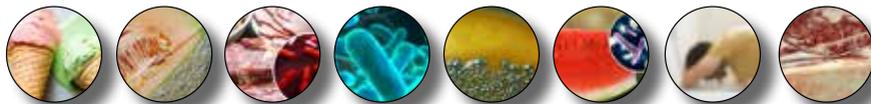




Výskyt
Listeria monocytogenes
v potravinách

a riziko onemocnění pro člověka

Publikace pracovní skupiny pro bezpečnost potravin při ČTPP



MVDr. Josef Brychta, Ph.D.



Výskyt *Listeria monocytogenes* v potravinách

a riziko onemocnění pro člověka

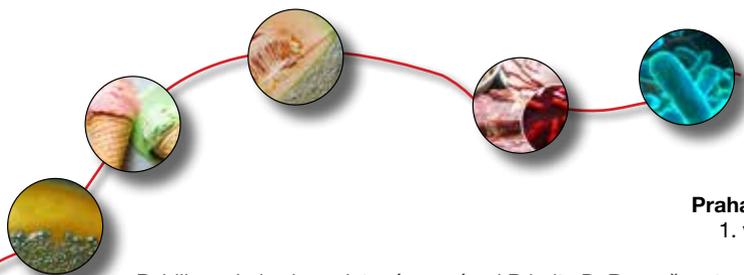
Autor:

MVDr. Josef Brychta, Ph.D.,
Národní referenční laboratoř
pro *Listeria monocytogenes*,
při SVÚ Jihlava

Spoluautoři a oponenti:

Mgr. Lenka Bartošová, Ph.D., SZPI ČR
MVDr. Vladimír Brychta, MZe ČR

Fotografie na titulní straně:
Kateryna Kon/Shutterstock.com



Praha 2018
1. vydání

Publikace byla zkompletována v rámci Priority D. Bezpečnost potravin České technologické platformy pro potraviny ve spolupráci s Potravinářskou komorou České republiky a za finanční podpory Ministerstva zemědělství ČR (dotační titul 10.E.a/2018).

ISBN 978-80-88019-31-2

1. Úvod			
1.1 Komu a k čemu je publikace určena	4		
1.2 Historie laboratorní diagnostiky	4		
1.2.1 Bakterie a kolonie <i>L. monocytogenes</i>	5		
1.2.1.1. Popis a charakteristika kolonie <i>L. monocytogenes</i>	6		
1.2.1.2. Mikroskopie <i>Lm</i>	7		
1.2.1.3. Struktura bakteriální kolonie	8		
1.2.2 Charakteristika bakterií a jejich růstu	10		
1.2.2.1 Rozdělení bakterií a odborné termíny	10		
1.2.2.2 Generační doba a fáze růstu bakterií	13		
1.2.2.3 Růstové podmínky <i>L. monocytogenes</i>	14		
2. Vývoj nemoci v ČR (EPIDAT) a v zahraničí	16		
2.1 Infekční dávka <i>Lm</i> pro člověka	18		
2.2 Prevalence	21		
2.3 Přenos <i>Lm</i> a brány vstupu do těla	21		
2.4 <i>Lm</i> jako příčina onemocnění v průběhu těhotenství	22		
2.5 Adaptace v těle	24		
3. Rezervoáry <i>Lm</i> v životním prostředí	26		
3.1 Kde se vyskytuje? Jak přežívá ve vnějším prostředí?	26		
3.1.1 Vnější rezervoár	26		
3.1.2 Vnitřní rezervoár	28		
3.1.3 Potraviny – výskyt	29		
3.2 Přenos do výroby živočišné	30		
3.3 Přenos do výroby vegetabilních potravin	33		
3.4 Primární a sekundární kontaminace	34		
3.4.1 Aerosol	36		
3.4.2 Ruce a osobní hygiena	39		
4. Výskyt <i>Lm</i> v jednotlivých druzích potravin	40		
4.1. Rozdělení potravin	40		
4.1.1 Kontaminace syrového masa <i>Lm</i>	42		
4.1.2 Česká legislativa	44		
4.1.3 Výskyt <i>Lm</i> v tepelně opracovaných výrobcích	45		
4.1.3.1 Kde najdu <i>Lm</i> ve svém zařízení/podniku?	47		
4.1.4 Fermentované trvanlivé masné výrobky	48		
4.2 Výskyt <i>Lm</i> v rybách a rybích výrobcích	51		
4.3 Výskyt v mléce a mléčných výrobcích	56		
4.3.1 Syrové mléko	56		
4.3.2 Sýry a výrobky	59		
4.3.3 Jiné mléčné výrobky	60		
4.3.4 Zmrzliny	61		
4.4 Výskyt v zelenině a jiných surovinách a výrobcích z nich	62		
4.5 Cukrářské výrobky	65		
4.6 Lahůdky a hotová jídla	65		
4.7 Lovná zvěř	68		
4.8 Pokrmy v zařízení společného stravování	68		
4.9 Startovací kultury	75		
4.10 Mikrovlnný ohřev	77		
5. Stresory ve výrobě potravin	77		
5.1 Reakce bakterií a <i>L. monocytogenes</i> na stresory (překážky) ve výrobě	77		
5.1.1 Teplota, chlad, mražení – vliv na růst <i>L. monocytogenes</i>	78		
5.1.2 Adaptace <i>Lm</i> na stres spojený s aw a obsahem soli	79		
5.1.3 pH	81		
5.1.4 <i>L. monocytogenes</i> ve vztahu k ukazatelům: D-time, z-value (hodnota)	83		
5.1.5 Modifikovaná atmosféra (MOA) a obaly	85		
5.1.6 Obaly	87		
5.2 Aditiva	88		
5.2.1 Bakteriociny, jejich účinek proti <i>Lm</i>	90		
5.3 Ultrafialové (UV) světlo	90		
5.4 Vznik a rozvoj rezistence na antimikrobiální látky u <i>Lm</i>	93		
6. PPP – zodpovědnost PPP a pozitivní nález ve vzorku	95		
6.1 Co dělat při pozitivním nálezu <i>Lm</i> v potravine? Stanovisko SVS ČR	96		
6.2 Stanovisko SZPI	97		
6.3 Provedení identifikace izolátu na úroveň sérovaru	100		
7. Perzistence ve výrobních provozech	101		
7.1 Biofilm	103		
7.2 Quorum sensing (QS) – komunikace a paměť bakterií	108		
7.3 Kde a kdy provádět stěry	109		
7.3.1 Související legislativa	109		
7.3.2 Účel stěrové kontroly	109		
7.3.3 Plán odběru vzorků z míst a zařízení ve výrobě - stěry, provedení a vyhodnocení	113		
7.4 Jak postupovat při pozitivním nálezu ve stěru	117		
8. Tržní síť	118		
8.1 Maloobchodní prodejny	118		
8.2 Přenos v průběhu prodeje	120		
9. Příklady legislativy	122		
9.1 Interpretace výsledků vyšetření podle nařízení (ES) č. 2073/2005	127		
9.2 Ověřování trvanlivosti potravin – studie údržnosti potravin podporující růst <i>Lm</i>	128		
9.3 Rozdělení výrobků pro provedení metodiky studií údržnosti (trvanlivosti)	128		
10. Ekonomické ztráty v důsledku onemocnění člověka listeriózou	130		
11. Metodika provádění studií trvanlivosti pro <i>L. monocytogenes</i>	131		
12. Použitá literatura	132		

1. Úvod

1.1 Komu a k čemu je publikace určena

Tato publikace je určena všem provozatelům potravinářských podniků (dále jen „PPP“) a dalším pracovníkům v potravinářském průmyslu, zvláště těm, kteří nestudovali mikrobiologii na vysoké škole. Mohou ji využívat všichni, včetně pracovníků dozorových orgánů, kteří pracují s potravinami a musí dbát na jejich bezpečnost či ji kontrolovat (zdravotní nezávadnost).

V evropské legislativě se jasně uvádí, že: „Potraviny nesmějí obsahovat mikroorganismy nebo jejich toxiny či metabolity v množstvích, která představují nepřijatelné riziko pro lidské zdraví“ a *Listeria monocytogenes* (dále jen „*Lm*“ nebo také „*L. monocytogenes*“) je bakterie, která by se neměla přehlížet nebo podceňovat.

Účelem této publikace **není**:

- obsáhnout všechny odborné a důležité informace,
- nahradit nejnovější odborné či vědecké poznatky,
- poskytnou vyčerpávající informace o legislativě,
- měnit nebo nahradit funkci dozorových orgánů.

1.2 Historie laboratorní diagnostiky

Laboratorní diagnostika *L. monocytogenes*, tak jak ji známe v současnosti, se začala uplatňovat v roce 1987, kdy byla na Státním veterinárním ústavu (dále jen „SVÚ“) Jihlava zavedena metoda používaná v USA. Tato metoda zkrátila čas k dosažení výsledku vyšetření na 3 až 5 dnů z původních 5 až 7 týdnů. Od té doby se změnila kultivační média, na kterých *Lm* roste, ale princip této metody je v podstatě stejný.

V současné době jsou již vyvinuty nové metody molekulární biologie na bázi DNA, např. polymerázová řetězová reakce, tzv. PCR. Rozhodčí metodou však zůstává i nadále kultivační metoda popsaná v technické normě EN/ISO 11290 část 1 a 2.

Nové přístupy

Dalším důvodem pro rozšíření požadavků na laboratorní diagnostiku může být i to, že nastupuje nový trend v EU a tím je „*Jedno zdraví!*“. Jde o nově pojatý zdravotní, vzdělávací a výzkumný systém aktivit v západní Evropě, jehož cílem je zvýšit spolupráci mezi sektory zdraví lidí, zvířat a životního prostředí. Důvodem je nárůst a postupné změny příznaků a projevů lidských infekčních chorob, které mají zoonotický původ, zvyšující odolnost mikroorganismů na antimikrobiální léky apod. Prokázala se

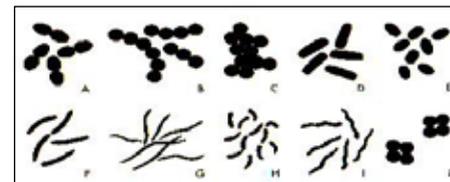
potřeba spolupráce mezi sektory zdraví lidí, zvířat a životního prostředí. Konceptci jednoho zdraví se stále více dostává uznání od politiků a vědců z celého světa.

1.2.1. Bakterie a kolonie *L. monocytogenes* - Popis a charakteristika bakterií - obecně:

PPP a jejich zaměstnancům se většinou dostanou do rukou pouze údaje o tom, že v jejich výrobku byly nebo nebyly prokázány patogenní bakterie nebo že výskyt kontrolovaných bakterií vyhovuje/nevyhovuje stanoveným limitům platné legislativy. V tom případě se poskytuje údaj o množství kolonií tvořících jednotek „KTJ“, který se uvádí i v jiných různých zkratkách = KTJ/ CFU/ TPC apod. Tento údaj však v žádném případě není roven počtu jednotlivých bakterií. Jak vypadá jedna KTJ například *Lm* na Petriho misce, je patrné z obrázku č. 1.2. A jak vypadá roztěr jedné KTJ pod mikroskopem, je patrné z obrázku č. 1.3.

1. Morfologie bakterií

A – diplokoky; **B** – streptokoky; **C** – stafylokoky; **D** – bacily; **E** – kokobacily; **G** – filamentózní forma; **H** – vibria; **I** – spirily; **J** – sarciny



Na obrázku jsou vykresleny různé tvary bakterií tak, jak jsou vidět pod mikroskopem. Zdůrazňujeme, že se jedná o ilustrační kresbu. *Lm* patří do skupiny H.

Paradox - Na světě žije přibližně 7,5 miliard lidí. V jednom kelímku jogurtu je přítomno asi 20x více živých bakterií než je lidí na Zemi.

Popis a charakteristika *L. monocytogenes*

Samotná bakterie *Lm* je známa již téměř sto let. Jak dlouho se vyskytuje na Zemi, zatím není známo.

L. monocytogenes (obr. č. 1.1) je malá grampozitivní, pohyblivá, nesporulující bakterie. Vyskytuje se téměř všude kolem nás. Kolonizuje trávicí trakt člověka i zvířat, žije také ve vodě, bahně nebo půdě. Je schopna kontaminovat potraviny, krmiva, vodu apod. Jde o tak zvanou ubiquitární (všudepřítomnou), spíše neškodnou, formu života, která se většinou neprojeví výrazným onemocněním jince.

Roste běžně aerobně (za přístupu vzduchu), ale i fakultativně anaerobně, tedy s minimálním obsahem kyslíku. Buňky jsou 1 až 2 μm dlouhé, vyskytují se jednotlivě nebo ve dvojicích, příležitostně může tvořit i řetízky (v závislosti na růstových podmínkách). V případě růstu v nepříznivých podmínkách mění svůj tvar (zmenšuje povrch) – zkracuje se až do tzv. kokoidní formy.

Pokud *Lm* uplatní své faktory virulence a změní své chování do patogenní formy, způsobuje nebezpečné onemocnění lidí i zvířat **listeriózu**.

Lm patří mezi pohyblivé bakterie, protože je vybavena bičíky (mají 1 až 4 bičíky). Bičíky jsou tenká vlákna mnohonásobně delší než bakteriální buňka (tloušťka 20 až 30 nm, délka asi 20 μ m). Pohyblivost bakterie se snižuje nad 25 °C, při teplotě těla (37 °C) bičíky vymizí. Tloušťka bičíků je tak nepatrná, že jejich pozorování světelným mikroskopem je velmi obtížné. Pro jejich zviditelnění se používají náročné barvicí postupy, např. **stříbření**. Běžně můžeme bičíky pozorovat v elektronovém mikroskopu.



Obrázek č. 1.1: *L. monocytogenes* s bičíky pozorovaná v scanovacím elektronovém mikroskopu (zdroj: www.textbookofbacteriology.net/Listeria_2.html)

1.2.1.1 Popis a charakteristika kolonie *L. monocytogenes*

Lm vytváří pravidelné malé až středně velké (1 až 3 mm) okrouhlé kolonie, které mají různou barvu, to podle média, na kterém rostou. Jednou z předepsaných půd pro kultivaci *Lm* je médium ALOA (Agar pro listerie podle Ottavianiho a Agostiho), kde rostou kolonie *Lm* v modrozelené barvě (*aktivita galaktosidasy*) obklopené širokou kruhovou neprůhlednou zónou precipitace (*aktivita fosfolipasy C*) – viz obrázek č. 1.2.



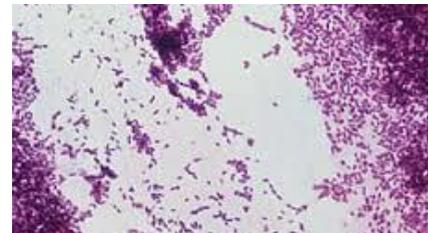
Obrázek č. 1.2: Nárůst kolonií *Lm* na agaru ALOA (foto: SVÚ Jihlava)

Jednotlivé kolonie bakterií vidíme především na živných médiích, která se v laboratořích

používají k izolaci a diagnostice jednotlivých rodů a druhů bakterií. Ve skutečnosti se na potravinách vyskytují spíše v jiné formě. Bakterie nejsou v prostředí jen ve statické formě, ale jsou buď v pohybu pasivní/aktivní nebo tvoří biofilmy (podrobněji dále v textu). V koloniích je vidíme spíše na povrchu výrobků, kdy jsou původcem především barevných sensorických změn. Podobně je tomu i u kolonií plísní, což ale neplatí pro plísňové sýry jako je Niva apod., kde naopak jejich přítomnost vyžadujeme.

1.2.1.2 Mikroskopie *Lm*

Jak je z obrázku (č. 1.3) patrné, jedna KTJ je složená z milionů jednotlivých bakterií.



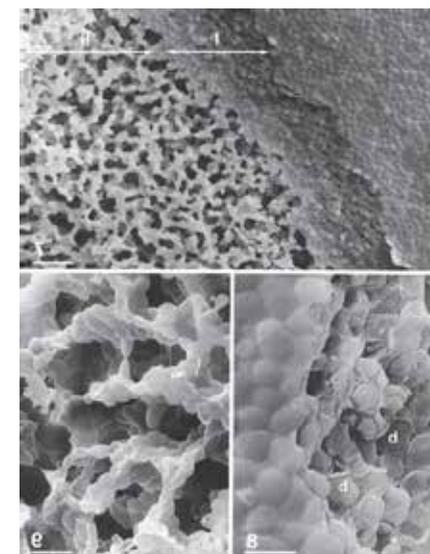
Obrázek č. 1.3: preparát bakterií *Lm* pod mikroskopem, barvení podle Grama (G+ bakterie) (zdroj: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3164129/figure/fig1>)

Navíc bakteriální kolonie není žádné náhodné seskupení bakterií, ale dobře organizované společenstvo, které si musí zajistit dobré zásobování živinami a odvádění produktů bakteriálního metabolismu (látkové výměny).

Obrázek č. 1.4:

Vnitřní struktura bakteriální kolonie

(Zdroj: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3164129/figure/fig1)



1.2.1.3 Struktura bakteriální kolonie

Kolonie je protkána „tunely“, které jsou naplněny vodným roztokem s živinami (obr. č. 1.4). Slouží i k odvádění zplodin metabolismu kolonie a k dýchání.

Bakterie se pohybují v organismu, v surovinách i ve výrobcích. Pohyb bakterií lze rozdělit na pohyb pasivní a aktivní.

a) Pasivní pohyb: bakterie jsou unášeny vodou (látkem) především do míst s odlišnou koncentrací soli.

b) Aktivní pohyb bakterií umožňují především jejich povrchové buněčné orgány - bičíky.

Bičíky

Jedná se o tzv. motor bakterií/nanomotor apod. U většiny bakterií se tvoří dva různé druhy bičíků, a to **polární bičíky** umožňující „swimming motility“ (plavání) v tekutém prostředí a **laterální bičíky** pro „swarming motility“ (plazivý pohyb) na povrchu zařízení, masa, potravin apod.

Bičíky nerotují konstantní rychlostí, bičíky mohou posunout bakterii až o 60 buněčných délek za vteřinu, což je v přepočtu **0,17 m/hod**, ale to je extrémní rychlost ve srovnání s vyššími živočichy.

Rotace bičíků vytváří velkou sílu a dovolí bakterii pohybovat se **rychlostí až 50 μm/**

sec. To je ekvivalent až 3 mm za minutu.

Bakterie je schopna se dostat na **10 tělových délek** za jednu sekundu (běžné podmínky). To vše záleží na prostředí, ve kterém se pohyblivá bakterie nachází a jaké impulzy z okolního prostředí i od jiných bakterií dostává. Výjimečně se bakterie pohybují přímočaře. Stále vyhodnocují signály z okolního prostředí a míří tam, kde je to pro ně výhodné a bezpečné.

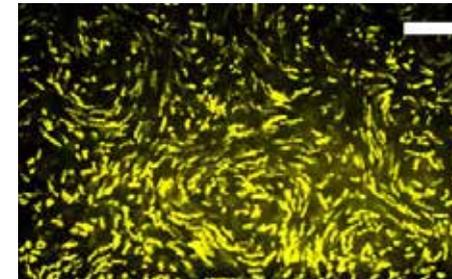
Ještě pár čísel spíše pro pobavení:

V relativních podmínkách se například gepard může pohybovat rychlostí 25 tělesných délek za sekundu, zatímco člověk asi 5,4 délek za sekundu.

Všechny tyto bakteriální pohyby jsou aktivovány jedním nebo více stimuly. U pohyblivých bakterií můžeme pozorovat několik druhů pohybů, které souvisí s podněty z okolního prostředí, které bakterie vyhodnocují jako vhodné či nebezpečné pro jejich další životaschopnost.

Jedná se například o:

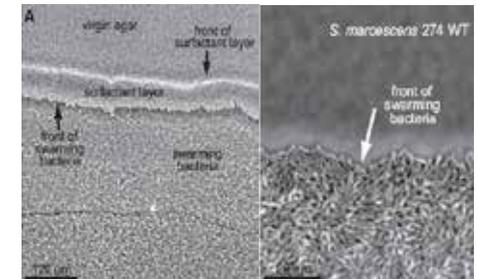
Swimming – plavací pohyb způsobený pohyby bičíků především v tekutinách. Pod mikroskopem to vypadá jako chaotický pohyb, ve skutečnosti je založen na vyhodnocení chemických a životních podmínek vnějšího prostředí.



Obrázek č. 1.5: Plavací pohyb bakterií pod mikroskopem (Ishikawa aj., 2011).

Jak již bylo zmíněno výše, bakterie jsou v neustálém pohybu, protože vyhodnocují impulzy z okolního prostředí a snaží se najít optimální prostor pro pomnožování buněk a také se snaží vyhnout stresům, které by je mohly ohrozit.

Swarming – plazivý pohyb po povrchu. Při pozorování mikrostruktury jsou bakterie při tomto druhu pohybu vysoce organizované ve víry a pruhy. Mezi nejrychlejší bakterie patří například - *Proteus mirabilis*, *Bacillus megaterium*, *Clostridium bifermentans*, *Bacillus alvei*, *Bacillus cereus*.



Obrázek č. 1.6: Kolektivní plazivý pohyb bakterií (*Salmonella marcescens*) na povrchu Virgin agaru.

Vysvětlivky:

Front of surfactant layer – čelo mukózní (slizovité) vrstvy

Surfactant layer – mukózní (slizovitá) vrstva
Front of swarming bacteria – čelo plazivě se pohybujících bakterií

(Zdroj: Avraham Be'er and Rasika M. Harshey. 2011
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889437)

Pro *Lm* je charakteristický pohyb **tumbling** – jedná se na první pohled o chaotické otáčení či tápání bakterií. Vysvětlení je opět jednoduché - buňky vyhledávají/detekují lepší životní podmínky.

Lm je poněkud pomalejší než jiné bakterie, dosahuje rychlosti asi 6 μm/min., což je v přepočtu trojnásobek buněčné délky/min. (Hewitt, 2010; Huijing Du aj. 2012; Sharma a Anand, 2002).

Veškerý pohyb bakterií je však závislý především na teplotě okolí, koncentraci bakterií, dostupné atmosféře, výživě apod. Teplota, stejně jako inhibující látky, je u většiny pohyblivých bakterií limitujícím faktorem jejich šíření v prostředí.

1.2.2 Charakteristika bakterií a jejich růstu

1.2.2.1 Rozdělení bakterií a odborné termíny

Bakterie dělíme například podle jejich působení na člověka:

- Patogenní
- Kazící potraviny
- Užitečné

Vysvětlivky: KTJ/ CFU = kolonie tvořící jednotky; **CPM/ / TPC** = zkratky pro vyjádření celkového počtu mikroorganismů

Co je logaritmus CPM?

V rovnici $= 10^3 = 1000$ bakterií - je desítka základ, trojka exponent

Tento exponent (3) = logaritmus čísla 1000 (při základu 10)

Logaritmy při základu 10 se nazývají dekadické logaritmy

Rozdělení bakterií podle teplotních požadavků na růst:

a) Psychrotrofní: jejich tepelné optimum růstu leží v rozmezí (25 až 30 °C), ale jsou

schopny se množit při nízkých teplotách. Vyskytují se ve vodě, v půdě, prachu, na rostlinách, v krmivu, ve výkalech zvířat, dojícím zařízení, apod.

b) Psychrofilní mikroorganismy: jejich tepelné optimum růstu leží v rozmezí (0 až 15 °C), **tepelné minimum růstu je 0 °C nebo nižší.**

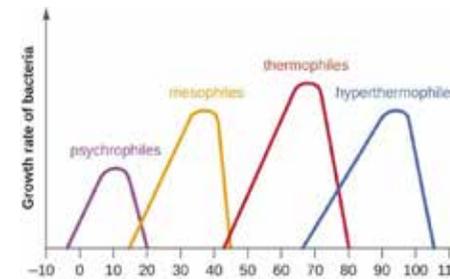
c) Mezofilní aerobní a fakultativně anaerobní bakterie: rostou v neselektivních, nutričně bohatých kultivačních mediích nebo tvoří kolonie na nutričně bohatých agarových půdách během **72 hodin**, za aerobních podmínek, **při 30 až 37 °C.**

d) Termofilní: rostoucí při vyšších teplotách, než je u většiny bakterií obvyklé (tj. asi nad 40 °C). Žijí např. v půdě, kde na slunci může teplota dosahovat až 50 °C.

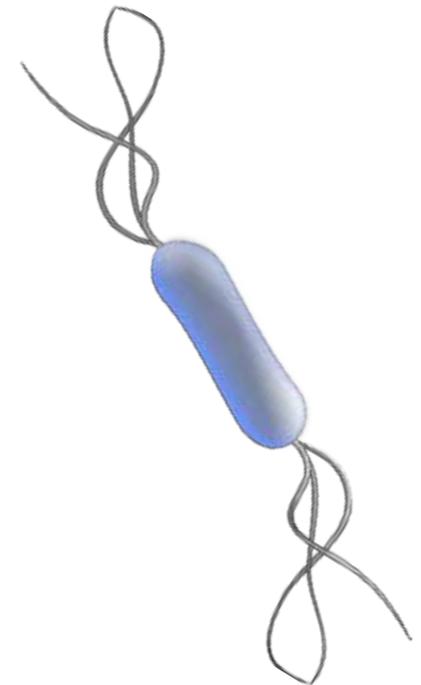
e) Hypertermofilní: bakterie se vyskytují v horkých pramenech až do 110°C, jsou také nazývány extrémně termofilní.

Udržení bakterií na žádoucí úrovni je velice důležité. Výrobky, které mají po výrobě **CPM 100 bakterií/g**, mají velkou šanci vydržet v dobrém stavu za ideálních podmínek po **12 dnů**, kdy se začínají objevovat první příznaky kažení – změna vůně, osliznutí a následné kažení. Výrobky, které startují na úrovni **5 000/g**, mají tuto dobu zkrácenu pod **7 dnů**.

Graf č. 1.1: Graf zobrazuje růstové křivky bakterií v závislosti na teplotě (Anon.,1).



Vysvětlivky: growth rate of bacteria = tempo/rychlost růstu bakterií



Tabulka č. 1.1: Rozdělení mikroorganismu podle teplotních požadavků

	Minimální teplota	Optimální teplota	Maximální teplota
Psychrofilní	-5 až +5 °C	12 až 15 °C	15 až 20 °C
Psychrotrofní	-5 až +5 °C	25 až 30 °C	30 až 35 °C
Mezofilní	+5 až 15 °C	30 až 45 °C	37 až 47 °C
Termofilní	40 až 45 °C	55 až 75 °C	60 až 90 °C

1.2.2.2 Generační doba a fáze růstu bakterií:

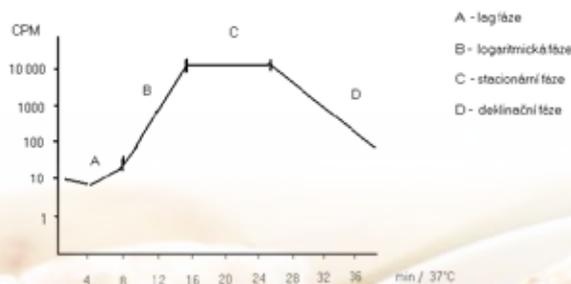
Generační doba je údaj o čase, který je potřebný k rozdělení jedné buňky na dvě (u většiny bakterií v rozmezí 0,5 až 6 hodin). V průměru se bakterie pomnoží ve vhodných podmínkách asi za 20 až 30 minut.

Růst bakteriální kolonie

Zvětšování kolonie na agaru je důsledkem množení buněk na okraji kolonie. V jedné kolonii se buňky nacházejí v různých růstových fázích.

Graf č. 1.2: Hypotetická růstová křivka bakterií (Anon., 2).

(Zdroj: www.rustreg.upol.cz/_materials/microbiology/04_Dynamika_bakterialniho_rustu.pdf)



Popis fází růstové křivky

Lag-fáze: je stav, při kterém se navenek neděje nic a množství organismů zůstává stejné. V této fázi se kultura adaptuje na nové prostředí (buňky zvětšují velikost, syntetizují induktivní enzymy apod.) a připravuje se na dělení. Délka lag-fáze závisí na podmínkách (čím lepší podmínky, tím je kratší, obvykle 30 až 120 minut) a na velikosti bakteriální kultury (inokula) přenesené na živnou půdu (větší inokulum má kratší lag-fázi). Bakterie si zvyká na podmínky prostředí a chystá se na fázi množení (růstu).

Fáze zrychlujícího růstu. V této fázi naměříme zrychlující se přírůstek organismů. Většina organismů dokončila adaptaci a začínají se postupně dělit.

Exponenciální fáze růstu. V této fázi se organismy dělí v pravidelných krátkých intervalech (tzv. generační době) a organismů tak přibývá exponenciálně. V této fázi jsou mikroorganismy v nejlepším fyziologickém stavu a v kultuře je nejvyšší procento živých buněk. Nakreslíme-li závislost množství buněk na čase s logaritmickou časovou osou, dostaneme přímku. Proto se této růstové fázi často také říká logaritmická.

Fáze zpomalujícího se růstu. V této fázi se začíná projevovat vyčerpání živin a hromadění zplodin metabolismu, organismy se

proto přestávají množit, začínají více odumírat a celkový růst se zpomaluje. Často se také mění fyziologie kultury směrem k vyšší odolnosti a obraně.

Stacionární fáze. V této fázi už nepozorujeme přírůstek mikroorganismů. Některé se sice ještě množí, jiné ale umírají a lyzují. Fyziologie většiny populace se mění. Sporující mikroorganismy v této fázi tvoří odolné spory. Aktivuje se sekundární metabolismus. Mají-li ještě z čeho, hromadí buňky zásoby. Organismy aktivují obranné mechanismy a procesy konkurenčního boje, např. produkci antibiotik.

Fáze odumírání. V této fázi už se organismům nedostává prakticky žádných živin a většina jich postupně umírá.

GENERAČNÍ ČAS BAKTERIÍ

Startujeme s jednou bakterií

Generace	Počet bakterií
1	1
2	2
10	512
14	8 192

Pokračování

Generace	Počet bakterií
16	32 768
21	1 048 576
25	16 777 216
30	536 870 912

Komentář k tabulce č. 1:

V tabulce jsou uvedeny možné generační časy bakterií. Na počátku je jedna bakterie, která se za vhodných podmínek pomnoží za 20 až 30 minut na dvě. Po 7 hodinách (14. generace) je již pomnožená na hodnotě 8 192. To je hodnota, která se jeví z hlediska údržnosti potravin jako ještě přípustná.

Vyšší hodnoty bakterií (především kazících) výrazně snižují údržnost potravin. Jinak řečeno – během jedné směny se může *Lm* pomnožit na desítky tisíc, v případě špatného uložení surovin či potravin. Za 15 hodin může být *Lm* namnožena na úroveň 5 krát 10^8 , což může být infekční dávka i pro zdravého člověka.

1.2.2.3 Růstové podmínky***L. monocytogenes*** (Anon., 4)

Bakterie *Lm* se v přírodě běžně vyskytují, přežívají i v extrémních podmínkách (pH koncentrace soli do 10 %) i za přítomnosti antimikrobiálních látek. Listerie jsou psychrotrofní a rostou v širokém rozmezí teplot 1 až 45 °C, optimální teplota růstu je 30 až 37 °C. Generační doba při teplotě 4 °C je 30 až 40 hodin, při teplotě 8 °C jenom 10 až 13 hodin. Chladírenské teploty jsou pro listerie příznivé, přežívají také mražení.

Tabulka č. 1.3: Průměrný čas a podmínky prostředí pro typické kmeny *Lm*, které umožňují zvýšení počtu *Lm* z 10 na 100 buněk (Food MicroModel).

pH	% soli	1 °C	3 °C	5 °C	8 °C	10 °C
6,0	1 %	375 h	230 h	145 h	78 h	53 h
5,0	1 %	919 h	-	352 h	-	127 h
6,0	3 %	596 h	-	234 h	-	87 h

Vysvětlivky: h = hodina

Komentář k tabulce č. 1.3: vliv soli i pH se uplatňuje na pomnožení *Lm* výrazněji při nižší teplotě. Vliv pH se mírně projeví i při 10 °C, vliv soli (3 %) je zanedbatelný.

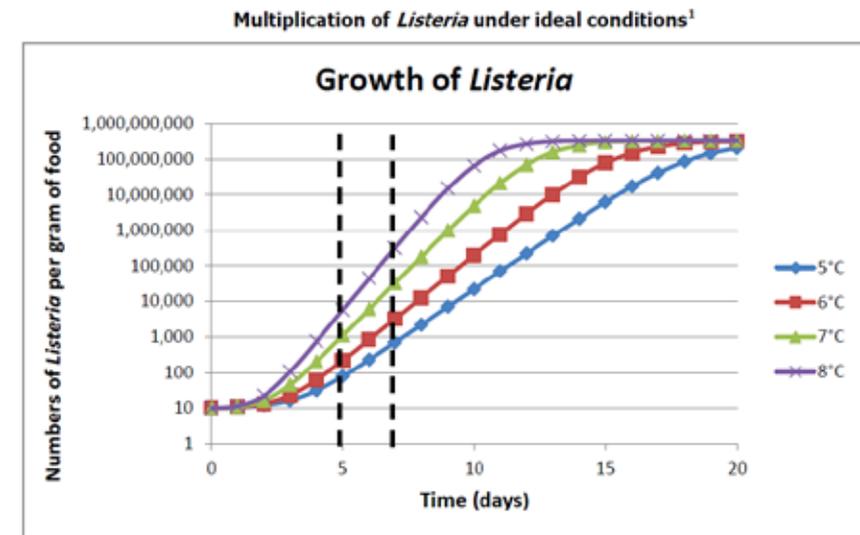
L. monocytogenes toleruje široké rozmezí pH 4,3 až 9,6 (optimální hodnota pH 7,0). Je schopná růstu v přítomnosti 10 % NaCl a při aktivitě vody do 0,92.

Na množení *Lm* se uplatňuje především vliv koncentrací soli a pH, a to výrazněji při nižší teplotě, jak vyplývá z tabulky č. 3. Za ideálních podmínek (pH, Aw, T) se může *Lm* namnožit do koncentrace 100 KTJ/g (ml) potravin již za 3 až 4 dny, kdy dojde k překročení legislativního limitu, kterým se vymezuje mikrobiální bezpečnost potravin (graf č. 1.2).

(Zdroj: www.iifiir.org/userfiles/file/publications/notes/NoteFood_02_EN.pdf)

Vysvětlivky: h = hodina

Graf č. 1.3: Generační čas listerií v ideálních podmínkách (Anon., 5)



Growth of *Listeria monocytogenes* generated from ComBase predictive models (www.combase.cc)

Komentář: Z grafu č. 1.3 je patrné, že do pátého dne se *Lm* pomnožuje pomaleji, ale limit 100 KTJ může přesáhnout již třetí až čtvrtý den. Záleží na adaptaci kmene. Dále je vhodné upozornit na více než desetinásobný rozdíl pomnožení *Lm* v rozmezí teplot 5 °C a 8 °C do pěti dnů skladování. Kolem sedmého dne je rozdíl již stonásobný.

2. Vývoj nemocnosti v ČR (EPIDAT) a v zahraničí

Jaké představuje *Lm* nebezpečí pro člověka?

Počet nahlášených onemocnění listeriózou u člověka v EU byl v roce 2013 podle údajů

Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (dále jen „EFSA“) asi 1763 případů, přičemž úmrtnost byla asi 15,3 %. Pouze pro srovnání - salmonelóz u člověka bylo asi 82694 případů, úmrtnost byla 0,14 %.

Tabulka č. 2.1: Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2007 až 2016 – absolutně
(EPIDAT = Informační systém k hlášení infekčních onemocnění)

Rok	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Listerióza	51	37	32	26	35	32	35	37	34	46
Salmonelóza	18 204	11 009	10 805	8 622	8 752	10 507	10 280	13 633	12 739	11 912
Shigelóza	349	229	178	450	164	266	257	92	88	70
Kampylobak	24 254	20 175	20 371	21 164	18 811	18 412	18 389	20 902	21 102	24 291
VTEC/STEC/ EHEC	nd	nd	Nd	nd	nd	13	16	28	20	28

Vysvětlivky: Kampylobak. = kampylobakterióza; VTEC = STEC = EHEC = enterohemoragická *Escherichia coli* produkující shigatoxin (verocytotoxin)

Z tabulky č. 2.1 vyplývá (mimo jiné), že v ČR není listerióza příliš frekventována. Mohou tu vedle sebe stát dvě názorové skupiny:

- 1) První skupina říká – „nic moc se neděje, nemocných listeriózou je málo a není zapotřebí vytvářet hysterii. Vše je pod kontrolou!“
- 2) Druhá názorová skupina říká – „pozor, je to možná jen klidové stádium! Nechceme připustit ojedinělé výskyty ani hromadná ohniska onemocnění! Tato bakterie je nevyzpytatelná!“

Jak má chápat žena, že jí *Lm* připravila o dítě, když si myslela, že se stravuje kvalitně a mikrobiologicky bezpečnými potravinami. Jak má chápat pozůstalý, kterému zemřel blízký na nemoc přenášenou potravinami, i když PPP garantují její bezpečnost? Jak chce PPP vysvětlovat u soudu nevyšimavost a vědomé neplnění povinností vyplývajících z platné legislativy?

Rizikové skupiny

A) Podle věku rozlišujeme 3 hlavní rizikové skupiny

- novorozenci
- těhotné ženy
- osoby vyššího věku (obvykle nad 65 let).

B) Osoby s oslabenou imunitou

- nádorově nemocní
- nemocní s AIDS, žloutenkou, diabetem
- osoby podstupující dlouhodobě léčbu imunosupresivou
- lidé se sníženou obranyschopností z jiných příčin
- osoby dlouhodobě léčené antacidy.

Údajů o počtu onemocnění a s tím spojené mortalitě je celá řada. Ucelenější přehled uvádí například Hernandez-Milian a Payeras-Cifre (2014).

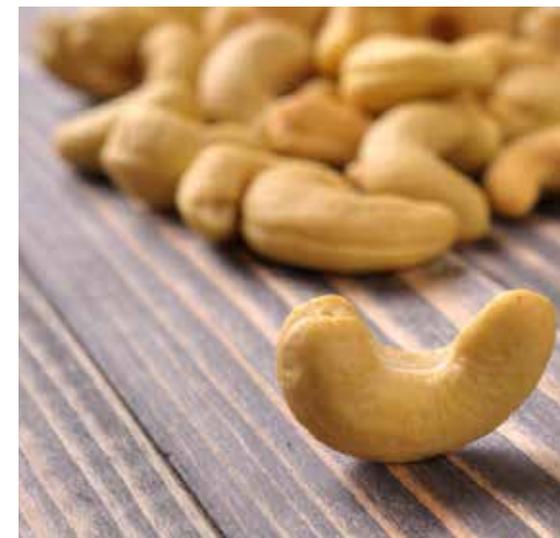
Tabulka č. 2.2:

Země	rok	úmrtnost (%)
USA	2009 - 2011	17,6
Čína	1964 - 2010	26
Dánsko	1994 - 2003	21
Španělsko	2011	20 - 30
Malorka	2002 - 2012	25
Madrid	1986 - 2007	24,3
Barcelona	2011	14

Sérovary *Lm*

Všechny laboratorně získané izoláty *Lm* jsou dále diagnostikovány pro potřeby veterinárního dozoru (statistika) a epizootologie. Jedná se především o stanovení rizika jednotlivých sérovarů, dohledání a potvrzení případného zdroje *Lm*.

U jednotlivých izolátů *Lm* jsou ověřovány somatické (O) a bičíkové (H) antigeny za použití komerčních sér. Na základě prokázaných antigenů je *Lm* zařazena do příslušné sérovarové skupiny, kterých je celkem 13. Každý z těchto sérovarů *Lm* může způsobit onemocnění člověka. Avšak 95 % listerióz člověka je způsobeno sérovary 1/2a, 1/2b nebo 4b, přičemž sérovar 4b způsobuje 33 až 50 % listerióz na světě (Anon., 6).



PŘEHLED O NEMOCNOSTI V EU (VYBRANÉ CHOROBY):

2.1 Infekční dávka *Lm* pro člověka

Listerióza člověka může být způsobena všemi 13 serotypy *Lm*, nejvyšší podíl na vzniku onemocnění má serotyp: 1/2a (15 až 25 %); 1/2b (10 až 35 %); 1/2c (0 až 4%); 3 (1 až 2 %); 4b (37 až 64 %); 4 ne b (0 až 6 %). Serotyp 4b se nejvíce uplatňuje u listerióz souvisejících s těhotenstvím, zatímco serovar 1/2 b se podílí spíše na jiných typech onemocnění. Serovar 4b také lépe překonává kritickou kyselost v žaludku a je lépe přizpůsoben pomnožování v potravinách než jiné serovary. Odborníci v USA odhadují, že asi 0,2 % z celkového počtu 2 500 nemocných listeriózou je způsobeno konzumací potravin s obsahem *Lm* < 100 KTJ/g⁻¹. V kontrastu s tím, více než 80 % onemocnění je způsobeno kontaminací potravin > 1 krát 10⁶ KTJ/g⁻¹. Velice ohroženou skupinou jsou například lidé nemocní AIDS nebo s poruchou imunity (léčení chemoterapií), kteří jsou asi 850 krát vnímavější k infekci *Lm* než zdraví jedinci (Anon., 4).

Infekční dávku nelze přesně stanovit. Je různá pro těhotné ženy, novorozence, starší či nemocné jedince apod. Podle údajů Food Standards Australia New Zealand (FSANZ, 2009) byla prokázána infekční dávka v rozsahu 1,31 krát 10⁸ až 5,01 krát 10¹¹ buněk pro zdravého člověka, u rizikových skupin je výrazně nižší 10² až 10³ buněk. Také inkubační doba je rozdílná – několik dnů až

týdnů, a to v závislosti na infekční dávce, virulenci bakterií a imunitním stavu pacienta. Významný rozdíl ve schopnosti *Lm* vyvolat onemocnění je samozřejmě v sérovorech a velmi záleží na uplatnění jednotlivých faktorů virulence jednotlivých izolátů (Anon., 8). Ribet a Cossart (2015) upozorňují na to, že respirační, zažívací a urogenitální aparát představuje celkovou plochu mukózy 300 až 400 m², což je plocha 200 krát větší než poskytuje kůže. Tato plocha je vystavena stálému ataku saprofytických i patogenních bakterií, včetně *Lm*. Bakterie musí překonat přirozené bariéry mukózy, poté adherují na povrch buněk a pronikají do těla.

Aby byla překonána střevní bariéra a listerie pronikly do organismu, musí jejich koncentrace překročit 10⁶ CFU/g potravin. K infekci může dojít i přes kůži, například u veterinářů při kontaktu s infikovanými porodními cestami, nebo u řezníků a uzenářů při kontaktu s kontaminovanou surovinou (Duben, 2007). To však neplatí pro všechny věkové skupiny obyvatel a nemocné lidi – jak se objasní v dalších informacích. Pacienti se sníženou imunitou, děti a starší lidé jsou 10 až 100krát vnímavější ve srovnání se střední generací a zdravými lidmi (WHO, 2004).

Počty nemocných listeriózou ve srovnání se salmonelózami či kampylobakteriázami se mohou na první pohled zdát naprosto zanedbatelné. Opak je pravdou, protože úmrtnost u listeriózy je výrazně vyšší než u výše zmíněných onemocnění. Smrtnost může dosahovat až 30 % z počtu nemocných (Anon., 8).

Vědecká data jednoznačně prokazují to, že největší riziko plyne z konzumace potravin podporujících růst *Lm* a které mají široké rozpětí v datu spotřeby. To umožňuje pomnožení *Lm* do vysokých počtů (CPM/g⁻¹) s následným rizikem vniku onemocnění (FAO/WHO, 2004; FDA & USDA, 2003). Znovu upozorňujeme na to, že infekční dávka pro rizikové skupiny obyvatel může být velice nízká (10² až 10³ buněk).



„**potravní patogen**“ na začátku osmdesátých let minulého století, kdy se jednoznačně prokázalo, že byla příčinou vzniku hromadných onemocnění po konzumaci silně kontaminovaných potravin v USA a evropských zemích (De Valk aj., 2005). Některé studie uvádějí přítomnost *Lm* ve střevě člověka (bacionosoci) 1 až 10 % (Schneider aj., 2008).

Ideálním zdrojem jsou potraviny, které jsou určeny k přímému konzumu (dále jen „RTE“ z angl. ready to eat), bez předchozího tepelného ošetření. Jsou to různé typy lahůdek masových i zeleninových, mléko, sýry a další mléčné výrobky, zmrzlina, uzeniny apod. Nejčastěji to jsou požívatin s vysokým podílem ručního opracování či přípravy.

V roce 2008 bylo v Kanadě potvrzeno 53 případů listeriózy, z toho zemřelo 20 pacientů. Vznikla první tak zvaná „vlna hysterie kolem listerie“ (Anon., 9).

Podle údajů EFSA bylo v roce 2012 v Evropské unii nahlášeno přibližně 1 640 případů listeriózy u člověka s úmrtností ve výši 17,8 %.

Podle analýzy základního průzkumu EFSA provedeného v rámci celé EU v období od ledna 2010 do ledna 2012 byla *Lm* zjištěna u 10,3 % vzorků rybích výrobků, 2,1 % vzorků tepelně zpracovaných masných výrobků a 0,5 % vzorků měkkých a poloměkkých sýrů, jejichž odběr byl proveden v supermarketech a v obchodech napříč EU včetně České republiky.

Podíl vzorků potravin, u kterých byl překročen zákonný limit bezpečnosti potravin (100 KTJ/g) na konci doby jejich trvanlivosti, byl nízký: 1,7 % u vzorků ryb, 0,4 % u vzorků masa a 0,06 % u vzorků sýrů. Celková bdělost týkající se možné přítomnosti této bakterie v potravinách je a musí být garantována až do konce data trvanlivosti resp. data použitelnosti (Anon., 10).

V roce 2013 informovalo 27 členských států EU o 1 763 případech potvrzených listerióz. V přepočtu se vykazuje 0,44 případů na 100 000 obyvatel, což představuje zvýšení oproti roku 2012 o 8,6 %. Úmrtnost se uvádí na úrovni 15,6 % ověřených onemocnění. Nejčastěji konzumovanou potravinou – ve vztahu ke vzniku onemocnění – byly rybí výrobky (hlavně uzené ryby), polotrdé sýry, masné výrobky určené k přímé spotřebě a tvrdé sýry (EFSA Journal, 2015).

Listeriózou onemocnělo v roce 2015 (EU) přibližně 2200 osob. V 270 případech bylo toto onemocnění smrtelné, což je doposud nejvyšší počet případů zaznamenaných v EU. Ve věkové skupině nad 64 let podíl případů zřetelně vzrostl z 56 % v roce 2008 na 64 % v roce 2015. Navíc počet hlášených případů (a jejich podíl) ve skupině nad 84 let se v tomto období téměř zdvojnásobil.

Dr. Marta Hugas, vedoucí oddělení pro biologická rizika a kontaminanty EFSA, uvedla: „Výskyt listerie málokdy překročí zákonné limity v potravinách určených k přímé spotřebě, které představují nejběžnější zdroj ali-

mentárních nákaz člověka. Je však důležité, aby spotřebitelé řádně dodržovali pokyny výrobců pro skladování potravin a zásady zacházení s potravinami dané národními úřady“ (Anon., 12).

Tabulka č. 2.4: Prevalence *L. monocytogenes* v rámci výroby komodit v severní Americe a Evropě (Warriner a Namvar, 2009).

Výskyt <i>Lm</i>	prevalence
Výroba sýrů	8 %
Zpracování mléka	23 %
Výroba zmrzliny	6 %
Hovězí výroba	28 – 92 %
Drůbež zpracování	13,3 %
Zpracování ryb	12,8 %
Ledničky v domácnosti	20 %



V následující tabulce je přehled nejzávažnějších epidemií, které byly způsobeny *Lm* v USA od roku 2010.

Tabulka č. 2.5: Klíčové infekce listeriózy v USA od roku 2010 (Anon., 13).

Rok	Potravina	Počet případů	Počet úmrtí
2010 - 2015	zmrzlina	10	3
2014	karamelové jablko	35	7
2014	růžičková kapusta	5	2
2013 - 2014	sýry a mléčné výrobky	5	1
2013	sýrové výrobky	8	1
2013	Sýry	6	1
2012	Ricotta salát se sýrem	22	4
2011	ananas - meloun	147	33

2.3 Přenos *Lm* a brány vstupu do těla

Potraviny a zažívací trakt:

Jak je uvedeno výše, přenos *Lm* a následný vznik onemocnění člověka je nejčastěji spojován s konzumací kontaminovaných potravin. Ale tato teorie byla plně přijata až v osmdesátých letech minulého století. Do té doby se jednalo pouze o ojedinělé informace o přenosu potravinami. Onemocnění bylo nejčastěji vysvětlováno a spojováno s přímým kontaktem se zvířaty. Nesmíme opomenout i prokázaný vertikální přenos z matky na plod/dítě, kontakt se zvířaty, kontakt s nemocnými osobami a přenos kontaminovanými materiály.

Předpokladem vzniku invazivní generalizované infekce je překonání střevní bariéry hostitele. *Lm* jako intracelulární patogen invaduje ze střeva do buněk střevních plaků a dále pak do cílových orgánů. Těmi jsou játra, plíce, centrální nervový systém (CNS) nebo placenta.

Je prokázáno, že asi 0,6 až 3,4 % zdravých lidí vylučuje *Lm* ve stolici, bez předchozího známého kontaktu a zdroje kontaminace (FDA/USDA/CDC, 2003). Jiné studie uvádějí bacilonosičství u lidí na 1 až 10 % (Hernandez-Milian a Payeras-Cifre, 2014).

Elischerová aj. (1979) se na Slovensku zabývali zjišťováním výskytu *Lm* ve stolici pracovníků v masokombinátech. Laboratorní výsledky, například u řezníků, byly poněkud překvapující. Pozitivních pracovníků bylo 17 % a byli bez jakýchkoliv příznaků klinického onemocnění. Nejvyšší pozitivita byla u pracovníků v uzenářské výrobě (14,5 %) a bourárně (8,9 %). Dále bylo vyšetřeno 294 rektálních výtěrů prodáváčů na prodejnách masa a bylo zjištěno, že pozitivita na *Lm* u mužů byla 2,4 %, u žen 3,5 %. V současné době podobné studie v naší republice chybí.

Schuchat aj. (1991) uvádějí pozitivitu ze stolice u pracovníků z masného závodu KDE na úrovni 4,8 % (55 z 1 147 testovaných),

u hospitalizovaných pacientů to bylo 1,2 % (12 z 1 034 pacientů). U pacientů s projevy průjmu to bylo asi 1 % (6 z 595 pacientů), při ověřování kontaktu lidí s nemocnými listeriózou to byla pozitivita na úrovni 26 % (9 z 34 testovaných).

Tento zdroj *Lm* by se však neměl přeceňovat, ale už vůbec ne podceňovat, protože sekundární kontaminace potravin není pouhou teorií, ale naprostou realitou.

Kůže:

Poraněná nebo poškozená kůže může být vstupní branou infekce *Lm* při dojení mastitidních krav, během porodu při manipulaci s infikovaným plodem (*Lm*) či porodními cestami, při manipulaci s vysoce kontaminovaným krmivem – především siláží apod.

Ústa:

Poraněná sliznice ústní dutiny přichází jako první do kontaktu s kontaminovanou potravinou a tak je možný přenos krevní cestou nebo i podél nervů přímo na centrální nervový systém“ (dále jen „CNS“). Stejně tak mohou být vstupní branou infekce zkažené zuby nebo poraněné dásně.

Plíce a aerosol:

Nelze se vyhnout ani infekci, která může být způsobena inhalací *Lm* při manipulaci s krmivem, během česání a ošetřování srsti a kůže zvířat. Kůže hospodářských zvířat je jedním z důležitých vektorů (přenosu) *Lm* ze stáje na jatka. Vstupní branou infekce může

být oko (spojivka) především u řezníků, ošetřovatelů drůbeže apod., kdy víření kontaminovaného prachu a peří může způsobit rychlou infekci.

Vertikální přenos: jedná se o kontaminaci, kdy se plod nebo novorozenec nakazí od matky *in utero* nebo během porodu stykem s vaginálními sekrety, které obsahují živé bakterie *Lm*.

Klinické příznaky:

Listerióza má většinou velmi progresivní a těžký průběh. Klinické syndromy spojené s infekcí *Lm* jsou podobné u všech vnímavých hostitelů a zahrnují febrilní gastroenteritidis, septikémii, potrat a infekce CNS. *Lm* má tendenci způsobit invazivní onemocnění rizikových skupin, včetně těhotných žen a novorozenců, starých lidí a pacientů s některým základním onemocněním. Seznam těchto příčin je dlouhý a zahrnuje například cukrovku, alkoholismus, chronická onemocnění jater a ledvin, transplantace orgánů, autoimunitní choroby, AIDS, imunosupresivní léčby (např. steroidy) a léčby, které snižují sekreci žaludeční kyseliny. Avšak listerióza může vzniknout i u jinak zdravých osob (Overmann aj., 2010; Anon., 14).

2.4 *Lm* jako příčina onemocnění v průběhu těhotenství

Těhotné ženy mají vyšší riziko nakažení *Lm* než průměrně zdravý dospělý jedinec a výsledky pro jejich dítě mohou být fatální. Během těhotenství probíhají výrazné hormonál-

ní změny v těle, jako jsou zvýšená produkce progesteronu, snižují se aktivity imunitního systému, který může hůře bojovat proti infekcím. Listerie toho mohou využít a způsobit invazivní listeriózu (Anon., 15).

Lokální útlum specifické buněčné imunity matky, který je nezbytným předpokladem imunologické tolerance plodu, vede ke zvýšené vnímavosti těhotných žen k infekcím vyvolaným intracelulárními patogeny včetně *Lm*. Samotné těhotenství není důvodem k onemocnění listeriózou (Ježová aj., 2008).

Sledování a vyhodnocení 782 případů listerióz ve 20 zemích vykazuje 43 % infekcí spojených s graviditou; 29 % bylo spojeno se septikémií; 24 % způsobilo onemocnění CNS a 4 % měly nespecifický průběh. V těhotenství byly postiženy matky a plody především v třetím trimestru, méně v druhém a vzácněji v prvním trimestru (Mateus aj., 2013).

Ogunmodede aj. (2005) zjistili, že těhotné ženy jsou ohroženy touto formou nemoci asi 20 krát více oproti běžné populaci. Výskyt listerióz u těhotných žen byl v USA evidován na úrovni 3,42 % na 100 000, oproti osobám starších 65 let, kdy se uvádí „pouze“ 1,21 %.

Goulet aj. (2013) uvádějí, že inkubační doba listeriózy je různě dlouhá podle typu onemocnění. Například příznaky typické pro invazivní listeriózu jsou zjištěny v průměru kolem 8 dne (1 až 67 dnů), u těhotných žen v průměru 27,5 dnů (17 až 67 dnů), u CNS se zjistí příznaky kolem 9. dne (1 až 14), v přípa-

dě bakteriémie v průměru kolem 2 dnů (1 až 12 dnů). Febrilní gastro-intestinální onemocnění se může projevit asi po 24 hodinách (6 hodin až 10 dnů).

Běžné potraviny, které se nedoporučují ženám v těhotenství a je lépe se jim vyhnout:

- sýry měkké a poloměkké,
- za studena lisované maso,
- studené vařené kuře,
- předem připravené zeleniny a saláty,
- neumyté ovoce a déle připravené ovocné saláty,
- paštiky a pomazánky,
- čerstvě připravená servírovaná zmrzlina,
- syrové mořské ryby,
- ryby uzené studeným kouřem (losos),
- mražená (čerstvá) zelenina.

Bezpečnější alternativy:

- čerstvě vařené maso, kuře, mořské plody,
- tvrdé sýry a pasterizované mléčné výrobky,
- konzervované potraviny,
- čerstvě umyté a připravené ovoce, zelenina a saláty,
- vejce vařená či smažená tak, že žloutek začíná houstnout.

Neonatální infekce

Výskyt novorozenecké listeriózy je přibližně 8,6 na každých 100 000 živě narozených a může být způsoben narůstající infekcí, transplacentárním přenosem *Lm* v organismu nebo při vdechnutí plodové vody (De Luca aj., 2015).

2.5 Adaptace v těle

Adaptace během průchodu *Lm* zaživacím traktem

Sleator aj. (2009) uvádí, že za úspěšnou adaptaci či přežití *Lm* v zaživacím traktu je zodpovědný komplex **sigma faktor^B**, který aktivuje geny pro tvorbu specifických obranných proteinů.

Zajímavě je nazývána proměna *Lm* ze saprofytického přežívání na infekční formu. Jde o přirovnání, že *Lm* je bakterie dvou tváří – tak jak to známe z literatury:

První tvář je „Dr. Jekyll: jedná se o bakterie, které jsou adaptovány jako saprofyt na podmínky přírodního prostředí a neškodí. Nachází se v půdě, krmivu (především v silážích), vodě, odpadních vodách, odpadech z výroby (rostlinné zbytky) a jiných formách prostředí, včetně divokých zvířat, ptáků, hlodavců, hospodářských zvířat a člověka. Chovají se neškodně až „mírumilovně“.

Druhou tvář je „Mr. Hyde“: tedy bakterie, která je schopna pronikat do buněk a množit se jako intracelulární patogen, což způsobuje onemocnění člověka i zvířat. Zatím není zcela jasné proč a z jakých důvodů dochází k této přeměně. Proces přeměny ze saprofytické formy v patogenní probíhá poměrně rychle, a to v průběhu průchodu (pasáže) trávicím traktem. Ví se o řadě podnětů, které souvisí s *Quorum sensing* (komunikace mezi bakteriemi) nejen mezi listeriemi, ale i s jinými druhy bakterií. Úplně jasné argumenty, které by stoprocentně celou změnu v chová-

ní *Lm* vysvětlily, zatím chybí (Gray aj., 2006). Na druhé straně pro ochranu člověka před proniknutím bakterií do těla a následnému šíření krevní cestou, působí ve stěně střeva řada obranných imunitních mechanismů. Gastrointestinální trakt je nejdelším a zřejmě i nejdůležitějším orgánem v těle. U běžného člověka má střevo délku asi 6,5 m a vytváří asi 400 až 500 m² plochy kryté epitelem. Tento epitel neplní pouze funkci absorbce živin, ale je i první a základní obrannou linií proti bakteriím (Anon., 16).

Střevo také obsahuje obrovské množství jiných bakterií, asi 500 až 1000 rodů (Sleator aj., 2009) v množství asi 10¹¹ až 10¹²/g obsahu v tlustém střevě. V tenkém střevu je obsah bakterií nižší, asi 10⁴ až 10⁹/g obsahu. Řada bakterií má probiotický účinek a podporuje tvorbu mucinu na střevní stěně, včetně tvorby bakteriocinů, které mají inhibiční až destruktivní vliv na *Lm*. Samozřejmě se aktivují i jiné imunologické procesy.

První fyzikální stres, se kterým se musí *Lm* vypořádat je nízké pH v žaludku (~pH 2) s následným kontaktem se žlučí v tenkém střevu. Žluč není významným stresovým faktorem pro listerie (Dowd *et al.*, 2011). *Lm* byla například izolována v čisté kultuře ze žlučnicku psa v souvislosti s onemocněním jater (Marien *et al.*, 2007).

Vzhledem k tomu, že může probíhat výrazná inaktivace *Lm* v důsledku nízkých pH hodnot v žaludku, rozsah inaktivace bude také záviset na celkovém počtu pasážovaných

bakteriálních buněk (tj. dávka při požití) a potravinovými složkami, které mohou krýt bakterie před účinky pH. Tuto reakci můžeme přirovnat například k „deštníkovému efektu“.

Mohou to být například tukové složky potravin, které mohou chránit bakterie před žaludeční kyselinou při průchodu žaludkem (Blaser a Newman, 1982). To bylo prokázáno při vypuknutí salmonelózy (*Salmonella Typhimurium*) po požití čokolády, kdy sice byla kontaminace na velmi nízké úrovni, ale k onemocnění přesto došlo.

Častým projevem ochrany bakterií před účinky žaludečních šťáv jsou například léčiva podávaná pacientům s vředovou chorobou, kdy léky snižují sekreci žaludeční šťávy a tím se výrazně snižuje expozice bakterií proti pH. Nelze opomenout ani získanou rezistenci po předchozích stresech například z výrobního prostředí, životních podmínek ve výrobku apod. (Viz. další kapitoly). Kyselým prostředím stresované listerie (pH 5,5 po dobu dvou hodin) vykazují souběžnou multi-rezistenci k tepelnému ohřevu, osmotickým šokům (25 až 30 % soli) a účinkům alkoholu (15 %).

V odborné literatuře není mnoho informací o tom, zda existuje důvod k tomu, že se zvýšená vnímavost k listeriím váže na pohlaví (netýká se těhotných žen) jedince.



3. REZERVOÁRY *Lm* V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

3.1 Kde se vyskytuje? Jak přežívá ve vnějším prostředí?

Hale aj. (2015) uvádějí, že listeriózy, které vznikly po předchozím kontaktu se zvířaty (hospodářská, divoká i domácí) nebo s jejich životním prostředím, se podílí na celkové sumě listerióz asi od 0,5 až 2 %. Nejvyšší procento kontaktních příčin onemocnění se zvířaty je uváděno pro kampilobaktery 9 - 22 %, pro *E. coli* O157 asi 4 až 15 %, pro salmonely 6 až 20 %.

3.1.1 Vnější rezervoár

Významným rezervoárem a zdrojem listerií jsou hospodářská zvířata, lovná zvěř a maso z ní, ale jsou to i domácí mazlíčci.

EFSA (2014) uvádí v závěrečné zprávě údaj o pozitivitě *Lm* ve výkalech skotu, kdy bylo zjištěno, že 1,5 % vzorků bylo pozitivních. *Lm* se nachází v půdě, na čerstvé zelenině, jedná se o ubiquitous bakterii, která se může vyskytovat všude okolo nás a nelze se jí zbavit.

Není žádnou novinkou, že *Lm* mohou v životním prostředí šířit volně žijící ptáci. Přičemž významně vyšší promořenost byla zjištěna u ptáků, kteří se živí zbytky na skládkách a jiných odpadních zdrojích, než u ptáků z volné přírody (Hellström *et al.*, 2008).

Je třeba zmínit i hmyz, více než rezervoárem je hmyz přenašečem *Lm* (Anon., 17).

Lm byla kromě člověka izolována z nejméně 42 druhů divoce žijících i domestikovaných savců, 17 druhů ptáků, byla nalezena i v tělech ryb, koryšů, mlžů, much. Studie naznačují, že *Lm* žije v trávicím traktu až 10 % lidí, aniž by u nich vyvolala příznaky nemoci. Vyskytuje se také volně ve vnějším prostředí, v půdě, ve vodě, na rostlinách, přežije i v silážích.

Životní prostředí farem

Farmy orientované na chov přežvýkavců mohou být kromě jiného i významným rezervoárem *Lm* (Tabulky č. 3.1 a 3.2). Mnohé studie pojednávají o kontaminaci půdy, která je hnojena močůvkou, kejdou, hnojem apod. *Lm* byla prokázána nejen na povrchu půdy v rozsahu 8,7 až 51,4 %, ale i v hloubce do 10 cm v rozsahu 3,2 až 33,3 % (Weis a Seeliger, 1975).

Je známo, že povětrnostní podmínky, především sluneční záření, mohou v letních měsících počet *Lm* v aplikovaných kálech výrazně snížit. I když je půda silně kontaminovaná, není prokázáno, že by docházelo k dalšímu výraznému pomnožování *Lm*. Přežití *Lm* je především závislé na typu půdy, vlhkosti apod. Sklizené rostliny z těchto půd mohou být kontaminovány v rozmezí 9,7 až 44 % (Weis a Seeliger, 1975).

Častou příčinou hromadného onemocnění (listerióza) lidí bývá aplikace čerstvého hnoje nebo závlivky kontaminovanou vodou na záhony a pole před sklizní zeleniny a ovoce.

Esteban aj. (2009) sledovali přítomnost *Lm* v Baskicku. *Lm* prokázali ve výkalech 46 % ve vzorcích výkalů zdravého skotu (žír a dojnice odděleně), ovcí a prasat chovaných prasat *Lm* nezjistili.

Tabulka č. 3.1 Prevalence *L. monocytogenes* v různých formách životního prostředí (Anon., 18)

<i>L. monocytogenes</i> – prevalence		
Lokalizace	%	n - vzorků
Přírodní prostředí	1,3 – 8 %	NYS data
Městské prostředí	7,3 %	NYS data
Farmy skotu s případy listeriózy	24,3 %	(n = 616)
Farmy skotu bez výskytu případů listeriózy	20,1 %	(n = 643)
Farmy malých přežvýkavců s případy listeriózy	32,9 %	(n = 322)
Farmy malých přežvýkavců bez výskytu listeriózy	5,9 %	(n = 475)
<i>Listeria</i> species	asi 30 %	-

Tabulka č. 3.2: Prevalence *L. monocytogenes* v různých vzorcích z životního prostředí farmy (Van Renterghem aj., 1991).

Vzorky	Počet vzorků	Počet pozitivních (%)
Výkaly prasat	25	4 (16 %)
Výkaly skotu	25	5 (20 %)
Hněj	10	0 (0 %)
Orná půda	17	0 (0 %)
Spodní voda	15	1 (6,7 %)

Výskyt *Lm* v silážích

Častější výskyt *Lm* byl prokázán v balených silážích (asi 25 %) než v silážních jámách a silech (2,5 až 5,9 %). Souvisí to s větší plochou krmiva, která má kontakt se vzduchem a siláž má také vyšší pH (Fenlon, 1986a). Prokázáným zdrojem onemocnění zvířat byla například siláž, která obsahovala 12 000 KTJ

Lm/g a kontaminace byla především v povrchové vrstvě do 15 cm, pH bylo 8,3 až 8,6. V hlubších vrstvách siláže se *Lm* nevyskytovala, pH hlubších vrstev bylo $\leq 4,5$. U hnilobných procesů v siláži byla zjištěna kontaminace *Lm* $>1,1 \cdot 10^6$ KTJ/g. *Lm* může v nekvalitních zbytcích siláží přežít až několik let (Fenlon aj., 1986a).

Listerie se mohou vylučovat ještě asi osm týdnů do posledního podání kontaminovaného krmiva.

Výskyt *Lm* v odpadních vodách

Lm může velmi dlouho přežívat v odpadních vodách, které měly teplotu asi 4 °C. Přežívá v těchto podmínkách až 141 dnů (Budzińska aj., 2012). V teplotách kolem 20 °C byl čas přežití podstatně nižší, asi 47 dnů.

Tento čas přežití může být ovlivněn jak pozitivně, tak negativně dezinfekčními látkami, pH, vysokým obsahem organického odpadu

(masná výroba, mlékárna) apod. Je to významný zdroj kontaminace rostlin při využití odpadních vod k zalévání.

3.1.2 Vnitřní rezervoár

Hospodářská zvířata:

Hospodářská zvířata mohou být významným rezervoárem *Lm*, což může vést ke kontaminaci syrového mléka a masa. Takto kontaminované suroviny se stávají významným vehikulem *Lm* do výrobního prostředí a technologií ve zpracovatelských závodech, což při porušení systému HACCP může v konečném důsledku zapříčinit infekci člověka.

vzorky	Počet vzorků	Počet pozitivních	(%)
Výkaly prasat	25	4	(16)
Výkaly skotu	25	5	(20)
hnůj	10	0	(0)
Orná půda	17	0	(0)
Spodní voda	15	1	(6,7)

Infekční dávka a distribuce *Lm* u zvířat

Infekční dávka pro skot a malé přežvýkavce není známa. Uvažuje se o podobné infekční dávce jako u člověka s uplatněním věkové a produkční kategorie zvířete, funkčnosti imunitního systému apod. Inkubační doba je obdobná jako u člověka v rozmezí dvou až šesti týdnů (Low a Donachie, 1997).

Po perorální infekci (dávka 10^{10}) byla *Lm* transportována předžaludky ovcí asi za čtyři hodiny a ve vyloučených exkrementech byla zjištěna do 24 hodin. Vylučování ve výkalech přetrvává asi 10 až 14 dnů od podání jednorázové dávky. Již v průběhu prvního dne po podání infekční dávky se *Lm* vylučovala slinami ovcí. Maximální vylučování *Lm* bylo zjištěno druhý den po podání (3,6 krát 10^3 CFU/g). Během prvního dne byl nejvyšší obsah *Lm* prokázán v obsahu střeva a druhý

den ve stěně střeva (Nightingale aj., 2004).

Mízní uzliny (MU) retrofaryngeální a mandle byly více kontaminovány než MU mesenterické. Tato skutečnost jistě souvisí i s regurgitací u přežvýkavců. V menší míře byla kontaminována játra a plíce (< 50 CFU/g) a jejich příslušné MU. *Lm* nemusí být ovlivněna mikroflórou bachoru, může se v bachoru spíše pomnožovat, což je doloženo dlouhodobým vylučováním *Lm* v exkrementech (dva týdny po jednorázovém podání). *Lm* byla schopna perzistovat nejméně 14 dnů v zažívacím traktu pokusných ovcí, retrofaryngeálních mízních uzlinách (MU) a mandlích v poměrně vysokých dávkách (1 krát 10^4 CFU/g). Na druhé straně může také bachor hrát významnou roli pufovacího systému, hlavně při vysokých jednorázových infekcích zvířat z krmiva (Zundel a Bernard, 2006).

3.1.3 Potraviny – výskyt

Výskyt *Lm* v potravinách je běžně publikován výzkumnými pracovníky, autoritami jednotlivých členských států EU, stejně jako v sumárních přehledech, které předkládá EFSA, autority USA, australskými a novozélandskými autoritami (FSANZ apod.). *Lm* je všudypřítomná a byla izolována prakticky ze všech druhů potravin určených k přímé spotřebě. Výčet pozitivních (nevyhovujících) potravin by neměl konce. Proto se musíme omezit pouze na základní informace.



Prevence

- Správná výrobní praxe, hygienické postupy a účinná kontrola teploty během celého řetězce výroby, distribuce a skladování potravin a to i v domácnostech mohou omezit růst bakterie *Lm*, pokud by byla přítomna v potravinách určených k přímé spotřebě.
- Vnitrostátní orgány pro bezpečnost potravin v EU poskytují praktická doporučení spotřebitelům ohledně hygieny potravin a hygieny v kuchyni a obecně doporučují, aby ledničky byly nastaveny na teplotu 0 °C až 5 °C, v souladu s doporučeními Světové zdravotnické organizace.

Zkrácená legislativa:

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004 o hygieně potravin, v platném znění:

KAPITOLA IX**USTANOVENÍ TÝKAJÍCÍ SE POTRAVIN**

1. Provozovatel potravinářského podniku nesmí přijmout žádné suroviny nebo složky, kromě živých zvířat, ani jiné materiály používané při zpracování produktů, pokud je o nich známo nebo pokud by se dalo důvodně očekávat, že jsou natolik kontaminovány parazity, patogenními mikroorganismy nebo toxickými, rozkladnými nebo cizorodými látkami, že by i po hygienicky provedeném vytrídění nebo po přípravných nebo zpracovatelských procesech v potravinářských podnicích zůstaly stále nevhodné k lidské spotřebě.
2. Suroviny a všechny složky skladované v potravinářském podniku musí být uloženy ve vhodných podmínkách navržených tak, aby zabraňovaly jejich kažení, které ohrožuje zdraví, a chránily je před kontaminací.
3. Ve všech fázích výroby, zpracování a distribuce musí být potraviny chráněny proti jakékoli kontaminaci, která by mohla způsobit, že potraviny nebudou vhodné k lidské spotřebě, budou poškozovat zdraví nebo budou kontaminovány takovým způsobem, že by bylo nesmyslné očekávat, že by se mohly v takovém stavu konzumovat.

kávat, že by se mohly v takovém stavu konzumovat.

Co se týká legislativy potravin živočišného původu, čistota kůže je například řešena v nařízení (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu, kde je uvedeno, že **jatečná zvířata musí být čistá.**

3.2 Přenos do výroby živočišné**Kde se *Lm* bere a kde ji hledat a najít ve svém podniku?**

Listerie může být prakticky všude. Existuje mnoho potenciálních zdrojů kontaminace na jatcích, včetně:

- životní prostředí: bakterie se šíří různými cestami - vzduchem, aerosolem, přímým kontaktem (např. kůže zvířat, postřikové hadice čistícího zařízení, kondenzace, demontáž zařízení, atd.);
- zaměstnanci: oděvy, rukavice, boty, vše co přichází do přímého styku s vybavením výroby a zpracováním masa;
- živá zvířata vstupující na porážku;
- surovina - pokud se špatně čistí a dezinfikují výrobní zařízení, pokud neprobíhá kontrola vstupní suroviny (nakoupené);
- syrové produkty, ingredience (např. koření);
- chladicí technika nebo výrobní postupy (například nálevy, láky);
- vrácené produkty (Anon., 19).

Kromě těchto potenciálních zdrojů kontaminace jsou potvrzena další místa výskytu *Lm*. Především se jedná o místa s vysokou vlhkostí, kterou *Lm* potřebuje (mimo jiné) k růstu, proto musí být kontrolována například tato místa a zařízení:

- podlahy a kanalizace
- stojaté vody
- stropy a odkapové záchyty u nadzemního potrubí
- chladicí a kondenzační jednotky
- mokrá izolace
- stropní kolejnice a vozíky
- dřevěné palety
- popraskané hadice, těsnění dveří, zdí, nedostatečně uzavřené povrchové dlaždice
- vakuové pumpy, linky, hadice, kolečka, rozvodny, skříně motorů
- produkce ledu, vzduchové filtry, ložiska u řezaček a jiných zařízení (Anon., 19).

Poznámka: k rozvodům vody by se měly používat hadice, které jsou určeny k rozvodu vody. Nelze použít například zahradní nebo jiné druhy hadic. Uvnitř dochází k prasklinám a v nich se usazují bakterie (i patogenní), které mohou způsobit sekundární kontaminaci s následným onemocněním nebo se mohou výrazně podílet na kažení výrobků.

PŘENOS BAKTERIÍ**Pět základních cest šíření bakterií****u člověka:**

- 1) **Nos, ústa nebo oči:** bakterie se mohou šířit do rukou během kýchnutí, kašláním, když si mneme/otíráme oči, a pak mohou být přeneseny na jiné členy rodiny nebo na potraviny. Jednoduše – když si umyjete ruce, můžete zabránit takové nemoci jako běžné nachlazení nebo oční infekce.
- 2) **Z rukou na potraviny:** obvykle se přenáší bakterie z nečistých rukou do potravin. Potraviny jsou nejčastěji infikovány personálem, který si nedostatečně umyl ruce po použití toalety. Jde o klasickou sekundární kontaminaci.
- 3) **Z potravin na ruce a zpět na potraviny:** bakterie jsou přenášeny z nezpracovaných potravin (surovin), jako je kuře či syrové maso, na ruku při přípravě jídla. Bakterie na ruce jsou pak převedeny na jiné potraviny určené k přímé spotřebě nebo připravená jídla, saláty, zákusky apod. Vařením syrové potraviny se zničí prvotní kontaminace, ale salát a jiné připravené pokrmy zůstávají kontaminovány.
- 4) **Ze zvířete na člověka:** umyjte si ruce vždy po hlazení zvířat nebo dotykem s povrchy, které přicházejí do styku s nimi. V srsti, na jazyku, tlapkách se vyskytuje velké množství bakterií, plísňů a parazitů. Zvířata divoká, hospodářská, exotická a domácí mazlíčci jsou významným zdrojem i přenašečem zároveň.

5) Z nakaženého dítě - ruce – přenos na

jiné děti/osoby: bakterie jsou přeneseny od dítěte například s průjmem na ruce rodiče například během přebalování, ošetřování apod. Pokud si neumyjeme okamžitě a řádně ruce, bakterie se usídí v záhybech (Anon., 20).

Drůbež:

Dhama aj. (2013) upozorňují na to, že si musíme stále připomínat schopnosti bakterií způsobit lidské infekce, například po kontaktu s infikovanými ptáky nebo konzumací kontaminované drůbeže a drůbežích produktů, zejména těch, které jsou předem uvařené a připravené k jídlu. Nicméně mladí ptáci (kuřata, brojeři) mají většinou chronickou infekci, zatímco dospělí ptáci hynou náhle po septikémii nebo onemocnění CNS a občas vykazují známky meningoencefalitidy. Mladí ptáci jsou náchylnější k infekci *Lm*, což může mít za následek až 40% úmrtnost drůbeže. Vzhledem ke krátké době výkrmu brojlerů se nemusí onemocnění ani výrazně projevit. Infekce člověka a prostředí pak souvisí s přítomností *Lm* v peří a trusu. Samozřejmě je důležitý i počet zaměstnanců, kteří přicházejí do přímého kontaktu s drůbeží. Záněty spojivek jsou často považovány za banální záležitost a nebývají spojovány se zpracováním kuřat a jejich možnou infekcí *Lm*. Nástup bývá v těchto případech náhlý a infekce se může rozvinout do všech známých forem onemocnění (Rocourt a Bille, 1997; Swaminathan, 2001).

Prasata:

Lm může být příležitostně izolována ve výkalech i na povrchu těla zdravých zvířat. Prevalence je různá od 0 až 47 %. Na frekvenci výskytu i na procentu pozitivitu má velký význam ustájení a způsob krmení. *Lm* byla izolována ve výkalech v chovech se suchým krmením asi ve 2 %, oproti chovům s technologií vlhkého krmení, kde byla pozitivita *Lm* mezi 25 až 50 %.

Na jatkách se na kontaminaci povrchu jatečné upravených těl (dále jen „JUT“) významně podílí způsob eviscerace (vyjmutí vnitřních orgánů z těla). Bylo však opakovaně prokázáno, že nejsilnější rezervoár (místo kontaminace) *Lm* je kořen jazyka (14 %) a mandle u prasat (0 až 61 %). Je prokázáno, že všechny orgány a části jatečných prasat mohou být kontaminovány *Lm*, a to až v rozsahu asi 64 % (jazyk, jícn, trachea, plíce, srdce, bránice, ledviny a játra). To naznačuje kontakt a možný přenos *Lm* z tonzil a jazyka (při porážce) na jiné orgány (Autio aj., 2000).

Skot, malí přežvýkavci:

Jatečná zvířata krmená siláží (nebo balíky s fermentovanou pící či sušeným krmivem), která je často kontaminována *Lm*, mohou běžně vylučovat *Lm* z těla. Přeprava živých zvířat na dlouhé vzdálenosti (> 100 km) může výrazně zvýšit úroveň vylučování *Lm*.

Čištění dopravních prostředků pro převoz zvířat sice snižuje množství *Lm* (KTJ), ale neodstraňuje ji zcela (Fenlon aj., 1996).

Tabulka č. 3.3: Vliv přepravy zvířat na exkreci a kontaminaci JUT u skotu bakteriemi *L. monocytogenes* (Fenlon aj., 1996)

vzdálenost	<i>Listeria monocytogenes</i> v trusu						<i>Lm</i> stěry JUT		
	Před přepravou			Na jatkách			n	p (%)	max/g ⁻¹
n	p (%)	max/g ⁻¹	N	p (%)	max/g ⁻¹	n			
< 25 km	13	4 (31)	15	13	7 (53,8)	> 16 < 140	13	2 (15,4)	P
> 150 km	16	5 (31)	50	10	10 (100)	1 000*	16	0	P

Vysvětlivky: p = pozitivní nález *Lm*; P = pozitivní ve stěru

Kontaminovaná bývá kůže jatečného skotu. Nižší kontaminace *Lm* byla prokázána v létě a na podzim, naopak vyšší byla v zimě a na jaře.

3.3 Přenos do výroby vegetabilních potravin

Čerstvá zelenina bývá často kontaminována *Lm*. Jde především o brokolici, květák, pórek a jim podobné suroviny, protože se v nich dobře mohou udržovat nečistoty z pole a těžko se vymývají záhyby mezi listy nebo prostory mezi růžičkami například brokolice. Pozitivní bývá i mražená zelenina jako je hrášek, floky z mrkvi apod. To vše dělá poměrně značné komplikace u mražených výrobků jako je pizza nebo vegetabilní či veganská strava. Ani namáčení do antibakteriálních přípravků nepřineslo potřebné snížení *Lm*. Bakterie jsou chráněny vzduchem, který je přítomen v prostorech růžiček a nelze ho nijak vytěsnit.

Velkou pozornost by měli PPP věnovat strojům na čištění zeleniny. Několikrát denně by je měli řádně vymýt a zbavit nečistot (zeminy), která může být zdrojem sekundární kontaminace u jinak kvalitní suroviny. Pozor! Nejedná se pouze o *Lm*, ale také o salmonely a klostridia, která jsou často prokazována i v sušených přípravcích, jako je česnek a cibule.

Jak uvádí Botticella aj. (2013), *L. monocytogenes* byla izolována z široké škály syrové zeleniny včetně brambor, zelí, okurek, rajčat, ředkviček a dalších. Bylo také prokázáno, že *Lm* je schopna aktivně se množit na několika jiných druzích zeleniny včetně celeru, hlávkového salátu, kukuřici, chřestu a brokolici, zatímco u jiných druhů zeleniny, jako je fenykl, mrkev a rajčata bylo prokázáno, že jsou špatným substrátem pro růst této bakterie. Bylo prokázáno, že *Lm* je schopna růst a množit se v zelenině, která je balena a ukládána v modifikované atmosféře a chladu. Navzdory údajům, které naznačují nízkou prevalenci a nízké koncentrace *Lm* u opra-

cované zeleniny a čerstvě vyrobených potravin, spotřeba těchto produktů je spojována s občasnými ohnisky listerióz v populaci.

3.4 Primární a sekundární kontaminace:

Co je primární kontaminace (neúmyslná)?

Jde o kontaminaci (tzv. neúmyslnou) z původního, vnějšího prostředí, kde se nachází jatečné zvíře nebo surovina pro výrobu potravin. **Může jít i o nemocná zvířata.**

Co je zkřížená/křížová/sekundární kontaminace?

Většinou nejde o kontaminaci z primárního zdroje. Jde o to, že zdravotně nezávadná surovina, polotovar, rozpracovaný nebo hotový pokrm je kontaminován mikroorganismy (např. křížová kontaminace z prostředí nástrojů, zařízení, rukama pracovníků atd.). Lze ji definovat také jako přenos mikroorganismů (bakterií apod.) z míst jejich přirozeného výskytu, např. ze syrového masa,

zeleniny, vajec na ostatní potraviny či pokrmy, které se používají bez předchozí tepelné úpravy k výživě člověka.

Pro výrobce je zásadní sekundární kontaminace, protože jde o jejich zodpovědnost za bezpečnou potravinu. Nemocná zvířata nebo nebezpečná surovina by měla mít úplně jiný režim porážky, zpracování apod. To řeší dozorové orgány!

Sekundární kontaminace:

Mikroorganismy mohou být při sekundární kontaminaci přeneseny **přímo/horizontálně** nebo **nepřímo/vertikálně**.

Běžným příkladem **přímo/horizontální** kontaminace je přenos mikrobiálních agens např. štávou nebo krví ze syrového masa v chladničce na hotové pokrmy. Může se stát, že maso či zelenina nejsou v nákupní tašce dobře zabaleny a kontaminují přímo ostatní nakoupené potraviny nebo jejich obaly.

Nepřímo/vertikálně dochází ke křížové kontaminaci poživatin při otvírání znečištěných obalů, neumytými rukama, špinavým kuchyňským zařízením – noži, krájecími prkénky, nádobím nebo znečištěnou pracovní plochou. Co se výroby týká, je mnoho potvrzených zdrojů. Na výrobním zařízení a v prostorech, kde se potraviny vyrábějí, mohou být bakterie přítomny ve formě biofilmů nebo pouze krátkodobě ulpěly na kontaktní i nekontaktní ploše při nevhodné manipulaci při mytí, opracování suroviny apod.

Průzkum prováděný WHO (1995) v Evropě naznačil, že téměř 25 % původců onemocnění z potravin (evidovaných ohnisek) je možno vysledovat zpět ke zdroji kontaminace, kde bakterie mohou persistovat a mohou být i příčinou opětovné sekundární kontaminace.

Jedním ze základních zdrojů sekundární kontaminace je mnohočetná manipulace s výrobkem a jeho dělení nářezem.

Sheen (2008) uvádí výsledky umělé kontaminace kráječe (nářezáku) a následný přenos *Lm* na plátky. Vždy záleží na celkové počtu sledované bakterie, například nízká úroveň kontaminace *Lm* (3 až 4 log KTJ), má za následek kontaminaci zhruba 70 až 100 řezů. Při vyšších úrovních inkulu (6 log KTJ a více) se kontaminace prokázala mezi 200 až 350 řezy.

Také záleží na druhu výrobku, který je krájen - kolik obsahuje vody a hlavně tuku, zda je

tuk lehce roztíratelný nebo tuhý apod. Lehce roztíratelný tuk pokryje celý nářezový nůž a trvá delší dobu, než se přenesou z nože na jiné (sušší) krájené výrobky. Přenos probíhá velmi rychle při krájení fermentovaných, zrajících sýrů na krájené potraviny tepelně ošetřené. Jedná se o přenos jak patogenních bakterií, tak kulturních bakterií, které na tepelně opracovaném výrobku začnou působit svojí lipolytickou i proteolytickou aktivitou nepříznivě sensorické změny – oslznutí, nakyslost, zápach apod.

Ať se už jedná o primární nebo sekundární kontaminaci potravin, které jsou tepelně ošetřeny pasterační teplotou, je nutné mít na paměti, že tato teplota nedosahuje parametrů sterilizace!

Bohužel, v současné době neexistuje legislativa, která by nařizovala limity pro celkové počty mikroorganismů (dále jen CPM) v tepelně opracovaných potravinách tak, jak tomu bylo před rokem 2005. Toto stanovisko můžeme podpořit konstatováním, že *Lm* je často prokazována (pozitivní/ 25 g) ve výrobku v prvotním obalu, který nebyl narušen. Například v párcích, tyčových salámech, tlačenkách apod. Vysoké CPM jsou předzvěstí i možné kontaminace *Lm*. Když různé bakterie přežijí fázi výroby ve vysokých počtech, zcela určitě přežije i *Lm*.

Patogenní bakterie nacházející se ve výrobě mohou pocházet nejen od infikovaných výrobních zaměstnanců (*bacilonosiči*), ale i ze



špinavých pracovních oděvů, bot, nástrojů a vybavení pracovníků údržby, kteří se pohybují a pracují na opravách výrobních zařízení i v průběhu výroby.

Nejčastějším zdrojem kontaminace pracovníků je fekálně-orální cesta. Výsledky různých studií ukázaly a potvrdily i méně zvažované cesty kontaminace potravin, například od pracovníků - kontakty se syrovými potravinami, především živočišného původu, aerosoly od zaměstnanců i cizích osob - dýchání, kýchání, apod. Exponované ruce a delší dobu se nehojící až hnisavá ložiska na ruce byly rovněž spojeny s řadou ohnisek onemocnění člověka po požití infikovaných potravin.

Přenos patogenů byl zdokumentován i z domácího prostředí prostřednictvím kontaminovaných oděvů a potravin doma připravených. Častým problémem jsou prsteny u výrobních pracovníků, kuchařů, obsluhy v restauraci a prodavačů; významný je i přenos přes peníze; přenos bakterií z povrchu kůže při podávání rukou, kliky, madla ve výtahu, prach a aerosoly apod. Stálý zdroj kontaminace mohou představovat vlhké čisticí utěrky. Nejen proto, že je tam vysoká pravděpodobnost významné kontaminace, ale ze samotné podstaty jejich využití nesou vysoké riziko šíření kontaminace na jiné povrchy, včetně přenosu na ruce.

Fijan aj. (2006) se zabývali otázkou, zda oděvy (pro zaměstnance z jatek) z čistírny jsou

mikrobiologicky čisté. Nečistoty byly zjevně odstraněny, ale jak se zjistilo, oděv není zcela sterilní. Zkušenosti by měly alarmovat kontrolní týmy v prádelnách i v potravinářských provozech k výraznější aktivitě, aby se otázce kvalitního praní velmi vážně věnovaly. Některé přeživší bakterie po vyprání a žehlení mohou ohrozit v první řadě pracovníky, protože právě oni je mají v přímém kontaktu s kůží. Kontaminované oděvy (až 20 %) byly pozitivní na mikrokoky, korynebakterie, stafylokoky (koaguláza negativní), *Bacillus cereus*, enterokoky atd. v množství i > 100 CPM/dm².

3.4.1 Aerosol

Aerosol: je heterogenní směs malých pevných nebo kapalných částic v plynu. První případ se také označuje jako dým, druhý jako mlha. Rozptýlené částice mají velikost od 10 nm do 10 μm, což odpovídá shlukům několika molekul až částicím tak hmotným, že už nemohou snadno poletovat v atmosféře (Anon., 21).

Bioaerosol: lze definovat jako aerosol biologického původu obsahující bakterie, viry, spory plísní, rozočte, mrtvé i živé buňky, pyl, zbytky organismů apod. Velikost částic se pohybuje v rozmezí 0,5 až 2,5 μm.

Bioaerosoly můžeme dělit do dvou hlavních skupin na životaschopné nebo **mrtvé**. Aerosolové částice první skupiny obsahují živé organismy, které mohou při dostatku živin růst a tvořit viditelné kolonie. **Neživý**

bioaerosol obsahuje mrtvé organismy, pyl, zbytky zvířat, exkrementy hmyzu. Mezi nejrozšířenější bioaerosoly řadíme spóry hub a bakterií.

Poměr mezi životaschopnými a neživými částicemi $\geq 0,5 \mu\text{m}$ byl odhadován na 1:10 000. V průmyslových procesech mohou prachové částice způsobit nejen kontaminaci rezidui cizorodých látek do výrobku, ale také mikrobiální kontaminaci (Ljungqvist a Reinmüller, 1993).

Koncentrace bioaerosolových částic v ovzduší závisí na celé řadě faktorů jako je vítr, počasí a přítomnost či nepřítomnost zdroje bioaerosolů. Běžné venkovní koncentrace se pohybují v rozmezí 100 až 1 000 jednotek kolonií na m³. Vnitřní prostředí s přirozenou ventilací vzduchu a bez přítomnosti

zdroje poskytuje nižší koncentrace v rozmezí do 100 jednotek na m³. Vysoké koncentrace bioaerosolů (10⁴ až 10¹⁰ jednotek na m³) nacházíme v prostředí farem, potravinářských závodů, skládek apod. (Anon., 22).

Je známo, že větší kapénky (5 μm) sedají rychleji - během několika minut - než menší (0,3 μm), které potřebují asi 4 hodiny. V tomto případě má minimální efekt vlhkost. Minimální rozdíl v usedání kapének byl při relativní vlhkosti (dále jen „RV“) 40 % a 75 %. Pokud byl rozprach *Lm* v aerosolu při hodnotách 1,5 krát 10² či 2,5 krát 10², nebyla prokázána kontaminace na exponovaných vzorcích ani po 4 hodinách. Při koncentraci *Lm* 3,5 krát 10⁵ byly všechny exponované vzorky pozitivní do 30 minut. V tomto případě byla rychlejší kontaminace prokázána při RV 75 %.



Celkový počet listerií v aerosolu rychle klesá během první hodiny, poté se úbytek počtu zpomaluje. Po třech hodinách nebyly listerie ve vzduchu prokázány. *Lm* bývá prokázána na stěnách, podlaze, kanálových vpustích a mohou přežívat nepříznivé podmínky více než 151 dnů v 10 °C a relativní vlhkosti (dále jen RV) 88 %, přežije i nulovou RV při 22°C po dobu 82 dnů (Zhang aj., 2007). Větší partikule aerosolu než 5 µm mohou na sebe vázat více než jednu buňku *Lm*.

Berrang aj. (2013) zjišťovali, jak listerie mohou kolonizovat podlahové vpusti potravinářských podniků, kde přežívají a přetrvávají léta, než dojde k jejich úplné eliminaci, pokud k ní vůbec dojde. Jedním z problémů je, že tento organismus může uniknout z podlahové vpusti během mytí dál do kanalizace, anebo se dostává při tlakovém mytí do aerosolu a vzduchem se šíří dál. Vznik aerosolové směsi kontaminované listeriami může kontaminovat maso, výrobní prostředí včetně zařízení.

Co z toho vyplývá?

- 1) Podlahové vpusti mohou být kontaminovány *Lm* a při mytí mohou být bakterie vymývány do aerosolu a šířeny do okolí.
- 2) Přímé šíření vzduchem během mytí bylo prokázáno na vzdálenost asi 2,4 metru.
- 3) Během skladování masa po čtyři dny se podstatně nezměnily nízké počty listerií na syrovém kuřecím mase, které bylo kontaminováno sprejem pocházejícího z mytí podlahy.
- 4) Pouze efektivní čištění a dezinfekce může být dobrou prevencí masivní kontaminace

ce při porcování či vykostování drůbeže. Může se tím zabránit přenosu výrazného množství listerií na surovinu v části podniku, kde se zpracovává syrové maso. Lze tím omezit šíření *Lm* do míst, kde dochází k tepelnému opracování nebo expedici syrového masa k prodeji.

Voda: *Lm* může přežít 10 až 30 dnů ve vodovodním potrubí při 28 až 30°C (voda z kóhoutu). Nebo 7 až 110 dnů / při 5 až 10°C. V rybníční vodě přežije asi 8 týdnů.

V následující tabulce jsou uvedeny výsledky měření šíření bakterií KTJ v průběhu různých aktivit (příhod). Počty bakterií (KTJ) jsou uvedeny na jeden akt. Celkové počty *Lm* nebyly uvedeny.

Tabulka č. 3.4.: Šíření bakterií aerosolem nebo vzduchem v průběhu různých aktivit (projevů) člověka (Fernstrom a Goldblatt, 2013).

Aktivita	Průměrný počet bakterií (KTJ)	jednotka
Kýchání	40 000	kýchnutí
Průjem	20 000	událost
Zvracení	1 000	událost
Kašel	710	událost
Mluvení	36	100 slov

Dále bylo prokázáno, že *Lm* může být přenášena i v chladícím tunelu s mrazíci teplotami -16 až -18 °C. Kontaminace touto cestou byla prokázána při výrobě zmrzlin. Stejně tak byla objasněna kontaminace

potravin stavebním prachem, který obsahoval *Lm*.

Vzduch, který přichází do styku s potravinami, musí být kontrolován! Kvalita vzduchu ve výrobním prostředí je řízena výrobcem potravin. Pro PPP je proto nezbytné věnovat této problematice náležitou pozornost a provádět nejen včasnou výměnu filtrů, ale provádět i ověřovací kontroly na kvalitu ovzduší, v rámci výrobního prostředí, a stále tak snižovat míru znečištění vzduchu (Wirtanen aj., 2002).

3.4.2 Ruce a osobní hygiena

Ruce: ruce jsou hlavní cestou přenosu mikroorganismů na potraviny.

Nehty musí být: krátce strženy, bez laku, nenalepovací.

Mytí rukou: ruce se musí umývat vždy:

- před vstupem na pracoviště
- před zahájením práce
- po jídle, pití, kašlání, kýchání, smrkání
- po použití WC
- po doteku tváře, nosu, rtů a uší
- po manipulaci s odpadky a vnějšími obaly
- po manipulaci s chemikáliemi a čistícími přípravky
- a dále při jakémkoliv změně činnosti
- nasadit si pokrývku hlavy
- obléct si pracovní oblečení, které kompletně zakryje civilní oblečení
- důkladně si umýt ruce.

Jedná se o celou řadu povinností, ale z prostorových důvodů se musíme omezit pouze na těchto pár doporučení (Anon., 23).

Rezidenční bakterie: jedná se o bakterie, které se běžně nacházejí na lidské kůži. Tyto mikroorganismy existují na kůži normálních, zdravých lidí a obvykle nejsou škodlivé. Tyto bakterie zdomácněly na kůži člověka a nemohou být zcela odstraněny. Bakterie žijí v mikrokoloniích, které jsou obvykle hluboko v pórech kůže a chrání je tuková sekrece mazových žláz.

Přechodné bakterie: na rukou se nacházejí ve velké míře tak zvané „přechodné bakterie“. Zaměstnanci píšou, zvedají telefon, pracují s penězi, připravují jídlo z domova a provádějí mnoho dalších manuálních činností. Ve skutečnosti se na rukou shromažďují bakterie z každé činnosti, kterou pracovníci vykonávají. Proto je nutné odstranit co nejvíce z těchto bakterií účinným mytím rukou, včetně účinného drhnutí nehtů. Zaměstnanci by také měli používat sanitální prostředky ke snížení přenosu kontaminace, před zahájením práce. *Ochranné rukavice pomáhají zabránit přenosu patogenních bakterií z prstů a rukou do potravin a kromě toho mají i příznivý psychologický účinek na personál.*

Nicméně kůže pod rukavicemi může být silně znečištěna potem, který se akumuluje v prostoru mezi rukavicemi a kůží. Vlhkosti a tepla na kůži využívají bakterie k pomnožení. Účinné mytí rukou je tedy nezbytné, ale před použitím rukavic musí být ruce suché!

Uvádí se, že přibližně 25 % kontaminace potravin je důsledkem nesprávného mytí rukou. Mytí rukou mýdlem a teplou vodou je nutné k přerušení přenosu mikroorganismů z rukou na potraviny nebo zařízení. Vyšší účinnost mytí rukou se docílí mnutím rukou nebo drhnutím kartáčem s mýdlem. Pracovníci musí být v této činnosti stále cvičeni a kontrolováni (Anon., 24).

Většina lidí si neumývá ruce dost dlouho. Byl proveden pokus odstranění salmonel po předchozím mytí. Salmonela byla prokázána za 10 minut po 15 sekundách předchozího mytí rukou. Jak již bylo uvedeno, ruce se musí řádně vysušit, protože zbytková vlhkost na rukou je hlavním faktorem, který umožňuje přenos bakterií z rukou do potraviny nebo na kontaktní plochy. Bakterie se šíří asi 1 000 krát více z vlhkých rukou než suchých. Nejvýhodnějším odstraněním bakterií z rukou je kombinace mýdla a desinfekce v jednom prostředku. Pokud se používají odděleně, jejich účinnost je nižší.

Nejčastěji prokazované rezidenční bakterie:

- *Staphylococcus aureus* - byl prokázán u vzorků ze stěrů - 22 % v nose, 6 % v krku, 25 % v kožních lézích, 40 % na rukou kuchyňského personálu
- *Listeria* - byla zjištěna na rukou 12 % potravinářských pracovníků

- virus hepatitis A- může způsobit virové onemocnění přenosem z potravin. Virus byl na ruce prokázán ještě 4 hodiny po nedostatečném umytí rukou (Anon., 25).

Kerr aj. (1993) prověřovali kontaminaci *Lm* na rukou pracovníků v potravinářském sektoru. Zjistili, že 12 % kontrolovaných osob bylo pozitivních na *Listeria spp.* a 7 % bylo pozitivních na *Lm*, přičemž 4 osoby byly nositeli dvou druhů a jedna osoba tří druhů listerií.

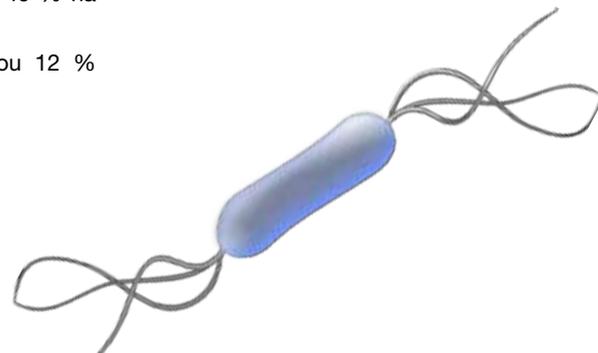
4. VÝSKYT *Lm* V JEDNOTLIVÝCH DRUZÍCH POTRAVIN

4.1. Rozdělení potravin

Nařízení (ES) č. 2073/2005 jasně definuje kategorii potravin na nepodporující a podporující růst *L. monocytogenes*:

Kapitola 1. Kritéria bezpečnosti potravin

Upozornění: citujeme odpovídající články z nařízení, proto neodpovídají níže uvedené číselné odkazy běžné posloupnosti



Kategorie potravin	Mikro-organismus	n	Plán odběru vzorků		Limity	Fáze, na niž se kritérium vztahuje
			c	m		
1.1 Potraviny určené k přímé spotřebě pro kojence a zvláštní léčebné účely (4)	<i>Listeria monocytogenes</i>		10	0	nepřítomnost ve 25 g	produkty uvedené na trh během doby údržnosti
1.2 Potraviny určené k přímé spotřebě, které podporují růst <i>Lm</i>			5	0	100 KTJ/g (5)	produkty uvedené na trh během doby údržnosti
1.3 Potraviny určené k přímé spotřebě, které nepodporují růst <i>Lm</i> (4), (8)	<i>Listeria monocytogenes</i>		5	0	nepřítomnost ve 25 g (7)	Předtím než potravina opustí bezprostřední kontrolu PPP, který ji vyrobil
			5	0	100 KTJ/g	produkty uvedené na trh během doby údržnosti

Vysvětlivky:

- (1) **n** = počet jednotek tvořících vzorek; **c** = počet jednotek vzorku, jejichž hodnoty převyšují **m** nebo leží mezi **m** a **M**.
- (4) Pravidelné provádění vyšetření podle příslušného kritéria není za běžných podmínek užitečné u těchto potravin určených k přímé spotřebě:
- u takových, které byly tepelně ošetřeny nebo jinak zpracovány za účelem účinného odstranění *L. monocytogenes*, pokud po tomto ošetření není možná opětovná kontaminace (např. výrobky, které jsou tepelně ošetřeny v konečném obalu),

- u čerstvé, nekrajené a nezpracované zeleniny a ovoce, vyjma naklíčených semen,
- u chleba, sušenek a podobných výrobků,
- u vod, nealkoholických nápojů, piva, jablečného vína, vína, lihovin a podobných výrobků v lahvích nebo baleních,
- u cukru, medu a cukrovinek, včetně výrobků z kakaa a čokolády,
- u živých mlžů.

- (5) Toto kritérium platí, pokud je výrobce schopen ke spokojenosti příslušného orgánu prokázat, že výrobek nepřekročí

limit 100 KTJ/g po celou dobu údržnosti. Provozovatel může pro průběh procesu stanovit průběžné limity, které musejí být dostatečně nízké, aby zaručily, že limit 100 KTJ/g nebude na konci doby údržnosti překročen.

(7) Toto kritérium se vztahuje na výrobky před tím, než opustí bezprostřední kontrolu provozovatele potravinářského podniku, který je vyrábí, pokud není schopen ke spokojenosti příslušného orgánu prokázat, že výrobek nepřekročí limit 100 KTJ/g po celou dobu údržnosti.

(8) Výrobky s $pH \leq 4,4$ nebo $a_w \leq 0,92$, výrobky s $pH \leq 5,0$ a $a_w \leq 0,94$, výrobky s dobou údržnosti pod 5 dní jsou automaticky považovány za výrobky spadající do této kategorie. Je-li to vědecky opodstatněné, mohou do této kategorie spadat také jiné kategorie výrobků.

4.1.1 Kontaminace syrového masa *Lm*

Při jatečném zpracování zvířat může dojít ke kontaminaci masa *Lm* ze srsti/peří a obsahu střev poražených zvířat. *Lm* bývá zjištěna na vepřovém, hovězím i drůbežím mase. Vysoká prevalence *Lm* bývá na tonzílách prasat. Variabilita výskytu na tonzílách, měkkém patře a kořeni jazyka se pohybuje v rozmezí 7 až 45 %. Manipulace s touto tkání může znamenat i výraznou kontaminaci technologického zařízení a její následné šíření v masném podniku (Buncic, 1991).

Vepřové maso

V roce 2015 oznámilo 20 členských států (dále jen „ČS“) EU údaje o výskytu *Lm* v RTE z masných výrobků z prasat, 18 z nich uvedlo údaje o průkazu *Lm*. *Lm* byla zjištěna u 4,2 % z testovaných 2 382 vzorků na úrovni maloobchodu a 2,1 % z testovaných 9 226 vzorků na úrovni výroby (Anon., 26).

Hovězí maso

Údaje o pozitivitě *Lm* v RTE z hovězího masa v roce 2015 byly hlášeny ve 13 ČS (Anon., 1). Pozitivních bylo 4,4 % ze 180 vzorků z tržní sítě. Dále bylo zjištěno, že *Lm* byla prokázána ve 2,0 % z celkem 1 519 vzorků z výroby. Žádný z 10 MS nehlásil překročení limitu 100 KTJ/g u RTE z hovězího masa kvantitativním vyšetřením.

Drůbeží maso

V roce 2015 oznámilo 13 ČS údaje o výskytu *Lm* v RTE z masa brojlerů a 11 ČS hlásilo údaje o *Lm* v RTE produktech z krůtího masa. Srovnáním s údaji hlášenými na EFSA dříve v roce 2014, byl v roce 2015 zjištěn mnohem nižší počet nevyhovujících jednotek RTE z masa brojlerů. V roce 2015 nebyla *Lm* zjištěna v žádném z 342 RTE z masných výrobků z brojlerů z obchodu (metodou průkazu). *Lm* byla izolována ze vzorků z výroby na úrovni 3,4 % z celkového počtu 1 245 testovaných jednotek. Většina (73,8 %) pozitivních vzorků z výroby byla hlášena z Polska. Z celkem 1 339 vzorků,

které byly vyšetřeny na počet *Lm*, byl limit 100 KTJ/g překročen pouze u pěti jednotek z Polska a Irska (Anon., 27).

Tabulka č. 4. 1: Prokázané serotypy a zdroje *L. monocytogenes* u skotu

Serotypy LM u skotu (7)					
Izoláty LM Zdroj	n	Serotyp <i>Lm</i> – počet pozitivních izolátů			
		1/2a	1/2b	1/2c	4b
Kůže	22	19	0	1	2
Jatečně upravená těla (JUT)	1	1	0	0	0
Hovězí maso	8	7	0	1	0
Celkem	31	27	0	2	2

Komentář k tabulce č. 4.1.: kůže je silným zdrojem patogenních bakterií (v tomto případě *Lm*) a může způsobit při špatné technologii stahování kontaminaci JUT.

Khen aj. (2014) uvádí, že v Irsku zjistili na hovězí kůži kontaminaci *Lm* u 27 % vzorků. Povrch masa byl kontaminován ve 14 %, mleté maso v obchodní síti vykazovalo pozitivitu ve 29 % (nejvyšší hodnoty byly 100 až 200 CFU *Lm/g*).

Jiné údaje byly zjištěny v Polsku (Wieczorek a Osek, 2010), kdy byla *Lm* prokázána na hovězí kůži u 10,8 % vzorků, hovězí maso bylo pozitivní u 2,5 % vzorků. Kontaminaci dominoval serotyp 1/2a (87 %), minoritními byly serovary 1/2c a 4b (oba serovary byly zjištěny pouze u 2 vzorků z 31 vyšetřených).

Co se týká legislativy – čistota kůže je řešena v nařízení (ES) č. 853/2004, kde je uvedeno, že jatečná zvířata musí být čistá.

Intervence vedoucí ke snížení mikrobiální kontaminace JUT (Duffy a Danaher, 2014) je založena především na ošetření povrchu JUT a týká se umytí studenou nebo horkou vodou, postřikem organických kyselin, apod.

Nařízení Komise (EU) č. 101/2013 povoluje použití kyseliny mléčné ke snížení povrchové mikrobiální kontaminace JUT skotu. Je povoleno sprejování nebo mízení 2% až 5% roztokem kyseliny mléčné v pitné vodě, při maximální teplotě 55 °C. Pro použití jsou vyžadovány kontrolovatelné a ověřitelné podmínky a integrace do systému řízení kvality (HACCP = systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů).

Prevalence *Lm* v syrovém masu je samozřejmě velmi rozdílná. Údaje o počtu pozitivních vzorků z různých zemí jsou uvedeny v tabulce č. 4.2 (Jemmi a Stephan, 2006).

Tabulka č. 4.2: Prevalence *L. monocytogenes* v syrovém masu

(Jemmi a Stephan, 2006).

Země	maso	n - počet vzorků	Pozitivních %
Itálie	maso nezájmého druhu	113	8
Belgie	drůbež	772	38
UK	drůbež	100	60
Dánsko	mleté maso	67	28
Francie	maso nezájmého druhu	112	17
Japonsko	mleté hovězí	34	21
	mleté maso	400	11

Komentář k tabulce č. 4.2. V tabulce jsou uvedena procenta pozitivních nálezů *Lm* u jednotlivých masných produktů. Prevalence se zdá být poměrně vysoká, ale jedná se o syrová masa! Pokud se zamyslíme nad výrobou tatarských bifteků nebo nad proklamovanou úpravou hamburgerů a steaků (lehce za syrova, krvavé) při grilování, tak výše uvedená pozitivita nevěští nic dobrého (zdravého). Přece jen můžeme vidět jeden základní rozdíl a tím je možné průjmové onemocnění a možné fatální následky listeriózy! Potom ale nesmíme svádět všechny problémy na PPP!

Při porovnání rozmělněných mas s celým svaalem se předpokládá, že nepoškozené, celé svaly by měly být sterilní (Elmossalami a Wasef, 1971). Výzkum však ukázal, že bakterie, včetně *Lm*, se mohou přenést (díky jejich schopnostem) do celosvalových produktů. Bakterie, například *Salmonella Enteritidis*, migruje do hovězího svalu 5, 10 a 15 cm po 12, 24 a 36 h (při 30 °C). Penetrace byla pomalejší, ale stále pozorovatelná při teplotě 7 °C a 10 °C. Gill a Penney (1977) prokázali, že *S. Typhimurium* pronikla 3, 7 až 10 cm/h do hovězí svaloviny při 20 °C, 30 °C a 37 °C.

Penetrace je schopna i *Lm*, jen není k dispozici tolik literárních údajů, jako například pro salmonely. Ono to není zase tak důležité pro masné výrobky, kde se využívá injekční aplikace solí, protože dochází k „omývání syrového masa“ a *Lm* se dostává do hlubších vrstev jednak lákem, ale i jehlami aplikačního zařízení (Orta – Ramirez aj., 2005; Anon., 28).

4.1.2 Česká legislativa

V § 8 vyhlášky č. 69/2016 Sb., o požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich; jsou uváděny **základní pojmy**:

- **tepelně neopracovaným masným výrobkem** zpracovaný masný výrobek určený k přímé spotřebě bez další úpravy, u něhož ve všech částech neproběhlo tepelné opracování surovin ani výrobku odpovídající působení teploty plus 70 °C po dobu 10 minut;
- **trvanlivým tepelně opracovaným masným výrobkem** zpracovaný masný výrobek, u kterého bylo ve všech částech dosaženo minimálně tepelného účinku odpovídajícího působení teploty plus 70 °C po dobu 10 minut a navazujícím technologickým opracováním, zráním, uzením nebo sušením za definovaných podmínek došlo k poklesu aktivity vody na hodnotu a_w (max.) = 0,93 a k prodloužení minimální doby trvanlivosti na 21 dní při teplotě skladování plus 20 °C a za případně dalších skladovacích podmínek;
- **fermentovaným trvanlivým masným výrobkem** zpracovaný masný výrobek tepelně neopracovaný určený k přímé spotřebě, u kterého v průběhu fermentace, zrání, sušení, popřípadě uzení za definovaných podmínek došlo ke snížení aktivity vody na hodnotu a_w (max.) = 0,93, s minimální dobou trvanlivosti 21 dní při teplotě plus 20 °C a za případně dalších skladovacích podmínek.

Poznámka: vyhláška č. 326/2001 Sb. byla zrušena (Anon., 31).

4.1.3 Výskyt *Lm* v tepelně opracovaných výrobcích

RTE – potraviny z masa určené k přímé spotřebě

Výskyt *Lm* v masných výrobcích je obecně nízký. I když – pouze teoreticky vzato – jedná se o bakteriální KTJ *Lm* má potenciál vyvolat onemocnění. Většina epidemiologických údajů prokázala, že potraviny prokazatelně spojené se vznikem ohniska listeriózy jsou ty, ve kterých je *Lm* pomnožena a obecně dosáhla úrovně výrazně > 1 000 KTJ Lm/g^{-1} (Anon., 29).



Tabulka č. 4.3: Přehled stanovení *L. monocytogenes* v tepelně opracovaných masných výrobcích (TOMV) provedených SVÚ v letech 2014 až 2016

Rok	Komodita TOMV	Počet vzorků vyšetřených na průkaz <i>Lm</i>				Analýzy – průkaz <i>Lm</i>		
		pětice	pětice nevyhov.	jednotlivé	jednotlivé nevyhov.	počet	nevyhovujících	%
2014	drůbeží	100	6	44	0	544	13	2,4
	červené	2 087	80	695	7	11 130	192	1,7
2015	drůbeží	2	0	27	0	37	0	0
	červené	117	2	284	1	869	4	0,5
2016	drůbeží	102	7	22	0	532	19	3,6
	červené	1 908	67	919	4	10 459	141	1,4

Rok	Komodita TOMV	Počet vzorků vyšetřených na počty <i>Lm</i> (KTJ/g)				Analýzy – stanovení počtu <i>Lm</i>		
		pětice	pětice nevyhov.	jednotlivé	jednotlivé nevyhov.	počet	nevyhovujících	%
2014	drůbeží	9	0	12	0	57	0	0
	červené	413	0	139	0	2 204	0	0
2015	drůbež	0	0	0	0	0	0	0
	červené	12	0	7	0	67	0	0
2016	drůbeží	8	0	3	0	43	0	0
	červené	408	0	214	0	2 254	0	0

Komentář k tabulce č. 4.3.: Počet nevyhovujících vzorků (průkaz *Lm*) v průběhu posledních let je plíživě narůstající. A to jak u drůbežního, tak u červeného masa. TOMV z drůbeže jsou častěji kontaminovány *Lm* než výrobky z červeného masa. Při stanovení počtů *Lm* (limit ≤ 100 KTJ *Lm/g* výrobku) byly výsledky vyhovující.

Prevalence *Lm* v tepelně opracovaném kuřecím masu (RTE):

Jak uvádějí informace FSANZ (2013), kontrolním vyšetřením RTE z drůbežního masa byla zjištěna *Lm* v různých zemích v rozsahu 0,5 až 15 % u různých pozitivních vzorků.

- sledování v Austrálii (NSW) v roce 2010 přineslo informace o pozitivních vzorcích (5,3 %) krájeného (RTE) drůbežního masa na úrovni tržní sítě (n=38 vzorků).
- při sledování v UK v roce 2007 bylo zjištěno 0,5 % pozitivních vzorků krájeného drůbežního masa (n = 402 vzorků) na úrovni tržní sítě. Úroveň kontaminace byla < 100 KTJ/g.
- obdobné sledování kontaminace bylo provedeno v Jordánsku, kde bylo 15 % pozitivních RTE drůbežních výrobků jak v obchodě, tak ve výrobě (n = 120 vzorků). Hodnoty kontaminace byly ≤ 100 KTJ/g.

4.1.3.1 Kde najdu *Lm* ve svém zařízení/podniku?

Lm může být prakticky všude. Existuje mnoho potenciálních zdrojů kontaminace na jatkách, ve výrobě až po expedici včetně:

- životní prostředí: vzdušné bakterie, kontaminace z narušených zařízení (např. stříkácí hadice, kondenzace, demontáž zařízení, atd.)
- zaměstnanci: oděvy, rukavice, boty, vše co přichází do přímého styku s vybavením
- produkt: pokud se špatně čistí a dezinfikují výrobní prostory a zařízení
- živá zvířata vstupující do zařízení porážky
- syrové produkty, ingredience (koření)
- technologie řešení chlazení nebo přípravné manipulace se surovinami (například nálevy, nástřiky)
- likvidace vrácených či nestandardních produktů (olupování, přepracování do jiných výrobků apod.) (Anon., 30).

Kromě těchto potenciálních zdrojů kontaminace jsou i jiné zdroje ve výrobě. Vzhledem k tomu, že *Lm* potřebuje vlhkost, můžeme ji nacházet i v těchto místech, kde se pomnožuje a dále šíří výrobou:

- podlahy a kanalizace
- stojaté vody
- stropy a nadzemní potrubí
- chladicí a kondenzační jednotky

- mokrá izolace
- stropní kolejnice a vozíky a dřevěné palety
- popraskané nebo nevhodné hadice, těsnění dveří, zdí, nedostatečně uzavřené povrchové panely
- vakuové pumpy, linky, hadice, kolečka, rozvodny, skříně motorů
- výrobníky ledu, vzduchové filtry, ložiska strojů, madla výtahů a ovladačů strojů (Anon., 30).

4.1.4 Fermentované trvanlivé masné výrobky:

Mikrobiologická kontrola trvanlivých fermentovaných masných výrobků (16) vyplývá z nařízení Komise (ES) č. 2073/2005; a to z bodu č. 2, předmluvy kde se uvádí: „potravinu nesmějí obsahovat mikroorganismy nebo jejich toxiny či metabolity v množstvích, která představují nepřijatelné riziko pro lidské zdraví“. Pro mikrobiologickou kontrolu masných výrobků je zvláště důležitá kapitola I., bodů 1.2 a 1.3, kde jsou uvedena kritéria pro *Lm* potravin určených k přímé spotřebě, které podporují či nepodporují růst *Lm*.

Trvanlivé fermentované masné výrobky jsou z hlediska mikrobiologického známy tím, že po použití „startovacích kultur“ mají nízké pH a v kombinaci s nízkou *aw* představují oproti jiným potravinám menší riziko pomnožení bakterií, které způsobující onemocnění člověka. Na jedné straně se v odborné literatuře v hojně míře objevují údaje o citlivosti patogenních bakterií k nízkým hodnotám

aw a pH (viz kap. 5.1). Na druhé straně se objevují stále častěji informace o výskytu rezistentních variant běžně známých patogenních bakterií. V publikaci US FDA se uvádí, že většina salmonel je citlivá na *aw* (vodní aktivita) kolem 0,94, *E.coli* (*EHEC*) na hodnotu 0,95, ale *Lm* reaguje až na hodnoty *aw* kolem 0,92.



Tabulka č. 4.5: Přehled stanovení *L. monocytogenes* u trvanlivých masných výrobků (TNMV) provedených SVÚ ČR v letech 2014 až 2016

Rok	Počet vzorků TNMV vyšetřených na průkaz <i>Lm</i>				Analýzy – průkaz <i>Lm</i>		
	pětice	pětice nevyhov.	jednotlivé	jednotlivé nevyhov.	počet	nevyhovujících	%
2014	93	1	178	6	643	13	2,0
2015	7	0	147	7	182	7	3,9
2016	24	4	150	1	270	14	5,2

Rok	Počet vzorků TNMV vyšetřených na počty <i>Lm</i> (KTJ/g)				Analýzy – stanovení počtu <i>Lm</i>		
	pětice	pětice nevyhov.	jednotlivé	jednotlivé nevyhov.	počet	nevyhovujících	%
2014	77	0	197	0	582	0	0
2015	9	0	7	0	52	0	0
2016	108	0	111	0	651	0	0

Komentář k tabulce č. 4.5: Pokud se týká hodnocení výrobků na průkaz *Lm*, je patrný pozvolný nárůst pozitivních výsledků. Příčin je samozřejmě více – například dovážení masa. Nikdo neví, v jaké „mikrobiologické čistotě“ či spíše „nečistotě“ se dovážené maso nachází. Počet vzorků TNMV odebraných k vyšetření je vzhledem k počtu vyráběných druhů a výrobců velmi malý. Dodržování zásad fermentace nelze prokázat, vzorky nejsou odebírány. Mnohdy je základní surovina nahrazena méně kvalitní, pro fermentaci téměř nevhodnou (místo hovězího masa se používá hovězí srdce),

a tak zračí proces nemusí fungovat tak, jak se od něho očekává.

Zrání je souhrn procesů v potravině, zahrnující fermentaci i sušení, tj. ztrátu vody z výrobku.

Fermentace výrobků označuje děje, které probíhají působením mikrobiálních enzymů.

Proces fermentace je jedním z nejstarších způsobů konzervace masa, která závisí na biologické účinnosti kyseliny mléčné, kterou produkují bakterie mléčného kvašení.

Také díky produkci významných antibakteriálních látek (bakteriocinů) jsou tyto bakterie schopny potlačit růst nežádoucí mikrobiální flóry, včetně *Lm*.

Poznatky o roli mikroorganismů v kvašení potravin jsou již dávno známy, ale ne všechny bakterie typu LAB (bakterie mléčného kvašení) jsou vhodné z hlediska technologického a hygienického. Jako nejvhodnější se doporučují převážně druhy rodu *Lactobacillus* a *Pediococcus*.

Při testování antimikrobiální aktivity LAB v laboratořích se projevuje inhibicí jiných mikroorganismů prostřednictvím jednoho nebo více antimikrobiálních metabolitů jako jsou například organické kyseliny (mléčná, octová), peroxid vodíku, antimikrobiální enzymy, bakteriociny apod. Využití bakteriocinové syntézy u těchto kmenů, v průběhu procesu fermentace potravin, je součástí ochranných konceptů v potravinářském průmyslu (Zdolec aj., 2008).

Jak uvádí v přehledu Meloni (2015), vyšší prevalence *Lm* se zjišťuje ve zpracovávaném syrovém masu (45 až 50 %) ve srovnání se svaly čerstvě poražených prasat (0 až 2 %). Surové maso představuje primární zdroj kontaminace *Lm* u konečných výrobků. Úroveň kontaminace se výrazně zvyšuje o 70 až 100 % během zpracování - fáze dělení masa, mletí a různých způsobů balení. Vepřové maso také bývá kontaminováno prostřednictvím kontaktu s pracovními povr-

chy a zařízení. Úroveň kontaminace povrchů masa z kontaktu s rezervoárem *Lm* bývá 17 až 50 %. Kontaminace masa bez kontaktu se zdrojem v průběhu zpracování se pohybuje v rozmezí 11 až 25 %.

Lm je nejčastěji zjišťována v suchých fermentovaných klobásách. Prevalence se prokázala až na úrovni 40 až 45 %. Většinou se jedná o výrobu tradiční fermentované klobásy, která se uvádí na místní nebo regionální trhy. Někteří výrobci mají tendenci snižovat období zrání s cílem zvýšit ziskovost. Ve skutečnosti negativně ovlivní pH a *a_w* těchto výrobků, což je často jediný inhibitor růstu *Lm*. Nedostatečně sušené klobásy mohou mít úroveň aktivity vody blízko 0,92 až 0,94 a *Lm* je schopna přežít tento nedostatečný výrobní proces.

Meloni (2015) dále (mimo jiné) upozorňuje na různé úrovně kontaminace *Lm* na konci doby zrání u fermentovaných výrobků. Obecně bývají tyto kontaminace na nižší úrovni než 100 KTJ/g, protože *Lm* nemůže soupeřit s převládajícími startovacími kulturami, které produkují minimálně jednu překážku, a to v podobě kyseliny mléčné. Pouze bez konkurenční mikroflóry je *Lm* schopna pomnožení a dosáhnout vysoké úrovně kontaminace (vyšší než 1000 KTJ/g), což může představovat hlavní zdravotní riziko těchto výrobků.

Byl prověřován vliv obsahu tuku ve výrobcích z hovězího masa na růst *Lm*, která

byla uměle vpravena do výrobku. Výsledky simulace vykazaly vyšší míry růstu pro *Lm* ve vzorcích, které obsahovaly 18 % tuku ve srovnání s 30% obsahem tuku, a to během prvních 14 dnů skladování v 11°C, za přítomnosti vzduchu. Tento účinek obsahu tuku se zmenšil při uložení v 5 °C (Genkowski aj., 2002).

4.2 Výskyt *Lm* v rybách a rybích výrobcích

Různé druhy ryb, chobotnic a koryšů obsahují *Lm*. Velice častá a vysoká kontaminace bývá zjišťována u produktů z lososa, který pochází z farmových chovů. Existují

rozdíly i mezi různými místy těla ryby v jejich kontaminaci *Lm*. Nejvyšší pozitivita *Lm* byla zjištěna v žábřácích, podstatně méně na kůži a vnitřnostech (tab. 4.6). Se zvýšenou konzumací ryb, především uzených, souvisí vyšší incidence listerióz zejména ve skandinávských státech (tab. 4.7).

Na základě laboratorních vyšetření vzorků sladkovodních a mořských ryb provedených v SVÚ Jihlava v letech 2014 až 2016 lze konstatovat, že situace v ČR je relativně dobrá. Nicméně, odebraných vzorků je poměrně málo, tudíž není možné na základě získaných výsledků stanovit obecné závěry.

Tabulka č. 4.6 : Prevalence *Listeria spp.* a *L. monocytogenes* u celkem 510 vyšetřených vzorků ryb (Miettinen, 2006) .

Vzorek	<i>Listeria spp.</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>	
	n – vzorků	%	n – vzorků	%
žábry	82	16	43	8,4
kůže	14	2,7	1	0,2
vnitřnosti	1	0,2	1	0,2
ryba po zamražení	91	18	44	8,6

Komentář k tabulce č. 4.6: Nejvyšší pozitivita *Lm* byla zjištěna v žábřácích, podstatně méně na kůži a vnitřnostech. Jak vyplývá z dalších údajů tohoto zdroje, stěry z kůže mořských ryb mohou být pozitivní na *Lm* až v 86 % (losos Norsko), 88 % (losos Velká Británie).

Tabulka č. 4.7: Incidence listerióz (na 100 000 obyvatel) ve vybraných skandinávských zemích (Anon., 32).

Stát	Incidence na 100 000
Island	1,3
Dánsko	1,1
Norsko	1,0
Švédsko	0,6
Ostatní země EU	0,6 – 1,1

Komentář k tabulce č. 4.7: Skandinávské země mají pravidelně vyšší incidenci listerióz v přepočtu na 100 000 obyvatel, což zřejmě souvisí s vyšší konzumací uzených ryb.



Tabulka č. 4.8: Přehled stanovení *L. monocytogenes* v rybách a rybích výrobcích provedených SVÚ Jihlava v letech 2014 až 2016

Rok	Komodita	Počet vzorků vyšetřených na průkaz <i>Lm</i>				Analýzy – průkaz <i>Lm</i>		
		pětice	pětice nevyhov.	jednotlivé	jednotlivé nevyhov.	počet	nevyhovujících	%
2014	ryby sladkovodní	9	0	0	0	45	0	0
	ryby mořské	14	0	2	1	72	1	1,4
2015	ryby sladkovodní	1	0	6	0	11	0	0
	ryby mořské	0	0	3	3	3	3	100
2016	ryby sladkovodní	5	0	7	0	32	0	0
	ryby mořské	7	0	1	0	36	0	0

Komentář k tabulce č. 4.8: Jak vyplývá z výše uvedené tabulky č. 4.8, u sladkovodních ryb nebyla *Lm* prokázána delší dobu prokázána. U ryb mořských prokázána bývá, především u ryb z farmových chovů. Odebraných vzorků je však velice málo a tak „k nějakému zásadnímu hodnocení nemáme (NRL) dostatečné podklady.



Ryby mořské a sladkovodní

Vodní prostředí v pobřežních mořských vodách a ústí řek je vystaveno vysokému ekologickému zatížení a bylo prokázáno, že tyto nečistoty mohou být zdrojem kontaminace *Lm* (Miettinen, 2006). V Kalifornii říční a pobřežní mořské vody obsahovaly *Listeria spp.* v 81 % a *Lm* byla zjištěna u 62 % vzorků. Ve Skotsku se *Lm* vyskytovala v celém průběhu řeky procházející oblastí od řídké osídlených hor až do hustě obydlených městských oblastí. V severním Nizozemsku byla prokázána kontaminace *Lm* v 37 % povrchových vod, kanálů a jezer a u 67 % vzorků vody ob-

sahující odpadní vody z čistírny odpadních vod. V Itálii byla *Lm* zjištěna u 40 % vzorků z řek, u 58 % ošetřených a 67 % u neošetřených odpadních vod. Většina z upravené vody (84,4 %) a surového kalu (89,2 %) byla kontaminována *Listeria spp.* S využíváním těchto vod mohou vznikat problémy při využití k zálivkám, napájení zvířat nebo využitím jako technické vody.

V pobřežních vodách, které se využívají k farmové produkci korýšů, musí být produkce kontrolována i na přítomnost *Lm*, virů žloutenky, vibrií, biotoxinů apod. Není žádným překvapením, že různé druhy ryb, chobotnic

a koryšů obsahují *Lm*. Velice častá a vysoká kontaminace bývá zjišťována u produktů z lososa, který pochází z farmových chovů.

Jak uvádí Miettinen (2006), je výskyt *Lm* v mořských produktech pravidelně sledován. Rozdíly se vyskytují v prevalenci *Lm* u různých druhů ryb, stejně jako mezi jednotlivými výrobci v jejich výrobním prostředí. (tabulka 4.9). Uzené ryby bývají pozitivní na *Lm* v rozmezí od 0 do 100 %, míra střední kontaminace vzorků u výrobků je asi 30 %.

Přítomnost *Lm* v pramenité vodě nebo vodních zdrojích, je vzácná. Je však schopna přežít několik týdnů ve vhodném vodním prostředí.

Výrobci lahůdek musí vycházet ze skutečnosti, že RTE produkt z ryb, který zpracovávají do pomazánek, salátů a jiných potravin se v tomto okamžiku použití stává surovinou, která může být zatížena vysokým počtem *Lm*, která se zavádí do prostředí bohatého na vodu a jiné výživné látky, což může způsobit rychlý nárůst bakterií (nejen *Lm*).

Guilbaud aj. (2008) prokázali, že tekutý kouř ve vyšší koncentraci silně ovlivnil růst a samotné přežití *Lm*. Tekutý kouř působí stresově, má vliv na řadu metabolických procesů *Lm* a inhibuje hemolytickou aktivitu *Lm*. Během krátké doby při ošetření výrobků tekutým kouřem se nevyvíjela žádná adaptační odpověď ze strany *Lm*. Některé složky tekutého kouře, především fenoly v množství 15 až 30 $\mu\text{g. ml}^{-1}$, pravděpodobně působí na buněčné membrány a přímo či

nepřímo na stabilitu virulečních faktorů *Lm* (např. listeriolysin O). To by mohlo mít za následek alespoň částečný útlum virulence *Lm* působením tekutého kouře při výrobě uzených rybích výrobků.

Tabulka č. 4.9: Prevalence *L. monocytogenes* v syrovém mase ryb a některých rybích výrobcích (Kwiatek, 2004)

Produkt	Počet vzorků	Počet pozitivních	%
Syrová ryba	633	8	1,26
Uzená ryba	451	4	0,88
Marinovaná ryba	34	0	0

Komentář k tabulce č. 4.9: Posloupnost snížení výskytu *Lm* je zjevná. U uzených ryb se jistě projeví účinky kouře a u marinovaných ryb se uplatní pH. Každá pozitivita *Lm* má však možnost (za špatných skladovacích podmínek) nástupu rychlého pomnožení *Lm*.



Tabulka č. 4.10: Incidence *L. monocytogenes* ve vzorcích z různých produkčních míst a výrobních fází při zpracování ryb (Autio aj., 1999).

Zdroj vzorků, vzorkované místo	n - pozitivních vzorků (vzorků celkem)	Počet izolátů
Jatka		
Syrové ryby	1 (60)	4
Zpracovatelský závod - Příjem		
Led - balení	1 (7)	2
Ryby	0 (35)	-
Vzduch	0 (6)	-
Stahování z kůže, nakládání, uzení		
Výrobní prostředí	4 (48)	8
Stroje	15 (62)	30
Roztok láku	4 (6)	8
Pracovníci	4 (9)	8
Ryby bez kůže	0 (10)	-
Kůže	0 (4)	-
Ryby po lákování	7 (10)	28
Ryby po uzení	8 (10)	29
Vzduch	0 (66)	-
Krájení a balení		
Výrobní prostředí	5 (19)	10
Stroje	5 (22)	10
Pracovníci	2 (10)	4
Ryby po nakrájení	7 (10)	25

Komentář: Jak vyplývá z tabulky č. 4.10, problém není až tak zásadní u suroviny, ale v následujících krocích během technologického zpracování. Sekundární kontaminace *Lm* může zásadně ovlivnit původní surovinu z hlediska bezpečnosti u RTE a můžeme zároveň uvažovat i o velmi silné kontaminaci zařízení, tvorbě biofilmu a perzistenci *Lm* ve výrobním prostředí podniku (viz. jiné kapitoly).

Poměrně čtená je diskuse o tom, zda je pravděpodobnější riziko kontaminace *Lm* pro člověka z konzumace uzených ryb za studena a za tepla. Ve Švédsku byla potvrzena listerióza související s konzumací pstruha uzeného za studena, ale žádné ohnisko onemocnění nebylo prokázáno u ryb uzených za tepla.

Problém asi nebude v technologii uzení, ale v následujícím nakládání s hotovým výrobkem. Nedodržení chladničkových teplot může umožňovat pomnožení *Lm*, jak již bylo uvedeno dříve. Uvažuje se i o tom, že uzení za tepla dává vyšší možnost k pomnožení *Lm*, protože teplota při uzení výrazně sníží počty konkurenčních bakterií, jak uvádí Ingham a Lau (2003).

Dary moře

Dary moře (měkkýši, koryši) jsou dalším důležitým potenciálním zdrojem listeriózy (nemoci z potravin). Důvodem je způsob výživy a životní prostředí této komodity, protože tiito živočichové mohou hromadit bakterie ze znečištěného prostředí. *Lm* byla prokázána také v krevetách a garnátech a výrobcích z nich. Kontaminace se pohybuje z nízké úrovně až do 50 %, jak uvádí Jami aj. (2014). Například uzené mušle (z chladničky od infikovaných osob), které byly zdrojem infekce pacientů, obsahovaly *Lm* v množství 1,6 krát 10^7 KTJ/g a 3,2 krát 10^6 KTJ/g (Mitchell, 1991). Vysoký počet *Lm* (2,1 krát 10^9 KTJ/g) byl také nalezen v imitaci krabího masa, která způsobila listeriózu (Farber aj., 2000).

Uzené mušle, které byly zdrojem infekce pacientů, obsahovaly *Lm* v množství 1,6 krát 10^7 KTJ/g a 3,2 krát 10^6 KTJ/g (z chladničky od pacientů; Mitchell, 1991). Vysoký počet *Lm* (2,1 krát 10^9 KTJ/g) byl také nalezen v imitaci krabího masa, která způsobila listeriózu (Farber aj., 2000).

4.3 Výskyt v mléce a mléčných výrobcích

4.3.1 Syrové mléko

Syrové mléko je poměrně často kontaminováno *Lm*. Do mléka se dostává různými cestami z krmení, srsti, ze špatně ošetřených struků před dojením, z listeriových zánětů vemene a také kontaminací z dojícího zařízení a tanků.

Výskyt *Lm* v syrovém mléku má sezónní charakter. Vyšší incidence v zimních měsících jistě souvisí s chovem ve stájích a tím i možným zvýšeným nečistot na vemeni, dále se uplatňuje i zkrmování siláže (Autio, 2003).

Tabulka č. 4.11: Incidence *L. monocytogenes* v syrovém mléce v ČR 2014 až 2016 – výsledky SVÚ

Rok	Počet vzorků vyšetřených na průkaz <i>Lm</i>				Analýzy – průkaz <i>Lm</i>		
	pětice	pětice nevyhov.	jednotlivé	jednotlivé nevyhov.	počet	nevyhovujících	%
2014	5	0	106	3	131	3	2
2015	0	0	12	0	12	0	0
2016	4	0	64	1	84	1	1,2

Rok	Počet vzorků vyšetřených na počty <i>Lm</i> (KTJ/g)				Analýzy – stanovení počtu <i>Lm</i>		
	pětice	pětice nevyhov.	jednotlivé	jednotlivé nevyhov.	počet	nevyhovujících	%
2014	0	0	0	0	0	0	0
2015	0	0	0	0	0	0	0
2016	0	0	0	0	0	0	0

Komentář k tabulce č. 4.11: Kontaminace syrového mléka je v ČR spíše neměnná, počet vzorků je ale malý na to, abychom (NRL) činili váženější doporučení, jak nebo kdy omezovat prodej syrového mléka, apod. Úroveň kontaminace lze srovnat například s Novým Zélandem, EU nebo jinými vyspělými zeměmi (Anon., 33).

Lm však roste v syrovém mléce i při chladicích teplotách a je obtížné předvídat rozsah růstu (podle času a teploty) během skladování mléka. Zásadní rozdíly nastanou zejména po nákupu mléka spotřebitelem. Tempo růstu při správném skladování bude zřejmě pomalé a dá se usuzovat, že nedojde ke zvýšení počtu *Lm* o více než $2 \log^{10}$ KTJ/ml, během skladování po dobu 5 až 7 dnů. Tedy pokud je mléko získáno od zdravých dojníc v hygienicky „čistém“ prostředí. Na druhé straně byla v syrovém mléce (již na farmě) zjiš-

těna kontaminace *Lm* na úrovni 10^5 KTJ/ml. V současné době je módním stylem konzumovat Bio mléko apod. Pokud možno syrové, bez tepelné úpravy! „Odborníci na výživu“, kteří toto doporučují, vůbec nechápou a nejsou schopni posoudit, jaká nebezpečí z konzumace syrového mléka mohou vyplývat.

- Varovná označení a doporučení konzumace po převaření jim nic neříkají. Domácnosti často nejsou kapacitně vy-

baveny na skladování tohoto mléka a tak není divu, že se šíří průjmová a jiná onemocnění, která jsou ve spojení s konzumací syrového mléka.

- Řada bakterií (včetně *Lm*) a virů je vylučována do mléka, aniž by dojnice (ovce i kozy) projevily známky onemocnění.
- *Lm* má častější výskyt v zimních měsících, kdy se určitou měrou na této skutečnosti podílí hygiena ustájení, krmení siláží apod.
- Kontaminace syrového mléka může pocházet ze srsti zvířat, kontaminovaného prachu ve stáji, znečištěného vemene dojníc, špatných hygienických postupů při údržbě dojícího zařízení apod.

Bylo potvrzeno, že *Lm* může být přítomna v kozím mléce, ještě před tím, než se projevily klinické příznaky onemocnění CNS dojených koz. Sýry vyrobené před klinickým onemocněním by mohly být zdrojem vzniku onemocnění konzumenta. Shodné subtypy byly prokázány z mozku nemocných koz i u sýrů uložených v ledničce (Food Safety, 1995). Všeobecně je prokázáno, že konzumace syrového mléka je riziková, způsobuje sporadický výskyt listeriózy člověka, ale většinou nemívá hromadný charakter onemocnění.

Tabulka č. 4.12: Přehled stanovení *L. monocytogenes* v mléčných výrobcích v letech 2014 až 2016 (NRL SVÚ Jihlava)

Rok	Komodita	Počet vzorků vyšetřených na průkaz <i>Lm</i>				Analýzy – průkaz <i>Lm</i>		
		pětice	pětice nevyhov.	jednotlivé	jednotlivé nevyhov.	počet	nevyhovujících	%
2014	sýry zrající	330	0	514	0	2164	0	0
	sýry nezrající měkké (čerstvé)	312	4	127	0	1687	8	0,5
	jiné mléčné výrobky	601	2	1452	1	4457	3	0,1
2015	sýry zrající	472	5	224	2	2584	16	0,62
	sýry nezrající měkké (čerstvé)	351	6	135	5	1790	19	1,06
	jiné mléčné výrobky	552	1	1659	0	4419	1	0,02
2016	sýry zrající	469	0	214	0	2559	0	0,00
	sýry nezrající měkké (čerstvé)	345	2	129	0	1854	5	0,30
	jiné mléčné výrobky	573	0	1525	0	4390	0	0,00

Rok	Komodita	Počet vzorků vyšetřených na počty <i>Lm</i> (KTJ/g)				Analýzy – stanovení počtu <i>Lm</i>		
		pětice	pětice nevyhov.	jednotlivé	jednotlivé nevyhov.	počet	nevyhovujících	%
2014	sýry zrající	202	0	188	0	1198	0	0
	sýry nezrající měkké (čerstvé)	67	0	37	0	372	0	0
	jiné mléčné výrobky	150	0	491	0	1241	0	0
2015	sýry zrající	216	3	19	0	1068	3	0,28
	sýry nezrající měkké (čerstvé)	27	2	54	0	189	3	1,58
	jiné mléčné výrobky	160	0	458	0	1258	0	0
2016	sýry zrající	230	0	12	0	1162	0	0,0
	sýry nezrající měkké (čerstvé)	58	0	64	0	344	0	0,0
	jiné mléčné výrobky	185	0	472	0	1387	0	0,0

Komentář k tabulce č. 4.12 : situace v posouzení pozitivních nálezů není nijak dramatická. Ve srovnání se zahraničními údaji jsme na tom buď lépe, nebo srovnatelně. Jde jen o to, jaký typ sýrů si vybíráme k vyšetření, zda se jedná o sýry s mazem na povrchu, plísňové apod. Tyto výrobky bývají častěji pozitivní než sýry tvrdé.

4.3.2 Sýry a výrobky

Skutečnost, že *Lm* je občas přítomna v potravinách, není důvodem k panice, že vždy onemocníte listeriózou. Přestože se onemocnění vyskytuje jen zřídka, je prokázáno, že především čerstvé sýry mohou způsobit hromadné onemocnění. Téměř všechny případy listeriózy jsou způsobeny tím, že konzument spotřebovává velmi vysoké hla-

diny bakterií v potravinách. Naštěstí v drtivé většině případů, kontaminace potravin *Lm* bývá na velmi nízké úrovni, tedy méně než 10 bakterií v jednom gramu. Ale postupem času, je-li jídlo špatně uskladněno a tím poskytuje správné prostředí k pomnožení, počet *Lm* se může násobit a původně nízká kontaminace může skončit s vysokými čísly. Tomu je třeba se vyhnout!

Několikastupňový rozdíl v lednici může mít vliv na tempo růstu *Lm*. Skladování potravin po dobu více než 5 dnů, při mírném teplotním rozdílu - mezi 5 °C a 8 °C - může znamenat velký rozdíl v nárůstu počtu *Lm* - 80 KTJ v 5 °C; a 6 000 KTJ při uložení v 8 °C. Po 7 dnech narůstá rozdíl na 700 KTJ/g při teplotě 5 °C; až na 300 000 KTJ/g při uložení v 8 °C. Co to znamená pro prodejce a konzumenta? Že sice nakoupí potraviny, které jsou z hlediska kontaminace *Lm* v pořádku, ale špatným skladováním a manipulací se zvyšuje riziko vzniku onemocnění. Jídlo, které si koupíme, se musí:

- udržovat v chladu
- nejlépe v ledničce ≤ 5 °C
- mělo by se spotřebovat během krátké doby
- ideálně do 2 až 3 dnů (Anon., 34).

U zrajících sýrů, především s mazem na povrchu, se nejlépe daří *Lm* ve vrstvě pod mazem a povrchem sýrů. Má zde ideální zdroj výživy po enzymatickém zrání, má dostatek vody i vhodnou atmosféru. Navíc je chráněna před některými bakteriociny, které produkují jiné startovací kultury (Food Safety, 1995).

Vyšší obsah tuku v mléku může zvyšovat odolnost *Lm* proti zářevu. Zřejmě to souvisí i se skladbou mléčného tuku, protože bylo prokázáno, že tuk z ovčího mléka vykázal vyšší ochranné vlastnosti než tuk z mléka krav (Food Safety, 1995). V ovčím mléce s obsahem tuku 7 % přežila *Lm* teplotu

68 °C po dobu 30 minut, ale nepřezila teplotu 72 °C / 15 minut.

4.3.3 Jiné mléčné výrobky

Všeobecně se má za to, že mléčné výrobky – především zakysané - jsou bezpečné a z hlediska *Lm* se jim moc pozornosti nevěnuje.

Jak uvádí literární zdroje, tzv. jiné mléčné výrobky mohou být zdrojem listeriózy. Například Gahan a Hill (2005) prokázali, že čokoládové mléko bylo v roce 1994 zdrojem infekce gastroenteritidis (u jinak zdravých osob), tabulka č. 4.12.

Lado (2003) uvádí, že *Lm* naočkovaná do jogurtu přežila až 27 dní při 4 °C, v tvarohu (pH 5,0) více než 35 dní v 5 °C. To také naznačuje, že chlazené zakysané mléčné produkty by měly být považovány za možné nosiče *Lm* a při dohledávání zdroje infekce bychom je neměli přehlížet. Přežití *Lm* bylo potvrzeno, při skladování v chladničkové teplotě, v tvarohu (pH 3,5), čedaru (pH 5,2), jogurtu (pH 3,9), dresinku na salát (pH 3,0).

V několika studiích byly pozorovány vyšší koncentrace *L. monocytogenes* v tvarohu než v syrovátce. Listerie se zdá být „zakotvena“ uvnitř mléčného kaseinu a byla přenesena do syřeniny (Dominguez, 1987).

Na přežití *Lm* v mléčných výrobcích má také vliv složení výrobků. V jogurtu, během skladování při 4 °C, bylo ovlivněno hodnotou pH

a sušinou. Obsah tuku neměl významný vliv (Anon., 35).

Tabulka č. 4.12: Některé příklady listeriózy u člověka způsobené konzumací mléčných produktů (McLauchlin et al., 2004; Anon., 35)

Země	Rok	Potravina	Celkem nemocných	Zemřelých
USA	1994	čokoládové mléko	45	0
Francie	1995	čerstvé sýry	17	4
Finsko	1998-1999	máslo	25	6
USA	2000-2001	čerstvé sýry – mexického typu	12	5

4.3.4 Zmrzliny

Dosud se podařilo prokázat, spíše ojediněle, že zmrzlina byla zdrojem hromadné listeriózy u lidí. V Německu byla prokázána pozitivita *Lm* u 15 až 20 % analyzovaných vzorků zmrzlin. Srovnatelné výsledky byly zjištěny v USA, kdy byla prokázána pozitivita asi u 2 až 7 % kontrolovaných zmrzlin. Počty *Lm* bývají na velmi nízkých úrovních a tak by u zdravých jedinců nemělo dojít k vyvolání infekce. *Lm* je odolná vůči mrazu i po dobu delšího skladování. (Anon., 35)

Při dohledávání zdroje listeriózy, probíhalo i zjišťování výskytu rezidentních listerií v továrně na zmrzlinu ve Finsku. Bylo zjištěno, že tento organismus byl již rezidentní více než sedm let. Zjistilo se, že stejný sérotyp se vyskytuje v okolí místa výroby a výro-

ních zařízení po všech-ny ty roky. Prokázalo se, že zejména balicí stroje byly často kontaminovány *Lm* (Anon.,36).



Zmrzlina, navzdory podmínkám skladování, je také velmi dobré médium pro mikrobiální rozvoj, díky své vysoké nutriční hodnotě a také téměř neutrálnímu pH 6 až 7.

4.4 Výskyt v zelenině a jiných surovinách a výrobcích z nich

O *Lm* je známo (i jiných bakteriích), že mohou přežívat v místech (u kořenů listů apod.) pod ochranou vzuchovýh bublin nebo se dostanou dovnitř tkání a tam jsou dostatečně chráněny před účinky antimikrobiálních

látek. Počet vyšetřených vzorků je velmi nízký, takže dělat nějaké vážné závěry není vhodné (Tabulka 4.13). Nicméně, metodou průkazu byla ve vzorcích ze SVÚ v roce 2014 prokázána pozitivita 10,8 %. To je jistě vysoké číslo a měli by ho brát v úvahu manažeři podniků, kde se dále zelenina zpracovává (i v mražené formě), a také v sektoru veřejného stravování. Jako alarmující považujeme prokázanou pozitivitu v roce 2016 (29,6 %)!

Tabulka č. 4.13: Přehled stanovení *L. monocytogenes* v zelenině a zeleninových výrobcích v letech 2014 až 2016, která byla provedena dozorovými orgány SVS s SZPI

Rok	Dozorová organizace	Počet vzorků vyšetřených na průkaz <i>Lm</i>				Analýzy – průkaz <i>Lm</i>		
		pětice	pětice nevyhov.	jednotlivé	jednotlivé nevyhov.	počet	nevyhovujících	%
2014	SVS	5	2	68	0	93	10	10,8
	SZPI	0	0	0	0	0	0	0
2015	SVS	0	0	8	0	8	0	0,0
	SZPI	0	0	0	0	0	0	0
2016	SVS	20	14	52	7	152	45	29,6
	SZPI	0	0	0	0	0	0	0

Rok	Dozorová organizace	Počet vzorků vyšetřených na počty <i>Lm</i> (KTJ/g)				Analýzy – stanovení počtu <i>Lm</i>		
		pětice	pětice nevyhov.	jednotlivé	jednotlivé nevyhov.	počet	nevyhovujících	%
2014	SVS	2	0	0	0	10	0	0
	SZPI	75	0	0	0	375	0	0
2015	SVS	0	0	25	0	25	0	0
	SZPI	117	0	0	0	585	0	0
2016	SVS	0	0	51	3	51	3	5,9
	SZPI	105	0	0	0	525	0	0

Konzumace čerstvého ovoce a zeleniny je nedílnou součástí zdravé stravy. US Department of Agriculture doporučuje pět až devět porcí ovoce a zeleniny denně. Světová zdravotnická organizace a jiné potravinářské a zemědělské organizace doporučují příjem minimálně 400 g ovoce a zeleniny za den. Ovoce a zelenina poskytují tolik potřebné vitamíny, minerální látky a vlákninu. Produkty mohou hrát důležitou roli ve zdraví prostřednictvím prevence srdečních chorob, rakoviny a cukrovky. Očekává se, že trend zvýšené spotřeby ovoce a zeleniny poroste i nadále a po roce 2020 by spotřeba ovoce měla narůst o 24 až 27 % a spotřeba zeleniny o 19 až 24 %. Zvýšení spotřeby ovoce a zeleniny může mít i druhotné důsledky. Je třeba vzít v úvahu i nárůst nemocí spojených s konzumací kontaminované zeleniny a ovoce, protože v roce 1990 bylo asi 12 % alimentárních onemocnění přímo spojeno s jejich konzumací (Raicevic aj., 2010).

Každý není ochoten připravit doma pět čerstvých porcí ovoce a zeleniny každý den, protože je to nudné, drahé a pracné. To vedlo ke zvýšené poptávce již hotových jídel a občerstvení (zeleninových a ovocných salátů). Saláty, ovoce a zelenina se liší od většiny potravin (které kupujeme) tím, že nejsou vařené a obvykle se jí v syrovém stavu. Zakoupené výrobky mohou být více kontaminované než ty doma připravené. Je tu také zvýšená konzumace tzv. biopotravin. Jak si ale málokdo uvědomuje, zde se používá více živočišných hnojiv pro organicky pěstované ovoce a ze-

leninu. Potenciál pro mikrobiální kontaminaci je mnohem vyšší než u konvenčně pěstovaných plodin.

Dojde-li k mikrobiologické kontaminaci, je velmi obtížné ji napravit či odstranit. Bakterie jsou často připojené na surovinu (biofilm) a je těžké je smýt. Je známo, že běžným omytím není odstraněno asi 10 % enteropato-genů. Běžný oplach může navíc způsobit i další šíření bakterií na potravině či surovině. Pro představu – jeden kontaminovaný list hlávkového salátu může mycím procesem přenášet bakterie na všechny další listy (Raicevic aj., 2010).

Lm byla izolována z půdy, vody, kanalizace, odpadních vod a široké škály zeleniny. *Lm* byla izolována ze syrové zeleniny, včetně brambor, zelí, okurek, rajčat, ředkviček a dalších. Bylo také prokázáno, že *Lm* je schopna aktivně proliferovat do několika druhů zeleniny včetně celeru, hlávkového salátu, kukuřice, chřestu, zatímco u ostatní zeleniny jako je fenykl, mrkev a rajčata bylo prokázáno, že jsou špatným substrátem pro růst této bakterie. Bylo také prokázáno, že *Lm* je schopna růst a množit v zelenině, která je balena a ukládána v modifikované atmosféře (Crépet aj., 2007).

Málo se v tomto směru vyšetřují konzumní houby pěstované na substrátech (žampiony). Výsledky z různých studií ukázaly, že (skladované a prodávané) krájené a celé houby mají schopnost podporovat růst *Lm*.

Zatímco rostoucí houby (opouzdřené) umožňují sice přežít *Lm*, ale nepodporují růst. Výhodou pro pěstované houby je to, že houbový substrát je bohatý na obsah a rozsah konkurenční mikrofóry vůči *Lm* a tím brání jejímu pomnožování (Leong aj., 2013).

Zřejmě proto nebyla řešena žádná hromadná onemocnění po konzumaci pěstovaných hub. Pokud nějaká listerióza vznikla po konzumaci žampionů či jiných hub, jednalo se spíše o sporadické onemocnění.

Čerstvě krájené zeleninové pokrmy vykazaly vyšší míru kontaminace *Lm* v porovnání s původními celými surovinami, ze kterých byly připraveny. Lindow a Brandl (2003) se zabývali vznikem biofilmu na zelenině a zjistili, že biofilm může představovat až 80 % celkové mikrobiální populace na povrchu rostlin.

V USA 2014 byla řešena listerióza, která postihla lidi ve dvanácti státech USA a Kanady. Zdrojem nákazy byla zabalená jablka (caramel apples), původem ze státu Ohio. Celkem onemocnělo 35 lidí a sedm zemřelo. Jedenáct pacientů byly těhotné ženy, z toho jedna potratila. Dále byly potvrzeny tři případy dětské meningitidy u dětí ve věku 5 až 15 let (Anon., 37).

Zdroje, které mohou přispět k nárůstu listeriózy a mohou být spojeny s konzumací syrového ovoce a zeleniny v průmyslově vyspělých zemích, byly mnohokrát popsány. Mezi

faktory patří i globalizace nabídky potravin. Jde o neúmyslné zavlečení patogenů do nových zeměpisných oblastí.

Standardy hygieny při sklizni: skladování a kvalita závlahových vod se značně liší v různých zemích, což zvyšuje potenciál pro kontaminaci produktů a spotřebitelé mohou být vystaveni i silné kontaminaci různých patogenů.

U připravených produktů (například balené saláty) se mohou vytvořit příznivé podmínky pro proliferaci a přežití patogenů. Na řezných plochách se jim dostává množství živin, které jim poskytuje možnost přežití. Nejčastěji se jedná o patogeny *E. coli* O157:H7 a *Lm*. Bylo prokázáno, že bakterie se dostanou řeznou plochou dovnitř salátových listů a pronikají dál do vnitřní tkáně, která je chrání před chemickými prostředky (Takeuchi a Frank, 2000).

Zajímavá se zdá schopnost mrkve snižovat populaci životaschopných *Lm*. Tento efekt byl prokázán při aplikaci *Lm* na celou nebo drcenou syrovou mrkev, ale nebyl prokázán u vařené mrkve. Snížení populace *Lm* bylo zjištěno krátce po namáčení do roztoku s celou mrkví a *Lm* nebyla zjištěna již po 7 dnech skladování při 5 °C nebo 15 °C (Beuchat a Brackett, 1990)

Již přítomnost 1 % syrové mrkvové šťávy v pomnožovací půdě podstatně snížila počet *Lm* během 24 h při 30 °C (Sarkar a Phan, 1979).

4.5 Cukrářské výrobky

Většina cukrářských výrobků patří z hlediska nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 mezi potraviny nepodporující růst *Lm* z důvodu jejich krátké doby použitelnosti (< 5 dnů), z těchto důvodů kontroluje Státní zemědělské a potravinářské inspekce (dále jen „SZPI“) u většiny výrobků počet *Lm* nikoliv jejich průkaz, proto je počet nevyhovujících výrobků poměrně nízký (Tabulka 4.14). *Lm* byly zjištěny u výrobků obsahující smetanu ke šlehání. Gelbíčová a Karpíšková (2009) sledovaly výskyt *Lm* v cukrářských výrobcích v ČR. Celkem vyšetřily 96 vzorků a prokázaly pozitivitu *Lm* u pěti vzorků (5,2 %).

Little aj. (2009) vyšetřovali cukrářské výrobky na přítomnost *Listeria spp.* a *Lm*. Cukrovinky s čerstvým krémem obsahovaly *Listeria spp.* (3,3 %) oproti vzorkům se syntetickým krémem (0,8 %). *Lm* byla zjištěna pouze z produktů s čerstvou smetanou (1,0 %).

Přítomnost *Lm* byla zkoumána v dezertech, které byly vyrobeny v potravinářských podnicích na ostrově Kefalonia (Řecko). Nejvyšší přítomnost *Lm* byla v dezertech ze smetany a zmrzliny (22,7 % a 26 %). Jde o výrobky, které zahrnují mnoho kroků ručního zpracování. Dalším faktorem je všudypřítomnost nevařených vajec v kuchyních jednotlivých výroben, neboť pasterované tekuté/práškové formy nejsou upřednostňovány. Kontaminace může být vyvolána občasným přidáním syrových vajec do výrobku v posledních

výrobních fázích, což jistě vede ke křížové kontaminaci RTE zákusků a zmrzliny (Effimia, 2015).

Tabulka č. 4.14: Přehled stanovení *L. monocytogenes* v cukrářských výrobcích v letech 2014 až 2016 (data SZPI)

Rok	Vzorky cukrářských výrobků vyšetřené na počty <i>Lm</i> (KTJ/g)	
	Počet	Nevyhovující (%)
2014	344	0 (0 %)
2015	495	0 (0 %)
2016	503	3 (0,6 %)

4.6 Lahůdky a hotová jídla

Je všeobecně známo, jak je těžké zajistit, aby potraviny byly *Lm* prosté až do konce data spotřeby. Na druhé straně jsou společnosti (PPP) povinny stáhnout výrobky obsahující *Lm* v nadlimitním množství. Často jsou potraviny kontaminovány velmi malým počtem *Lm* - méně než 10 KTJ v jednom gramu. Je pravděpodobné, že konzumace takto nastavených limitů pro *Lm* by neměla negativně ovlivnit naše zdraví.

Vědecká data důsledně ukázala, že zvýšené riziko listeriózy je především v RTE potravinách, které podporují růst listerií a mají deklarovanou dlouhou dobu spotřeby. Zde vzniká příležitost a čas pro růst *Lm* na vysokou úroveň. Uvádí se, že více než 96 %

Lm, které jsou vyšší než 100 000 *Lm* v servírované porci jídla. Tato kontaminace se vyskytuje přibližně u 0,03 % servírovaných jídel (jedenkrát na každých 3 000 jídel). I tak se předpokládá a je prokázáno, že ne všechny kmeny *Lm* mohou mít stejnou schopnost infikovat lidi.

Jak již bylo uvedeno dříve, i na první pohled nízký rozdíl v chladničkových teplotách může znamenat výrazný rozdíl v pomnožení *Lm* a tím navýšení počtu KTJ/g. Proto na všech stupních distribuce i skladování (možná nejvíce v domácnostech) musíme dbát na to, že:

- udržujeme potraviny v ledničce pod 5 °C (ideálně)
- konzumujeme potraviny co nejdříve po zakoupení – nejlépe do 2 až 3 dnů (Anon., 38)

Ve Velké Británii (Little aj., 2015) byly čtyři z nedávných ohnisek listerióz spojeny s konzumací sendvičů zakoupených nebo podávaných v nemocnicích. Celkově je nedostatek informací o prevalenci *Lm* v sendvičích podávaných či prodávaných v rámci pečovatelských domů a nemocnic. Senioři, nebo ti, kteří mají poruchu imunity apod., jsou obzvláště náchylní k infekci.

Celkově byla kontaminace *Listeria spp.* u sendvičů 7,6 %. *Lm* byla zjištěna u 88 vzorků (2,7 %). Z toho bylo 87 vzorků kontaminováno na úrovni < 10 KTJ/g a jeden vzorek obsahoval 20 KTJ/g. Sendviče byly

kontaminovány *Listeria spp.* a *L. monocytogenes* častěji tam, kde nebyly dostatečně zpracovány analýzy nebezpečí: na místech od kavárny, obchodů nebo oddělení v rámci nemocnice; například byly výrobky uloženy nad 8 °C. Přítomnost *Listeria spp.* a *Lm* byla rovněž spojena s výrobky, které byly: dodány jako hotové a zabaleny; v případě, že hlavní náplní sendviče byla náplň z drůbežního masa nebo kde sendvič obsahoval salátové ingredience, měkký sýr a majonézu. Předchozí studie ukázaly, že sendviče mají často vysoké hladiny mikroorganismů (CPM) a méně často potenciální patogeny. Nicméně přetrvává nedostatek zveřejněných informací o prevalenci, úrovni kontaminace a typech *L. monocytogenes* v sendvičích (Little aj., 2015).

Z výsledků kontrol dozorových orgánů ČR v letech 2014 až 2016 vyplývá, že výrobky studené kuchyně (lahůdkové saláty, aspiky, obložené chlebíčky, jednohubky) nelze jako zdroj onemocnění *Lm* přehlížet a podceňovat (Tabulka č. 4.15).

Tabulka č. 4.15: Přehled stanovení *Listeria monocytogenes* v lahůdkách v letech 2014 – 2016 (data SVS a SZPI)

Rok	Dozorová organizace	Počet vzorků vyšetřených na průkaz <i>Lm</i>				Analýzy – průkaz <i>Lm</i>		
		pětice	pětice nevyhov.	jednotlivé	jednotlivé nevyhov.	počet	nevyhovujících	%
2014	SVS	59	8	49	0	344	21	6,1
	SZPI	91	4 (4,4%)	0	0	455	20	4,4
2015	SVS	5	0	1	0	26	0	0
	SZPI	130	2 (1,5%)	0	0	650	10	1,5
2016	SVS	53	2	59	1	324	5	1,5
	SZPI	90	3 (3,3%)	0	0	450	15	3,3

Rok	Dozorová organizace	Počet vzorků vyšetřených na počty <i>Lm</i> (KTJ/g)				Analýzy – stanovení počtu <i>Lm</i>		
		pětice	pětice nevyhov.	jednotlivé	jednotlivé nevyhov.	počet	nevyhovujících	%
2014	SVS	73	0	36	0	401	0	0
	SZPI	357	1 (0,3%)	0	0	1 785	5	0,3
2015	SVS	5	0	0	0	25	0	0
	SZPI	402	0	0	0	2 010	0	0
2016	SVS	40	1	26	1	226	6	2,7
	SZPI	453	0	0	0	2 265	0	0



4.7 Lovná zvěř

Bohužel, není mnoho literárních údajů o výskytu *Lm* u divoké zvěře, v mase zvěřiny apod. Většinou se odborná sdělení týkají náhodného průkazu listeriózy nebo kontroly životního prostředí a ne cílené kontroly výrobků z lovné zvěře, které jsou určeny k lidskému konzumu (Nyssönen aj., 2006).

Významnou měrou se může na kontaminaci těla jatečných zvířat podílet i transport zvířat z farmových chovů na jatka. V důsledku transportního stresu se zvyšuje nejen procento pozitivních vzorků (exkrementů), ale i počet *Lm* (KTJ) ve vyšetřovaných vzorcích, a to úměrně vzdálenosti a době přepravy (Fenlon aj., 1996).

Není žádnou novinkou, že *Lm* mohou v životním prostředí šířit volně žijící ptáci. Přičemž významně vyšší promořenost byla zjištěna u ptáků, kteří se živí zbytky na skládkách a jiných odpadních zdrojích, než u ptáků z volné přírody (Hellström aj., 2008).

Výskyt *Lm* v trusu divokých ptáků a jiných volně žijících zvířat bývá variabilní. Pozitivita byla zjištěna u ptáků v rozsahu od 8 až 33 %, u krys 7 %, u jelenů 6 %, u losů 5 %, u bobrů se kontaminace neprokázala (Anon., 39).

Tato pozitivita není nijak výjimečná, protože i člověk vykazuje běžně pozitivitu *Lm* ve stolici a to v rozsahu 0,5 až 29 %, aniž by byly zjištěny jakékoli příznaky onemocnění (Farber a Peterkin, 1991).

Také je všeobecně známo, že například ošetřovatelé zvířat, řezníci a obdobné profese vykazují vyšší procenta positivity *Lm* ve stolici, oproti profesím, které nemají přímou spojitost s výrobou potravin či chovem zvířat.

Z celkového počtu 59 masných výrobků (sušené klobásy) z lovné zvěře bylo 45 vzorků (tj. 76 %) pozitivních na *Listeria spp.* Z toho bylo 14 vzorků (24 %) potvrzeno jako *Lm*. Další izolace potvrdily pozitivitu u zbylých 31 vzorků (52 %) na *L. innocua* a *L. welshimeri*. Nutno dodat, že *Lm* byla prokázána v množství < 100 KTJ/g. *Lm* byla dále prokázána u 38 % sušených výrobků z lovné zvěře (sausages) připravených k prodeji (Lucchini aj., 2012).

Atanasova aj. (2008) citují jiné autory a předložili výsledky kontaminace masa lovné zvěře, které se u *Lm* pohybují od 3,3 % až po 12,5 %. Nejčastěji bývá *Lm* zjišťována u JUT divočáků.

4.8 Pokrmy v zařízení společného stravování

Přítomnost jakýchkoliv bakterií v hotových pokrmech napovídá o nesprávných postupech, které mohou zahrnovat např. nízkou kvalitu surovin nebo složek použitých pro jejich výrobu, nedostatečné vaření, křížovou kontaminaci, nedostatečný úklid a nedostačnou kontrolu teploty a času jejich úchovy.

Jak již bylo několikrát zdůrazněno, *Lm* jsou schopné růst za normální chladicí teploty, ale jsou ničeny při vystavení teplotě nad 70 °C po dobu 2 minut. V pokrmech, které projdou takovou tepelnou úpravou, vypovídá přítomnost *Lm* o nedostatečném vaření nebo kontaminaci v následném procesu. Listérie jsou environmentální kontaminanty, které mohou přežít jak v provozech zpracovávajících potraviny, tak na zařízení, pokud není použito dostatečných hygienických postupů. V případě *Lm* se dá očekávat, že je v některých produktech používaných pro přípravu pokrmů již přítomná v koncentracích na hranici legislativní přípustnosti.

Tyto mikroorganismy jsou méně citlivé na čistící postupy používané při výrobě potravin včetně pokrmů v porovnání s ostatními bakteriemi.

Pokrmy lze rozdělit z legislativního hlediska na:

- Teplý pokrm, za který se považuje potravina kuchyňsky upravená ke konzumaci v teplém stavu a udržovaná v teplém stavu po dobu uvádění do oběhu, přepravy a rozvozu. Teplé pokrmy se uvádějí do oběhu tak, aby se ke spotřebiteli dostaly co nejdříve, a to za teploty nejméně 60 °C.
- Studený pokrm, za který se považují potraviny kuchyňsky upravené ke konzumaci za studena a uchovávané v chladu po dobu uvádění do oběhu, přepravy a rozvozu.
- Rozpracovaným pokrmem se rozumí kuchyňsky opracovaná potravina ve všech fázích přípravy a výroby určená k další

kuchyňské úpravě před konzumací v teplém nebo studeném stavu; např. nakrájené potraviny jako jsou masné výrobky, sýry, syrová zelenina apod.

- Zmrazeným pokrmem se rozumí pokrm, který byl po ukončení výroby neprodleně zmrazen na teplotu -18°C a nižší ve všech částech pokrmu.
- Zchlazeným pokrmem se rozumí teplý nebo studený pokrm, který byl po ukončení výroby neprodleně zchlazen na teplotu 4 °C a nižší ve všech částech pokrmu. Jde-li o zchlazené nebo zmrazené pokrmy, musí výrobce uvést na obalu nebo dodacím listu skladovací podmínky a způsob ohřevu.
- Regenerace pokrmu je tepelná úprava již dříve tepelně opracovaného pokrmu, jejímž smyslem je zahřát pokrm na teplotu podávání a současně inaktivovat případnou přítomnou vegetativní mikroflóru, která by mohla vyvolat onemocnění. Legislativa požaduje záhřev na nejméně 70 °C ve všech částech ohřívánoho pokrmu.

Z hlediska zajištění bezpečnosti nabízených studených pokrmů je velmi důležitá historie daného produktu a jednotlivých složek, tj. jistota dodržení podmínek skladování pro danou komoditu a dále celý průběh manipulace a skladování před nabízením (např. formou bufetu), a také trvanlivost jednotlivých složek pokrmu ve chvíli přípravy, která musí minimálně pokrýt dobu trvanlivosti zamýšleného pokrmu.

U pokrmů nabízených za tepla je také třeba se věnovat historii daného pokrmu, tj. dodržení jednoduchých pravidel z hlediska chlazení, regenerace a dalšího nabízení, pokud není pokrm nabízen bezprostředně po uvaření. Z hlediska zchlazování je důležitá jeho rychlost, tj. rychlost poklesu teploty pod 21 °C za 2 hodiny a pod 5 °C za celkovou dobu maximálně 6 hodin (Codex Alimentarius, CACA/RCP 39-1993). Ohřívání musí probíhat také rychle, a to z toho důvodu, aby potravina rychle prošla nebezpečným teplotním rozmezím od 10 °C do 60 °C. To obvykle vyžaduje použití horkovzdušné trouby či infračervených nebo mikrovlnných ohřivačů. Teplotu ohřívání potravin je třeba pravidelně kontrolovat (Čeřovský: Výroba hotových pokrmů a lahůdek; Anon., 40).

Epidemiologické údaje ukazují, že většina z významných faktorů přispívajících k propuknutí nemocí přenášených potravinami souvisí s operacemi, které následují po tepelném opracování; například pokud je zchlazení příliš pomalé, v jakékoli části potraviny zůstane po nebezpečně dlouhou dobu zachována teplota v rozmezí od 60 °C do 10 °C, takže zde může docházet k růstu mikroorganismů. Proto by výrobky neměly být ponechány v tomto teplotním rozmezí po dobu přesahující 4 hodiny. Podmínky zchlazení se musí vyhodnotit pomocí analýzy rizik.

Problémy, se kterými se lze setkat při kontrole *Lm* v zařízeních společného stravování:

- široká škála nabízených pokrmů zvyšuje

- riziko zkřížené kontaminace,
- špatné hygienické podmínky, neoddělení výrobních prostor a postupů,
- nedostatečné proškolení personálu v hygienickém minimu,
- mikrobiologická kontrola prostředí výroben, připraven a výdejen pokrmů je nedostatečná nebo žádná,
- mikrobiologická kontrola pokrmů je nedostatečná většinou však žádná,
- sanitace zařízení je omezená a postupy nejsou dokumentovány,
- kontrola teplot je nedostatečná.

Přes výše uvedené problémy, se kterými se lze setkat v provozovnách společného zařízení je riziko kontaminace *Lm* v těchto zařízeních poměrně nízká, a to z důvodu, že vysoce rizikové pokrmy jsou bezprostředně připravovány před konzumací; objem pokrmů a počet strávníků je obvykle nízký (Food Safety Authority of Ireland: The Control and Management of *Listeria monocytogenes* Contamination of Food, 2011). V EU v letech 2008 až 2015 byla *Lm* jako prokázaný původce onemocnění z pokrmů připravených a nabízených v zařízení společného stravování, ať už uzavřeného nebo otevřeného typu, zjištěna pouze v sedmi případech. Nejčastějším důvodem kontaminace pokrmů *Lm* v uvedených případech onemocnění byla křížová kontaminace (Tabulka č. 4.16, zdroj: Draft EFSA Draft Scientific Opinion: *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU). V rámci otevřeného typu stravová-

ní (restaurace, cukrárny, rychlé občerstvení, pivnice a bary, čerpací stanice apod.), které od roku 2015 z části dozoruje SZPI nebyly v odebraných vzorcích pokrmů popř. v rozpracovaných pokrmech zjištěny žádné překročené počty *Lm* (Tabulka 4.17). O situaci v uzavřeném typu stravování (nemocnice, školní jídelny, léčebny, domovy důchodců, pečovatelská služba apod.) lze získat informace na webových stránkách jednotlivých krajských hygienických stanic.

K prevenci kontaminace pokrmů *Lm* přitom platí pár jednoduchých zásad:

- Nikdy nedávat hotové pokrmy do nádob, ve kterých předtím bylo syrové maso nebo drůbež, aniž by tyto nádoby byly důkladně omyté. Pokrm je třeba vždy důkladně provařit, propéci – pouze teploty minimálně 75 °C po dobu minimálně 5 min v celém objemu připravovaného pokrmu usmrtí případně se vyskytující

mikroorganismy. To se týká především pokrmů z masa, drůbeže a vajec.

- Pokrm je nutné zchladit nebo zmrazit bez zbytečných prodlev – obecně platí zásada, že studené pokrmy je třeba udržovat při teplotě do 4 °C a teplé pokrmy při teplotě nad 65 °C.
- Zbytky pokrmů, především ty, které se rychle kazí, je nutno zchladit nebo zmrazit nejlépe během dvou hodin. Pokrmy je vhodné rozdělit na menší porce a ty umístit do čistých mělkých nádob s víky, ve kterých je proces zmrazení nebo zchlazení rychlejší.
- Zchlazené pokrmy dále udržovat při teplotě do 4°C, zmrazené do -18 °C (Duben, 2007).



Tabulka č. 4.16: *L. monocytogenes* jako původce onemocnění z pokrmů v zařízení společného stravování EU v letech (2008 až 2015) – zpracováno na základě draftu EFSA (Draft

Pokrm	Sérovar <i>Lm</i>	Rok	Stát	Zdroj	Uplatňující se faktor	Počet případů onemocnění	Hospitalizace	Smrt
Krájené vepřové v aspiku	4b	2008	Rakousko	Zařízení společného stravování otevřeného typu (restaurace/ catering)	Křížová kontaminace	14	7	0
Dušené hovězí maso	1/2a	2012	Velká Británie	Mobilní stánek s občerstvením	Křížová kontaminace	4	4	2
Složený pokrm	neuve-den	2014	Dánsko	Zařízení společného stravování uzavřeného typu (nemocnice)	neznámý	6	0	0
Sendviče-bu-fetová nabídka	neuve-den	2014	Velká Británie	Zařízení společného stravování uzavřeného typu (nemocnice)	Další uplatňující se faktory	4	4	0
Směs potravin	4b	2015	Portugalsko	Zařízení společného stravování uzavřeného typu (závodní kantýna)	Křížová kontaminace	3	3	0
Rýžový nákyp	4b	2015	Velká Británie	Zařízení společného stravování uzavřeného typu (školní jídelna)	Teplota skladování	159	2	0
Bufetové pokrmy	neuve-den	2015	Finsko	Zařízení společného stravování otevřeného typu (restaurace/ catering)	Kontaminované ingredience, teplota skladování	24	10	0

Scientific Opinion: *L. monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU)

Pokrm	Sérovar <i>Lm</i>	Rok	Stát	Zdroj	Uplatňující se faktor	Počet případů onemocnění	Hospitalizace	Smrt
Krájené vepřové v aspiku	4b	2008	Rakousko	Zařízení společného stravování otevřeného typu (restaurace/ catering)	Křížová kontaminace	14	7	0
Dušené hovězí maso	1/2a	2012	Velká Británie	Mobilní stánek s občerstvením	Křížová kontaminace	4	4	2
Složený pokrm	neuve-den	2014	Dánsko	Zařízení společného stravování uzavřeného typu (nemocnice)	neznámý	6	0	0
Sendviče-bu-fetová nabídka	neuve-den	2014	Velká Británie	Zařízení společného stravování uzavřeného typu (nemocnice)	Další uplatňující se faktory	4	4	0
Směs potravin	4b	2015	Portugalsko	Zařízení společného stravování uzavřeného typu (závodní kantýna)	Křížová kontaminace	3	3	0
Rýžový nákyp	4b	2015	Velká Británie	Zařízení společného stravování uzavřeného typu (školní jídelna)	Teplota skladování	159	2	0
Bufetové pokrmy	neuve-den	2015	Finsko	Zařízení společného stravování otevřeného typu (restaurace/ catering)	Kontaminované ingredience, teplota skladování	24	10	0

Tabulka č. 4.17: Výsledky sledování počtů *L. monocytogenes* v pokrmech odebraných SZPI v letech 2015 až 2016 v zařízením společného stravování

Rok	Typ pokrmu	Počty	
		vzorků	nevyhovujících
2015	Zchlazené pokrmy	3	0
	Studené pokrmy	168	0
	Teplé pokrmy	64	0
	Nebalené zmrzliny	74	0
2016	Rozpracované pokrmy	5	0
	Zchlazené pokrmy	11	0
	Studené pokrmy	137	1
	Nebalené zmrzliny	76	0

Marinování:

Kontaminované nebo kazící se maso, které je dále marinováno, může představovat vysoké riziko jak pro konzumenta, tak i pro kuchaře, který má přímý kontakt s kontaminovaným masem a může se sám nakazit nebo způsobit sekundární kontaminaci jiných podávaných jídel. Phebus (19) se domnívá, že čepelí naklepané steaky nepředstavují žádné další bezpečnostní riziko pro spotřebitele, ačkoli přenos bakterií (uměle naočkované

povrchu) do vnitřní struktury masa je asi 3 až 4 %. Tepelné opracování steaků v grilu na cílovou vnitřní teplotu je nízké, méně než 54 °C. Typický steak zahrnuje aplikaci tepla z vnějšího povrchu steaku k dosažení koncového bodu vnitřního teplotního rozmezí 55 až 82 °C (krvavý až propečený).

Vegetativní bakteriální buňky jsou na vnějším povrchu syrového hovězího masa inaktivovány vysokými teplotami při vaření. Bylo zjištěno, že bakterie pronikají u steaků do maximální hloubky 300 µm (0,3 mm). Rozsah kontaminace při kolonizaci podpovrchových vrstev by neměl představovat bezpečnostní riziko pro spotřebitele, pokud jsou dodrženy správné zásady tepelného zpracování (Anon., 41).

Tenderizačního zařízení a šíření *Lm*

Studie Raccach aj. (1979) se zaměřila na význam a dodržování „programu dobré hygieny“ při použití kotoučového zařízení pro tenderizaci masa. Je zřejmé, že nehygienické podmínky na mase i ve výrobě, mohou změnit tenderizer na „kontaminační stroj“. Výsledkem této nevhodně užití technologie má za následek produkci výrobků s kratší trvanlivostí, a pokud obsahují patogeny, jsou nebezpečné pro veřejné zdraví. Pronikání bakterií do hlubších vrstev masa je velmi diskutovaný problém. Na rozdíl od dřívějšího sdělení, prokázali Sikes a Maxcy (1980), že mikroorganismy pronikají povrchem po ztuhlosti svalů, až do hloubky 20 až 40 mm, při skladování při vyšších teplotách (až 37 °C).

Osídlení hlubších vrstev masa závisí na mnoha faktorech:

- na druhu organismu – adaptaci, pohyblivosti a schopnosti tvořit proteolytické enzymy,
- na typu a struktuře masa,
- podmínkách skladování, marinace apod.

Jiné zdroje *Lm*:

Předkrájené ovoce a zelenina, balené saláty a nepasterizované ovocné šťávy mohou způsobit listeriózu konzumenta. V poslední době je „příkladem“ (Rockmelon/cantaloupe) meloun, který byl jednoznačně identifikován jako příčina hromadného onemocnění. Jak se vyhnout takovým případům? Začněte prevencí! Ujistěte se, zda je povrch suroviny před krájením čistý a suchý, vyhněte se nepasterizovaným šťávám. Dalším krokem je umytí pod tekoucí vodou před jídlem, přičemž nezapomeňte vyhodit špinavé nebo silně pohmožděné ovoce. Každé další krájení ovoce může přinášet nová rizika kontaminace *Lm* stejně jako u plátků masa (Anon., 42).

Syrové mořské ryby, dary moře (včetně ústřic) a výrobky jako sushi přináší riziko kontaminace *Lm* a vzniku onemocnění. Riziko ústřic spočívá ve filtraci vody, odkud získávají živiny, ale mají i tendenci akumulovat bakterie nebo viry, které se vyskytují ve vodě. Historie, která souvisí s onemocněním po požití darů moře, je velmi bohatá. Ústřice jsou sice oblíbenou pochoutkou, nicméně jsou stále považovány za vysoce rizikové potraviny a je třeba se jim vyhnout především v těhotenství.

Výrobky ze syrových ryb (např. sushi nebo sashimi) mohou s vysokou pravděpodobností obsahovat parazity a patogenní bakterie na rozdíl od tepelně upravených RTE.

V roce 2008 bylo vyšetřeno 13 446 vzorků sushi a 2,9 % vzorků obsahovalo listerie v zimních měsících, zatímco v létě bylo vyšetřeno 13 404 vzorků a listerie obsahovalo 3,2 % vzorků. Ačkoli listeria byla zjištěna v některých vzorcích sushi, tento výrobek má velmi krátkou dobu trvanlivosti. Nebezpečí může nastat při silné sekundární kontaminaci nebo uchovávání při pokojové teplotě, která umožňuje rychlý růst *Lm*. Proto je vhodné, aby se jedlo sushi čerstvé bez jakýchkoliv sensorických změn, přičemž je třeba se vyvarovat zejména předem připravených výrobků tohoto typu (Anon., 42).

4.9 Startovací kultury

Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (dále jen „BMK“) jsou grampozitivní nesporogenní mikroaerofilní bakterie, které tvoří při fermentaci sacharidů jako hlavní produkt kyselinu mléčnou. Pro výrobu fermentovaných masných výrobků jsou nejvýznamnější skupinou (rod) BMK laktobacily. Sacharidy zkvašují (fermentují) homofermentativně nebo heterofermentativně.

Rod *Lactobacillus* (dále jen „LAB“) je považován za nejheterogennější skupinu BMK (Ljungh a Wadström, 2009).

Startovací kultura je komerční preparát obsahující živé mikroorganismy, které v potravine vyvíjejí požadovanou metabolickou aktivitu (Anon., 43, 44).

Jak uvádí Kameník (Anon., 44), startovací kultury jsou vybrané bakteriální kmeny, které se přidávají do salámového díla pro svůj pozitivní vliv na okyselení (a tím na mikrobiální stabilitu), barvu a chuť (aroma). Dávkování startovacích kultur do salámového díla musí zaručit minimální počet 10^7 bakteriálních buněk na 1 gram díla. Na 100 kg díla se takto aplikuje kolem 10^{12} buněk, které váží kolem 1 gramu. Pro snadnější manipulaci se startovacími kulturami se proto používají nosiče (zvětšení objemu, hmoty).

Do skupiny bakterií mléčného kvašení (BMK nebo LAB) jsou v současnosti zařazeny bakteriální rody: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella* (Stiles a Holzappel, 1997).

Antimikrobiální působení BMK

Bakterie mléčného kvašení se uplatňují jako významná překážka proti růstu nežádoucích mikroorganismů zejména v prvních dnech procesu výroby. Tento antagonistický efekt je založený na několika mechanismech. Jedná se o kompetici – soutěžení o živiny a životní prostor vůbec. V díle masného výrobku je hned

od počátku vytvořeno optimální prostředí pro rozvoj BMK, které se takto mohou proti svým konkurentům lépe prosadit. Rychleji rostou, rychleji využívají živiny, které již pak nejsou dostupné pro jiné – pomaleji se vyvíjející mikroby. Při své existenci vylučují BMK do zevního prostředí látky, z nichž mnohé mají přímý antibakteriální efekt. Může jít o peroxid vodíku nebo organické kyseliny. Složitější strukturu pak mají bakteriociny (Kameník, Anon., 44).

Klasickým projevem antagonismu BMK vůči *Lm*, je především rychlé snižování pH. Patogenní bakterie, včetně *Lm* jsou vůči této změně pH většinou velmi citlivé a pH je pro ně významným stresujícím faktorem (překážkou pomnožení).

4.10 Mikrovlnný ohřev

Mikrovlny (dále jen „MV“) mohou inaktivovat bakterie cestou tepelných účinků. Proto tepelná vodivost potravin hraje důležitou roli při mikrovlnném ohřevu. Velikost potravin ovlivňuje hloubku průniku mikrovln a tím se ovlivňuje nejen rychlost, ale i uniformita ohřevu. Dalším z vlivů je vlhkost výrobku. Výrazně ovlivňuje dielektrické vlastnosti potravin a v důsledku toho i hloubku pronikání mikrovln. Nízká vlhkost potravin má výhodu vyššího prohřátí jako následek hlubšího pronikání mikrovln. Kromě toho vyšší vlhkost může mít za následek i tepelnou ztrátu v důsledku vyššího povrchového odpařování vody z povrchu výrobku (Gunasekaran, 2002). Flores (1994) studoval účinky MV na mikro-

biologickou kontaminaci u potravin z mletého hovězího masa. Dospěl k závěru, že tuk podstatně hůře vede teplo než libové maso.

Nevýhodou ohřevu v mikrovlnné troubě je, že může prohřívát potravinu (podle složení) nerovnoměrně a tím mohou vznikat „studená místa, dutiny“, kde může *Lm* a jiné patogení bakterie přežít. MV pronikají do hloubky 2,5 až 4 cm tam, kde mohou na potravinu přímo působit (Anon., 45).

Pokud je dosaženo teploty 70 °C v „celém jídle“ a tato teplota je dosažena a udržována alespoň 2 minuty, dochází k podstatnému snížení počtu *Lm*. Schopnost *Lm* přežít tuto teplotu, v uvedeném čase, bude zřejmě souviset s nerovnoměrným prostupem tepla a s tím souvisejícím vytvářením studených míst v produktu Coote aj. (1991).

5. STRESORY VE VÝROBĚ POTRAVIN

5.1 Reakce bakterií a *L. monocytogenes* na stresory (překážky) ve výrobě

Mezi nejúčinnější stresory proti bakteriím *Lm* v průběhu výroby potravin patří:

- vysoká teplota
- chladicí teploty
- redukce vodní aktivity (*a_w*)
- zvýšení kyselosti (nižší pH)
- redukce redox potenciálu
- ochranná aditiva
- konkurenční mikroflóra a další (Anon., 46).



5.1.1 Teplota, chlad, mražení – vliv na růst *Listeria monocytogenes*

Nové studie naznačují, že mikroby mohou přežít v „pasti“ uvnitř ledových krystalů pod vrstvou kolem 3 kilometrů ledu a sněhu více než 100 000 let. Živé bakterie byly nalezeny ve vzorcích ledu v hloubkách 4 kilometrů v Antarktidě. Vysvětlení o přežití bakterií je postaveno na předpokladu, že kolem bakterií je slabá bublina (film) složená z kyslíku, vodíku, metanu a dalších plynů, které poskytují základní výživu k přežití. Tedy prakticky každý mikrob může zůstat naživu v ledu, odolat teplotám až -55 °C a tlaku 300 atmosfér (Anon., 47).

Tabulka č. 5.1 : Vybrané stresové limity pro přežití a pomnožování *L. monocytogenes* (Anon., 2)

Parametr	rozsah	optimum	může přežít (ale neroste)
teplota (°C)	-1,5 - 45	30 - 37	-18

Jak dokáže *Lm* přežít v prostředí nízkých teplot?

Aby se dokázala *Lm* vypořádat s tímto stresem, musí být provedeny následující kroky v buněčné struktuře a v zapojení některých „spících“ genů:

1) Změny v povrchové membráně buňky: základem je složení mastných kyselin, jejichž složení a poměr se mění podle informací, které buňka vnímá z okolního prostředí. Změny teploty vedou k přestavbě tukové složky tak, aby

byla umožněna rychlá propustnost stěny směrem z buňky pro tekutiny, enzymy apod. Změny v délce uhlíkových řetězců od C17 k vyššímu podílu C15 (Gandhi a Chikindas, 2007).

2) Změny v genové funkci a produkci specifických proteinů: v reakci na šok při snižování teploty se začíná produkovat specifický protein (Csps – cold shock proteins – tvoří ho asi 12 různých proteinů) a další aklimatizační proteiny (Caps – cold acclimation proteins), jako reakce na přizpůsobení růstu v chladu.

3) Tvorba akumulace kryoprotektivní látky v buňce: jedná se především o *karnitin* a *glycin betain*. Jako osmoprotektanty byly dále prokázány prolin betain, acetyl-karnitin, γ -butyrobetain, 3-methylsulfonylpropionát a další.

4) Aktivizace komplexu (sigma faktor): je to základní aktivátor antistresových genů s následnou produkcí specifických látek. Existuje ještě řada dalších mechanismů ovládaných genovou výbavou *Lm*, ale pro tuto publikaci nemají větší význam.

Kmeny adaptované na nižší pH mají často spojenou rezistenci k nízkým teplotám, více odolávají záhřevu, nižší aw, vyšší koncentraci solí apod. Jde o kombinaci aktivovaných genů. Například *Lm* adaptovaná při pH 5.2 za 2 hodiny vykazovala vyšší odolnost k teplotě 52 °C a koncentraci soli 20 až 30 %, kmeny byly také rezistentní k účinkům alkoholu (Gandhi a Chikindas, 2007).

Při poklesu teplot dochází nejprve ke změně v povrchové membráně buňky. Změny mají odlišné fáze v teplotním rozmezí od 45 °C do 5°C, respektive jsou založeny na reakcích dvou typů mastných kyselin. Od 45 °C do 20 °C probíhá fáze zkracování mastných kyselin, ale od 20 °C do 5 °C to bylo zkracování následované převažující syntézou jiných forem mastných kyselin. Zkracování řetězců mastných kyselin snižuje interakce mezi uhlíky sousedních řetězců buněčné membrány, což pomáhá udržovat optimální stupeň tekutosti membrány při růstu v nízkých teplotách (Černý, 2008).

Příklady přežití *Lm* v různých potravinách a při různých teplotách:

Populace *Lm* se snížila o < 1 log během skladování (více než tři měsíce) zamražením při -18 až -20 °C v naočkovaných vzorcích ryb, krevet, mletém hovězím a krutím mase, párčích, kukuřici a zmrzlině. Populace *Lm* v rajské polévce (pH 4,7) byla snížena asi o 3 log po obdobném zamražení. Snížení počtu *Lm* v rajčatové polévce bylo přičítáno spíše jako následek poškození buněk během rozmražování. Zmražení a následné rozmražení vede často k prasknutí buněčné stěny, změně integrity plazmatické membrány, což může způsobit únik cytoplazmatického obsahu (Lado, 2003).

Nízké teploty mražení a rychlé zmražení je nejvýhodnější pro bakteriální přežití. Když *Lm* byla zmrazena a skladována při teplotě

-198 °C (v kapalném dusíku), nebyly pozorovány žádné známky buněčné smrti. Během zmražení a skladování při teplotě -18 °C byly počty *Lm* sníženy o 1 až 2 log a poškozeno bylo > 50 % populace *Lm*. Podobné výsledky byly dosaženy u některých jídel (špenát, sýr, ryby, kuřecí a hovězí maso) během počátečního rychlého zmrazování při -50 °C během 57 minut a následném skladování (300 dnů) při teplotě -18°C. Rychlé zmražení a následné skladování snížilo počet *Lm* pouze o 0,1 až 1,6 log KTJ (Lado, 2003).

Opakované zamražování a rozmražování bakteriím škodí (u potravin není dovoleno). Avšak přidání 2 až 4 % glycerolu nebo 2 % mléka do média, ve kterém je *Lm* testována, pomáhá výrazným způsobem tomuto vlivu odolat. Mezi další ochranné složky, které jsou běžnou součástí potravin, napomáhající zvyšovat odolnost proti mražení patří kasein, laktóza a mléčný tuk. Přídavek některé ze složek mléka do masných výrobků, nebo jiných potravin, určitě napomáhá zvýšit chladovou rezistenci *Lm* (Lado, 2003).

5.1.2 Adaptace *Lm* na stres spojený s aw a obsahem soli

L. monocytogenes zůstává životaschopná i v prostředí aw < 0,90, nárůst počtu KTJ je minimální, spíše nulový. Je prokázáno, že *Lm* přežila ve fermentovaných sušených salámech (aw: 0,79 - 0,86) při 4 °C nejméně 84 dnů (Lado, 2003).

Metodika měření vodní aktivity (*aw*) vychází z platné legislativy:

ČSN ISO 21807 / 2008 Mikrobiologie potravin a krmiv – Stanovení vodní aktivity.

Tabulka č. 5.2: Vybrané stresové limity pro přežití a pomnožování *L. monocytogenes* (Lado, 2003)

Parametr	rozsah	optimum ^d	může přežít ^e (ale neroste)
teplota (°C)	-1.5 - 45	30 - 37	-18
pH ^a	4.2 - 9.5	7	3.3 - 4.2
aw ^b	0.90 až >0.99	0.97	< 0.90
sůl % ^c	< 0.5 až 12	N/A	≥ 20

a Kyselina chlorovodíková jako oxysličovadlo (inhibice závisí na typu přítomné kyseliny), **b** Chlorid sodný jako zvlhčovadlo, **c** Procenta chloridu sodného, vodní fáze, **d** Kdy je míra růstu nejvyšší, **e** Období přežití se liší v závislosti na povaze potravin a dalších faktorech, **N/A** Neuplatňuje se

Akumulace osmolytů

Většina bakterií se vypořádává se zvýšenou osmolaritou v prostředí akumulací osmolytů (Sleator and Hill, 2002). **Osmolyty** jsou malé vysoce rozpustné molekuly, které nemají za fyziologického pH žádný náboj. Mohou být v buňce nahromaděny ve velkých koncentracích, aniž by působily nepříznivě na nezbytné buněčné procesy. Zpočátku byly za osmolyty zúčastněné v toleranci *Lm* k solím považovány pouze glycin betain, karnitin a prolin (nebo peptidy obsahující prolin). Nicméně seznam osmolytů, které kromě osmotolerance podporují také toleranci k nízkým teplotám, se rozšířil o prolin betain, acetylkarnitin, γ -butyrobetain a 3-dimethylsulfoniopropionát (Bayles a Wilkinson, 2000) jak uvádí Černý (2008).

K akumulaci osmolytů využívá *Lm* poměrně mnoho mechanismů. Všechny však umožňují zvládnout osmotický stres za podmínek, že jsou osmolyty volně k dispozici v prostředí, ve kterém se bakterie momentálně nalézá.

Lm je dále vybavena systémem **GAD** (z angl. glutamate decarboxylase acid resistance system), který významně přispívá k přežití *Lm* (i jiných bakterií) při nízkém pH. GAD systém je složen ze tří genů *gadA*, *gadB* a *gadC*. Tyto geny jsou klíčové pro úspěšné fungování rezistence. GAD systém je prakticky nepostradatelný pro přežití v kyselém prostředí žaludku a chrání *Lm* před účinky žaludečních šťáv i během tranzitu zažívacím traktem (Gahan a Hill, 2005).

Funkčnost systému je navíc úzce závislá na přítomnosti glutamátu ve vnějším prostředí (Cotter aj., 2001). Údaje naznačují, že přítomnost vysoké hladiny glutamátu v konkrétních potravinách může mít za následek zvýšení tolerance *Lm* ke kyselinám.

Podobně fungují další výše uvedené ochranné složky, jako je například glycin betain. Je to osmolyt získávaný především z rostlinných složek, kdežto karnitin je získáván z potravin živočišného původu (Gahan a Hill, 2005).

Lm také akumuluje vysoké hladiny osmolytů, když se pěstuje na různých formách opracovaného masa, za snížených teplot. Například podíl akumulovaného karnitinu na celkové intracelulární koncentraci byl však mnohem větší ve vzorcích *Lm* pěstovaných na mase, než u těch, které byly pěstované v kapalných médiích. Ale bližší zjištění o systému akumulace naznačuje, že hromadění osmolytů k přežití *Lm* z masa je stejně důležité, jako z tekutých médií (Smith, 1996). Karnitin je důležitý osmoprotectant, který se může podílet na zvýšení thermotolerance, cryotolerance a barotolerance (Meadows a Wargo, 2015).

5.1.3 pH

Optimální pH pro růst *Lm* je v neutrální oblasti. Minimální čas k dvojnásobnému pomnožení *Lm* byl 81 minut při pH 7,2 a 125 minut při pH 5,5. V prostředí pH 4 byl růst

zastaven, *Lm* si ale zachovala původní počet KTJ. Když kleslo pH pod 4, začal se projevovat smrtící efekt. Letální efekt po 60 minutách při pH 3,5 a 3,3 činil 27 a 2,4 %. Při pH 3 byla *Lm* zcela devitalizována. Na základě této a podobných studií bylo zvoleno pH 3,5 jako indukující syntézu specifických ATR bílkovin (Phan-Thanh a Montagne, 1998).

Tabulka č. 5.4: Přibližné pH hodnoty umožňující růst *L. monocytogenes* v potravinách (Anon., 48).

	pH min	pH průměr	pH max
<i>Lm</i>	4,39	7,0	9,4

pH stres:**Definice acidického (pH) stresu:**

- Jedná se o kombinovaný biologický účinek nízkého pH a slabých (organických) kyselin v prostředí, kde se bakterie nacházejí.
- Slabé kyseliny: těkavé mastné kyseliny jako butyrát, propionát a acetat.
- Nenabité, protonované slabé kyseliny difundují přes membránu a disociují až v cytoplasmě, kde snižují pH.
- Čím nižší je vnější pH, tím více slabých kyselin bude protonováno (podle pKa hodnot) a tím více jich bude procházet membránou.
- K usmrcení buněk při pH 3,5 je potřeba méně slabých org. kyselin, než při pH 4,5 (Anon., 49).

Regulace odpovědi na stres způsobený kyselinami

Stres způsobený kyselinami může být také popsán jako kombinovaný biologický efekt nízkého pH s přítomností slabých kyselin v prostředí. Slabé kyseliny v protonové formě bez náboje mají schopnost difundovat přes membránu a disociovat uvnitř buňky, což způsobí pokles interního pH (dále jen „pHi“) v buňce. Čím nižší je externí pH (dále jen „pHe“), tím víc nedisociovaných slabých kyselin je k dispozici na přechod membránou a schopných ovlivnit pHi.

Řada volných mastných kyselin vykazuje listeristatický až listericidní efekt a snižuje tak nejen počty *Lm*, ale i jejich invazivní schopnosti. Mezi prokázané účinné mastné kyseliny patří: kyselina laurová (C12:0), linolová (C18: 2) a kyselina linolenová (C18: 3). Přítomnost těchto mastných kyselin v množství ≥ 200 mg / ml vykazovala listericidní efekt. Efektivita těchto kyselin se nejvíc projevuje v prostředí pH 5,0. Se stoupajícím pH (6 až 7) aktivita klesá. Ostatní mastné kyseliny mají variabilní dopad na růst nebo životaschopnost *Lm* a jiných patogenů (Lado, 2003).

Lm si může vytvořit zvýšenou toleranci ke kyselinám (pH) během exponenciálního růstu, po předchozí expozici k subletální acidifikaci. Tato reakce je komplexní odpovědí buňky na okolní prostředí a označuje se jako „acid tolerance response“ (dále jen „ATR“). Maximální rezistence bývá zjištěna

při expozici bakterií k pH 5,0 pro dobu jedné hodiny před ověřením přežitelnosti *Lm* v podmínkách pH = 3.

Doba 60 minut je adaptační čas *Lm*, během něhož dochází k rozvoji maximální tolerance k pH. Během této doby lze postupně zvyšovat úroveň pH tolerance. Vytvoření pH rezistence (ATR) vyžaduje širší syntézu nových bílkovin (Davis aj., 1996). Získaná tolerance vydržela u bakterie uchovávané v teplotě 4 °C po dobu několika týdnů (Phan-Thanh aj., 2000).

Stresy vyčerpaná *Lm* (v průběhu výroby) musí přežít další překážky v těle člověka. Nejvýraznějším stresem je žaludeční pasáž. Lidský žaludek vykazuje pH od 1 do 3, ale může být i vyšší (než 6,0). To souvisí se skladbou stravy, stravovacích zvyklostí, účinku léčebných preparátů apod. (Ivy aj., 2012).

Jak již bylo uvedeno dříve, *Lm* je všudypřítomná. Kromě vlivů při výrobě potravin se na jejím rozvoji genetických odpovědí může podílet i kyselost v životním prostředí a hostitelských systémech. Kyselé deště, průmyslové odpady, hnůj, siláž, fermentované potraviny, gastrointestinálních sekrety, léčiva a řada dalších efektů může podporovat rozvoj rezistencí (zejména k pH) u *Lm* a samozřejmě i u jiných bakterií.

Byly studovány účinky slabých organických kyselin na *Lm* a také účinek směsi těkavých

mastných kyselin (kyselina octová, propionová kyselina a kyselina máselná), které kopírují složení kyselin v lidském střevě.

Když byla ke snížení pH média použita kyselina octová, místo kyseliny chlorovodíkové (HCl), žádná *Lm* nepřežila stres v čase 60 minut při pH 3,5 (v porovnání s 27 % přežití *Lm* při použití HCl). Kyselina octová při pH 3,5 byla příliš toxická pro *Lm* ve stejné hodnotě 3,5 pro externí pH (pHe). Intracelulární pH (pHi) odpovídající HCl bylo 4,22, ale u kyseliny octové bylo sníženo ze 4,22 na pH 3,34. Kyselina octová způsobila mnohem důležitější snížení pHi. Při porovnání účinku různých kyselin můžeme konstatovat, že externím pH 4,2 (pHe), kyselina chlorovodíková nezpůsobila smrt *Lm*, ale přítomnost organických kyselin může způsobit rychlejší letální účinek. Tento efekt byl také více patrný při pHe 3,8 se silnější kyselinou octovou, než koktejl těkavých mastných kyselin.

Má žluč nějaký vliv na přežití *Lm*?

Žluč je složena především ze sodných solí žlučových kyselin. Žlučové soli umožňují emulgaci tuků, čímž je připravují k trávení a vstřebávání v tenkém střevě. Žlučové kyseliny mají také silnou antimikrobiální

aktivitu. Rozpouštějí fosfolipidy, cholesterol a proteiny buněčné membrány, což může vést až k destrukci buněk (buněčné lýzi).

Kmeny *Lm* dokázaly tolerovat i 30% přítomnost hovězí žluči a dokonce v ní byly schopné i růstu (Černý, 2008).

5.1.4 *L. monocytogenes* ve vztahu k ukazatelům: D-time, z-value (hodnota)

V potravinářském průmyslu je důležité snížit množství bakterií ve výrobcích tak, aby byla zajištěna bezpečnost a kvalita potravin. Toho se docílí především tepelným zpracováním a nalezením jiných způsobů, jak snížit počet bakterií ve výrobku. Pro vyjádření snížení počtu mikroorganismů v závislosti na čase se používá několik hodnot, tzv. sterilizačních symbolů: D-hodnota (time), z-hodnota a F-hodnota.

D-hodnota (decimal reduction time) je definována jako čas potřebný pro snížení bakteriální populace o 90 % při dané teplotě. Udává se v minutách. **Z-hodnota** je udávána ve °C a je to hodnota, o kterou musí být původní teplota zvýšena, aby se D-hodnota snížila na 1/10 (Van Asselt a Zwietering, 2006).

Tabulka č. 5.5: D- hodnoty (sec) pro *Salmonella senftenberg* 775W, *L. monocytogenes* 101M a *Enterococcus* sp. B2354; v přítomnosti 4 a 12% tuku v mletém hovězím mase při teplotách 58, 62, 65, a 68 °C (Anon., 50).

Bakteriální kmen	% tuku	58 °C/sec.	62 °C/sec.	65 °C/sec.	68 °C/sec.
L. monocytogenes 101M	4	152 ± 39	31.2 ± 2.2	9.2 ± 0.7	4.3 ± 0.3
	12	264 ± 28	36.2 ± 1.3	13.6 ± 0.7	4.21 ± 0.41
S. Senftenberg 775W	4	154 ± 3	40.2 ± 2.8	8.7 ± 1.4	3.3 ± 0.5
	12	269 ± 11	50.3 ± 2.3	14.6 ± 2.7	4.53 ± 0.43
Enterococcus sp. B2354	4	2,724 ± 226	476 ± 14.3	70.2 ± 11.0	18.6 ± 0.4
	12	3902 ± 193	736 ± 110	118 ± 22	16.5 ± 3.3

Vysvětlivky: sec. = sekundy

Komentář k tabulce č. 5.5: Zvýšená rezistence k teplotě byla jednoznačně prokázána u *Enterococcus* sp. oproti salmonelám a *Lm*. Výsledky také prokazují ochranný efekt vyššího obsahu tuku u nižších teplot, kdy je zapotřebí vyššího času k dosažení stejného efektu.

Lm 101M a *Salmonella senftenberg* 775W byly vybrány pro vyšší tepelnou rezistenci (podle publikovaných údajů). *Salmonella Senftenberg* 775W je podle literárních údajů asi 30krát více odolná k tepelnému ošetření než je *Salmonella typhimurium*.

Tabulka č. 5.6: z hodnoty (°C) pro *S. senftenberg* 775 W, *L. monocytogenes* 101M, a *Enterococcus* spp. B2354 v mletém hovězím mase s obsahem tuku 12% (Doyle, 2005).

bakterie	% tuku	z-value (°C)
L. monocytogenes 101M	4	6,3
	12	5,6
S. senftenberg 775 W	4	5,8
	12	5,6
E. faecium B2354	4	4,5
	12	4,2



Komentář k tabulce č. 5.6: Podstatně nižší hodnota je evidentně u enterokoků oproti salmonelám a *Lm*. Nejvyšší požadavek na zvýšení teploty vykazovala *Lm* → *Salmonella* sp. → *E. faecium*. Z výsledků lze využít i poznatek, že pokud jsou inaktivovány enterokoky, teplota a čas je dostatečná pro eliminaci salmonel a *Lm* z potravin.

5.1.5 Modifikovaná atmosféra a obaly

Balení potravin v modifikované atmosféře (dále jen „MOA“) a podobné technologie snižují riziko výskytu patogenních bakterií (včetně *Lm*) a mohou prodloužit dobu spotřeby, bez velkého rizika nakažení konzumenta či zkažení potravin.

Lm roste dobře v aerobních i anaerobních podmínkách, je tolerantní k chladu. Tyto vlastnosti činí *Lm* potenciální hrozbou pro bezpečnost potravin, které jsou baleny ve vakuu nebo upravené atmosféře. Přítomnost > 80 % oxidu uhličitého v balící atmosféře je doporučena ke zpomalení růstu *Lm*. Inhibice růstu oxidem uhličitým (> 50 %) byla mnohem výraznější při 4 °C než při 10 °C a také při pH 5,5 oproti pH 6,5. Začlenění organických kyselin nebo bacteriocinů zvyšuje bezpečnost balených potravin při použití modifikované atmosféry (Lado, 2003).

Bylo zjištěno, že v běžné atmosféře roste *Lm* pomaleji než běžné (kazící) psychrotrofní bakterie (Manu-Tawiah aj., 1993).

A) *Lm* a modifikovaná (řízená/ochranná) atmosféra (MOA) její výhody x nevýhody (anon.,1) :

- *Lm* roste bez kyslíku, může se pomnožovat ve vakuu při pH > 6.
- Ochranná atmosféra může inhibovat některé skupiny bakterií, které kazí potraviny, ale často nemá výrazný vliv na snížení počtů *Lm*.
- Vysoký obsah CO₂ má inhibiční vliv na růst *Lm*, především v nízkých teplotách.
- Koncentrace CO₂ v hodnotě 5 až 10 % nezpomalí růst *Lm*.
- 75 % obsah CO₂ inhiboval růst *Lm* při teplotách 4 °C až 27 °C, ale neměl žádný efekt při přítomnosti 5 % O₂.
- Plyn s 80 % O₂ měl inhibiční efekt při 1 °C.
- MOA například 90 % CO₂ v kombinaci s mléčnany má inhibiční efekt na *Lm* asi 14 dnů, zatímco samotná MOA asi týden a samotný mléčnan 2 až 4 dny.
- Kombinace MOA s jinými prostředky – bacteriociny, mléčnany, záření apod., má vždy prodloužený inhibiční efekt na *Lm*.

B) Aktivní obaly:

Obalové materiály obsahující látky s aktivitou proti *L. monocytogenes* jsou stále vyvíjeny a vylepšovány pro zvýšení bezpečnosti potravin a odolnosti proti kažení, po jejich zabalení. **Listeristatické** nebo **listericidní**

agens jsou například zabudovány do mezivrstvy balícího materiálu. Mohou to být organické kyseliny, bacteriociny, extrakty z koření, lysozym, chitosan, listeriofágy nebo EDTA, které brání pomnožování *Lm* v potravine nebo na jejím povrchu poté, co jsou tyto antimikrobiální látky imobilizovány z nosiče či obalu. Například nisin (1 mg/ml) adsorbovaný oxid křemičitý inhibuje některé, ale ne všechny kmeny *Lm* (Lado, 2003).

Adsorbované antimikrobiální látky jsou obecně mnohem účinnější proti *Lm* při použití v kombinaci než jednotlivě.



Využití nanolátek

Jak uvádějí Ramachandraiah aj. (2015), některé z balících technologií mohou potenciálně využívat nanotechnologie dodáním antioxidantů a antimikrobiálních látek pomocí nanomateriálů ve zpracovaném masu. Přestože existuje mnoho výhod, byly vzneseny

rovněž obavy z potenciálního rizika využití nanotechnologií v potravinářském průmyslu. Jde hlavně o vyhodnocení bezpečnosti nanomateriálů na buňkách, mnohé testy již byly provedeny, včetně orální toxicity, kožní toxicity, testy akutní i chronické, jakož i vyhodnocení schopnosti vyvolat mutagenese a podráždění kůže (Cushen et al., 2012). Bylo zjištěno, že cytotoxicita, genotoxicita, oxidační stres, záněty a řada dalších vlivů může být způsobena použitím některých nanomateriálů v potravinářských aplikacích (Cockburn et al., 2012). Použití kovových nanočástic z mědi, zinku a oxidu titaničitého ukázalo akutní orální toxicitu u hlodavců, ale ve zvýšených dávkách.

Antibakteriální vlastnosti esenciálních olejů

Na trhu je k dispozici minimálně 300 druhů esenciálních olejů, které lze komerčně využít proti bakteriím. Jde o přirozené konzervanty, ale jejich plošné využití je problematické.

Jednou z testovaných látek je například hřebíčkový olej, který v koncentracích 0,5 a 1 % omezil růst *Lm*. Je zřejmé, že 1% koncentrace přidaná do mletého skopového masa měla vyšší efekt než 0,5% přídavek (Jayseena a Jo, 2013). Použití esenciálních olejů do všech potravin je omezeno pro jejich vůně a chuti, které ovlivňují senzorické vlastnosti surovin a potravin.

Reakce grampozitivních (dále jen „G+“) bakterií na rostlinné extrakty (EO) je obecně mnohem vyšší než u gramnegativních (dále jen „G-“) bakterií. Je to hlavně kvůli přítomnosti lipopolysacharidové složky buněčné stěny u G- bakterií, která brání šíření hydrofobní sloučeniny. *Lm* vykazuje větší citlivost na extrakty z koření než salmonely (Gyawali aj., 2015).

Esenciální oleje jsou uznány a označeny jako GRAS - obecně uznávané jako bezpečné (U.S. Food and Drug Administration). Informací tohoto charakteru je nepřeborné množství a není účelem tohoto sdělení zabývat se těmito látkami a účinky proti *Lm* do hloubky.

5.1.6 Obaly

Aktivní balení je jedním z inovativních způsobů ochrany potravin, které byly zavedeny v reakci na průběžné změny v současné spotřebitelské poptávce a trendech na trhu. Jedná se o „typ balení, které mění stav podmínek vedoucích k prodloužení trvanlivosti nebo zvýšení úrovně bezpečnosti nebo senzorických vlastností při zachování kvality potravin“ (Anon., 51).

Aktivní balení potravin může poskytnout několik funkcí najednou, které neexistují v konvenčních balících systémech. Tradiční metody uchování potravin vychází z účinku proti mikrobiálnímu růstu, což je tepelné opracování, sušení, zmrazení, chlazení, ozarování, ochranná atmosféra, přidání antimikrobiálních látek nebo soli. Bohužel, některé

z těchto nových postupů nelze použít pro všechny potraviny, například pro čerstvé maso a některé RTE výrobky. Antimikrobiální balení je slibná forma ochrany zejména pro masné výrobky. Přímé povrchové aplikace antibakteriálních látek na potraviny mají omezené výhody, protože aktivní látky mohou být neutralizovány v místě aplikace nebo rychle difundují z povrchu dovnitř potravin.

Antimikrobiální balení je druh aktivního balení, které výrazně mění tradiční pohled a úlohu tradiční pasivní role obalu jako pouhé ochrany a potravinářských výrobků uváděných na trh. Postupným uvolňováním z obalu probíhá žádoucí proces snižování počtu nebo inhibice růstu mikroorganismů na povrchu potravin. Antimikrobiální balení může mít různé formy.

Zásadním ukazatelem u těchto technologií je rovnováha distribuce látek mezi obalovým materiálem, volným prostorem a potravinou. Je třeba znát hlavní migrační mechanismy aktivních látek k odhadu distribuce látky na rozhraní či kontaktních plochách obalu a potravinou. Těkavé látky lze použít v těchto systémech, pokud umožňují přenos z obalu, přídatných balíčků a pod, přes vzduchové mezery balíčku a jídlem (Anon., 52).

Bacteriociny jsou heterogenní skupina bioaktivních peptidů, které jsou schopny letálního efektu nebo zastavení růstu blízké příbuzných mikroorganismů (patogenů)

v potravinách. *Lm* patří mezi patogeny, které jsou schopny přežít a množit se v chladírenských teplotách. Vyráběné masné výrobky jsou většinou ošetřeny tepelně, což je zásadní letální efekt pro kontaminující bakterie. Kontaminace *Lm* však mohou být prakticky u každé další fáze opracování potravin. Především u těch, které jsou krájeny nebo jinak děleny a baleny pro maloobchodní podniky nebo výrobní lahůdek.

Esenciální oleje - jak uvádí Rocha aj. (2013), esenciální oleje jsou zařazeny do kategorie GRAS (z angl.: generally recognised as safe) – jsou obecně uznávané jako bezpečné podle U.S. Food and Drug Administration. Mnoho esenciálních olejů bylo použito jako antimikrobiální přísady do filmů včetně bergamotu (*Citrus bergamia*), skořice (*Cinnamomum verum*), citronelly (*Pelargonium citrosium*), koriandru (*Coriandrum sativum*), hřebíčku (*Syzygium aromaticum* L.), cypřiše (*Cupressus sempervirens* L.), fenyklu (*Foeniculum vulgare* Miller), česneku (*Allium sativum*), zázvoru (*Zingiber officinale*), levandule (*Lavandula stoechas*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*), oregana (*Origanum vulgare*), borovice (*Pinus sylvestris*), rozmarýnu (*Rosemarinus officinalis*), šalvěje (*Salvia officinalis*) a tymiánu (*Thymus vulgaris*). Antimikrobiální aktivita éterických olejů je přisuzována především terpenoidům a fenolickým sloučeninám, jako je například thymol, karvakrol a eugenol.

Terpeny mají schopnost narušit a proniknout do lipidové struktury buněčné stěny bakterie,

což vede k denaturaci bílkovin a destrukci buněčné membrány, cytoplazmatickému úniku, lýze buňky a nakonec smrti buňky (Emireglu aj., 2010). Pokles pH, který se vyskytuje v důsledku narušení buněčné membrány a má za následek ztrátu kontroly nad buněčnými procesy, jako je transkripce DNA, bílkovinné syntézy a enzymové aktivity (Caillet aj., 2004). Účinek antimikrobiálních filmů s esenciálními oleji byl ověřen proti mnoha patogenům, jako je *E. coli*, *E. coli* O157: H7, *Lm*, *S. aureus*, *S. enteritidis* a *S. typhimurium*.

Chitosan je polysacharid, který byl odvozen z chitinu (biopolymeru), který je bohatě obsažen v řadě ulit (např. krabí skořápky), buněčných stěnách hub a jiných biologických materiálech. Chitosan má schopnost působit jako antimikrobiální látka na filmech proti mikroorganismům jako je *E. coli*, *S. aureus*, *Lm*, *B. cereus*, *S. typhimurium* a řadě plísní. Chitosan má významnou antimikrobiální aktivitu kvůli jeho NH₂ skupině, která snadno tvoří elektrostatické interakce s aniontovými skupinami mikrobiálních buněčných membrán, což vede k úniku bílkovin a následnému prasknutí buňky (Rocha aj., 2013).

5.2 Aditiva

Existuje propast mezi vnímáním a realitou ve vztahu k aditivům?

Až 30 lidí ze 100 „věří“, že jsou alergičtí nebo mají intoleranci na jednu nebo více potravin, případně „ěčka“. Studie ve Velké Británii pomocí „testování naslepo“ však naznačují, že

pouze 1 člověk až 2 lidé ze 100 mají pravou potravinovou alergii (Anon., 66).

Aditiva - chemické látky, ať přírodního nebo syntetického původu, se přidávají do potravin kvůli vylepšení nebo zachování jejich trvanlivosti, vzhledu, konzistence, chuti, vůně atd. Všechna aditiva musí být použita v souladu s platnou legislativou.

Aditivní látky v potravinách splňují tyto hlavní úkoly:

- Zajištění hygienické nezávadnosti potravin;
- Zlepšení kvality potravin;
- Zvýšení dostupnosti ve všech ročních obdobích;
- Zlepšení nebo udržení jejich nutriční hodnoty;
- Zvýšení jejich přijatelnosti pro spotřebitele;
- Zlepšení a usnadnění přípravy potravin (Anon., 53).

Za aditivní látky také nepovažujeme vodu, NaCl, cukr, CO₂ a etanol. Použití aditivních látek je vyloučeno u nezpracovaných surovin, medu, kávy, čaje, cukru, másla, mléka, podmáslí a zakysaných mléčných výrobků. Spotřebitel je o přítomnosti aditivních látek ve výrobku informován výrobcem na obalu výrobku, a to formou tzv. E – kódů (Anon., 54).

Lysozym: je antimikrobiální enzym, který se přirozeně vyskytuje v potravinách živočišného původu, včetně slepičích vajec a mléka. Tento enzym působí proti mnoha gram-pozitivním bakteriím (včetně *Lm*) a byl navržen pro použití v sýru. Lysozym je atraktivní ze-

jména jako konzervant potravin, protože tento enzym je aktivní od 4 do 95 °C a v rozmezí pH, které je běžně využíváno v potravinách. Listeriostatická nebo listericidní účinnost byla prokázána v zelenině, čerstvém mase, zpracovaných masných výrobcích (např. šunka), rybím filé, majonéze, mléku a sýrech (Lado, 2003).

Peroxid vodíku způsobuje oxidační poškození v bakteriální DNA, RNA, proteinů a tuků. Kataláza *Lm* detoxikuje nízké úrovně peroxidu vodíku. Vysoká koncentrace tohoto antimikrobiálního činidla, však ničí buněčnou katalázu a tím překoná přirozenou obranu tohoto patogenu.

Laktoperoxidáza představuje 1 % mléčných syrovátkových bílkovin. Jde o antimikrobiální systém přirozeně se vyskytující v mléce. Tento ochranný komplex je možné dobře využívat k prodloužení trvanlivosti mléka především v zemích, kde nejsou k dispozici dostatečně účinné chladicí systémy. Kravské mléko obsahuje přirozeně thiokyanát 1 až 7 ppm. Doplnění thiokyanátu do mléka na konečnou koncentraci >35 mg / l mléka je nezbytné pro uspokojivou listerio-statickou účinnost (Lado, 2003).

Tekutý kouř

Tekutý kouř může silně ovlivnit růst a přežití *Lm*. Složky kouře jsou stresorem, který má vliv na metabolické procesy buňky a inhibuje hemolytickou aktivitu *Lm*. Bližší informace

byly podány dříve. Kouř obsahuje složky formaldehydů, fenolů a jejich derivátů, organických kyselin, uhlíkových sloučenin a dalších složek (Guilbaud aj., 2008).

5.2.1 Bakteriociny, jejich účinek proti *Lm*

Bakteriociny: jsou heterogenní skupina bioaktivních peptidů, které jsou schopny vyvolat buněčnou smrt nebo zastavit růst mikroorganismů, například patogenů z potravin (Fadda aj., 2010).

Mnoho bakterií produkuje antimikrobiální látky (peptidy), které mají výrazné inhibiční účinky proti *Lm* (především ruší účinky a funkci buněčné membrány). Bakteriociny o molekulové hmotnosti pod 10 000 jsou velmi aktivní proti *Lm* (např. nisin způsobuje změny v uskupení mastných kyselin v buněčné membráně *Lm*).

Bakteriociny vs. antibiotika:

Bakteriociny jsou často zaměňovány s antibiotiky. To by absolutně omezilo jejich použití v potravinářských aplikacích z právního hlediska. Bakteriociny, které jsou jasně odlišitelné od klinických antibiotik, by se měly bezpečně a efektivně použít k řízení (potlačení) růstu cílových patogenů v potravinách. Na rozdíl od bakteriocinů jsou antibiotika obecně považována za sekundární metabolity. Antibiotika nejsou syntetizována ribosomálně (Cleveland aj., 2001).

Toxicita bakteriocinů

Schválení nisinu bylo založeno na publikovaných i nepublikovaných údajích o jeho bezpečnosti, nikoliv na historii běžného použití (U.S. Food and Drug Administration, 1988). Studie subchronické, akutní a chronické toxicity, senzibilizace a zkřížené rezistence ukázaly, že nisin je bezpečný pro lidskou spotřebu v ADI (přijatelný denní příjem) 2,9 mg/osobu/den (U.S. Food and Drug Administration, 1988). Vzhledem k tomu, že nisin je přijímán ústně, byl rovněž posuzován účinek nisinu na ústní mikroflóru. Bylo zjištěno, že po 1 minutě od požití čokoládového mléka s obsahem nisinu, byla prokázána pouze 1/40 původní koncentrace nisinu ve slinách. Další studie prokázaly účinek žaludečních enzymů na nisin. Trypsin inaktivuje peptid a tak byl učiněn závěr, že požití nisinu nebude mít vliv na užitečné organismy, například mikroflóry střeva (Cleveland aj., 2001).

5.3 Ultrafialové světlo

L. monocytogenes je mnohem citlivější k ultrafialovému (dále jen „UV“) světlu než jiné grampozitivní bakterie (Lake aj., 2005).

UV světlo bylo využito pro kontrolu mikrobiální kontaminace v některých oblastech potravinářství kvůli jeho baktericidním účinkům. Ultrafialové záření o vlnových délkách 220 až 300 nanometrů je považováno za zdroj baktericidních účinků na bakterie, plísně, kvasinky a viry. Nejvíce mikrobiologicky škod-

livé rozmezí vlnových délek ultrafialového záření je mezi 240 a 280 nm. UV inaktivace mikroorganismů závisí hlavně na dosažené dávce při ozáření agens a ne na intenzitě světla (Gailunas, 2003).

Nicméně rezistence bakterií se liší mezi jednotlivými druhy a závisí také na věku organismů a přítomnosti spor a plísní. Obecně, gram-pozitivní bakterie mají tendenci být odolnější vůči UV záření než gramnegativní organismy a sporetvorné bakterie. Vegetativní bakterie jsou nejvíce odolné vůči UV záření před aktivním buněčným dělením během Lag fáze. Také bylo zjištěno, že i vysoká dávka UV se stává méně účinná při vyšším počtu buněk. Absence kyslíku také zvýší mikrobiální odolnost vůči UV záření (Gailunas, 2003).

Použití ultrafialového světla pro kontrolu listerií v mase

Protože UV světlo nemůže proniknout do potravin, působí pouze na mikroby exponované na povrchu. Bakterie na hladkém povrchu - jako jsou například destičky agaru v laboratořích nebo plochý talíř, mohou absorbovat více UV záření než bakterie na hrubém povrchu. Stejně jako některé celistvé kusy hovězího masa, vepřové nebo kuřecí kůže. Studie prokázaly, že UV záření nemá škodlivý vliv na barvu masa, ani nezpůsobuje oxidační žluknutí. To proto, že UV záření neindukuje produkci oxidujících volných radikálů. Toxicita UV záření spočívá především v tvorbě tyminových dimerů, které narušují

strukturu a fungování DNA v bakteriálních buňkách.

Experimenty s *L. monocytogenes* a UV prokázaly, že buňky ve vlhkém prostředí byly zničeny mnohem snadněji než ty v suchém filmu nebo krustě. Kromě toho kratší vlnové délky (254 nm) jsou mnohem účinnější než delší vlnové délky (365 nm). Novinka, která výrazně zvyšuje špičkový výkon u zdroje UV



světla - je technika pulzní energie (PPET). PPET světelné zdroje pracující při 1 impulsu/sekundu jsou schopny inaktivovat *Lm* na povrchu agaru mnohem rychleji, než trvalý zdroj světla a mohou snížit populaci buněk o 6 log během 512 μ s. Porovnáním citlivosti původců alimentárních onemocnění (pěstovaných na agarových plotnách) odhalilo, že *Lm* více odolává UV světlu oproti jiným bakteriím:

L. monocytogenes > *Staphylococcus aureus* > *Salmonella* Enteritidis > *E. coli* > *Bacillus cereus* (Gailunas, 2003).

Germicidní lampy

Jsou využívány pro vytváření UV záření typu C (dále jen „UVC“). Jejich účinek je založen na emisi záření o vlnové délce blízko 254 nm, což je záření s nejvyšším baktericidním účinkem (Anon., 55). Baktericidní účinek spočívá v proniknutí záření do buňky a následnému poškození DNA.

Pokud jsou bakterie pouze poškozeny a ne zcela inaktivovány, jejich životaschopnost nekončí. Mají úžasné schopnosti sebeopravy. Zmíníme pouze ten nejjednodušší z mnoha možných:

Fotoreaktivace:

Tento termín je znám již od roku 1949. Vyjadřuje snad jeden z nejjednodušších a nejstarších opravných systémů mikroorganismů, který se skládá z jediného enzymu: fotolyázy. Fotolyázy byly zjištěny u bakterií, hub, rostlin, bezobratlých a mnohých obratlovců. Zdá se, že fotolyázy chybí nebo nejsou funkční u člověka (Sinha a Häder, 2002).

I když i u člověka byly studovány možnosti fotoreaktivace. Jev byl zkoumán v lidské kůži, kde je využíván buňkami ke snížení účinku UV záření s delší vlnovou délkou v souvislosti se vznikem erytému (Sutherland, 1981).

Existuje řada dalších systémů, jak se bakterie mohou a umí opravit (oprava DNA excizí apod.).

Výhody UV dezinfekce

UV má mnoho výhod oproti jiným metodám. Na rozdíl od chemických ošetření UV záření nezpůsobuje tvorbu toxinů nebo metabolitů, nemění chemické složení, chuť, pach nebo pH. Vody nebo kapaliny jsou dezinfikovány. UV záření lze použít pro primární dezinfekci nebo jako podporu pro jiné metody čištění - například uhlíkové filtrace, reverzní osmózu nebo pasterizaci (Sinha a Häder, 2002).

Nevýhody UV záření u potravin

UV záření jako metoda povrchové desinfekce je použitelná v případech kdy nedochází ke stínění ošetřovaného povrchu žádnou překážkou neprostupnou pro UVC. Je vhodná pro ošetření povrchu baleného masa (Djenane et al., 2001), ovšem pouze v případě balení do obalů propouštějících UV záření. Je vhodné pro ošetření povrchu ryb, vaječných skořápek apod. Wong aj. (1998) prokázali, že na povrchu potravin, jejichž povrchová struktura vytváří malé stíny, absorbují bakterie menší dávku záření. Reálná odolnost bakterií vzniká, díky povrchovým nerovnostem.

V naší NRL pro *L. monocytogenes* (SVÚ Jihlava) jsme se věnovali účinkům UV lampy v provozu, kde může dojít k určitému stínění a tím i k přežívání bakterií. Cílem práce bylo zjistit, do jaké míry mohou různé nečistoty ovlivnit germicidní účinek UV lampy na *Lm* a *Escherichia coli*. *Lm* je významný patogen

vyskytující se v potravinách a je považována odolnou vůči UV záření. *E. coli* je naopak považována za citlivější k UV záření.

Stín byl uměle vytvořen zakrytím misky polyetylenovým sáčkem; položením drobků (strouhanka) na povrch agaru; položením špendlíku na povrch agaru; položením kancelářské svorky nad agar na okraje misky tak, aby se nedotýkala media; položením chomáče prachu na povrch agaru a jako kontrola byly použity Petriho misky bez zakrytí. Vzdálenost UV lampy od Petriho misky byla jeden metr. Ozáření bylo provedeno na miskách bez jakéhokoliv stínu pod úhlem 45° a pod úhlem 90°, a na miskách s vytvořeným stínem pod úhlem 45° a pod úhlem 90° (Brychta aj., 2011).

Výsledky:

Z testovaných stínících materiálů neměly žádný vliv na účinnost UV záření polyetylenový sáček, chomáč prachu a kancelářská svorka. Omezení účinnosti UV záření se naopak projevilo u špendlíku a drobků. Materiál prostupný pro UV záření (polyetylenový sáček) nesnižuje baktericidní účinek UVC záření. Materiál neprostupný pro UVC záření (víčko Petriho misky, drobký) snižuje baktericidní účinek UVC. Pokud je vzdálenost stínícího předmětu od bakterií dostatečná – asi 4 mm, UV záření se láme (ohýbá) a může tak zasáhnout celý ozařovaný povrch (Brychta aj., 2011).

5.4 Vznik a rozvoj rezistence na antimikrobiální látky u *Lm*

Rezistence k antibiotikům

Vývoj bakteriální rezistence, resp. adaptace bakterií na přítomnost antibiotika, není překvapující. Je nutné si uvědomit, že bakterie jsou obyvateli planety Země více jak 3,8 miliardy let a za tuto dobu se jistě naučily přizpůsobovat se vnějším vlivům. Aarestrup (1999) udává, že více jak polovina celkové světové spotřeby antimikrobiálních přípravků se používá v chovech hospodářských zvířat, kde jsou používány nejen k terapii a prevenci bakteriálních infekcí, ale i jako růstové stimulatory.

a) Primární rezistence

Některé mikroorganismy jsou primárně (přirozeně) rezistentní vůči některým antimikrobiálním látkám. Takové bakterie jsou rezistentní vůči danému antibiotiku bez jakékoliv genetické změny.

b) Sekundární rezistence

Sekundární (získaná) rezistence na antibiotika je stále větším problémem. Bakterie původně citlivé na určitý druh léčiva, jsou schopny se stát rezistentními a léčba tímto antibiotikem je naprosto neúčinná. Další nepříjemnou skutečností je i to, že v přítomnosti antibiotika se selektují rezistentní kmeny, které se nacházejí v každé velké bakteriální populaci. Rezistence k antibiotikům narůstá rychleji, než výzkum stačí připravit nové typy antimikrobiálních látek.

Za většinou těchto nepříznivých změn je potřeba vidět i viníka. Tím je například:

- nadměrné užívání antibiotik i v ordinacích, podávání v neinfekčních stavech,
- nevhodné použití antibiotik - bez předchozího ověření citlivosti,
- nedodržení léčebného režimu – pacient musí dostat kompletní dávku a dodržovat předepsané časy užívání,
- lidé si berou antibiotika „naslepo“ z vlastních zásob, apod.

Míra rezistence *Lm* k antibiotikům je zásadně ovlivněna a způsobena třemi mobilními genetickými prvky: samostatně převoditelné plazmidy, mobilizovatelné plazmidy a konjugace transpozonů Charpentier aj. (1999). Efluxní pumpy byly potvrzeny také u *Lm*, jak uvádí Godreuil aj., (2003).

Rezistence k pH:

Adaptace na etanol zvyšuje rezistenci *Lm* na jinak destrukční dávky kyselin (Kazemi a Faezi-Ghasemi, 2015).

Na druhé straně vysoké pH má za následek některé morfologické změny v buňkách *Lm*. Alkalický stres způsobil adaptační změny v morfologii buněk, které se změnilly v delší buňky a měly zvýšený objem (Giotis aj., 2007).

Kmeny *Lm* byly zvlášť vystaveny různým hodnotám pH: (i) pH 5,0, (ii) pH 4,5 a (iii) pH 5,0, poté následovala další inkubace

při pH 4,5. Pre-inkubační stresování *Lm* v kterémkoli ze tří kyselých prostředí výrazně zvyšovalo odolnost patogenů proti pH 3,5. Testované hodnoty pH prostředí (i) a (iii) jsou běžné v oblasti výroby a zpracování potravin. Adaptovaná *Lm*, která je přítomná v jídle, může přežít nízké pH žaludku a způsobit onemocnění konzumenta. V přírodě, kde se listerie mohou setkávat například s kyselým deštěm, vodou, která je kontaminována odpady ze siláží nebo kyselou odpadní vodou procházejí *Lm* adaptací ke kyselému pH (Lou a Yousef, 1997).

Rezistence k peroxidům:

Bakterie *Lm* mohou být vystaveny oxidačnímu stresu, jejich adaptace k němu se poté může projevit při invazi do lidského hostitele. Imunitní reakce buněk může produkovat oxidační molekuly, které jsou využívány k odstranění patogenů. V některých zemích je povoleno další přidávání peroxidu (H_2O_2) do syrového mléka a tekutých vajec. Působení peroxidu vodíku v systému laktoperoxidáz syrového mléka bylo potvrzeno. Dopad oxidačního stresu lze pozorovat následně ve změně produkce enzymů, proteinů, DNA a přestavbě buněčné membrány (Lou a Yousef, 1997).

Rezistence k etanolu a sůl:

V místech, která musí být udržována suchá, se doporučuje použití sanitačních přípravků na bázi etanolu. Studie, která zkoumala 117

PPP, zaznamenala, že asi 26 % výrobců používá výrobky na bázi alkoholu. Byl to třetí nejčastěji používaný dezinfekční prostředek uvedený v průzkumu. Vliv stresu z působení etanolu na *Lm* má velký význam ve zkřížené rezistenci. Jedním z příkladů této zkřížené rezistence je vyšší odolnost *Lm* k vysokotlakému zpracování (Lou a Yousef, 1997).

Byl zkoumán vliv osmotických stresů o různé koncentraci soli (NaCl) a sacharózy. Bylo zjištěno, že přítomnost sacharózy má jen malý vliv na inhibici růstu *Lm*, proto není vhodná pro využití v dlouhodobém skladování potravin. Navíc je lze vyvodit závěr, že přítomnost *Lm* ve sladkých pokrmech, jako je zmrzlina, je vyšší (Farber aj., 1992).

Přežití *Lm* v prostředí nakládacích/nastřikovacích láků je vážnou hrozbou pro výrobky určené k přímé spotřebě. Zvyšuje se tlak na PPP v používání a dodržování podmínek HACCP. Studie o recirkulačních kontaminacích nastřikovacího láku pro vepřové maso prokázala zvýšení počtů *Lm* o 2,34 log KTJ/100 ml (po přepočtu 2,34 log = 218 KTJ) již po 2,5 hodinách recirkulace, spolu s dramatickým nárůstem počtu kazících bakterií. *Lm* rostla v 6% solném roztoku a přežila přes měsíc v 16% roztoku soli. Kombinace nízké teploty a vysoké koncentrace soli nestačí zabránit přežití tohoto patogenu. Přítomnost soli také částečně chrání *Lm* před tepelným stresem (Anon., 56).

6. PPP – ZODPOVĚDNOST PPP A POZITIVNÍ NÁLEZ VE VZORKU

Nařízení (ES) č. 178/2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin, stanovuje v článku 19 provozovatelům potravinářských podniků odpovědnost za potraviny:

Jestliže se provozovatel potravinářského podniku domnívá nebo má důvod se domnívat, že potravina, kterou dovezl, vyprodukoval, zpracoval, vyrobil nebo distribuoval, není v souladu s požadavky na bezpečnost potravin, neprodleně přistoupí ke stažení dotyčné potraviny z trhu, pokud tato potravina již není pod bezprostřední kontrolou tohoto původního provozovatele potravinářského podniku, a uvědomí o tom příslušné orgány. Jestliže se již produkt mohl dostat ke spotřebiteli, provozovatel účinně a přesně informuje spotřebitele o důvodu jeho stažení, a jeli to nezbytné, převezme zpět od spotřebitelů již dodané produkty, nestačí-li k dosažení vysoké úrovně ochrany zdraví jiná opatření.



6.1 Co dělat při pozitivním nálezu *Lm* v potravine? (Stanovisko SVS)

A) Opatření SVS: písemná informace SVS pro MZe (únor 2017).

Otázka: Jak se má postupovat, když je *Lm* prokázána ve vzorku v rámci státní objednávky? Co se musí, může a co se nesmí - ze strany PPP a dozorového orgánu?

Odpověď SVS:

Inspektor SVS nařídí opatření dle § 53 zákona 166/1999 Sb. a mimořádná veterinární opatření, která obvykle zahrnují:

1. pozastavení výroby, stahování výrobku, zákaz uvádění do oběhu,
2. generální sanitace provozu a zařízení,
3. odběr stěrů po sanitaci a vzorků zkušební výroby (pod úředním dohledem),
4. vyšetření další vyrobené šarže,
5. přezkoumání funkčnosti HACCP, SVP a SHP (kontrola HACCP, teplotních režimů, sanitace, DDD, zdravotních průkazů),
6. provedení školení pracovníků o zásadách HACCP, provozním řádu a sanitačním řádu, o dodržování SHP a SVP.

Otázka: Inspektoři SVS uznávají výsledky soukromých laboratoří, které předkládají PPP - je to v rozporu s veterinárním zákonem?

Odpověď SVS:

Veterinární zákon v § 53 stanovuje, že podkladem pro rozhodnutí státního orgánu doзору musí být výsledek laboratoře státní, re-

ferenční či schválené. Výsledky soukromých akreditovaných laboratoří (pokud neobdržely povolení od SVS) nelze použít ve správním řízení, avšak PPP je může využívat pro kontrolu své činnosti a dozorový orgán k nim přihlíží.

Otázka: Jak se má postupovat, když je *Lm* prokázána v rámci jiné kontroly (od SZPI) nebo při kontrole samotným PPP? Co může a musí vet. inspektor nařídit, uznat a také co nesmí?

Odpověď SVS:

Pokud SZPI odebrala pozitivní vzorek v místě prodeje, nelze ve všech případech tento výsledek vztáhnout na výrobce. Výrobce již neměl výrobek pod svou kontrolou a nelze vyloučit, že distributor či prodejce manipulovali se zbožím nevhodným způsobem, což by mohlo zapříčinit kontaminaci či množení *L. monocytogenes*. Dle posouzení případu je na místě, aby SVS provedla u výrobce šetření, s cílem zjistit přítomnost *Lm* v daném výrobku a provozu, a přezkoumala funkčnost HACCP, SVP a SHP.

Pokud je zjištěna přítomnost *Lm* ze vzorku odebraného provozovatelem, pak nelze výrobek považovat za bezpečný. PPP má povinnost postupovat dle svých postupů založených na zásadách HACCP, dle nařízení (ES) č. 2073/2005 a dle nařízení (ES) č. 178/2002. Inspektor na základě takového výsledku nezhájí správním řízení, ale může nařídit opatření dle § 53 zákona č. 166/1999

Sb. Na tato opatření se nevztahuje správní řád a některá z opatření lze použít i v případě pouhého podezření, že dotčené produkty nejsou zdravotně nezávadné.

Otázka: Jak postupovat, když je na výrobek (skupinu výrobků) vytvořena studie a u tohoto výrobku byla zjištěna *Lm* - výrobek byl vyhodnocen jako nevyhovující? Bude studie i nadále platná nebo bude nařízena studie nová - případně pro jiný výrobek atd.?

Odpověď SVS:

K takovým případům je na místě přistupovat individuálně. Je třeba hledat příčinu nevyhovění, např. hrubé porušení zásad SVP a SHP, až v krajním případě provést novou studii.

Provedení identifikace izolátu na úroveň sérovaru

Otázka: Kdo má hradit náklady na identifikaci sérovaru?

Odpověď SVS:

Identifikaci izolátu na úroveň sérovaru nelze na náklady PPP nařídit. Nařízení (ES) č. 2073/2005 uvádí pouze *Listeria monocytogenes*. I v případě zjištění sérovaru, který není považován za patogenní, není dle tohoto nařízení (ES) č. 2073/2005 výrobek považován za bezpečný. Stanovení sérovaru lze PPP doporučit, aby bylo možno rozlišit kmeny při opakovaných pozitivních výsledcích.

B) Opatření SZPI: písemná informace SZPI pro MZe (únor 2017).

Otázka: Jak se má postupovat, když je *Lm* prokázána ve vzorku v rámci kontroly SZPI? Co se musí, může a co se nesmí - ze strany PPP a dozorového orgánu?

6.2 Stanovisko SZPI:

V případě nevyhovujících výsledků mikrobiologických rozborů potravin z důvodu překročení limitů pro *Lm* stanovených v příloze č. 1 nařízení č. 2073/2005 v platném znění lze na základě zmocnění v § 5 zákona č. 146/2002 Sb. o Státní zemědělské a potravinářské inspekci v platném znění ukládat opatření. Inspektorům je doporučováno každé porušení posuzovat individuálně a v kontextu dalších zjištění.

Podle ustanovení § 5 odst. 1 písm. e) zákona č. 146/2002 Sb., o SZPI je v případě zjištění *Lm* v potravine kontrolované osobě uloženo opatření pozastavit uvádění potraviny na trh a její likvidace, což musí být doloženo zasláním kopie dokladu o likvidaci firmou oprávněnou ke zneškodňování odpadů.

Dále je v souladu s § 5 odst. 1 písm. a) bodu 1, 2 a 3 zákonu č. 146/2002 Sb. uložena opatření - zákaz výroby, zákaz používání přístrojů a zařízení, užívání prostor, a to v závislosti na míře kontaminace.

Kontrolované sobě jsou dále uložena následující opatření k odstranění zjištěných nedostatků:

- provést celkovou a důkladnou sanitaci a desinfekci provozovny a její účinnost písemně doložit laboratorními rozborů stěrů z povrchů a zařízení na stanovení přítomnosti *Lm* provedenými v akreditované laboratoři;
- analyzování surovin v akreditované laboratoři;
- doložení schopnosti výroby bezpečných potravin - doložení analýz z akreditované laboratoře ze zkušební výroby po provedené sanitaci;
- provedení analýz v akreditované laboratoři další dvou vyrobených šarží před obnovením výroby v provozovně;
- přezkoumání a případně přepracování HACCP, zdravotní prověrka zaměstnanců;
- provedení školení pracovníků o zásadách HACCP, provozním řádu a sanitacním řádu, o dodržování SHP a SVP.

Otázka: *Jak se má postupovat, když je *Lm* prokázána v rámci jiné kontroly (od MZe, a pod) nebo při kontrole samotným PPP? Co se smí, co se nesmí? Co může a musí inspektor nařídit, uznat a také co nesmí?*

Odpověď SZPI:

V případě jakéhokoliv zjištění (nejen *Lm*) v úředně odebraném vzorku předané jiným dozorovým orgánem např. v rámci sítě RASFF je provedeno šetření na místě u výrobce. Je odebrán výrobek předmětné šarže, nebo je odebrán stejný výrobek jiné šarže a stěry z prostředí k laboratorním rozborům s cílem zjistit přítomnost *Lm* ve výrobku a provozovně. Dále jsou uložena opatření k odstranění zjištěných nedostatků dle situace na místě (přezkum HACCP, SVP a SHP). V rámci sledovatelnosti je zjišťována distribuce do obchodní sítě, export do států EU a distribuce do zařízení společného stravování.

V případě nahlášení nálezu *Lm* PPP (výrobem) dle čl. 19 nařízení (ES) č. 178/2002 je rovněž provedeno šetření na místě, pokud je

to možné, je odebrán vzorek k laboratorním rozborům, a jsou uložena opatření k odstranění zjištěných nedostatků dle situace na místě (např. kontrola sanitace – doložení laboratorních rozborů stěrů z jakékoliv akreditované laboratoře, analýza surovin – doložena rozborů, doložení schopnosti výroby bezpečných potravin, přezkoumání funkčnosti HACCP). Je uloženo opatření stáhnout výrobky z trhu a zlikvidovat. Zastaví se výroba až do doby doložení schopnosti výroby bezpečných potravin.

Otázka: *Jak postupovat, když je na výrobek (skupinu výrobků) vytvořena studie a u tohoto výrobku byla zjištěna *Lm* - výrobek byl vyhodnocen jako nevyhovující? Bude studie i nadále platná nebo bude nařízena studie nová – případně pro jiný výrobek atd.?*

Odpověď SZPI:

V případě zjištění *Lm* u výrobku (skupiny výrobků), na který má PPP zpracována studie neovlivní její platnost. Bude však požadováno zvýšení četnosti odběrů vzorků v rámci auto-kontroly PPP - především stěry po dez-

infekci, analýza surovin a hotových výrobků ve smyslu zjištění příčiny nevyhovění dle článku 7 odst. 1 nařízení (ES) č. 2073/2005, které mají vyšší vypovídací schopnost o aktuální situaci ve výrobě než samotné zpracování studie údržnosti. Provozovna bude z hlediska rizikovitosti zařazena v rámci informačního systému SZPI do kategorie s vyšší frekvencí běžných kontrol a bude zkrácen interval pro komplexní kontrolu.

Provedení identifikace izolátu na úrovni sérovaru

Otázka: *Kdo má hradit náklady na identifikaci sérovaru ?*

Odpověď SZPI:

Typizaci *Lm* v úředně odebraném vzorku (sérovar, výjimečně pulzotyp) hradí SZPI a je prováděna v akreditované laboratoři. PPP nelze nařídit typizaci izolátu (sérovar), lze ji jen doporučit, neboť nařízení (ES) č. 2073/2005 vyžaduje pouze sledování *L. monocytogenes* bez specifikace sérovaru. U výrobců se proto s typizací izolátů *L. monocytogenes* nesetkáváme, rostou tím ná-



klady na rozbor, tudíž by to spíše vedlo k celkovému snížení četnosti odběru vzorků a jejich testování na úroveň s omezenou vypovídající hodnotou.

Otázka: *Jak postupovat při pozitivním nálezu ve stěru po dezinfekci – co se smí a co se nesmí. Kam posílat stěry a kolik, případně jim doporučit metodiku kontrolních míst?*

Odpověď SZPI:

L. monocytogenes zjištěná ve výrobě po čištění a dezinfekci, znamená vážnou chybu v čistících a dezinfekčních postupech PPP, proto je uloženo opatření revidovat HACCP a zvýšit frekvence odběrů vzorků z prostředí, kterým se ověří, zda provedené změny byly účinné (doložit kopiemi laboratorních rozborů). PPP musí mít plán odběru vzorků z míst a zařízení ve výrobě dokumentován, většinou je zpracován v rámci příručky HACCP nebo v sanitačním řádu a měl by zahrnovat: vzorkovací postup, stanovení míst odběrů, stanovení doby odběru vzorků z míst a zařízení, stanovení četnosti odběru vzorků, stanovení laboratoře pro testování vzorků a stanovení nápravných opatření v případě pozitivních výsledků. Pokud tomu tak není, má inspektor možnost uložit opatření na odstranění zjištěných nedostatků – přepracovat HACCP.

PPP si vhodnou četnost a počty stěrů stanoví sám na základě systémů založených na zásadách HACCP, SVP a SHP s ohledem na specifika výroby, tudíž nelze četnost/ počty přesně vymezit a vymáhat. PPP by měl zohlednit objem denní produkce, rizikovitost

výroby a konečného produktu např. použití konzervačních látek. SZPI doporučuje PPP začít odebírat větší počet vzorků a na základě analýzy trendů z laboratorních analýz počet vzorků snižovat. Data z předcházejícího období, ale i ekonomické hledisko, jsou jedním z prostředků, kterými PPP může obhájit zvolenou četnost a počty odběrů stěrů. Ačkoliv nařízení (ES) č. 2073/2005 nestanovuje požadavek na provádění analýz v akreditované laboratoři, SZPI doporučuje využívat laboratoř, která je akreditována na analýzy vzorků z prostředí a zařízení.

6.3 Provedení identifikace izolátu na úroveň sérovaru

Abyste zabránili rozvoji listeriózy a následné vysoké mortalitě, musí laboratorní diagnostika co nejrychleji identifikovat *Lm* a dále specifikovat genotypové a fenotypové vlastnosti *Lm*. Jedním z prvních kroků identifikace vlastností *Lm* je její sérodiagnostika. *Lm* je rozdělena do základních 12 sérovarů (tj. 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e a 7) a to na základě reakcí známých antigenů O (somatické = I - XV) a H (flagelární/ bičíkové = A - D) se specifickými antiséry. Listerióza člověka je většinou způsobena (asi z 98 %) pouze třemi sérovary (1/2a, 1/2b a 4b), jak vyplývá ze statistiky šetřených hromadných i individuálních onemocnění. Sérovary 4a a 4c se uplatňují sporadicky. Sérovar 4b byl zjištěn převážně u hromadných epidemií, sérovary 1/2a, 1/2b byly prokázány spíše u menších epidemií či individuálních onemocnění (Liu aj., 2006a).

Z hlediska veterinárního byly prokázány jako kauzativní izoláty *Lm* 1/2b a 4b u ovcí (encephalitis). Sérovar 1/2a byl zjišťován spíše u septikémií a abortů ovcí (Brychta aj., 2010). Sérovar 4b byl prokázán jako příčina mastitid u skotu a bývá často přítomen v jatečné drůbeži (Yadav aj., 2010).

Podle údajů FAO/WHO (2004) jsou prokazatelné následující frekvence jednotlivých sérovarů *Lm* při onemocnění člověka: 1/2a (15 až 25 %); 1/2b (10 až 35 %); 1/2c (0 až 4 %); 3 (1 až 2 %); 4b (37 až 64 %); 4 jiné než b (0 až 6 %) (Anon., 67).

Výše uvedené informace jsou velmi důležité jak pro veterinární dozor, tak i pro PPP, kteří nesou přímou odpovědnost za bezpečný výrobek. Určení sérovaru může být dobrou nápovědou především pro prvovýrobce, zda se mají více či méně obávat tohoto konkrétního izolátu. Je však nutné mít na paměti, že každý izolát *Lm* se může uplatnit jako infekční agens!

7. PERZISTENCE VE VÝROBNÍCH PROVOZECH

Bakterie tvoří většinu biomasy života na Zemi a hrají důležitou roli v recyklaci prvků, které jsou klíčové pro udržení života. Zjišťujeme, že existují a jsou často propojeny ve více druhové kolonie nazývané biofilm. Jsou všude kolem nás, na nás a také v nás. Ve skutečnosti více než 99 % mikroorganismů na Zemi žije ve formě biofilmů. Ty hrají klíčovou roli v ekologii Země a udržitelnosti života. Po mnoho let byly studie bakteriální fyziologie zaměřeny především na planktonní formu a zanedbávalo se studování formy biofilmu. V posledních letech se situace změnila, protože biofilm je převažující forma života bakterií, ve které dobře snášejí stresy životního prostředí (Sheffield a Crippen, 2012).

Zpočátku byl termín „**biofilm**“ používán mezi vědci neformálně, po mnoho let. Poprvé se objevil ve vědeckém časopisu v roce 1977 (Anon., 57).



Bakterie v biofilmech jsou fenotypově odlišné od jejich planktonních forem. Tyto změny zahrnují změny v regulaci velkých sadách genů. Transformace z planktonní existence do biofilmu je složitý proces, často jej vyvolávají různé změny v okolním prostředí. Projevují se významné rozdíly v zapojení genů do tvorby ochranných proteinů a enzymů, což se často projevuje v rezistenci vůči antibiotikům a dezinfekčním prostředkům (Sheffield a Crippen, 2012).

Některé kmeny *Lm* způsobovaly kontaminaci výroby rostlinných potravin po dlouhou dobu. Dlouhodobé nebo trvalé kontaminace byly hlášeny v různých oblastech výroby potravin. Byly prokázány kontaminace přetrvávající až několik let (tabulka 7.1). Charakteristika perzistentní kontaminace je, že ne všechny kmeny *Lm* jsou příčinou trvalé kontaminace výrobního prostředí. Některé kmeny jsou perzistentní (trvalé) a vyskytují se opakovaně; jiné jsou trvalé a jen sporadicky lze prokázat (obnovit je v kultivovatelné formě). Další vlastností je, že *Lm* způsobuje trvalou kontaminaci, i když nejsou přítomny

v surovinách. Bylo prokázáno, že vymýcení perzistentních kmenů *Lm* je obtížné, ale ne nemožné. Pouze cílenou a zlepšenou sanitací lze dosáhnout úspěšné eradikace (Lundén, 2004).

Některé kmeny *Lm* způsobovaly kontaminaci výroby rostlinných potravin po dlouhou dobu. Dlouhodobé nebo trvalé kontaminace byly hlášeny v různých oblastech výroby potravin. Byly prokázány kontaminace přetrvávající až několik let (tabulka 7.1). Charakteristika perzistentní kontaminace je, že ne všechny kmeny *Lm* jsou příčinou trvalé kontaminace výrobního prostředí. Některé kmeny jsou perzistentní (trvalé) a vyskytují se opakovaně; jiné jsou trvalé a jen sporadicky lze prokázat (obnovit je v kultivovatelné formě). Další vlastností je, že listerie mohou způsobovat trvalou kontaminaci, i když nejsou přítomny v surovinách. Bylo prokázáno, že vymýcení perzistentních kmenů *Lm* je obtížné, ale ne nemožné. Pouze cílenou a zlepšenou sanitací lze dosáhnout úspěšné eradikace (Lundén, 2004).



Tabulka č. 7.1: Doba perzistence *L. monocytogenes* v potravinářských provozech (Lundén, 2004)

Potravinářská výroba	Doba perzistence	Reference
Masný průmysl		
Zpracovatelský závod	4 roky	Nesbakken et al. 1996
Jatečný závod a bourárna	1 rok	Giovannacci et al. 1999
Zpracovatelský závod	2 roky	Senczek et al. 2000
Zpracovatelský závod	3 měsíce	Chasseignaux et al. 2001
Drůbežářské odvětví masného průmyslu		
Zpracovatelský závod	6 měsíců	Lawrence and Gilmour 1995
Zpracovatelský závod	9 měsíců	Chasseignaux et al. 2001
Jatečný závod	16 měsíců	Rørvik et al. 2003
Zpracování ryb		
Uzení ryb za studena - závod	8 měsíců	Rørvik et al. 1995
Uzení ryb za studena - závod	8 měsíců	Fonnesbech Vogel et al. 2001
Uzení ryb za studena - závod	6 měsíců	Norton et al. 2001
Uzení ryb za studena - závod	2 měsíců	Hoffman et al. 2003
Mlékárenský průmysl		
Výroba sýrů	7 let	Unnerstad et al. 1996
Výroba zmrzlin	7 let	Miettinen et al. 1999a
Nespecifikováno	8 měsíců	Tkáčiková et al. 2000
Výroba čerstvých omáček	17 měsíců	Pourshaban et al. 2000

Perzistentní a neperzistentní kmeny *Lm*:

Kmeny *Lm*, které byly nalezeny opakovaně (pětkrát nebo více) po dobu tří měsíců nebo déle, byly považovány za přetrvávající/perzistentní kmeny. Kmeny, které se nacházejí sporadicky (méně než pětkrát) nebo v rámci omezeného časového období (méně než tři měsíce) byly považovány za neperzistentní (Lundén, 2004).

7.1 Biofilm

Biofilm: je strukturované mikrobiální společenství, uložené v mezibuněčné (slizovité) hmotě a adhezující k inertním i živým povrchům. Struktura mezibuněčné hmoty není jednodušá, má přívodní a odvodní systém kanálků, které přivádějí živiny a odvádějí produkty metabolismu. Biofilmy svojí strukturou i funkcí připomínají tkáň vyšších organismů. Mnohdy je stavba biofilmu ještě

složitější, protože se na ní podílí různé druhy mikrobů. Bakterie rostoucí ve formě biofilmu se zásadně liší od planktonních bakterií. V množící se populaci se mezi bakteriálními druhy šíří signály, které aktivují jinak „spící“ geny a ty začínají produkovat nové produkty potřebné k přežití. Tomuto komunikačnímu jevu mezi bakteriemi se říká „**quorum sensing**“.

V těle hostitele může fungovat biofilm i ve formě ložiska, z něhož se obnovuje chorobný proces, který obrana těla ani léčebné postupy nejsou schopny eliminovat. Jako příklady v jejich patogenezi můžeme uvádět: zubní kaz, zánět středního ucha, záněty žlučových cest, záněty plic, apod.

Adherence: aby se bakterie mohla uplatnit na některém z povrchů (výrobního zařízení a pod), musí být schopna pevně *přilnout* (adherovat) na povrch pomocí **glykokalix** tj. směs polysacharidů, nukleových kyselin

a proteinů produkovaných bakteriemi (Votava, 2001).

Povrchy pracovních ploch, nádob a zařízení, s vysokou úrovní volné povrchové energie, jako jsou nerez a sklo, jsou více hydrofilní. Tyto povrchy obecně umožňují větší bakteriální přilnavost a tvorbu biofilmu, než hydrofobní povrchy jako je teflon, nylon, guma a fluorované polymery.

Listeria spp. se může rychle připojit ve vyšším počtu na hydrofobní povrch než na hydrofilní. K přilepení se k povrchům využívají listerie bičků, pili a membránové proteiny. Bylo prokázáno, že listerie mohou tvořit biofilmy na kráječích a jiném zařízení vyrobeném z ocele a to způsobuje další křížové kontaminace potravin *Lm* (Anon., 58).

Biofilmy v přírodě mohou mít vysokou úroveň organizace, mohou existovat v jedné nebo více druhů komunit, tvoří jednu vrstvu

nebo třídídimenzionální struktury či podobné agregáty. Přirozeně vzniklý biofilm může fungovat prostřednictvím kolektivního chování bakterií a koordinované aktivity mezi buňkami (signalizace), která napomáhá k přežití základních buněk v náročném prostředí. Většina mikroorganismů v přírodním stanovišti je pevně připojena k povrchu.

Biofilm se skládá z imobilizovaných bakteriálních buněk, které vylučují extracelulární polysacharidy, které přilnou na povrch. Mechanismus tvorby biofilmu můžeme rozdělit do několika fází:

- 1) Nejprve dochází k přilnutí buněk k povrchu, tvorbě mikrokolonie, nárůstu biofilmu do šířky a tvorbě vnitřní struktury. Této fázi říkáme **adherence**. Tato strukturovaná mikrobiální společenství mohou být jak jedno tak častěji vícedruhová. V jednom společenství mohou koexistovat vedle sebe bakterie s odlišnými nároky, například na kyslík a s odlišnou respirační aktivitou.
- 2) Druhou fází je **kolonizace** povrchu (sklo, nerez, guma, teflon, dřevo, umělá hmota). Na toto ještě reversibilní stádium vývoje biofilmu navazuje stádium ireversibilní, spočívající v redistribuci buněk a tvorbě mikrokolonií. Vznikají kanálky a póry, kterými proudí voda a výživa do hlubších vrstev společenství buněk.
- 3) V poslední fázi dochází k **uvolňování** mikrobiálních buněk z biofilmové struktury nebo olupování z povrchu. Četněji jsou uvolňovány jednotlivé buňky a malé shluky, ale oddělují se i velké kusy, které

představují s ohledem na infekční dávku zdravotní riziko. Na rozdíl od volně žijících planktonních buněk, lze mikroorganismy v biofilmech na potravinářských kontaktních površích velmi obtížně inaktivovat. Bakterie rostoucí v biofilmech jsou totiž mnohem více chráněny před nepříznivými podmínkami prostředí, a to především díky tvorbě exopolysacharidové matrice, která chrání biofilmy před vysycháním, účinkem fagocytů a protilátkami.

K preventivním opatřením vzniku biofilmů na pracovních plochách v potravinářství patří zejména důsledné odstraňování zbytků po výrobě, a to dokonale provedenou sanitací (Cwiková, 2012).

Biofilmy jsou slizké povlaky na povrchu předmětů ve vlhkém prostředí, nejsou uniformní, díky novým technikám byly popsány tři základní typy:

- heterogenní;
- heterogenní/pseudohomogenní mozaikový typ a
- houbový typ (Danese aj., 2001).

Planktonní buňky mají oproti biofilmu výhodu v rychlejším pomnožování a rychle se šíří do prostředí. Jak vzniká biofilm, je popsáno výše a je dobře patrné z následujícího obrázku (č. 7.1). Otvory ve vrstvě biofilmu proudí voda, která přináší živiny a odplavuje metabolické zplodiny a také jednotlivé planktonické buňky (volné, izolované buňky) do vnějšího prostředí (Danese aj., 2001).



Negativní vlivy biofilmu na technologie

Adherentní bakterie opakovaným dělením (množením) a formováním mikrokolonií produkují polysacharidy (exopolysacharidy, sliz – glykokalyx – směs polyacharidů, nukleových kyselin a proteinů produkovaných bakteriemi).

Planktonní mikroorganismy většinou nejsou schopny v potravinářském průmyslu vytvářet koroze. Ale jiná situace nastává u biofilmu. Bakterie nejsou schopny vyrobit si potřebné živiny prostřednictvím fotosyntézy, proto musí metabolizovat organický obsah z okolních tekutin. energii získávají například z glukózy, která dodává uhlík

a potřebují i další živiny jako jsou minerální sloučeniny obsahující fosfor, síru a dusík pro stavbu buněčných struktur bakterií. Bakterie se mohou účastnit korozních procesů různými způsoby: změni prostředí tím, že nahradí jednu látku jinou, pokrývající částečně kovový povrch a z jejich biofilmů vytvářejí buňky místní koroze nebo způsobují korozi změnou depolarizace vodíku na povrchu kovu (Salas aj., 2012; Anon., 60).

Mechanismy

Termín „mikrobiálně indukovaná koroze“ se používá pro korozi, kdy se mikroorganismy podílejí na degradaci kovových materiálů. V prostředí s vysokým obsahem kyslíku do-

minují aerobní bakterie, ale při snížení hladiny kyslíku jsou nahrazeny anaerobními bakteriemi.

Bakterie jsou také kategorizovány jako slizovité, kyselinotvorné, snižující sírany, redukující dusičnany, oxidující železo, bakterie snižující obsah železa apod. Diskutovat zde o této problematice je nemožné, protože je velice široká. Je důležité mít na paměti, že mikroby ovlivněná koroze vyplývá z činností mikrobiálních komunit, nikoliv jednotlivých mikrobů. Je to interaktivní růstová aktivita bakteriálních konsorcií, které skutečně stimulují proces koroze ve výrobě potravin (Anon., 61).

Glykokalix: na povrchu buněčné stěny některých bakterií se mohou nacházet polymery vytvářející buď pouzdra anebo slizovou vrstvu. Pouzdra přilnou pevně k buněčné stěně, slizová vrstva je volná amorfni hmota. Bakterie tvořící **mikrokolonie** zakotvují v této polysacharidové vrstvě jako dlaždice nebo ochranný kryt. Bakterie kombinují své činnosti a vytvářejí velmi rychle živý mikroregion, který je zformován a nazývá se **matrix** nebo se obecně používá termín **biofilm**.

Bylo například zjištěno, že: pseudomonády vytvoří spojení za 30 minut při 25°C a za 2 hodiny při 4 °C. *Listeria* se zakotví a začne

vytvářet biofilm do 20 minut na nerezovém povrchu.

Energetické náklady: Biofilm je tvořen z 85 až 95 % z vody. Je spočítáno, že 1 mm biofilmu odpovídá izolaci asi 5 mm vodního kamene. Jak se **biovrstva** rozrůstá v potrubí, redukuje se průměr potrubí mající za následek poklesy průtoku, tlaku a zvyšuje požadavek na pumpu. **1,5 mm biovrstvy** redukuje průtočný profil asi o **42 %** (podle průměru potrubí). To má za následek redukovanou efektivitu a zvětšené náklady (Kumar a Anand, 1998).

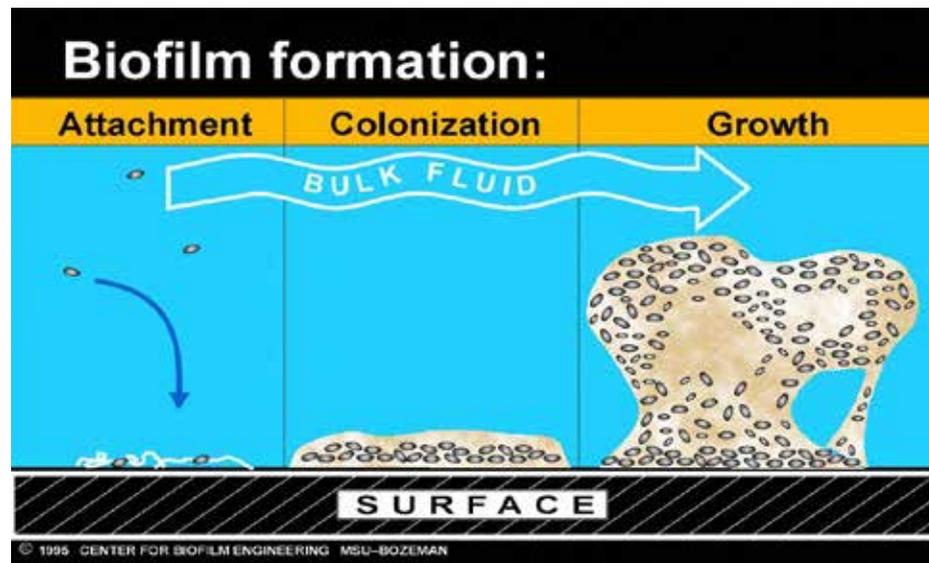
Mikrobiologická koroze: Biofilm zhoršuje kvalitu kovových materiálů přímým nebo nepřímým působením bakterií, řas, plísní a hub, a to samostatně nebo v kombinaci. V anaerobních podmínkách byla potvrzena vysoká aktivita sulfid-redukujících bakterií.

Princip: spočívá v přímé oxidaci železa nebo působením přes hydroxidy.

Příčiny: Živé organismy způsobují efekt reakce katody a anody a tím se rozvíjejí podmínky pro korozi.

Obrázek č. 7.1. Grafické znázornění tvorby biofilmu (Anon., 59).

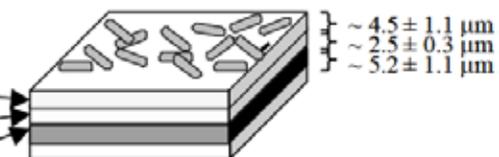
(Zdroj: www.uweb.engr.washington.edu/research/tutorials/biofilm.html)



Obrázek č. 7.2.: Tvorba a skladba biofilmu (Lado, 2003).

Biofilm formation

- Layers with variable cell density
 - ~ 1.3×10^6 CFU/cm²
 - ~ 1.3×10^4 CFU/cm²
 - ~ 3.2×10^6 CFU/cm²
- Homogeneous cell distribution horizontally



Vysvětlivky k obr. č. 7.2:

Biofilm formation – tvorba biofilmu
Layers with variable cell density – vrstvy s proměnlivou hustotou buněk
Homogeneous cell distribution horizontally – homogenní rozdělení (distribuce) buněk horizontálně

Persisters: jsou persistující mikroorganismy, malá část z původního množství. Jde o téměř nezranitelné buňky, které jsou fenotypově odlišnou variantou původních buněk. Tyto mikroorganismy rostou téměř bez omezení a nelze je zničit běžnými baktericidními látkami. Často jsou příčinou vysoké odolnosti k léčbě při vzniku infekcí (z biofilmů). Tento fenomén extrémní rezistence u bakterií je zatím poměrně málo prozkoumaný (Van Houdt aj., 2010).

7.2 Quorum sensing – komunikace a paměť bakterií

Bakterie využívají signalizující molekuly pro mezi-buněčnou a vnitro-buněčnou komunikaci. Tento fenomén bakteriální komunikace „cell-to-cell“ je znám jako *quorum sensing*. *Quorum-sensing* (dále jen „QS“) signály se podílejí na bakteriální patogenitě, kažení potravin a tvorbě biofilmů.

Samotná *Lm* není příliš zdatná ve tvorbě biofilmu ve srovnání s jinými druhy bakterií. Nicméně monokultury biofilmů *Lm* jsou, i když zřídka, nalezeny v přirozeném prostředí. *Lm* tvoří biofilm převážně ve smíšené formě s jinými bakteriemi například *Pseudo-*

monas spp. Tyto bakterie jsou běžné prokazovány při kažení potravin, zejména při chladících teplotách a jsou široce rozšířeny v potravinách. *Lm* je schopna integrovat se přímo do slizovité vrstvy epoxypolysacharidů i biofilmů vytvořených jinými bakteriemi. Celkově výsledky různých studií naznačují, že specifická rezidentní mikroflóra v zařízení na zpracování potravin, hraje důležitou roli při určování pravděpodobnosti usazení *Lm* a její perzistenci v „novém“ životním prostředí (Ibusquiza, 2011).

Významná schopnost bakterií - zapamatovat si informace z minulosti - je dobře známá a je přenášena v RNA. Méně je známo o tom, zda jednobuněčné organismy jako jsou bakterie, mohou také ukládat informace o posledních událostech a použít tyto „vzpomínky“ a touto informací ovlivnit své současné chování. Proto autoři použili experimentální nastavení, které umožňuje sledovat jednotlivé bakteriální buňky prostřednictvím opakované expozice stresu na sůl. Sledovali, zda na expozici mohou buňky reagovat tak, aby lépe zvládaly stres. Reakce jednotlivých buněk byly do značné míry nezávislé na minulé události, ale byl prokázán vznik paměti (Bai a Rai, 2011).

Tak, jako je QS originální, tak má i své nedostatky. Tím jsou přírodní inhibitory. Bioaktivní fytochemické extrakty z ovoce, zeleniny, rostlin a koření mohou radikálně inhibovat funkci *quorum sensing*. Jsou to extrakty především z mrkve, vikve, rajčat, sóji, česneku, leknínu, fazolí, heřmánku, jiných přírodních

sloučenin, esenciálních olejů, kyselina askorbová a další. Kromě těchto inhibičních účinků jsou tyto extrakty zkoušeny k využití na potlačení růstu patogenů, například *Lm* (Tiwari aj., 2016).

7.3 Kde a kdy provádět stěry**7.3.1 Související legislativa**

Systém verifikace/ověřování účinnosti čištění a dezinfekce je dán výrobcům a dozorovým orgánům platnou legislativou:

- 1) Nařízení (ES) č. 852/2004, o hygieně potravin, které se zaměřuje na implementaci a flexibilitu postupů HACCP, požaduje v článku 5 analýzu rizika a kritické kontrolní body.
V příloze č. II., bod 5 (HACCP a nezbytné požadavky) jsou zmíněny požadavky na sanační postupy (čištění a dezinfekce).
- 2) Vyhláška č. 289/2007 Sb., kde je v části B uvedeno: Stěry z povrchu výrobního zařízení, odebrané z plochy 10 cm² po skončení čištění a dezinfekce, nesmí obsahovat:
 - a) více než 100 KTJ aerobních a fakultativně anaerobních bakterií,
 - b) salmonely.
- 3) Nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kriteriích pro potraviny

Článek 5: Zvláštní ustanovení o provádění vyšetření a odběru vzorků odstavec 2 – provozovatele potravinářských podniků (PPP) vyrábějící potraviny určené k přímé spotřebě, které mohou představovat rizi-

ko *L. monocytogenes* pro veřejné zdraví, musí v rámci svého plánu odběru vzorků odebírat vzorky pro stanovení *Lm* z míst a zařízení pro zpracování.

Článek 9: Analýzy trendů – PPP musí analyzovat trendy ve výsledcích vyšetření. Zjistí-li trend směrem k nevyhovujícím výsledkům, podniknou bez zbytečného odkladu příslušná opatření k nápravě situace s cílem zabránit výskytu mikrobiologických rizik.

- 4) Přípravovaná norma (vodítka) týkající se kontroly *Lm* ve výrobním prostředí (EU-RL *Lm*, Guidelines, 2011), která je v současné době v připomínkovém řízení.

7.3.2 Účel stěrové kontroly:

Běžným cílem dezinfekce bývá:

- 1) Zničení přítomných bakterií - patogenů či potravin kazících bakterií.
- 2) Prevence pomnožení bakterií, tvorby biofilmu a následné kontaminace výrobků. Dříve, než začne odpovědný pracovník provádět stěry, měl by mít ujasněn důvod a očekávaný efekt této činnosti. Musí vědět kde, proč a jak bude stěry provádět.

Podle záměru si pak musí vhodně zvolit materiál potřebný ke stěrování (stěry, houbičky, šablony a jiné vybavení). Výtěžnost stěrové metody z velké části závisí právě na použitém materiálu a smáčivém roztoku.

Některé firmy (PPP) stále preferují, z hlediska ceny, doma vyrobené stěry. K jejich

výrobě používají neověřené materiály, které mohou být pro bakterie toxické. Jedná se především o bavlnu (Da Silva aj., 2012).

- 1) Kontrola účinnosti dezinfekce – rozsah mikrobiologického vyšetření je dán platnou legislativou. Důležité je zaměření na kontaktní i nekontaktní plochy, nástroje, ruce, vybavení pracovníků apod.
- 2) Vyhledávání zdroje kontaminace – provádí se cíleně na základě předchozích nevyhovujících výsledků ze stěrů a kontrolních vyšetření vzorků potravin. Souvisí s analýzou trendů, tj. korekce čistících a dezinfekčních postupů, nápravná opatření, kontrola a vzdělávání pracovníků apod.

Metod a postupů, jak provádět kontrolu výrobního prostředí a kontrola účinnosti dezinfekce, existuje celá řada. Většinou si myslíme, že jsou dobře a dlouhodobě zavedeny, a že se asi nic nového nemusíme učit. Opak je pravdou, teprve v roce 1997 byla stěrová metoda poprvé uveřejněna jako validovaná v Journal of AOAC International (Salo aj., 2000) a stále se objevují nové poznatky, materiály a postupy k vylepšení výsledku.

Rovněž vlastní provedení stěru se může zdát jako rutinní a naprosto jednoduché. Ale získat bakterie z povrchu výrobního prostředí nebo zařízení v co nejvyšší mře, může být někdy velmi obtížné. Komplikace vyplývají především ze schopnosti bakterií přilnout k povrchu, tvořit biofilm, odolávat čistícím a desinfekčním prostředkům apod.

Bakterie, které se nacházejí uvnitř společenství biofilmu, jsou více než tisíckrát odolnější vůči sanitaci než bakterie volně se vyskytující ve výrobním prostředí (Anon., 62).

Úspěšnost záchytu také souvisí s mírou praktických znalostí o možných rezervoárech bakterií a znalosti kontrolovaného podniku. Provedení stěrů musí být zaměřeno na kontaktní a nekontaktní plochy vyráběných potravin či surovin a kontrolu vzduchu. Ani jednu skupinu nelze při vzorkování opomenout.

Nekontaktní plochy: míní se tím především kanálky na odpadní a odtokové vody, podlahy, zbytkové vody na podlaze (jezírka), úklidové vybavení, mycí plochy, váhové systémy, hadice, vozíky, kladky a dopravníky, vybavení pracovníků, mrazáky, ledničky a výrobníky ledu, zařízení na záchyt a odvádění kondenzačních vod, parapety, dveře, stěny, kliky, vodní kohouty, ovládací panely, madla ve výtahu a na schodech, spodní plochy stolů, kolečka, boty a mnoho dalších míst. Výčet nemůže být vyčerpávající!

Neměli bychom zapomínat na kontrolu sanitace sociálního zázemí pracovníků (toalety, šatny, stravování, a pod).

Nezapomínejme ani na kontrolu čistoty vstupujících pracovníků z podpůrných profesí a návštěv (opraváři, technický personál) a pod.

Kontaktní plochy: nářezové stroje, baličky, dopravní pásy, násypky, koše, vozíky, drtiče, mlýnky, plničky, různá jiná zařízení, náčiní a vybavení pracovníků i samotného výrobního prostředí. Měli bychom věnovat pozornost nakládacím lákům a roztokům, které se používají ke křehčení masa. Nelze zapomenout na šrouby, různé (sice pevně připevněné) součásti strojů a prostory pod nimi.

Právě z těchto prostor se často stávají rezervoáry nežádoucích bakterií, které se objeví až po jejich demontáži.

Při běžné kontrole se tyto zdroje nemusí objevit, ale mohou dobře fungovat až při mechanické zátěži během výroby (Guidelines, 2011).

Vyšetření atmosféry: jedná se o vyšetření základního ukazatele kvality výrobního prostředí, které PPP ani dozorové složky téměř nevyužívají. Většina výrobních provozů je klimatizována, ovšem bez jakékoliv kontroly. K tomuto způsobu kontroly můžeme využít různé metody. Podle způsobu provedení a přístrojové náročnosti lze tyto metody rozdělit do čtyř základních skupin. Jedná se o stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM) při filtraci vzduchu aeroskopem (CPM/m³), stanovení počtu mikroorganismů spadem na otevřená specifická média, měření biochemických komponent bakteriálních buněk/m³ (ATP, DNA, enzymy, jiné buněčné produkty) a vyšetření pod mikroskopem. Pouze první dvě skupiny lze snadno využít v běžné praxi (Pasquarella aj., 2000).

Nejčastěji je používána metodika pasivní kontroly – tedy metoda spadu na odkryté Petriho misky s příslušným selektivním médiem (CPM, plísně a kvasinky, koliformní bakterie, apod.). Musí se stanovit vhodné kontrolní místo a zvolit expoziční čas.

Výhodou je nízká cena, jednoduchá manipulace, sterilita materiálu. Lze využít více různých médií ve stejný čas na stejném místě.

Nevýhodou je neznámý objem kontrolovaného vzduchu a opakovatelnost výsledků, silné ovlivnění průvanem apod.

V případě použití metodiky aktivní kontroly se jedná o filtraci známého objemu vzduchu aeroskopem. Filtr se poté v laboratoři přelije vybraným médiem pro stanovení sledovaného druhu bakterii, plísní či kvasinek. Výhodou je přesnost a opakovatelnost výsledků včetně jejich interpretace.

Důležitá je aktivní možnost volby kontrolovaného objemu vzduchu, kdy se dají filtrovat i desítky m³ vzduchu (výroba kosmetiky, léčiv apod.). Nevýhodou je vyšší cena aeroskopu a nutnost sterilizace zařízení mezi jednotlivými měřeními.

Procento pozitivních výsledků na přítomnost *Lm* je velmi variabilní. Například ve tříleté studii ze čtyř výrobních závodů v Anglii byla zjištěna pozitivita *Lm* na úrovni 0,23 %, naopak v jiné studii, která byla provedena ve Francii, byla průměrná pozitivita na *Lm* 27,5 %. (Holah aj., 2004; Chasseignaux aj., 2002).

Výskyt *Lm* ve výrobním prostředí po dezinfekci souvisí mimo jiné i se schopností *Lm* tvořit biofilm uplatněním „Quorum sensing“ a dalších mechanismů mezibakteriální komunikace, na rezistenci k dezinfekčním prostředkům a také se špatně odvedenou prací při provádění sanitace.

Je známo, že především biofilmy z prostředí masné výroby a lahůdek, mohou obsahovat řadu patogenních bakterií - jako jsou listerie, kampylobaktery, stafylokoky, salmonely apod.

Právě v příznivých podmínkách biofilmu se nejrychleji vytváří bakteriální mutace vedoucí ke zvýšené rezistenci bakterií nejen k dezinfekčním prostředkům, ale i k teplotě, pH nebo aw. Aktivátory těchto technologických rezistencí mohou souběžně způsobovat i zvýšenou rezistenci k léčivům (Milanov aj., 2009).

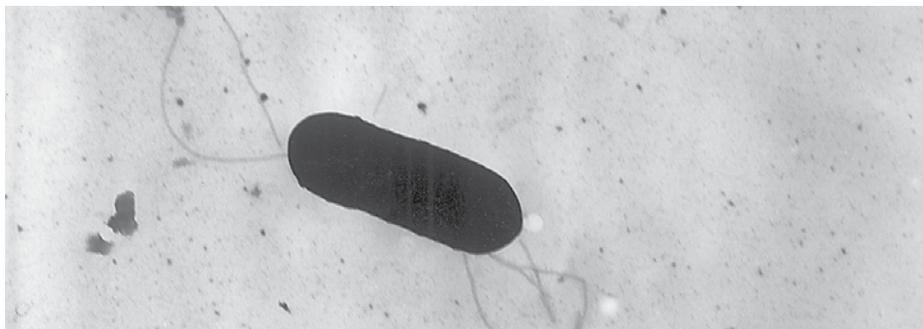
Tyto rezistence tak mohou zásadním způsobem ovlivňovat bezpečnou produkci potravin. V podmínkách výroby mléčných výrobků se často zjišťují biofilmy složené z bakteriál-

ních monokultur (termorezistentní bakterie) nebo složené z menšího spektra bakterií, které se podílí především na kažení výrobků. Zde sehrává významnou úlohu selekční efekt pasterace mléka. Často také dochází k nežádoucí kontaminaci startovacích kultur, které se ve výrobě používají (Deibl a Schoemi, 2017).

Sekundární kontaminaci výrobků můžeme rozdělit do tří základních typů:

- 1) z potravin na potraviny
- 2) z rukou (pracovníků) na potraviny
- 3) ze zařízení (kontaktní plochy) na potraviny.

Úspěšnost záchytu také souvisí s mírou praktických znalostí o možných rezervoárech bakterií a znalosti kontrolovaného podniku (sledování trendů). Provedení stěrů musí být zaměřeno na kontaktní a nekontaktní plochy vyráběných potravin či surovin a kontrolu vzduchu. Ani jednu skupinu nelze při vzorkování opomenout.



Tabulka č. 7.2: Přehled stanovení *L. monocytogenes* ve stěrech – komerční objednávka (KO), nákup služeb SVS (NS) – zdroj: SVÚ celkem

Rok	Komodita	Analýza průkazu <i>Listeria monocytogenes</i>		
		počet	nevyhovující	%
2013	Stěry celkem	6 948	30	0,43
	Stěry NS	1 503	2	0,1
	Stěry KO	5 445	28	0,5
2014	Stěry celkem	4 752	31	0,7
	Stěry NS	1 203	1	0,1
	Stěry KO	3 549	30	0,9
2015	Stěry celkem	1 123	2	0,18
	Stěry NS	238	0	0
	Stěry KO	885	2	0,23
2016	Stěry celkem	5 619	52	0,90
	Stěry NS	1 525	17	1,0
	Stěry KO	4 094	35	0,85

Komentář k tabulce č. 7.2: Vzorky byly odebrány buď inspektory SVS = NS, nebo výrobci = KO. Jak je patrné, pozitivita je mnohem níže než informují odborné studie. To je na jednu stranu velmi příjemné zjištění, ale ve skutečnosti se jedná o zlomek vyšetřených stěrů oproti počtu stěrů, který by se měl kontrolovat. Ve skutečnosti jsou mnohdy zasílány k ověření účinnosti dezinfekce pouze 3 až 5 stěrů, což sice platná legislativa umožňuje, ale vypovídající efekt je nulový. Vůbec nejsou zohledněny základní principy stěrové kontroly. Nejsou sledovány jednotlivé provozy, nejsou sledovány kontaktní a nekontaktní plochy, atd. Z tohoto důvodu lze tyto tabulkové výsledky vnímat spíše jako alarmující. Kdyby se vyšetřilo 10 krát více

stěrů – jaký by asi byl výsledek? Pozitivita by mohla být výrazně vyšší než 10 krát.

7.3.3 Plán odběru vzorků z míst a zařízení ve výrobě - stěry, provedení a vyhodnocení

Podle čl. 5 odst. 2 nařízení (ES) č. 2073/2005 musejí PPP, vyrábějící potraviny určené k přímé spotřebě, které mohou představovat riziko *Lm* pro veřejné zdraví, v rámci svého plánu odběru vzorků odebírat vzorky pro stanovení *Lm* z míst a zařízení pro zpracování.

Plán odběru vzorků z míst a zařízení ve výrobě musí být PPP dokumentován a musí zahrnovat:

- a) **vzorkovací postup,**
- b) **stanovení míst odběrů,**
- c) **stanovení doby odběru vzorků z míst a zařízení,**
- d) **stanovení četnosti odběru vzorků,**
- e) **stanovení laboratoře pro testování vzorků,**
- f) **stanovení nápravných opatření v případě pozitivních výsledků.**

Podrobněji k jednotlivým bodům:

a) Vzorkovací postupy

Metoda stěrová

Výhodou stěrů je:

- možné stěrování nerovných a hůře přístupných ploch;
- stěry se v laboratoři naředí a dají se vyočkovat na libovolná specifická média, získané kolonie se dají okamžitě použít pro další identifikaci;
- dlouhodobá expirace, nenáročnost na skladování;
- relativně nízká cena.

Otiskové metody

Otiskové metody slouží ke kontrole hygieny především rovných povrchů.

K dispozici je velký výběr testovacích souprav i pro specifické kontroly (celkový počet mikroorganismů, enterobakterie, *E. coli*, koliformní bakterie, kvasinky a plísně, stafylokoky).

Nevýhodou je:

- špatný přístup k nerovným plochám;
- nelze použít dostatečný tlak k šetření kontrolovaného místa;
- nutnost použití několika různých testů, pro identifikaci jednotlivých druhů bakterií;
- možné potíže s expirací testů;
- neškolený personál může mít potíže s vyhodnocením výsledků;
- jsou dražší než běžné stěry.

Abrazivní houbičky

Houbičky jsou dodávány v aseptickém balení s přídavkem transportního média, které je definováno na obalu. Použité médium – peptonová voda – je vhodné pro resuscitaci salmonel a nemělo by být využito pro jiné bakterie, protože by podporovalo jejich růst, u psychrotrofních kmenů i pomnožení. Houbičky s neutrálním médiem (například fyziologický roztok apod.) jsou vhodné pro kontrolu povrchů, protože lze využít vyššího tlaku při stírání kontrolované plochy. Další výhodou je dobrá nasákavost, proto lze využít i pro kontrolu mokrých nebo velkých ploch. K dispozici je řada literárních údajů, které porovnávají stěrové výtěžnosti houbiček, stěrů a jiných druhů testovacích souprav. Z výsledků vyplývá, že houbičky poskytují nejvyšší výtěžnost. Nevýhodou může být jejich vyšší cena.

Odběr tekutých vzorků

Ke kontrole tekutých výrobků lze použít ponorné proužky. Tyto výrobky by měly mít definovanou nasákavost a lze je využít přede-

vším pro kontrolu vody a tekutých potravin. Na trhu je k dispozici i řada alternativních metod, které jsou sice přesné, ale mohou být i výrazně dražší. Jedná se především o bioluminiscenční metody. Mnohem jednodušší a levnější jsou odběry do sterilních lahví nebo do plastových sáčků s uzavíratelným vstupem pomocí několikanásobného zahnutí a fixací pomocí kovového proužku. Pokud se s nimi dobře nakládá, tekutina nemůže vytéci.

Stěry pro virologické vyšetření a metody PCR

Při vyhledávání virů by se měly používat stěry s transportním médiem, které je vhodné pro uchování virů (například Virocult liquid medium).

Některé zásady a doporučení:

- suchá plocha musí být zvlčena sterilním tamponem a transportním roztokem, poté musí být setřena do sucha. Na mokré plochy by se měl použít suchý tampon;
- tamponem se během stírání musí stále otáčet; houbičkou se otáčí a využívá se obou stran;
- použitý roztok využívat jen po nezbytně dlouhou dobu – pouze v průběhu stěrování. Po ukončení stěrování je vhodné zbytek roztoku ihned vyhodit. Při vyšším počtu stěrů doporučujeme použít více ampulí se sterilním smáčivým roztokem;
- pokud se stěr otevře, musí se použít nebo znehodnotit, nelze ho použít v jiný den;
- nepoužívat ke smáčení sterilní destilovanou vodu;

- nestírat plochy, které obsahují rezidua čistících nebo dezinfekčních látek;
- nejvhodnější je stírat plochy krátce před zahájením výroby.

b) Stanovení míst odběrů – vybírat místa s největší pravděpodobností kontaminace mikroorganismů: vlhká, potřísněná místa, kde budou bakterie schopny růst a persistovat, těžko dostupná místa např. otvory/ praskliny, porézní materiály, těžce čistitelná zařízení (odběry po rozebrání zařízení např. při pravidelném servisu). Nevyčerpatelný seznam míst může zahrnovat:

- **Nekontaktní plochy** - povrchy, které nepříjdou do kontaktu s potravinou: drenáže, podlahy, stěny, čistící nástroje, zařízení na vážení zabudované do podlahy, hadice, duté válce na dopravnících, dopravníky, studená místa, kde dochází ke kondenzaci vody (stěny, chladicí jednotky, okolí potrubí), pryžové těsnění kolem dveří, mrazničky, ledničky, výrobníky ledu apod.
- **Kontaktní plochy** - povrchy, které přijdou do přímého kontaktu s potravinou: pracovní stoly, prkýnka, nože, kleště, násypník, mixér, míchačka, škrabka, plnicí a balicí zařízení, přepravní kontejnery a další nádoby, nejednorázové rukavice apod.
- **Zaměstnanci** – ochranné pomůcky a ruce.

Od výběru místa odběru a doby odběru stěrů se dále odvíjí použití ředícího činidla k navlhčení stěrových pomůcek a výrobce by měl být schopen doložit, který typ ředícího roztoku použil k provádění stěrů.

c) Stanovení doby odběru vzorků z míst a zařízení – v nařízení (ES) č. 2073/2005 ani v ČSN ISO 18593 není stanovena doba odběru vzorků z prostředí a zařízení. V případě detekce *Lm* je nevhodné odebrat vzorky z prostředí výroben a zařízení bezprostředně po čištění a dezinfekci, buňky jsou poškozené chemickými prostředky a tudíž obtížně kultivovatelné. Vzorky by měly být odebrány min. 2 hodiny po zahájení výroby nebo na konci výroby např. před čištěním a sanitací.

d) Stanovení četnosti odběru vzorků z míst a zařízení – PPP si vhodnou četnost stanoví sám na základě systémů založených na zásadách HACCP, SHP a SVP s ohledem na specifika výroby, tudíž nelze četnost přesně vymezit.

e) Stanovení laboratoře pro testování vzorků z míst a zařízení – ačkoliv nařízení (ES) č. 2073/2005 nestanovuje požadavek na provádění analýz v akreditované laboratoři, doporučuje se využívat laboratoř, která je akreditována na analýzy vzorků z prostředí a zařízení.

f) Stanovení nápravného opatření v případě pozitivních výsledků – PPP si v plánu odběru vzorků z prostředí a zařízení stanoví, jaká přijme opatření v případě pozitivních výsledků. Opatření budou

záviset např. na izolovaném mikroorganismu, typu povrchu, kde byl záchyt mikroorganismů zjištěn (povrch v přímém/nepřímém kontaktu s potravinou), zda jsou v podniku vyráběny potraviny určené k přímé spotřebě.

Podle čl. 9 nařízení (ES) č. 2073/2005 musejí PPP analyzovat trendy ve výsledcích vyšetření **včetně stěrů**. Zjistí-li trend směrem k nevyhovujícím výsledkům, podniknou bez zbytečného odkladu příslušná opatření k nápravě situace s cílem zabránit výskytu mikrobiologických rizik.

Mimo harmonizované evropské legislativy, která se zmiňuje jednak o požadavcích na provádění čištění a sanitace [nařízení (ES) č. 852/2004, čl. 4 odst. 2 ve spojení s přílohou II kapitolou V], ale i o požadavcích na provádění odběrů vzorků stěrů z míst a zařízení ve výrobě [nařízení (ES) č. 2073/2005 čl. 5 odst. 2] řeší tuto problematiku i národní předpis. Konkrétně se jedná o vyhlášku č. 289/2007 Sb, o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství k veterinárnímu zákonu, kde jsou v příloze č. 3 části B uvedeny požadavky na stěry:

Stěry z povrchu výrobního zařízení, odebrané z plochy 10 cm² po skončení čištění a dezinfekce, nesmí obsahovat:

- a) více než 10² aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů,
- b) salmonely.

7.4 Jak postupovat při pozitivním nálezu ve stěru

A) Stanovisko SVS:

Otázka: *Jak postupovat při pozitivním nálezu *Lm* ve stěru po dezinfekci? Kam lze posílat stěry a kolik?*

Odpověď SVS: pro MZe (únor 2017)

(Stěr po dezinfekci může vykazovat podhodnocený obraz a je známkou zejména provedení dezinfekce. Větší vypovídací hodnotu mají stěry na *Lm* prováděné během výroby nebo po ní.)

Vyhodnocení nálezů monitoringu prostředí by měl mít PPP ošetřen v plánu HACCP. Pozitivní nález ve stěru z ploch, které se přicházejí do styku s potravinami, by měl být vyhodnocen jako nevyhovující. Pak je na místě pozastavit výrobu a uvádění živočišných produktů do oběhu. Provést důkladnou sanitaci všech prostor provozovny a nový odběr provozních stěrů. Zvážit likvidaci potravin, meziproduktů či výrobků přítomných v provozovně nebo ošetření postupem vylučujícím přítomnost *Lm* nebo vyšetření na přítomnost

Lm dle nařízení (ES) č. 2073/2005. Nález *Lm* ve stěru z ostatních ploch a podlah lze do určité míry přijmout za přijatelný, ale následně je nutno provádět stanovená opatření stanovená v plánu HACCP.

Stěry odebrané PPP lze vyšetřovat i v soukromé laboratoři. Frekvence a počet stěrů nejsou striktně nařízeny. Určují se na základě analýzy rizika individuálně pro každý provoz a jsou stanoveny v rámci postupů založených na zásadách HACCP a správné hygienické praxe. Což inspektor SVS posuzuje již při (schválení a) registraci provozovny a při každé změně v činnosti.

B) Stanovisko SZPI

Otázka: *Jak postupovat při pozitivním nálezu *Lm* ve stěru po dezinfekci? Kam lze posílat stěry a kolik?*

Odpověď SZPI: pro MZe (únor 2017)

L. monocytogenes zjištěná ve výrobě po čištění a dezinfekci, znamená vážnou chybu v čistících a dezinfekčních postupech PPP, proto je uloženo opatření revidovat HACCP a zvýšit frekvence odběrů vzorků z prostředí, kterým se ověří, zda provedené změny byly účinné (doložit kopiemi laboratorních rozborů). PPP musí mít plán odběru vzorků z míst a zařízení ve výrobě dokumentován, většinou je zpracován v rámci příručky HACCP nebo v sanitčním řádu a měl by zahrnovat: vzorkovací postup, stanovení míst odběrů, stanovení

doby odběru vzorků z míst a zařízení, stanovení četnosti odběru vzorků, stanovení laboratoře pro testování vzorků a stanovení nápravných opatření v případě pozitivních výsledků. Pokud tomu tak není, má inspektor možnost uložit opatření na odstranění zjištěných nedostatků – přepracovat HACCP.

PPP si vhodnou četnost a počty stěrů stanoví sám na základě systémů založených na zásadách HACCP, SVP a SHP s ohledem na specifika výroby, tudíž nelze četnost/počty přesně vymezit a vymáhat. PPP by měl zohlednit objem denní produkce, rizikovitost výroby a konečného produktu např. použití konzervačních látek. SZPI doporučuje PPP začít odebírat větší počet vzorků a na základě analýzy trendů z laboratorních analýz počet vzorků snižovat. Data z předcházejícího období, ale i ekonomické hledisko, jsou jedním z prostředků, kterými PPP může obhájit zvolenou četnost a počty odběrů stěrů. Ačkoliv nařízení (ES) č. 2073/2005 nestanovuje požadavek na provádění analýz v akreditované laboratoři, SZPI doporučuje využívat laboratoř, která je akreditována na analýzy vzorků z prostředí a zařízení.

8. TRŽNÍ SÍŤ

8.1 Maloobchodní prodejny

8.1.2 Přenos v průběhu prodeje – krájení a dělení výrobků k přímé spotřebě (RTE), problematika *Lm* u kráječů

V průběhu krájení či řezání masných výrobků může docházet k přenosu patogenních a potravinových kazících bakterií na člověka. Tento přenos byl jednoznačně prokázán u *Listeria monocytogenes*, salmonel a jiných bakterií, které mohou způsobit alimentární onemocnění, nebo způsobit rychlé kažení výrobků.

Pokud se neprovádí řádné očištění a desinfekce pomůcek či zařízení na krájení a dělení masných výrobků, dochází k adherenci bakterií na povrchu a následné tvorbě biofilmu. Bakterie organizované v biofilmu úspěšně využívají zbytků tuků, bílkovin, cukrů a dalších složek potravin, které ulpěly na povrchu zařízení, k pomnožení, tvorbě enzymů či toxinů.

Za využití systémů mezibuněčné komunikace „*Quorum sensing*“ mohou zvyšovat svoji odolnost vůči okolnímu prostředí a postupům čištění (Brychta aj., NRL SVÚ Jihlava).

Tabulka č. 8.1: Výsledky vyšetření masných výrobků ihned po dodání do laboratoře a po 20 hodinovém uchování v ledničce do + 5 °C (KTJ/g). (Zdroj: Brychta aj., NRL SVÚ Jihlava.)

Druh vzorku	Datum vyšetření	CPM	Entero.	Lactob.	LM
Junior vcelku	9.4.	0	0	0	negativní
Junior krájený	9.4.	33 000	0	8 000	negativní
Junior vcelku	10.4.	0	0	0	negativní
Junior krájený	10.4.	110 000	0	50 000	negativní
Poličan vcelku	9.4.	-	0	> 300 000	negativní
Poličan krájený	9.4.	-	0	> 300 000	negativní
Poličan vcelku	10.4.	-	0	> 300 000	negativní
Poličan krájený	10.4.	-	0	> 300 000	negativní
Gothaj vcelku	9.4.	250	0	200	negativní
Gothaj krájený	9.4.	22 000	0	15 000	negativní
Gothaj vcelku	10.4.	440	0	360	negativní
Gothaj krájený	10.4.	18 000	0	10 000	negativní
Herkules vcelku	9.4.	-	0	> 300 000	negativní
Herkules krájený	9.4.	-	0	> 300 000	negativní
Herkules vcelku	10.4.	-	0	> 300 000	negativní
Herkules krájený	10.4.	-	0	> 300 000	negativní
Šunkový vcelku	9.4.	0	0	0	negativní
Šunkový krájený	9.4.	13 000	0	9 000	negativní
Šunkový vcelku	10.4.	130	0	0	negativní
Šunkový krájený	10.4.	180 000	0	60 000	negativní
Paprikáš vcelku	9.4.	-	0	200 000	negativní
Paprikáš krájený	9.4.	-	0	260 000	negativní
Paprikáš vcelku	10.4.	-	0	300 000	negativní
Paprikáš krájený	10.4.	-	0	290 000	negativní
Šunka vcelku	9.4.	310	0	180	negativní
Šunka krájená	9.4.	9 000	0	5 000	negativní
Šunka vcelku	10.4.	150	0	60	negativní
Šunka krájená	10.4.	6 600	0	3 000	negativní

Legenda:

KTJ = kolonie tvořící jednotka; CPM = celkový počet mikroorganismů; Entero. = čeleď *Enterobacteriaceae*; Lactob. = *Lactobacillus spp.*; LM = *Listeria monocytogenes*

Komentář k tabulce č. 8.1: v NRL byly vyšetřeny vzorky z celých výrobků a jejich nakrájené plátky. Tyto výrobky byly poté uloženy do ledničky při 5 °C a následující den byly odebrány stejné vzorky. Cílem bylo zjistit, jak se promítne nakrájení do rozvoje mikrobiologické kontaminace. Krájení bylo provedeno na nářezovém stroji v prodejně, o které bylo referováno, že je na vysoké úrovni hygieny. Jak je patrné z tabulky č. 8.1, pouhé nakrájení způsobí kontaminaci výrobku. Je to dáno zřejmě tím, že do krájených plátků se dostal vzduch (kyslík) a také se mohla rozeřít „hnízda“ bakterií, která nebyla tepelným ošetřením u výrobce kompletně zničena. Ani sekundární kontaminace z nože není vyloučena.

Přípravě a krájení výrobků jsme nebyli přítomni, a jak bylo stěrem prokázáno, ani krájecí nůž nebyl v souladu s vyhláškou, která vyžadovala počet CPM < 100 KTJ/cm². Překvapením pro nás bylo nižší pomnožení bakterií u šunky. Zřejmě měla nižší obsah vody oproti předchozím výrobkům.

Závěr

- Nářezový nůž může být důležitým zdrojem sekundární kontaminace.
- Nekrájený výrobek vykazuje mnohem vyšší údržnost než výrobek krájený.
- U krájených tepelně opracovaných masných výrobků jsou dobré podmínky pro rozvoj kontaminující mikroflóry, a to jak původní, tak sekundárně získané.
- Jak vyplývá z našich výsledků, dodržo-

vání předepsané teploty nemusí být dostatečným ochranným prvkem, který by zabránil růstu bakterií.

- Nejúčinnějším ochranným prvkem v systému HACCP je zcela určitě dobře nastavený režim udržování čistoty a účinnosti desinfekce.
- Čistota zařízení a účinnosti desinfekce ve výrobním prostředí musí být pravidelně kontrolována a vyhodnocována nejen z hlediska zaměření na patogenní bakterie, ale i na bakterie způsobující nepříznivé senzorké změny a kažení výrobků (Brychta aj., NRL SVÚ Jihlava).

Jak již bylo uvedeno dříve, bakteriím se daří v teple. Teploty v rozmezí 4 °C až 60 °C jsou považovány za *nebezpečnou zónu* pro uchovávání potravin, protože bakterie se při těchto teplotách rychle množí (Farber aj., 2014). K pomnožení bakteriím stačí krátký čas, většinou se jejich počet zvyšuje geometrickou řadou již po 20 až 30 minutách.

8.2 Přenos v průběhu prodeje

Kontrola času a teploty

Mikroorganismům se daří ve vyšších teplotách. Teploty mezi 4 až 60 °C jsou teploty, ve kterých mohou mikroorganismy nejen růst a pomnožovat se, ale mohou produkovat enzymy, exotoxiny a jiné produkty metabolismu. Na druhé straně mnoho mikroorganismů může být inaktivováno při působení teplot 60 °C po dobu několika minut. Teploty pod

bodem mrazu však nemají valný význam pro jejich zničení. Mohou ale vyvolat stav **dormance** (stav spánku, klidu), je to doba, po kterou nemůže mikroorganismus růst a být aktivní. Je také důležité vědět a musíme to stále připomínat, že některé bakterie, jako *Lm*, rostou dobře v chladicích teplotách.

Kontrola patogenů na obchodě

Obvykle mají bakterie za správných podmínek a teploty schopnost zdvojnásobit svůj počet asi za 20 až 30 minut. Některé bakterie potřebují velmi málo buněk, např. jen čtyři až pět v případě *Salmonella spp.*, aby způsobily onemocnění.

Proto i v případě, že potravina je ponechána bez dozoru v „nebezpečném prostoru za nebezpečných podmínek“ jen na 2 hodiny, může to vést k riziku vzniku onemocnění. Tento efekt je kumulativní. To znamená, že i když je potravina udržována při teplotě nevhodného skladování jen pouhých pár minut v různých fázích výroby, jako je expedice, příjem, přeprava, skladování a příprava, tak to může mít za následek (v konečném součtu času a příznivé teploty) pomnožení bakterií na dostatečnou úroveň, která je dostatečná k následnému vzniku onemocnění (Kozak aj., 2014).

Tato informovanost by měla být výrazně posilována i u kupujících, protože nelze vinit za všechny problémy pouze výrobce a obchod. Jen si představme podmínky při transportu nakoupených potravin do domácnosti. Jak

často vede cesta přímo domů? Jaká je teplota v autě nebo dopravních prostředcích? Otázek by mohlo být mnohem víc, jen na ně není prostor. Ještě snad další připomínka – jaká je úroveň kontaminace připravovaných svačin pro naše děti?

Prostory, které jsou rozhodující pro přenos patogenů na post-výrobní úrovni:

- 1) přeprava a skladování mezi zpracováním a obchodní sítí,
- 2) příjem, zpracování a skladování v maloobchodu,
- 3) přeprava z maloobchodu ke spotřebiteli domů,
- 4) manipulace a skladování v domácnosti (Anon., 63).

Například drůbeží výrobky (syrové) rychleji podléhají zkáze, a tak by měly být skladovány při nejnižší možné teplotě pro prodloužení doby jejich skladovatelnosti. Studie prokázaly, že populace některých bakterií se zdvojnásobí každých 36 hodin při 2 °C; 14 hodin při 0 °C; 7 hodin při 5 °C a za méně než 1 hodinu při 25 °C. Studie také ukázaly, že počty bakterií na JUT kuřat uložených ve 2 °C po dobu 14 dní jsou rovnocenné těm, které byly uloženy v 10 °C po 5 dní nebo 24 °C za 1 den. *Lm* nepatří mezi bakterie, které způsobují kažení! Může být ale skryta v okolní bakteriální populaci a pomnožovat se, aniž by bylo možné ji lehce zjistit.

Růst mikroorganismů na povrchu drůbeže způsobuje vznik zápachu, oslizlosti a další sensorické změny. Čím vyšší je počáteční bakteriální kontaminace, tím rychleji nastupuje osliznutí a kažení (Anon., 64).

Poznámka: Zde se otevírá prostor pro „šetřivé podnikatele“, kteří mohou počátky změn v sensorice řešit po svém. Maso nakoření a naloží, poté ho prodávají jako vhodné ke grilování nebo ho přímo tepelně opracují a prodávají ve formě hotového jídla/pokrmu.

Vzhledem k tomu, že pouze část spotřebitelů nakupuje přímo od místního zemědělce, globální charakter nabídky potravin může vyústit v to, že potraviny cestují stovky, ne-li tisíce kilometrů před dosažením místní maloobchodní prodejny. Více než 200 miliard tun potravin se přepravuje každoročně globálně, po zemi, moři a vzduchu. Většina potravin, které jsou přepravovány, má jedinečné požadavky na kontejner, úložiště, teplotu a jiné požadavky v nakládání s nimi. Potraviny jsou velmi citlivé na znečištění a kontaminaci během přepravy. Také některé z rizikových faktorů, které mohou být spojeny s dopravou, jsou mnohdy zneužívány. Včetně teploty, základních hygienických požadavků, nekalých praktik nakládky/vykládky, jedná se často o poškození obalů a lidské chyby. Pokud jde o maloobchod, automobilová doprava je upřednostňovaný způsob dopravy do obchodu. V USA, to činí více než 80 % všech zásilek potravin a z toho vyžaduje asi 91 % přepravy řízenou teplotu (Ackerley aj., 2010).

9. Příklady legislativy

Uvádíme některé vybrané příklady platné legislativy ve vztahu k *Lm* včetně jejich citace.

Za účelem ochrany spotřebitele před touto hrozbou a dalšími potenciálními hrozbami pro veřejné zdraví EU přijala integrovaný přístup k bezpečnosti potravin od zemědělské produkce až po spotřebu („z farmy až po vidličku“). Tento přístup sestává z hodnocení rizik a opatření k řízení rizik zahrnujících všechny klíčové aktéry: členské státy EU, Evropskou komisi, Evropský parlament, EFSA a ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Tento přístup je podporován včasnými a účinnými aktivitami v oblasti komunikace rizik.

EFSA monitoruje prevalenci bakterie *Lm* u zvířat a v potravinách a posuzuje rizika, která tato bakterie představuje pro lidské zdraví. Na vyžádání tento úřad doporučuje opatření pro prevenci výskytu bakterie a ke snížení hladin bakterie *Listeria* zjištěných v potravinách (opatření k tlumení). Zjištění EFSA jsou používána manažery rizik na úrovni EU a členských států ke zlepšení politiky informovanosti a k podpoře stanovení případných cílů snížení výskytu bakterie *Listeria* v potravinovém řetězci.

Jedním ze základních cílů potravinového práva je vysoký stupeň ochrany veřejného zdraví. Mikrobiologická nebezpečí v potravinách představují hlavní zdroj onemocnění

z potravin u lidí. Požadavky na bezpečnost potravin, stanovuje:

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 ze dne 28. ledna 2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin.

V článku 14 tohoto nařízení jsou stanoveny obecné požadavky na bezpečnost potravin, které se spolu s požadavky na řízení rizika uvedenými v článku 19 použijí za účelem snížení či vyloučení rizika způsobeného uvedením nebezpečných potravin na trh. Cílem



článku 14 je chránit veřejné zdraví. Jsou v něm proto stanoveny faktory, které je nutno vzít v úvahu při rozhodování o tom, zda je potravina škodlivá pro zdraví nebo nevhodná k lidské spotřebě. Pro ochranu veřejného zdraví a zájmů spotřebitelů má v celém potravinovém řetězci prvořadý význam schopnost vysledovat potraviny a krmiva (článek 18).

Článek 14

Požadavky na bezpečnost potravin

- Potravina nesmí být uvedena na trh, není-li bezpečná.*
- Potravina se nepovažuje za bezpečnou, je-li považována za:*
 - škodlivou pro zdraví;*
 - nevhodnou k lidské spotřebě.*
- Při rozhodování o tom, zda potravina je nebo není bezpečná, se berou v úvahu*
 - obvyklé podmínky použití potraviny spotřebitelem a v každé fázi výroby, zpracování a distribuce a*
 - informace poskytnuté spotřebiteli, včetně informací na štítku nebo dalších informací obecně dostupných spotřebiteli o tom, jak zamezit škodlivým účinkům určité potraviny nebo skupiny potravin na zdraví.*
- Při rozhodování o tom, zda potravina není vhodná k lidské spotřebě, se bere v úvahu skutečnost, zda není potravina s ohledem na své zamýšlené použití nepřijatelná pro lidskou spotřebu z důvodu kontaminace cizorodými nebo jinými látkami nebo z důvodu hniloby, kažení nebo rozkladu.*
- Pokud je nebezpečná potravina součástí*

dávky, šarže nebo zásilky potravin zařazených do stejné kategorie nebo odpovídajících stejnému popisu, předpokládá se, že všechny potraviny v dané dávce, šarži nebo zásilce rovněž nejsou bezpečné, pokud důkladné šetření neprokáže, že neexistují důkazy o tom, že zbytek dávky, šarže nebo zásilky není bezpečný.

Minulé události v odvětví potravin prokázaly, že schopnost vysledovat potraviny a krmiva v celém potravinovém řetězci má prvořadý význam pro ochranu veřejného zdraví a zájmů spotřebitelů. Sledovatelnost sama o sobě nezajišťuje bezpečnost potravin. Jedná se o způsob, jak pomoci omezit problém týkající se bezpečnosti potravin.

Článek 18 Sledovatelnost

1. Ve všech fázích výroby, zpracování a distribuce je nutné zajistit sledovatelnost potravin, krmiv, zvířat určených k produkci potravin a jakékoli jiné látky, která je určena k přimísení do potraviny nebo krmiva nebo u níž se předpokládá, že do nich bude přimíšena.
2. Provozovatelé potravinářských a krmivářských podniků musí být schopni identifikovat každou osobu, která jim dodala potravinu, krmivo, hospodářské zvíře nebo jakoukoli látku, která je určena k přimísení do potraviny nebo krmiva nebo u níž se předpokládá, že do nich bude přimíšena.

Za tímto účelem zavedou tito provozovatelé systémy a postupy, které umožní, aby tyto informace byly na požádání poskytnuty příslušným orgánům.

3. Provozovatelé potravinářských a krmivářských podniků zavedou systémy a postupy umožňující identifikovat podniky, kterým byly dodány jejich výrobky. Tyto informace poskytnou na požádání příslušným orgánům.

Pokud potravina je nebo může být nebezpečná podle článku 14 nařízení č. 178/2002 má PPP povinnost stáhnout nebezpečné potraviny z trhu, převzít je zpět nebo o nich informovat.

Článek 19 Odpovědnost za potraviny: provozovatelé potravinářských podniků

1. Jestliže se provozovatel potravinářského podniku domnívá nebo má důvod se domnívat, že potravina, kterou dovezl, vyprodukoval, zpracoval, vyrobil nebo distribuoval, není v souladu s požadavky na bezpečnost potravin, neprodleně přistoupí ke stažení dotyčné potraviny z trhu, pokud tato potravina již není pod bezprostřední kontrolou tohoto původního provozovatele potravinářského podniku, a uvědomí o tom příslušné orgány. Jestliže se již produkt mohl dostat ke spotřebiteli, provozovatel účinně a přesně informuje spotřebitele o důvodu jeho stažení, a je-li to nezbytné, převezme zpět od spotřebitelů již dodané produkty, nestá-

čí-li k dosažení vysoké úrovně ochrany zdraví jiná opatření.

2. Provozovatel potravinářského podniku odpovědný za maloobchodní nebo distribuční činnost, která nemá vliv na balení, označování, bezpečnost nebo neporušenost potraviny, zahájí v mezích své činnosti postupy, jimiž se z trhu stahují výrobky nespĺňující požadavky na bezpečnost potravin, a přispívá k bezpečnosti potraviny tím, že předá významné informace nezbytné ke sledování potraviny, přičemž spolupracuje na opatřeních producentů, zpracovatelů, výrobců nebo příslušných orgánů.
3. Provozovatel potravinářského podniku neprodleně uvědomí příslušné orgány, pokud se domnívá nebo má důvod se domnívat, že potravina, kterou uvedl na trh, může být škodlivá pro lidské zdraví. Provozovatel uvědomí příslušné orgány o opatřeních, která přijal s cílem předejít riziku pro konečného spotřebitele, a nebrání žádné osobě ani žádnou osobu neodrazuje od toho, aby v souladu s vnitrostátními právními předpisy a právní praxí spolupracovala s příslušnými orgány, lze-li tím předejít riziku spojenému s potravinou nebo toto riziko zmenšit či vyloučit.
4. Provozovatelé potravinářských podniků spolupracují s příslušnými orgány v rámci opatření přijatých s cílem zabránit riziku spojenému s potravinou, kterou dodal, nebo toto riziko zmenšit.

Bezpečnost potravin se zajišťuje především preventivním přístupem, například prováděním správné hygienické praxe a používáním postupů založených na zásadách analýzy rizik a kritických kontrolních bodů (HACCP). Pravidla pro hygienu potravin vztahující se na provozovatele potravinářských podniků stanovuje:

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004 ze dne 29. dubna 2004 o hygieně potravin

S ohledem na veřejné zdraví obsahuje toto nařízení pravidla a zejména zásady týkající se odpovědnosti výrobců a příslušných orgánů, strukturální, provozní a hygienické požadavky na zařízení, postupy schvalování zařízení, požadavky na skladování a přepravu a požadavky na označení zdravotní nezávadnosti. Podle článku 4 nařízení (ES) č. 852/2004 musejí provozovatelé potravinářských podniků dodržovat mikrobiologická kritéria.

KAPITOLA I OBCENÁ USTANOVENÍ

Článek 1

Oblast působnosti

1. Toto nařízení stanoví obecná pravidla pro hygienu potravin vztahující se na provozovatele potravinářských podniků, přičemž přihlíží především k těmto zásadám:
 - a) primární odpovědnost za bezpečnost potravin nese provozovatel potravinářského podniku;

- b) je nezbytné zajistit bezpečnost potravin v celém potravinovém řetězci, počínaje prvovýrobou;
- c) je důležité, aby u potravin, které nelze bezpečně skladovat při okolní teplotě, zejména u mražených potravin, nebyl porušen chladicí řetězec;
- d) všeobecné používání postupů založených na zásadách HACCP spolu s používáním správné hygienické praxe by mělo posílit odpovědnost provozovatelů potravinářských podniků;
- e) pokyny pro správnou praxi jsou hodnotným nástrojem, který napomůže provozovatelům potravinářských podniků na všech úrovních potravinového řetězce dodržet pravidla hygieny potravin a používat zásady HACCP;
- f) je nezbytné stanovit mikrobiologická kritéria a požadavky na kontrolu teploty, založené na vědeckém posouzení rizika;

Toto nařízení se použije na všechny fáze výroby, zpracování a distribuce potravin a na vývoz. Nejsou jím dotčeny specifitější požadavky týkající se hygieny potravin.

KAPITOLA II

POVINNOSTI PROVOZOVATELŮ POTRAVINÁŘSKÝCH PODNIKŮ

Článek 3

Obecná povinnost

Provozovatel potravinářského podniku zajistí, aby ve všech fázích výroby, zpracování a distribuce potravin pod jeho kontrolou splňovaly odpovídající hygienické požadavky stanovené v tomto nařízení.

Článek 4

Obecné a zvláštní hygienické požadavky

1. Provozovatelé potravinářských podniků zabývajících se prvovýrobou a souvisejícími postupy uvedenými v příloze I dodržují obecná hygienická pravidla stanovená v části A přílohy I a všechny zvláštní požadavky stanovené nařízením (ES) č. 853/2004.
2. Provozovatelé potravinářských podniků provádějících činnosti v jakékoli fázi výroby, zpracování a distribuce potravin, které následují po fázích, na něž se vztahuje odstavec 1, dodrží všeobecné hygienické požadavky stanovené v příloze II a všechny zvláštní požadavky stanovené nařízením (ES) č. 853/2004.
3. Provozovatelé potravinářských podniků podle potřeby přijmou tato zvláštní hygienická opatření:
 - a) pro soulad s mikrobiologickými kritérii pro potraviny;
 - b) postupy nezbytné pro splnění úkolů stanovených za účelem dosažení cílů tohoto nařízení;
 - c) pro soulad s požadavky na kontrolu teploty potravin;
 - d) pro zachování chladicího řetězce;
 - e) pro odběr vzorků a analýzu.

Při validaci a ověřování postupů založených na zásadách HACCP a dalších opatření na kontrolu hygieny je možné použít mikrobiologická kritéria. Při překročení limitů pro mikrobiologickou bezpečnost potravin z hlediska výskytu *Lm* musí být potravina považována za nepřijatelně kontaminovanou

těmito mikroorganismy. Podle potravinového práva EU, které zabezpečuje harmonizaci bezpečnostních kritérií, jsou stanovena pravidla odpovědnosti především pro PPP. Odpovědnost za mikrobiologickou bezpečnost je obsažena zejména v:

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

Z nařízení (ES) č. 2073/2005 vyplývá mimo jiné, že:

- Potraviny nesmějí obsahovat mikroorganismy nebo jejich toxiny či metabolity v množstvích, která představují nepřijatelné riziko pro lidské zdraví.
- Používání mikrobiologických kritérií by mělo být nedílnou součástí provádění postupů založených na zásadách HACCP a dalších opatření na kontrolu hygieny.
- Bezpečnost potravin se zajišťuje především preventivním přístupem, například prováděním správné hygienické praxe a používáním postupů založených na zásadách analýzy rizik a kritických kontrolních bodů (HACCP). Mikrobiologická kritéria je možné použít při validaci a ověřování postupů založených na zásadách HACCP a dalších opatření na kontrolu hygieny.

Toto nařízení vysvětluje v příloze I kapitole I kategorizaci potravin na podporující a nepodporující růst *Lm*.

Pro úplnost uvádíme i další právní předpisy EU, které mají související vztah k *Lm*:

Nařízení Komise (EU) č. 601/2014 ze dne 4. června 2014, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, pokud jde o kategorie potravin u masa a použití některých potravinářských přídatných látek v masných polotovarech.

Nařízení Komise (EU) 2017/185 ze dne 2. února 2017, kterým se stanoví přechodná opatření k provádění některých ustanovení nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 a (ES) č. 854/2004.

9.1 Interpretace výsledků vyšetření podle nařízení (ES) č. 2073/2005

Limity uvedené v příloze I kapitoly I nařízení (ES) č. 2073/2005 se vztahují na každou vyšetřovanou jednotku vzorku, vyjma živých mlžů a živých ostnokožců, pláštěnců a plžů v souvislosti s vyšetřením na *E. coli*, kdy se limit vztahuje na směsný vzorek. Výsledky vyšetření vypovídají o mikrobiologické jakosti vyšetřované partie.

***L. monocytogenes* v potravinách určených k přímé spotřebě pro kojence a pro zvláštní léčebné účely:**

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

L. monocytogenes v potravinách určených k přímé spotřebě, které podporují růst *Lm*, před tím, než potraviny opustí bezprostřední kontrolu provozovatele potravinářského podniku, který je vyrábí, pokud není schopen prokázat, že výrobek nepřekročí limit 100 KTJ/g po celou dobu údržnosti:

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

L. monocytogenes v ostatních potravinách určených k přímé spotřebě a *E. coli* v živých mlžích:

- vyhovující, pokud jsou všechny zjištěné hodnoty \leq limit,
- nevyhovující, pokud je kterákoli hodnota $>$ limit.

9.2 Ověřování trvanlivosti potravin – studie údržnosti potravin podporující růst *Lm*

Podle čl. 3 odst. 2 nařízení (ES) č. 2073/2005 PPP odpovědní za výrobu produktu musejí v případě potřeby provádět studie podle přílohy II s cílem prověřit, zda jsou po celou dobu údržnosti dodržována příslušná kritéria. Stanovením fyzikálně-chemických vlastností výrobku např. pH, vodní aktivita (*aw*), skladovací teplota, obsah soli, koncentrace konzervantů, druh obalového systému, reálná teplota skladování, může výrobce určit, které mikroorganismy včetně patogenních

mohou ve výrobku přežívat a růst. Výrobce by měl stanovovat fyzikálně-chemické vlastnosti výrobků pravidelně, čímž zohlední variabilitu jednotlivých šarží a v případě *L. monocytogenes* by měl být pomocí získaných údajů schopen dozorovým orgánům doložit, zda výrobek podporuje nebo nepodporuje růst *L. monocytogenes*.

Některé výrobky, které umožňující růst *Lm* mohou vykazovat nízkou prevalenci kontaminace v místě produkce (<100 KTJ) a vyšší prevalenci v místě spotřeby, stejně jako výrobky, které růst *Lm* nepodporují. Důvodem nebývá sekundární kontaminace, ale nárůst



počtu *Lm* v důsledku adaptace na nové životní podmínky a nedodržení podmínek *aw* a pH. Toto tvrzení lze doložit pozitivními vzorky na *Lm* v prvotním obalu, který nebyl před laboratorním vyšetřením poškozen (otevřen). (Viz. zprávy NRL SVÚ).

Podle čl. 9 nařízení (ES) č. 2073/2005 má PPP provádět analýzy trendů ve výsledcích vyšetření. Údaje z předcházejícího období mohou poukázat na úroveň kontaminace prostředí a zařízení výroby, surovin a z nich vyrobených potravin, zda je úroveň kontaminace *Lm* u potravin určených k přímé spotřebě na konci údržnosti trvale nízká či žádná a že žádný ze zjištěných výsledků nepřekročil právní limity. Nicméně, pokud údaje z předcházejícího období nejsou z pohledu dozorových orgánů dostatečně průkazné, aby demonstrovaly, že limity stanovené pro *Lm* nebudou na konci doby údržnosti překročeny, je nutné provést laboratorní studie.

Článek 3: Obecné požadavky

1) *Bezpečnost potravin se zajišťuje především preventivním přístupem, například prováděním správné hygienické praxe a používáním postupů založených na zásadách analýzy rizik a kritických kontrolních bodů (HACCP). Mikrobiologická kritéria je možné použít při validaci a ověřování postupů založených na zásadách HACCP a dalších opatření na kontrolu hygieny.*

1b) *aby kritéria bezpečnosti potravin platná po celou dobu údržnosti produktů mohla být dodržena za rozumně předvídatelných podmínek distribuce, skladování a používání.*

2) *Provozovatelé potravinářských podniků odpovědní za výrobu produktu musejí v případě potřeby provádět studie podle přílohy II s cílem prověřit, zda jsou po celou dobu údržnosti dodržována příslušná kritéria. To se týká zejména potravin určených k přímé spotřebě, které podporují růst *Listeria monocytogenes* a které mohou představovat riziko *Listeria monocytogenes* pro veřejné zdraví.*

Článek 9: Analýzy trendů

Provozovatelé potravinářských podniků musejí analyzovat trendy ve výsledcích vyšetření. Zjistí-li trend směrem k nevyhovujícím výsledkům, podniknou bez zbytečného odkladu příslušná opatření k nápravě situace s cílem zabránit výskytu mikrobiologických rizik.

9.3 Rozdělení výrobků pro provedení metodiky studií údržnosti (trvanlivosti)

Z každé skupiny by se měl vybrat výrobek, který se vyrábí v největším množství (nebo ten, který se zdá nejrizikovější) a tento výrobek by měl být určen pro provedení studie údržnosti (trvanlivosti). Podrobnější informace o zásadách a podmínkách provedení studie jsou uvedeny v příloze č. 3: Metodika provádění studií trvanlivosti pro *L. monocy-*

togenes u potravin určených k přímé spotřebě, uvádí pro PPP doporučené členění výrobků.

Výrobky z masa

Podle stupně zpracování můžeme použít rozdělení masných výrobků na následující skupiny: drobné masné výrobky, měkké salámy, trvanlivé masné výrobky, speciální masné výrobky, vařené masné výrobky, pečené masné výrobky, uzená masa, fermentované výrobky.

Mléčné výrobky

Konzumní, pasterované mléko, kysané tekuté výrobky, tvarohy, máslo, čerstvé sýry, měkké sýry, tvrdé sýry, tavené sýry a pomazánky, sušená mléka, plísňové sýry, strouhané sýry.

Rybí výrobky

Základní rozdělení je samozřejmě na ryby mořské a sladkovodní. Pro další rozdělení výrobků můžeme využít například obsah tuku:

- libové – méně než 2 % tuku (treska, štika, candát, okoun)
- středně tučné – 2 až 10 % tuku (platýz, losos, pstruh, kapr, sumec)
- tučné – více než 10 % tuku (sleď, úhoř, makrela, šprot)
- marinované výrobky
- syrové výrobky k přímému konzumu (sushi, apod)
- speciality.

Lahůdky

Saláty s majonézou, saláty bez majonézy, rybí saláty, zeleninové saláty, aspikové výrobky, masné výrobky – viz členění u výrobků z masa, mléčné výrobky, pomazánky, krémy a pěny, kusové výrobky s pečivem (Anon., 65).

10. EKONOMICKÉ ZTRÁTY V DŮSLEDKU ONEMOCNĚNÍ ČLOVĚKA LISTERIÓZOU

Jak uvádí Oliver aj. (2005), finanční náklady na léčbu onemocnění z potravin rychle rostou. V roce 2000 již bylo vynaloženo v USA asi 1,2 miliardy dolarů pro *Campylobacter* (všechny aerotypy); na léčbu salmonelóz 2,4 miliardy; pro léčbu onemocnění způsobené *E. coli* O 157:H7 bylo zapotřebí 0,7 miliardy; dále 0,3 miliardy pro jiné *E. coli* produkující Shiga toxin a pro *L. monocytogenes* náklady činily 2,3 miliardy dolarů.

Odhady ekonomických nákladů spojené s onemocněním z potravin, jsou důležitou informací pro různá rozhodování ve veřejném zdraví. V roce 2008 bylo v Kanadě potvrzeno 57 případů listeriózy a z toho 24 úmrtí, které souvisely s kontaminovanými lahůdkami z masa. Náklady spojené s případy (včetně nákladů na zdravotní péči, nemedicínské náklady a ztráty produktivity), náklady vynaložené na řízení s dotčeným výrobcem a náklady federální agentury, byly odhadnuty na téměř 242 milionů kanadských dolarů. Přičemž náklady, na samotný případ onemocnění byly odhadnuty na přibližně 2,8 milionu dolarů, a to včetně ztráty na životech.

To vykazuje značnou ekonomickou zátěž na úrovni jedince i populace, spojenou zejména s alimentárními nákazami a otravami jídlem (Thomas aj., 2015).

Z ČR máme k dispozici pouze jeden údaj o nákladech na listeriózu. Jádrová a Marešová (2005) řešily kazuistiku listeriózy u dvou novorozenců. Genotypizací byl určen kmen *L. monocytogenes* - 4b, sérotyp 208. Úhrada za hospitalizaci byla vyčíslena zdravotnické pojišťovně na 581 019,61 Kč.

11. METODIKA PROVÁDĚNÍ STUDIÍ TRVANLIVOSTI PRO *LISTERIA MONOCYTOGENES*

11.1 Metodika provádění studií trvanlivosti pro *L. monocytogenes* u potravin určených k přímé spotřebě je dostupná na webových stránkách NRL SVÚ Jihlava: www.svujihlava.cz, kde budou uváděny aktualizace.

11.2 Kontrolní list ke studiím údržnosti pro *L. monocytogenes* u potravin určených k přímé spotřebě podle nařízení (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny bude dostupný na webových stránkách NRL SVÚ Jihlava: www.svujihlava.cz

11.3 Kontrolní list pro stanovení aw (vodní aktivity) u potravin bude dostupný na webových stránkách NRL SVÚ Jihlava: www.svujihlava.cz

11.4 Kontrolní list pro stanovení pH u potravin bude dostupný na webových stránkách NRL SVÚ Jihlava: www.svujihlava.cz



12. POUŽITÁ LITERATURA

Aarestrup, F.M.: Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int. J Antimicrob Agents* 1999; 12: 279–285.

Ackerley, N. – Sertkaya, A. – Lange, R. 2010. Food Transportation Safety: Characterizing Risks and Controls by Use of Expert Opinion. *Food Protection Trends*, Vol. 30, No. 4, Pages 212–222.

Akbas, M.Y. 2015. Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. www.microbiology5.org/microbiology5/book/383-394.pdf

Atanassova, A. – Apelt, J. – Reich, F. – Klein, G.: Microbiological quality of freshly shot game in Germany. *Meat Science* 78 (2008) 414–419.

Autio, T. – Hielm, S. – Miettinen, M. – Sjöberg, A.M. – Aarnisalo, K. – Björkroth, J. – Mattila-Sandholm, T.M. – Korkeala, H.: Sources of *Listeria monocytogenes* Contamination in a Cold-Smoked Rainbow Trout Processing Plant Detected by Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Jan. 1999, Vol. 65, No. 1. p. 150 - 155.

Autio, t.: Tracing the sources of *listeria monocytogenes* contamination and listeriosis using molecular tools. Academic dissertation. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, October, 2003.

Bai, A.J. – Rai, V.R. 2011. Bacterial Quorum Sensing and Food Industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol.10, 2011.

Berrang, M.E. - Frank, J.F. – Meinersmann, R.J.: Contamination of raw poultry meat by airborne *Listeria* originating from a floor drain. 2013 *J. Appl. Poult. Res.* 22 :132–136.

Beuchat, L.R. - Brackett, R.E.: Inhibitory Effects of Raw Carrots on *Listeria monocytogenes*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, June 1990, Vol. 56, No. 6. p. 1734-1742.

Blaser, M.J. - Newman, L.S.: 1982. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. *Rev. Infect. Dis.* 4:1096–1106.

Botticella, G. – Russo, P. - Capozzi, V. - Amodio, M.L. - Massa, S. - Spano, G. – Beneduce, L.: *Listeria monocytogenes*, biofilm formation and fresh cut produce. *FORMATEX* 2013. www.formatex.info/microbiology4/vol1/114-123.pdf

Brychta, J. - Bulawová, H. – Klímová, E.: Výskyt *Listeria monocytogenes* v životním prostředí hospodářských zvířat. *Veterinářství* 1/2010. s. 40 -42.

Brychta, J. – Brychta, T. – Steinhäuserová, I. – Klímová, E.: 2011. Ověření baktericidního účinku UV lamy pro ošetření pracovních ploch kontaminovaných *Listeria monocytogenes* a *Escherichia coli*. *Maso*. 6/11. 8 – 11.

Brychta, J.¹ - Klímová, E.¹ - Bulawová, H.¹ - Paul, A.²: Krájení masných výrobků a jeho vliv na úroveň bakteriální kontaminace. ¹Státní veterinární ústav Jihlava, Rantířovská 93, 586 05 Jihlava, Česká Republika, ²AP CONSULT Brno, Česká Republika.

Brychta, J., Klímová, E., Brychta, T., Bulawová, H. Kontaminace masných výrobků bakterií *Listeria Monocytogenes*. *maso* 6/2015. 40 – 44.

Budzińska, K. – Wroński, G. – Szejniuk, B.: 2012. Survival Time *Listeria monocytogenes* in Water Environment and Sewage. *Pol. J. Environ. Stud.* Vol. 21. No.1, 31 – 37.

Buncic, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia. *Int J Food Microbiol* 1991;12: 173 - 180.

Caillet, S. - Millette, M. - Turgis, M. - Salmieri, S. – Lacroix, M. 2006. Influence of Antimicrobial Compounds and Modified Atmosphere Packaging on Radiation Sensitivity of *Listeria monocytogenes* Present in Ready-to-Use Carrots (*Daucus carota*). *Journal of Food Protection*: January 2006, Vol. 69, No. 1, pp. 221-227.

Cenkowski, S. - Blank, G. - Chung-Lewis, M.: Modelling of *Listeria Monocytogenes* growth in pre-sterilized ground beef as affected by fat content, temperature, and atmosphere. Volume 44. 2002. *CANADIAN BIOSYSTEMS ENGINEERING*. 3.11 – 3.16.

Cleveland, J. – Montville, T.J. – Nes, I.F. – Chikindas, M.L.: Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71. 2001. 1–20.

Cockburn, A. - Bradford, R. - Buck, N. - Constable, A. - Edwards, G. - Haber, B. - Hepburn, P. - Howlett, J. - Kampers, F. - Klein, C. - Radomski, M. - Stamm, H. - Wijnhoven, S. – Wildeman, T. 2012. Approaches to the safety assessment of engineered nanomaterials (ENM) in food. *Food Chem. Toxicol.* 50:2224-2242.

Coote, P.J. - Holyoak, C.D. - Cole, M.B.: Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* during a process simulating temperatures achieved during microwave heating. *Journal of Applied Bacteriology* 1991, 70, 489494.

Cotter, P.D. – Gahan, C.G. – Hill, C.: A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Molecular Microbiology*. Volume 40, Issue 2, 2001

- Crépet, A. – Albert, I. – Dervin, C. – Carlin, F.: Estimation of microbial contamination of food from prevalence and concentration data: application to *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73: 250–258.
- Cushen, M. – Kerry, J. – Morris, M. – Cruz-Romero, M. – E. Cummins, E.: Nanotechnologies in the food industry – Recent developments, risks and regulation. Review Article. *Trends in Food Science & Technology, Volume 24, Issue 1, March 2012, Pages 30-46*
- Cwiková, O. 2012. Problematika vzniku mikrobiálních biofilmů. www.chempoint.cz/problematika-vzniku-mikrobiálních-biofilmů
- Černý, M.:2008. Adaptace ke stresu u patogenní bakterie *Listeria monocytogenes* www.theses.cz/id/wvirlr/downloadPrace-Content_adipldno_11184
- Čeřovský: Výroba hotových pokrmů a lahůdek. Anon., 40
- Danese, P.N. – Pratt, L.A. – Kolter, R.: Biofilm formation as developmental process. *Methods in Enzymology, Volume 336, 2001, Pages 19-26.*
- Da Silva, S.M. – Urbas, A.A. – Filliben, J.J. – Morrow, J.B. 2012. Recovery balance: a method for estimating losses in a *Bacillus anthracis* spore sampling protocol. *Journal of Applied Microbiology*. Volume 114, Issue 3. p. 1 – 12.
- Davis, M.J. – Coote, P.J. – O’Byrne, C.P.: Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology* (1996), 142, 2975-2982.
- Deibel, V. – Schoeni, J.: 2017. I. The clean operation: Biofilms: Forming a Defense Strategy for the Food Plant. http://www.hygienea.net/tech_library-article-27a.
- De Luca, C. – Donati, L. – D’Oria, L. – Licameli, A. – Pellegrino, M. – De Santis, M. *Listeria* Infection in Pregnancy: A Review of Literature. *The Open Infectious Diseases Journal*, 2015, 9, 20-25
- De Valk H, Jacquet C, Goulet V, et al. (2005) Surveillance of *Listeria* infections in Europe. *Euro Surveill* 10: 572.
- Dhama, K. – Verma, A.K. – Rajagunalan, S. – Kumar, A. – Tiwari, R. – Chakraborty, S. – Kumar, R.: 2013. *Listeria monocytogenes* Infection in Poultry and its Public Health Importance with Special Reference to Food Borne Zoonoses. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16: 301-308.
- Djenane, D. – Sanchez-Escalante, A. – Beltran, J. A. – Roncales, P.: 2001: Extension of the retail display life of fresh beef packaging in modified atmosphere by varying lighting conditions. *Journal of Food Science* 66, 181-186.
- Dominguez, L. – Garayzabal, J.F.F. – Vazquez, J.A. – Blanco, J.L. – Suarez, G. Fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of semi-hard cheese. *Applied microbiology*. Volume 4, Issue 6, December 1987. Pages 125–127.
- Doyle, M.E.: 1999. Use of organic acids to control *listeria* in meat. Food Research Institute, UW-Madison. www.meatpoultryfoundation.org/namif/wp-content/uploads/99-230.pdf
- Dowd, G.C. – Joyce, S.A. – Hill, C. – Gahan, C.G.M. Investigation of the Mechanisms by Which *Listeria monocytogenes* Grows in Porcine Gallbladder Bile. *Infection and Immunity*, Jan. 2011, p. 369–379.
- Duben, J. Kdo se bojí listerií. 2007. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha. Vydání první. 21 s.
- Duffy, G. – Danaher, M. 2014. Assessing and managing the risk related to microbial pathogens and chemical contaminants in the European beef industry. 60th International Congress of Meat Science and Technology. Uruguay.
- Elischerová, K. – Stúpalová, S. – Helbichová, R. – Štěpánek, J. Výskyt *Listeria monocytogenes* v stolici osob zaměstnaných vo výrobních a predajných mäsä. *Čs. Epidem.*, 28, 1979, No.2. p. 97 – 102.
- Elmossalami, E. – Wasef, N. :1971. Penetration of some Microorganisms in Meat. *Zoonoses and Public Health*. Volume 18, Issue 5, June 1971, Pages 329–336.
- EFSA. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 2014; 12(2):3547.
- EFSA. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 2014; 12(2):3547.
- EFSA Journal 2015;13(1):3991
- Effimia, E. (2015) Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Ready-to-Eat Foods in Kefalonia, Greece. *J Bacteriol Parasitol* 6: 243.
- Emiröglü, KZ, Yemis, GP, Coskun, BK, Candogan, K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*. 2010 ; 86: 283–288.
- EPIDAT. Hlášený výskyt vybraných infekčních nemocí v České republice v Epidatu v letech 2005-2014 - absolutně - předběžná data. www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2003-2012-absolutne-navsteva 6. 8. 2015

- Esteban, J.I. – Oporto, B. – Aduriz, G. – Juste, R.A. – Hurtado, A. (2009): Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. *BMC Veterinary Research*, **5**: 2.
- Fadda, S. – López, C. – Vignolo, G. Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Sci.* (2010);**86**:66–79.
- Farber, J. M., Peterkin, P. I. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, Sept. 1991:476-511.
- Farber, J.M. – Coates, F. – Daley, E.: Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol.* 1992; **15** (3): 103-5.
- Farber, J.M. – Pagotto, F.: The effect of acid shock on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 1992, **15**, 197 – 201.
- Farber, J.M. - E.M. Daley, E.M. – Mackie, M.T. – Limerick, B. 2000. A small outbreak of listeriosis potentially linked to the consumption of imitation crab meat. *Letters in Applied Microbiology* 2000, **31**, 100 -104.
- Farber, J. – Crichton, J. - Snyder, O.P.Jr. 2014. Retail Food Safety. www.springer.com/978-1-4939-1549-1
- Fenlon, D. R. Rapid quantitative assessment of the distribution of *Listeria* in silage implicated in a suspect out-break of listeriosis in calves. *VetRec*1986a; **118**: 240 - 242.
- Fenlon, D. R., Wilson, J., Donachie, W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. *Journal of Applied Bacteriology.* 1996;**81**: 641 -650.
- Fernstrom, A. – Goldblatt, M.: Aerobiology and Its Role in the Transmission of Infectious Diseases. Hindawi Publishing Corporation *Journal of Pathogens*. Volume 2013, Article ID 493960, 13 pages.
- Fijan, S. - Cencič, A. - Šostar Turk, S.: Hygiene monitoring of textiles used in the food industry. *Brazilian Journal of Microbiology* (2006) **37**:356-361.
- Flores, L.M. 1994. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated and low fat ground beef and thermal inactivation in fresh low fat ground beef by microwave energy. Thesis: University of Nebraska. April, 1994.
- Food safety. Microbiological reference criteria for food. 1995. www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Microbiological_Reference-Guide_Assess.pdf
- FSANZ (2009) Microbiological risk assessment of raw cow milk. Food Standards Australia New Zealand, Canberra.2010. www.foodstandards.gov.au/code/proposals/documents/P1007%20PPPS%20for%20raw%20milk%201AR%20SD1%20Cow%20milk%20Risk%20Assessment.pdf. Accessed 21 June 2010.
- Gahan, C.G.M. – Hill, C.: A REVIEW. Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Applied Microbiology* 2005, **98**, 1345–1353.
- Gailunas, K.M.: Use of ultraviolet light for the inactivation of *listeria monocytogenes* and lactic acid bacteria species in recycled chill brines. Thesis, June 30, 2003. Blacksburg, VA. www.theses.lib.vt.edu/theses/available/etd-07092003-140629/unrestricted/karolsthesis.pdf
- Gandhi, M. - Chikindas, M.L.: *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* **113** (2007) 1–15.
- Gailey, J.K. - Dickson, J.S. – Dorsa, W.: Survival of *Listeria monocytogenes* in a Simulated Recirculating Brine Chiller System. *Journal of Food Protection*, Vol. **66**, No. **10**, 2003, Pages 1840–1844.
- Gelbíčová, T. – Karpíšková, R.: Occurrence and Characteristics of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-eat Food from Retail Market in the Czech Republic. *Czech J. Food Sci.* Vol. **27**, 2009, *Special Issue 2*: S2-3–S2-7.
- Gill, C. O. - Penney, N. 1977. Penetration of bacteria into meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**:1284-1286.
- Giotis, E.S. – Blair, I.S. – McDowell, D.A. Morphological changes in *Listeria monocytogenes* subjected to sub-lethal alkaline stress. *Int J Food Microbiol.* 2007; **120** (3): 250-8.
- Godreuil, S. – Galimand, M. - Gerbaud, G. – Jacquet, C. – Courvalin, P.: Efflux pump Ide is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003;**47**:704–708.
- Goulet, V. - King, L.A. - Vaillant, V. - de Valk, H.: “What is the incubation period for listeriosis?” *BMC Infectious Diseases*, vol. **13**, article 11, 2013.
- Gray, J. M., Freitag, E. N., Boor, J. K. How the Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes* Mediates the Switch from Environmental Dr. Jekyll to Pathogenic Mr. Hyde. *Infect Immun* 2006; **74**(5): 2505 - 2512.
- Guilbaud, M. – Chafsey, I. – Pilet, M.F. – Leroi, F. – Prévost, H. – Hébraud, M. - Dousset, X.: Response of *Listeria monocytogenes* to liquid smoke. *Journal of Applied Microbiology.* June 2008, Volume 104, Issue 6, Pages 1744 – 1753.
- Gunasekaran, N.: Effect of Fat Content and Food Type on Heat Transfer during Microwave Heating. Master of Science. August 8, 2002. Blacksburg, Virginia. 1-129 p.

- Gyawali, R. - Hayek, S.A. - Ibrahim, S.A.. Plant extracts as antimicrobials in food products: types. Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality. www.researchgate.net/publication/282597753_Plant_extract_as_antimicrobials_in_food_products_Types Hale, C. R. et al. 2015. Estimates of Enteric Illness Attributable to Contact With Animals and Their Environments in the United States. www.baker.ifas.ufl.edu/documents/S472full-illnessthroughanimalcontact.pdf
- Hellström, S., Kiviniemi, K., Autio, T., Korkeala, H. *Listeria monocytogenes* is common in wild birds in Helsinki region and genotypes are frequently similar with those found along the food chain. *Journal of Applied Microbiology*, 104 (2008), p. 883–888.
- Hernandez-Milian, A. - Payeras-Cifre, A. What Is New in Listeriosis? *BioMed Research International* Volume 2014, Article ID 358051, 7 pages.
- Hewitt, J. L. A comparative Study of *Pseudomonas aeruginosa* Strains. A Thesis for the Degree of Master of Science in Bioengineering. University of Notre Dame. Indiana. 2010: 1-59.
- Holah, J. T., Bird, J., Hall, K. E. The microbial ecology of highrisk, chilled food factories; evidence for persistent *Listeria* spp. and *Escherichia coli* strains. *Journal of Applied Microbiology*. 2004; 97:68–77.
- Huijing Du, H. - Xu, Z. - Anyan, M. - Kim, O. - Leevy, W. M. - Shrout, J. D. - Alber, M. High Density Waves of the Bacterium *Pseudomonas aeruginosa* in Propagating Swarms Result in Efficient Colonization of Surfaces. *Biophysical Journal* 2012;103:601-609.
- Charpentier, E. - Gerbaud, G. - Courvalin, P.: Conjugative mobilization of the rolling-circle plasmid pIP823 from *Listeria monocytogenes* BM4293 among gram-positive and gramnegative bacteria. *J Bacteriol* 1999;181:3368–3374.
- Chasseignaux, E., Gerault, P., Toquin, M. Z., Salvat, G. Colin, P., Ermel, G. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiology Letters* 2002;210: 271- 275.
- Ibusquiza, P.S. 2011. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. Resistance to industrial biocides and crossresponse caused by adaptation to benzalkonium chloride. Doctoral Tesis. Vigo. 1 – 262.
- INGHAM, S.C. – LAU, M.M.: Comparative Survival of *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* on Hot-Smoked Fish. 2003. *Food Protection Trends*, Vol. 23, No. 9, Pages 735-742.
- Ishikawa, T. - Yoshida, N. - Ueno, H. - Wiedeman, M. - Imai, Y. - Yamaguchi, T.: Energy transport in a concentrated suspension of bacteria. *Physical Review Letters*, 107, 028102 (2011).
- Ivy, R.A. - Wiedmann, M. - Boor, K.J.: *Listeria monocytogenes* Grown at 7°C Shows Reduced Acid Survival and an Altered Transcriptional Response to Acid Shock Compared to *L. monocytogenes* Grown at 37°C. *Applied and Environmental Microbiology* p. 3824–3836. June 2012 Volume 78 Number 11.
- Jackson, V. – Blair, I.S. – McDowell, D.A. – Kennedy, J. – Bolton, D.J.: 1993. The incidence of significant foodborne pathogens in domestic refrigerators. www.ibrarian.net/navon/paper/The_incidence_of_significant_foodborne_pathogens_i.pdf?paperid=17828557
- Jádrová, Z. - Marešová, M.: Nozokomiální listerióza. 2005. www.pmfhk.cz/WWW/TD_2012/Jagrova_Nozokomialni.pdf
- Jami, M. - Ghanbari, M. - Zunabovic, M. - Domig, K.J. – Kneifel, W.: *Listeria monocytogenes* in Aquatic Food Products - A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol.13, 2014. 1 – 16
- Jayasena, D.D. – Jo, Ch.: Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology* 34 (2013). 96 -108.
- Jemmi, T. – Stephan, R.: *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2006, 25 (2), 571-580.
- Ježová, M. – Múčková, K. – Koukalová, P.: *Listeria monocytogenes* jako příčina spontánního abortu – popis tří případů. *Čes.-slov. Patol.*, 44, 2008, No. 3, p. 71 – 74.
- Kazemi, S. - Faezi-Ghasemi, M.: An In Vitro Study on Impact of Environmental Stresses on Growth, Morphological and Biochemical Features of *Listeria monocytogenes* PTCC 1297. *J Med Microbiol Infect Dis*, 2015, 3 (1-2): 11-17.
- Kerr, K.G. - Birkenhead, D. - Seale, K. - Major, J. - Hawkey, P.M.: Prevalence of *Listeria* spp. on the Hands of Food Workers. *Journal of Food Protection*, Vol. 56, No. 6, Pages 525-527 (June 1993).
- Khen, B.K. – Lynch, O.A. – Carroll, J. – McDowell, D.A. – Duffy, G.. 2015. Occurrence, antibiotic resistance and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* in the beef chain in the Republic of Ireland. *Zoonoses and Public Health* 62: 11-17
- Kolář, M.: Vývoj bakteriální rezistence a nová antimikrobní léčiva.
- Kozak, G.K. – Crichton, J. – Farber, J. aj., 2014. Control of Pathogens at Retail. www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&e-source=s&source=web&cd=1&ved=0ahU-KEwjh9tyv3ZjXAhUBZIAKHe6bDuQQF-

- ggpMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.springer.com%2Fcd%2Fcontent%2Fdocument%2Fcd_downloaddocument%2F9781493915491-c1.pdf%3FSGWID%3D0-0-45-1488343-p176836604&usg=AOvVaw3jSd4fMmqlumjBZSz3_2MM
- Kumar, C.G. - Anand, S.K.: Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 42 (1998) 9–27.
www.dliran-mavad.com/sell/trans/en/Significance_of_microbial_biofilms_in_food_industry_a_review.pdf
- Kwiatek, K.: Occurrence of *Listeria monocytogenes* in selected food of animal origin. *Bull Vet Inst Pulawy* 48, 269–272, 2004.
- Lado, B. H. - A. E. Yousef, A.E.: 2003. Selection and identification of a *Listeria monocytogenes* target strain for pulsed electric field process optimization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2223–2229.
- Lake, R. - Hudson, A. - Cressey, P. - Gilbert, S.: 2005. Risk profile: *Listeria monocytogenes* in low moisture cheeses. http://www.food-safety.govt.nz/elibrary/industry/Risk_Profile_Listeria_Monocytogenes-Science_Research.pdf
- Leong, D. - Alvarez-Ordóñez, A. - Guillas, F. - Jordan, K.: Determination of *Listeria monocytogenes* Growth during Mushroom Production and Distribution. *Foods* 2013, 2, 544–55.
- Lindow, S.E. – Brandl, M.T.: Microbiology of phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003; 69:1875–1883.
- Little, C.L. - Sagoo, S.K. - Gillespie, I.A. - Grant, K. – McLauchlin, J.: Prevalence and Level of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* Species in Selected Retail Ready-to-Eat Foods in the United Kingdom. *Journal of Food Protection*, Vol. 72, No. 9, 2009, Pages 1869–1877.
- Liu, D. - Lawrence, M. - Gorski, L. - Mandrell, R. E. - Austin, F. W. - Ainsworth, A. J.: *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains belonging to lineages I and III possess distinct molecular features. *J. Clin. Microbiol.* 44, (2006a). 204–207.
- Ljungh A. and Wadstrom T. (2009) A handbook – Lactobacillus Molecular biology From Genomics to Probiotics.
www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&e-source=s&source=web&cd=6&ved=0ahUKEWjbyKCC1LXVAhXI6xQKHWM2CoAQFghaMAU&url=http%3A%2F%2Fgs.elaba.lt%2Fobject%2Felaba%3A1909083%2F1909083.pdf&usg=AFQjCNFkr_n6XfK151bjh68zh5Y-r1fdw
- Ljungqvist, B. - Reinmüller, B. 1993. Interaction between air movements and the dispersion of contaminants: clean zones with unidirectional air flow. *J.Parent. Sci. Technol.*, Vol. 47, pp. 60.69.
- Lou, Y. - Yousef, A.E.: Adaptation to Sublethal Environmental Stresses Protects *Listeria monocytogenes* against Lethal Preservation Factors. *Applied and Environmental Microbiology*, Apr. 1997, Vol. 63, No. 4.p. 1252–1255.
- Low, J. C. - Donachie, W. A. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet J* 1997; 153: 9 - 29.
- Lucchini, R. – Armani, M. – Novelli, E. – Rodas, S. – Masiero, A. – Minenna, J. – Bacchin, C. – Drigo, I. – Piovesana, A. – Favretti, M. – Farina, G.: *Listeria monocytogenes* in game meat cured sausages. *Game Meat Hygiene in Focus* *Wiena*, 11. – 12 October, 2012.
- Lundén, J.M. – Autio, T.J. – Sjöberg, A.M. – Korkeala, H.J.: Persistent and Nonpersistent Contamination in Meat and Poultry Processing Plants. *Journal of Food Protection*, Vol. 66, No. 11, 2003, p. 2062 – 2069.
- Mackey, B. M.- Pritchett, C. – Norris, A. – Mead, G.C.: Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effects of meat type and curing salts. *Letters in Applied Microbiology* 1990, 10, 251 – 255.
- Manu-Tawiah, W. – Myers, D. J. – Olson, D. G. Molins, R. A.: 1993. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in pork chops packed under modified gas atmospheres. *J. Food Sci.* 58: 475–479.
- Mackey, B.M. – Bratchel, N.: A Review. The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 1989,9, 89–94.
- Marien, M. - Decostere, A. - Werbrouck, H. - Van Coillie, E. - Paepe, D. - Moyaert, H. - Pasmans, F. - Daminet, S. – Haesebrouck, F. Isolation of *Listeria monocytogenes* from the gallbladder of a dog with liver insufficiency. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 2007, 76. 352 – 354.
- Mateus, T. - Silva, J. - Maia, L.R. – Teixeira, P.: Listeriosis during Pregnancy: A Public Health Concern. *ISRN Obstetrics and Gynecology*. Volume 2013, Article ID 851712, 6 pages.
- McLauchlin et al., (2004)
www.doiserbia.nb.rs/img/doi/1450-9156/2011/1450-91561103067K.pdf
- Meadows, J.A. - Wargo, M.J.: Carnitine in bacterial physiology and metabolism. *Microbiology* (2015), 161, 1161–1174.
- Meloni, D.: Presence of *Listeria monocytogenes* in Mediterranean-Style Dry Fermented Sausages – review. *Foods* 2015, 4, 34–50.
- Miettinen, H.: 2006. *Listeria monocytogenes* in fish farming and processing. University of Helsinki. Academic dissertation. 1 – 77.

www.ethesis.helsinki.fi/julkaisut/ela/elint/vk/miettinen/listeria.pdf

Milanov, D., Ašanin, R., Vidić, B., Katić, V., Plavša, N. Examination of the Capabilities of Attachment and Biofilm Formation of Different *Listeria monocytogenes* Strains. *Bio-technology in Animal Husbandry*. 25 (5-6), 2009, p 1255-1265.

Mitchell, D.L. (1991) A case cluster of listeriosis in Tasmania. *Communicable Disease Intelligence* 15, 427.

NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 178/2002 ze dne 28. ledna 2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin.

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004 ze dne 29. dubna 2004 o hygieně potravin. *Úřední věstník L 139, 30/04/2004 S. 0001 – 0054*.

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 601/2014 ze dne 4. června 2014, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003, pokud jde o kategorie potravin u masa a použití některých potravinářských přídatných látek v masných polotovarech.

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2017/185 ze dne 2. února 2017, kterým se stanoví přechodná

opatření k provádění některých ustanovení nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 a (ES) č. 854/2004.

Nightingale, K. K., Schukken, Y. H., Nightingale, C. R., Fortes, E. D., Ho, A. J. Her, Z., Grohn, Y. T., McDonough, P. L. and Wiedmann, M. Ecology and Transmission of *Listeria monocytogenes* Infecting Ruminants and in the Farm Environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004; 70(8):4458 – 4467.

Nyysönen, T., Hirvelä-Koski, V., Norberg, H. Nieminen, M. Septicaemic listeriosis in reindeer calves – a case report. *Rangifer*, 26 (1), 2006. p. 25 – 28,

Oevermann, A. - Zurbriggen, A. - Vandeveld, M.: Rhombencephalitis Caused by *Listeria monocytogenes* in Humans and Ruminants: A Zoonosis on the Rise? *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. Volume 2010, Article ID 632513, 22 pages.

Ogunmodede, F. - Jones, J.L. - Scheftel, J. - Kirkland, E. - Schulkin, J. - Lynfield, R.: "Listeriosis prevention knowledge among pregnant women in the USA," *Infectious Disease in Obstetrics and Gynecology*, vol. 13, no. 1, pp. 11–15, 2005.

Oliver, S.P. – Jayarao, B.M. - Almeida, R.A. Foodborne pathogens, mastitis, milk quality, and dairy food safety. NMC Annual Meeting

Proceedings (2005). www.nmconline.org/articles/MilkQualFoodSafety.pdf návštěva 10. 8. 2015.

Orta-Ramirez, A. - Marks, B.P. - Warsaw, Ch. R. - Booren, A.M. - Ryser, E.T.: Enhanced Thermal Resistance of *Salmonella* in Whole Muscle Compared to Ground Beef. Vol. 70, Nr. 7, 2005, *Journal of food science*.

Pasquarella, C., Pitzurra, O., Savino, A. The index of microbial air contamination. *Journal of Hospital Infection* 2000;46:241- 256.

Peiris, W.I.P.: *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. Swedish University of Agricultural Sciences. Masters thesis. Uppsala, 2005. 1-47 p.

Phan-Thanh, L. – Montagne, A.: Physiological and biochemical aspects of the acid survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 44, 183–191 (1998).

Pontello, M. – Guaita, A. - Sala, G. - Cipolla, M. - Gattuso, A. - Sonnessa, M. - Gianfranceschi, M.V.: *Listeria monocytogenes* serotypes in human infections (Italy, 2000-2010). *Ann Ist Super Sanità* 2012. Vol. 48, No. 2: 146-150.

Raccach, M. and R.L. Henrickson. 1979. Microbial aspects of mechanical tenderization of beef. *J. Food Prot.* 42:971-973.

Raicevic, V., Kljujev, I., Petrovic, J., 2010. Microbial contamination of irrigation water,

fruits and vegetables. www.cropwat.agrif.bg.ac.rs

Ramachandraiah, K. - Han, S. G. - Chin, K.B.: 2015. Nanotechnology in Meat Processing and Packaging: Potential Applications – A Review. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* Vol. 28, No. 2 : 290-302.

Reij, M.W. - Den Aantrekker, E.D.: 2004. Review article. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*. 91. 1–11.

Ribet, D. - Cossart, P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes and Infection* 17 (2015) 173-183.

Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Technical report. WHO / FAO 2004. jemra@fao.org

Rocourt, J. - Bille, J.Ch. 1997. *Human Listeriosis 1991-1992*. WHO/FNU/FOS/97.1, World Health Organization, Geneva, 47 pp.

Rocha, M. – Ferreira, F.A. – Souza, M.M. – Prentice, C.: Antimicrobial films: a review. 2013. www.formatex.info/microbiology4/vol1/23-31.pdf

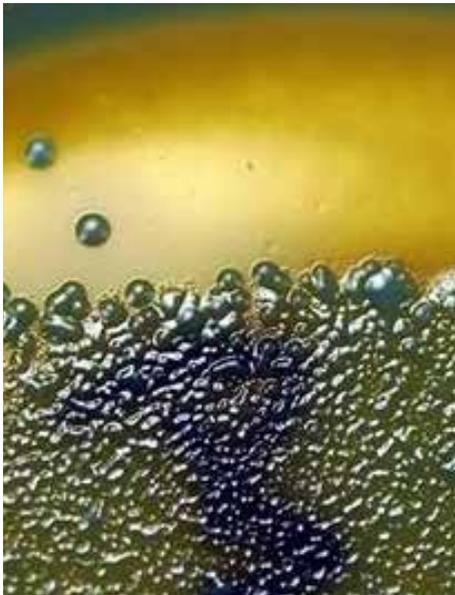
Salas, B.V. - Wiener, M.S. - Stoytcheva, M. - Zlatev, R. - Beltran, M.C.: 2012. Corrosion in the Food Industry and Its Control. www.cdn.intechopen.com/pdfs/29168/In-

- Tech-corrosion_in_the_food_industry_and_its_control.pdf
- Salo, S., Laine, A., Alanko, T., Sjöberg, A. M., Wirtanen, G. Validation of the Microbiological Methods Hygicult Dipslide, Contact Plate, and Swabbing in Surface Hygiene Control: A Nordic Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 2000;(83)6:1357–1366.
- Sarkar, S. K., and C. T. Phan. 1979. Naturally-occurring and ethylene-induced phenolic compounds in carrot root. *J. Food Prot.* 42:526-534. www.cropwat.agrif.bg.ac.rs
- Sharma, M. – Anand, S. K. Swarming: A coordinated bacterial activity. *Current science*, 2002;Vol. 83, No. 6, p. 707-715.
- Sheen, S.: Modeling Surface Transfer of *Listeria monocytogenes* on Salami during Slicing Vol. 73, Nr. 6, 2008. *Journal of food science*. 1-8 p.
- Sheffield, C.L. – Crippen, T.L.: 2012. Invasion and Survival of Salmonella in the Environment: The Role of Biofilms. http://cdn.intechopen.com/pdfs/26447/InTech-Invasion_and_survival_of_salmonella_in_the_environment_the_role_of_biofilms.pdf
- Schuchat, A. - Swaminathan, B. - Broome, C.V. Epidemiology of Human Listeriosis. *Clinical microbiology reviews*, Apr. 1991, Vol. 4, No. 2, p. 169-183.
- Sinha, R.P. – Häder, D.P.: UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, 1, 225–236.
- Sleator, R.D. - Watson, D. - Hill, C. - Gahan, C.G.M.: The interaction between *Listeria monocytogenes* and the host gastrointestinal tract. *Microbiology* (2009), 155, 2463–2475.
- Schneider, K.R. - Goodrich, R.M. - Sampath, D. 2008. Preventing Foodborne Illness: Listeriosis. www.ecosafeusa.com/documents/Ozone%20Documentation/ListeriaB/Listeria%20Temperature%20B.pdf
- Smith, L.T. (1996) Role of osmolytes in adaptation of osmotically stressed and chill-stressed *Listeria monocytogenes* grown in liquid media and on processed surfaces. *Applied Environmental Microbiology* 62, 3088–3093.
- Stiles, M.E. - Holzapfel, W.H.: Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36, 1-29, 1997.
- Swaminathan, B., 2001. Foodborne pathogenic bacteria: *Listeria monocytogenes*, In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC, pp. 337–352.
- Takeuchi, K. - Frank, J.F.. Direct Microscopic Observation of Lettuce Leaf Decontamination with a Prototype Fruit and Vegetable Washing Solution and 1% NaCl-NaHCO₃. Research Note. *Journal of Food Protection*, Vol. 64, No. 8, 2001, Pages 1235–1239.
- The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 2015;13(1):3991.
- The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4634>
- Thomas, M.T. - Vriezen, R. - Farber, J.M. – Currie, A. - Schlech, W. – Fazil, A. 2015. Economic Cost of a *Listeria monocytogenes* Outbreak in Canada 2008. *Foodborne pathogens and disease* Volume 12, Number 12. 966 – 971.
- Tiwari, R. - Karthik, K. - Rana, R. - Malik, Y.S. - Dhama, K. - Joshi, S.S.: 2016. Quorum Sensing Inhibitors/antagonists Countering Food Spoilage Bacteria-need Molecular and Pharmaceutical Intervention for Protecting Current Issues of Food Safety. *International Journal of Pharmacology*, 12: 262-271.
- Votava, M.: Lékařská mikrobiologie obecná. Vydal Neptun 2001, Brno. 1- 247.
- Van Houdt, R. - Michiels, C.W.: Biofilm formation and the bacterial outer surface. 2010. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072. 1-15.
- www.flandersfood.com/sites/default/files/Biofilm%20formation%20and%20the%20food%20industry,%20a%20focus%20on%20the%20bacterial%20outer%20surface.pdf
- Van Renterghem, B. - Huysman, F. - Rygole, R. - Verstraete, W.: Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem. *Journal of Applied Bacteriology* 1991, 71, 211-217.
- Warriner, K. – Namvar, A.: What is the hysteria with *Listeria*? *Trends in Food Science & Technology*, 20. 2009. 245 – 254 p.
- Weis, J.Seeliger, H. P. R. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl. Microbiol.* 1975; 30: 29 - 32.
- Wirtanen, G. - Miettinen, H. - Pakkala, S. - Enbom, S. - Vanne, L. Clean air solutions in food processing. Espoo 2002. VTT Publications 482. 95 p.
- Wong, E. – Linton, R. H. – Gerrard, D. E.: 1998: Reduction of *Escherichia coli* and *Salmonella senftenberg* on pork skin and pork muscle using ultraviolet light. *Food microbiology* 15, 415-423.
- Yadav, M.: - Roy, A. - Bhandari, B. - Joshi, Ch.: Pheno-genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* from bovine clinical mastitis. *Buffalo Bulletin* (March 2010) Vol.29 No.1. 29 -38.

Zdolec, N. – Hadžiosmanović, M. – Kozačinski, L. – Cvrtila, Ž. – Filipović, I. – Škrivanko, M. 2008. Influence of protective cultures on *Listeria monocytogenes* in fermented sausages: a review. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 59, 60–64.

Zhang, G. - Ma, L. - Oyarzabal, O.A. – Doyle, M.P.: Aerosol Studies with *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, Vol. 70, No. 8, 2007, Pages 1857–1865.

Zundel, E., Bernard, S.: *Listeria monocytogenes* translocates throughout the digestive tract in asymptomatic sheep. *Journal of Medical Microbiology* 2006; 55: 1717 - 1723.

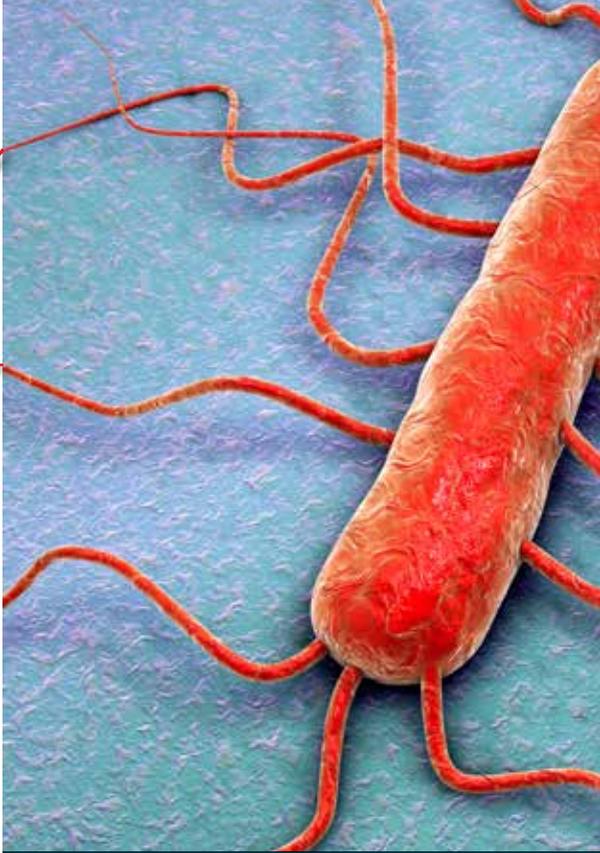
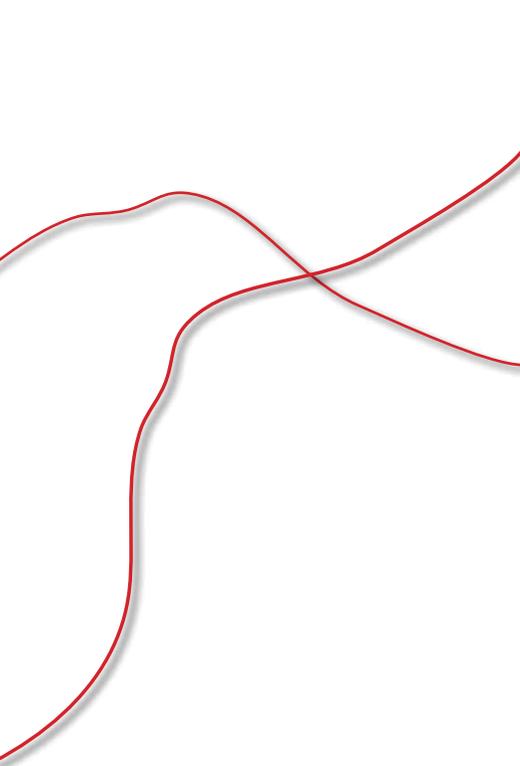


ANONYMOUS:

- 1) [www.bio.libretexts.org/TextMaps/Map%3A_Microbiology_\(OpenStax\)/09%3A_Microbial_Growth/9.4%3A_Temperature_and_Microbial_Growth](http://www.bio.libretexts.org/TextMaps/Map%3A_Microbiology_(OpenStax)/09%3A_Microbial_Growth/9.4%3A_Temperature_and_Microbial_Growth)
- 2) www.mhhe.com/prescottprinciples
- 3) www.fzp.ujep.cz/~trogl/3Rozmnzovani.pdf
- 4) www.cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/
- 5) www.foodauthority.nsw.gov.au/pregnancy
- 6) www.cs.wikipedia.org/wiki/Smrteln%C3%A1_d%C3%A1vka
- 7) www.media.corporate-ir.net/media_files/irol/88/88490/Listeria%20Customer%20Fact%20Sheet%20OC09%2008-Final.pdf
- 8) www.foodstandards.gov.au/code/proposals/documents/P1007%20PPPS%20for%20raw%20milk%201AR%20SD1%20Cow%20milk%20Risk%20Assessment.pdf. Accessed 21 June 2010.
- 9) FAO/WHO 2004 (Anon., 29)
- 10) www.bezpecnostpotravin.cz
- 11) *EFSA Journal* 2015;13(1):3991
- 12) What is the hysteria with *Listeria*? (PDF Download Available). Available from: https://www.researchgate.net/publication/248485594_What_is_the_hysteria_with_Listeria [accessed Mar 29, 2017].
- 13) www.fda.gov/downloads/Advisory-Committees/CommitteesMeeting-Materials/FoodAdvisoryCommittee/UCM472845.pdf
- 14) www.researchgate.net/publication/11907748_Listeria_Pathogenesis_and_Molecular_Virulence_Determinants [accessed Mar 31, 2017].
- 15) www.foodauthority.nsw.gov.au/pregnancy
- 16) www.link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4614-1177-2_2#page-1. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1231091/
- 17) www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.07_LISTERIA_MONO.pdf Návštěva 16. 8. 2015
- 18) www.cfs.gov.hk/english/whatsnew/whatsnew_act/files/VPH_Workshop_2015/E_Martin_WIEDMANN.pdf
- 19) www.omafra.gov.on.ca/english/food/inspection/meatinsp/controllinglisteria.htm
- 20) www.health.state.mn.us/handhygiene/why/5ways.html
- 21) www.cs.wikipedia.org/wiki/Aerosol
- 22) www.enviwiki.cz/wiki/Bioaerosol
- 23) www.uniconsulting.cz/download/ucebni-text/Zasady_spravne_vyrobnihygienicke_praxe.pdf
- 24) www.employeesafety.pork.org/content/Additional%20Resources/Handwashing%20and%20General%20Employee%20Hygiene.pdf
- 25) www.nbbcfod.info/foodmatters/business/pdfs/handwashingpresentation03.pdf
- 26) www.scialert.net/abstract/?doi=pjbs.2013.301.308
- 27) www.scialert.net/abstract/?doi=pjbs.2013.301.308
- 28) www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/EU-summary-report-trends-sources-zoonoses-2015.pdf
- 29) www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/UCM197329.pdf
- 30) www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/UCM197329.pdf
- 31) www.zakonyprolidi.cz/print/cs/2016-69/zneni-20160801.htm
- 32) www.cmc-cvc.com/sites/default/files/files/EwenTodd.pdf
- 33) www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/2014-16-Risk-Profile-Listeria-monocytogenes-in-Raw-Milk.pdf
- 34) *Listeria and pregnancy* The foods you should avoid and why January 2014 NSW/FA/CE053/1401
- 35) www.doiserbia.nb.rs/img/doi/1450-9156/2011/1450-91561103067K.pdf
- 36) www.fda.gov/downloads/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofGlobalRegulatoryOperationsandPolicy/ORA/ORAElectronicReadingRoom/UCM445811.pdf

- 37) www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html.
- 38) www.foodauthority.nsw.gov.au/pregnancy
- 39) Hellström, S. Contamination routes and control of *Listeria monocytogenes* in food production. ACADEMIC DISSERTATION.
<https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/27420/contamin.pdf?sequence=1>
ukp.vscht.cz/files/uzel/0007647/HP+text.pdf.
- 41) www.scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-07292002-153950/unrestricted/jfood-prot.pdf
- 42) www.foodauthority.nsw.gov.au/_Documents/foodsafetyandyou/listeria_and_pregnancy.pdf
- 43) www.czvp.szu.cz/vedvybor/dokumenty/informace/Info_2006_16_deklas_Probio_SK.pdf
- 44) www.cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/kamenik-skripta-web.pdf
- 45) Microwave Ovens and Food Safety.
www.fsis.usda.gov/shared/PDF/Microwave_Ovens_and_Food_Safety.pdf
- 46) Principles of Preservation of Shelf-Stable Dried Meat Products 5/11/05
meathaccp.wisc.edu/validation/assets/Principles%20for%20preservation.pdf
- 47) www.newscientist.com/article/dn12752-microbes-can-survive-deep-freeze-for-100000-years/
- 48) www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/ucm094145.htm
- 49) old-biomikro.vscht.cz/vyuka/bm/Typy_stresu.pdf
- 50) jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-70.4.952?code=fopr-site
- 51) www.u-cursos.cl/faciqyf/2010/1/FBQI4108/1/material_docente/previsualizar?id_material=560376
- 52) www.fedoa.unina.it/2012/1/La_Storia_Scienze_Tecnologie_Produzioni_Agro-Alimentari.pdf
- 53) www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/publikace/P%C5%99%C3%ADdatn%C3%A9%20l%C3%A1tky%20v%20potravin%C3%A1ch%20PK.pdf
- 54) www.kgv.zf.jcu.cz/upload/Prezentace/JKkgv-UNC/14_prednaska_toxicke_latky_aditiva.pdf
- 55) www.scribd.com/doc/15620509/lab-05-Effect-of-UV-Radiation-on-bacteria
- 56) www.theses.lib.vt.edu/theses/available/etd-05272004-181730/unrestricted/p.1-49.pdf
- 57) Montana State University, <http://www.biofilm.montana.edu/node/2930>
- 58) Formatex, 2015., <http://www.microbiology5.org/microbiology5/book/383-394.pdf>
- 59) www.uweb.engr.washington.edu/research/tutorials/biofilm.html
- 60) www.uweb.engr.washington.edu/research/tutorials/biofilm.html
- 61) efcweb.org/efcweb_media/mechanisms.pdf
- 62) www.springerlink.com/content/r71457n65855w135/
- 63) www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/29d51258-0651-469b-99b8-e986baee8a54/Controlling-LM-Delicatessens.pdf?MOD=AJPERES
- 64) www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/FoodAdvisoryCommittee/UCM472845.pdf
- 65) www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/Koubova/Voditka_L%20monocyt_2012.pdf
- 66) www.archive.senseaboutscience.org/data/files/resources/121/Making-Sense-of-Food-Additives-v8.pdf
- 67) Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods . Technical report. WHO / FAO 2004. jemra@fao.org





Potravinářská komora České republiky

Počernická 96/272, 108 03 Praha 10-Malešice
Telefon: +420 296 411 187
e-mail: foodnet@foodnet.cz
web: <http://www.foodnet.cz>

ISBN: 978-80-88019-31-2