

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů

STUDIJNÍ PROGRAM: B4131 Zemědělství

STUDIJNÍ OBOR: Zemědělské biotechnologie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Patogenní mikroorganismy v mléce a mléčných produktech

(Food-borne pathogens in milk and milk products)

Eva Baldíková

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Eva Samková, Ph.D.

Konzultant:

MVDr. Lucie Hasoňová, Ph.D.

2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eva BALDÍKOVÁ**
Osobní číslo: **Z08427**
Studijní program: **B4131 Zemědělství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Patogenní mikroorganismy v mléce a mléčných produktech**
Zadávací katedra: *****Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Patogenní mikroorganismy v surovinách či potravinách mohou být příčinou alimentárních infekcí a intoxikací u konzumentů.

Cílem práce bude zpracovat literární rešerši na téma patogenní mikroorganismy se zaměřením na zdravotní rizika spojená s konzumací, popisem druhů vyskytujících se v mléce a mléčných produktech a faktorů, které ovlivňují jejich růst a množení. Současně popíšete i metodiky stanovení vybraných druhů patogenních mikroorganismů.

Bakalářská práce je součástí řešení projektu OP VK CZ.1.07/2.3.00/09.0081 a bude vypracována na základě pokynů uvedených na www.zf.jcu.cz/studenti/informace-pro-studujici/ podle následující osnovy:

1. **Úvod** - význam řešené problematiky včetně uvedení cílů práce
2. **Literární přehled** - současný stav poznání problematiky s ohledem na cíle práce, zpracovaný na základě studia vědecké a odborné literatury, případně grafické či tabulkové porovnání výskytu patogenních mikroorganismů v České republice a ve světě
3. **Závěr** - shrnutí získaných informací, návrhy a doporučení vyplývající z problematiky
4. **Summary** - přehled a nejdůležitější výsledky včetně klíčových slov (v anglickém jazyce)
5. **Seznam literatury** - podle zásad ČSN 01 0197, ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2.

Rozsah grafických prací: 5-10 stran (tabulky a grafy)
Rozsah pracovní zprávy: 25-30 stran textu
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

SAMKOVÁ, E. et al.: Faremní zpracování mléka v ekologickém zemědělství. Kvalita mléka, hygienické požadavky na jeho zpracování, přímý prodej. Zásady ekologického chovu skotu, ovcí a koz. Metodika pro praxi. 1. vyd. Olomouc: Bioinstitut, 2009. 62 s. ISBN 978-80-904174-5-8.
ELMOSLEMANY, A.M. et al.: Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 1: Overall risk factors. Journal of Dairy Science, 2009, 92 (6): 2634-2643.
ŠAFRÁN, P., DUBEN, J.: Nákazy zvířat přenosné na člověka a bezpečnost potravin. 2. vyd. Praha: ÚZPI, 2008. 31 s. ISBN 978-8/0-7271-197-0.
ŠILHÁNKOVÁ, L.: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. vyd. Praha: Academia, 2002. 363 s. ISBN: 80-200-1024-6.

Databáze


CASLIN, Česká zemědělská bibliografie, CAB Abstracts, PROQUEST, dostupné na: <http://www.zf.jcu.cz/public/departments/knihovna/>
Publikace v časopisech Výživa a potraviny, Mlékařské listy a ve sbornících z konferencí - př. Den mléka (Praha: ČZU), Mléko a sýry (Praha: VŠCHT), Ingrovy dny (Brno: MENDELU)

Dokumenty,

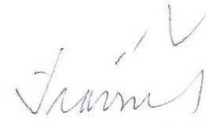
publikace a informace Společnosti pro výživu (www.vyzivaspol.cz/), Potravinářské komory ČR (www.foodnet.cz/), Ústavu zemědělské ekonomiky a informací (www.uzei.cz/), popř. internetových portálů www.agronavigator.cz, www.czso.cz či www.mze.cz

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Eva Samková, Ph.D.
***Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů
Konzultant bakalářské práce: MVDr. Lucie Hasoňová, Ph.D.
***Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů

Datum zadání bakalářské práce: 25. března 2010
Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2011


prof. Ing. Miroslav Šoch, CSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice


prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 25. března 2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Patogenní mikroorganismy v mléce a mléčných produktech“ vypracovala samostatně pouze s využitím zdrojů, které jsou uvedeny v seznamu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 15. dubna 2011

.....

podpis

Poděkování

Děkuji Ing. Evě Samkové, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, podnětné připomínky a rady.

Dále děkuji všem, kteří mi během práce podali pomocnou ruku, zejména MVDr. Lucii Hasoňové, Ph.D., MVDr. Růženě Cempírkové, CSc. a mým rodičům.

Abstrakt

Mléko je díky své nutriční hodnotě a pH výborným živným médiem pro růst patogenních mikroorganismů. Stává se tak nebezpečným zdrojem alimentárních onemocnění, zvláště v kombinaci s nedodržením hygieny výrobního procesu a 10 zlatých pravidel vydaných světovou zdravotnickou organizací WHO.

Práce se zabývá popisem jednotlivých druhů patogenních mikroorganismů vyskytujících se v mléce a mléčných produktech, faktory, jež ovlivňují jejich růst a množení, a v neposlední řadě zdravotními riziky spojenými s konzumací.

Klíčová slova: patogenní mikroorganismy, alimentární onemocnění, faktory růstu, prevence

Abstract

Thanks to its nutrition and pH values, milk is an excellent nutrient medium for the growth of food-borne pathogens. It therefore becomes a dangerous source of food-borne illness, especially in combination with infringement of hygiene guidelines during the production process and the 10 golden rules as published by the World Health Organization (WHO).

The thesis describes the individual species of food-borne pathogens that occur in milk and dairy products, the factors that influence their growth and reproduction and, last but not least, it also describes the health risks that are linked to its consumption.

Key words: food-borne pathogens, food-borne illness, growth factors, prevention

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. OBECNÉ POZNATKY Z MIKROBIOLOGIE.....	10
2.1. Názvosloví	10
2.2. Faktory růstu a množení mikroorganismů	12
2.2.1. Teplota.....	13
2.2.2. pH	14
2.2.3. Oxidoredukční potenciál	15
2.2.4. Vodní aktivita	15
2.2.5. Osmotický tlak	16
2.3. Zásady ochrany a prevence	16
3. VÝZNAMNÉ PATOGENNÍ MIKROORGANISMY	20
3.1. <i>Aspergillus flavus</i>	20
3.2. <i>Bacillus cereus</i>	24
3.3. <i>Campylobacter jejuni</i>	27
3.4. <i>Escherichia coli O157:H7</i>	31
3.5. <i>Listeria monocytogenes</i>	34
3.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	38
3.7. <i>Yersinia enterocolitica</i>	42
4. OSTATNÍ PATOGENY	47
4.1. Historicky významné mikroorganismy	47
4.1.1. <i>Brucella spp.</i>	47
4.1.2. <i>Mycobacterium bovis a Mycobacterium tuberculosis</i>	49
4.1.3. <i>Streptococcus pyogenes</i>	50
4.2. Méně časté a vzácné mikroorganismy	52
4.2.1. <i>Citrobacter freundii</i>	52
4.2.2. <i>Clostridium spp.</i>	52
4.2.3. <i>Corynebacterium ulcerans</i>	54
4.2.4. <i>Salmonella</i>	54
4.2.5. <i>Streptobacillus moniliformis</i>	56
5. METODY DETEKCE.....	58
5.1. Klasické kultivační metody.....	58
5.1.1. Detekce vybraných patogenních bakterií	58

5.2. Molekulárně genetické metody	61
5.3. Imunochemické metody	62
6. ZÁVĚR.....	63
7. ZDROJE.....	65
7.1. Odborné publikace	65
7.2. Elektronické zdroje	70
7.3. Normy, nařízení a vyhlášky	73
8. PŘÍLOHY.....	75
8.1. Seznam použitých zkratk	75
8.2. Seznam obrázků	75
8.3. Seznam tabulek	76

1. ÚVOD

Patogenní mikroorganismy vždy byly a budou potenciální hrozbou pro lidské zdraví. Dle údajů Státního zdravotního ústavu bylo jen za rok 2010 hlášeno téměř 40 tisíc případů onemocnění z potravin, přičemž tato čísla mohou být prakticky daleko vyšší. Alimentární infekce a intoxikace jsou tedy velice vážným problémem ve většině rozvinutých zemí a jejich studium je tak řazeno mezi priority i v národním systému bezpečnosti potravin v ČR.

Vzhledem k aktuálnosti problematiky bylo mým cílem zpracovat literární přehled popisující jednotlivé druhy mikroorganismů vyskytujících se v mléce a mléčných produktech, faktory, které ovlivňují jejich růst a množení, dále zdravotní rizika spojená s konzumací a metodiky stanovení vybraných druhů patogenních mikroorganismů. Bakalářská práce byla součástí řešení projektu OP VK CZ. 1.07/2.3.00/09.0081.

2. OBECNÉ POZNATKY Z MIKROBIOLOGIE

2.1. Názvosloví

Absces je dutina ve tkáni vzniklá zánětem, jež je vyplněná hnisem a obklopená zanícenou tkání.

Alimentární infekce jsou vyvolány mikroorganismy, které se potravinou nebo vodou dostávají do trávicího traktu člověka, kde se pomnoží a vyvolají onemocnění.

Alimentární toxoinfekce způsobují uvolněné endotoxiny bakterií, působící na střevní sliznici.

Alimentární intoxikace (enterotoxikózy) jsou onemocnění vyvolaná potravinami, ve kterých se pomnožily bakterie a vlivem jejich metabolické aktivity se nahromadily toxické metabolity (exotoxiny).

Bakteriémie je přítomnost bakterií v krvi.

Endokarditida je zánětlivé onemocnění vnitřní výstelky srdce (endokardu).

Chemoorganotrofie je způsob výživy, při němž organismy získávají energii z chemických organických látek.

Infekční dávka je množství mikroorganismů, jež je schopné vyvolat onemocnění.

Inkubační doba je doba od vniknutí infekčního agens do organismu do propuknutí prvních příznaků nemoci.

Karcinogen je látka schopná u člověka vyvolat zhoubné nádorové bujení.

Keratitida je zánětlivé onemocnění oční rohovky.

Meningitida (= zánět mozkových blan) je závažné infekční onemocnění, při kterém dochází k zánětu mozkových obalů (tzv. meningů).

Mutagen je fyzikální, chemický nebo biologický faktor schopný vyvolat genetickou mutaci.

Nosokomiální nákazy jsou infekční onemocnění vzniklé ve spojitosti s pobytem postiženého ve zdravotnických zařízeních.

Pasterace je proces ničení mikroorganismů v potravinách, které by mohly způsobovat onemocnění. Jedná se o tepelné opracování, přičemž u mléka lze použít dva postupy: ošetření teplotou 72 °C po dobu 15 sekund a nebo teplotou 63 °C na 30 minut.

Patogenita je schopnost daného mikroorganismu vyvolat onemocnění konkrétního druhu hostitele.

Patogenní mikroorganismy jsou bakterie, bakteriální toxiny, viry i plísně, které jsou schopny vyvolat infekční onemocnění.

Polyneuropatie je porucha periferních nervů, provázená narušením jejich funkcí. Postiženy bývají hlavně dlouhé nervy (nejčastěji na dolních končetinách).

Podmíněný (oportunní) patogen vyvolá onemocnění pouze při poškození některého z faktorů rezistence a při snížené funkci imunitního systému.

Pneumonie (= zápal plic) je zánětlivé onemocnění průdušinek, plicních sklípků a/nebo plicní tkáně.

Saprofyt je organismus živící se výměškou jiného organismu nebo rozkládajícím se živočišným nebo rostlinným tělem či jeho částí.

Sepse (= otrava krve) je systémová zánětlivá reakce organismu na přítomnost infekce. Může se rozvinout do těžké sepse a dále septického šoku spojeného s mnohočetným selháním orgánů.

Střední letální dávka (LD₅₀) je objektivní metoda hodnocení toxicity zkoumané látky. Jedná se o množství látky, po které uhynulo 50 % testovaných živočichů za 24 hodin po podání.

Toxiny jsou jedovaté látky bílkovinné povahy, které jsou produkovány některými bakteriemi. Patří mezi vůbec nejsilněji působící toxiny v přírodě.

Ubikvitární = všudypřítomné.

Virulence je kvantitativní vyjádření míry patogenity. Je určena toxicitou původce, jeho invazivitou a vnímavostí hostitelského organismu. Podle virulence rozdělujeme kmeny patogenních druhů na vysoce virulentní, virulentní a avirulentní.

2.2. Faktory růstu a množení mikroorganismů

Na životní činnost a vývoj všech mikroorganismů mají zásadní vliv podmínky vnějšího prostředí. K tomu, aby se mikroorganismus pomnožoval, musí být splněny jeho nároky. Nejenže je třeba zabezpečit dostatečné množství živin k syntéze buněčné hmoty, ale opomenuty nesmí být ani záležitosti biologické, fyzikální či chemické.

Nejdůležitějšími faktory, které ovlivňují životaschopnost organismu, jsou teplota, pH, oxidoredukční potenciál, vodní aktivita a osmotický tlak. Nicméně je třeba zahrnout také tlak, vliv záření, přítomnost toxických látek a vliv jiných mikroorganismů.

Základní podmínky pro optimální růst vybraných patogenních mikroorganismů jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Optimální podmínky vybraných patogenů.

Mikroorganismus	Teplota v °C	pH	Aktivita vody (minimální)
<i>Bacillus cereus</i>	30-37	7,0-7,4	0,91
<i>Campylobacter spp.</i>	(37)-42	6,5-7,5	0,98
<i>Escherichia coli</i> <i>O157:H7</i>	30-42	6,8-7,2	0,95
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	37	7,0-7,5	0,92
<i>Salmonella enteritidis</i>	35-37	6,5-7,5	0,93
<i>Staphylococcus aureus</i>	bakterie: 30-37	6,0-7,5	0,90
	toxin: 40-45	7,0-8,0	0,92
<i>Yersinia enterocolitica</i>	30-37	7,2	0,95

Upraveno podle: Doyle et al., 1989; Jičínská & Havlová, 1995; Altekruise, 1999; Marth & Steele, 2001; Blažková & Karamonová, 2005; Hrubý, 2005; NSW Food Authority, 2007; Hochel, 2009; NZSFA³, 2010.

2.2.1. Teplota

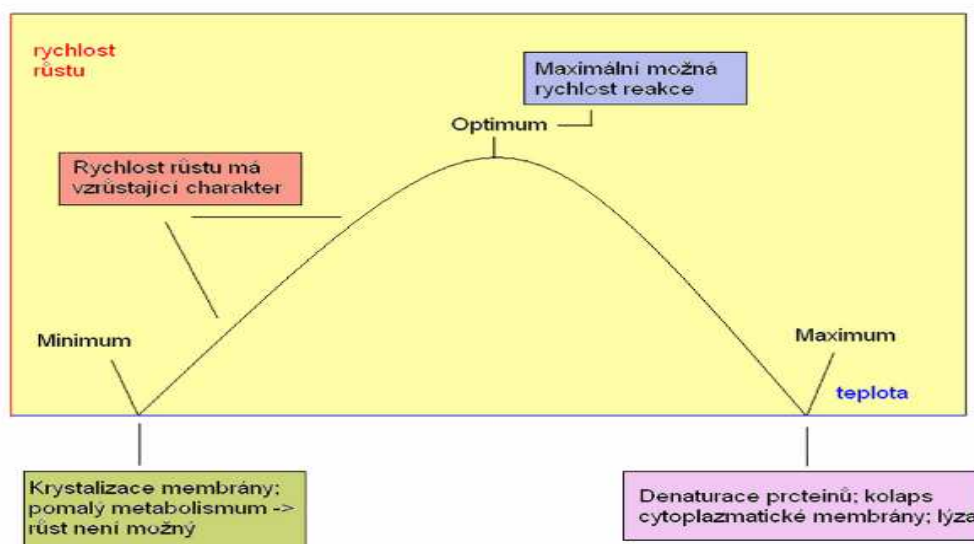
Teplota je jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují rychlost rozmnožování organismů. Jak je patrné z obrázku 1, obecně lze říci, že se zvyšující se teplotou roste rychlost růstu, což platí až do dosažení hodnoty teplotního optima, tzn. bodu či intervalu, ve kterém organismus roste nejrychleji. Při dalším zvyšování teploty pak dochází k prudkému poklesu rychlosti rozmnožování a posléze až k samotné denaturaci proteinů a rozpadu membrán.

U každého mikroorganismu rozeznáváme tedy tři základní body teploty: **minimální**, tzv. nejnižší, pod kterou již nemůže růst, **optimální**, při níž se pomnožuje největší rychlostí a **maximální**, nad kterou již růst není možný. Optimální teplota je různá pro různé životní fáze (množení, tvorbu spor a intenzivní metabolismus) a platí, že je vždy blíže teplotě maximální než minimální. Dle vztahu

k teplotě se pak mikroorganismy rozdělují do čtyř skupin (Šilhánková, 2002; Rosypal et al., 2003):

- 1) Psychrotrofní, které jsou schopné růst i v teplotách nižších než 0 °C. Jejich optimální teplota se nachází kolem 15 °C a maximální okolo 20 °C. Do této skupiny patří ještě organismy psychrotolerantní, což jsou organismy, které jsou sice schopné růst i při 0 °C, ale přednost dávají teplotám o něco vyšším.
- 2) Mezofilní, jejichž optimální teplota se pohybuje v rozmezí 20-45 °C.
- 3) Termofilní, vyžadující teploty nad 45 °C.
- 4) Hypertermofilní, jež rostou v rozsahu teplot od 85-110 °C.

Obrázek 1: Vliv teploty na rychlost rozmnožování mikroorganismů.



Upraveno podle: Falteisek et al., 2006.

2.2.2. pH

Koncentrace vodíkových iontů v prostředí silně ovlivňuje nejen růst mikroorganismů, ale také jejich biochemickou činnost (konformaci proteinů, potažmo aktivitu enzymů) a odolnost k působení dalších vlivů, jako je působení vyšších teplot. Každý organismus je schopen se pomnožovat pouze v určitém rozmezí pH. Pro optimální růst bakterií je tento rozsah poměrně úzký, zatímco u většiny plísní je podstatně širší.

Většina mikroorganismů nesnáší kyselé prostředí, které výrazně snižuje rychlost jejich rozmnožování. Dokonce ani spory patogenních mikroorganismů nemohou v tomto prostředí vyklíčit (Falteisek et al., 2006).

Dle hodnot pH je možné organismy rozdělit na:

- 1) Acidofilní (s optimální hodnotou pH 0-5,5).
- 2) Neutrofilní (pH 5,5-8) s nejpočetnějším zastoupením mikroorganismů.
- 3) Alkalofilní (pH 8,5-11,5).

2.2.3. Oxidoredukční potenciál

Oxidoredukční potenciál je dán zastoupením oxidačních a redukčních činidel v prostředí. Definuje se jako rozdíl potenciálu mezi platinovou elektrodou umístěnou do daného prostředí a vodíkovou elektrodou. Silně oxidační látky vytvářejí pozitivní oxidoredukční potenciál, kdežto silně redukující látky vedou k negativnímu potenciálu (Šilhánková, 2002).

Jedním z nejdůležitějších oxidačních činidel je kyslík. Dle vztahu k němu jsou mikroorganismy děleny na (Šilhánková, 2002; Rosypal et al., 2003):

- 1) Aerobní, které rostou pouze za přítomnosti kyslíku.
- 2) Fakultativně anaerobní, jež sice kyslík k růstu nepotřebují, ale s ním rostou lépe.
- 3) Striktně anaerobní, které vyžadují prostředí bez kyslíku.

2.2.4. Vodní aktivita

Vodní aktivita je vyjádřena jako poměr parciálního tlaku vodní páry potraviny a destilované vody, což popisuje zjednodušená rovnice: $a_w = \frac{p}{p_0}$. Nabývá hodnot

0 - 1, přičemž dolní hranice u bakterií se pohybuje kolem 0,92, u kvasinek 0,88, u vláknitých hub 0,80 a u xerofilních plísní až kolem 0,65.

Obecně pro bakterie platí, že čím nižší je tato hodnota, tím obtížnější je pro ně růst. Snížení vodní aktivity lze dosáhnout několika způsoby (Šilhánková, 2002):

- a) odstraněním vody sušením, uzením, odpařením nebo mražením
- b) zvýšením koncentrace rozpuštěných látek v prostředí přidávkem vhodných látek (často sacharóza či NaCl), což způsobí zvýšení osmotického tlaku.

Dle vlhkosti prostředí lze mikroorganismy rozdělit na (Čejková, [s.a]):

- 1) Hygrofilní, vyžadující přítomnost vody. Velmi citlivé k nedostatku vody jsou některé z gramnegativních bakterií (např. meningokoky), které bez vody hynou již za několik hodin.

2) Xerofilní, které jsou schopné využívat i vodu hygroskopickou, jejíž molekuly jsou vázány na povrchu půdních částic. Nejčastěji se jedná o aktinomycety a plísňe. Vysoce odolné vůči suchému prostředí jsou také mykobakterie či klidová stádia (spory, cysty, zapouzdřené buňky).

2.2.5. Osmotický tlak

Osmotický tlak úzce souvisí s přítomností vody a koncentrací solí rozpuštěných ve vodě. Zvýšení koncentrace rozpuštěných látek, jak již bylo psáno, vede ke zvýšení osmotického tlaku. Také v každé mikrobiální buňce je určitý osmotický tlak, za normálních podmínek vyšší než v okolním prostředí.

Nachází-li se buňka v hypotonickém prostředí, dochází k plazmoptýze, při níž se osmotický tlak vyrovnává difúzí vody do buňky. Bobtnání a prasknutí buňky při tomto procesu většinou brání silná a pevná buněčná stěna. V hypertonickém prostředí naopak dochází k plazmolýze, při níž dochází k odvodnění buňky a zastavení životních projevů. Právě tento jev je hojně využíván v konzervářenském průmyslu (solené maso, džemy, marmelády aj.) (Falteisek et al., 2006).

Z hlediska vyrovnávání se s vysokým osmotickým tlakem a vysoké koncentraci solí v prostředí lze mikroorganismy rozdělit na (Šilhánková, 2002):

- 1) Osmotolerantní, které jsou schopné růst při vysokých koncentracích cukrů, např. kvasinky rodu *Zygosaccharomyces* v 60% roztoku sacharosy.
- 2) Osmofilní, jež vyžadují vysoký osmotický tlak, např. některé plísňe.
- 3) Halofilní, vyžadující vysoké koncentrace solí. Nejlépe se rozmnožují při koncentracích NaCl 15% a více.
- 4) Halotolerantní, schopné růst v určitých koncentracích (většinou do 10%), nicméně nejlépe rostou bez přítomnosti rozpuštěných látek. Do této skupiny jsou řazeny např. koky rodu *Staphylococcus*.

2.3. Zásady ochrany a prevence

Tato kapitola má za úkol poskytnout stručný přehled nejdůležitějších bodů ochrany a prevence před patogenními mikroorganismy a jimi vyvolávanými onemocněními, jak v průběhu získávání, zpracování i výroby, tak u běžného

spotřebitele. Dále jsou uvedena kritéria bezpečnosti potravin v mléce a mléčných produktech dle Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 (viz tabulka 2), která sledují výskyt patogenních mikroorganismů, jejich toxinů a metabolitů, zabývající se zejména druhy *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* a stafylokokovými enterotoxiny.

V prvovýrobě je v první řadě důležité pečovat o zdravotní stav dojníc, sledovat výskyt mastitid, oddělit chovy dojníc od chovů prasat nebo drůbeže a zkrmovat pouze dobře prokysané siláže a nezavhlá, nezaplísňená krmiva (Jičínská & Havlová, 1995).

Další bod spočívá v dodržování hygienických předpisů při dojení, týkajících se nejen mytí a dezinfekce vemen, ale také sanitace dojících aparátů. Mimořádná pozornost musí být věnována mikrobiologické jakosti vody.

Ve výrobě je podstatné využívat všechny dostupné zábrany růstu patogenních mikroorganismů a produkce toxinů jako je vhodný tepelný režim, vysoce aktivní zákysové mlékařské kultury, antibiotika nebo chemické inhibitory (Jičínská & Havlová, 1995).

Velice důležitým bodem je chlazení mléka od nadojení až po pasteraci při teplotě menší než 10°C, ve výrobě sýrů i jiných zakysaných výrobků je nezbytné používání aktivních, rychle prokysávajících zákysových kultur, které inhibují nebo inaktivují patogeny.

Nejvíce chyb, co se zacházení s potravinami týče, se dopouštějí samotní spotřebitelé, a přitom k zabránění výskytu patogenních mikroorganismů stačí pouze dodržování deseti zlatých pravidel, vypracovaných světovou zdravotnickou organizací (WHO) k zabezpečení zdravotní nezávadnosti potravy (Nečesánková, 2005):

1. Výběr takových potravin, které jsou po technologickém zpracování zdravotně nezávadné. Např. je vhodné vybírat pasterované mléko.

2. Dokonalé provaření potravin. Obecně se uvádí, že k zabezpečení zdravotní nezávadnosti potravin je třeba prohřát všechny části potravy na 70 °C po dobu 10 minut.

3. Konzumace stravy ihned po uvaření. Necháme-li totiž potraviny chladnout v pokojové teplotě, mikroorganismy se začnou pomnožovat.

4. Velmi uvážlivé uchovávání potravin po uvaření. Potraviny je možné uchovávat buď v teplém stavu (kolem 60°C), nebo ve stavu studeném (méně než

10 °C). Toto pravidlo je zvláště důležité, chceme-li potraviny uchovat na dobu delší než 4 hodiny.

Další velmi častou chybou je uložení ještě teplých potravin do ledničky. Zůstane-li totiž střed potraviny teplý (nad 10°C) na dlouhou dobu, mikroorganismy se začnou rychle množit a jejich množství snadno dosáhne infekčních dávek.

5. Důkladné ohřívání již jednou uvařených potravin.

6. Zabránění křížové kontaminace mezi syrovými a již uvařenými potravinami. Uvařené potraviny mohou být sekundárně kontaminovány sebemenším dotykem potraviny.

7. Mytí rukou před začátkem přípravy potravin i při jakémkoliv přerušení.

8. Udržování kuchyňského zařízení v bezvadné čistotě.

9. Ochrana potraviny před hmyzem, hlodavci a jinými zvířaty, která jsou častými nositeli choroboplodných zárodků způsobujících onemocnění.

10. Používání pouze pitné vody. V případě pochybnosti o vhodnosti vody je dobré ji před přidáním do potraviny převařit.

Tabulka 2: Kritéria bezpečnosti potravin v potravinách dle Nařízení komise (ES) č. 2073/2005.

Kategorie potravin	Mikroorganismy/ jejich toxiny	Limity	Fáze, na niž se kritérium vztahuje
Potraviny určené k přímé spotřebě pro kojence a potraviny určené k přímé spotřebě pro zvláštní léčebné účinky	<i>Listeria monocytogenes</i>	nepřítomnost ve 25 g	produkty uvedené na trh během doby údržnosti
Potraviny určené k přímé spotřebě, které podporují růst <i>L. monocytogenes</i> , jiné než pro kojence a pro zvláštní léčebné účinky	<i>Listeria monocytogenes</i>	100 KTJ/ g	produkty uvedené na trh během doby údržnosti
		nepřítomnost ve 25 g	před tím, než potravina opustí bezprostřední kontrolu provozovatele potravinářského podniku, který ji vyrobil
Potraviny určené k přímé spotřebě, které nepodporují růst <i>L. monocytogenes</i> , jiné než pro kojence a pro zvláštní léčebné účely	<i>Listeria monocytogenes</i>	100 KTJ/ g	produkty uvedené na trh během doby údržnosti
Sýry, máslo a smetana vyrobené ze syrového mléka nebo mléka, které bylo podrobeno nižšímu tepelnému ošetření než pasterací	<i>Salmonella</i>	nepřítomnost ve 25 g	produkty uvedené na trh během doby údržnosti
Sušené mléko a sušená syrovátka	<i>Salmonella</i>	nepřítomnost ve 25 g	produkty uvedené na trh během doby údržnosti
Zmrzlina, vyjma výrobků, u nichž výrobní proces nebo složení výrobku vyloučí riziko salmonel	<i>Salmonella</i>	nepřítomnost ve 25 g	produkty uvedené na trh během doby údržnosti
Sýry, sušené mléko a sušená syrovátka podle kritérií pro koagulázopozitivní stafylokoky	<i>Stafylokokové enterotoxiny</i>	neprokázány ve 25 g	produkty uvedené na trh během doby údržnosti

3. VÝZNAMNÉ PATOGENNÍ MIKROORGANISMY

3.1. *Aspergillus flavus*

Hygienický význam

Onemocnění způsobené mykotoxiny houby *A. flavus* v posledních letech přibývají na významu a to nejen v oblastech se suchým a horkým klimatem. V poslední době se ukazuje, že právě tento druh je mnohem více virulentní, než se zprvu zdálo. Navíc vykazuje ohromnou odolnost vůči antimykotům (Krměčnick & Kysilka, 2001a).

Většina studií je i přesto zaměřena na nejrozšířenější druh rodu - *A. fumigatus*, původce invazivních aspergilóz, ač bylo experimentálně prokázáno, že *A. flavus* je až 100x jedovatější (Marth & Steele, 2001; Krměčnick & Kysilka, 2001a).

Historie

Rod *Aspergillus* žije v lidském prostředí odnepaměti, ale teprve v druhé polovině 19. století začal být uznáván jako původce onemocnění lidí a zvířat (Krměčnick & Kyselka, 2001a).

Aflatoxiny byly identifikovány začátkem 60. let v Anglii v souvislosti s epidemií označovanou jako krůtí X onemocnění, při které zahynulo na 100 000 krůtích mláďat po zkonsumování krmiva s obsahem toxické arašídové mouky. Postupně byly identifikovány čtyři přirozené typy aflatoxinů: AFB1, AFB2, AFG1 a AFG2. Hydroxylací AFB1 a AFB2 pak vznikají AFM1 a AFM2, které nacházíme v mléce a mléčných produktech (Marth & Steele, 2001; Edayati et al., 2007).

Taxonomie

Rod *Aspergillus* zahrnuje asi 150 druhů, z nichž pouze některé byly prokázány jako původci lidských onemocnění. Spadá do říše hub, oddělení *Ascomycota* (vřeckovýtrusné houby) a čeledi *Trichocomaceae* (Abbas, 2005).

Do samotného komplexu *A. flavus* je řazeno 23 druhů, včetně dvou pohlavně reprodukovatelných *Petromyces alliaceus* a *P. albertensis* (Krménčík & Kysilka, 2001a).

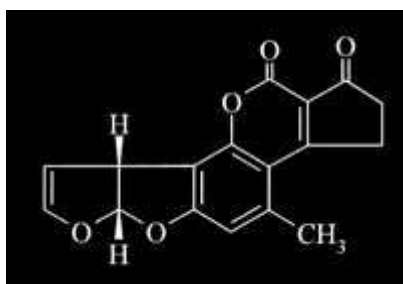
Aflatoxiny

Aflatoxiny jsou sekundární metabolity produkované toxigenními kmeny *A. flavus*, *A. parasiticus* a *A. nomius*, jež jsou potenciálně škodlivé pro lidi i zvířata. Samotný název aflatoxin pochází ze spojení *A. flavus* a toxin (Marth & Steele, 2001; Edayati et al., 2007; Pasqualotto, 2009).

Z chemického hlediska se jedná o látky odvozené z difuranokumarinového skeletu (viz obrázek 2). Jejich účinky jsou akutně toxické, karcinogenní, mutagení a teratogenní, přičemž pořadí toxicity a mutagenity jednotlivých typů je následující: AFB1 > AFG1 > AFB2 > AFG2 (Krménčík & Kysilka, 2001a).

AFB1 patří mezi vůbec nejtoxičtější a nejsilnější hepatokarcinogenní látky v přírodě. Má akutní toxicitu LD₅₀ v rozsahu 0,4 - 18 mg/kg v závislosti na živočišném druhu. Při vysokých hladinách se toxicita projeví za 3-6 hodin jako nekróza hepatocytů (jaterních buněk) či poškození srážlivosti. To může vést k širokým hemoragiím (krvácení) a případné smrti (Krménčík & Kysilka, 2001a).

Obrázek 2: Chemická struktura AFB1 (Krménčík & Kysilka, 2001a).



Výskyt a zdroje kontaminace

Rod *Aspergillus* patří k nejrozšířenějším houbám v prostředí. Na člověka se přenášejí vzdušnou cestou, tedy inhalací mikrokonidií. Právě vzdušné konidie jsou pravděpodobně zodpovědné za kosmopolitní výskyt mikroorganismu (Krménčík & Kysilka, 2001a).

Aspergillus tvoří aflatoxiny během růstu na vlhkých rostlinných krmivech (seno, sláma, zrní). Stejně jako oportunističtí paraziti často infikují reprodukční orgány

rostlin (kukuřice, bavlník, podzemnice olejná) už během vegetace a mohou se dále pomnožovat a produkovat aflatoxiny během sklizně a dalšího zpracování rostlinného materiálu na krmiva (Jičínská & Havlová, 1995).

Po požití krmiva kontaminovaného aflatoxinem AFB1 či AFB2 dochází v organismu dojnice k hydroxylaci na aflatoxiny AFM1 a AFM2, které jsou následně vylučovány do mléka. Koncentrace aflatoxinů v mléce je přímo úměrná dávce v krmivu (Jičínská & Havlová, 1995; Marth & Steele, 2001; Hrubý, 2005;). Bylo prokázáno, že za 24 hodin od konzumace kontaminovaného krmiva v množství 300 ng AFB1/g produkuje dojnice mléko obsahující 1 ng AFM1/ml (Krménčik & Kysilka, 2001a).

V sýrech, jež jsou připravovány z kontaminovaného mléka, je koncentrace aflatoxinů několikanásobně vyšší než v samotném mléce (u měkkých sýrů až 3x, u tvrdých až 6x) (Marth & Steele, 2001).

Morfologie, fyziologie, biochemie

Jedná se o vláknité houby, jejichž vlákna (hyfy) jsou dělena septy a jejichž konce jsou rozšířeny v konidiofor, nesoucí malé konidie (plísňové spory) (viz obrázek 3). Makroskopický útvar složený z rozvětvených hyf se nazývá mycelium a má dle lokalizace a funkce dvě části (Bednář et al., 1996):

- a) Mycelium vegetativní (bazální), které vrůstá do kultivační půdy a čerpá živiny.
- b) Mycelium vzdušné (povrchové, reprodukční), jež nese reprodukční orgány.

Obrázek 3: Konidiofor s konidiemi druhu *A. flavus*
(www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/asp-fl.htm).



Za 2 - 4 dny narostou aspergily na různých půdách, přičemž chmýřité kolonie jsou zbarveny podle barvy mikrokonidií (žlutě, šedozeleň, černě) (Bednář et al.,

1996). Kolonie *A. flavus* na CYA (po 14 dnech při 25 °C) je znázorněna na obrázku 4. *A. flavus* optimálně roste při a_w 0,86 - 0,96 a při 37 °C, ač růst hub lze pozorovat v teplotním rozmezí 12 - 48 °C (Krmečnick & Kysilka, 2001a).

Obrázek 4: Kolonie *A. flavus* na CYA (Czapkův agar s kvasničným extraktem) (www.sci.muni.cz/mikrob/MiniAtlas/asp-fl.htm).



Onemocnění

Aspergily jsou potenciálně patogenní houby a vznik onemocnění je podpořen nejen masivností infekce a virulencí kmene, ale především zvýšenou vnímavostí hostitele. V dnešní době patří mezi významné původce nosokomiálních nákaz (Bednář et al., 1996).

A. flavus ohrožuje člověka dvojitým způsobem – infekcí a intoxikací a způsobuje tak široké spektrum chorob, od infekčního onemocnění **aspergilózy**, jež postihuje primárně dýchací cesty, až po chronický zánět vedlejších nosních dutin, keratitidu, kožní aspergilózy, infekce ran či osteomyelitidu. Aflatoxiny (AFB1, AFB2, AFG1 a AFG2) pak vyvolávají akutní selhání jater, projevující se krvácením, edémem, změnami v trávení a metabolismu živin, někdy také bezvědomím (Marth & Steele, 2001; Pasqualotto, 2009).

Žádný živočišný druh není imunní vůči toxickým účinkům aflatoxinů. Člověk ovšem vykazuje vyšší toleranci, a proto podlehne akutní aflatoxikóze ojedinele (Pasqualotto, 2009).

3.2. *Bacillus cereus*

Hygienický význam

Bacillus cereus je jedním z nejdůležitějších a současně i hygienicky nejrizikovějších bakteriálních kontaminantů mléka, ač byl až do roku 1959 pokládán za potravinářsky neškodného saprofyta (Jičínská & Havlová, 1995).

Bakterie produkuje celou řadu toxinů, z nichž nejdůležitější jsou diarhogenní a emetický toxin, a další virulenní faktory – fosfolipáza, hemolyzin aj. – které zvyšují jejich patogenní potenci (Drobniewski, 1993; Jičínská & Havlová, 1995; Kolář, 2001). Emetický toxin je nízkomolekulární, vysoce termostabilní protein odolný vůči pH a proteázám, produkováný během tvorby spor, jehož účinek je obdobný stafylokokovým enterotoxinům, zatímco diarhogenní toxin je extracelulární termolabilní protein, který vzniká v průběhu germinace (počátečního vývoje) spor. Účinek toxinu je spíše podobný choleroým toxinům (Jičínská & Havlová, 1995).

Historie

První záznamy týkající se otrav z potravin způsobené rodem *Bacillus* pochází z roku 1906, nicméně jako příčina onemocnění z potravin byl *Bacillus cereus* uznán až po roce 1950. Již od roku 1971 bylo ve Velké Británii známo, že mikroorganismus způsobuje dva odlišné typy onemocnění; diarhogenní formu s relativně delší inkubační dobou a formu emetickou, projevující se zvracením, s velice rychlým nástupem charakteristických příznaků.

Od roku 1975 bylo několik dalších druhů rodu *Bacillus* spojováno s nemocemi z potravin. V těchto případech se jednalo o nákazy obvykle vyvolané druhy rodu *Bacillus* patřícími do stejné morfologické skupiny, především *B. subtilis*, ale také *B. licheniformis* a *B. pumilis* (Kolář, 2001).

Taxonomie

Bacillus cereus náleží do čeledi aerobních a fakultativně anaerobních bakterií *Bacillaceae*, kde tvoří spolu s *Bacillus anthracis* a *Bacillus thuringiensis* skupinu velkých, toxigenních bacilů (Jičínská & Havlová, 1995; Hrubý, 2005).

K identifikaci rodu *Bacillus* byl vyvinut systém, který rozděluje rod do třech skupin podle morfologie spory a sporangia (Kolář, 2001):

Skupina 1: Sporangium nezduřelé; spory elipsoidní nebo cylindrické, centrální až terminální. Grampozitivní. Tato skupina je dále rozdělena do dvou podskupin lišících se velikostí buněk: A) podskupina s „velkými buňkami“ ($> 1 \mu\text{m}$) – zahrnující druhy *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* a *B. anthracis*; B) podskupina s „malými buňkami“ ($< 1 \mu\text{m}$) – *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. licheniformis*, *B. firmus* a *B. coagulans*.

Skupina 2: Sporangium zduřelé; spory elipsoidní, centrální až terminální. Gramproměnlivé. Do této skupiny jsou řazeny *B. circulans*, *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. alvei*, *B. laterosporus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. popilliae*, *B. larvae* a *B. lentimorbus*.

Skupina 3: Sporangium zduřelé; spory sférické, subterminální až terminální. Gramproměnlivé. *B. sphaericus*.

Pro rod *Bacillus* je velice významným taxonomickým znakem tvorba jedné endospory, která se vyznačuje velkou odolností k vysokým teplotám, jedům, zářením a jiným nepříznivým podmínkám (Kolář, 2001).

Výskyt a zdroje kontaminace

Bacillus cereus je ubikviterní saprofytický mikroorganismus, který roste na rozkládajících se zbytcích rostlin v půdě, hnoji i krmivech (Doyle et al., 1989; Jičínská & Havlová, 1995). Jako nejvýznamnější zdroje této bakterie jsou uváděny syrové potraviny rostlinného původu (Doyle et al., 1989), nezanedbatelným zdrojem jsou však také dojnice, u kterých může vyvolat mastitidu. O něco méně významným zdrojem je člověk, u něhož se může mikroorganismus přechodně objevit ve střevech (NZSFA¹, 2010).

Vysoký výskyt *B. cereus* je znám v pasterovaném a jinak tepelně ošetřeném mléce (typické je 35 – 48 % pozitivních vzorků) ve srovnání s mlékem neošetřeným (~ 9% pozitivních). V tomto případě tepelné zpracování spíše napomůže sporotvorným mikroorganismům (Kolář, 2001).

Výskyt je také rozdílný v závislosti na toxinu, který bakterie produkuje. Kmeny produkující emetický toxin dobře rostou na rýži a ostatních škrobnatých potravinách (brambory, těstoviny), zatímco kmeny produkující průjmový (diarhogenní) toxin nalézáme v nejrůznějších druzích potravin, ať se jedná o masové výrobky (např. játrová paštika), zeleninu či omáčky. Schopnost tvořit spory (resp. rezistence

spor k teplu) umožňuje i výskyt na suchých potravinách (např. mouka) (Doyle et al., 1989).

Morfologie, fyziologie, biochemie

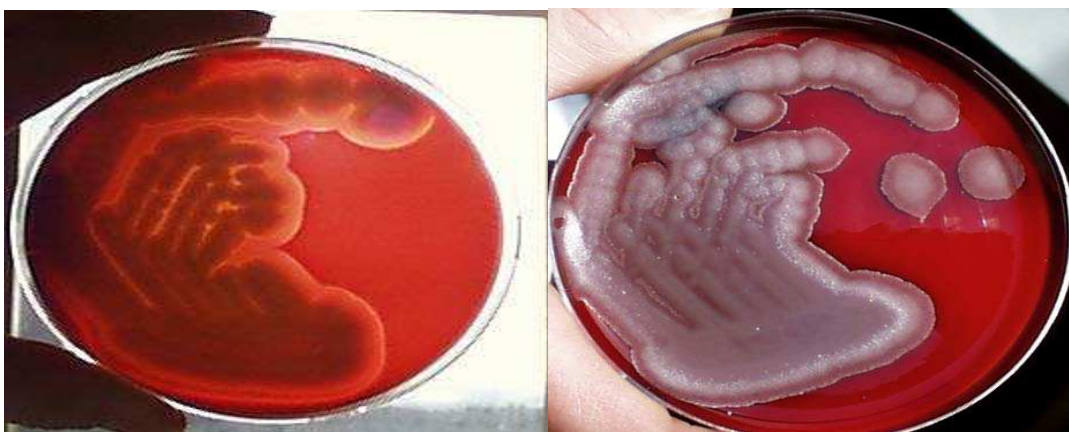
Bacillus cereus je grampozitivní, neopouzďřená, pohyblivá tyčinka tvořící spory. Je to fakultativní anaerob s poměrně velkými vegetativními buňkami (1,0 – 1,2 x 3 - 5 μm), jež se mohou vyskytovat jednotlivě, ve dvojicích či řetězcích (Jičínská & Havlová, 1995; Kolář, 2001; Hrubý, 2005).

Spory této bakterie, jak je uvedeno výše, jsou centrální, elipsoidního tvaru, nezpůsobují nadouvání sporulující buňky a vykazují různou teplotní odolnost. Díky schopnosti tvořit spory je mikroorganismus široce rozšířený v okolním prostředí (Jičínská & Havlová, 1995; Kolář, 2001; Hrubý, 2005).

B. cereus je kultivačně nenáročný. Roste na běžných médiích, na krevním agaru vyrůstá ve velkých, drsných koloniích s nepravidelnými okraji, obklopených zónou β - hemolýzy (viz obrázek 5) (Kolář, 2001; Hrubý, 2005).

Obrázek 5: Kolonie *B. cereus* na krevním agaru

(<http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/rep/bace.htm>).



Bakterie je producentem řady enzymů. První skupinu tvoří fosfolipázy C, mezi něž spadá lecitináza, enzym, který rozkládá lecitin na toxický lysolecitin, což je typickým identifikačním znakem pro *B. cereus*. Dále jsou to dva hemolysiny. Hemolysin I (Cereolysin), jenž je oxygenlabilní a letální pro myš, a Hemolysin II, který je oxygenstabilní.

Až na několik výjimek *Bacillus spp.* vytváří katalázu, což je znak, který kromě aerobní produkce endospor, rozlišuje rod *Bacillus spp.* od rodu *Clostridium spp.* (Kolář, 2001).

Onemocnění

Onemocnění vzniká po požití kontaminovaných potravin enterotoxinogenním kmenem a z kontaminovaných kosmetických přípravků či očních kapek (Kolář, 2001). Vyskytuje se, jak již bylo zmíněno, ve dvou formách, a sice formě emetické, kdy otrava vzniká v důsledku požití toxinu obsaženého v potravě, a diarhogenní, kdy jsou požitý samotné bakteriální buňky, jež posléze v tenkém střevě vytvářejí enterotoxin.

Jako komplikace se mohou objevit místní kožní infekce ran, oční infekce, selhání jater či jiná onemocnění jako je např. pneumonie, meningitida nebo endokarditida (Louisiana Office of Public Health, 2004).

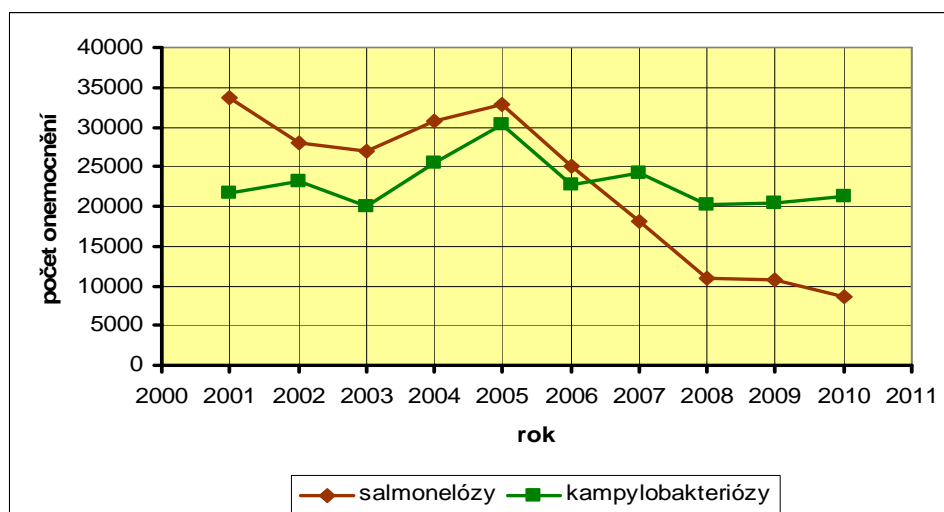
3.3. *Campylobacter jejuni*

Hygienický význam

Kampylobakterie jsou mikrobiálními patogeny člověka a zvířat, které se v posledních deseti letech stávají významnými původci alimentárních nálezů v Evropě, USA a dalších vyspělých zemích (Jičínská & Havlová, 1995; Hochel, 2009). Počet onemocnění v ČR způsobených rodem *Campylobacter* v letech 2001 – 2010 je uveden na obrázku 6.

V současnosti můžeme konstatovat, že kampylobakteriíza je nejčastější infekcí zažívacího traktu. Výskyt je celosvětový, srovnání v různých státech však není snadné - díky odlišným podmínkám v dostupnosti lékařské péče, laboratorního vyšetření, způsobu stravování, hygienické úrovni stravování a v neposlední řadě pak v rozdílnosti evidence a hlášení (Nečesánková, 2005).

Obrázek 6: Počet případů onemocnění způsobené bakteriemi rodu *Campylobacter* a *Salmonella* v ČR v letech 2001 až 2010.



Upraveno podle: SZÚ, 2011.

Historie

Kampylobakterie byly původně popsány jako zvířecí patogeny a byly zařazeny do rodu *Vibrio*. Teprve až v roce 1957 byl v krvi pacienta nalezen druh, který sice morfologicky odpovídal druhu *V. fetus*, který se s *C. jejuni* zaměňoval, ale jenž se odlišoval svými biochemickými a antigenními vlastnostmi. Tento nový druh byl pak označen termínem „*related vibrio*“ (Hochel, 2009).

Počet infekcí prokazatelně způsobených touto bakterií byl vzhledem k nedostatečně účinným izolačním technikám až do začátku 70. let nízký. Prudký nárůst kampylobakterióz byl zaznamenán od konce 90. let minulého století až do roku 2005 (Hochel, 2009).

Taxonomie

Campylobacter jejuni spadá do čeledi *Campylobacteraceae*, která zahrnuje tři rody: *Campylobacter*, *Arcobacter* a rod *Sulfurospirillum* (Hochel, 2009).

Samotný rod *Campylobacter* je tvořen 18 více či méně genotypicky homologními druhy, přičemž 11 z nich je pro člověka patogenní (Moore et al., 2005; Hochel, 2009). Mezi nejdůležitější patogeny řadíme *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter fetus*, za původce gastroenteritid přenášených potravinami jsou považovány *C. jejuni*, *C. coli*, *C. laridis* a *C. upsaliensis* (Jičínská & Havlová, 1995; Moore et al., 2005).

Výskyt a zdroje kontaminace

Kampylobakterie se běžně nacházejí ve zdravých domácích a divokých zvířatech, včetně skotu, ovcí, koz, prasat, kuřat, kachen, hus, volně žijících ptáků, psů, koček, hlodavců a mořských savců. Hojně se také vyskytují v přirozených vodních tocích (Altekruse, 1999). Bakterie obvykle žijí ve střevech zvířete, aniž by způsobily některý z klinických příznaků, ovšem je znám jeden druh, který může u hospodářských zvířat vyvolat potrat (Rees et al., 1995).

Ke kontaminaci syrového mléka patrně dochází buď nepřímo – při dojení fekálním znečištěním z prostředí, nebo přímo – z kampylobakteriových zánětů vemene (Jičínská & Havlová, 1995).

Vzhledem k faktu, že jsou kampylobaktery velice citlivé na vyschnutí, nevyskytují se v sušených potravinách – sušeném mléce, vejcích a zelenině. Nenajdeme je ani v potravinách se zvýšenou koncentrací soli nebo cukrů (Jičínská & Havlová, 1995).

Jako významný zdroj kontaminace je kromě jatečné drůbeže uváděna i hygienicky závadná provozní voda (Jičínská & Havlová, 1995; Altekruse, 1999).

Morfologie, fyziologie, biochemie

Buňky většiny druhů kampylobakterií jsou spirálovité nebo zakřivené gramnegativní tyčinky o rozměrech 0,2 - 0,8 x 0,5 - 5 μ m, které mohou vytvářet jednu nebo více smyček (Hochel, 2009). Ve starých kulturách nebo v nepříznivých podmínkách přecházejí spirálovité buňky na kokoidní formu, tzv. „životaschopné nekultivatelné formy“, které po přeočkování nerostou na běžných půdách (Jičínská & Havlová, 1995; Hochel, 2009). K těmto morfologickým změnám dochází pravděpodobně v důsledku enzymové degradace peptidoglykanové vrstvy (Hochel, 2009).

Kampylobakterie netvoří spory. Většina druhů je pohyblivá, a to prostřednictvím polárního bičíku na jednom nebo obou koncích buňky, některé jsou nepohyblivé, např. *C. gracilis* (Hochel, 2009).

Jedná se o chemoorganotrofní mikroorganismy, které nejsou schopny fermentovat ani oxidovat sacharidy. Nerozkládají přírodní makromolekuly (proteiny, tuky, polysacharidy), což odpovídá jejich velmi malému genomu (Jičínská & Havlová, 1995; Hochel, 2009).

Bakterie rodu *Campylobacter* dobře přežívají chlazení či mrazení, nicméně nesnáší vyschnutí či prostředí o koncentraci 1,5 – 2% NaCl. Dále jsou citlivé k většině desinfekčních látek včetně chlorových preparátů, proto je vhodné chlorovat pitnou vodu (Jičínská & Havlová, 1995; Altekruše, 1999).

Kampylobakteriíza

Onemocnění způsobené *Campylobacter spp.* probíhá nejtypičtěji jako enteritida v klinických projevech shodná s jinými infekcemi bakteriálního původu. Průběh nemoci je ovlivněn virulencí kmene, infekční dávkou a vnímavostí pacienta. Na rozdíl od salmonelóz je u kampylobakterových infekcí patrný časný letní vrchol (Hrubý, 2005; Hochel, 2009).

Ačkoliv vlastní onemocnění není obvykle život ohrožující, závažnější jsou komplikace popř. postinfekční následky, jako je masivní střevní krvácení, hepatitida, pankreatitida, potrat, Reiterův syndrom a Guillain – Barré syndrom (GBS) (Hochel, 2009). Úmrtí z kampylobakteriové infekce jsou vzácná (Altekruše, 1999).

GBS je zánětlivá polyneuropatie způsobující neuromuskulární paralýzu. Klinicky se syndrom projevuje smyslovými poruchami, bolestí, rychle postupující slabostí dolních a horních končetin, ochabnutím dýchacích svalů, popř. svalovou paralýzou (Hochel, 2009). Odhaduje se, že jeden případ GBS připadá na každých 1.000 případů kampylobakteriízy (Altekruše, 1999).

Virulencním faktorem je flagelární adhezín, který zprostředkuje připoutání bakterií k buňkám střevního epitelu a kolonizaci střevní sliznice. Také hlavní imunogen buněčné stěny, membránový porin (MOMP) se pravděpodobně uplatňuje jako virulencní faktor (Jičínská & Havlová, 1995).

Vstupní bránou infekce je trávicí ústrojí. Prokázalo se, že k infekci zapříčiněné tekutinami (mléko, voda) stačí dávka 500 buněk. Zpočátku se kolonizuje lačník a kyčelník, infekce se později šíří kyčelníkem dále do tlustého střeva a konečníku. Mikrobi jsou invazivní. Při rozvinuté infekci jsou lymfatické uzliny zvětšené, prosáklé a zanícené (Hrubý, 2005).

3.4. *Escherichia coli* O157:H7

Hygienický význam

Escherichia coli je součástí normální střevní mikroflóry člověka a teplokrevných zvířat (Jičínská & Havlová, 1995; Wasteson, 2002; Marler², 2007). Jejím hlavním rezervoárem v prostředí prvovýroby je zažívací trakt a stolice hospodářských zvířat, proto výskyt tohoto mikroorganismu v provoze, mléce či mléčných výrobcích ukazuje na špatnou úroveň hygieny a sanitace (Jičínská & Havlová, 1995).

Bakterie hraje důležitou roli také v moderním biologickém inženýrství a průmyslové mikrobiologii. Nejenže je stále používána jako modelový mikroorganismus, dokonce se stala základem biotechnologií. Modifikované *E. coli* byly již použity při výrobě vakcíny či imobilizovaných enzymů, novinkou není ani produkce lidského inzulinu.

V posledních letech však získávají na významu hlavně enterohemoragické kmeny *E. coli*, které nejenže jsou schopny způsobit závažné onemocnění, ale jejich toxin může být (dle CDC - Centers for Diseases Control and Prevention) zneužit jako bioteroristický agens. Jedná se totiž o velice silný toxin, kdy k infekci postačí méně než 50 buněk (Marth & Steele, 2001; Marler², 2007).

Historie

Bakterie byla poprvé popsána v roce 1885 německým bakteriologem Theodorem Escherichem, od kterého získala název *Coli commune* (Marth & Steele, 2001; Wasteson, 2002; Todar², 2009).

Až do první poloviny 20. století byl mikroorganismus víceméně považován za obyčejného komenzála ve střevním traktu lidí a zvířat. Teprve v pozdějších letech se prokázalo, že sérologicky odlišné „enteropatogenní“ kmeny jsou zodpovědné za průjmy a jiné extraintestinální choroby, jako jsou urogenitální infekce, mastitidy, septikémie či meningitidy (Marth & Steele, 2001; Wasteson, 2002).

Potravinářským patogenem byla *E. coli* uznána až v roce 1982 v souvislosti s vyšetřováním hemoragické kolitidy, spojené s konzumací kontaminovaných hamburgerů. V následujícím roce byl označen i skutečný viník – Shiga toxin (STX) – produkováný *E. coli* O157:H7 (Marler², 2007).

Taxonomie

Escherichia coli je rod střevních fakultativně anaerobních bakterií spadajících do rozsáhlé čeledi *Enterobacteriaceae*, kam mimo *E. coli* řadíme také další střevní patogeny – rod *Salmonella*, *Shigella* a *Yersinia* a kolonisty lidského gastrointestinálního traktu – rod *Enterobacter* či *Klebsiella* (Todar², 2009).

Patogenní kmeny *E. coli* lze odlišit sérologickou typizací (O, H a K antigeny), biochemickými vlastnostmi a testy na patogenitu (Hrubý, 2005).

Dle průběhu onemocnění, vlastností, zastoupení faktorů virulence, účinku na buněčné kultury a sérologické typizace je popisováno pět hlavních skupin patogenních *E. coli* (Jičínská & Havlová, 1995):

- 1) ETEC enterotoxigenní *E. coli*
- 2) EIEC enteroinvazivní *E. coli*
- 3) EPEC enteropatogenní *E. coli*
- 4) EAaggEC enteroagregativní *E. coli*
- 5) STEC enterohemoragické *E. coli* (VTEC, EHEC)

Výskyt a zdroje kontaminace

Hlavní zásobárnou kmenů EHEC je střevní trakt přežvýkavců, zejména skotu a ovcí. Některé sérotypy byly však také nalezeny u prasat, volně žijících ptáků, koní, psů a koček (Jičínská & Havlová, 1995; Hocking, 1997; Bolton, 2009).

V různých terénních průzkumech obsahovalo 3-30% vzorků stolice zdravého skotu (telata, krávy, buvoli) *E. coli* O157:H7, ale i jiné verotoxigenní sérotypy. Stejně tak byla *E. coli* O157:H7 izolována ze stolice zdravých dojníc, jejichž mléko u konzumentů způsobilo hemolyticko - uremický syndrom (HUS) (Jičínská & Havlová, 1995).

Zvířecí bacilonosiči i nemocná zvířata kontaminují prostředí, v němž se *E. coli* ve vhodných lokalitách dále saprofytický pomnožuje. Z těchto zdrojů pak infikuje další zvířata. Mléko může být kontaminováno z vemen znečištěných hnojem infikovaným EHEC nebo i přímým vylučováním bakterií do mléka z mastitid, způsobovaných *E. coli* (Jičínská & Havlová, 1995).

V souvislosti s kmenem EHEC, byla zaznamenána pestrá škála kontaminovaných potravin. Rizika jsou spojená s konzumací hamburgerů, syrového mléka, zeleniny, ovoce, salátů, nepasterizované jablečné šťávy či vody (Doyle et al., 1989).

Morfologie, fyziologie, biochemie

Escherichia coli jsou gramnegativní nesporulující tyčinky se zaoblenými konci o rozměrech 1,1 - 1,5 µm x 2,0 - 6,0 µm, jež se mohou vyskytovat jednotlivě, ve dvojicích nebo v krátkých řetězcích (Marth & Steele, 2001; Hrubý, 2005). Na povrchu mají různé typy fimbrií, z nich jedny jsou zastoupeny ve velkém počtu na povrchu bakteriální buňky a umožňují adhezi na hostitelskou buňku, další – sex pili, jsou přítomny v menším počtu a napomáhají konjugaci. Některé typy *E. coli* tvoří pouzdra a jejich kolonie mají hlenovitý charakter (Dos Reis, 2010).

Buňky jsou fakultativně anaerobní a biochemicky aktivní (Hrubý, 2005). *E. coli* fermentují glukózu a laktózu s tvorbou kyseliny (mléčné, octové, mravenčí) a plynu (CO₂, H₂), fermentují D-sorbitol (93%) a indol (95%) (Marth & Steele, 2001).

Onemocnění

Ač do skupiny EHEC řadíme více než 80 sérotypů, např. O26, O48, O111, O113, O121, O145 a O157, největší pozornost je stále věnována sérotypu O157:H7, který údajně způsobuje 50-80% všech infekcí způsobených EHEC kmeny (Marth & Steele, 2001).

EHEC jsou uznávány jako primární příčina slabého průjmu, hemoragické kolitidy (HC), HUS a trombotické trombocytopenické purpury (TTP).

Výskyt infekcí EHEC se liší podle věkových skupin. Nejvyšší incidence hlášených případů se vyskytují u dětí ve věku do 15 let, přičemž za 63 až 85% případů zodpovídají kontaminované potraviny (WHO, 2010).

Hlavním faktorem virulence je shiga toxin, který se skládá ze dvou rodin – stx1 (homogenní skupina toxinů totožné s Shiga toxinem) a stx2 (heterogenní skupina) (Doyle et al., 1989). Shiga toxiny katalyticky inaktivují 60S ribozomální podjednotky eukaryotických buněk, čímž blokují translaci mRNA a způsobují tak smrt buňky. Dalším důležitým faktorem je enterohemolyzin (Marth & Steele, 2001).

Hemoragická kolitida (HC)

Inkubační doba bývá 3-5 dní a doba onemocnění 2-9 dní. HC je charakterizována lokalizací změn v tlustém střevě, což má za následky silné břišní bolesti, vodnatý a později krvavý průjem, popř. i mírnou horečku (WHO, 2010).

Hemolyticko – uremický syndrom (HUS)

Lze charakterizovat třemi termíny - selhání ledvin, hemolytická anémie a trombocytopenie (= snížené množství krevních destiček). Nemoc se rozvíjí u 2-7 % pacientů, zejména u dětí (Hocking, 1997). Celkově lze konstatovat, že HUS je nejčastější příčinou akutního selhání ledvin u malých dětí (WHO, 2010).

Mortalita se pohybuje kolem 3-10%, avšak až u 30 % se mohou vyskytnout vážné následky (např. hypertenze nebo poruchy centrální nervové soustavy - CNS).

Trombotická trombocytopenická purpura (TTP)

Je onemocnění vznikající zejména u starších lidí. Klinicky je podobné HUS, ovšem přibývají další dva příznaky - horečka a poruchy CNS (Hocking, 1997).

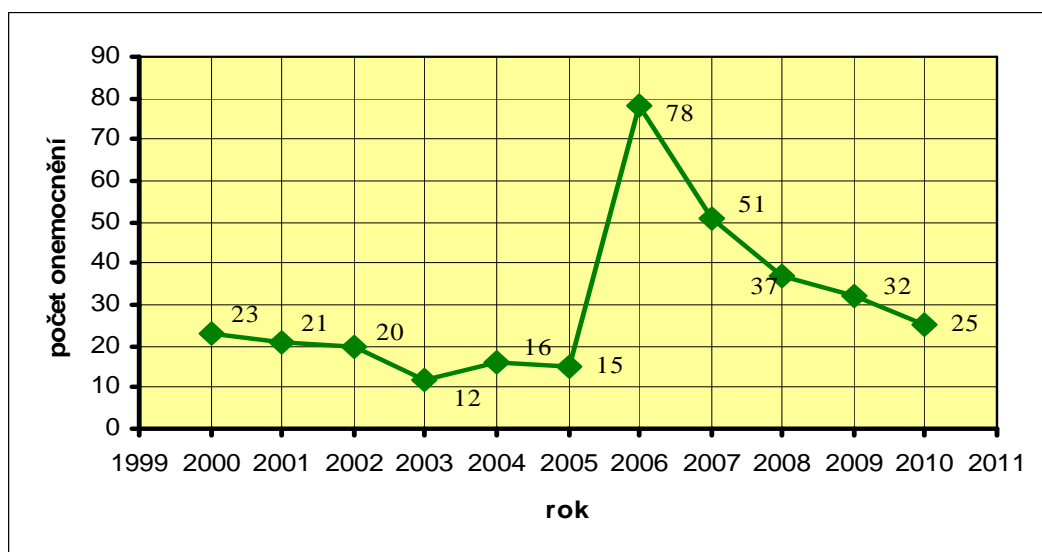
3.5. *Listeria monocytogenes*

Hygienický význam

Listeria monocytogenes je obávaným patogenním mikroorganismem, který nejčastěji kontaminuje mléčné a masné výrobky (Blažková et al., 2007). Jedná se o patogen, který se jakožto původce alimentárního onemocnění uplatňuje teprve od roku 1980 (Gellin & Broome, 1989; Jičínská & Havlová, 1995). Přehled výskytu listeriózy v letech 2000-2010 je uveden na obrázku 7.

V průmyslově vyspělých zemích jsou listeriózy příčinou jen asi 0,5 – 1% všech hromadných alimentárních infekcí a intoxikací mikrobiálního původu, mají však mezi těmito nemocemi zcela nesporné prvenství v procentu mortality, které se odhaduje až na 30 % úmrtí z celkového počtu onemocnění (Hrubý, 2005, Blažková et al., 2007).

Obrázek 7: Přehled výskytu onemocnění v letech 2000 – 2010 v ČR (SZÚ, 2011)



Historie

Již na začátku minulého století byla popsána lidská onemocnění, jejichž klinická symptomatologie odpovídala obrazu listeriové infekce. Mikroorganismus byl izolován v roce 1926 u epizootie pokusných králíků v Cambridge a získal název *Bacterium monocytogenes*. Ve 40. letech 20. století byla pak tato bakterie vyvolávající onemocnění zvířat i lidí nazvána na počest anglického chirurga Josepha Listera (Gellin & Broome, 1989; Jančová & Škapová, 2007).

Vědci se dlouho domnívali, že se v případě listeriózy jedná o zoonózu, tj. nemoc přenosnou z živočichů na člověka. Až v 80. letech 20. století bylo zjištěno, že jde o nákazu alimentární, způsobenou kontaminovanými potravinami (Jančová & Škapová, 2007).

Taxonomie

Rod *Listeria* náleží do čeledi *Listeriaceae* a je tvořen sedmi druhy, které lze rozdělit do dvou skupin genomicky příbuzných druhů (Gellin & Broome, 1989; Bednář et al., 1996; Hrubý, 2005).

Do první skupiny jsou řazeny druhy *L. monocytogenes*, která je podmíněným patogenem pro lidi i zvířata, *L. ivanovii*, vyvolávající převážně onemocnění u ovcí a jen výjimečně onemocnění u lidí, *L. seeligeri*, saprofytický druh, který byl jen ojediněle prokázán jako vyvolavatel lidské listeriózy a *L. innocua* a *L. welshimeri*, jejichž patogenita je prakticky nulová.

Druhou skupinu tvoří *L. grayi* a *L. murrayi*, které jsou rozšířeny v přírodě, ale onemocnění nevyvolávají (Bednář et al., 1996).

Na základě O- a H- antigenů řadíme listerie do sérotypů. Bylo popsáno více než 16 sérotypů, avšak pouze tři z nich jsou odpovědné za více než 90% onemocnění člověka (Gellin & Broome, 1989; Jančová & Škapová, 2007).

Výskyt a zdroje kontaminace

L. monocytogenes je ubikvitární mikroorganismus, jenž je v přírodě hojně rozšířen. Byl objeven v prachu, půdě, vodě, na rostlinách, v kanalizaci, hnoji, krmivech, ale také ve střevním traktu volně žijících zvířat. Je známou příčinou nákazy u ovcí a skotu a dalších 42 druhů savců a 17 druhů ptáků. Také byl izolován z koryšů, pstruhů, klíšťat a much (Gellin & Broome, 1989).

Za nejdůležitější zdroj infekce hospodářských zvířat jsou považovány nedostatečně prokysané siláže, méně časté je pak vylučování listerií do mléka při chronických mastitidách (Jičínská & Havlová, 1995).

Morfologie, fyziologie a biochemie

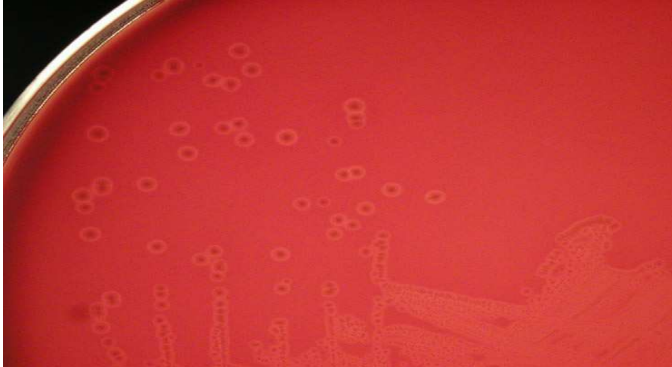
Listeria monocytogenes je grampozitivní, krátká, rovná tyčinka o velikosti 0,4 - 0,5 x 0,5 - 2 μm , s paralelními stranami a zakulacenými konci, vyskytující se jednotlivě nebo v krátkých řetězcích. Při teplotách 20 – 25 °C je pohyblivá, zatímco při teplotách vyšších nikoliv (Dongyou, 2008).

Netvoří pouzdra ani spory a ve starších bujónových kulturách se vyskytuje ve formě vláken (Jančová & Škapová, 2007). Je fakultativně anaerobní, fermentuje cukry na kyselinu mléčnou a produkuje degradativní exoenzymy. Je kataláza pozitivní (Jičínská & Havlová, 1995).

Všechny rody *Listeria* jsou morfologicky podobné, rostou na nutričně bohatých neselektivních médiích, na kterých tvoří kolonie průměru 0,5 – 1,5 mm, průsvitné, kapičkového tvaru, šedomodré s hladkým povrchem, zatímco starší kultury (3-7 dní) vytvářejí kolonie větší, v průměru 3-5 mm, neprůsvitné a mnohdy s drsným povrchem (Dongyou, 2008). Kolonie *L. monocytogenes* na MPKA je znázorněna na obrázku 8.

Obrázek 8: Kolonie *L. monocytogenes* na MPKA v procházejícím světle s částečnou hemolýzou

(http://fv1.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/praktikum07/index.html).



L. monocytogenes jsou schopné přežít v drsných podmínkách, jako je extrémní teplota, vysoká hladina soli či široké rozmezí pH (3-9,5). Pokusy dokazují, že mohou přežít i v 25% NaCl, 20 dní v suchém prostředí (ač jinak jim plně vyhovují potraviny s vodní aktivitou větší jak 0,92) a 6 dní v destilované vodě (Blažková et al., 2005).

Listerióza

Je závažné onemocnění, které v mnoha případech probíhá bezpříznakově. Zvláště nebezpečná je u rizikových skupin, mezi něž řadíme imunodeficitní pacienty (u osob s onemocněním AIDS se listerióza vyskytuje až 300 x častěji než u lidí s normálním imunitním systémem), starší osoby, děti a těhotné ženy (Jančová & Škapová, 2007).

Cesta přenosu je nejčastěji alimentární, nicméně jsou známy případy nakažení se z životního prostředí či kontaktem s postiženým zvířetem. Výskyt infekce stoupá s věkem, průměrný věk nakaženého jedince je 55 let a častěji postihuje muže (Dongyou, 2008).

Ke klinickým příznakům patří gastroenteritidy, avšak po překonání bariéry tenkého střeva je listerie schopna proniknout lymfatickou a krevní cestou do sleziny a jater a vyvolat septikémie, meningitidy a meningoencefalitidy. Protože je listerie schopna překonávat i bariéru placentární, může vyvolat potrat nebo infikovat plod (Jančová & Škapová, 2007).

3.6. *Staphylococcus aureus*

Hygienický význam

Staphylococcus aureus je uváděn jako jeden z nejvýznamnějších a nejčastějších patogenů způsobujících alimentární intoxikace (Loir et al., 2003; Hrubý, 2005). Obecně se tato intoxikace považuje za mírné onemocnění, které po určité době samo vymizí. Úmrtnost je nízká, uvádí se však, že asi 14% postižených osob vyžaduje hospitalizaci.

Tato bakterie produkuje řadu virulenčních faktorů. Mimo nejznámějšího stafylokokového enterotoxinu se na virulenci podílí nejméně 8 dalších toxinů a řada enzymů, přičemž právě některé z nich se používají v identifikačních testech kultivačních metod k potvrzení příslušnosti izolátů *S. aureus* (Jičínská & Havlová, 1995).

Historie

Přestože se zprávy o případech onemocnění, připomínající současné stafylokokové otravy, datují již k roku 1830, byla bakterie popsána až v roce 1880 lékařem Alexandrem Ogstonem, jenž ji izoloval z hnisu abscesů. Od něj také pochází název *Staphylococcus*, což vzniklo spojením dvou řeckých slov; *staphyle* (= hrozen) a *kok* (= bobule) (Doyle et al., 1989; Marth & Steele, 2001; Murray et al., 2005).

Až do roku 1884 nebyl však *Staphylococcus aureus* pokládán za původce alimentárních intoxikací (Marth & Steele, 2001).

Taxonomie

Rod *Staphylococcus* náleží do čeledi *Staphylococcaceae*, která zahrnuje ještě tři méně známé rody *Gemella*, *Macrococcus* a *Salinicoccus* (Murray et al., 2005; Todar⁴, 2009).

V současné době zahrnuje rod *Staphylococcus* 32 známých druhů bakterií, z nichž většina je nepatogenní a tvoří součást přirozené mikroflóry kůže a sliznic člověka a zvířat (Doyle et al., 1989; Marth & Steele, 2001). Jako patogen v hygieně potravin se uplatňuje pouze druh *Staphylococcus aureus*, avšak nálezy z posledních let naznačují, že i některé další druhy (např. *S. hyicus* a *S. intermedius*) produkují enterotoxiny a způsobují mastitidy (Jičínská & Havlová, 1995).

Výskyt a zdroje kontaminace

S. aureus je komenzál teplokrevných živočichů a člověka. Nalézá se na sliznicích dýchacího ústrojí, především v nosní a ústní dutině, ale také na kůži (Jičínská & Havlová, 1995). Při rutinním vyšetření lze patogen prokázat v horních dýchacích cestách u 20-50% osob, přičemž jedna třetina této pozitivní populace patří k trvalým a zbylé dvě třetiny k dočasným nosičům (Krménčík & Kysilka, 2001b; Murray et al., 2005).

Jedná se o ubikvitární mikroorganismus, který lze nalézt nejen ve vodě, půdě, krmivech a povrchu rostlin, ale také v prachu, což je mnohdy důsledek kontaminace nástrojů a technologických zařízení (Jičínská & Havlová, 1995; Hrubý, 2005). Je také přirozenou součástí mikroflóry vemene (Jičínská & Havlová, 1995).

Hlavním rezervoárem kontaminace syrového mléka jsou klinické a subklinické mastitidy skotu, ovcí a koz (Jičínská & Havlová, 1995; Marth & Steele, 2001). Odhady z různých industrializovaných zemí uvádějí cca 5-26% výskytů mastitid ve stádech. V mléce postižených dojnic je *S. aureus* vylučován v hojných počtech, cca 10^8 /ml v mléce z klinických a 10^{3-4} /ml ze subklinických případů (Jičínská & Havlová, 1995).

Mléko a mléčné výrobky jsou spojovány se stafylokokovými otravami více než 100 let. Nejčastěji je to právě syrové mléko, poté zmrzlina, kondenzované a pasterované mléko a sýry (Marth & Steele, 2001). Mezi další náchylné potraviny lze zařadit syrové maso, masné a lahůdkářské výrobky, drůbež a výrobky z vajec a pekařské výrobky (smetanou plněné pečivo) (Loir, 2003).

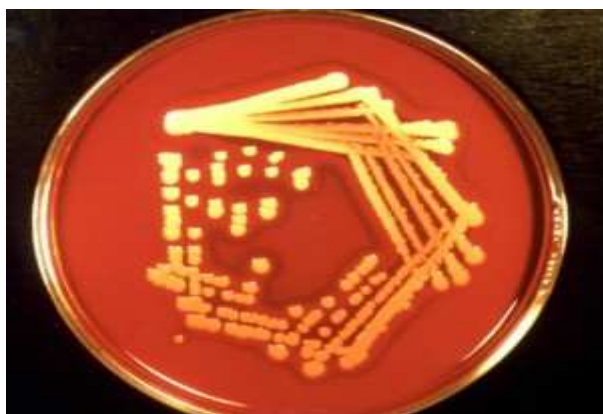
Morfologie, fyziologie, biochemie

S. aureus je grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporulující bakterie, přesto poměrně odolná vůči vlivům zevního prostředí (Levison, 2008). Nepohyblivé buňky o průměru 0,5-1 μm jsou uspořádány do charakteristických hroznů (Krménčík & Kysilka, 2001b; Levison, 2008) nebo se vyskytují jednotlivě či ve dvojicích (Marth & Steele, 2001; Hrubý, 2005). Bakterie je halotolerantní, až mírně halofilní, roste dobře ještě při koncentraci 10% NaCl, rovněž je osmotolerantní.

Z biochemického hlediska je mikroorganismus kataláza pozitivní a oxidáza negativní (Doyle et al., 1989; Marth & Steele, 2001; Todar⁴, 2009). Více než 90 % kmenů *S. aureus* tvoří na neselektivních půdách pigmentované kolonie, jejichž

zbarvení může být od smetanové žluté až po oranžovou, proto je organismus známý také jako zlatý staph či Oro staphira (Jičínská & Havlová, 1995; Kluytmans et al., 1997; Marth & Steele, 2001). Kolonie *S. aureus* na krevním agaru jsou zobrazeny na obrázku 9. Za zbarvení je odpovědný karotenoid staphyloxanthin, který mimo jiné plní funkci antioxidantu (Kluytmans et al., 1997).

Obrázek 9: Kolonie *S. aureus* na krevním agaru (po 48 hodinách) s úzkou zónou β -hemolýzy (www.medmicro.info)



S. aureus se řadí mezi biochemicky neaktivnější bakteriální druhy. Produkuje řadu komplexních látek buněčné stěny, exoenzymů a toxinů, z nichž mnohé se uplatňují jako faktory virulence. Mezi významné extracelulární proteiny můžeme zařadit enterotoxiny, leukocidin (Pantén-Valentinův toxin), plasmokoagulázu a toxin toxického šokového syndromu. Mimo samotných extracelulárních proteinů působí značně antigenně i samotná buněčná stěna této bakterie (Krménčík & Kysilka, 2001b).

Onemocnění

Staphylococcus aureus je podmíněný patogen, přítomný v nose a na kůži. Infikuje nejčastěji místa se sníženou rezistencí, například poškozenou kůži, sliznice nebo hematomy v měkkých tkáních (Hrubý, 2005).

V závislosti na faktorech virulence může bakterie způsobit řadu onemocnění od drobných kožních infekcí, jako jsou pupínky, vředy, syndrom opařené kůže nebo abscesy, až po život ohrožující onemocnění jako je zápal plic, meningitida, osteomyelitida, endokarditida, syndrom toxického šoku (TSS), bakteriémie a sepsy (Salysers & Whitt, 2002). Opomenout nesmíme ani stafylokokové otravy jídlem, ač

jsou způsobené pouze jedním jediným faktorem virulence a to stafylokokovým enterotoxinem (Loir, 2003).

Bakterie je přenášena prostřednictvím aerosolu nebo přímým kontaktem s kontaminovanými předměty či infikovanými zvířaty a lidmi (Blackmore & Francis, 1970).

1) Stafylokokové intoxikace

S. aureus způsobuje otravu, která se projevuje zvracením a průjmem, v těžších případech také bolestmi hlavy a svalovými křečemi. Většinou se jedná o lehčí onemocnění, které obvykle samo odezní během 24 hodin a nevyžaduje léčení (Hrubý, 2005).

Příčinou intoxikace je stafylokokový enterotoxin (SE), který produkují toxigenní kmeny. Existuje 14 sérologicky odlišných enterotoxinů, ale otravy nejčastěji způsobují sérotypy A a D. Enterotoxiny jsou jednořetězcové termostabilní proteiny o relativně nízké molekulové hmotnosti (26-28kDa), rozpustné ve vodě. Nejsou inaktivovány pasterací a jsou rezistentní k proteolytickým enzymům zažívacího traktu i k proteázám mléčných bakterií a proto mohou velice dlouho setrvávat v zakysaných výrobcích (Jičínská & Havlová, 1995).

2) Stafylokokové infekce

S. aureus je oportunní patogen, který způsobuje zánětlivá onemocnění u lidí i zvířat. Pro hygienu potravinářské výroby jsou důležité dva typy těchto zánětlivých onemocnění: mastitidy dojnic a hnisavé záněty drobných poranění na lidských rukách, které nejsou dostatečně ošetřeny a izolovány od předmětů, s nimiž ruce přicházejí do styku. Tyto infekce obsahují vysoké koncentrace virulentních stafylokoků, které se z ložiska velmi snadno uvolňují pouhým dotekem a přenášejí se do prostředí (Jičínská & Havlová, 1995).

Stafylokokové mastitidy jsou hlavním zdrojem kontaminace syrového mléka virulentním *S. aureus*. Tvorba SE není pro vznik stafylokokových infekcí nutná (Hrubý, 2005).

3.7. *Yersinia enterocolitica*

Hygienický význam

Yersinia enterocolitica patří mezi významné původce gastroenteritid přenosných převážně potravinami. Podle různých statistik se v posledních letech podílí na 1-2 % případů gastroenteritid v průmyslově vyvinutých státech (Hrubý, 2005).

Onemocnění způsobené touto bakterií se nejčastěji objevuje na přelomu podzimu a zimy a bývá většinou sporadické, nicméně poměrně hojně jsou hlášeny i hromadné intoxikace (Huovinen et al., 2010).

Historie

Yersinia enterocolitica, původně *Bacterium enterocoliticum*, *Pasteurella pseudotuberculosis* typu *b* či *Pasteurella X*, byla poprvé izolována roku 1939 z případů gastroenteritid, avšak celých dalších třicet let nebyly registrovány případy onemocnění po požití potravin (Jičínská & Havlová, 1995). Jako důležitý lidský enteropatogen byla uznána až koncem 60. let (Shiemann, 1987).

Taxonomie

Rod *Yersinia* náleží do čeledi *Enterobacteriaceae* a zahrnuje 11 druhů, z nichž tři jsou patogenní pro člověka: *Y. enterocolitica* (O:3, O:5, O:8, O:9), *Y. pestis* (dýmějový mor) a *Y. pseudotuberculosis* (mezenterické adenitis) (Morris & Feeley, 1976; Marth & Steele, 2001; Hrubý, 2005).

Druh *Y. enterocolitica* zahrnuje pět biotypů, které jsou silně geograficky limitovány. V některých geografických oblastech převládají, zatímco v jiných se téměř nebo vůbec nevyskytují. V Evropě mluvíme o biotypu 4 (O:3) a biotypu 2 (O:9 a O:5,27), zatímco v USA o biotypu 1 (O:8) a v Japonsku o sérotypech O:3, O:5,25 (Jičínská & Havlová, 1995).

Výskyt a zdroje kontaminace

Yersinia enterocolitica se vyskytuje ve vodních tocích, půdě i vegetaci (Hocking et al., 1997). Primárním rezervoárem mikroorganismu jsou sice prasata, ale hojně se nachází i v různých druzích domácích, hospodářských a volně žijících zvířat (Jičínská & Havlová, 1995).

Nejčastější příčinou přenosu do mléka je zřejmě fekální znečištění při dojení nebo voda, používaná k mytí dojících aparátů a zařízení (Jičínská & Havlová, 1995; Marth & Steele, 2001).

Bakterie se běžně vyskytují v syrovém mléce i mléčných výrobcích, většinou se však jedná o nepatogenní druhy nebo nepatogenní sérotypy. Dále kontaminují pasterované mléko, sýry, chlazené potraviny, ale také zeleninu a samozřejmě výrobky z vepřového masa (Jičínská & Havlová, 1995).

Morfologie, fyziologie, biochemie

Y. enterocolitica jsou gramnegativní, nesporulující, psychrotrofní koky o rozměrech 0,5 – 0,8 µm x 1 – 3 µm. Při 25 °C jsou buňky pohyblivé, ale při teplotách vyšších jak 37 °C ztrácejí bičíky a s nimi i schopnost pohybu (Marth & Steele, 2001; Hrubý, 2005;).

Jedná se o fakultativně anaerobní mikroorganismus, jenž je biochemicky velice aktivní. Roste dobře na běžných živných půdách, v živném bujonu i v peptonové vodě. Charakteristická je pro něj fermentace glukózy. Bakterie je oxidáza negativní a nefermentuje laktózu. Také je tolerantní k žlučovým solím a k NaCl (5%) a je schopna přežít dlouhodobé zmrazení (Jičínská & Havlová, 1995).

Systém sérotypizace druhu *Y. enterocolitica* je založený na 54 tepelně stabilních O antigenech (Marth & Steele, 2001). Mezi nejdůležitější sérotypy podílející se na infekci lidí řadíme: O:3 (nejčastěji se vyskytující, asi 90%), O:9 a O:5,27 (Shiemann, 1987).

Y. enterocolitica je invazivní vnitrobuněčný parazit. Schopnost vyvolat onemocnění je vázána na četné virulenční faktory, z nichž alespoň některé jsou imunologicky i geneticky příbuzné virulenčním faktorům jiných druhů enterobakterií: např. yersiniový enterotoxin (YEST) je homologický enterotoxinu *E. coli*. Předpokládá se že právě prostřednictvím YEST, který je vysoce termostabilní a je vylučován do prostředí, může bakterie způsobit alimentární intoxikace (Jičínská & Havlová, 1995).

Onemocnění

Y. enterocolitica způsobuje onemocnění nazývané yersinióza. Existuje mnoho forem infekce v závislosti na zatížení organismu, infekční dávce, stejně tak na věku a fyzické kondici infikované osoby. Nejčastějším projevem je však gastroenteritida, která primárně postihuje děti do sedmi let (nejčastěji kojence) a seniory (Marth & Steele, 2001; NZSFA³, 2010). Obecně jsou postihováni více muži (Morris & Feeley, 1976; NZSFA³, 2010).

Druhým nejhojněji se vyskytujícím projevem yersiniózy je septikémie, která se nejčastěji vyskytuje u starších pacientů trpících základním onemocněním, jako je alkoholismus, onemocnění jater, leukémie a jiné imunosupresivní poruchy. Tato forma nemoci se vyznačuje, i přes včasnou antibiotickou léčbu, vysokou úmrtností (25-50%) (Marth & Steele, 2001; Papaioannou, 2003).

U infikovaných 5% jedinců se rozvinou sekundární komplikace, mezi něž jsou řazeny např. poruchy štítné žlázy, oční infekce, svalové abscesy, kožní infekce, pneumonie, zánět pobřišnice, meningitidu, ale také velice vzácná endokarditida (Marth & Steele, 2001; NZSFA³, 2010).

Na závěr této kapitoly uvádím klinický obraz intoxikací (viz tabulka 3) a infekcí (viz tabulka 4) způsobených požitím produktů kontaminovaných výše uvedenými mikroorganismy. Jak je patrné, jedním z nejnebezpečnějších patogenů je právě *E. coli* O157:H7, jejíž infekční dávka činí pouhých 50 buněk.

Tabulka 3: Charakteristika intoxikací způsobených významnými patogeny.

Název	Specifika	Infekční dávka (počet buněk/g či ml)	Inkubační doba *	Příznaky	Doba nemoci *	Komplikace
<i>B. cereus</i>	diarhogen. forma	10^5 - $9,5^8$ buněk/g	6-24 h	bolest břicha, vodnaté průjmy, nevolnosti, křeče v břiše	20-36 h	místní kožní infekce ran, oční infekce, selhání jater, také pneumonie, meningitida nebo endokarditida
	emetická forma	2×10^7 buněk/g	1-6 h	zvracení, křeče v břiše, průjem (u 1/3 postižených), nevolnost	8-10 h	
<i>E. coli</i> O157:H7		< než 50 bakterií, postačí i 2 buňky/25 g	3-8 d	průjem (mnohdy krvavý), silné křeče a zvracení	2-9 d	hemoragická kolitida, hemolyticko-uretický syndrom.
<i>S. aureus</i>	intoxikace	1-100 mg enterotoxinu,	1-7 h	zvracení, průjem, bolesti hlavy, svalové křeče	1-2 d	abscesy, zápal plic, syndrom toxického šoku, sepse, bakteriémie
	infekce		několik h až 2 dny			moč. infekce, endokarditidy, meningitidy, pneumonie, syndrom opařené kůže

Upraveno podle: Doyle et al., 1989; Jičínská & Havlová, 1995; Hocking, 1997; Kolář, 2001; Krmenčík & Kyselka, 2001a; Marth & Steele, 2001; Louisiana Office of Public Health, 2004; NZSFA¹, 2010.

Tabulka 4: Charakteristika infekcí způsobených významnými patogeny.

Název	Infekční dávka (buněk/g či ml)	Inkubační doba *	Příznaky	Doba nemoci *	Komplikace
<i>C. jejuni</i>	10 ² -10 ³ bakterií, u tekutin 500 buněk	2-5 d	horečka, bolesti břicha, průjem	do 7 d	krvácení střev, hepatitida, potrat, Reiterův syndrom a Guillain – Barré syndrom
<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁸ buněk, u rizikových skupin 10 ² -10 ³	3-70 d, nejčastěji 3 týdny	malátnost, bolesti hlavy, horečka, také záněty středního ucha či močových cest	2-6 týdnů, dle typu nemoci	zánět měkkých blan mozku, sepse, potrat
<i>S. enteritidis</i>	10 ⁵ -10 ⁸ buněk	8-72 h	horečka, zimnice, zvracení, průjem, bolesti svalů, kloubů a hlavy	2-5 d	bakteriémie, lokalizované infekce-meningitida, endokarditida
<i>Y. enterocolitica</i>	10 ⁹ bakterií	24-72 h	průjem, silné bolesti břicha, žaludeční křeče	1-3 d	septikémie, poruchy štítné žlázy, oční infekce, svalové abscesy, kožní infekce, pneumonie, zánět pobřišnice, meningitida, endokarditida

Upraveno podle: Doyle et al., 1989; Jičínská & Havlová, 1995; Hocking, 1997; Krměčík & Kyselka, 2001b; Marth & Steele, 2001; Nečesánková, 2005; NZSFA³, 2010.

* inkubační doba v hodinách, délka nemoci ve dnech, není-li uvedeno jinak

4. OSTATNÍ PATOGENY

Tato kapitola byla rozdělena do dvou částí. První vypovídá o patogenech, jež byly velice významné především v minulosti a jejichž výskyt je v dnešní době potlačen. Četná zdravotní rizika byla spojená zejména s tyfem a spálou a v neposlední řadě také s brucelózou, od níž je Česká republika prostá již od roku 1964 (Marth & Steele, 2001; Sedlák & Tomšíčková, 2006).

Druhá část kapitoly poskytuje stručnou charakteristiku méně častých mikroorganismů, o nichž je prokázáno, že se také mohou přenášet potravinářskými surovinami nebo výrobky a způsobit onemocnění. Z epidemiologického hlediska mají poměrně malý význam, nicméně z pohledu klinického jsou důležité jako příčiny – mnohdy velmi těžkých – chorob. Do této části je řazen také rod *Salmonella*, ač se v celosvětovém měřítku nachází mezi nejčastějšími původci alimentárních onemocnění. V mléce se však vyskytuje zřídka, což bylo důvodem k zařazení do této části.

4.1. Historicky významné mikroorganismy

4.1.1. *Brucella spp.*

Taxonomie

Rod *Brucella* náleží do čeledi *Brucellaceae* a v dnešní době zahrnuje šest druhů, přičemž druhy *B. abortus* a *B. melitensis* jsou na světě nejrozšířenější a představují potenciální problém pro mlékárenský průmysl (Jičínská & Havlová, 1995; Bednář, 1996; Marth & Steele, 2001; Mantur et al., 2007).

Výskyt a zdroje kontaminace

Za hlavní zdroj kontaminace je považováno syrové kravské a kozí mléko. V infikovaných stádech mohou brucely přetrvávat ve vemenech krav mnoho let po potratu a jsou schopné vylučovat až 15000 organismů v mililitru mléka po dobu pěti měsíců. Mezi další, již méně významné zdroje, pak řadíme smetanu, sýr a jogurty (Marth & Steele, 2001).

V industrializovaných zemích byla brucelóza v chovech dobytka prakticky zlikvidována a hromadná onemocnění brucelózou, způsobená mlékem nebo mléčnými výrobky, se vyskytují jen ojediněle, avšak v zemědělských oblastech rozvojových zemí je brucelóza dosud velmi rozšířena (Jičínská & Havlová, 1995).

Jedná se o klasickou antropozoonózu, která se přenáší prostřednictvím přímého nebo nepřímého kontaktu s infikovanými zvířaty, požitím nakažených potravin nebo vdechnutím aerosolu (Marth & Steele, 2001; Mantur et al., 2007).

Morfologie, fyziologie, biochemie

Mikroorganismy rodu *Brucella* jsou gramnegativní, nepohyblivé kokobacily o rozměrech 0,6 – 1,5 μm x 0,5 – 0,7 μm , jež se vyskytují jednotlivě, ve dvojicích nebo krátkých řetězcích (Jičínská & Havlová, 1995; Bednář, 1996; Marth & Steele, 2001). Jsou rezistentní k vyschnutí a proto si velmi dlouho udržují životaschopnost v infikovaném prostředí (Jičínská & Havlová, 1995).

Od většiny ostatních patogenů se odlišují nepřítomností zjevných faktorů virulence, jako jsou tobošky, fimbrie, bičíky, exotoxiny, cytolysiny, lyzogenní fágy, plastidy či geonomové ostrovy (Mantur et al., 2007).

Členové rodu jsou nutričně nároční a z biochemického hlediska kataláza pozitivní, oxidáza pozitivní a metabolicky oxidativní. Růst je anaerobní, ale některé kmeny navíc vyžadují 5-10% CO_2 v atmosféře (Jičínská & Havlová, 1995; Marth & Steele, 2001).

Onemocnění

Brucella spp. je intracelulární bakterie, která má jedinečnou schopnost napadat i fagocytující buňky. Mikroorganismy pronikají do lymfatických cest a usídlují se v regionálních lymfatických uzlinách. Poté jsou zaneseny do krevního řečiště a odtud do orgánů, především do sleziny, jater, kostní dřeně, ostatních lymfatických uzlin a do ledvin (Bednář, 1996; Franco et al., 2007).

Je všeobecně známo, že bakterie způsobuje neplodnost, potraty a další reprodukční komplikace u zvířat a u člověka chřipkovité onemocnění se střídavě se zhoršujícími stavy (Jičínská & Havlová, 1995; Mantur et al., 2007).

Úmrtnost je vzácná, vyskytuje se u 2% pacientů, kteří většinou umírají na následky sekundární endokarditidy (Mantur et al., 2007).

4.1.2. *Mycobacterium bovis* a *Mycobacterium tuberculosis*

Taxonomie

Rod *Mycobacterium* zahrnuje více než 50 druhů, mezi nimiž jsou vedle obligátně patogenních původců tuberkulózy a lepry též podmíněně patogenní a nepatogenní druhy, které představují významnou mikrobiální složku přírodních biotopů (Bednář et al., 1996).

Výskyt a zdroje kontaminace

Hlavním infekčním zdrojem pro člověka je mléko z tuberkulózních mastitid, ve kterém se vylučuje *M. bovis* v množství až 5×10^5 KTJ (kolonie tvořících jednotek)/ml, nicméně dojnice mohou vylučovat bakterii do mléka i v důsledku septikémických a kožních infekcí (Jičínská & Havlová, 1995; Marth & Steele, 2001). V minulosti byly dalšími zdroji i máslo, tavený sýr či tvaroh (Marth & Steele, 2001).

Přenos *M. tuberculosis* se uskutečňuje nejčastěji aerosolem (Jičínská & Havlová, 1995; Bednář et al., 1996).

Morfologie, fyziologie, biochemie

Bakterie rodu *Mycobacterium* jsou grampozitivní, nesporulující, acidorezistentní, nepohyblivé, rovné tyčinky o rozměrech 3-6 μm x 1-4 μm , které se vyskytují jednotlivě, ve dvojicích nebo svazečcích paralelních buněk (Jičínská & Havlová, 1995; Marth & Steele, 2001; NZSFA², 2001).

Charakteristický je pomalý růst, podmíněný neobyčejně dlouhou generační dobou (20 až 30 hodin), s optimální teplotou kolem 37 °C. Neroste při 25 a 45 °C a také nepřežívá krátkodobou vysokou pasteraci (Jičínská & Havlová, 1995; Marth & Steele, 2001). Mikroorganismus je velmi rezistentní k vyschnutí a v prostředí se udržuje v životaschopné, infekční formě po několik měsíců (Jičínská & Havlová, 1995).

Onemocnění

Tuberkulóza je jednou z největších metel lidí a zvířat. První případy tohoto onemocnění zaznamenal již Hippokrates v roce 400 př.n.l. Zlom nastal až v roce 1882, kdy Robert Koch izoloval původce onemocnění – *Tuberkelbacillin*. Posléze se

podářilo rozlišit tři hlavní druhy, jež jsou schopné vyvolat onemocnění u různých živočichů (Marth & Steele, 2001):

- 1) *Mycobacterium tuberculosis* (lidský typ)
- 2) *M. bovis* (bovinní typ)
- 3) *M. avium* (ptačí typ)

Infekční agens vstupuje nejčastěji aerogenní cestou (vzácně cestou perorální do zažívacího ústrojí nebo traumatizovanou pokožkou) do dýchacího ústrojí, kde vzniká tzv. primární komplex, tj. zánětlivé ložisko v plicním parenchymu. Infekce navodí imunitní odezvu, jejíž projevem je kožní přecitlivělost na tuberkulin (Bednář et al., 1996).

4.1.3. *Streptococcus pyogenes*

Taxonomie

Rod *Streptococcus* je velice rozmanitý, což vedlo k vypracování vnitřního třídění rodu. Klasifikace se opírá o čtyři základní kritéria (Bednář et al., 1996):

- 1) Typ změn na krevním agaru, podle nichž se rozlišují:
 - a) streptokoky β - hemolytické, které zcela rozrušují membránu erytrocytů, takže kolonie jsou obklopeny zónou úplné hemolýzy
 - b) streptokoky α - hemolytické (viridující), které redukují hemoglobin na směs produktů, takže krevní agar pod kolonií má hnědozelené zbarvení
 - c) streptokoky nehemolytické (γ - hemolytické), které vzhled agaru nemění
- 2) Sérologické třídění podle stěnového antigenu.
- 3) Biochemické a fyziologické charakteristiky.
- 4) Patogenita a místo výskytu.
 - a) pyogenní, kam řadíme *S. pyogenes*, původce mastitid *S. agalactiae*, a další
 - b) streptokoky ústní
 - c) enterokoky
 - d) laktokoky (sérologická skupina N)

Výskyt a zdroje kontaminace

Hlavním zdrojem kontaminace (před zavedením pasterace) bylo mléko infikovaných krav nebo mléko, které bylo infikované během dojení. Mezi další

zdroje, které byly v minulosti zodpovědné za propuknutí infekce, je řazena zmrzlina, sušené mléko nebo bílý sýr (Marth & Steele, 2001).

Morfologie, fyziologie, biochemie

S. pyogenes jsou β - hemolytické, grampozitivní, nesporulující, nepohyblivé koky, které se vyskytují v řetězcích o 10-15 buňkách o velikosti 0.5 - 1.0 μm nebo v párech (Krménčik & Kysilka, 2001c; Todar⁵, 2009).

S. pyogenes je charakteristický velkou náročností na živiny, k růstu potřebuje aminokyseliny a vitamíny. Je fakultativně anaerobní, fermentuje cukry za tvorby kyseliny mléčné, produkuje aceton z glukózy a amoniak z argininu, hydrolyzuje hipurát a skulin. Netvoří katalázu. Na rozdíl od ostatních pyogenních streptokoků nefermentuje ribózu. Přítomnost CO_2 , stejně jako anaerobní podmínky, podporuje růst a zvýrazňuje hemolýzu (Bednář et al., 1995; Krménčik & Kysilka, 2001c).

Produkuje širokou škálu faktorů virulence (Krménčik & Kysilka, 2001c; Todar⁵, 2009). Hlavním antigenem určujícím virulenci kmenů je však M protein.(= monoklonální imunoglobulin produkováný plazmatickými buňkami), bez něhož jsou kmeny nevirulentní. Tato bílkovina umožňuje adhezi bakterie na povrch sliznic a po průniku chrání bakterii před fagocytózou.

Onemocnění

Mikroorganismus je primárně patogenní pro člověka a člověk je jediným přirozeným zdrojem infekce. Infekce vyvolané touto bakterií se vyskytují po celém světě, v mírném pásmu převažují infekce respiračního traktu, v teplých oblastech jsou častější infekce kožní (Bednář et al., 1996; Krménčik & Kysilka, 2001c).

Bakterie je původcem faryngitid (zánětů hltanu), spály (vyrážky), infekcí kůže a podkoží, systémových infekcí, streptokokového toxického šoku a poststreptokokových následků u lidí a mastitid u mléčného skotu (Bednář et al., 1996; Marth & Steele, 2001). Pyogenní streptokoky mohou pravděpodobně infikovat mléko z bacilonosičů během dojení (Jičínská & Havlová, 1995).

Infekce *S. pyogenes* může vést k vážným následkům: akutní revmatické horečce, která může vést až k trvalému poškození srdečních chlopní či akutnímu zánětu ledvin (Todar⁵, 2009).

4.2. Méně časté a vzácné mikroorganismy

4.2.1. *Citrobacter freundii*

Citrobacter freundii jsou aerobní, gramnegativní tyčinky o délce 1-5 μm . Objeveny byly v roce 1932 a posléze zařazeny do čeledi *Enterobacteriaceae*. Mikroorganismy se hojně vyskytují v životním prostředí, především v půdě, vodě a kanalizaci, ale také v jídle či střevním traktu lidí a zvířat (Nantel, 1999; Wang et al., 2000).

Bakterie je zodpovědná za řadu závažných infekcí. Je známo, že je příčinou různých nosokomiálních infekcí dýchacích a močových cest a krve, přičemž představuje přibližně 29 % všech oportunních infekcí (Whalen et al., 2007).

Některé kmeny, produkující enterotoxin a verotoxin, jsou schopné vyvolat gastroenteritidu s inkubační dobou dlouhou 12-48 hodin. Mezi typické příznaky je pak řazen průjem, bolesti břicha, horečka, zimnice, bolest hlavy, zvracení a nevolnost. Úplné zotavení trvá až sedm dní (Marth & Steele, 2001).

Za zdroj infekce bylo již v minulosti považováno syrové mléko či dovážené francouzské sýry (Marth & Steele, 2001).

4.2.2. *Clostridium spp.*

Druhy *Clostridium perfringens* i *Clostridium botulinum* jsou grampozitivní, sporulující bakterie spadající do čeledi *Bacillaceae* (Jičínská & Havlová, 1995; Hrubý, 2005). *C. botulinum* se objevuje v mléce a mléčných produktech vzácně, zatímco výskyt *C. perfringens* je častější. V mléce lze nalézt také druhy *C. butyricum* a *C. isobutyricum*, nicméně tyto mikroorganismy způsobují spíše vady výrobků než onemocnění.

Z biochemického hlediska je rod *Clostridium* velice aktivní. Je schopný kvasit celou řadu organických sloučenin za produkce kyselin (máselná, octová) či velkého množství plynu (CO_2 a H_2). Charakteristickým znakem je redukce sulfitů na sirovodík. Bakterie také produkují širokou škálu extracelulárních enzymů schopných rozkládat makromolekuly (proteiny, lipidy, celulózu) (Jičínská & Havlová, 1995; Todar¹, 2009).

C. botulinum

C. botulinum jsou striktně anaerobní tyčinky, produkující oválné spory většího průměru než je samotná vegetativní buňka (Nantel, 1999; Marth & Steele, 2001; Hrubý, 2005). Je to půdní saprofyt, kterého najdeme ve vodě, bahně, krmivech, ale také na povrchu listů, zeleniny či plodů (Jičínská & Havlová, 1995; Baron et al., 1996; Marth & Steele, 2001).

Nejčastějším zdrojem botulismu jsou doma vyrobené, nedokonale vysterilizované masové či zeleninové konzervy, nicméně v poslední době jsou rizikové také vakuově balené potraviny (maso, sýry, uzeniny). Příznivé podmínky poskytují sýrové pomazánky s vyšším obsahem vody a vyšší hodnotou pH (Jičínská & Havlová, 1995). Samotné požití mikroorganismu není škodlivé. Ten se stává nebezpečným až po jeho růstu s následnou tvorbou toxinu.

Bakterie produkuje sedm typů toxinů (A, B, C, D, E, F a G), které se naváží na neurony a inhibují tak uvolňování acetylcholinu z nervových zakončení svalu (Todar¹, 2009). Účinek toxinů tedy spočívá v bloádě nervosvalového přenosu vzruchu, což vede k paralýze postiženého svalstva. Smrt nastává během 24 hodin v důsledku paralýzy dýchacího aparátu (asfyxie) (Doyle et al., 1989).

Uvádí se, že botulotoxin je jedním z nejsilnějších toxinů, údajně až 100 000x silnější než jed chřestýše, přičemž pouhých 0,1ng/kg živé váhy je letální (Doyle et al., 1989; Marth & Steele, 2001).

Lidský botulismus je tedy velice závažná, často smrtelná forma otravy z potravin se zřetelnými neurotickými účinky (Hrubý, 2005)

C. perfringens

C. perfringens jsou obligátně anaerobní bakterie, které však mohou přežít i v mikroaerobních podmínkách (< 5% kyslíku) (Jičínská & Havlová, 1995; Louisiana Office of Public Health, 2008).

Mikroorganismus je ubikvitární, vyskytuje se i ve střevním traktu lidí a domácích zvířat (De Jong, 2003; Office of Public Health², 2008). Nejčastější příčinou onemocnění jsou produkty z masa a drůbeže, koření a až posléze mléčné výrobky. Vydátným zdrojem kontaminace mléka sporama jsou pomalu prokysávající siláže (Jičínská & Havlová, 1995; De Jong, 2003).

C. perfringens zahrnuje pět kmenů (A, B, C, D a E), jež produkují několik druhů toxinů (α , β , ϵ , ι) a enterotoxinů. Alimentární otravy však může vyvolat pouze typ A (AvianBiotech, 2010). Jedná se o nebezpečný mikroorganismus, jenž může způsobit také potenciálně smrtelné syndromy jako jsou nekrotizující enteritidy (typ C), bakteriémie, klostridiové sepse či plynatá sněť (klostridiová myonekróza) (Louisiana Office of Public Health², 2008; Todar¹, 2009).

4.2.3. *Corynebacterium ulcerans*

Jsou bakterie, které doposud nejsou považovány za samostatný druh. Objeveny byly v roce 1927 a stále jsou přisuzovány k *C. diphtheriae*, ačkoliv od něj mohou být spolehlivě odlišeny (Marth & Steele, 2001). Izolovány mohou být z infekcí lidí, opic nebo domácích zvířat (Bednář et al., 1996).

Mikroskopicky jde o grampozitivní krátké až kokovité tyčky bez metachromatických granul. Netvoří pouzdro ani spory a nejsou acidoresistentní. Stejně jako *C. diphtheriae* štěpí cukry, ale navíc jsou schopné hydrolyzovat močovinu a tvořit D - sfingomyelinázu (Bednář et al., 1996).

Případy lidského onemocnění jsou jen sporadické, objevují se faryngitidy různé závažnosti a v několika málo případech onemocnění podobné záškrtu. Zdrojem infekce je člověk nebo zvíře, k přenosu může dojít také infikovaným mlékem (Bednář et al., 1996; Marth & Steele, 2001).

4.2.4. *Salmonella*

Taxonomie

Rod *Salmonella* je řazen do čeledi *Enterobacteriaceae* a zahrnuje dva druhy; *S. enterica* a *S. bongori*, které tvoří více jak 2500 sérovarů. Druh *S. enterica* se dále dělí do šesti poddruhů (Marth & Steele, 2001; Hrubý, 2005; Rhen, 2007; BSOP ID 24, 2008; Todar³, 2009):

I *S. enterica* subsp. *enterica*

II *S. enterica* subsp. *salamae*

IIIa *S. enterica* subsp. *arizonae*

IIIb *S. enterica* subsp. *diarizonae*

IV *S. enterica* subsp. *houtenae*

VI *S. enterica* subsp. *indica*

(symbol V byl ponechán nyní již samostatnému druhu *S. bongori*)

Poddruh I zahrnuje sérovary patogenní pro člověka a teplokrevné živočichy, v poddruzích II a III jsou patogeny a symbionty studenokrevných živočichů a v nepočtených poddruzích IV a VI jsou sérovary izolované z prostředí nebo ze studenokrevných živočichů (Jičínská & Havlová, 1995)..

Z klinického hlediska jsou sérovary rozdělitelné do dvou obrovských skupin. První skupina zahrnuje rody *S. typhi* a *paratyphi* A, B, C, jež jsou odpovědné za invazivní onemocnění, známé jako střevní horečky, zatímco všechny ostatní sérovary jsou známé jako netyphoidní salmonely (NTS), které mají tendenci způsobovat méně závažná onemocnění (Rhen, 2007).

Výskyt a zdroje kontaminace

Nejčastějším zdrojem infekce je vejce a drůbež, dále pak kontaminovaná voda, syrové, sušené či nedokonale pasterované mléko, mléčné výrobky - zejména smetana a sýry, hovězí maso, ovoce a zelenina (Marth & Steele, 2001; Linam & Gerber, 2007; Todar³, 2009).

Mezi významné zdroje bakterií je řazen střevní trakt lidí, drůbeže, prasat, skotu, hlodavců a domácích zvířat, jako jsou leguáni, želvy, psi a kočky (Linam & Gerber, 2007; Todar³, 2009).

Salmonelóza se téměř výhradně přenáší fekálně – orální cestou, prostřednictvím potravy nebo pitné vody, kontaminované infikovanými fekáliemi. Jen výjimečně dochází k přímé infekci stykem s infikovaným hostitelem, např. ošetřovatelky telat s nemocnými telaty, nebo přenosem z infikované matky na novorozeně při porodu (Jičínská & Havlová, 1995; Hrubý, 2005).

Morfologie, fyziologie, biochemie

Salmonely jsou krátké, gramnegativní, rovné tyčinky o velikosti 0,7 – 1,5 µm x 2,0 – 5,0 µm, jež jsou až na sérotypy *S. gallinarum* a *S. pullorum* pohyblivé (Jičínská & Havlová, 1995; Hrubý, 2005; BSOP ID 24, 2008).

Bakterie jsou fakultativně anaerobní, dobře rostou na běžných živných médiích a jako všechny enterobakterie jsou biochemicky velice aktivní (Jičínská & Havlová,

1995). Na krevním agaru vytvářejí kolonie o průměru 2-3mm (BSOP ID 24, 2008). Salmonely jsou velice odolné, nevadí jim vysoké teploty, vlhké prostředí ani mráz (Rhen, 2007).

Z biochemického hlediska nefermentují laktózu a zkvašují glukózu, což je obvykle doprovázené výrobou plynu. Jsou oxidáza negativní a jsou schopné redukovat dusičnany na dusitany a produkovat sirovodík (Marth & Steele, 2001; BSOP ID 24, 2008).

Hlavním virulentním faktorem je enterotoxin, nicméně většina sérotypů produkuje také cytotoxin s účinky podobnými shigelovému toxinu a některé další endotoxiny, které kromě enterocytů mohou napadat i jiná cílová místa (Jičínská & Havlová, 1995).

Onemocnění

Bakterie rodu *Salmonella* vyvinuly důmyslný mechanismus infekce. Některé z nich penetrují do epitelových buněk, které tvoří vnitřní vrstvu stěny střeva. I když jsou patogeny v těchto buňkách zabity, vyvolají zánět, který naruší střevní mikroflóru a s tím zároveň i její obrannou funkci (Smětalová, 2009). Z tenkého střeva se bakterie mohou transportovat do lymfatického systému či do krve. Krví mohou dále putovat kamkoliv a usadit se v různých orgánech, kde mohou způsobit těžké komplikace (Marth & Steele, 2001).

4.2.5. *Streptobacillus moniliformis*

S. moniliformis je gramnegativní, fakultativně anaerobní, nepohyblivá, neopouzdrěná a vysoce pleomorfní (= vícetvará) tyčinka, která způsobuje dvě formy onemocnění označované jako Haverhill fever a Rat-bite fever (horečka způsobená kousnutím krysou) (Marth & Steele, 2001; De Jong, 2003).

Hlavním rezervoárem bakterie jsou nejen krysy, ale také různí savci včetně koček, psů a frettek. V případě Rat-bite horečky je zdrojem infekce pro člověka kousnutí či manipulace s infikovanými krysami, zatímco u Haverhill horečky je zdrojem kontaminované mléko či voda (De Jong, 2003).

Nástup příznaků je náhlý, objevuje se zimnice, bolesti hlavy, vyrážka a bolesti zad a kloubů. Ke komplikacím (např. artritida, endokarditida, zápal plic, abscesy,

anémie či těžká dehydratace) dochází u 50 % infikovaných jedinců, zejména u dětí (Marth & Steele, 2001).

Případy horečky Haverhill jsou vzácné. Je známo pouze pár ohnisek, a to v roce 1920 v Haverhill, kdy z mléka onemocnělo 130 žáků anglické internátní školy, a roku 1987 v Essexu, kdy se nakazilo 304 žáků (Marth & Steele, 2001; De Jong, 2003).

5. METODY DETEKCE

5.1. Klasické kultivační metody

Standardní kultivační metody zahrnují pět základních operací: resuscitaci (obnovení životaschopnosti poškozených patogenních mikrobů); pomnožení v tekutém selektivním médiu; kultivaci na agarovém selektivně – diagnostickém médiu a výběr charakteristických kolonií; identifikaci vyizolovaných mikroorganismů biochemickými sérologickými testy (potvrzení) a vyhodnocení výsledku rozboru (Jičínská & Havlová, 1995). Již z tohoto výčtu je patrné, že tyto metody jsou časově velice náročné (cca 7-10 dní).

5.1.1. Detekce vybraných patogenních bakterií

Bacillus cereus

Ke stanovení počtu *B. cereus* se používá metoda ISO 7932 (tabulka 5), kterou je stanoven počet tzv. presumptivních *Bacillus cereus*, tedy předpokládaných příslušníků tohoto druhu. Očkuje se na půdu MYP (Mannitol / Yolk / Polymyxine B), jež využívá třech základních schopností *B. cereus*: rezistence k antibiotiku polymyxin, neschopnost zkvašovat mannitol a produkce lecitinázy. Naočkované plotny se inkubují při 30 °C po dobu 18-24 hodin. Pokud nejsou kolonie zřetelně viditelné, inkubují se plotny po ještě dalších 24 h a teprve potom se kolonie počítají. Přednostně se vybírají plotny očkované dvěma po sobě následujícími ředěními, na nichž vyrostlo méně než 150 charakteristických kolonií (tzn. velké, růžové - mannitol negativní – a obvykle obklopené zónou precipitace – což značí tvorbu lecinitázy). Z každé plotny se vybere pět charakteristických kolonií, které se přeočkují na glukózový agar a inkubují při 30 °C po dobu 24 hodin. Žluté zbarvení značí pozitivní reakci.

Campylobacter jejuni

Ještě v roce 1995 nebyla vypracována k průkazu *Campylobacter jejuni* a *C. coli* v mléce ani v jiných potravinách žádná mezinárodní standardní metoda (ISO, IDF) (Hrubý, 2005). Nyní však již platná norma existuje, a sice norma ČSN ISO 10272

(tabulka 5), používaná pro izolaci a průkaz termofilních kampylobakterií ve výrobcích určených k lidské výživě nebo ke krmení zvířat.

Testovaný vzorek se očkuje do bujonu podle Boltona, který obsahuje cefoperazon, vankomycin, trimetoprim a amfotericin B, v poměru 1:10 a kultivuje se za mikroaerofilních podmínek při teplotě 37 °C po dobu 46 hodin a poté při teplotě 41,5 °C po dobu 44 – 48 hodin. Pomnožená kultura se očkuje na desoxycholátový agar s aktivním uhlím, cefoperazonem a amfotericinem B a na druhé volitelné médium (modifikovaný agar podle Butzlera, agar podle Skirrowa, agar podle Karmaliho, agar podle Prestona) a to proto, aby se zvýšila pravděpodobnost záchytu požadovaného mikroorganismu. Plotny se inkubují za mikroaerofilních podmínek při teplotě 41,5 °C po dobu 44 – 48 hodin. Pro konfirmaci se z každé plotny vybere pět charakteristických kolonií a provedou se předběžné testy. Suspektní kolonie jsou pak dále charakterizovány pomocí předepsaných biochemických testů.

Listeria monocytogenes

Stále nejčastějším způsobem stanovení *Listeria monocytogenes* v potravinách je použití klasických kultivačních metod. Na jejich základě je založena i metoda popsaná v ČSN EN ISO 11290 (tabulka 5). Prvním krokem je primární pomnožení listerií v tekuté selektivní půdě se sníženou koncentrací inhibičních složek (tzv. poloviční bujon podle Frasera), která obsahuje jeden objemový díl roztoku chloridu lithného a polovinu objemových dílů roztoku akriřlavinu a roztoku kyseliny nalidixové. Takto inokulovaný zkušební vzorek se inkubuje při 30 °C po dobu 24 hodin. Toto pomnožení částečně inhibuje růst doprovodné mikroflóry a současně umožňuje oživení poškozených buněk listerií. Poté následuje sekundární pomnožení v tekuté selektivní půdě s plnou koncentrací buněk (tzv. bujon podle Frasera), přičemž se inkubuje při 35 °C po dobu 48 hodin. Získané kultury se vyočkují na dvě selektivně diagnostická agarová média, Oxford a PALCAM, a následuje inkubace při 30 °C, 35 °C nebo 37 °C a po 24 hodinách (je-li potřeba ještě po 48 hodinách) se zjišťuje přítomnost charakteristických kolonií.

Staphylococcus aureus

Ke stanovení počtu *S. aureus* se používá metoda ISO 6888 (tabulka 5), jež je rozdělena do třech částí:

Část 1. je používána v běžných případech. Očkuje se na selektivně – diagnostický Baird – Parkerův agar, inkubuje při 35 °C nebo 37 °C a prohlíží jak po 24 tak po 48 hodinách. Přítomnost suspektních koagulázopozitivních stafylokoků se projeví reakcí s vaječným žloutkem. Pro stanovení počtu se vyberou pouze ty plotny, které obsahují maximálně 300 kolonií včetně 150 typických a/nebo atypických kolonií ve dvou po obě jdoucích ředěních. Pro confirmaci (koagulázový test) se vybere pět typických (jsou-li přítomny pouze typické), nebo pět atypických (jsou-li přítomny pouze atypické), nebo pět typických a pět atypických (jsou-li přítomny oba druhy). Koagulázový test se považuje za pozitivní, když objem koagula tvoří více než polovinu původního objemu.

Část 2. se využije, jedná-li se o potraviny (jako jsou sýry vyrobené ze syrového mléka), u nichž se předpokládá kontaminace buď stafylokoky, vytvářejícími atypické kolonie na Baird - Parkerově agaru, nebo průvodní mikroflórou, která může znesnadnit odečet kolonií. Očkuje se do agarové půdy s králičí plasmou a fibrinogenem a inkubuje při 35 °C nebo 37 °C po dobu 18 až 24 hodin a je-li třeba, reinkubuje se dalších 24 hodin. Z počtu typických kolonií (černé, šedé nebo bílé malé kolonie obklopené zónou precipitace, indikující koagulázovou aktivitu) na Petriho misce se vypočítá počet koagulázopozitivních stafylokoků v milimetru nebo gramu.

Část 3. je doporučena pro výrobky, u kterých lze očekávat přítomnost stresovaných stafylokoků a jejich nízkého počtu (např. v sušených výrobcích). Očkuje se na Giolittiho a Cantoniho půdu a inkubuje při 37 °C po dobu 24 až 48 hodin. Přítomnost suspektních koagulázopozitivních stafylokoků se projeví redukcí teluričitanu draselného. Následuje subkultivace na Baird-Parkerův agar a provedení koagulázového testu.

Tabulka 5: Vybrané akreditované normy ISO.

	Přesný název zkušební postupu/metody	Identifikace metody
1.	Horizontální metoda stanovení počtu presumptivního <i>Bacillus cereus</i> - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30°C	ČSN EN ISO 7932
2.	Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu <i>Campylobacter spp.</i> – Část 1: Metoda průkazu	ČSN EN ISO 10272-1
3.	Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu <i>Listeria monocytogenes</i> – Část 1: Metoda průkazu	ČSN EN ISO 11290 -1
4.	Horizontální metoda stanovení počtu koagulázo-pozitivních stafylokoků (<i>Staphylococcus aureus</i> a další druhy) – Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera Část 2: Technika s použitím agarové půdy s králičí plasmou a fibrinogenem Část 3: Průkaz a stanovení nízkých počtů technikou MPN	ČSN EN ISO 6888 - 1,2,3

5.2. Molekulárně genetické metody

Molekulárně genetické metody umožňují určit mikroorganismus na základě jeho genetické informace. Nejvýznamnějšími z nich je hybridizace a polymerázová řetězová reakce (PCR), přičemž obě tyto metody jsou založeny na specifické komplementaci (hybridizaci) mezi hledaným úsekem jednovláknové nukleové kyseliny a sondou (= synteticky připravené krátké sekvenci nukleotidů komplementární k hledanému úseku) (Blažková et al., 2005).

Obecně lze říci, že tyto metody jsou vysoce citlivé, jsou-li použity čisté bakteriální kultury. V opačném případě se citlivost výrazně snižuje, a proto je často nezbytné mikroorganismy před vlastní analýzou separovat, k čemuž je možné využít jednak metody fyzikálně-chemické (filtrace, extrakce), jednak metody bioafinitní (imunochemické).

Hybridizace

Sonda, jež je komplementární k hledanému úseku, je označena chemiluminiscenční (= světélkující) značkou, která umožňuje konečnou detekci. Po hybridizaci je přidáno selekční činidlo, které slouží k rozlišení hybridizované a volné sondy (Blažková et al., 2005).

PCR

Je metoda umožňující namnožení definovaného úseku DNA in vitro. Vlastní PCR předchází izolace bakterie ze zkoumaného vzorku, její pomnožení v tekutém médiu a následný rozpad buňky. Právě lyzované buňky jsou pak analyzovány PCR.

Prvním krokem je denaturace (90°C), při níž dochází k rozplétání dvoušroubovice DNA. Následuje hybridizace primeru (krátká sekvence nukleotidů) ke komplementárnímu úseku DNA (45-65°C) a extenze připojeného primeru termostabilní DNA polymerasou (72°C), kdy probíhá syntéza druhého řetězce DNA (Blažková et al., 2005).

Produkty PCR jsou poté detekovány elektroforézou v agarosovém gelu.

5.3. Imunochemické metody

Jsou rychlé, jednoduché, a vysoce citlivé nejen v čistých kulturách a navíc lze stanovit velký počet vzorků současně. Dalšími klady je pak nenáročnost na laboratorní vybavení a relativně nízká cena (Blažková et al., 2005). Základem těchto metod je interakce mezi specifickým antigenem (toxin, komponenty buněčné stěny) a protilátkou (Jičínská & Havlová, 1995; Blažková et al., 2005).

Nejčastěji používanými metodami jsou ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) a LAT (Latexové Aglutinační Testy). Ve srovnání s ELISA mají LAT několik výhod, jsou jednoduché, rychlé a levné.

6. ZÁVĚR

Patogenní mikroorganismy se objevovaly v mléce již v samém počátku mlékárenského průmyslu. Potencionální hrozba vzniku onemocnění však postupem času klesala a to z důvodu zavádění nových moderních postupů, jako je univerzální použití pasterace či dodržování přísných hygienických pravidel, zahrnující nejen mytí a dezinfekci vemen, ale také např. skladování nadojeného mléka ve vhodných teplotách.

I samotné zdroje nálezů „mléčnými“ patogeny jsou specifické. Původcem onemocnění bakteriemi *Campylobacter jejuni* a *Staphylococcus aureus* je častěji syrové mléko, zatímco k nálezům psychrotrofní bakterií *Listeria monocytogenes* dochází především v důsledku konzumace mléčných výrobků, zejména sýrů. Sporotvorné mikroorganismy, např. druh *Bacillus cereus*, se mohou vyskytovat i v pasterovaném či jinak tepelně ošetřeném mléce. K onemocnění jsou ve všech případech nej náchylnější hlavně rizikové skupiny, mezi které jsou řazeny děti, jedinci s oslabenou imunitou a starší osoby.

V České republice a celé Evropské unii se dle Nařízení komise (ES) č. 2073/2005, sleduje pouze *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Enterobacter* a stafylokokové enterotoxiny, v případě kontroly hygieny výrobního procesu navíc *Escherichia coli* a ostatní mikroorganismy z čeledi *Enterobacteriaceae* a koagulázopozitivní stafylokoky. Je zajímavé, že pro druh *Campylobacter jejuni* normy neexistují, ač právě tomuto mikroorganismu patří prvenství v počtu alimentárních onemocnění. I přes neexistenci limitů je však *C. jejuni* monitorován řadou státních a vědeckých institucí (např. Státní veterinární správa či Státní zdravotní ústav) a podobně je tomu také u druhů *Bacillus cereus* a *Yersinia enterocolitica*.

Jak již bylo naznačeno, nejvyšší počet případů onemocnění (bez ohledu na zdroj infekce) byl zaznamenán u rodu *Campylobacter*, který v posledních letech předčil i výskyt onemocnění způsobených rodem *Salmonella*. Jen za rok 2010 bylo hlášeno více než 21 tisíc případů kampylobakterií, zatímco počet salmonelóz nedosahuje ani devíti tisíc. Naprosto opačný trend jeví *Listeria monocytogenes*, která v roce 2010 vyvolala pouze 25 onemocnění.

Nejobávanějšími patogeny jsou *E. coli* 0157:H7, pro kterou je charakteristická nejen nejnižší inkubační dávka (pouhých 50 buněk), ale také vznik několika

závažných komplikací, zejména hemolyticko-uremického syndromu a trombotické trombocytopenické purpury, a *Listeria monocytogenes*, způsobující onemocnění, jež probíhá takřka bezpříznakově a pro něž je typická nejvyšší míra mortality (až 30%). Naopak za méně závažné patogenní mikroorganismy lze považovat druhy, jež způsobují onemocnění gastrointestinálního charakteru, např. *Staphylococcus aureus*. Nicméně i ony mohou být zodpovědné za závažnější komplikace.

Především díky aktuálnosti problematiky a potřeby rychlého zjištění přítomnosti a počtu patogenních mikroorganismů došlo k výraznému pokroku v metodách detekce, a sice zavedení imunochemických metod, založených na interakci mezi specifickým antigenem a protilátkou, které nejenže jsou rychlé, ale také relativně levné.

7. ZDROJE

7.1. Odborné publikace

ABBAS, H. K. *Aflatoxin and Food Safety*. 1. ed. London: CRC Taylor & Francis, 2005. 616 p. ISBN 0-8247-2303-1.

ALTEKRUSE, S. F., STERN, N. J., FIELDS, P. I., SWERDLOW, D. L. *Campylobacter jejuni: An Emerging Foodborne Pathogen. Emerging Infectious Diseases*. January - March 1999, Vol. 5, No.1. ISSN 1080-6059

BARON, S., WELLS, C.L., WILKINS, T.D. *Medical Microbiology*. 4 th edition. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. 1273 p. ISBN 0 -9631172-1-1.

BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996. 558 s. ISBN 80-238-0297-6.

BLACKMORE, D. K., FRANCIS, R. A. *The apparent transmission of staphylococci of human origin to laboratory animals*. *Journal of comparative pathology*. 1970, 80, p. 645-51. ISSN 0021-9975.

BLAŽKOVÁ, M., KARAMONOVÁ L., FUKAL, L., RAUCH, P. *Listeria monocytogenes: Nebezpečný patogen a jeho detekce v potravinách. Chemické listy*. 2005, 99, s. 467-473. ISSN 0009-2770.

BOLTON, D. J., DUFFY, G., O'NEILL, C. J., BAYLIS, C. L., TOZZOLI, R., MORABITO, S., WASTESON, Y., LOFDAHL, S. *Epidemiology and Transmission of Pathogenic Escherichia coli*. Ireland: Ashtown Food Research Centre, 2009. 22 p. ISBN 1-84170-535-7.

- DE JONG, A.E.I. *Clostridium perfringens : Spores & cells, media & modeling*. Wageningen: Thesis Wageningen University, 2003. 136 p. ISSN 90-5808-931- 2.
- DONGYOU, L. *Handbook of Listeria monocytogenes*. 1. edition. Boca Raton: Taylor & Francis, 2008 [cit. 2010-09-01]. 540s. ISBN 9781420051407.
- DOS REIS, R. S., HORN, F. Enteropathogenic Escherichia coli, Salmonella, Shigella and Yersinia: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathogens*, 2010, 2:8. 12 p. ISSN 1757-4749.
- DOYLE, M.P., KRAMER J. M., GILBERT, R. J. *Foodborne bacterial pathogens*. 1 ed. New York: Marcel Dekker, 1989. 816 p. ISBN 0824778669.
- DROBNIEWSKI, F. A. Bacillus cereus and related species. *Clinical Microbiology Reviews*. Oct 1993, 6(4), p. 324 – 338. ISSN 0893-8512.
- FALTEISEK, L., FIKÁČEK, M., HODAČ, L., CHMÁTAL, L., JEDELSKÝ, P. L., KOUTECKÁ, E., KOUTECKÝ, P., KRTKOVÁ, J., KUBEŠOVÁ, M., LIŠKOVÁ, J., MATĚJ, J., SMÝKAL, V., ŠÍPEK, P. *Organismy a abiotické faktory prostředí*. 1.vyd. Praha: Národní institut dětí a mládeže MŠMT, 2006. 112 s. ISBN 80-86784-39-8.
- FRANCO, M., MULDER, M., GILMAN, R., SMITS, H. Human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 2007, Vol. 7, p. 775 – 786. ISSN 14733099.
- GELLIN, B., BROOME, C. Listeriosis. *JAMA*. March 3, 1989 – Vol. 261, No.9, p. 1313-1320. ISSN 0098-7484
- HEDAYATI, M. T., PASQUALOTTO, A. C., WARN, P. A., BOWYER, P., DENNING, D. W. *Apergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*. Jun 2007, 153, p. 1677-1692. ISSN 1350-0872.
- HOCHÉL, I. Metody detekce a charakterizace Campylobacter sp. *Chemické listy*. 2009, 103, s. 814-822. ISSN 0009-2770.

HOCKING, A. D. *Foodborne microorganism of public health significance*. 5th ed. North Sydney: Australian Institute of Food Science and Technology, 1997. 638 p. ISBN 09587515505.

HRUBÝ, R. *Charakteristika a výskyt patogenních mikroorganismů v potravinách* : Bakalářská práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, Teologická fakulta, 2005. 51 s. Vedoucí práce: Mgr. Leona Čechová, Ph.D.

HUOVINEN, E., SIHVONEN, L. M., VIRTANEN, M. J., HAUKKA, K., SIITONEN, A., KUUSI, M. Symptoms and sources of *Yersinia enterocolitica* - infection: a case-control study. *BMC Infectious Diseases*. 2010, Vol.10, No.122. ISSN 1471-2334.

KLUYTMANS, J., BELKUM, A., VERBRUGH, H. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanism, and Associated Risks. *Clinical Microbiology Reviews*, July 1997, Vol. 10, No. 3, p. 505 – 520. ISSN 0893-8512.

JIČÍNSKÁ, E., HAVLOVÁ, J. *Patogenní mikroorganismy v mléce a mlékárenských výrobcích*. Vydání první. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1995. 106 s. ISBN 80-85120-47-X.

LINAM, W. M., GERBER, M. A. Changing epidemiology and prevention of *Salmonella* infections. *Journal of Pediatric Infectious Diseases*. Aug 2007, 26 (8), p. 747 – 748. ISSN 1305-7707.

LOIR, Y., BARON, F., GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*. 2003, vol.2 (1), p. 63-76. ISSN 1676-580.

MANTUR, B. G., AMARNATH, S. K., SHINDE, R. S. Review of clinical and laboratory features of human Brucellosis. *Indian J Med Microbiol* 2007, 25, p. 188 – 202. ISSN 0255-0857.

MARTH, E. H., STEELE, J. L. *Applied dairy microbiology*. 2. vyd. New York: Marcel Dekker, 2001. 744 s. ISBN 0-8247-0536-X.

MOORE, J. E., CORCORAH, D., DOOLEY, J. S. G., FANNING, S., LUCEY, B., MATSUDA, M., McDOWELL, D. A., MÉGRAUD, F., MILLARD, B. CH., O'MAHONY, R. *Campylobacter. Veterinary Research*. 2005, Vol. 36, No. 3, p. 351 – 382.

MORRIS, G. K., FEELEY, J. C. *Yersinia enterocolitica: a review of its role in food hygiene. Bulletin the World Health Organization*. 1976, Vol. 54, p. 79-86. ISSN 0042-9689.

MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S, PFALLER, M. A. *Medical microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005. 963 p. ISBN 0323033032.

NATARO, J. P., KAPER, J. B. *Diarheagenic Escherichia coli. Clinical Microbiology Reviews*. Jan 1998, Vol. 11, No.1, p. 142-201. ISSN 0893-8512.

NEČESÁNKOVÁ, S. *Kampylobakteriόza. Vyziva a potraviny*. 2005, 2. ISSN 1211-846X.

PAPAIIOANNOU, C.A., VARVARIGOS, N., KARATSOLIS, G., PAPAIIOANNOU, N., DRAGANIGOS, A., KATSANTOURIS, C., KAPPAS, A., AVRAMOPOULOU, T. *Yersinia Enterocolitica Endocarditis. Hellenic J Cardiol*. 2003, 44, p. 427-430. ISSN 1109-9666.

PASQUALOTTO, A.C. *Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to Aspergillus fumigatus and Aspergillus flavus. Medical Mycology*. 2009, Vol. 47, No. 1, p. 261-270. ISSN 1369-3786.

REES, J. H., SOUDAIN, S. E., GREGSON, N. A., HUGHES, R. A. C. *Campylobacter jejuni infections and Guillain – Barré syndrome. The New England Journal of Medicine*. Nov 1995, 333, p. 1374 - 1379.

RHEN, M., MASKELL, MASTROENI, P., THRELFALL, J. *Salmonella: Molecular Biology and Pathogenesis*. Wymondham: Horizon Bioscience, 2007. 194 s. ISBN 978-1-904933-26-7.

ROSYPAL, S., HORÁČEK, I., KUBIŠTA, V., LOSOS, B., NEDVÍDEK, J., PIKÁLEK, P., SLAVÍKOVÁ, J., ŠAŠEK, V., ŠTYS, P. *Nový přehled biologie*. 1.vyd. Praha: Scienta, 2003. 797 s. ISBN 978-80-86960-23-4.

SALYERS, A. A., WHITT, D. D. *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. 2nd ed. Washington: ASM Press, 2002. 539 p. ISBN 155581171X.

SEDLÁK, K., TOMŠÍČKOVÁ, M. *Nebezpečné infekce zvířat a člověka*. Praha: Scientia, 2006. 167 s. ISBN 80-86960-07-2

SENESI, S., GHELARDI, E. Production, Secretion and Biological Activity of *Bacillus cereus* Enterotoxins. *Toxins*. 2010, 2 (7), p. 1690-1703. ISSN 2072-6651.

SHIEMANN, D.A. *Yersinia enterocolitica* in Milk and Dairy Products. *J Dairy Sci*. Feb 1987, 70 (2), p. 383-389. ISSN 0022-0302.

ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3.vyd. Praha: Academica, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

WANG, J. T., CHANG, S. C., CHEN, Y. C., LUH, K. T. Comparison of antimicrobial susceptibility of *Citrobacter freundii* isolates in two different time periods. *The Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. Dec 2000, 33 (4), p. 258 – 262. ISSN 1684-1182.

WASTESON, Y. Zoonotic *Escherichia coli*. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2002, 43, p. 79-84. ISSN 1751-0147.

WHALEN, J. G., MULLY, T. W., ENGLISH, J. C. Spontaneous *Citrobacter freundii* infection in an Immunocompetent Patient. *Archives of Dermatology*, 2007, Vol. 143, p. 124 – 125. ISSN 0003-987X.

7.2. Elektronické zdroje

American Medical Association. *Diagnosis and Management of Foodborne Illnesses: a Primer for Physicians and Other Health Care Professionals* [online]. Rev. and expanded 2nd ed. Chicago: American Medical Association, 2004. Patient scenario: Escherichia coli O157:H7 Infection [cit.2011-01-07]. 11p. Dostupné z WWW: < http://ama-assn.org/ama1/pub/upload/mm/36/2004_food_o157.pdf >.

ČEJKOVÁ, A. *Fyziologie průmyslových mikroorganismů: sylabus* [online]. Praha: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, [s.a] [cit. 2011-03-30]. 31 s. Dostupné z WWW: < <http://vscht.cz/kch/download/sylaby/fpm-bak.pdf> >.

JANČOVÁ, J., ŠKAPOVÁ, T. Listeria monocytogenes: Původce listeriosy. *Zpravodaj Centra MPI: Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě* [online]. Datum vydání 20.9.2007, ročník 3, 3/2007 [cit. 2010-09-06]. s. 2-4. Dostupné z WWW: < <http://zuova.cz/informace/cmpi/zpravodajmpi200703.pdf> >.

KOLÁŘ, J. *Kolar-jiri.sweb.cz* [online]. Vytvořeno 4.10.2001, změněno 3.2.2005 [cit. 2010-11-28]. Dostupné z WWW: < <http://kolar-jiri.sweb.cz/> >.

KRMENČÍK, P., KYSILKA, J. *Toxikon : Internetový průvodce světem toxikologie* [online]. Vytvořeno 1.1.2001a, změněno 9.1.2011 [cit. 2011-01-09]. Aflatoxiny. Dostupné z WWW: < <http://biotox.cz/toxikon/mikromycety/aflatox.php> > .

KRMENČÍK, P., KYSILKA, J.. *Toxikon : Internetový průvodce světem toxikologie* [online]. Vytvořeno 1.1.2001b, změněno 8.1.2011 [cit. 2011-01-08]. Staphylococcus aureus. Dostupné z WWW: < http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/staphylococcus_aureus.php >

KRMENČÍK, P., KYSILKA, J.. *Toxikon: Internetový průvodce světem toxikologie* [online]. Vytvořeno 1.1.2001c, změněno 9.1.2011 [cit. 2011-01-09]. Streptococcus pyogenes. Dostupné z WWW: < http://biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/streptococcus_pyogenes.php >.

LEVISON, M. *Staphylococcus aureus* Infections. In *The Merck Manuals: online medical library* [online]. USA (NJ): Merc and Co., Inc., ©2009-2010, last updated in September 2008 [cit. 2011-01-08]. Dostupný z WWW: < <http://merckmanuals.com/home/sec17/ch190/ch190t.html> >.

Louisiana Office of Public Health: Infectious Disease Epidemiology Section. *Bacillus cereus* toxin infection [online]. Revised 7.7.2004 [cit. 2010-11-28]. 2 p. Dostupné z WWW: < <http://dhh.louisiana.gov/offices/miscdocs/docs.../BacillusCereusManual.pdf> > .

Louisiana Office of Public Health: Louisiana Dept of Health and Hospitals. *Clostridium perfringens* [online]. Revised 24.11.2008 [cit. 2011-01-09]. 4 p. Dostupné z WWW: < <http://dhh.louisiana.gov/offices/miscdocs/.../ClostridiumPerfringensManual.pdf> >

MARLER, C¹. *Campylobacter jejuni: Campylobacter Food Poisoning* [online]. Seattle: Outbreak Inc., ©2005-2010, created 17.10. 2007, last modified 10.2.2010 [cit.2010-09-03]. Dostupné z WWW: < <http://about-campylobacter.com/> >.

MARLER, C². *E.coli Bacterie: E.coli Food Poisoning* [online]. Seattle: Outbreak Inc., ©2005-2010, created 15.10.2007, last modified 10.5.2010 [cit.2011-01-07]. Dostupné z WWW: < <http://www.about-ecoli.com/> >.

MARLER, C³. *Salmonella Food Poisoning* [online]. Seattle: Outbreak Inc. ©2005-2010, created 18.10.2007, last modified 10.11.2010 [cit. 2010-11-28]. Dostupné z WWW: < <http://www.about-salmonella.com/> >.

NANTEL, A.J. *Clostridium botulinum* [online]. Québec: Centre de Toxicologie du Québec. 1999. 32 p. [cit. 2011-01-09]. Dostupné z WWW: < <http://who.int/csr/delibepidemics/clostridiumbotulism.pdf> >.

National Standard Method BSOP ID 24. *Identification of Salmonella species* [online]. Issue 2.1., 29.9.2008 [cit. 2010-11-28]. Dostupné z WWW: < <http://hpa-standardmethods.org.uk/documents/bsopid/pdf/bsopid24.pdf> >.

NSW Food Authority: safer food, cleverer choices [online]. New South Wales. Created in August 2007, last modified 24.11.2010 [cit. 2010-11-28]. *Bacillus cereus*. Dostupné z WWW: < <http://foodauthority.nsw.gov.au/Documents/...pdf/Bacillus-cereus.pdf> >.

*NZSFA: New Zealand Food Safety Authority*¹ [online]. Wellington: The Authority, ©1994, document issued in July 2010 [cit. 2010-11-28]. *Bacillus cereus*: The organism/toxin. Dostupné z WWW: < <http://nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/bacillus-cereus.pdf> >.

*NZSFA: New Zealand Food Safety Authority*² [online]. Wellington: The Authority, ©1994, document issued in May 2001 [cit. 2011-01-09]. *Mycobacterium bovis*: The organism/toxin. Dostupné z WWW: < <http://nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/mycobacterium-bovis.pdf> > .

*NZSFA: New Zealand Food Safety Authority*³ [online]. Wellington: The Authority, © 1994, document issued in June 2010 [cit. 2011-01-08]. *Yersinia enterocolitica*: The organism/toxin. Dostupné z WWW: < <http://nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/yersinia-enterocolitica.pdf> >.

SMĚTALOVÁ, D. *Gate2biotech: biotechnologický portál* [online]. JIC, z.s.p., © 2006-2010, 4.11.2009 [cit. 2010-11-28]. Jak bakterie rodu *Salmonella* způsobují průjemové onemocnění. Dostupné z WWW: < <http://gate2biotech.cz/jak-bakterie-rodu-salmonella-zpusobuji-prujmove-onemocneni/> >.

Státní zdravotní ústav [online]. Státní zdravotní ústav, © 2007-2008, změněno 12.4.2011 [cit. 2011-04-12]. Dostupné z WWW: < www.szu.cz >.

TODAR, K¹. *Todar's Online Textbook of Bacteriology* [online]. Madison: Kenneth Todar, PhD, © 2008, last modified 4.10.2009 [cit. 2011-01-09]. Pathogenic Clostridia, including Botulism and Tetanus. Dostupné z WWW: < <http://textbookofbacteriology.net/clostridia.html> >.

TODAR, K². *Todar's Online Textbook of Bacteriology* [online]. Madison: Kenneth Todar, Ph.D, © 2008, last modified 17.9.2009 [cit. 2011-01-07]. Pathogenic E.coli. Dostupné z WWW: < <http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html> > .

TODAR, K³. *Todar's Online Textbook of Bacteriology* [online]. Madison: Kenneth Todar, Ph.D, © 2008, last modified 17.9.2009 [cit. 2011-01-07]. Salmonella and Salmonellosis. Dostupné z WWW: < <http://textbookofbacteriology.net/salmonella.html> > .

TODAR, K⁴. *Todar's Online Textbook of Bacteriology* [online]. Madison: Kenneth Todar, Ph.D, © 2008, last modified 16.9.2009 [cit. 2011-01-08]. Staphylococcus aureus and Staphylococcal Disease. Dostupné z WWW: < <http://textbookofbacteriology.net/staph.html> > .

TODAR, K⁵. *Todar's Online Textbook of Bacteriology* [online]. Madison: Kenneth Todar, Ph.D, © 2008, last modified 16.9.2009 [cit. 2011-01-08]. Streptococcus pyogenes and Streptococcal Disease. Dostupné z WWW: < <http://textbookofbacteriology.net/streptococcus.html> > .

WHO: World Health Organization [online]. © WHO 2011. Created 7.12.2010, updated 7.1.2011 [cit. 2011-01-07]. Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC). Dostupné z WWW: < <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/> > .

7.3. Normy, nařízení a vyhlášky

ČSN EN ISO 7932-1:2005 (560092) Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu presumptivního *Bacillus cereus* – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C.

ČSN EN ISO 1271-1:2006 Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Campylobacter* spp. – Část 1. Metoda průkazu.

ČSN EN ISO 11290-1:1999/A1:2005 (560093) Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* – Část 1: Metoda průkazu.

ČSN EN ISO 6888-1:1999/A1:2004 (560089) Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy) – Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera

ČSN EN ISO 6888-2:1999 (560089)/A1:2004 Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy) – Část 2: Technika s použitím agarové půdy s králičí plasmou a fibrinogenem

ČSN EN ISO 6888-3:2003 (560089) Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy) – Část 3: Průkaz a stanovení nízkých počtů technikou MPN

Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny (ve znění zveřejněném v Úředním věstníku Evropské unie L 338, 22. 12. 2005 sv. 48).

8. PŘÍLOHY

8.1. Seznam použitých zkratk

CDC – Centers for Diseases Control and Prevention

CNS – centrální nervová soustava

CYA - Czapkův agar s kvasničným extraktem

EHEC – enterohemoragické kmeny *E. coli*

GBS - Guillain – Barré syndrom

HC – hemoragická kolitida

HUS – hemolyticko – uremický syndrom

MPKA – masopeptonový bujon

TTP - trombotická trombocytopenická purpura

YEST – yersiniový enterotoxin

8.2. Seznam obrázků

Obrázek 1: <u>Vliv teploty na rychlost rozmnožování mikroorganismů.</u>	14
Obrázek 2: <u>Chemická struktura AFB1</u>	21
Obrázek 3: <u>Konidiofor s konidii druhu <i>A. flavus</i></u>	22
Obrázek 4: <u>Kolonie <i>A. flavus</i> na CYA (Czapkův agar s kvasničným extraktem)</u>	23
Obrázek 5: <u>Kolonie <i>B. cereus</i> na krevním agaru</u>	26
Obrázek 6: <u>Počet případů onemocnění způsobené bakteriemi rodu <i>Campylobacter</i> a <i>Salmonella</i> v ČR v letech 2000 až 2010.</u>	28
Obrázek 7: <u>Přehled výskytu onemocnění v letech 2000 – 2010 v ČR</u>	35
Obrázek 8: <u>Kolonie <i>L. monocytogenes</i> na MPKA v procházejícím světle s částečnou hemolýzou</u>	37
Obrázek 9: <u>Kolonie <i>S. aureus</i> na krevním agaru (po 48 hodinách) s úzkou zónou β-hemolýzy</u>	40

8.3. Seznam tabulek

Tabulka 1: <u>Optimální podmínky vybraných patogenů</u>	13
Tabulka 2: <u>Kritéria bezpečnosti potravin v potravinách dle Nařízení komise (ES) č. 2073/2005</u>	19
Tabulka 3: <u>Charakteristika intoxikací způsobených významnými patogeny</u>	45
Tabulka 4: <u>Charakteristika infekcí způsobených významnými patogeny</u>	46
Tabulka 5: <u>Vybrané akreditované normy ISO</u>	61