OBSAH

Předmluva **9**

1 ÚVOD **11**

2 MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR POTRAVIN – LEGISLATIVA **12**

2.1 Nařízení EU č. 178/2002 ..... **12**

2.2 Nařízení EU č. 2073/2005 ..... **12**

2.2.1 Kritéria bezpečnosti potravin 13

2.2.2 Kritéria hygieny výrobního procesu 14

2.3 Analýza rizik **14**

2.3.1 Princip HACCP 15

2.4 Standardizace metod v potravinářské mikrobiologii **15**

3 PŮVODCI ALIMENTÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ **17**

3.1 *Bacillus cereus* **17**

3.1.1 Úvod 17

3.1.2 Izolace a identifikace 17

3.1.3 Vazba na potraviny 18

3.2 *Campylobacter* spp. **18**

3.2.1 Úvod 18

3.2.2 Izolace a identifikace 18

3.2.3 Vazba na potraviny 19

3.3 *Clostridium perfringens* **19**

3.3.1 Úvod 19

3.3.2 Izolace a identifikace 19

3.3.3 Vazba na potraviny 20

3.4 *Cronobacter* (*Enterobacter*) *sakazakii* **20**

3.4.1 Úvod 20

3.4.2 Izolace a identifikace 20

3.4.3 Vazba na potraviny 21

3.5 *Enterobacteriaceae* a koliformní bakterie **21**

3.5.1 Úvod 21

3.5.2 Izolace a identifikace 22

3.5.3 Vazba na potraviny 22

3.6 *Escherichia coli* **22**

3.6.1 Úvod 22

3.6.2 Izolace a identifikace 23

3.6.3 Vazba na potraviny 23

3.7 *Listeria monocytogenes* **23**

3.7.1 Úvod 23

3.7.2 Izolace a identifikace 24

3.7.3 Vazba na potraviny 24

3.8 *Salmonella* spp. **25**

3.8.1 Úvod 25

3.8.2 Izolace a identifikace 25

3.8.3 Vazba na potraviny 25

3.9 *Shigella* spp. **26**
3.9.1 Úvod 26
3.9.2 Izolace a identifikace 26
3.9.3 Vazba na potraviny 26
3.10 *Staphylococcus aureus* **26**
3.10.1 Úvod 26
3.10.2 Izolace a identifikace 27
3.10.3 Vazba na potraviny 27
3.11 *Yersinia enterocolitica* **28**
3.11.1 Úvod 28
3.11.2 Izolace a identifikace 28
3.11.3 Vazba na potraviny 28
3.12 Viry přenášené potravinami (enterické viry) **28**
3.12.1 Norwalk-like viry 29
3.12.2 Rotaviry 29
3.12.3 Astroviry 29
3.12.4 Viry hepatitidy 29
3.13 Kvasinky a plísně **30**

4 ZÁKLADNÍ PRINCIPY MIKROBIOLOGICKÉ ANALÝZY POTRAVIN KULTIVAČNÍMI METODAMI **31**
4.1 Příprava a odběr vzorku **31**
4.1.1 Voda 31
4.1.2 Potraviny 32
4.2 Zpracování vzorků potravin **34**
4.2.1 Odběr navážky 34
4.2.2 Příprava výchozí suspenze 34
4.2.3 Příprava řady ředění 34
4.3 Kvalitativní analýza **34**
4.4 Kvantitativní analýza **35**
4.5 Stanovení nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů (MPN) **37**
4.5.1 Princip metody MPN 37
4.6 Izolační techniky **38**
4.6.1 Izolace čárkováním 38
4.6.2 Izolace roztěrem 38
4.6.3 Izolace přelivem 38
4.6.4 Metoda membránové filtrace 39
4.7 Kultivační média **40**
4.7.1 Základní (obecné) kultivační půdy 40
4.7.2 Speciální kultivační půdy 40
4.7.2.1 Obohacené 41
4.7.2.2 Selektivní 41
4.7.2.3 Diferenciační ~ diagnostické (selektivně-diagnostické) 41
4.7.2.4 Chromogenní média – vysoce diferenciační selektivní média 42
4.7.2.5 Půdy k anaerobní kultivaci 42
4.7.3 Inkubace 42
4.8 Kontrola kvality a kontrolní kmeny **43**
4.9 Vyjádření výsledků a nejistota **44**
4.9.1 Výsledky metod průkazu 44

4.9.2 Výsledky metod stanovení počtu za použití tuhých půd ... 44
4.9.2.1 Počítání kolonií ... 44
4.9.2.2 Metody výpočtu - obecná pravidla ... 45
4.9.2.3 Metody výpočtu - standardní počty ... 46
4.9.2.4 Metody výpočtu - nízké počty ... 48
4.9.2.5 Metoda výpočtu - vysoké počty ... 48
4.9.3 Výsledky metody stanovení počtu za použití tekutých půd (MPN) ... 49
4.9.4 Stanovení nejistoty měření ... 51

5 TRADIČNÍ METODY IDENTIFIKACE A KONFIRMACE MIKROORGANISMŮ A RYCHLÉ METODY STANOVENÍ ... 54
5.1 Biochemické metody ... 54
5.1.1 Princip biochemické identifikace mikroorganismů ... 54
5.1.2 Postup biochemické identifikace mikroorganismů ... 56
5.2 Imunochemické metody ... 58
5.2.1 ELISA ... 59
5.2.2 LFIA ... 60
5.3 Polymerázová řetězová reakce a její využití v potravinářské mikrobiologii ... 61
5.3.1 Detekce pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) ... 61
5.3.2 Kvantifikace pomocí polymerázové řetězové reakce (qPCR) ... 62
5.4 Identifikace mikroorganismů metodou MALDI-TOF MS ... 63
5.4.1 Princip metody ... 63
5.4.2 Identifikace mikroorganismů metodou MALDI-TOF MS ... 64

6 MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR PITNÉ VODY ... 68
6.1 Mikrobiologické ukazatele jakosti vody ... 68
6.1.1 Pitná voda ... 68
6.1.2 Balená voda ... 69
6.2 Význam mikroorganismů z hlediska hygieny vody ... 70
6.2.1 Koliformní bakterie ... 70
6.2.2 Enterokoky ... 70
6.2.3 Mikroorganismy kultivovatelné při 22 °C a 36 °C ... 70
6.2.4 *Clostridium perfringens* ... 71
6.2.5 *Legionella* spp. ... 71

7 LABORATORNÍ METODY ... 72
7.1 Stanovení celkového počtu mikroorganismů ... 72
7.1.1 Norma ... 72
7.1.2 Kultivační média a princip stanovení ... 72
7.1.2.1 Plotnová půda na počítání kolonií (Plate Count Agar, PCA) ... 72
7.1.3 Postup stanovení celkového počtu buněk mikroorganismů ... 72
7.1.4 Vyjádření výsledků ... 73
7.2 Stanovení čeledi *Enterobacteriaceae* ... 73
7.2.1 Norma ... 73
7.2.2 Kultivační média a princip stanovení ... 73
7.2.2.1 Půda s violetí, methylovou červení, žlučí a glukózou (VČŽG) ... 73
7.2.3 Postup kvantitativního stanovení čeledi *Enterobacteriaceae* ... 74
7.2.4 Konfirmace čeledi *Enterobacteriaceae* ... 75
7.2.4.1 Potvrzení cytochromoxidázy ... 75
7.2.4.2 Zkvašování glukózy ... 75

7.2.5 Zhodnocení ... 76
7.2.6 Vyjádření výsledků ... 76
7.2.7 Identifikace jednotlivých zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* metodou MALDI-TOF MS ... 76
7.2.7.1 Postup identifikace ... 76
7.2.7.2 Zhodnocení ... 77
7.2.7.3 Vyjádření výsledků ... 77
7.3 Stanovení počtu β-glukuronidázopozitivních *Escherichia coli* technikou počítání kolonií ... 77
7.3.1 Norma ... 77
7.3.2 Kultivační média a princip stanovení ... 78
7.3.2.1 Agar s tryptonem, žlučovými solemi a glukuronidem (Tryptone Bile X-glucuronide Agar, TBX) ... 78
7.3.3 Postup stanovení počtu β-glukuronidázopozitivních *E. coli* ... 78
7.3.4 Zhodnocení ... 79
7.3.5 Vyjádření výsledků ... 79
7.4 Stanovení počtu β-glukuronidázopozitivních *Escherichia coli* technikou nejvýše pravděpodobného počtu (MPN) ... 79
7.4.1 Norma ... 79
7.4.2 Kultivační média a princip stanovení ... 80
7.4.2.1 Modifikovaná glutamanová půda s minerální složkou (selektivní pomnožovací půda) ... 80
7.4.3 Postup stanovení počtu β-glukuronidázopozitivních *E. coli* metodou MPN .. 80
7.4.4 Zhodnocení ... 81
7.4.5 Vyjádření výsledků ... 81
7.5 Stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků ... 85
7.5.1 Norma ... 85
7.5.2 Kultivační média a princip stanovení ... 85
7.5.2.1 Agarová půda podle Baird-Parkera (BP) ... 85
7.5.3 Postup stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků ... 86
7.5.4 Konfirmace koagulázovým testem ... 87
7.5.5 Zhodnocení ... 87
7.5.6 Vyjádření výsledků ... 87
7.6 Stanovení počtu presumptivních *Bacillus cereus* ... 88
7.6.1 Norma ... 88
7.6.2 Kultivační média a princip stanovení ... 88
7.6.2.1 Komplexní MYP agar (Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar, MYP) ... 88
7.6.3 Postup kvantitativního stanovení *Bacillus cereus* ... 89
7.6.4 Konfirmace průkazem β-hemolýzy ... 89
7.6.5 Zhodnocení ... 90
7.6.6 Vyjádření výsledků ... 90
7.7 Průkaz *Listeria monocytogenes* ... 90
7.7.1 Norma ... 90
7.7.2 Kultivační média a princip stanovení ... 90
7.7.2.1 Bujon podle Frasera (Fraser) ... 91
7.7.2.2 Agar pro listerie podle Ottavianiho a Agostiho (ALOA médium) ... 91
7.7.3 Postup průkazu *Listeria monocytogenes* ... 92
7.7.4 Biochemická konfirmace *L. monocytogenes* ... 93
7.7.4.1 API *Listeria* test ... 93

7.7.4.2 RAPID'*L.mono* agar 93
7.7.4.3 Potvrzení *L. monocytogenes* CAMP testem 93
7.7.5 Zhodnocení 94
7.7.6 Vyjádření výsledků 95
7.8 Stanovení počtu *Listeria monocytogenes* 95
7.8.1 Norma 95
7.8.2 Kultivační média a princip stanovení 95
7.8.3 Postup kvantitativního stanovení *Listeria monocytogenes* 96
7.8.4 Vyjádření výsledků 97
7.9 Průkaz bakterií rodu *Salmonella* 98
7.9.1 Norma 98
7.9.2 Kultivační média a princip stanovení 98
7.9.2.1 Půda podle Rappaporta a Vassiliadise se sójou (RVS) 98
7.9.2.2 Muller-Kauffmannův bujon s tetrathionátem a novobiocinem (MKTTn) 98
7.9.2.3 Agar s xylózou, lyzinem a deoxycholanem (XLD) 99
7.9.2.4 Agar s brilantovou zelení (Brilliant-green agar, BGA) 100
7.9.3 Postup průkazu bakterií rodu *Salmonella* 100
7.9.4 Biochemické potvrzení průkazu *Salmonella* spp. 101
7.9.5 Imunochemický test Singlepath *Salmonella* 101
7.9.6 Zhodnocení 101
7.9.7 Vyjádření výsledků 102
7.10 Průkaz *Enterobacter sakazakii* (nyní *Cronobacter* spp.) 102
7.10.1 Norma 102
7.10.2 Kultivační média a princip stanovení 102
7.10.2.1 Modifikovaná laurylsulfát tryptózová půda (mLST) s vankomycinem 102
7.10.2.2 *Enterobacter sakazakii* izolační agar (ESIA) 103
7.10.2.3 Sójový agar s tryptonem (TSA) 103
7.10.2.4 Média pro průkaz utilizace aminokyselin 103
7.10.2.5 Půdy pro fermentaci cukrů 104
7.10.2.6 Simmons citrátová půda 104
7.10.3 Postup průkazu *Cronobacter* spp. 104
7.10.4 Potvrzení průkazu *Cronobacter* spp. 105
7.10.4.1 Konfirmace průkazem oxidázy 105
7.10.4.2 Konfirmace utilizací aminokyselin 106
7.10.4.3 Konfirmace fermentací cukrů 106
7.10.4.4 Konfirmace využitím citrátu 106
7.10.5 Zhodnocení 106
7.10.6 Vyjádření výsledků 107
7.11 Metoda průkazu *Campylobacter* spp. 107
7.11.1 Norma 107
7.11.2 Kultivační média a princip stanovení 107
7.11.2.1 Bujon podle Boltona (Bolton) 107
7.11.2.2 Modifikovaný dezoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem (mCCD agar) 108
7.11.2.3 Krevní agar Columbia 108
7.11.2.4 Bujon pro brucely 109
7.11.2.5 Krevní agar podle Muellera a Hintona (krevní Mueller-Hinton) 109
7.11.3 Postup průkazu a technika počítání kolonií u *Campylobacter* spp. 109
7.11.4 Potvrzení průkazu *Campylobacter* spp. 111
7.11.4.1 Konfirmace pomocí morfologie a pohyblivosti 111

7.11.4.2 Konfirmace pomocí růstových charakteristik 111
7.11.4.3 Konfirmace průkazem oxidázy 112
7.11.5 Zhodnocení 112
7.11.6 Identifikace druhů rodu *Campylobacter* 112
7.11.6.1 Průkaz katalázy 112
7.11.6.2 Průkaz hydrolýzy hippurátu 113
7.11.6.3 Průkaz hydrolýzy indoxyl acetátu 113
7.11.6.4 Zjišťování citlivosti ke kyselině nalidixové a cephalothinu 114
7.12 Stanovení počtu plísní a kvasinek 114
7.12.1 Norma 114
7.12.2 Kultivační média a princip stanovení 115
7.12.2.1 Chloramfenikolový agar s dichloranem a bengálskou červení (DRBC agar) 115
7.12.2.2 Dichloran glycerolový agar (DG18) 115
7.12.3 Postup stanovení počtu kvasinek a plísní 115
7.12.4 Zhodnocení 116
7.12.5 Vyjádření výsledků 116
7.13 Mikrobiologický rozbor pitné vody 117
7.13.1 Princip analýzy kontaminantů pitné vody 117
7.13.1.1 Typy rozborů 117
7.13.1.2 Inokulace 117
7.13.2 Stanovení koliformních bakterií a *E. coli* 118
7.13.2.1 Postup stanovení 119
7.13.2.2 Vyjádření výsledků 119
7.13.3 Stanovení intestinálních enterokoků 119
7.13.3.1 Postup stanovení 120
7.13.3.2 Vyjádření výsledků 120
7.13.4 Stanovení *Clostridium perfringens* 121
7.13.4.1 Postup stanovení 121
7.13.4.2 Vyjádření výsledků 121
7.13.5 Stanovení kultivovatelných mikroorganismů 122
7.13.5.1 Postup stanovení 122
7.13.5.2 Vyjádření výsledků 122