podle vztahu $P = [(P1 + P2)/11] \times F$ (P1, P2 – počet kolonií na dvou po sobě jdoucích počitatelných plotnách, F – převrácená hodnota vyššího ředění); a výsledky jsou vyjádřeny jako počet kolonie tvořících jednotku v 1 mL vzorku syrového mléka (KTJ/mL).

Úkol: Proveďte kultivační stanovení deskovou metodou obsahu mikroorganismů při 30 °C, koliformních bakterií a *E. coli*. Všechna získaná data, včetně výsledků výpočtů, uveďte do Tabulky 22. Porovnejte, zda počty koliformních bakterií a *E. coli* jsou řádově srovnatelné na selektivně-diferenciačním médiu MCA a chromogenním selektivně-diferenciačním médiu TBX.

Tabulka 22: Výsledková tabulka – počty narostlých kolonií

Kultivační médium	Ředění				KTJ/mL
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
MPA					
MCA			nt	nt	
TBX			nt	nt	

Pozn.: V případě použití malých Petriho misek jsou počítatelné ty, které obsahují 10–150 kolonií. Přítomnost pouze několika kolonií může indikovat kontaminaci při nedostatečně aseptické práci. Spočítané množství kolonií musí být vynásobeno číslem zohledňující objem počátečního inokula. MPA – masopeptonový agar; MCA – MacConkey agar; TBX – Tryptone Bile X-Glucuronide Chromogenic Agar; nt – netestováno; KTJ/mL – počet kolonií tvořících jednotku vztažených na mililitr vzorku syrového mléka.

Vzhledem k použití chromogenního selektivně-diferenciačního média pro stanovení *E. coli*, nebude další konfirmace identity tohoto taxonu prováděna.

5.2.2. Metodika mikrobiologické analýzy miniaturizovanými testy

Další možností mikrobiologické kontroly v potravinářském průmyslu jsou miniaturizované testy, které umožňují provádět velké množství analýz s nižšími náklady, menšími prostorovými nároky a bez časově náročné přípravy médií. Jejich výhodou je jednoduché použití, rychlejší dostupnost výsledků a možnost kontroly mikrobiologické kvality i nespecializovanými pracovníky. V této kapitole budou podrobněji rozebrány mikrobitesty a Petrifilmy.

5.2.2.1. Mikrobitesty

Mikrobitesty (Laktoflóra, ČR) představují jednoduchou, levnou a praktickou metodu k určení základních skupin mikroorganismů při rutinních mikrobiologických kontrolách v potravinářském průmyslu. Jsou vhodné pro systematické sledování úrovně sanitace i dodržování technologických procesů.

Jsou to proužky speciálního savého papíru napuštěné živnou půdou s přídavkem indikátorů a selektivních činidel. Proužky jsou uloženy v polyetylenových sáčkích, které zároveň slouží jako uzavřené kultivační prostředí. Po nasátí vzorku se nechávají kultivovat v termostatu při optimální teplotě podle cílové skupiny mikroorganismů. Jejich výhodou jsou nižší náklady na

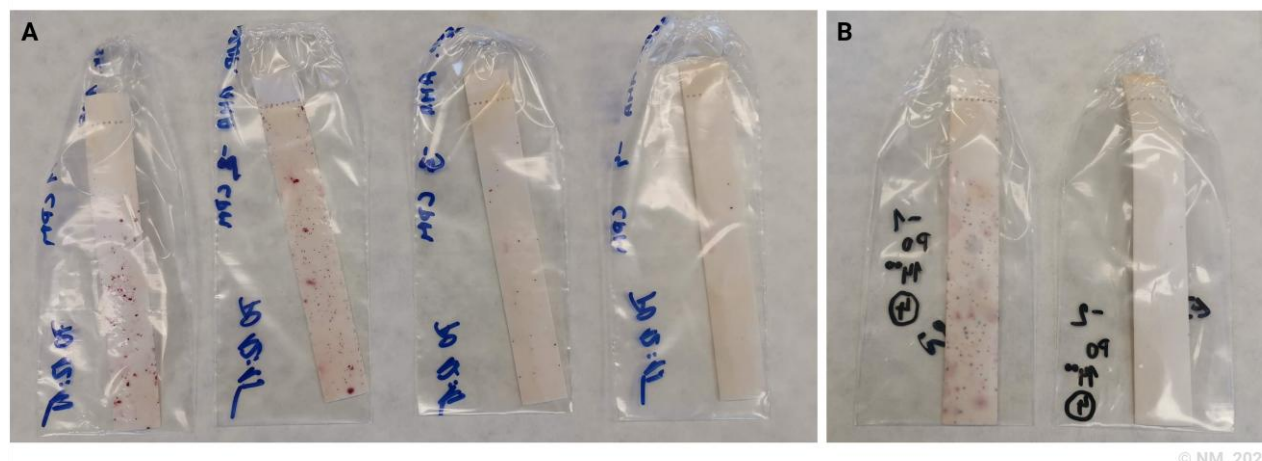
rozbory, možnost provádět velké množství analýz pro stanovení různých skupin mikroorganismů současně, mají jednoduché a rychlé použití a jsou vhodné i pro nespécializované pracovníky.

Výrobce nabízí řadu variant mikrobittestů cílících na různé skupiny mikroorganismů, a to: MIKROBITEST CA pro stanovení koliformních bakterií, MIKROBITEST CA-4 pro stanovení koliformních bakterií ve vodě, MIKROBITEST PRPM pro stanovení všech redukujících mikroorganismů, MIKROBITEST P pro stanovení plísní, MIKROBITEST P-5 pro stanovení kontaminace vzdušnými plísněmi, MIKROBITEST K pro stanovení kvasinek a MIKROBITEST CH pro současné stanovení koliformních bakterií a *E. coli*. Všechny uvedené testy jsou vyráběny v modifikacích ke stanovení v běžných tekutinách, ve viskózních tekutinách a pro otiskovou metodu.

V rámci praktického cvičení bude použit MIKROBITEST PRPM ke stanovení všech redukujících mikroorganismů a MIKROBITEST CH pro současné stanovení koliformních bakterií a *E. coli*. Pro provedení testů nejprve sériově rozřeďte vzorek syrového mléka ve fyziologickém roztoku až do koncentrace ředění 10^{-4} (detailně popsáno v kapitole 5.2.1. Metodika mikrobiologické analýzy deskovou metodou). Poté asepticky otevřete obal mikrobittestu (nad částí, kde je perforován), vysuňte papírek za perforovanou část a sáček si připravte k pozdějšímu opětovnému použití. Proužek testu držte za perforovanou část a ponořte ho do konkrétního ředění po dobu 5 s: test PRPM do 1.–4. ředění s namáčením po dobu 30 s, test CH do 1.–2. ředění s namáčením po dobu 30 s. Po vyjmutí proužku nechte přebytečnou tekutinu odkapat, vložte proužek zpět do sáčku, přidržte proužek v sáčku v místě perforace a oddělte část, za kterou byl proužek držen. Sáček poté zatavte nad plamenem, čímž vytvoříte vhodné kultivační prostředí. Následně inkubujte dle varianty testu: test PRPM při 30 °C po dobu 24 hodin, zatímco test CH při 37 °C po dobu 24 hodin.

Po proběhlé inkubaci spočítejte kolonie na obou stranách proužku. Validní pro vyhodnocení jsou pouze proužky s 20–200 koloniemi. Na testu PRPM spočítejte všechny červené kolonie, zatímco na testu CH spočítejte zvlášť růžovo-červené kolonie odpovídající *Enterobacteriaceae* a modrofialové kolonie představující *E. coli*. Žádná kolonie se nesmí počítat dvakrát. Pro přesnější vyhodnocení lze proužek prosvítit. Kolonie narostlé na testu PRPM a testu CH jsou znázorněny na Obrázku 17.

Obrázek 17: Vykultivované kolonie *Enterobacteriaceae* s *E. coli* na mikrobitestech



© NM, 2025

Pozn.: A – narostlé kolonie všech redukujících mikroorganismů na MIKROBITESTu PRPM; B – *Enterobacteriaceae* s *E. coli* na MIKROBITESTu CH.

Užitečný odkaz:

➤ Mikrobitesty od výrobce MILCOM (ČR): <https://www.milcom-as.cz/co-nabizime/mikrobitesty>

Úkol: Proved'te kultivační stanovení všech redukujících mikroorganismů pomocí MIKROBITESTu PRPM a současně stanovte koliformní bakterie a *E. coli* pomocí MIKROBITESTu CH. Všechna získaná data, včetně výsledků výpočtů, uveďte do Tabulky 23.

Tabulka 23: Vyhodnocení počtu vybraných skupin mikroorganismů stanovených mikrobitesty

Skupina MO	Test	Ředění				KTJ/mL
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
Všechny redukující MO	PRPM					
<i>Enterobacteriaceae</i>	CH			nt	nt	
<i>E. coli</i>	CH			nt	nt	

Pozn.: Při vyhodnocování nezapomeňte zohlednit nasávací schopnost proužku daného mikrobitestu, která je 0,1 mL pro každou variantu testu. MO – mikroorganismy, PRPM – Mikrobitest pro stanovení všech redukujících mikroorganismů, CH – mikrobitest pro současné stanovení koliformních bakterií a *E. coli*.

5.2.2.2. Petrifilm

Petrifilmy (Neogen, USA) představují praktickou, standardizovanou a celosvětově používanou metodu pro kvantitativní stanovení mikroorganismů v potravinách a nápojích. Jejich hlavní výhodou je eliminace potřeby přípravy klasických Petriho misek s živnými médii, což snižuje časovou i materiálovou náročnost a zjednodušuje celý postup stanovení. Petrifilmy umožňují rychlé získání spolehlivých a snadno interpretovatelných výsledků. I proto mohou být voleny jako nástroj pro rutinní kontrolu mikrobiální kvality.

Každý test je tvořen kartičkou s kultivačním médiem, studenou vodou rozpustným želírujícím činidlem, indikátory a selektivními látkami. Po inokulaci testovaného vzorku a krátké přípravě vzniká pevný gel, na kterém při zajištění vhodných kultivačních podmínek dochází k růstu mikroorganismů. Destičky jsou skladné a umožňují paralelní testování velkého množství vzorků. Jejich vyhodnocení je prováděno vizuálně, či přístrojem.

Výrobce nabízí různé varianty Petrifilmů zaměřené na konkrétní skupiny mikroorganismů, například pro stanovení celkového počtu aerobních mikroorganismů, koliformních bakterií přímo i s odlišením *E. coli*, *Bacillus cereus*, kvasinek a plísní aj.

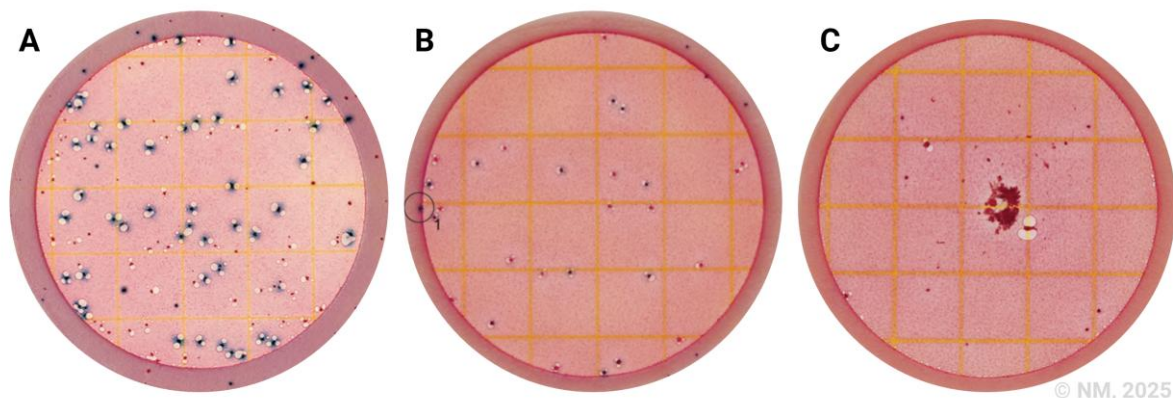
V rámci praktického cvičení bude použita varianta Petrifilm® *E. coli*/Coliform Count Plate, určená ke stanovení počtu koliformních bakterií a *E. coli* v potravinářském a nápojovém průmyslu. Součástí testové části jsou modifikované živiny Violet Red Bile (VRB), želírující činidlo rozpustné ve studené vodě, indikátor glukuronidázové aktivity (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-glukuronid) a tetrazoliový indikátor pro lepší viditelnost kolonií.

Pro provedení testů nejprve sériově rozřeďte vzorek syrového mléka ve fyziologickém roztoku až do koncentrace ředění 10^{-2} (detailně popsáno v kapitole 5.2.1. Metodika mikrobiologické analýzy deskovou metodou). Poté vyjměte kartičku testu, položte ji na rovný povrch a zvedněte horní krycí fólii. Asepticky aplikujte kolmo pipetou 1 mL inokula na střed spodní fólie. Pro analýzu budou použita inokula z 0.–2. ředění. Pro jedno ředění bude použita jedna kartička testu. Poté fólii opatrně srolujte na vzorek, abyste zabránili vzniku vzduchových bublin. Následně přiložte plastový Petrifilm aplikátor plochou stranou dolů na střed kartičky a zatlačte na fólii, aby došlo k rovnoměrnému rozprostření vzorku. Poté ponechte test po dobu jedné minuty na laboratorním stole. Následně inkubujte test při 37 °C po dobu 24 hodin.

Po proběhlé inkubaci spočítejte narostlé kolonie. Koliformní bakterie tvoří červené kolonie s vyprodukovaným plynem a konkrétně *E. coli* tvoří modré nebo červené kolonie s modrým středem vždy s viditelnými bublinami plynu. Celková počet koliformních bakterií tedy představují všechny červené a modré kolonie a plynem. Ukázka narostlých kolonií je znázorněna

na Obrázku 18. Pro správnou interpretaci není vhodné použít testy s více než 150 koloniemi na kartičce. V případě potřeby lze z Petrifimů narostlé kolonie izolovat.

Obrázek 18: Interpretace počtu narostlých bakteriálních kolonií na petrifilmech



Pozn.: Na obrázcích A–C je znázorněn možný nárůst kolonií na Petrifilmu® *E. coli*/Coliform Count Plate. A – počet modrých kolonií s plynem odpovídajících *E. coli* je 49, zatímco počet kolonií *E. coli* spolu s červenými koloniemi s plynem odpovídají celkovému počtu *Enterobacteriaceae* je 87 kolonií. B – 13 kolonií *E. coli* a celkem 28 kolonií *Enterobacteriaceae*; kolonie rostoucí na okraji kultivačního kruhu by neměly být započítávány z důvodu nižší selektivity média (příklad zakroužkován). C – 3 kolonie *Enterobacteriaceae*, zbytek červených částic bez tvorby plynu jsou částice vzorku a nejsou počítány.

Užitečný odkaz:

➤ Petrifilm® *E. coli*/Coliform Count Plates od výrobce Neogen (USA):
<https://www.neogen.com/en/categories/microbiology/petrifilm-e-coli-coliform-count-plates/?min=700002271>

Úkol: Proved'te kultivační stanovení počtu koliformních bakterií a *E. coli* pomocí Petrifilm® *E. coli*/Coliform Count Plate. Všechna získaná data, včetně výsledků výpočtů, uveďte do Tabulky 24.

Tabulka 24: Vyhodnocení počtu vybraných skupin mikroorganismů stanovených petrifilmem

Skupina MO	Ředění			KTJ/mL
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	
<i>Enterobacteriaceae</i>				
<i>E. coli</i>				

Pozn.: MO – mikroorganismy, PRPM – Mikrobitestr pro stanovení všech redukujících mikroorganismů, CH – mikrobitestr pro současné stanovení koliformních bakterií a *E. coli*.

6. Rezidua biologicky aktivních látek v potravinách

Cílem této kapitoly je seznámit studenty s problematikou reziduí biologicky aktivních látek v potravinách, zejména růstových stimulatorů a veterinárních léčiv, s jejich legislativní úpravou a metodami detekce. Praktická část je zaměřena na průkaz přítomnosti antibiotických látek ve vzorcích kuřecího masa pomocí mikrobiologického testu a na interpretaci získaných výsledků ve vztahu k limitům stanovených legislativou.

Během zemědělské výroby mohou být suroviny živočišného i rostlinného původu kontaminovány látkami různé chemické povahy, které pocházejí z různých zdrojů a mohou přetrvávat v potravinách ve formě reziduí. Pouze některé z těchto látek však vykazují biologickou aktivitu v těle konzumenta. Rezidua pocházející z rostlinné výroby (např. pesticidy, dusitany a dusičnany) nebo z průmyslových zdrojů (např. polychlorované bifenyly, dioxiny) působí většinou toxicky, mohou vyvolávat otravy či chronická onemocnění a řada z nich má schopnost se v těle kumulovat. Biologicky aktivní účinky na lidský organismus mají však nejčastěji látky pocházející ze živočišné výroby, zejména růstové stimulatory a veterinární léčiva (např. antibiotika, antikokcidika, antiparazitika), které jsou primárně určeny k působení v organismu ošetřené zvířete, avšak pokud jejich rezidua přetrvávají v potravinách, mohou biologickou aktivitu vykazovat i u konzumenta.

Mezi negativní účinky biologicky aktivních reziduí v potravinách živočišného původu patří alergické reakce (např. rezidui penicilinu v mléce dojníc léčených při mastitidě mohou vyvolat kožní přecitlivělost), vznik bakteriální rezistence (rezidua antibiotik v nízkých koncentracích mohou působit jako selekční tlak pro rezistentní kmeny mikroorganismů), toxicita (např. reziduum chloramfenikolu v potravine může negativně ovlivnit krvetvorbu a způsobit aplastickou anémii).

Kontrola reziduí veterinárních léčiv, růstových stimulátorů a dalších biologicky aktivních látek je v EU přísně regulována. Jsou stanoveny maximální limity reziduí (MRL, *Maximum Residue Limits*), jejichž dodržování je povinné a je pravidelně monitorováno v rámci národních i evropských programů dozoru nad potravinami. Legislativně je tato problematika upravena řadou dokumentů. Jedná se například o Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009, kterým jsou se stanoveny postupy Společenství pro stanovení limitů reziduí farmakologicky účinných látek v potravinách živočišného původu, Nařízení Komise (EU) č. 37/2010 o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu, Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/625 o úředních kontrolách a jiných úředních činnostech prováděných s cílem zajistit uplatňování potravinového a krmivového práva a pravidel týkajících se zdraví zvířat a dobrých životních podmínek zvířat, zdraví rostlin a přípravků na ochranu rostlin, Zákon č. 166/1999 Sb. o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů a řady dalších. Na kontrole se poté podílejí státní orgány státními orgány vykonávajícími dozor podle svěřené kompetence, jako například Státní veterinární správa, která monitoruje rezidua v živočišných produktech (mléko, maso, vejce, med), SZPI kontrolující potraviny živočišného i rostlinného původu v tržní síti, ÚKZÚZ kontrolující rezidua v rostlinných produktech a Celní správa.

Užitečné odkazy:

- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009 o postupech Společenství pro stanovení limitů reziduí farmakologicky účinných látek v potravinách živočišného původu: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32009R0470>
- Nařízení Komise (EU) č. 37/2010 o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=celex:32010R0037>
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/625 o úředních kontrolách a jiných úředních činnostech prováděných s cílem zajistit uplatňování potravinového a krmivového práva a pravidel týkajících se zdraví zvířat a dobrých životních podmínek zvířat, zdraví rostlin a přípravků na ochranu rostlin: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32017R0625>
- Zákon č. 166/1999 Sb. o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1999-166>

6.1. Růstové stimulanty

Růstové stimulanty jsou zvířatům ve velkochovech většinou podávány jako součást krmné dávky v podobě tzv. krmných aditiv (doplňkové látky v krmivech). Používání krmných aditiv je legislativně upraveno Nařízením Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat. Za **krmná aditiva** jsou považovány látky, mikroorganismy nebo přípravky jiné než krmné suroviny a premixy, které se záměrně přidávají do krmiva nebo vody, aby splnily zejména některé z následujících funkcí: musí mít příznivý vliv na vlastnosti krmiva, na vlastnosti živočišných produktů, uspokojovat nutriční potřeby zvířat, příznivě ovlivňovat důsledky živočišné výroby pro životní prostředí, podporovat užitkovost nebo welfare zvířat, nebo mít kokcidiostatický či histomonostatický účinek.

Na trh nesmí být uvedena žádná doplňková látka, pokud jí nebylo uděleno povolení podle uvedeného nařízení. Obecně nesmí mít nepříznivý účinek na zdraví zvířat, lidské zdraví ani na životní prostředí a nesmí uvádět spotřebitele v omyl, pokud jde o charakteristické vlastnosti produktů živočišného původu.

V EU je přísně zakázáno používat antibiotika a hormonální přípravky (anabolika) jako růstové stimulanty. Tyto látky lze používat výhradně jako veterinární léčiva, a to za přísně regulovaných podmínek. Zákaz používání antibiotik jako růstových stimulantů byl zaveden postupně, kdy některé látky byly zakázány již v 90. letech. Úplný zákaz používání antibiotik jako růstových stimulantů platí od roku 2006. V minulosti totiž přidávání nízkých subterapeutických dávek antibiotik hospodářským zvířatům vedlo k rychlejšímu růstu zvířat, jejich nižší mortalitě a lepší konverzi krmiva. Tyto látky však vyvolávají i selekční tlak na vznik rezistentních kmenů mikroorganismů, které se mohou šířit mezi zvířaty, prostředím i lidmi a představují vysoké riziko pro veřejné zdraví. Proto bylo jejich používání zakázáno Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003, doplněným následnými prováděcími předpisy.

Zákaz používání anabolik a jiných hormonálních přípravků v živočišné výrobě je dokonce ještě starší a vychází ze Směrnice Rady 96/22/ES o zákazu používání některých látek s hormonálním nebo tyreostatickým účinkem a beta-sympatomimetik v chovech zvířat. Tento zákaz se vztahuje jak na používání těchto látek pro růstovou stimulaci, tak i na uvádění masa ošetřených zvířat na trh v EU.

V některých zemích mimo EU však mohou být hormonální přípravky (např. s účinkem estrogenů, androgenů či gestagenů) a také některá antibiotika stále využívány k podpoře růstu zvířat, zvýšení produkce mléka nebo zlepšení konverze krmiva. Zdravotní rizika spojená s těmito látkami jsou nicméně významná. Jedná se například o nežádoucí účinky těchto látek, jako je

zvýšené riziko vzniku nádorových onemocnění, endokrinní poruchy či podpora šíření antibiotické rezistence. Proto je velmi důležité detailně studovat účinky jednotlivých přípravků na lidský organismus a sledovat legislativní rozdíly mezi státy.

Krmná aditiva lze rozdělit do několika kategorií. Technologická aditiva (zahrnují konzervační prostředky, regulátory kyselosti, silážní přípravky aj.), senzorická aditiva (barviva, aroma, ochucovadla aj.), nutriční aditiva (vitaminy, stopové prvky, aminokyseliny, močovina a její deriváty), zootechnická aditiva (stimulátory trávení, stabilizátory střevní mikrobioty, probiotika, enzymy), kokcidiostatika a histomonostatika (preventivně působí proti šíření onemocnění kokcidiózy a histomonózy zejména ve velkochovech drůbeže a zároveň mohou nepřímo zlepšovat užitkovost). Pro použití některých krmných aditiv, zejména kokcidiostatik a histomonostatik, je nutné přísně dodržovat ochranné lhůty před porážkou nebo sběrem živočišných produktů, aby se minimalizovalo riziko výskytu reziduí v mase, mléce či vejcích.

Užitečné odkazy:

- Nařízením Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=celex%3A32003R1831>
- Směrnice Rady 96/22/ES o zákazu používání některých látek s hormonálním nebo tyreostatickým účinkem a beta-sympatomimetik v chovech zvířat: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX%3A31996L0022>

6.2. Veterinární léčiva

Veterinární léčiva jsou v živočišné výrobě nezbytná pro léčbu a prevenci onemocnění hospodářských zvířat. Jejich používání je legislativně regulováno na evropské i národní úrovni, především prostřednictvím Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/6 o veterinárních léčivých přípravcích, které od roku 2022 nahradilo dřívější rámec. V České republice je problematika dále upravena Zákonem č. 166/1999 Sb. o veterinární péči. Používání veterinárních léčiv je povoleno pouze na základě indikace veterinárního lékaře a vždy musí být dodrženy podmínky stanovené příslušnými právními předpisy.

Nejčastěji používaná veterinární léčiva, jejichž rezidua se mohou vyskytovat v potravinách živočišného původu, jsou antibiotika. Jak již bylo zmíněno, jejich podávání jako růstových stimulátorů je v EU přísně zakázáno. Pokud jsou však antibiotika oprávněně používána k léčbě nebo k zaprahování dojnic, je nutné dodržovat tzv. **ochrannou lhůtu**. Ta představuje časový interval mezi posledním podáním přípravku zvířeti a okamžikem, kdy

koncentrace reziduí v potravinách živočišného původu (mléko, maso, vejce) poklesne pod stanovený MRL. Před uplynutím ochranné lhůty nesmí být tyto produkty používány pro lidskou výživu. Délka ochranné lhůty závisí na použitém přípravku a jeho farmakokinetice. Běžně se pohybuje v rozmezí 5–10, ale u některých antibiotik může být i delší. U přípravků používaných k zaprahování dojníc je ochranná lhůta výrazně delší. Pokud je doba stání na sucho kratší než doporučená (obvykle 45–60 dní), mohou se rezidua dostávat do mleziva nebo dokonce i do zralého mléka.

Přítomnost reziduí antibiotik v potravinách živočišného původu je nežádoucí jak z hlediska toxikologického pro zdraví konzumenta, tak i z hlediska technologického. Mezi zdravotní rizika patří alergické reakce, toxicita a zejména podpora vzniku antimikrobiální rezistence. Tato získaná rezistence je velmi riziková, protože bývá kódována na plasmidech nebo transpozonech, což umožňuje její snadné šíření mezi různými druhy bakterií. Riziko jejího vzniku se zvyšuje při opakovaném podávání nízkých dávek antibiotik, při nedodržení délky léčby nebo při jejich nevhodném používání. Příčinou vzniku velkého množství rezistentních kmenů bylo také masové využívaní antibiotik jako krmných aditiv. Samotná antibiotika se pak stávají neúčinná při léčbě infekčních onemocnění zvířat i lidí.

U syrového mléka platí v EU nulová tolerance přítomnosti antibiotik, protože i velmi nízké koncentrace mohou negativně ovlivnit průběh mlékárenských fermentací. Mohou totiž inhibovat činnost startovacích kultur a vést k nezdaru při výrobě kysaných mléčných výrobků či sýrů.

Užitečný odkaz:

➤ *Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/6 o veterinárních léčivých přípravcích:*
<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2019/6/oj?locale=cs>

6.3. Stanovení reziduí antibiotik v živočišných produktech

Pro stanovení reziduí antibiotik v potravinách nebo surovinách živočišného původu bylo vyvinuto mnoho různých analytických metod. Hojně využívané jsou tzv. **rychltesty**, které se sice liší spolehlivostí, ale jejich výhodou je rychlé získání výsledku a relativně nízké náklady na provedení. Rychlotesty lze rozdělit do třech základních skupin, konkrétně na **mikrobiologické inhibiční testy**, založené na inhibici růstu multicitlivých bakteriálních kmenů, **imunochemické testy**, zejména imunochromatografické LFIA metody a **selektivní testy**, konkrétně receptorové

nebo enzymatické testy umožňující cílenou detekci vybraných antibiotických skupin. Pokud jsou výsledky těchto screeningových testů pozitivní, přistupuje se následně k ověření přítomnosti reziduí antibiotik **instrumentálními metodami** (např. HPLC, LC-MS/MS, TLC), které umožňují přesnou identifikaci a kvantifikaci přítomné látky a lze tak přesně určit, zda se dané reziduum vyskytuje v potravíně v nadlimitním množství. Screeningové testy tedy slouží zejména k rychlé detekci přítomnosti antibiotik, zatímco instrumentální metody k jejich potvrzení.

Nejjednodušší formou mikrobiologického inhibičního testu pro stanovení antibiotik je inkubace citlivého organismu přímo ve vzorku (např. mléka). Pokud vzorek antibiotika neobsahuje, dochází k růstu bakterií, produkci kyselin a následnému vysrážení. V opačném případě se mléko nesráží. Další možností je kultivace citlivého organismu na agaru v přítomnosti vyšetřovaného vzorku. Není-li antibiotikum přítomno, bakterie roste, což lze detekovat vizuálně zakalením agaru nebo změnou barvy média v případě použití pH indikátoru. Pokud vzorek antibiotikum obsahuje, růst mikroorganismu je inhibován a vznikají inhibiční zóny nebo nedochází ke změně barvy média. Tyto testy jsou mimořádně citlivé zejména na β -laktamová antibiotika, ale lze je využít také k detekci sulfonamidů a dalších antimikrobiálních látek. Jejich nevýhodou je nutnost několikahodinové inkubace.

Standardním testem pro použití v referenčních laboratořích je agarová disková difuzní metoda s použitím bakterie *Geobacillus stearothermophilus*. Princip spočívá v aplikaci testovaného vzorku na papírový disk, který se umístí na povrch agarového média obsahujícího *G. stearothermophilus*. Pokud vzorek antibiotikum neobsahuje, bakterie roste a médium se zakalí. V opačném případě se kolem disku vytvoří inhibiční zóny.

Velmi jednoduché na provedení jsou také komerčně dostupné mikrobiologické inhibiční rychlotesty (např. Premi®Test (R-Biopharm AG, Německo) a Delvotest® (DSM-Firmenich, Švýcarsko). V mikrozku mávkách je umístěno agarové živné médium obsahující multicitlivý termofilní bakteriální kmen a acidobazický indikátor. Vzorek je aplikován na povrch média a následuje několika hodinová kultivace (obvykle 2–3 hodiny) při teplotě kolem 65 °C. Pokud vzorek neobsahuje antibiotika, bakterie rostou a produkují kyseliny, což způsobí barevnou změnu indikátoru. V případě přítomnosti antibiotika růst bakterií nenastává a barva indikátoru se nemění.

Další možností, jak efektivně a velmi rychle stanovit rezidua antibiotik v potravinách živočišného původu je použití LFIA testů, jejichž princip je podrobně vysvětlen v kapitole 4.4.3.3.2.

6.3.1. Metodika stanovení reziduí antibiotik ve vzorcích kuřecího masa

V rámci cvičení budou testovány vzorky kuřecího masa na přítomnost blíže nespecifikovaných antibiotik. Níže popsáný metodický postup není standardizovanou metodu používanou v akreditovaných laboratořích. Postup byl upraven a zjednodušen pro demonstrativní účely výuky. Cílem je tedy provedení mikrobiologického inhibičního testu a zhodnocení, zda neznámé vzorky kuřecích prsou vykazují či nevykazují známky přítomnosti inhibičních látek (reziduí antibiotik).

Pro stanovení bude použita agarová disková difúzní metoda s využitím bakteriálního sbírkového kmene *Micrococcus luteus* kultivovaného na MPA. Při testování je nezbytné dodržovat principy aseptické práce. Do sterilní velké Petriho misky přeneste 1 mL 0,9% roztoku NaCl. Poté pomocí sterilní mikrobiologické kličky odeberte část biomasy čerstvě narostlého sbírkového kmene *M. luteus* a důkladně ho rozmíchejte ve fyziologickém roztoku. Připravenou suspenzi přelijte MPA, obsah důkladně promíchejte a nechte agar ztuhnout. Po utužení poté na povrch agaru pinzetou aplikujte kousky vzorků kuřecího masa A–D, jejichž pozice si předtím popisovačem označte ze spodu misky. Vzorky masa nastříhejte nebo naporcujte skalpelem. Takto připravené misky kultivujte při 37 °C po dobu 24 hodin.

Po kultivaci vyhodnoťte, zda ve vzorcích byly přítomny inhibiční látky. Pokud kolem vzorku masa vznikla inhibiční zóna (zóna bez růstu *M. luteus*), test indikuje přítomnost reziduí antibiotik či jiných inhibičních látek. Pokud bakteriální kmen narostl i v těsné blízkosti testovaného vzorku, lze usuzovat, že vzorek rezidua antibiotik neobsahuje.

Úkol: Proved'te difúzní test s referenčním kmenem *Micrococcus luteus* pro prokázání či neprokázání přítomnosti antibiotik ve vzorcích masa z kuřecích prsou. Zaznamenejte velikost inhibičních zón a data uveďte do Tabulky 25. Na základě získaných výsledků zhodnoťte, zda, a konkrétně ve kterých vzorcích, byla přítomnost antibiotik prokázána.

Tabulka 25: Vyhodnocení přítomnosti antibiotik ve vzorcích masa z kuřecích prsou

Vzorek kuřecího masa	A	B	C	D
Velikost inhibiční zóny (mm)				
Průkaz přítomnosti ATB (+/-)				

7. Dusitany a dusičnany

Cílem této kapitoly je seznámit studenty s problematikou dusičnanů a dusitanů v potravinách a jejich významem z hlediska zdraví spotřebitele. Kapitola vysvětluje jejich toxicitu, legislativní limity a principy stanovení. Praktická část je zaměřena na laboratorní stanovení obsahu dusičnanů a dusitanů v zelenině, a s tím souvisejícím výpočtem množství zeleniny, které by muselo být studentem zkonzumováno, aby odpovídalo přijetí ADI, a interpretaci výsledků ve vztahu k platné legislativě.

Dusitany a dusičnany se mohou v potravinách vyskytovat jako přirozené složky metabolismu rostlin, jako rezidua či kontaminanty, ale také jako záměrně přidávaná aditiva (konzervanty, stabilizátory apod.).

Do potravin rostlinného původu se dostávají zejména z půdy, a to ve zvýšené míře při použití dusíkatých hnojiv. Výskyt dusičnanů v rostlinách je zcela přirozený. Jsou totiž nejběžnější formou dusíku, kterou rostliny přijímají, a po redukci zabudovávají dusík do aminokyselin a bílkovin. V půdě vznikají dusičnany činností nitrifikačních bakterií oxidací amoniaku a dusitanů.

Obsah dusičnanů v rostlinách je velmi variabilní a závisí na druhu, způsobu pěstování, hnojení i světelných podmínkách. Nejvyšší obsah dusičnanů (> 1000 mg/kg) mívají listové saláty, špenát, ředkve či celer. Středně vysoký obsah bývá v košťálové zelenině (zelí, kapusta, květák, brokolice) nebo v kořenové zelenině (mrkev, petržel). Nízký obsah (< 250 mg/kg) se obvykle nachází v cibuli, rajčatech, okurkách nebo hrachu. Z ovoce mají schopnost akumulovat dusičnany např. jahody, meloun či banány. Obsah dusičnanů lze částečně snížit blanšírováním, vařením nebo fermentací.

Významným zdrojem dusičnanů pro člověka je i pitná voda, která může být kontaminována vyplavováním hnojiv z půdy. V ČR i EU jsou proto stanoveny maximální limity dusičnanů (50 mg/L) a dusitanů (0,50 mg/L) v pitné vodě podle Směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/2184 o jakosti vody určené k lidské spotřebě.

V potravinách živočišného původu se dusičnany a dusitany přirozeně prakticky nevyskytují. Výjimkou jsou masné výrobky, konzervy, rybí výrobky a některé sýry, do kterých se přidávají jako aditiva s cílem prodloužení trvanlivosti a ovlivnění sensorických vlastností. Nejčastěji jsou to dusitan sodný (E250), dusitan draselný (E249), dusičnan sodný (E251) a dusičnan draselný (E252). Vzhledem k tomu, že toxicita dusitanů je vyšší, vhodnější formou do potravin je přidavek dusičnanů, které jsou přímo v potravině mikrobiální redukcí v přiměřeném množství přeměněny na dusitany, čímž je zajištěn technologický účinek.

V redukčním prostředí se z dusitanů uvolňuje oxid dusnatý (NO), který reaguje s myoglobinem masa za vzniku červeného nitrosomyoglobinu, čímž je stabilizována charakteristická růžovo-červená barva masných výrobků. Dusitany mají dále také antimikrobiální účinek, zejména proti *Clostridium botulinum*, a proto hrají důležitou roli v prevenci vzniku botulismu. Naopak nejsou účinné proti bakteriím čeledi *Enterobacteriaceae* (včetně salmonel) ani proti bakteriím mléčného kvašení.

Užitečný odkaz:

- *Směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/2184 o jakosti vody určené k lidské spotřebě:*
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32020L2184>

7.1. Toxicita dusičnanů a dusitanů

Dusičnany samy o sobě nejsou v běžných koncentracích pro dospělého člověka považovány za akutně toxické. Většina přijatého množství je relativně rychle vylučována močí, i když s přibývajícím věkem se tato schopnost může mírně snižovat. Rizikem je však jejich poměrně snadná redukce na dusitany, k níž může docházet v trávicím traktu vlivem střevní mikrobioty nebo chemických procesů. Pokud se dusitany vstřebají do krve, mohou oxidovat železo v hemové skupině hemoglobinu z dvojmocné formy Fe^{2+} , která váže kyslík, na trojmocnou formu Fe^{3+} . Vzniká tak methemoglobin, který ztrácí schopnost přenášet kyslík. Tento stav se nazývá **methemoglobinemie** a může vést k tkáňové hypoxii až udušení. U dospělých je poté methemoglobin za normálních okolností redukován zpět na hemoglobin díky enzymatickému systému NADH-dependentní methemoglobinreduktázy. U kojenců však tento enzymový systém není plně vyvinut, a proto jsou mnohem citlivější k rozvoji methemoglobinemie (tzv. „blue baby syndrome“) a v extrémním případě vést až k tkáňovému udušení.

Dalším závažným zdravotním rizikem vysokého příjmu dusitanů, resp. dusičnanů, které se v těle na dusitany redukuje, je tvorba **nitrosaminů**. Jsou to látky s prokázaným karcinogenním a teratogenním účinkem. Dusitany mohou v kyselém prostředí žaludku reagovat se sekundárními aminy pocházejícími z potravy (například dimethylamin z ryb a mořských plodů, diethylamin z čaje, kávy a fermentovaných potravin aj.), léčiv nebo tabákového kouře. Nitrosaminy jsou spojovány se zvýšeným rizikem vzniku nádorů žaludku, jater, tlustého střeva a močového měchýře. Tvorbu nitrosaminů lze významně omezit dostatečným příjmem antioxidantů (např. vitamin C, vitamin E, polyfenoly), které zabraňují oxidaci dusičnanů na dusitany, a také konzumací vlákniny, jež urychluje průchod tráveniny trávicím traktem a snižuje tak dobu, po kterou mohou probíhat nitrosační reakce.

7.2. Legislativní limity

Obsah dusičnanů a dusitanů jako kontaminantů v potravinách je regulován Nařízením Komise (EU) č. 2023/915 o maximálních limitech některých kontaminujících látek v potravinách. V Příloze 1 a kapitole 6.1 jsou uvedeny **maximální limity dusičnanů** pro konkrétní druhy potravin. Jedná se o čerstvý špenát (*Spinacia oleracea*) – maximální limit 3 500 mg NO₃/kg, konzervovaný nebo zmrazený špenát – 2 000 mg NO₃/kg, hlávkový salát – 2 000–5 000 mg NO₃/kg (podle způsobu pěstování a období sklizně), rukolu – 6 000–7 000 mg NO₃/kg, obilné a ostatní příkrmy pro kojenče a malé děti – 200 mg NO₃/kg. Pro další druhy zeleniny, které nejsou explicitně uvedeny v nařízení, platí obecný princip evropské legislativy. Potravina nesmí být škodlivá pro zdraví nebo nevhodná pro lidskou spotřebu dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002. Riziko lze tedy hodnotit podle vědeckých doporučení (např. EFSA, WHO) a s ohledem na **přípustnou denní dávku (ADI; *Acceptable Daily Intake*)**, **tolerovatelný denní příjem (TDI; *Tolerable Daily Intake*)** nebo jiné referenční hodnoty stanovené pro konkrétní látku. V praxi je nutné posuzovat riziko ve vztahu k průměrné spotřebě konkrétní potraviny a zdravotnímu stavu spotřebitele.

Pro dusičnany je ADI 3,7 mg/kg tělesné hmotnosti, což odpovídá přibližně 260 mg dusičnanů denně u dospělého člověka o hmotnosti 70 kg. **Pro dusitany je ADI stanovena na 0,07 mg/kg tělesné hmotnosti**, což odpovídá cca 5 mg dusitanů denně pro dospělého člověka s tělesnou hmotností 70 kg. Tyto hodnoty byly stanoveny odbornými orgány WHO a byly uznány i v rámci hodnocení EFSA.

Konzervanty v potravinách jsou poté definovány v Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách a konkrétně v Nařízení Komise

(EU) č. 1129/2011 je uveden unijní seznam povolených potravinářských přídatných látek. V Příloze II Části B v Kapitole 3. Potravinářské přídatné látky jiné než barviva a náhradní sladidla jsou konkretizovány dusitan draselný (E249), dusitan sodný (E250), dusičnan sodný (E251) a dusičnan draselný (E252). Pokud jsou dusitany označeny „pro použití v potravinách“, mohou být prodávány pouze ve směsi se solí nebo s náhradou soli.

Potraviny živočišného původu přirozeně nepředstavují významný zdroj dusičnanů ani dusitanů. Výjimkou jsou ale výrobky živočišného původu, do kterých byly tyto látky záměrně přidány jako aditiva, zejména masné výrobky, sýry a některé rybí výrobky. V těchto potravinách se běžně detekované koncentrace pohybují v rozmezí 50–250 mg/kg pro dusičnany a 50–150 mg/kg dusitany. Všechny tyto výrobky samozřejmě ale musí splňovat legislativně stanovené limity. Limity těchto aditiv pro konkrétní kategorie potravin lze dohledat v Nařízení Komise (EU) č. 1129/2011 v části E – Povolené potravinářské přídatné látky a podmínky jejich použití v kategoriích potravin. Limit například pro kategorii tepelně opracované maso je 150 mg/kg dusičnanů a 100 mg/kg dusitanů. Je nicméně důležité zohlednit, že dusičnany mohou být obsaženy v některých tepelně opracovaných masných výrobcích v důsledku přirozené přeměny dusitanů na dusičnany v slabě kyselém prostředí.

Limity pro pitnou vodu jsou uvedeny ve Vyhlášce č. 83/2014 Sb., kterou jsou stanoveny hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody a limity pro balenou vodu jsou uvedeny ve Vyhlášce č. 13/2024 Sb. o požadavcích na jakost balených vod a o způsobu jejich úpravy. V pitné vodě je povolen obsah maximálně 50 mg/L, v balené vodě 25 mg/L a v balené kojenecké 10 mg/L dusičnanů. Limity pro obsah dusitanů jsou mnohem přísnější, a to konkrétně 0,5 mg/L v pitné vodě a 0,02 mg/L v balené kojenecké vodě.

Užitečné odkazy:

- Nařízením Komise (EU) č. 2023/915 o maximálních limitech některých kontaminujících látek v potravinách: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/cs/ALL/?uri=CELEX:32023R0915>
- Nařízení (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32008R1333>
- Nařízení Komise (EU) č. 1129/2011 s unijním seznamem povolených potravinářských přídatných látek: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=celex:32011R1129>
- Vyhláška č. 83/2014 Sb. o hygienických požadavcích na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2014-83>
- Vyhláška č. 13/2024 Sb. o požadavcích na jakost balených vod a o způsobu jejich úpravy: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2024-13/zneni-20240221#f7853781>
- Re-evaluation of sodium nitrate (E 251) and potassium nitrate (E 252) as food additives (EFSA, 2017): <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2017.4787>

7.3. Metodika stanovení dusičnanů a dusitanů v zelenině

Pro stanovení dusičnanů a dusitanů v potravinách existuje široká škála analytických metod. Využívají se například přímá potenciometrie s použitím dusičnanově selektivní iontové elektrody, spektrofotometrické stanovení nebo separační metody, jako je izotachoforéza, kapilární elektroforéza či HPLC. Klasickým, dnes méně používaným postupem, je také gravimetrické stanovení dle Busche, při kterém dusičnany za kyselých podmínek reagují s organickým činidlem nitronem za vzniku nerozpustné sloučeniny. Tento precipitát se po vysrážení oddělí filtrací, promyje, vysuší a zváží. Z této hmotnosti lze následně vypočítat koncentraci dusičnanů ve vzorku. Tato metoda je relativně jednoduchá na provedení a nevyžaduje složité přístrojové vybavení, nicméně její nevýhodou je nižší citlivost a časová náročnost. Proto je dnes v rutinní praxi nahrazena modernějšími instrumentálními metodami, zejména iontově-výměnnou HPLC.

V rámci praktického cvičení budou stanoveny koncentrace dusičnanů a dusitanů ve vzorcích různých druhů zeleniny. Níže uvedený metodický postup není standardizovanou metodou používanou v akreditovaných laboratořích a slouží pouze k demonstrativnímu a orientačnímu stanovení koncentrací pro výukové účely. Hodnoty dusičnanů v zelenině se výrazně liší podle druhu, odrůdy, podmínek pěstování a ročního období, takže výsledek tohoto experimentu má pouze ilustrativní charakter. Cílem je tedy pomocí indikátorových papírků provést **kolorimetrické stanovení dusičnanů** ve vzorku zeleniny a následně vypočítat, kolik zeleniny by musel konzument zkonzumovat, aby překročil svoji individuální ADI dusičnanů, tedy 3,7 mg/kg tělesné hmotnosti.

Pro analýzu si vyberte jeden druh zeleniny. Vzorek očistěte do podoby, v jaké se běžně konzumuje (odstraňte kořeny, slupku, listy a nečistoty). Zvažte vzorek a zaznamenejte jeho hmotnost. Poté pomocí odšťavňovače získejte šťávu. Pomocí odměrného válce změřte objem získané šťávy. Indikátorový proužek ponořte do šťávy na 1 s. Po 1 minutě odečtěte koncentraci dusičnanů a dusitanů na barevné stupnici.

Úkol: Stanovte kolorimetricky koncentraci dusičnanů v poskytnutém vzorku zeleniny a vypočítejte, kolik zeleniny by konzument o své tělesné hmotnosti musel zkonzumovat, aby překročil svou přijatelnou denní dávku dusičnanů. Všechna získaná data, včetně výsledků výpočtů, uveďte do Tabulky 26. Na základě výsledků posuďte zdravotní riziko konzumace daného produktu.

Tabulka 26: Dílčí hodnoty pro stanovení koncentrace dusičnanů a dusitanů ve vzorku zeleniny

DRUH ZELENINY		Hmotnost člověka	
Hmotnost vzorku		ADI dusičnanů	
Objem šťávy		Množství zeleniny pro překročení ADI	
Koncentrace dusičnanů			
Koncentrace dusitanů			

V následujícím textu je uveden ukázkový postup výpočtu. ADI dusičnanů je 3,7 mg dusičnanů na 1 kg tělesné hmotnosti. Při hmotnosti 60 kg odpovídá tato dávka 222 mg dusičnanů/den. Z 50 g vzorku okurky bylo získáno 40 mL šťávy, tedy 1 kg okurky obsahuje 800 mL šťávy. Naměřená hodnota dusičnanů byla 50 mg/L, což odpovídá 40 mg/800 mL šťávy = 40 mg dusičnanů v 1 kg vzorku (1 kg okurky obsahuje 800 mL šťávy). Pokud je ADI dusičnanů pro člověka o hmotnosti 60 kg 222 mg na den a 1 kg okurky obsahuje 40 mg dusičnanů, musel by člověk za den zkonzumovat 5,55 kg této okurky, aby došlo k překročení ADI. Ke stejnému výsledku lze dospět i alternativními výpočty s jinými úvahami.

8. Falšování potravin

Cílem této kapitoly je seznámit studenty s problematikou falšování potravin, nejčastějšími formami a metodami detekce. Důraz je kladen na laboratorní metody prokázání přítomnosti nebo nepřítomnosti nedeklarovaných složek, zejména škrobu ve vzorcích mletého pepře a zakysané smetany, a na schopnost správně vyhodnotit a interpretovat získané výsledky.

Falšování potravin lze podle SZPI považovat zejména za záměnu dražší složky potravin za levnější, uvedení výrobku s nepravdivým nebo klamavým složením, nesprávné označení, nebo tzv. nastavování výrobků například vodou, škrobem či jinými látkami. Ve většině případů sice falšování neznamená bezprostřední porušení zdravotní nezávadnosti nebo hygieny potravin, ale spotřebitelé jsou poškozováni z hlediska kvality a ceny. Existují však i případy,

kdy falšování vedlo k ohrožení zdraví a života konzumentů napříč světem. Jako příklad lze uvést přídavek melaninu do kojeneckých mléčných náhrad, použití metanolu v lihovinách, adulterace olivového oleje, přídavek etylenglykolu do vína, použití průmyslových barviv v jedlích olejích a koření, nebo záměna ořechů za arašídů.

Nejčastěji se lze však setkat s falšováním, které přímo neohrožuje zdraví, ale snižuje kvalitu potravin. Typicky se falšují luxusní potraviny (lihoviny, víno, koření) nebo potraviny vyráběné a prodávané ve velkém množství (masné a mléčné výrobky, tuky a oleje, káva a kakao, ovocné šťávy, zmrzliny, vaječné těstoviny).

Mezi hlavní způsoby falšování patří náhrada drahé suroviny za levnější (např. záměna ovocné složky, záměna tuků a olejů, přídavek kávoviny do instantní kávy, snížení podílu masa v masných výrobcích či vajec v těstovinách, přídavek škrobu a jiných látek ke zvýšení objemu). Dalšími způsoby falšování jsou přítomnost nedeklarovaných složek (např. použití strojně odděleného masa bez uvedení), použití jiné než deklarované technologie (záměna obyčejného oleje za panenský, vydávání ryb produkovaných na farmách za divoké), klamavé označení původu (zejména u vín) a zneužití značky nebo manipulace s datem použitelnosti. Za falšování se poté nepovažuje nedodržení deklarované hmotnosti nebo objemu balení, což je posuzováno samostatně a kontrolu provádí Česká obchodní inspekce (ČOI).

Mezi nejčastěji falšované komodity lze zařadit víno, které je ředěno vodou, docukřováno nebo obohaceno o syntetický glycerol nebo barviva. Dále lihoviny, které obsahují etanol jiného než deklarovaného botanického původu, syntetického či technického lihu. Také med, do kterého je přidáván cukr nebo sirup, karamel pro zlepšení barvy a rostlinné enzymy. Džemy často neobsahují deklarovaný obsah ovocné složky. Hmotnost ryb je uměle navyšována nedeklarovaným obsahem vody. Dále byly u ryb zaznamenány i přídavky polyfosfátů a kyseliny citronové.

8.1. Metody kontroly pravosti (autenticity) potravin

Spolehlivé odhalení falšování potravin spotřebitelem je prakticky nemožné, i když v některých případech lze neautenticitu odhadnout na základě senzorických vlastností (chuť, barva, vůně, konzistence). Kontrola pravosti potravin musí být prováděna pomocí laboratorních analytických postupů, které v ČR provádí zejména SZPI a SVS, případně i specializované referenční laboratoře. Mezi nejjednodušší metody patří metody mikroskopické. Mikroskopicky lze hodnotit například druh a původ medu podle pylových zrn, odhalit příměsi cizích látek v koření nebo posoudit kvalitu masných výrobků. Mikroskopicky lze také zjistit náhradu masa

méněcennými složkami jatečných zvířat či rostlinnými příměsemi a podle přítomnosti úlomků kostí lze usuzovat na použití strojně separovaného masa.

K odhalování falšování potravin se dále používají pokročilé chemické, imunochemické a molekulárně-biologické metody. Chromatografické metody (např. HPLC, GC, TLC) pro odhalení nepovolených přísad (např. syntetických barviv, sladidel, aditiv, melaminu, etylenglykolu), k analýze medu, vína či ovocných šťáv, hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS, GC-MS, MALDI-TOF MS) umožňující identifikaci složek, stopových kontaminantů či markerů původu, spektroskopické metody (NMR, FTIR, izotopové metody) pro určení geografického původu, zjištění přísad vody v mléce nebo víně, či k posouzení složení tuků a olejů, imunochemické metody (např. ELISA, LFIA) pro detekci nedeklarovaných příměsí (např. přítomnost arašídů nebo sóji ve výrobcích), pro kontrolu původu masa či mléčných výrobků a molekulárně-biologické metody (PCR, qPCR, sekvenace) pro určení druhu a původu surovin (např. detekce koňského masa v hovězích výrobcích, odhalení záměny ryb, deklarace GMO složek).

Kombinace více metod často umožňuje tzv. polyfázický přístup, který zvyšuje spolehlivost odhalování falšování potravin. Vývoj metod v posledních letech směřuje k rychlým screeningovým testům a miniaturizovaným technologiím (biosenzory, čipy, spektroskopie v blízké infračervené oblasti), které umožňují rychlou a levnou kontrolu přímo v terénu nebo na výrobní lince.

8.2. Metodika průkazu přísady škrobu v pepři

Pepř patří mezi nejznámější a nejpoužívanější koření. Koření je jakákoliv část rostlin (kořeny, oddenky, kůra, listy, nať, květy, plody, semena aj.), která je přidávána do potravin a pokrmů za účelem ovlivnění chuti, vůně a vzhledu. Koření ovšem neovlivňuje pouze sensorické vlastnosti. Řada druhů má také antioxidační a antimikrobiální účinky, čímž přispívá k prodloužení trvanlivosti potravin. Některé z nich navíc podporují trávení a mohou mít i zdravotní benefity.

Vzhledem k relativně vysoké ceně koření je tato komodita poměrně často falšována. Nejčastějšími způsoby falšování je přidávek levných inertních látek (škrub, mouka, křída, prášková celulóza), které zvyšují hmotnost výrobku, dále záměna dražšího koření levnějším (např. šafrán falšovaný kurkumou) a nedeklarovaná příměs jiných botanických druhů. Konkrétně pepř je v české kuchyni využíván velmi často a jeho spotřeba je relativně vysoká. Typickou štiplavou chuť mu dodává alkaloid piperin, jehož obsah v černém pepři, což jsou sušená zralá

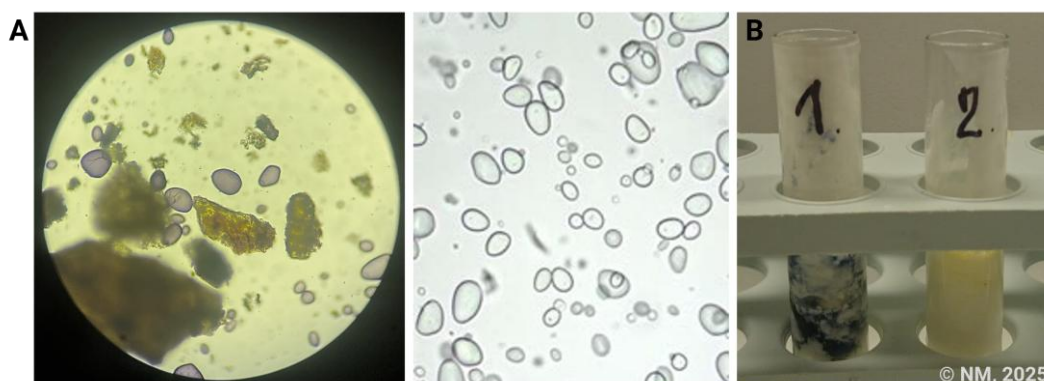
semena *Piper nigrum*, se pohybuje mezi 3–8 %. Piperin v nízkých dávkách působí stimulačně na centrální nervovou soustavu, vykazuje i mírný antipyretický účinek. Ve vysokých dávkách nicméně může mít negativní účinky, kdy působí slabě mutagenně, snižuje krevní tlak a zpomaluje dýchání.

Prokazování falšování pepře škrobem lze provést pomocí mikroskopického a chemického testu s roztokem jodu. Tento test je jednoduchý, rychlý a levný, ale slouží pouze k demonstrativním a orientačním účelům. Ve státní kontrole a akreditovaných laboratořích se k prokazování falšování pepře používají sofistikovanější metody, např. mikroskopická analýza v kombinaci s HPLC, FTIR spektroskopií nebo DNA analýzou k potvrzení botanického původu.

Prokazování falšování pepře škrobem lze provést pomocí mikroskopického a chemického testu s roztokem jodu. Tento test je jednoduchý, rychlý a levný, ale slouží pouze k demonstrativním a orientačním účelům. Ve státní kontrole a akreditovaných laboratořích se k prokazování falšování pepře používá například mikroskopická analýza v kombinaci s HPLC, FTIR spektroskopií nebo DNA analýzou k potvrzení botanického původu.

V rámci praktického cvičení budou testovány vzorky pepře na přítomnost příměsí škrobu. Na podložní sklíčko nakapejte kapku Lugolova roztoku, pomocí skalpelu přidejte malé množství vzorku mletého pepře, překryjte krycím sklíčkem a pozorujte pod světelným mikroskopem suchým objektivem. Následně určete, zda vzorek obsahuje příměs škrobu. Fragmenty pepře mají v mikroskopu ostré hrany a nepravidelný tvar, zatímco škrobová zrna jsou oválná až kulovitá, s typicky hladkými okraji. Po přidání Lugolova roztoku se navíc škrobová zrna barví modrofialově až černě v důsledku tvorby škrob–jodového komplexu (reakce jodu s amylopektinem a amylozou), což umožňuje jejich jednoznačnou identifikaci (Obrázek 19A).

Obrázek 19: Průkaz přítomnosti škrobu v pepři a zakysané smetaně



Pozn.: A – V mikroskopickém preparátu se zvětšením 400krát jsou patrné modrofialově zbarvené oválné částice škrobu indikující falšování mletého pepře (částice pepře jsou hnědé

nepravidelné fragmenty s ostrými hranami); B – ve zkumavce 1 je patrná pozitivní reakce přidaného škrobu s Lugolovým roztokem (modrá barva) indikující falšování zakysané smetany, zatímco zkumavka 2 představuje negativní nález (žlutá barva).

Úkol: Mikroskopicky ověřte, zda byly vzorky mletého pepře nastavovány škrobem. Výsledky pozorování zaznamenejte do Tabulky 27. Zhodnoťte, které vzorky lze považovat za falšované.

Tabulka 27: Vyhodnocení průkazu přítomnosti škrobu ve vzorcích mletého pepře

Vzorek mletého pepře	A	B	C	D	E	F
Průkaz přítomnosti škrobu (+/-)						

8.3. Metodika průkazu přídavku škrobu v zakysané smetaně

Přítomnost škrobu v zakysané smetaně není zakázána žádným českým ani unijním předpisem a současně není stanoveno maximální množství, které smí být do tohoto výrobku přidáno. Výrobci obvykle uvádějí, že přidaný škrob je chuťově neutrální a byl přidán do výrobku za účelem zlepšení konzistence. Při senzorickém hodnocení se však ukázalo, že přítomnost škrobu mění chuť zakysané smetany, a to nikoli vždy pozitivně. V některých testovaných výrobcích navíc škrob nezabránil uvolňování tekutiny a výrobky měly řidkou až vodnatou konzistenci.

V rámci praktického cvičení budou vzorky zakysané smetany testovány na přítomnost škrobu. Do zkumavky odeberte 2 mL vzorku smetany pomocí injekční stříkačky a přidejte 2 mL destilované vody. Směs promíchejte a zahřívejte ve vodní lázni po dobu 5 minut. Po ochlazení na pokojovou teplotu přidejte několik kapek Lugolova roztoku a sledujte vzniklé zbarvení. Přítomnost škrobu se projeví modrofialovým až modročerným zbarvením, zatímco vzorek bez škrobu zůstane bílý nebo mírně nažloutlý vlivem Lugolova roztoku (Obrázek 19B).

Úkol: Ověřte, zda byly vzorky zakysané smetany nastavovány škrobem. Výsledky šetření zaznamenejte do Tabulky 28. Zhodnoťte, které vzorky lze považovat za falšované.

Tabulka 28: Vyhodnocení průkazu přítomnosti škrobu ve vzorcích zakysané smetany

Vzorek mletého pepře	A	B
Průkaz přítomnosti škrobu (+/-)		

9. Použité zdroje

- Andryukov, B. G. (2020). Six decades of lateral flow immunoassay: from determining metabolic markers to diagnosing COVID-19. *AIMS Microbiol.*, 6(3), 280.
- Bell, R. L., Jarvis, K. G., Ottesen, A. R., McFarland, M. A., & Brown, E. W. (2016). Recent and emerging innovations in *Salmonella* detection: a food and environmental perspective. *Microb. Biotechnol.*, 9(3), 279-292.
- Biorender online software. *Created with BioRender.com*. Software byl použit pro tvorbu obrázků, které vytvořila autorka skript (Nikol Modráčková). Součástí skript jsou také fotografie pořízené autorkou (NM). Všechny tyto obrázky jsou označeny © NM, 2025.
- Bunešová, V. Cvičení z Hygieny a zdravotní nezávadnosti potravin. 2016. Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN 978-80-213-2632-3.
- Croxatto, A., Prod'hom, G., & Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.*, 36(2), 380-407.
- ČSN 56 9609. Pravidla správné hygienické a výrobní praxe – Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace.
- European Commission. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Dostupné online: https://food.ec.europa.eu/safety/rasff_en.
- European Commision. Good Laboratory Practice Dostupné online: https://single-market-economy.ec.europa.eu/sectors/chemicals/good-laboratory-practice_en.
- European Food Safety Authority (EFSA). Re-evaluation of sodium nitrate (E 251) and potassium nitrate (E 252) as food additives. *EFSA Journal*, 2017;15(6):4787.
- Informační centrum bezpečnosti potravin. Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF). Dostupné online: <https://bezpecnostpotravin.cz/system-rychleho-varovani-pro-potraviny-a-krmiva-rasff/>.
- ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*. Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
- Khan, A., Ahmad, M., Sultan, A., Khan, R., Raza, J., Ul Abidin, S. Z., Khan, S., Zafar, M., Uddin, M. N. & Kazi, M. (2024). Herbal spices as food and medicine: Microscopic authentication of commercial herbal spices. *Plants*, 13(8), 1067.
- Killer, J. Potravinářská mikrobiologie, pro posluchače FAPPZ (3. přepracované vydání). 2019. Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN 978-80-213-2945-4.
- Killer, J. Hygiena a zdravotní nezávadnost potravin, pro posluchače FAPPZ. 2019. Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN 978-80-213-2941-6.

- Kozel, T. R., & Burnham-Marusich, A. R. (2017). Point-of-care testing for infectious diseases: past, present, and future. J. Clin. Microbiol., 55(8), 2313-2320.
- MILCOM. Mikrobitesty. Dostupné online: <https://www.milcom-as.cz/co-nabizime/mikrobitesty>.
- Ministerstvo zemědělství. Potraviny – Hygiena potravin. Dostupné online: <https://mze.gov.cz/public/portal/mze/potraviny/hygiena-potravin>.
- Modrackova, N., Stovicek, A., Burtscher, J., Bolechova, P., Killer, J., Domig, K. J., Neuzil Bunesova, V. (2021). The bifidobacterial distribution in the microbiome of captive primates reflects parvorder and feed specialization of the host. Sci. Rep., 11, 15273.
- Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C.: Manual of clinical microbiology. ASM Press, Washington, 1995.
- Nariadení Komise (ES) č. 1441/2007 ze dne 5. prosince 2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny.
- Nariadení Komise (EU) č. 1129/2011 ze dne 11. listopadu 2011, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinářských přídavných látek Unie.
- Nariadení Komise (EU) č. 2023/915 ze dne 25. dubna 2023 o maximálních limitech některých kontaminujících látek v potravinách a o zrušení nařízení (ES) č. 1881/2006.
- Nariadení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 ze dne 28. ledna 2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin.
- Nariadení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009 ze dne 6. května 2009, kterým se stanoví postupy Společenství pro stanovení limitů reziduů farmakologicky účinných látek v potravinách živočišného původu, kterým se zrušuje nařízení Rady (EHS) č. 2377/90 a kterým se mění směrnice Evropského parlamentu a Rady 2001/82/ES a nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 726/2004.
- Nariadení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004 ze dne 29. dubna 2004 o hygieně potravin.
- Nariadení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu.
- Nariadení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídavných látkách.
- Nariadení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 ze dne 22. září 2003 o doplňkových látkách pro používaných ve výživě zvířat.

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 2017/625 ze dne 15. března 2017 o úředních kontrolách a jiných úředních činnostech prováděných s cílem zajistit uplatňování potravinového a krmivového práva a pravidel týkajících se zdraví zvířat a dobrých životních podmínek zvířat, zdraví rostlin a přípravků na ochranu rostlin, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 999/2001, (ES) č. 396/2005, (ES) č. 1069/2009, (ES) č. 1107/2009, (EU) č. 1151/2012, (EU) č. 652/2014, (EU) 2016/429 a (EU) 2016/2031, nařízení Rady (ES) č. 1/2005 a (ES) č. 1099/2009 a směrnic Rady 98/58/ES, 1999/74/ES, 2007/43/ES, 2008/119/ES a 2008/120/ES a o zrušení nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 854/2004 a (ES) č. 882/2004, směrnic Rady 89/608/EHS, 89/662/EHS, 90/425/EHS, 91/496/EHS, 96/23/ES, 96/93/ES a 97/78/ES a rozhodnutí Rady 92/438/EHS (nařízení o úředních kontrolách).

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 2019/6 ze dne 11. prosince 2018 o veterinárních léčivých přípravcích a o zrušení směrnice 2001/82/ES.

Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny.

Nařízení Komise (EU) č. 37/2010 ze dne 22. prosince 2009 o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu.

Nařízení vlády č. 98/2005 Sb. ze dne 9. února 2005 o stanovení systému rychlého varování o vzniku rizika ohrožení lidí z potravin a krmiv.

Neogen. Petrifilmy pro kultivaci mikroorganismů. Dostupné online: <https://www.neogen.com/en/categories/microbiology/petrifilm-e-coli-coliform-count-plates/?min=700002271>.

Nujić, M., & Habuda-Stanić, M. (2017). Nitrates and nitrites, metabolism and toxicity (2017). Food in Health and Disease, 6(2) 63-72.

Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) (2022). Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance Monitoring. Paris: OECD. Dostupné online: https://single-market-economy.ec.europa.eu/sectors/chemicals/good-laboratory-practice_en.

Prescott H.: Laboratory exercises in microbiology, The McGraw–Hill, 5th Edition, 449, 2002.

Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. Br. J. Hosp. Med., 77(7), C98-C101.

Siegrist, J. AnalytiX Issue 3. Přehled chromogenních médií (Merck). Dostupné online: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/cs/technical-documents/technical-article/clinical-testing-and-diagnostics-manufacturing/bacteriology/overview-chromogenic-media>.

- Směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/2184 ze dne 16. prosince 2020 o jakosti vody určené k lidské spotřebě (přepřelované znění).
- Směrnice Rady 96/22/ES ze dne 29. dubna 1996 o zákazu používání některých látek s hormonálním nebo tyreostatickým účinkem a beta-sympatomimetik v chovech zvířat a o zrušení směrnic 81/602/EHS, 88/146/EHS a 88/299/EHS.
- Thermo Fisher Scientific, Oxoid Quality Assurance Product Specification. Informace k prezentovaným kultivačním médiím vycházejí z produktových specifikací uvedených výrobcem volně dostupných online.
- Usnesení vlády České republiky ze dne 29. března 2021 č. č. 323 o Strategii bezpečnosti potravin a výživy 2030.
- Vyhláška č. 13/2024 Sb. ze dne 17. ledna 2024 o požadavcích na jakost balených vod a o způsobu jejich úpravy.
- Vyhláška č. 83/2014 Sb. ze dne 30. dubna 2014, kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody.
- Vyhláška č. 289/2007 Sb. ze dne 14. listopadu 2007 o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství.
- Vyhláška č. 397/2016 Sb. ze dne 2. prosince 2016 o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje.
- Vlková, E., Rada, V. Cvičení v potravinářské mikrobiologii. 2013. Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN 978-80-213-2402-2.
- World Health Organization (2020). Laboratory Biosafety Manual, fourth edition, Geneva. Dostupné online: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/337956/9789240011311-eng.pdf?sequence=1>.
- Zákon č. 91/1996 Sb. ze dne 15. března 1996 o krmivech.
- Zákon č. 110/1997 Sb. ze dne 24. dubna 1997 o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů.
- Zákon č. 166/1999 Sb. ze dne 13. července 1999 o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon).

10. Seznam obrázků a tabulek

Obrázky:

Obrázek 1: Šablona zkušebního protokolu	26
Obrázek 2: Plán experimentu stanovení kritérií sledovaných u mletého vepřového masa	27
Obrázek 3: Schéma kultivačního stanovení kritérií hygieny výrobního procesu.....	33
Obrázek 4: Schéma kultivačního stanovení kritéria bezpečnosti potravin.....	36
Obrázek 5: Izolace čistých kultur pro konfirmaci detekovaných mikroorganismů	38
Obrázek 6: Postup a princip Gramova barvení	42
Obrázek 7: Kolonie <i>Salmonella</i> spp. a <i>E. coli</i> po kultivaci na chromogenních médiích	45
Obrázek 8: Re-inokulace kultur ze selektivně-diferenciačních médií.....	49
Obrázek 9: Vyhodnocení COLItestu pro konfirmaci <i>E. coli</i>	51
Obrázek 10: Princip imunologického aglutinačního testu	53
Obrázek 11: Vyhodnocení <i>Salmonella</i> Test Kit pro konfirmaci <i>Salmonella</i> spp.	54
Obrázek 12: Princip sendvičového typu ELISA testu.....	56
Obrázek 13: Princip imunochromatografického testu.....	57
Obrázek 14: Hmotnostní spektra bakteriálních izolátů	61
Obrázek 15: Lesklá nerezová MALDI-TOF MS destička	63
Obrázek 16: Kultivační stanovení vybraných mikrobiologických kritérií v syrovém mléce.....	74
Obrázek 17: Vykultivované kolonie <i>Enterobacteriaceae</i> s <i>E. coli</i> na mikrobitestech	78
Obrázek 18: Interpretace počtu narostlých bakteriálních kolonií na petrifilmech	80
Obrázek 19: Průkaz přítomnosti škrobu v pepři a zakysané smetaně	96

Tabulky:

Tabulka 1: Typy oznámení vydané EK	14
Tabulka 2: Kritéria hygieny výrobního procesu týkající se mletého masa.....	23
Tabulka 3: Kritéria bezpečnosti potravin týkající se mletého masa	24
Tabulka 4: Kultivační média potřebná stanovení konkrétní skupiny mikroorganismů	28
Tabulka 5: Charakteristiky kolonií na MacConkey agaru po 24h kultivaci při 37 °C	29
Tabulka 6: Počty stanovených kolonií pro výpočet KTJ/g vzorku.....	35
Tabulka 7: Ověření přítomnosti <i>Salmonella</i> spp.	37
Tabulka 8: Kultivační znaky bakteriálních izolátů	40
Tabulka 9: Morfologické znaky bakteriálních izolátů	43
Tabulka 10: Kultivační a morfologické znaky bakteriálních izolátů.....	50
Tabulka 11: Interpretace reakcí v COLItestu	51
Tabulka 12: Výsledky COLItestu.....	52
Tabulka 13: Výsledky <i>Salmonella</i> Test Kitu.....	54
Tabulka 14: Interpretace výsledků MALDI-TOF MS identifikace	65
Tabulka 15: Výsledky MALDI-TOF MS identifikace	66
Tabulka 16: Souhrnné výsledky potřebné pro vypracování zkušební zprávy	67
Tabulka 17: Kritéria pro syrové mléko.....	69
Tabulka 18: Kritérium bezpečnosti potravin pro výrobky z mléka s nižší než pasterační úpravou	70
Tabulka 19: Kritéria hygieny výrobního procesu pro výrobky z mléka s nižší než pasterační úpravou ...	71
Tabulka 20: Kritéria hygieny výrobního procesu pro výrobky z mléka s pasterační úpravou	72
Tabulka 21: Kultivační média potřebná pro kultivační analýzu vzorku syrového mléka	74
Tabulka 22: Výsledková tabulka – počty narostlých kolonií	76
Tabulka 23: Vyhodnocení počtu vybraných skupin mikroorganismů stanovených mikrobitesty	78
Tabulka 24: Vyhodnocení počtu vybraných skupin mikroorganismů stanovených petrifilmem	81
Tabulka 25: Vyhodnocení přítomnosti antibiotik ve vzorcích masa z kuřecích prsou.....	88
Tabulka 26: Dílčí hodnoty pro stanovení koncentrace dusičnanů a dusitanů ve vzorku zeleniny	93
Tabulka 27: Vyhodnocení průkazu přítomnosti škrobu ve vzorcích mletého pepře	97
Tabulka 28: Vyhodnocení průkazu přítomnosti škrobu ve vzorcích zakysané smetany	97

Název: Skriptum pro praktická cvičení z Hygieny a zdravotní nezávadnosti potravin

Autor: Ing. Nikol Modráčková, Ph.D.

Vydavatel: Česká zemědělská univerzita v Praze

Adresa vydavatele: Česká zemědělská univerzita v Praze

Kamýcká 129

Praha – Suchdol, 165 00

Tiskárna: Elektronická skripta

Pořadí vydání: první

Rok vydání: 2025

ISBN 978-80-213-3527-1

Určeno: pro posluchače FAPPZ

Počet stran: 104

Autor technické/grafické úpravy: Ing. Nikol Modráčková, Ph.D.

Vydala Česká zemědělská univerzita ve svém nakladatelství