

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2016

VLADISLAV STRMISKA



**Stanovení reziduí inhibičních látek v mase drůbeže
screeningovými metodami**
Diplomová práce

Vedoucí práce:
MVDr. Olga Cwиковá, Ph.D.

Vypracoval:
Bc. Vladislav Strmiska

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: „*Stanovení reziduí inhibičních látek v mase drůbeže screeningovými metodami*“ vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji MVDr. Olze Cwиковé, PhD. za odborné vedení, cenné rady a ochotu při vypracování diplomové práce.

ABSTRAKT

Podle Nařízení Komise Evropská unie (EU) č. 37/2010 je stanoven maximální limit reziduí antibiotik v drůbežím mase. Konzumace potravin, které obsahují nadměrné množství reziduí antibiotik, může vyvolat rezistenci některých kmenů mikroorganismů vůči určitým skupinám antibiotik, hypersenzitivní reakce a zničení přirozené střevní mikroflóry. Tato studie je zaměřena na posouzení reziduí antibiotik v drůbežím mase screeningovou metodou Premi® Test (R-Biopharm AG, Německo). Byla také hodnocena mikrobiologická kontaminace drůbežího masa, se zaměřením na různé skupiny mikroorganismů v závislosti na původu drůbeže, podmínkách skladování a anatomické části. Z mikrobiologických ukazatelů byl stanoven celkový počet mikroorganismů, počet psychrotrofních mikroorganismů, *E. coli*, koliformních mikroorganismů, plísní a kvasinek. Vzorky pocházely z České republiky a EU. Maso bylo chlazené a mrazené, jednalo se o prsní a stehenní svalovinu.

Klíčová slova: *rezidua veterinárních léčiv, antibiotika, mikrobiologie, drůbeží maso, kuřecí maso*

ABSTRACT

The Commission Regulation European Union (EU) no. 37/2010 laid down the maximum amount of antibiotics in poultry meat. Consuming foods that contain excessive amount of antibiotic residues may cause resistance of certain strains of microorganisms towards certain groups of antibiotics, hypersensitive reactions and destruction the natural intestinal microflora. This study aimed to the assessment of antibiotic residues in poultry meat by screening method Premi® Test (R-Biopharm AG, Germany). We also determined the microbiological contamination in poultry meat that aimed at different groups of microorganisms depending on the origin of poultry, storage and anatomical parts. The groups of microorganisms were evaluated by the total viable count, count psychrotrophic microorganisms, *E. coli*, coliform microorganisms, fungi and yeasts. The samples came from the Czech Republic and the EU. The meat was chilled and frozen, breast and thigh muscle.

Key words: *residues of veterinary drugs, antibiotics, microbiology, poultry meat, chicken*

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	CÍL	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1	POUŽITÍ VETERINÁRNÍCH LÉČIV V CHOVU DRŮBEŽE	11
3.2	STANOVENÍ REZIDUÍ INHIBIČNÍCH LÁTEK V MASE DRŮBEŽE .	11
3.2.1	Fyzikálněchemické metody stanovení reziduí veterinárních léčiv v mase drůbeže	12
3.2.1.1	Chromatografie na tenké vrstvě	12
3.2.1.2	Kapalinová chromatografie.....	12
3.2.1.3	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	12
3.2.1.4	Ultraúčinná kapalinová chromatografie.....	13
3.2.1.5	Elektrosprejová ionizace	13
3.2.2	Imunologické screeningové metody	13
3.2.2.1	ELISA	13
3.2.2.2	Dipstick.....	14
3.2.2.3	Bio senzory	14
3.2.3	Mikrobiologické metody.....	14
3.2.3.1	Čtyřplotnová metoda.....	15
3.2.3.2	Dvouplotnová metoda.....	16
3.2.3.3	Nouws Antibiotic Test (NAT)	16
3.2.4	Screeningové metody.....	17
3.2.4.1	Explorer® test.....	17
3.2.4.2	Premi® Test	17
3.3	MIKROBIOLOGIE DRŮBEŽÍHO MASA.....	19
3.4	VLIV TECHNOLOGICKÉHO OPRACOVÁNÍ NA MIKROBIOLOGICKOU JAKOST DRŮBEŽÍHO MASA.....	20
3.4.1	Omračování.....	20
3.4.1.1	Elektrické omračování	20
3.4.1.2	Omračování plynem.....	21
3.4.1.3	Mechanické omračování	21
3.4.2	Porážka.....	21
3.4.3	Vykrvení	21

3.4.4	Paření	22
3.4.5	Škubání	23
3.4.6	Eviscerace	23
3.4.6.1	Čištění JUT a dekontaminace	24
3.4.7	Chlazení	24
3.4.8	Porcování a balení.....	24
3.5	VÝZNAMNÉ MIKOORGANISMY DRŮBEŽÍHO MASA	25
3.5.1	Bakterie rodu <i>Salmonella</i>	25
3.5.2	Bakterie rodu <i>Yersinia</i>	26
3.5.3	Bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	27
3.5.4	Bakterie rodu <i>Clostridium</i>	27
3.5.5	Bakterie rodu <i>Listeria</i>	28
3.5.6	Bakterie <i>Escherichia coli</i>	29
3.5.7	Bakterie rodu <i>Campylobacter</i>	29
4	MATERIÁL A METODIKA	31
4.1	Materiál.....	31
4.1.1	Stanovení reziduí veterinárních léčiv	31
4.1.2	Mikrobiologická analýza	31
4.2	Metody	32
4.2.1	Přístrojové vybavení	32
4.2.2	Premi® Test.....	32
4.2.3	Mikrobiologická analýza	33
4.2.4	Příprava živných pŮd	33
4.2.4.1	Plate Count Agar (PCA)	34
4.2.4.2	Plate Count Agar with skimmed milk (PCA)	34
4.2.4.3	Dichloran Bengal Rose Chloramphenicol agar	35
4.2.4.4	ChromoCult® Coliform agar	36
4.2.5	Vyjádření výsledků	37
4.2.6	Statistické metody.....	37
5	VÝSLEDKY	38
5.1	Rezidua veterinárních léčiv	39
5.2	Mikrobiální kontaminace s ohledem na původ kuřecího masa.....	43

5.3	Mikrobiální kontaminace v závislosti na způsobu skladování	44
5.4	Mikrobiální kontaminace v závislosti na anatomické části kuřete	46
6	DISKUSE	48
7	ZÁVĚR	53
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	55
9	SEZNAM TABULEK	62
10	SEZNAM ZKRATEK	63
11	PŘÍLOHY	65
12	SEZNAM PŘÍLOH	71

1 ÚVOD

Rezidua inhibičních látek, jsou zbytková množství veterinárních léčiv. Ty jako kontaminanty přecházejících z krmiv do jatečně opracovaných těl drůbeže. V chovech se používají jako terapeutické prostředky pro léčení nálezů, nebo jako preventivní prostředky podávané v subterapeutických dávkách. Nedodržením ochranných lhůt dochází ke kontaminaci potravin rezidui těchto látek a potravina tak nemůže být nabízena k prodeji. Stanovení těchto reziduí screeningovými metodami je rychlý a účinný postup jejich detekce v souladu s hodnotami maximálních limitů reziduí stanovených Evropskou komisí.

Konzumace potravin s překročenými hodnotami maximálních limitů reziduí veterinárních léčiv může vést k vývoji rezistence proti antibiotikům, porušení přirozené střevní mikroflóry, nebo přecitlivělé reakci u citlivých jedinců.

Drůbeží maso je mikrobiologicky citlivá komodita, která díky nízké aciditě, vysoké aktivitě vody a přístupu živin je vhodným prostředím pro růst a množení mikroorganismů. Mikrobiologické hodnocení drůbežího masa má význam pro posuzování přenosu patogenních mikroorganismů na člověka. Dále jako posouzení míry fekálního znečištění během procesu opracování jatečných těl a čistoty výrobního zařízení. Řízením systému kritických kontrolních bodů a dodržováním správné výrobní a hygienické praxe je možné dosáhnout kvalitního a bezpečného produktu.

2 CÍL

Cílem práce bylo vypracování literární rešerše o problematice výskytu a stanovení reziduí inhibičních látek a vybraných skupin mikroorganismů v mase drůbeže. Zaměřit se přitom na stanovení reziduí antibiotik screeningovými metodami a současně provést mikrobiologický rozbor u vzorků drůbežího masa. Výsledky následně zpracovat, vyhodnotit a porovnat s legislativou.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 POUŽITÍ VETERINÁRNÍCH LÉČIV V CHOVU DRŮBEŽE

V chovu drůbeže se používají anabolické steroidy, sedativa a antibiotika. Používají se buď jako růstové stimulanty pro zvýšení produkce výtěžků, nebo jako terapeutické prostředky používané k léčbě i prevenci chorob (Hakem, 2013). Antimikrobiální látky se nejčastěji používají při chovu drůbeže pro léčebné účely a jsou podávány v krmivu a vodě. V subterapeutických dávkách se používají pro profylaxi a podporu růstu (Dipeolu a Alonge, 2002). Neuvážené používání a nerespektování ochranných lhůt vede ke kontaminaci potravin (Hakem, 2013). Přítomnost léčiv nebo překročení reziduí antibiotik v potravinách je orgány ochrany veřejného zdraví celosvětově uznáváno jako nelegální (Kempe a Verachtert, 2000) a jejich spotřeba představuje riziko zahrnující: vývoj rezistentních kmenů mikroorganismů, přecitlivělou reakci u citlivých jedinců (Nisha, 2008; Vollard a Clasener, 1994) a narušení střevní mikroflóry (Jones, 1999; Cunha, 2001).

Některá léčiva mají schopnost vytvářet u konzumentů toxické reakce, například clenbuterol. Ostatní druhy léčiv jsou schopny vyvolat alergické nebo hypersenzitivní reakce. Například β -laktamová antibiotika mohou způsobit kožní vyrážku, dermatitidu, gastrointestinální potíže a anafylaxi při velmi nízkých dávkách. Taková léčiva zahrnují penicilin a cefalosporinové skupiny antibiotik (Paige a kol., 1997).

Nepřímé a dlouhodobé nebezpečí zahrnuje mikrobiologické účinky, karcinogenitu, reprodukční toxicitu a teratogenitu. Mikrobiologické účinky jsou jedním z hlavních zdravotních rizik u lidí. Rezidua antibiotik jsou konzumována společně s mlékem, masem a vejci, což může vytvářet rezistenci bakteriálních kmenů v těle konzumenta. To je jeden z hlavních důvodů terapeutického selhání u konzumentů. Určité látky, jako 3-nitrofurán a nitroimidazol mohou způsobit u člověka rakovinu (Novais a kol., 2010).

3.2 STANOVENÍ REZIDUÍ INHIBIČNÍCH LÁTEK V MASE DRŮBEŽE

Ideální charakteristikou screeningových metod je nízká míra zastoupení falešně pozitivních vzorků, vysoká výkonnost, snadné použití, krátká doba analýzy, dobrá selektivita a nízké náklady na analýzu (Cháfer-Pericás a kol., 2010).

3.2.1 Fyzikálněchemické metody stanovení reziduí veterinárních léčiv v mase drůbeže

3.2.1.1 Chromatografie na tenké vrstvě

Chromatografie na tenké vrstvě je citlivá extrakční metoda sloužící pro monitoring malého množství různých biologických a chemických látek. Ozáření proti UV světlu slouží jako jednoduchý detektor (Tajick a Shohrer, 2006).

3.2.1.2 Kapalinová chromatografie

Moretti a kol., (2016) vyvinuli metodu pro zjištění přítomnosti a screening antimikrobiálních reziduí ve svalovině. V této metodě je zahrnuto 62 antibiotik zahrnutých do deseti skupin – amphenicol, β -laktamy, diamino-pyrimidiny, likosamidy, makrolidy, pleuromultiliny, chinolony, rifamyciny, sulfonamidy a tetracykliny. Instrumentální stanovení se provádí kapalinovou chromatografií spojenou v kombinaci s vysoce účinným hmotnostním analyzátozem pracujícím v kladném módu elektrosprejové ionizace (LC-HRMS / MS).

3.2.1.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC je separační metoda u které výběr detekčního systému je důležitý pro selektivitu a citlivost (Bergweff a Schloesser, 2003). Detekce pro více jednotlivých reziduí jsou relativně jednoduché, ale vyžadují přečištění pomocí extrakce pevnou fází následovanou filtrací před injekcí na obrácenou fázi HPLC s diodovým polem. Tento postup se aplikuje u vzorku masa pro detekci antibiotik, jako jsou chinoliny (Kirbi a kol., 2005) sulfonamidy (Pecorelli a kol., 2004) β -laktamy, makrolidy (Nagata a kol., 2004), tetracykliny (Samanidou a kol., 2005). V některých případech mohou být sloučeniny identifikovány pomocí diodového pole nebo fluorescence. Deset chinolinových zbytků (ciprofloxacin, danofloxacin, difloxacin, enrofloxacin, flumequin, marbofloxacin, kyselina nalidixová, norfloxacin, kyselina oxolinová, sarafloxacin) v mase bylo detekováno a potvrzeno pomocí HPLC a fluorescenční detekce (Verdon a kol., 2005).

Extrakce vzorků a jejich přečištění jsou kroky určující rychlost analýzy léčiv. Použitím on-line extrakce na pevné fázi s chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií, nebo jinou spektroskopickou technikou jsou stále častěji používané techniky. Umožňují screening se simultánním potvrzením podezřelých vzorků. Přesto,

že jsou náklady na přístroje vysoké, tak při analýze vysokého počtu vzorků se náklady sníží a cena je konkurenceschopnější (Tang a kol., 2006).

3.2.1.4 Ultraúčinná kapalinová chromatografie

UPLC byla shledána jako alternativa k HPLC pro analýzu farmaceutických sloučenin. Pracuje na podobných principech jako HPLC, ale za použití menšího průměru kolony a vyššího tlaku, což umožňuje stejné výsledky jako při použití HPLC, ale v kratším čase (Wren a Thelitcheff, 2006).

3.2.1.5 Elektrosprejová ionizace

ESI je technika, která usnadňuje analýzu od malých molekul po velké a od hydrofobních až po hydrofilní. Je tedy vhodná pro analýzu veterinárních léčiv (Bergweff a Schloesser, 2003). ESI se navzájem doplňuje s metodou APCI, výběr metody se určuje na základě ionizace antibiotik (Gentili a kol., 2005).

3.2.2 Imunologické screeningové metody

Imunologické metody jsou založeny na interakci antigen-protilátka, která je specifická pro konkrétní rezidua. Nejběžněji používaná metoda ELISA je založena na detekci činidlem značeného enzymu. Možností jsou různé formy kvantifikace antigenu, jako Sandwich, dvojitý test a přímo ELISA test. RIA je založena na měření radioaktivity imunologických komplexů (Samarajeewa a kol., 1991). Další testy mají schopnost detekce pomocí luminiscenčního detektoru za použití chemiluminiscenční sloučeniny, nebo fluorimetru v případě použití fluorescenční sloučeniny (Roda a kol., 2003).

3.2.2.1 ELISA

V současnosti existuje mnoho komerčně dostupných souprav ELISA pro velký počet látek. ELISA soupravy jsou dostupné buď pro konkrétní látku, nebo pro celou skupinu příbuzných sloučenin. V některých případech je třeba mít na paměti možnost vzniku vedlejších reakcí. Tyto soupravy nevyžadují sofistikované přístrojové vybavení, výsledky jsou hotové během několika hodin a jsou velmi citlivé a specifické. ELISA kity vykazují dobrou výkonnost v analýze reziduí v mase u tylosinu, tetracyklinu (De Wasche a kol., 2001) chloramfenikolu (Gaudin a kol., 2003) nitroimidazolu (Huet a kol., 2005), sulfonamidů (Wang a kol., 2006).

3.2.2.2 Dipstick

Dipstick představuje další systém, které spočívá v membránovém proužku s ligandy receptorů. Vzorek s antibiotiky je aplikován a ponechán k interakci po ponoření do dvou různých látek. Barevná reakce může být srovnána buď se standardem, nebo měřena spektrofotometricky (Link a kol., 2007).

3.2.2.3 Bio senzory

Bio senzory obvykle obsahují protilátky, které reagují s analytem. Výsledný biochemický signál je měřen opticky, nebo je převeden na elektronický signál a zpracovává se pomocí vhodných zařízení (White 2004). Bio senzory jsou schopny detekovat současně více reziduí veterinárních léčiv ve vzorku (Gründig a Renneberger, 2002). Bio senzory se liší v interakci mezi rozpoznávací molekulou a analytem a v typu detekce. U některých senzorů je biomolekulární interakce založena na povrchové plasmové rezonanci. Tento typ optických biosenzorů měří změnu indexu lomu roztoku v blízkosti senzoru, když se mění hmotnostní koncentrace molekul v roztoku (Gillis a kol., 2002). Další bio senzory jsou založeny na použití biočipu, který je specifický pro určité množství reziduí, který umožní monitoring interakce analytu s rozpoznávací molekulou v čase. Tyto senzory jsou ovlivňovány několika faktory, jako je hustota ligandu v matici, koncentrace protilátky a průtok (Johansson a Hellenas, 2001). Rezidua některých látek, jako je chloramfenikol, clenbuterol a tylosin byly rozpoznány pomocí microarray malých molekul. Molekuly byly imobilizovány na skleněné destičce, inkubovány s odpovídajícími protilátkami a vzorky. Vazby byly detekovány s použitím cy5 sekundárně značené protilátky (Zuo a Ye, 2006). Ostatní typy bio senzorů jsou určeny na specifické třídy antibiotik. Konstrukce těchto činidel je kompatibilní s metodou ELISA a změna barvy je úměrná koncentraci antibiotik (Weber a kol., 2004).

3.2.3 Mikrobiologické metody

Mikrobiologické metody jsou vhodné pro detekci antimikrobiálních reziduí zvláště proto, že jsou méně nákladné než imunochemické a chromatografické metody a jsou schopny vyhodnocení velkého množství vzorků při minimálních nákladech (Pikkemaat, 2009).

3.2.3.1 Čtyřplotnová metoda

Čtyřplotnová metoda je založena na kombinaci pH a podmínek, které inhibují, nebo podněcují aktivitu antibiotik. PH média ovlivňuje aktivitu některých antimikrobiálních látek. Například aktivita tetracyklinů a aminopenicilinů se zvyšuje v kyselém prostředí, zatímco aktivita makrolidů, quinolinů a aminoglykosidů se zvyšuje v alkalickém pH (De Zutter a kol., 1985).

Čtyřplotnová metoda stanovení residuí v masě drůbeže je doporučována a schválena francouzskou agenturou pro bezpečnost potravin (AFSSA). Vzorky jsou testovány difusí na agaru o různém pH (6, 7,2 a 8). Jako testovací kmeny jsou používány *Bacillus subtilis* (BGA spory) a *Micrococcus luteus* (ATCC 9341). Tato metoda je schopná detekovat různé druhy antibiotik, včetně β -laktamů, tetracyklinů, chloramfenikolu a makrolidu (Hakem a kol., 2013).

Zkouška se provádí pomocí agarového difúzního testu. Na Petriho misku je naočkován referenční kmen *Bacillus subtilis* (pH 6, 7,2 a 8) a *Micrococcus luteus* (pH 8). V médiu je začleněn trimethoprim při pH 7,2 proto, aby se zvýšila citlivost detekce na zbytky sulfonamidů. Na agar jsou umístěny plátky masa (2 mm tloušťka; 8 mm průměr). Petriho misky se inkubují při 30 °C pro *Bacillus subtilis* (pH 6, 7,2 a 8) a 37 °C pro *Micrococcus luteus* pH 8. Po 24 hodinách inkubace se změří průměr inhibiční zóny posuvným měřítkem. Souběžně se posuzuje standardní roztok obsahující penicilin G, trimethoprim a erythromycin. Pozitivní je vzorek s prstencovou inhibiční zónou silnou alespoň 2 mm. Skupiny antibiotik detekovaných pomocí inhibice jsou uvedeny v tabulce 1 (Hakem a kol., 2013).

Tabulka 1: Skupiny antibiotik detekovaných pomocí použitých mikrobiálních kmenů (Hakem a kol., 2013)..

Agar	Mikrob	pH média	Teplota inkubace [°C]	Skupina antibiotik
1	<i>Bacillus subtilis</i>	6,0	30	β -laktamy a/nebo tetracykliny
2	<i>Bacillus subtilis</i>	7,2	30	Sulfonamidy
3	<i>Bacillus subtilis</i>	8,0	30	Aminoglykosidy
4	<i>Micrococcus luteus</i>	8,0	37	Makrolidy a/nebo β -laktamy

Mechanismus účinku pH na aktivitu antimikrobiálních látek a jejich vzájemné působení nejsou zcela vysvětleny. Nicméně jsou založeny na citlivosti a odolnosti testovacích mikroorganismů na rozdílné molekuly antibiotik (Karraouan a kol., 2009).

V agarové difúzi může mít vliv na velikost inhibičních zón typ použitého kultivačního média tak, že přímo ovlivňuje rychlost difúze antimikrobiálních látek, ale také rychlost růstu testovacího mikroorganismu (Barry a kol., 1974).

Výhodou mikrobiálních testů na rozdíl od LC-MS je schopnost detekovat všechny antimikrobiální látky, nebo jejich metabolity s antimikrobiální aktivitou. Zatímco LC-MS sleduje předem definovanou látku a ostatní látky systémem procházejí bez povšimnutí. Nevýhodou mikrobiálních testů je nízká specifita a v některých případech dlouhá doba inkubace (Picó a Barceló, 2008).

3.2.3.2 Dvouplotnová metoda

Dvouplotnová mikrobiologická metoda pro detekci zbytků většiny používaných antibiotik v živočišné výrobě, nazvaná Nová dvou plotnová zkouška (NTPT), byla optimalizována a validována v souladu s kritérii odvozených z rozhodnutí Komise 2002/657/EC. Tato screeningová metoda využívá jeden bakteriální kmen *Bacillus subtilis* naočkovaný na dvě média odlišného pH. Tato metoda se skládá z jednoduché extrakce a následuje aplikace extraktu na Petriho misku. Metoda zjišťuje ve vepřovém i kuřecím mase většinu ze šesti skupin antibiotik. Tetracykliny, (fluoro)chinoliny, peniciliny, makrolidy, aminoglykosidy a sulfonamidy. Florfenicol je zjištěn při koncentraci velmi blízké maximálnímu limitu reziduí používaném v EU. Nová dvou plotnová metoda byla srovnána s Premi Testem®, jako další screeningovou metodou. Dvou plotnová metoda odhalila více pozitivních vzorků (Pham a kol., 2011).

3.2.3.3 Nouws Antibiotic Test (NAT)

Nouws Antibiotic Test je testovací systém zahrnující počáteční screening tekutiny ledvinové pánvičky a post-screening svalů a ledvin. Počáteční screeningové testy se skládají z pěti testovacích misek, z nichž každá je optimalizovaná pro jednu nebo dvě skupiny antibiotik v konkrétní matrix: *Bacillus cereus* – miska specifická pro detekci tetracyklinů, *Kocuria rhizophilia* – specifická na β -laktamová antibiotika a makrolidy, *Yersinia ruckeri* – specifická pro chinoliny, *Bacillus pumilus* – specifický pro sulfonamidy a diaminopyrimidiny a *Bacillus subtilis* – specifický na aminoglykosidy (Pikkemaat a kol., 2008).

Vzorky, které vykazují inhibiční zónu u více, než jedné zkušební misky jsou navíc analyzovány post-screeningovým testem ledvin a/nebo svaloviny. Zde je metoda omezena na screening reziduí, u kterých byl počáteční test pozitivní. Vzorky pro post-screeningový test jsou připraveny homogenizováním ledvin nebo svaloviny a izolací tekutiny z homogenizátu centrifugací po krátkém ohřevu. Post-screeningový test je založený na principu více podobných ploten jako počáteční test (Pikkemaat a kol., 2009).

3.2.4 Screeningové metody

3.2.4.1 Explorer® test

Explorer® 2.0 je kvalitativní screeningový test mikrobiální inhibice antimikrobiálními rezidui ve vzorcích potravin. Citlivost tohoto systému byla ověřena u vzorků svaloviny v souladu s Rozhodnutím komise 2002/657/ES na 25 látek z několika skupin antimikrobiálních látek. Specifita a použitelnost testu byla prokázána u vzorků svaloviny ze čtyř druhů zvířat – skot, prase, ovce, drůbež. Nebyly zjištěny falešné pozitivní ani falešné negativní výsledky. Tato metoda zjednodušuje analýzu a zvyšuje přesnost interpretace výsledků zkoušek, neboť výsledek je automaticky určen a objektivně interpretován (Mata a kol., 2015).

Test je založen na inhibici mikrobiálního růstu *G. stearothermophilus*. Každá ampule obsahuje živný agar s bakterií a indikátor pH. Při inkubaci na 65 °C spory vyklíčí a bakterie začnou produkovat kyseliny, které mění střední hodnotu pH. Změna pH způsobí změnu barvy indikátoru z modré na nažloutlou. Pokud vzorek obsahuje inhibitory při vyšších koncentracích než LOD, nedojde k žádné barevné změně (Mata a kol., 2015).

Detekční schopnosti testu byly stanoveny pro šest skupin antibiotik – peniciliny, cefalosporiny, tetracykliny, sulfonamidy, makrolidy a aminoglykosidy. Většina z testovaných látek pracovala kolem MLR, nebo i pod (Mata a kol., 2015).

Napojení testu na e-Reader® zjednodušuje analýzu a zvyšuje přesnost a robustnost výsledků (Mata a kol., 2015).

3.2.4.2 Premi® Test

Premi® Test je screeningová metoda pro detekci reziduí antimikrobiálních látek v potravinách živočišného původu. Test je založen na inhibici růstu

Bacillus stearothermophilus. Tato termofilní bakterie je citlivá na mnohá antibiotika a sulfoamidové sloučeniny (Stead a kol., 2004).

Premi® Test umožňuje testovat maso drůbeže, vepřové i hovězí na rezidua β -laktamových antibiotik, cefalosporinů, makrolidů, tetracyklinů, sulfonamidů, aminoglykosidů, chinolonů, amphenocoly a polypeptidy. Souprava je validována podle AFNOR na screening β -laktamů, makrolidů, tetracyklinů a sulfonamidů v hovězím, vepřovém a drůbežím mase. Test je rychlý a hodnotí limity v souladu s maximálními limity reziduí platných pro EU (Ekene a kol., 2014).

Negativní Premi® Test zežloutne následkem růstu spor při 64 °C a jejich produkci kyseliny měnící pH, což iniciuje barevnou změnu indikátoru z fialové na žlutou. Na druhé straně přítomnost antibiotik způsobuje zpoždění spor nebo jejich inhibici v závislosti na koncentraci reziduí. V přítomnosti reziduí se tedy nebudou spóry rozrůstat a indikátor si ponechá fialovou barvu. Některé vzorky mohou zůstat nerozhodně mezi žlutým a fialovým zabarvením. To způsobuje nízká koncentrace reziduí ve vzorku a nedokonalé okyselení indikátoru následkem částečné inhibice spor (Ekene a kol., 2014).

Premi® Test není kvantitativní metoda, detekuje většinu antibiotik na maximální limity reziduí nebo tolerovatelnou hodnotu, jak stanovuje Světová zdravotnická organizace. Premi® Test může detekovat rezidua antibiotik v různých orgánech těla drůbeže. Testovací *Bacillus stearothermophilus* je relativně málo citlivý na chinolinová antibiotika, což může poskytovat falešné negativní výsledky. Pro pokrytí celého spektra antibiotik je zapotřebí další testování (Stead a kol., 2004).

Z orgánů mají ledviny nejvyšší podíl reziduí antibiotik a kromě toho, že jsou hlavním exkretčním orgánem většiny léčiv, tak *Bacillus stearothermophilus* používaný v Premi® Testu je citlivý na inhibiční aktivitu lysozymu, který je přítomný v ledvinách (Kibris, 2007).

3.3 MIKROBIOLOGIE DRŮBEŽÍHO MASA

Drůbeží maso je nabízeno k prodeji chlazené, mražené a dále dělené na části – stehna, prsa, droby. Mikrobiologické vlastnosti čerstvě chlazené a mražené drůbeže jsou závislé na podmínkách jejich chovu a technologických procesů při jejich opracování. V závislosti na postupnosti technologických fází výroby drůbežího masa se mění množství i složení mikroflóry drůbežího masa. Při technologických krocích výroby se věnuje pozornost kontaminaci, aby byla co nejmenší z důvodů trvanlivosti masa, hygienické a zdravotní nezávadnosti – salmonely, kampylobaktery (Görner a Valík, 2004).

Na začátku technologického procesu, kde je JUT za tepla eviscerované, kolísá rozmezí mikrobiální kontaminace mezi 10^3 až 10^4 KTJ \cdot cm⁻². Ihned po zabíjení a opracování převládají na JUT bakterie rodu *Pseudomonas* v hodnotě 20 – 25 %, nepigmentující koky a podobné bakterie. Zbytek se skládá z pestré směsi stovek druhů mikroorganismů. Na konci chladiřenského uchování je složení mikroflóry na pokožce JUT podstatně změněné. Většinu tvoří bakterie rodů *Pseudomonas* a *Alcaligenes* (90 – 95 %), počet bakterií dosahuje hodnoty 10^7 – 10^8 KTJ \cdot cm⁻² (Görner a Valík, 2004).

Voda, kterou je zásobeno napájení a čištění, musí splňovat požadavky na pitnou vodu, tedy bez patogenních mikroorganismů. Dále se sleduje frekvence výměny a čistota ochranných oděvů pracovníků, desinfekční rohože nebo bazénky určených k dezinfekci kol vjíždějících vozidel do chovu. Kontroluje se objekt haly, z důvodu pronikání hmyzu, ptáků, hlodavců a rychlost odstraňování kadáverů z haly (Matyáš a Vondrka, 2000).

Z hlediska zdravotní nezávadnosti je důležitá ochrana objektu proti zavlečení patogenních mikroorganismů a parazitů, kteří jsou schopni infikovat drůbež. Tím se zvyšuje i ekonomika chovu. V jednom chovu musí být stejně stará drůbež a musí se dodržovat postup naskladňování a vyskladňování, kdy je vždy jednorázově naskladněna nebo vyskladněna veškerá drůbež. Před naskladněním nesmí být v hale žádná drůbež. Krmivo může pocházet pouze z výrobní krmných směsí, která má zavedeno HACCP a dodržuje zásady ISO 9000 – 9004 a všechny další hygienické zásady. Taková výrobní poskytuje záruku striktního dodržování opatření proti výskytu salmonel (Matyáš a Vondrka, 2000).

3.4 VLIV TECHNOLOGICKÉHO OPRACOVÁNÍ NA MIKROBIOLOGICKOU JAKOST DRŮBEŽÍHO MASA

U drůbeže, jakožto zvířete, které se po porážce nestahuje z kůže, je počáteční mikroflóra závislá na přeživší mikroflóře po paření a odstranění peří (Fernandes, 2009).

3.4.1 Omračování

Při porážce drůbeže se pro omračení používají elektrický proud, plyn nebo mechanické omračení (Fernández-López a kol., 2010).

3.4.1.1 Elektrické omračování

Omráčení elektrickým šokem může být aplikováno takzvaným suchým způsobem, nebo ve vodní lázni. Použití vodní lázně je častěji využívaný způsob. Oba způsoby zahrnují navěšování živých zvířat za nohy do háků, což má řadu negativních dopadů: zhoršení welfare, značné poškození produktu a ztížené pracovní podmínky. Tyto metody se stále vyvíjejí. Upravuje se napětí, proud, frekvence a design linky pro zlepšení kvality výsledného produktu (Fernández-López a kol., 2010).

3.4.1.1.1 Vysoké napětí

Vysoká voltáž (120 mA) elektrického omračování způsobuje vyšší výskyt vad na JUT, jako jsou začervení konců křídel, zlomeniny kostí a krvácení. Může způsobit až 90% srdeční fibrilaci, což způsobuje nedokonalé vykrvení. Silné svalové kontrakce totiž způsobují vykrvení, pokud ale zvíře zemře před vykrvením, tak klesá kvalita výsledného JUT (Fernández-López a kol., 2010).

Nejnižší hodnota napětí v Evropě je u drůbeže 100 mA (podle Sams a McKee (2010) se v Evropě používá 90 + mA pro brojlerů a 100 + mA pro krůty), která spolehlivě omráčí 90 % zvířat. Z toho důvodu je doporučována hodnota 120 mA (Fernández-López a kol., 2010).

Vyšší napětí při omračování je z hlediska možného předčasného procitnutí, nebo nedokonalého omračení nízkým napětím humánnější, protože zamezuje tomuto probuzení před usmrcením (Sams a McKee, 2010).

3.4.1.1.2 Nízké napětí

Nízká voltáž (cca 13 – 15 mA) při elektrickém omračování je nejčastěji používána v USA, protože snižují výskyt poškození JUT spojených s použitím vysokého napětí.

Nevýhodou je, že se zvíře může, pokud není do dvou minut usmrceno probudit. Nízké napětí u omračování způsobuje předčasnou ztrátu krve, ale nemá vliv na celkovou ztrátu krve po 90 – 120 s vykrvování (Fernández-López a kol., 2010).

3.4.1.2 Omračování plynem

Pro omračování plynem se používají oxid uhličitý a argon. Omračení v plynné atmosféře může proběhnout zvýšením koncentrace oxidu uhličitého (hyperkapnická hypoxie), poklesem koncentrace kyslíku (anoxie), nebo kombinací obou (hyperkapnická anoxie). Použitím plynů při omračování vede ke snížení krevních sraženin v prsní svalovině. Zvířata se omračují ve skupinách v přepravních klecích, čímž se sníží stresové zatížení drůbeže. Tím se docílí snížení výskytu poškození JUT, nebo krevních podlitin (Fernández-López a kol., 2010). Používají se dva typy omračování plynem, reverzibilní a ireverzibilní. Při reverzibilním způsobu se používá kombinace oxidu uhličitého (10 – 40 %) a vzduch (60 – 90%) s kratší dobou působení (30 – 45 s) a omračení ptáci jsou přivedeni k porážecímu zařízení. Ireverzibilní způsob používá kombinace argonu (55 – 70 %), dusíku (0 – 15 %), oxidu uhličitého (30 %, nebo 40 – 80 %) a kyslíku s delší dobou působení (2 – 3 min.), kde jsou při vstupu do porážecího zařízení ptáci už mrtví (Sams a McKee, 2010).

3.4.1.3 Mechanické omračování

Mechanický způsob zahrnuje proražení mozku, nebo otřes mozku. Protože je tato metoda logisticky a welfare náročná pro automatizaci na lince, nepoužívá se tento způsob v komerčních systémech. Tato metoda se používá pouze k porážce pštrosů (Fernández-López a kol., 2010).

3.4.2 Porážka

Mikroorganismy přenesené porážecím zařízením hlouběji do JUT jsou významně eliminované baktericidní aktivitou krve a tkání (Gill a Penney, 1979). Tudiž porážecí proces v souladu s moderními hygienickými požadavky na porážku, by neměl výrazně přispívat ke kontaminaci JUT (Fernandes, 2009).

3.4.3 Vykrvení

Usmrcení se provádí proříznutím krční tepny a žíly na jedné, nebo na obou stranách krku, což způsobí rychlou smrt. Do dvou minut po proříznutí tepen by mělo zvíře být

mrtvé. Průdušnice i jícen musejí zůstat neporušené, aby mohly být později vyjmuty. To je důležité hlavně u automatických linek (Fernández-López a kol., 2010).

Méně běžnou metodou je dekapitace, která je častěji používaná v USA. Dekapitace po použití nízkého napětí při omráčení může být považována za alternativu k vysokému napětí používanému v EU (Fernández-López a kol., 2010). Pokud se používá dekapitace, je třeba ptáky efektivně vybírat a musí být odstraněna kůže v oblasti krku. Krevní sraženiny by takto mohly být snadno přeneseny k pařicím systémům a kontaminovat je. Nedostatečné vykrvení může mít za následek začervenaní křídel. V závažnějších případech nedojde k usmrcení ptáka, pouze k omráčení. Takto omráčený pták je přiveden k paření, kde se působením horké vody změní barva JUT na červenou. Takové JUT je označeno jak kadaver a není určeno k lidské spotřebě (Sams a McKee, 2010).

V průběhu krvácení se z těla drůbeže odstraní 40 – 60 % (podle Sams a McKee 2010 30 – 50 %) celkové krve. Zbytky krve zůstávají v těle, kde je distribuována do vnitřních orgánů (20 – 25 %) a JUT (15 – 20 %). Při vykrvování po omráčení elektrickým proudem se z těla odstraní 40 % krve za 60 – 90 s. Po omráčení plynem se doba vykrvení prodlouží na 2 – 2,5 min. (Fernández-López a kol., 2010). Mělkým řezem dojde k malému proříznutí žíly a tepny na krku a nedojde k dostatečnému vykrvení, čímž zůstává zbytková krev v JUT (Sams a McKee, 2010).

Špatné vykrvení může být způsobeno nedokonalým omráčením. Do pařicí vany se dostává krev, a čím více bílkovin v pařicí vodě je, tím více jsou chráněny mikroorganismy před působením tepla (Simeonovová a kol., 2013).

3.4.4 Paření

Pařením se odstraňuje většina mikroorganismů z povrchu drůbeže (Fernandes, 2009).

Při nedokonalém vykrvení se může kontaminovaná pařicí voda dostat do plic a vzdušných vaků při ponorném způsobu paření. Na rozdíl od plic nejsou během eviscerace vyjmuty vzdušné vaky – deset párových a jeden nepárový. Místo toho zůstávají v hrudní dutině, kde nejsou častým zdrojem mikrobiální kontaminace. Sprejové paření je často hygieničtější oproti tankovému paření, kde je mikrobiální kontaminace vyšší díky použití šetrného paření při teplotě 52 °C po dobu 3 min. Použití vysoké teploty paření - >58 °C po dobu 2,5 min., může být kontraproduktivní při

výrobě chlazeného masa. Odstraněním pokožky se JUT stává náchylnějším ke kažení (Clark, 1960).

3.4.5 Škubání

Škubáním se šíří hlavně kožní mikroorganismy mezi jednotlivá JUT a následně do zpracovatelského prostředí. Mezi zástupce mikroorganismů vyskytujících se na kůži drůbeže patří *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* a kvasinky. I přes mechanické působení škubacích strojů, výstupu fekálií a následné disperzi střevních bakterií na JUT, není toto uváděno jako hlavní problém (Mulder a kol., 1978). Nicméně *Salmonella* ssp. a *C. jejuni* a další střevní mikroorganismy přítomní na peří a pařátech drůbeže jsou v průběhu škubání přeneseni na JUT (Al-Mohizea a kol., 1994).

Mikroorganismy kůže drůbeže, které přežijí paření, kontaminují JUT během mechanického škubání. Fekální mikroflóra včetně patogenní *Salmonella* ssp. a *C. jejuni* jsou často přítomni na povrchu čerstvě oškubaného JUT, ale nesouvisí to přímo s kontaminací z trávicího traktu kloakou během škubání (Mulder a kol., 1978).

Škubání také přináší výraznou vzdušnou dispersi mikroorganismů, proto se doporučuje tyto operace oddělit od ostatních činností výrobního procesu. Gumové prsty je náročné vyčistit, proto zde může být mikrobiální kontaminací zavlečen *Staphylococcus aureus* (Notermans a kol., 1982).

3.4.6 Eviscerace

Eviscerací se rozumí odstranění kůže krku, odstranění kloaky, otevření tělní dutiny a vyjmutí vnitřností. To může být provedeno manuálně, poloautomaticky, nebo plně automaticky. Speciální pozornost se klade při vyjímání vnitřností, aby nedošlo k poškození a kontaminaci JUT (Fernández-López a kol., 2010).

Vysokou rychlostí automatické eviscerace nezdědka dochází k přítomnosti střevních mikroorganismů na JUT. Kontaminace JUT psychrotrofními mikroorganismy, zejména *Pseudomonas* ssp., které rostou na mokřích kontaktních výrobních površích, je významným problémem hygieny výrobního procesu, který ovlivňuje složení výchozí mikroflóry (Al-Mohizea a kol., 1994).

V moderním zpracování se odstraňuje dýchací soustava společně s trávicím traktem z jícnové a rektální strany, což je spojeno s minimální kontaminací JUT. Při manuální i

automatické evisceraci, pracovní rychlosti a malé velikosti tento postup přináší dobré výsledky s ohledem na poškození vnitřností (Fernandes, 2009).

3.4.6.1 Čištění JUT a dekontaminace

Použití teplé vody (35 – 50 °C) při čištění JUT po evisceraci je účinnější při snižování mikrobiální kontaminace na povrchu. Čistící účinek může být zvýšen použitím kartáčů a gumových prstů, kde je povoleno užití bakteriocidních přípravků. Jako látky s antimikrobiální aktivitou se mohou do čisticí vody přidávat oxid chloričitý, chlorid sodný, fosforečnan sodný, cetylpyridinium chlorid, peroxid vodíku, kyselina mléčná a okyselený chlorid sodný (Fernández-López a kol., 2010). Vícetupňové mytí během eviscerace snižuje počty koliformních bakterií a bakterie *Salmonella* na jatečném těle (Fernandes, 2009).

3.4.7 Chlazení

V okamžiku smrti je maso prakticky sterilní, během jatečného opracování je potom kontaminováno. Po porážce maso podléhá činnosti mikroorganismů. Rychlost a míra rozsahu rozkladů závisí na teplotě a dalších podmínkách skladování (Pipek, 2012).

Upravená drůbež by měla být zchlazena pod 4 °C do 20 min. od usmrcení. Voda v chladicích vanách přitéká z opačného směru, než je přiváděna drůbež (Rojas a kol., 2010). Z hygienického hlediska je tento způsob problémový, neboť jsou JUT ve vzájemném kontaktu a v kontaktu s někdy znečištěnou chladicí vodou, která je absorbována do tkání (Simeonovová a kol., 2013). Led použitý při výrobě a chlazení upravené drůbeže musí splňovat požadavky na pitnou vodu (Rojas a kol., 2010).

Chlazení vzduchem je hygieničtější způsob chlazení. Jatečně opracovaná těla nejsou v kontaktu, čímž by se mohla vzájemně kontaminovat. Sprejové chlazení drůbeže ve visu vodou v kombinaci se vzduchem má stejnou výhodu. Pouze v případě velkých kapek hrozí riziko sekundární kontaminace (Simeonovová a kol., 2013).

3.4.8 Porcování a balení

Teplota okolí při porcování i balení by měla být mezi 12 – 15 °C. Materiál a nářadí používané k balení a porcování musí být sanitované tak, aby produkt nemohl reagovat s chemikáliemi používanými pro sanitaci (Rojas a kol., 2010).

Při balení drůbeže se může použít chemické ošetření pro zajištění mikrobiální čistoty produktu. Jako látky používané k tomuto účelu se používá chlór, sorbát draselný,

kyselina chlorná, disodium ethylindiamintetraacetát, nisin, fosforečnan sodný, kyselý, nebo zásaditý roztok, peroctová kyselina a kvartérní amoniové sloučeniny (Fernández-López a kol., 2010).

Jako fyzikální ošetření se používají u drůbeže vakuové balení, které mění mikroflóru, ale neinhibuje bakteriální růst (*Aerobacter aerogenes*, *Escherichia coli* a *Proteus mirabilis*). Dalším fyzikálním způsobem ošetření je modifikovaná atmosféra, kde při 30 % CO₂, 70 % N₂, nebo 70 % CO₂ a 30 % N₂, se potlačil růst *Pseudomonas*, ale růst rodu *Enterobacteriaceae* a *Brochotrix thermosphacta* nebyl inhibován. Vytváření biogenních aminů je v korelaci s mikrobiologickými a senzoričnými změnami u drůbežích prsou balených v modifikované atmosféře. Oxid uhličitý má inhibiční účinky na růst psychrotrofních mikroorganismů, včetně *Pseudomonas*, který je hlavním mikrobem účastnícím se na kažení chlazeného drůbežního masa. Ošetření v horké vodě dokáže snížit kontaminaci patogenními bakteriemi na povrchu drůbeže. Proto se používá teplota 50 °C s výdrží 12 s, nebo teplota 100 °C s výdrží 1 s. Žádné tepelné ošetření pod 90 °C není schopno snížit kontaminaci *E. coli* nebo podobných termotolerantních mikroorganismů. Ozáření je technika kombinovaná s dalšími balicími technikami (Totosaus-Sánchez, 2010).

3.5 VÝZNAMNÉ MIKOORGANISMY DRŮBEŽÍHO MASA

3.5.1 Bakterie rodu *Salmonella*

Salmonelóza je jednou z nejčastějších zoonóz z potravin. V současnosti je na globální úrovni hlavním zdrojem konzumace kontaminovaného masa, včetně drůbeže, navzdory úspěšným opatřením pro tlumení salmonel v chovech. Antimikrobiální rezistence u netyfoidních salmonel je považována za jedno z největších ohrožení veřejného zdraví související s jídlem, včetně produkce drůbeže, což je další starost při řízení salmonel (Antunes a kol., 2016).

V mikrobiologii drůbeže se soustředí pozornost mimo saprofytických bakterií na neinvazivní salmonely. Jejich zdrojem jsou v chovech drůbeže kontaminovaná krmiva. Jednotlivé kusy drůbeže se v hromadných chovech navzájem infikují a salmonelóza se rozšíří v celém chovu. Při technologickém opracování JUT dochází k další kontaminaci, kdy jednotlivý kus nemusí být zjevně nemocný, ale je pouze nosičem salmonely. Nejčastěji se na mase drůbeže vyskytuje *Salmonella typhimurium* a *Salmonella pullorum* stejně jako řada dalších, kvantitativně méně významných druhů a sérovarů. Ke

kontaminaci JUT při průmyslovém opracování dochází nejčastěji při otevírání břišní dutiny, evisceraci a při chlazení v chladicí lázni (Görner a Valík, 2004).

Salmonely i jejich toxiny jsou termolabilní a nesnesou půlhodinový var. Při kulinářské úpravě jsou devitalizovány a inaktivovány. Musí se však zabránit kontaminaci tepelně upraveného masa salmonelami z pomůcek, nebo z rukou, které byly ve styku s tepelně neupraveným masem drůbeže (Görner a Valík, 2004).

Salmonella typhi je původcem tyfu a břišního tyfu. Gastroenteritida je spojena s nevolností, zvracením a průjmem. Při tyfu se buňky salmonely dostávají stěnou střeva do lymfatických uzlin, do krve a následně se šíří do orgánů. Tyfus se vyznačuje horečkou, zimnicí, bolestmi, slabostí, zácpou častěji než průjmem, bakteriémií a infekcí orgánů, např. CNS. Břišní tyfus obvykle zasahuje játra a/nebo slezinu se zvýšenou teplotou (Baker a kol., 2006).

3.5.2 Bakterie rodu *Yersinia*

Yersinia enterocolitica je důležitý potravinami přenášený enteropatogen, který způsobuje u dětí gastroenteritidu, někdy s těžkým průběhem a někdy lymfadenitidu mezenterických uzlin (Qinghua a kol., 2016). Po zduření uzlin tato gastroenteritida imituje apendicitidu (Schindler, 2014).

V přenosu nákazy mají hlavní úlohu potraviny připravované z vepřového masa, nebo potraviny fekálně kontaminované jinými zvířaty (Görner a Valík, 2004).

Průběh onemocnění je podobný, jako u enteritid způsobených salmonelami, *Campylobacter jejuni* a u jiných podobných střevních nákaz. Nejčastěji postihuje děti a dospělé se sníženou rezistencí a probíhá nejčastěji jako akutní gastroenteritida. Inkubační doba je 7 – 10 dní (Görner a Valík, 2004). Původce enterokolitid nejčastěji u dětí. Enterokolitida je charakterizovaná horečkou, bolestmi břicha a průjmem, ale samy odezní (Baker a kol., 2006).

Yersinia pestis je původcem moru. Existují tři hlavní klinické formy: dýmějový mor, septikemický mor a plicní mor. Dýmějový mor je charakterizován horečkou a zvětšenými lokálními místy v tříselech nebo podpaží. Pokud se neléčí, vede až k bakteriémií – septikemickému moru, septickému šoku a může se šířit do plic. Plicní mor je charakterizován horečkou, dýchacími obtížemi až smrtí u některých pacientů (Baker a kol., 2006).

3.5.3 Bakterie rodu *Staphylococcus*

Staphylococcus aureus je značně odolný vůči dekontaminujícím látkám, snáší záhřev na 60 °C po dobu 30 min a dobře se rozmnožuje v potravinách s vysokým obsahem soli i cukru $a_w = 0,86$ (Görner a Valík, 2004).

S. aureus je v lidské populaci velmi rozšířený. 30 – 40 % zdravých lidí jsou jeho nosiči ve stolici, na sliznici nosohltanu, na pokožce, hlavě a vlasech. Asi 20 – 50 % plazmakoaguláza pozitivních kmenů *S. aureus* izolovaných z člověka má schopnost produkovat stafylokokové enterotoxiny. Tyto toxiny mohou způsobit otravu potravinami – enterotoxikózy (Görner a Valík, 2004). Hlavní roli z enzymů produkovaných *S. aureus* má α -hemolyzin, který porušuje buněčnou membránu u eukaryotických buněk, PV-leukocid porušuje integritu buněčné membrány u leukocytů a tím je zabíjí. Alimentární intoxikaci způsobuje více než deset typů enterotoxinů, intoxikace probíhá bez následků (Schindler, 2014). Otravu způsobuje exotoxin, nikoli buňky samy o sobě (Baker a kol., 2006).

Mimo to je častým původcem lokálních hnisavých zánětlivých onemocnění, jako hnisavých vředů – furunkl, karbunkl (Görner a Valík, 2004), impetigo, panaricum (Schindler, 2014), pooperačních infekcí ran a generalizovaných infekcí s následovným napadením určitého orgánu (Görner a Valík, 2004). Významné jsou osteomyelitida, bronchopneumonie, endokarditida a sepse (Schindler, 2014).

Z potravinářsko-mikrobiologického hlediska jsou nebezpečné zejména hnisavá onemocnění na ruce a zvýšený výskyt stafylokoků v nosohltanu, kteří se při manipulaci s potravinou mohou dostat do nich a produkovat stafylokokové enterotoxiny (Görner a Valík, 2004).

Příčinou nákazy jsou méně často hospodářská zvířata, častěji tomu bývá díky nosičům stafylokoků, nebo stafylokokových infekcí – pracovníci s hnisavými ranami (Baker a kol., 2006).

3.5.4 Bakterie rodu *Clostridium*

Clostridium perfringens je součástí tlustého střeva lidí i zvířat, ale je přítomna i v půdě. Otravy potravinami způsobují jen kmeny *C. perfringens* typu A, které mohou způsobit i infekce ran. Typ A *C. perfringens* patří mezi ty pro člověka nejpatogeničtější typy (Görner a Valík, 2004).

Tvoří toxin lecitináza, který má hemolytické a myonekrotické účinky. Příčinou alimentární intoxikace u člověka je intoxikace enterotoxiny leukotoxin, kolagenáza, hyaluronidáza a další (Schindler, 2014). Enterotoxin se vytváří během sporulace buněk a uvolňuje se do organismu. Enterotoxin zvyšuje permeabilitu krevních kapilár, tím zesílí přísun tekutin do tenkého střeva, což za 8 – 20 hod. po požití inkriminované potravin vyvolá příznaky (Görner a Valík, 2004). Alimentární intoxikace je charakterizovaná profuzními průjmy a kolikovými bolestmi (Schindler, 2014). Příznaky onemocnění vymizí zpravidla za 10 – 24 hod po jejich započetí. Komplikace se vyskytují zřídka, častěji pak u starších, nebo oslabených lidí (Görner a Valík, 2004).

Přímou, nebo nepřímou kontaminací půdy a vody fekáliemi se může tento mikroorganismus dostat i do potravin. Nejvíce u drůbeže a hovězího masa. Při porážce může dojít ke kontaminaci masa fekáliemi. Tepelné opracování při kulinářské úpravě často nestačí k devitalizaci spor. Naopak, tepelný šok může urychlit jejich naklíčení (Görner a Valík, 2004).

3.5.5 Bakterie rodu *Listeria*

Patogenními druhy pro člověka jsou *Listeria monocytogenes* a *Listeria ivanovii*. Listerie jsou primárně půdní bakterie, které jsou přítomné i ve stolici zdravých i nemocných zvířat a v menší míře i u zdravých lidí. Díky všudypřítomnosti se mohou listerie izolovat z různých syrových potravin, které přicházejí do styku s půdou a povrchovými vodami. Především mleté maso a drůbež jsou častými zdroji listerií. Při porážce zvířat může docházet ke kontaktu fekálií s JUT, nebo samotným masem. Toto nebezpečí není vysoké, protože se jedná o malé množství listerií – 10^2 KTJ · g⁻¹; a maso se konzumuje po tepelné úpravě (Görner a Valík, 2004).

L. monocytogenes je původcem listeriózy. Obvykle postihuje pacienty s oslabenou imunitou, nebo těhotné ženy. Může vést k bakteremii, potratu, meningitidě a meningokokové encefalitidě (Baker a kol., 2006).

Listerie přežívají v nedbale zahřátých potravinách a pomnožují se v kontaminované potravině i při chladničkových teplotách. Teplotní rozmezí jejich růstu je 4 – 45 °C. U pacientů způsobují monocytózu (Schindler, 2014).

3.5.6 Bakterie *Escherichia coli*

Bakteriální kmeny Enteroinvazivní *E. coli* a Enteropatogenní *E. coli* způsobují převážně potravinové nákazy a kmeny Enterotoxigenní *E. coli* a Enterohemoragická *E. coli* způsobují převážně potravinové toxikoinfekce (Görner a Valík, 2004).

EPEC *E. coli* je původcem průjmových infekcí. Produkuje dva toxiny, termolabilní LT a termostabilní ST. Infekce probíhá bez horečky, po adhezi fimbriemi s vodovými průjmy. EPEC *E. coli* způsobuje průjmy u novorozenců, často s krví, bez horečky, neprodukuje toxin, ale je mírně invazivní. EIEC *E. coli* se pomnožuje na sliznici. Onemocnění se podobá úplavici, ve stolici je hlen a krev. EAEC *E. coli*. bakterie neinvaduje, infekce je mírná. EHEC *E. coli* nejčastěji sérotyp O157:H7, je nebezpečný. Vyvolává hemoragickou kolitidu, ze které se může vyvinout smrtelný hemoragicko-uremický syndrom. Je charakterizován hemolytickou anemií, trombocytopenií a akutním selháním ledvin. Hlavními faktory je shiga toxin (verotoxin) (Schindler, 2014).

E. coli je původcem gastrointestinálních infekcí a infekcí CNS. Tyto gastrointestinální infekce jsou spojeny s horečkou, průjmem (může obsahovat i krev) a zvracením během několika dnů. To může způsobit těžké dehydratace, šok a smrt. Meningitida způsobená *E. coli* je pozorovaná u novorozenců a je charakterizována horečkou, ztuhlostí krku, zvracením, bolestmi hlavy, kómatem a smrtí (Baker a kol., 2006).

3.5.7 Bakterie rodu *Campylobacter*

Campylobacter jejuni kolonizuje sliznici tenkého i tlustého střeva a vyvolává zánětlivý průjem s horečkou. Vzácně způsobuje gastroenteritidu (Schindler, 2014).

Kampylobakteriózu způsobují *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni* a zřídka *Campylobacter fetus* ssp. *intestinalis*. Kampylobakterióza je akutní horečnatá gastroenteritida, charakterizovaná kolikovitými bolestmi břicha a průjmem. *Campylobacter jejuni* je jedním z nejčastějších původců průjmových onemocnění, které ve vyspělých zemích rovnoměrně postihuje všechny věkové kategorie, zatímco v tropických a méně rozvinutých krajinách postihuje zejména děti. U akutních gastroenteritid bývá inkubační doba 1 – 7 dní (Görner a Valík, 2004).

Pramenem nákazy jsou domácí zvířata, nejčastěji drůbež, i zdravá. Syndromy kampylobakteriózy zpravidla za několik dní odezní i bez léčení. Nemocný člověk vylučuje zárodky i několik týdnů po infekci. Léčba antibiotiky člověka rychle zbaví

kontagiozity. Kontaminace masa se může uskutečnit už intravitálně, nebo kontaminací při porážce (Görner a Valík, 2004).

V tabulce 2 jsou uvedeny minimální infekční dávky lidských střevních patogenů, které mohou pocházet z drůbežího masa.

Tabulka 2: Infekční dávky střevních patogenů (Forsythe, 2000).

Organismus	Odhadovaná minimální infekční dávka
<i>Salmonella ssp.</i>	$10^4 - 10^{10}$
<i>Y. enterocolitica</i>	10^7
<i>St. Aureus</i>	$10^5 \rightarrow 10^6 \cdot g^{-a}$
<i>Cl. Perfringens</i>	$10^6 - 10^7$
<i>E. coli</i>	$10^6 \rightarrow 10^7$
<i>E. coli</i> O157:H7	10 – 100
<i>C. jejuni</i>	1000

^aŽivotaschopný počet schopný vyprodukovat dostatečné množství toxinu pro fyziologickou odpověď.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

Jako druh drůbeže pro testování byla zvolena kuřata. Vzorky byly zakoupeny v 25 případech v tržní síti a v jednom případě v mobilní prodejně. Z celkového počtu 26 vzorků bylo 14 vyrobeno v České republice a zbylých 12 bylo vyrobeno v sedmi zemích EU. V pěti případech v Polsku, ve dvou případech na Slovensku a po jednom vzorku v Brazílii, Dánsku, Francii, Maďarsku a Velké Británii. Mrazených bylo osm vzorků a chlazených 18. Jako anatomická část odběru byla v osmi případech odebrána prsní svalovina a v 18 případech stehenní svalovina.

K analýze na rezidua veterinárních léčiv bylo použito 25 vzorků. Nebyl použit vzorek masa z Maďarska, protože testovací sada obsahovala 25 ampulí a netestovaný vzorek byl zakoupen až po vypočtení zmíněných ampulí.

Všechny vzorky byly analyzovány před vypršením doby spotřeby a skladovány dle pokynů výrobce.

4.1.1 Stanovení reziduí veterinárních léčiv

Po odebrání vzorků k mikrobiologické analýze byly odebrány vzorky pro stanovení reziduí veterinárních léčiv. Pro analýzu reziduí veterinárních léčiv bylo u všech 25 vzorků použito jako testovací metoda širokospektrální Premi® Test Art. No. R3900 25 ampulí. Souprava obsahovala ampule s testovacím agarem, pipetou pro dávkování masové šťávy a jednorázové špičky na pipetu.

4.1.2 Mikrobiologická analýza

Pro mikrobiologické hodnocení bylo vybráno 26 vzorků kuřecího masa z tržní sítě. Vždy byly zakoupeny tři vzorky od jednoho výrobce a jedné šarže. Hodnoceno bylo tuzemské i dovozkové kuřecí maso, dělená i celá kuřata a chlazená i mrazená kuřata. Mikrobiologickou analýzou se hodnotil celkový počet mikroorganismů, počet koliformních mikroorganismů, počet *E. coli*, počet psychrotrofních mikroorganismů, počet plísní a kvasinek. Mikrobiologický rozbor se prováděl v mikrobiologické laboratoři ústavu Technologie potravin na Mendelově univerzitě v Brně.

Do laboratoře byly vzorky převezeny bez prodlevy a v termo obalu, aby nebyl porušen chladicí řetězec.

Zmrazené vzorky byly nejprve rozmrazeny při teplotě 5 °C. Všechny vzorky byly do doby analýzy skladovány podle doporučení výrobce.

4.2 Metody

4.2.1 Přístrojové vybavení

- Laboratorní váhy, přesnost $\pm 0,01$ g, firma Schoeller instruments, s.r.o., Praha, ČR (navažování analyzovaného vzorku a práškových půd)
- Homogenizátor Bag Mixer, peristaltického typu, Paříž, Francie (homogenizace vzorku ve sterilních igelitových sáčcích po dobu 90 sekund)
- VORTEX MIXER, Itálie (promíchání naředěného vzorku)
- Parní sterilizátor SANYO-LABO AUTOCLAVE, maximální dosažitelná teplota 135 °C, Schoeller instruments, s.r.o., Praha, ČR (sterilizace uzavřených živných půd, nástrojů, skla a dekontaminace půd)
- Digestoř
- Tlakový hrnec (rozvaření a sterilizace kultivačních půd)
- Komorový termostat Gallenkamp, udržovaná teplota 30 °C, Schoeller instruments, s.r.o., Praha, ČR (inkubace naočkovaných živných půd)
- Komorový termostat Sanyo incubator, udržovaná teplota 37 °C, Schoeller, s.r.o., Praha, ČR (inkubace naočkovaných živných půd)
- Komorový termostat Julabo TW 20 (vodní lázeň), udržovaná teplota 45 °C, Schoeller, s.r.o., Praha, ČR (uchovávání teploty tekutých kultivačních médií)
- Počítačka kolonií, vybavena osvětlením a lupou, POL-EKO-APARATURA LKB 2002, EU (počítání kolonií na Petriho miskách)
- Jednorázové plastové Petriho misky, rozměr 90 x 100 mm
- Laboratorní sklo – 1 ml, 5 ml, 10 ml pipety, odměrné válce, zkumavky, kádinky, 250 ml a 500 ml skleněné lahve
- Myčka nádobí (omytí použitého laboratorního skla)
- Ostatní – skalpely, pinzety, mikrotenové sáčky, alobal, odměrky, hokejky

4.2.2 Premi® Test

Po mikrobiologické analýze se odebíraly vzorky k vyšetření na rezidua veterinárních léčiv. Sterilním skalpelem a pinzetou byla odebrána svalovina. Svalovina byla vložena

do sterilního ručního nerezového lisu na česnek (dle doporučení výrobce) a opatrným stlačením byla z masa vylišována šťáva do sterilní zkumavky. Ze zkumavky bylo odebráno stříkačkou s jednorázovou špičkou, která byla součástí balení Premi® Testu, 100 µl masové šťávy. Vzorek šťávy byl převeden do ampule Premi® Test s testovacím médiem, tak aby nepoškodil testovací agar. Takto připravená ampule byla ponechána po dobu 20 min. při laboratorní teplotě. Za 20 min. byla ampule s aplikovanou masovou šťávou čtyřikrát propláchnuta demineralizovanou vodou tak, aby nebyl poškozen testovací agar. Ampule byly uzavřeny fólií. Takto naočkované ampule byly přeneseny do termostatu nastaveného na 64 °C a inkubovány 3 – 4 hod. Po třech hodinách byly ampule zkontrolovány. Ty ampule, které změnilly barvu z původní fialové na žlutou, vykazovaly nepřítomnost antibiotik ve vzorku. Ty ampule, které měly stále původní fialovou barvu nebo fialovo-žlutou barvu, byly ponechány v termostatu po celkovou dobu čtyř hodin. Poté byla odečtena barevná změna testovacího média. Fialově zabarvené médium představuje pozitivní reakci na přítomnost antibiotik.

4.2.3 Mikrobiologická analýza

Nejprve byly odebrány vzorky masa k mikrobiologickému vyšetření. Každý obal výrobku byl v místě otevření očištěn 70% lihem. Obal byl otevřen skalpelem tak, aby obalový materiál nekontaminoval surovinu. Vzorky masa byly odebrány sterilním skalpelem a pinzetou. Vzorek masa byl navažován do plastových sáčků po 10 g. Do sáčků bylo přidáno 90 ml sterilního fyziologického roztoku a celý obsah se ponechal 90 s homogenizovat. Roztok v sáčku tak představoval ředění 10^{-1} . Roztok se naředil do připravených zkumavek s 9 ml sterilního fyziologického roztoku. Přidáním 1 ml roztoku ze sáčku do 9 ml fyziologického roztoku se po promíchání vortexem dosáhne ředění 10^{-2} . Takto se pokračovalo v ředění až po dosažení finálního ředění 10^{-4} .

Na předem označené Petriho misky bylo napipetováno 1 ml roztoku požadovaného ředění a zalito příslušným agarem. Pro celkový počet mikroorganismů byl použit Plate Count Agar, pro psychrotrofní mikroorganismy Plate Count Agar with skimmed milk, pro plísně a kvasinky Dihloran Bengal Rose Chloramphenicol agar, pro koliformní mikroorganismy a *E. coli* ChromoCult® Coliform agar.

4.2.4 Příprava živných půd

Pro kultivaci vybraných skupin mikroorganismů byly použity dehydratované živné půdy pro celkový počet mikroorganismů Plate Count Agar, pro psychrotrofní Plate

Count Agar with skimmed milk, pro koliformní mikroorganismy a *E. coli* Chromocult Coliform Agar, pro plísňe a kvasinky Dichloran Bengal Rose Chloramphenicol agar.

4.2.4.1 Plate Count Agar (PCA)

Kultivační půda PCA (Biokar Diagnostics, Francie) se využívá pro stanovení celkového počtu mezofilních mikroorganismů, podle ČSN 4833.

PCA se připravuje navážením 20,5 g dehydratované směsi na přípravu 1 l destilované, nebo demineralizované vody. Přesná navážka se vypočítá podle potřebného množství půdy. Na jednu Petriho misku je zapotřebí 10 – 15 ml média. Takto připravený agar se steriluje při 121 °C 15 min. v autoklávu.

Připravené a naředěné vzorky určené ke stanovení celkového počtu mikroorganismů se inokulují na označenou Petriho misku o objem inokula 1 ml. Inokulum se zalévá agarem o teplotě 44 – 47 °C. Agar se na Petriho miskách nechá zatuhnout a inkubuje se pro CPM při 30 °C po dobu 72 hod. Vyrostlé kolonie se počítají na automatické počítače. Pro odečet se vybírají misky, kde narostlo méně než 300 kolonií. U takových misek se počítají všechny kolonie mikroorganismů.

Složení Plate Count Agar ($\cdot l^{-1}$)

- | | |
|------------------------|--------|
| • Trypton | 5,0 g |
| • Kvasniční extrakt | 2,5 g |
| • Glukóza | 1,0 g |
| • Bakteriologický agar | 12,0 g |

4.2.4.2 Plate Count Agar with skimmed milk (PCA)

Kultivační půda PCA (Biokar Diagnostics, Francie) se využívá pro stanovení psychrotrofních mikroorganismů, podle ČSN ISO 17410.

PCA se připravuje navážením 20,5 g dehydratované směsi na přípravu 1 l destilované, nebo demineralizované vody. Přesná navážka se vypočítá podle potřebného množství půdy. Na jednu Petriho misku je zapotřebí 10 – 15 ml média. Takto připravený agar se steriluje při 121 °C 15 min. v autoklávu.

Připravené a naředěné vzorky určené ke stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů se inokulují na označenou Petriho misku o objem inokula 1 ml. Inokulum se zalévá agarem o teplotě 44 – 47 °C. Agar se na Petriho miskách nechá zatuhnout a inkubuje se pro psychrotrofní mikroorganismy při 6,5 °C po dobu 10 dnů.

Vyrostlé kolonie se počítají na automatické počítače. Pro odečet se vybírají misky, kde narostlo méně než 300 kolonií. U takových misek se počítají všechny kolonie mikroorganismů.

Složení Plate Count Agar ($\cdot l^{-1}$)

- Trypton 5,0 g
- Kvasniční extrakt 2,5 g
- Glukóza 1,0 g
- Sušené odtučněné mléko 1,0 g
- Bakteriologický agar 12,0 g

4.2.4.3 *Dichloran Bengal Rose Chloramphenicol agar*

Kultivační půda DBRC (Biokar Diagnostics, Francie) se využívá pro stanovení plísní a kvasinek. Tato metoda stanovení plísní a kvasinek je doporučena podle standardu normy ISO 21527-1 z prosince 2008.

DBRC se připravuje navážením 30,0 g dehydratované směsi na přípravu 1 l destilované, nebo demineralizované vody. Přesná navážka se vypočítá podle potřebného množství půdy. Na jednu Petriho misku je zapotřebí 10 – 15 ml média. Takto připravený agar se steriluje při 121 °C 15 min. v autoklávu.

Připravené a naředěné vzorky určené ke stanovení počtu plísní a kvasinek se inokulují na označenou Petriho misku o objemu inokula 1 ml. Inokulum se zalévá agarem o teplotě 44 – 47 °C. Agar se na Petriho miskách nechá zatuhnout a inkubuje se pro plísně a kvasinky při teplotě (25 ± 1 °C) dobu 2 – 5 dnů. Vyrostlé kolonie se počítají na automatické počítače. Počítají se misky, které obsahují méně než 300 kolonií. U takových misek se počítají všechny narostlé kolonie.

Složení Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar ($\cdot l^{-1}$)

• Polypepton	5,0 g
• Glukóza	10,0 g
• Dihydrogenfosforečnan draselný	1,0 g
• Síran hořečnatý, 7H ₂ O	0,5 g
• Dichloran (dichloro-2,6-nitro-4-anilín	2,0 mg
• Bengalská červeň	25,0 mg
• Chloramfenikol	50,0 mg
• Chloramfenikol chlorhydrát	50,0 mg
• Síran zinečnatý, 7H ₂ O	10,0 mg
• Síran měďnatý, 5H ₂ O	5,0 mg
• Tergitol	1,0 ml
• Agar	12,4 g

4.2.4.4 *ChromoCult® Coliform agar*

Kultivační půda ChromoCult® Coliform agar (Merck, Německo) se používá ke stanovení počtu koliformních mikroorganismů a *E. coli*.

ChromoCult® Coliform agar se připravuje navážením 26,5 g dehydratované směsi na 1 l destilované, nebo demineralizované vody. Přesná navážka se vypočítá podle potřebného množství půdy. Na jednu Petriho misku je zapotřebí 10 – 15 ml média. Takto připravený agar se steriluje při 121 °C 15 min. v autoklávu.

Připravené a naředěné vzorky určené ke stanovení počtu plísni a kvasinek se inokulují na označenou Petriho misku o objemu inokula 1 ml. Inokulum se zalévá agarem o teplotě 45 – 50 °C. Agar se na Petriho miskách nechá zatuhnout a inkubuje se pro koliformní mikroorganismy a *E. coli* při 37 °C 24 hod. Počítány jsou misky s méně než 300 KTJ na automatické počítače kolonií. U takových misek se počítají zvlášť růžové kolonie koliformních mikroorganismů a modro-fialové kolonie tvořící *Escherichia coli*.

Složení ChromoCult® Coliform agar ($\cdot l^{-1}$)

- Pepton 3,0 g
- Chlorid sodný 5,0 g
- Dihydrogenfosforečnan sodný 2,2 g
- Hydrogenfosforečnan disodný 2,7 g
- Pyruvát sodný 1,0 g
- Tryptofan 1,0 g
- Sorbitol 1,0 g
- Bakteriologický agar 10,0 g

4.2.5 Vyjádření výsledků

Výsledek se vyjádří jako celkový počet mikroorganismů na ml (g) výrobku jako číslo 1,0 až 9,9 násobené 10^x (x je příslušná mocnina 10). Jednotky jsou KTJ (kolonie tvořící jednotky) nebo CFU (colony forming units).

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

$\sum C$ součet všech kolonií spočítaných na vybraných půdách

n_1 počet ploten použitý pro výpočet z prvního ředění

n_2 počet ploten použitých pro výpočet z druhého ředění

d první pro výpočet použité ředění

4.2.6 Statistické metody

Vyhodnocení výsledků analýz bylo zpracováno pomocí softwaru Statistica 10. Takto byly získány statistické popisné charakteristiky, jako je průměr a směrodatná chyba průměru. Dále byla použita metoda jednoduchého třídění analýzy rozptylu (ANOVA).

5 VÝSLEDKY

Primárním cílem diplomové práce bylo stanovit rezidua veterinárních léčiv v kuřecím mase screeningovými metodami. Pro stanovení reziduí antibiotik byl použit Premi® Test, který stanoví rezidua ATB na základě detekčních limitů uvedených v tabulce 5. Maximální limity reziduí platné v EU, tedy i v ČR jsou uvedeny v tabulce 4.

Dalším úkolem práce bylo stanovit kontaminaci kuřecího masa pro CPM, koliformní mikroorganismy, *E. coli*, psychrotrofní mikroorganismy, plísňe a kvasinky. Dále byl porovnán rozdíl v mikrobiální kontaminaci na základě původu (ČR, dovoz), anatomické části (prsí svalovina, stehenní svalovina) a způsobu skladování (chlazené, mrazené).

5.1 Rezidua veterinárních léčiv

Výsledkem analýzy reziduí veterinárních léčiv je barevná odezva testovacího média, kdy pozitivní vzorek je zbarven fialově a negativní žlutě.

V tabulce 3 jsou uvedeny výsledky testů na rezidua veterinárních léčiv ve vzorcích kuřecího masa. Z výsledků vyplývá, že pozitivní vzorky pocházely ze zahraničí. Konkrétně vzorek z Dánska a jeden vzorek z Polska. Pozitivním vzorkem se rozumí takový, který překročil maximální limit reziduí veterinárních léčiv povolených v EU. V tomto výsledná barva agaru po kultivaci v termostatu byla fialová, zatímco negativní vzorek vykazoval žluté zbarvení.

Tabulka 3: Výsledky odečtů barevných změn testovacího agaru širokospektrálního screeningového testu Premi® Test.

číslo vzorku	Země původu	Výsledek testu
1	Dánsko	Pozitivní
2	Česká republika	Negativní
3	Polsko	Pozitivní
4	Česká republika	Negativní
5	Francie	Negativní
6	Slovensko	Negativní
7	Polsko	Negativní
8	Česká republika	Negativní
9	Slovensko	Negativní
10	Česká republika	Negativní
11	Polsko	Negativní
12	Brazílie	Negativní
13	Česká republika	Negativní
14	Česká republika	Negativní
15	Česká republika	Negativní
16	Česká republika	Negativní
17	Česká republika	Negativní
18	Polsko	Negativní
19	Velká Británie	Negativní
20	Česká republika	Negativní
21	Česká republika	Negativní
22	Česká republika	Negativní
23	Česká republika	Negativní
24	Česká republika	Negativní
25	Polsko	Negativní

Na obrázku 1 je ukázána rozdílná barevná reakce testovacího média u pozitivního i negativního vzorku masa na přítomnost překročeného maximálního limitu reziduí veterinárních léčiv.



negativní vzorek



pozitivní vzorek

Obrázek 1: Barevná odezva testovacího agaru na přítomnost MLR antimikrobiálních látek (R-Biopharm AG, 2010).

Důvodem zjištění překročení MLR v kuřecím mase může být nedodržení ochranných lhůt chovatelem drůbeže. Jiným důvodem může být úmyslná aplikace veterinárních léčiv pro zvýšení efektivity výkrmu.

Tabulka 4: Maximální limity reziduí antibiotik pro svalovinu kuřat (Nařízení Komise (EU) 37/2010).

Antibiotika	MLR pro svalovinu [µg/kg]	Antibiotika	MLR pro svalovinu [µg/kg]
peniciliny		aminoglykosidy	
amoxicilin	50	kanamycin	100
ampicilin	50	neomycin (včetně framycetinu)	500
benzylpenicilin	50	paromomycin	500
kolaxacilin	300	spektinomycin	300
dikloxacin	300	polymyxiny	
oxacilin	300	kolistin	150
fenoxyethylpenicilin	25	pleuromutiliny	
chinolony		tiamulin	100
danofloxacin	200	linkosamidy	
difloxacin	300	linkomycin	100
enrofloxacin	100	ionofory	
flumekvin	400	lasalocid	20
kyselina oxolinová	100	sulfonamidy	
makrolidy		suma všech	100
erythromycin	200	aminoglykosidy	
spiramycin	200	neomycin	500
tilmikosin	75	jiná	
tylosin	100	trimethoprim	50
thiamfenikol	50	zakázané látky	
florfenikol	100	chloramfenikol	nelze stanovit MLR
tetracykliny		chloroform	nelze stanovit MLR
chlortetracyklin	100	chlorpromazin	nelze stanovit MLR
doxycyklin	100	kolchicin	nelze stanovit MLR
oxytetracyklin	100	dapson	nelze stanovit MLR
tetracyklin	100	dimetridazol	nelze stanovit MLR
orthosomiconová		metronidazol	nelze stanovit MLR
avilamycin	50	nitrofurany (včetně furazolidonu)	nelze stanovit MLR
		ronidazol	nelze stanovit MLR

V tabulce 4 jsou vypsány hodnoty maximálních limitů reziduí pro antibiotika ve svalovině kuřat podle Nařízení Komise (EU) 37/2010 včetně seznamu látek zakázaných, pro která nelze stanovit MLR. Překročením těchto limitů nesmí být maso kuřat nabízeno k lidské spotřebě.

Tabulka 5: Detekční limity testovací soupravy Premi® Test.

Antibiotikum	detekce u kuřat [µg/kg]	Antibiotikum	detekce u kuřat [µg/kg]
peniciliny		aminoglykosidy	
amoxicilin	5	gentamicin	100
ampicilin	5	streptomycin	1500
benzylpenicilin	3	neomycin	300
makrolidy		chinolony	
tylosin	50	enrofloxacin	>600
erythromycin	100	flumekvin	>100
linkomycin	100	polypeptidy	
tilmikosin	50	virginamycin	500
spiramycin	1000	bacitacin	500
tetracykliny		Zn-bacitracin	1250
chlortetracyklin	100	kolistin	>1000
oxytetracyklin	100	ionofory	
doxycyklin	100	salinomycin	1000
sulfonamidy		monensin	1250
sulfamethazin	75	orthosomicinová	
sulfadiazin	75	avilamycin	>5000
sulfaguanidin	<200	ostatní	
sulfapyridin	<50	florfenikol	100
sulfamethoxypyridin	<100	chloramfenikol	2500
sulfisoxazol	<100	trimethoprim	50
sulfathiazol	<100	narasin	1250
sulfachlorpyridazin	<100	amprolium	>2000
sulfamerazin	<100	fosfomycin	>1500
sulfanilamid	<100	furalozidon	>1500
sulfaquinoxalin	<100	cefalosporiny	
sulfametiozol	<100	cefchinom	75
		ceftiofur	100

V tabulce 5 jsou uvedeny detekční limity testovací soupravy pro antibiotika kuřecího masa. Hodnoty některých antibiotik se liší od hodnot daných Nařízením EU 37/2010, protože není možné dosáhnout stoprocentní citlivosti všech antibiotik společně v požadovaných koncentracích. Proto je třeba výsledky ověřit i jinými testy pro vyloučení falešně pozitivních výsledků.

5.2 Mikrobiální kontaminace s ohledem na původ kuřecího masa

Celkový počet mikroorganismů se u vzorků kuřat pocházejících z ČR a zahraničí nelišil ($p > 0,05$). Počty mikroorganismů u kuřat pocházejících z ČR byly $4,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($6,3 \cdot 10^4 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$) a u dovozových kuřat $4,4 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($2,6 \cdot 10^4 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$). Rozdíl byl ovšem zaznamenán u všech ostatních sledovaných skupin mikroorganismů ($p < 0,05$).

U kuřat původem z České republiky byl detekován vyšší ($p < 0,05$) počet psychrotrofních mikroorganismů, $4,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($3,1 \cdot 10^4 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$), oproti dovozovému kuřecímu masu ze zahraničí, které obsahovalo $3,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($3,2 \cdot 10^3 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$).

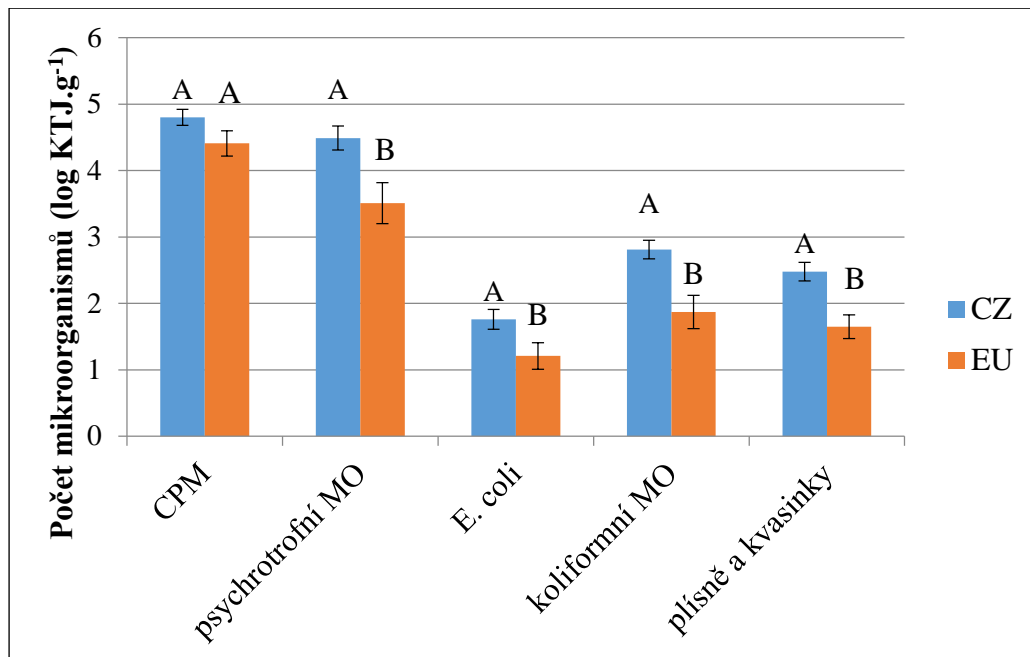
Přítomnost *E. coli* se potvrdila vyšší ($p < 0,05$) u českých kuřat, kde bylo přítomno $1,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($5,8 \cdot 10^1 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$), oproti zahraničním s výskytem $1,2 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($1,6 \cdot 10^1 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$).

Vyšší ($p < 0,05$) hodnota kontaminace byla zaznamenána u koliformních mikroorganismů kuřecího masa pocházejícího z České republiky, tedy $2,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($6,5 \cdot 10^2 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$). U dovozového kuřecího masa jsou hodnoty $1,9 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($7,4 \cdot 10^1 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$).

U plísní a kvasinek, které byly hodnoceny společně, dosahují česká kuřata hodnot $2,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($3,0 \cdot 10^2 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$). Kuřecí maso původem ze zahraničí vykazovalo nižší ($p < 0,05$) hodnoty $1,7 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($4,5 \cdot 10^1 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$).

Grafické porovnání mikrobiologických hodnot kuřecího masa původem z České republiky a Evropy je znázorněno na obrázku 2.

Důvodem lepších výsledků mikrobiální kontaminace u drůbeže pocházející ze zahraničí může být, že se v zahraničí někdy uplatňují dekontaminující postupy pro snížení mikrobiální kontaminace drůbežního masa. O použití takových postupů jsme však neměli informace. Tyto metody jsou více popsány v kapitole 3.4.6.1.



Obrázek 2: Porovnání mikrobiální kontaminace [KTJ · g⁻¹] u vzorků pocházejících z České republiky a zahraničí. Průměry označené A a B se v rámci daného faktoru statisticky liší ($p < 0,05$, $n_{CZ} = 42$; $n_{EU} = 36$).

5.3 Mikrobiální kontaminace v závislosti na způsobu skladování

U všech mikrobiologicky testovaných skupin mikroorganismů bylo více ($p < 0,05$) mikrobiálně kontaminované chlazené kuřecí maso.

Co se týká CPM, byly naměřeny nižší ($p < 0,05$) hodnoty pro mrazené kuřecí maso $3,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($6,3 \cdot 10^3 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$). Oproti hodnotám u chlazeného kuřecího masa $5,0 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($9,6 \cdot 10^4 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$).

Psychrotrofní mikroorganismy byly zjištěny ve vyšším ($p < 0,05$) počtu u chlazeného kuřecího masa s hodnotami $4,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($6,2 \cdot 10^4 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$). Zatímco u mrazeného masa byly zjištěny hodnoty $2,4 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($2,3 \cdot 10^2 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$).

Vyšší ($p < 0,05$) kontaminace *E. coli* byla zjištěna u chlazeného kuřecího masa $1,7 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($5,1 \cdot 10^1 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$). U mrazeného kuřecího masa byly naměřeny hodnoty $1,0 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($1,1 \cdot 10^1 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$).

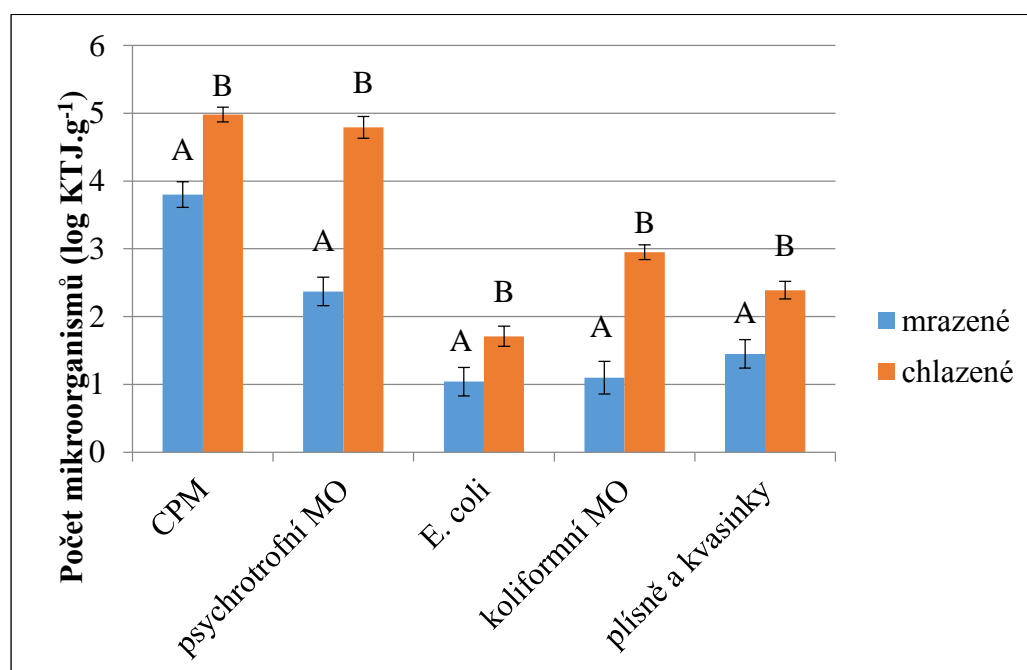
Hodnoty koliformních mikroorganismů sledovaných v kuřecím maso byly zjištěny jako vyšší ($p < 0,05$) u chlazeného kuřecího masa s hodnotami $2,9 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($8,3 \cdot 10^2 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$). Přítomnost koliformních mikroorganismů v mrazeném kuřecím maso byla naměřena hodnotami $1,1 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($1,3 \cdot 10^1 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$).

Co se týká plísní a kvasinek, vyšší počty ($p < 0,05$) byly zjištěny u chlazeného kuřecího masa s hodnotami $2,4 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($2,5 \cdot 10^2 \cdot \text{g}^{-1}$). Hodnoty zjištěné u mrazeného kuřecího masa byly $1,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($2,8 \cdot 10^1 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$).

Grafické porovnání mikrobiologických hodnot kuřecího masa chlazeného a mrazeného je znázorněno na obrázku 3.

Pro všechny testované skupiny bylo statisticky prokázáno ($p < 0,05$) chlazené kuřecí maso jako mikrobiologicky kontaminovanější ve srovnání s mrazeným masem, což může být způsobeno inhibicí většinové mikroflóry kuřecího masa při mrazírenském skladování. Druhým důvodem může být nedodržení chladicího řetězce u chlazeného drůbežního masa, které je navíc často nabízeno k prodeji v otevřených chladících pultech, oproti uzavřeným mrazákům, u kterých je tedy lépe zajištěna tepelná stabilita.

U mikroorganismů obecně platí, že mrazírenské teploty inhibují většinovou mikroflóru. Počáteční mikroflóra po jatečném opracování se tedy množí pomaleji, oproti mikroflóře v chlazeném masu.



Obrázek 3: Porovnání mikrobiální kontaminace [$\text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$] u vzorků skladovaných při chladírenských a mrazírenských teplotách. Průměry označené A a B se v rámci daného faktoru statisticky liší ($p < 0,05$, $n_{\text{mrazené}} = 24$; $n_{\text{chlazené}} = 54$).

5.4 Mikrobiální kontaminace v závislosti na anatomické části kuřete

Rozdíl v mikrobiální kontaminaci u stehenní, nebo prsní svaloviny byl zaznamenán v případě koliformních mikroorganismů, plísní a kvasinek ($p < 0,05$).

Zjištěné hodnoty CPM byly srovnatelné ($p > 0,05$), pro stehenní svalovinu hodnoty odpovídaly kontaminaci $4,7 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($5,0 \cdot 10^4 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$). Hodnoty kontaminace prsní svaloviny odpovídaly $4,4 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($2,3 \cdot 10^4 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$).

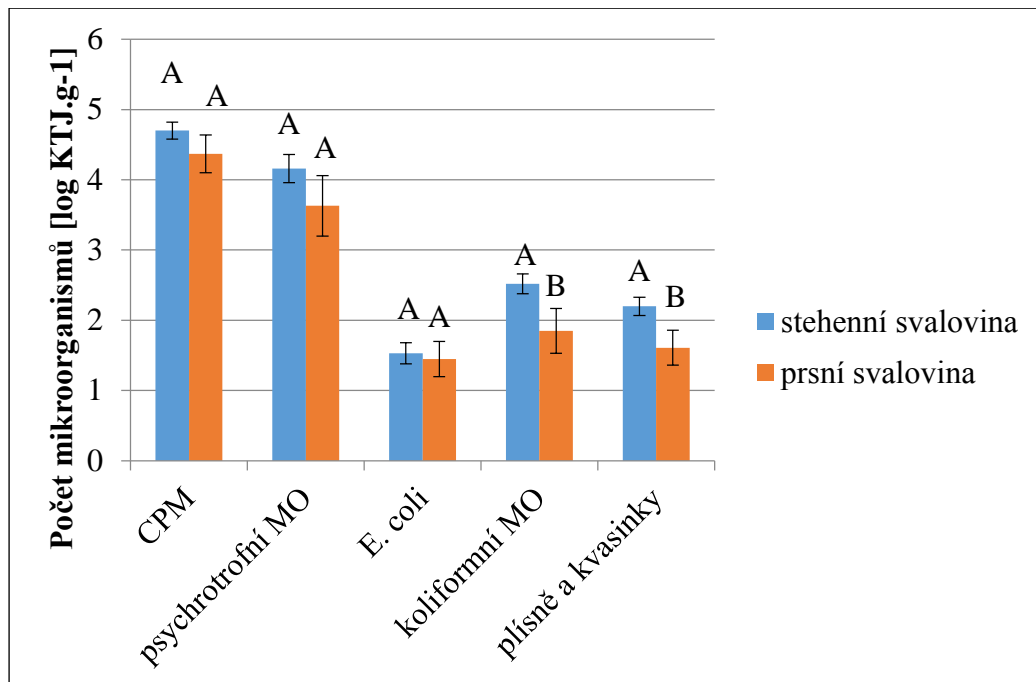
Kontaminace psychrotrofními mikroorganismy byla srovnatelná ($p > 0,05$) a dosahovala hodnot pro stehenní svalovinu $4,2 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($1,5 \cdot 10^4 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$) a prsní svalovinu $3,6 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($4,3 \cdot 10^3 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$).

Rozdíl nebyl zjištěn ani v případě *E. coli* ($p > 0,05$), kde u stehenní svaloviny bylo zjištěno $1,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($3,4 \cdot 10^1 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$) a v případě prsní svaloviny $1,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($2,8 \cdot 10^1 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$).

Hodnoty koliformních mikroorganismů se lišily v závislosti na hodnocené anatomické části kuřete ($p < 0,05$). Zjištěné počty pro stehenní svalovinu byly $2,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($3,3 \cdot 10^2 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$), oproti prsní svalovině $1,9 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($7,1 \cdot 10^1 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$).

Rozdíl ($p < 0,05$) byl zaznamenán také v případě plísní a kvasinek. Hodnota kontaminace stehenní svaloviny byla $2,2 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($1,6 \cdot 10^2 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$). U prsní svaloviny byla zjištěna kontaminace $1,6 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ($4,1 \cdot 10^1 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$).

Grafické porovnání mikrobiální kontaminace dvou anatomických částí JUT kuřete, kuřecí prsní svaloviny a kuřecí stehenní svaloviny, je znázorněno na obrázku 4.



Obrázek 4: Porovnání mikrobiální kontaminace [KTJ · g⁻¹] u vzorků pocházejících z odlišných anatomických částí JUT kuřete. Průměry označené A a B se v rámci daného faktoru statisticky liší ($p < 0,05$, $n_{\text{stehenní svalovina}} = 54$; $n_{\text{prsňí svalovina}} = 24$).

6 DISKUSE

Sledováním reziduí antibiotik a jejich maximálních limitů reziduí se v České republice zabývá Státní veterinární správa, která odhalila překročení MLR doxycyklinu u mrazených kuřecích prsou původem z Dánska (SVS, 2013) a MLR rezidua chloramfenikolu u kuřecího masa původem z České republiky (SVS, 2007). Chloramfenikol patří mezi zakázané látky, tedy jeho rezidua se nesmí v kuřecím mase vyskytovat vůbec.

Na evropské úrovni sleduje problematiku výskytu překročených reziduí veterinárních léčiv RASFF – Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva. Podle tohoto systému obsahovaly mrazené kuřecí filety původem z České republiky vyšší hodnoty doxycyklinu, než je MLR, a to v roce 2005 (RASFF, 2005).

Problematika reziduí veterinárních léčiv se netýká pouze drůbežního masa, ale všech živočišných produktů. Z výročních zpráv (RASFF, 2013) bylo v roce 2013 ze všech přijatých oznámení 14,0 % týkajících se reziduí veterinárních léčiv. Chlazené vepřové maso původem z Belgie obsahovalo nadlimitní hodnoty sulfondiazinu (RASFF, 2013) nebo výrobky z kuřecího masa původem z Polska obsahovaly nadlimitní hodnoty doxycyklinu (RASFF, 2013). V roce 2014 RASFF přijalo čtyři oznámení týkající se veterinárních léčiv. Jedním z častěji se vyskytujících bylo oznámení o korýších a jejich produktech původem z Vietnamu (RASFF, 2014).

Rezidua antibiotik v potravinách představují riziko pro konzumenta z hlediska vývoje rezistentních kmenů mikroorganismů, přecitlivělou reakci u citlivých jedinců (Nisha, 2008; Vollard a Clasener, 1994) a narušení přirozené střevní mikroflóry (Jones, 1999; Cunha, 2001). Některá léčiva mohou vyvolat toxické reakce (Paige a kol., 1997). Nepřímé a dlouhodobé představuje karcinogenita, reprodukční toxicita a teratogenita (Novais a kol., 2010).

Podle už neplatné vyhlášky 132/2004 by počet koliformních mikroorganismů neměl přesahovat hodnotu 10^4 KTJ \cdot g⁻¹. Ve výsledcích tuto hodnotu překračují dva dílčí vzorky ze dvou analyzovaných vzorků původem z Polska. V obou případech se jedná o chlazená kuřecí prsa.

Co se týká mikrobiologické kvality, podle ČSN 56 9609 (2008) se u masa drůbeže může pouze u dvou vzorků z pěti vyskytovat bakterie *E. coli* v hodnotách $5 \cdot 10^2$, jinak se nepřipouští přítomnost této bakterie. Úplnou nepřítomnost bakterie *E. coli*

vykazovaly dva vzorky, oba byly zmrazeny a původem ze Slovenska. V jednom případě byla analyzována prsní svalovina a v druhém případě stehenní svalovina. Hodnota *E. coli* pod $5 \cdot 10^2$ byla zjištěna celkem u 11 vzorků. U zbylých 13 vzorků byla alespoň u jednoho ze tří dílčích vzorků překročena hodnota $5 \cdot 10^2$.

Ze studie Shareef a kol. (2012) zaměřené na sledování mikroorganismů ve zmrazených kuřecích stehnech byla zjištěna přítomnost celkového počtu mikroorganismů $4,8 \pm 0,35 \log \text{KTJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ u vzorků pocházejících z Iráku. U mrazených kuřecích stehen dovezených do Iráku byla hodnota celkového počtu mikroorganismů nižší s hodnotou $3,8 \pm 0,25 \log \text{KTJ} \cdot \text{cm}^{-2}$. Námi zjištěné hodnoty ($3,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$) zmrazeného kuřecího masa jsou srovnatelné s hodnotami studie Shareef a kol., (2012) u do Iráku dovezeného kuřecího masa. V případě, že srovnáme námi zjištěné výsledky celkového počtu mikroorganismů stehenní svaloviny $4,7 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ s výsledkem Shareef a kol. (2012), hodnoty jsou si více podobné se vzorky z Iráku. Přepočítáním výsledků pro námi hodnocená mrazená kuřecí stehna ($n = 15$) odpovídá výsledek pro CPM $4,0 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$.

Al-Groom a Abu Shaqra (2013) se zaměřili na testování mikrobiologické kvality mrazeného kuřecího masa. Ze studie vyplývá, že hodnoty celkového počtu mikroorganismů pro mrazená kuřecí stehna byla menší, než $10^4 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. U celých kuřat hodnota kontaminace byla menší než $2,9 \cdot 10^4 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Námi zjištěné výsledky pro celkový počet mikroorganismů stehenní svaloviny jsou vyšší, a to $5,0 \cdot 10^4 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ oproti studii. Zatímco hodnoty pro mrazené kuřecí maso $6,3 \cdot 10^3 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ jsou nižší, než uvedené ve studii. Hodnota celkového počtu mikroorganismů pro mrazená kuřecí stehna ($n = 15$) odpovídá $9,3 \cdot 10^3 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, což odpovídá výsledkům ze studie Al-Groom a Abu Shaqra (2013).

Hodnoty koliformních mikroorganismů ze studie Al-Groom a Abu Shaqra (2013) jsou menší než $2,9 \cdot 10^2 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ pro celá mrazená kuřata a méně než $10^2 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ pro mrazená kuřecí stehna. Námi naměřené výsledky obecně pro mrazené kuřecí maso dosahují nižší hodnoty kontaminace koliformními mikroorganismy $1,3 \cdot 10^1 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ a pro kuřecí stehna obecně hodnoty $3,3 \cdot 10^2 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Pro mrazená kuřecí stehna ($n = 15$) byla kontaminace koliformními mikroorganismy $3,1 \cdot 10^2 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Což je více, než zjistili Al-Groom a Abu Shaqra (2013) ve své studii.

Mikrobiologický profil chlazeného kuřecího masa hodnotil Cohen a kol. (2007) u masa z tržní sítě supermarketů v závislosti na ročním období. V horkém období ($25 - 39 \text{ }^\circ\text{C}$) byl celkový počet mikroorganismů $5,9 \pm 0,6 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, zatímco

v chladném (5 – 20 °C) období $4,5 \pm 0,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Námi změřené hodnoty CPM pro chlazené kuřecí maso $5,0 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ jsou vyšší než v případě testovaných kuřat v chladném období od Cohen a kol. (2007). Kontaminace koliformními mikroorganismy v horkém období se pohybovala $3,6 \pm \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ a v chladném období $2,6 \pm 0,4 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Výsledná hodnota pro *E. coli* v horkém období se pohybovala v hodnotách $2,5 \pm 0,6$ a v chladném období $1,6 \pm 0,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Námi naměřené výsledky hodnot kontaminace koliformními mikroorganismy $2,9 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ a pro *E. coli* $1,7 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ jsou mezi srovnávanými. Přitom námi testované vzorky byly testovány v období březen až duben, kdy se teplota vzduchu pohybovala průměrně mezi 2 – 11 °C v březnu a 4 – 16 °C v dubnu (CHMU, 2016), tedy bylo chladněji oproti chladnému období podle Cohen a kol. (2007).

Abdel-Rahman a kol. (2008) porovnávali mikrobiologický profil mrazeného kuřecího masa původem z Japonska, nebo dovozového do Japonska. Celkový počet mikroorganismů u celých kuřat původem z Japonska byl $5,2 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, u importovaných do Japonska byla hodnota $3,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Výsledky našeho měření pro CPM mrazeného kuřecího masa jsou srovnatelné s do Japonska dováženým mrazeným kuřecím masem, tedy $3,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Hodnoty koliformních mikroorganismů pro Japonská celá kuřata $4,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ a dovozová do Japonska $2,2 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Námi zjištěná hodnota koliformních mikroorganismů pro mrazené kuřecí maso je nižší, tedy $1,1 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, v porovnání se studií Abdel-Rahman a kol.

Hodnoty celkových počtů mikroorganismů pro mrazená kuřecí prsa z Japonska $4,3 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ je o málo nižší oproti námi získané hodnotě $4,4 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ pro kuřecí prsa, ovšem vyšší oproti mrazenému kuřecímu masu s hodnotou $3,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Ovšem námi zjištěná hodnota celkového počtu mikroorganismů pro mrazená kuřecí prsa ($n = 27$) byla $3,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, což je méně i ve srovnání s do Japonska dováženými mrazenými kuřecími prsy s hodnotou pro CPM $3,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Kontaminace koliformními mikroorganismy mrazených kuřecích prsou z Japonska $4,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ a mimo Japonsko $1,90 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, proti námi změřené hodnotě $1,9 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ pro kuřecí prsa, $1,1 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ pro mrazené kuřecí maso a pro mrazená kuřecí prsa $1,3 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, ($n = 27$). Mrazená stehenní svalovina původem z Japonska vykazovala hodnoty pro CPM $5,1 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, dovozová mrazená kuřecí stehna $3,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ a hodnota z našeho měření byla $3,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ pro mrazené kuřecí maso, $4,7 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ pro kuřecí stehna a $4,0 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ pro mrazená kuřecí stehna ($n = 15$). Což je méně ve srovnání s kuřecím masem z Japonska. Kontaminace

koliformními mikroorganismy v případě japonských mrazených kuřecích stehen $4,6 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ a importovaných $1,2 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ve srovnání s naším výsledkem $1,1 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ pro mrazené kuřecí maso, $2,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ pro kuřecí stehna a $2,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ pro mrazená kuřecí stehna ($n = 15$) (Abdel-Rahman a kol. 2008).

Kozačinski a kol. (2006) analyzovali kuřecí prsa s kůží i bez kůže na celkový počet mikroorganismů. U kuřecích prsou bez kůže byly naměřeny hodnoty CPM $4,72 \pm 0,38 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ a u kuřecích prsou s kůží $3,7 \pm 0,88 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Námí zjištěná hodnota pro CPM kuřecích prsou byla $4,4 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$.

Álvarez-Astroga a kol. (2002) hodnotili kuřecí stehna bez kůže z hlediska CPM, počtu psychrotrofních mikroorganismů, koliformních mikroorganismů a *E. coli*. Hodnota celkového počtu mikroorganismů u kuřecích stehen byla $5,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, psychrotrofních mikroorganismů $7,1 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, koliformních mikroorganismů $3,6 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ a *E. coli* $2,6 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Ve srovnání s námi získanými výsledky je hodnota celkového počtu mikroorganismů v našem případě nižší $4,7 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, stejně jako u psychrotrofních mikroorganismů $4,2 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, kontaminace koliformními mikroorganismy byla námi změřena nižší, a to $2,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ i *E. coli* byla v našem případě zjištěna v nižším počtu, tedy $1,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$.

Voidarou a kol. (2011) porovnávali mikrobiologickou kontaminaci chlazeného kuřecího maso podle způsobu chovu. Mezi sledovanými mikrobiologickými ukazateli byl celkový počet mikroorganismů, psychrotrofní mikroorganismy a *E. coli* u konvenčního i volného chovu. Hodnota celkového počtu mikroorganismů byla pro konvenční způsob chovu $4,7 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ a volný chov $5,6 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, námí zjištěná hodnota celkového počtu mikroorganismů byla pro chlazené kuřecí maso $5,0 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Kontaminace psychrotrofními mikroorganismy byla zjištěna v případě konvenčního způsobu chovu $3,1 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ a v případě volného chovu $3,6 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Obě hodnoty jsou nižší ve srovnání s námi naměřeným počtem psychrotrofních mikroorganismů v chlazeném kuřecím mase ($4,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$). Detekce *E. coli* v kuřecím mase pocházejícím z konvenčního chovu byla $1,6 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ oproti volnému chovu $2,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Námí naměřená hodnota pro *E. coli* v chlazeném kuřecím mase byla $1,7 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$.

Del Río a kol. (2007) analyzovali chlazená kuřecí stehna z hlediska mikrobiální kontaminaci celkového počtu mikroorganismů $4,3 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, psychrotrofní mikroorganismy $2,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, koliformní mikroorganismy $4,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, plísňe a kvasinky $4,0 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Tyto hodnoty byly získány z kuřecích stehen ihned po

dokončení jatečného opracování. U kuřecích stehen byla hodnota celkového počtu mikroorganismů $4,7 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, psychrotrofních mikroorganismů $4,2 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, koliformních mikroorganismů $2,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, plísní a kvasinek $2,2 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. V případě chlazeného kuřecího masa naše výsledky dosahovaly hodnot pro celkový počet mikroorganismů $5,0 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, psychrotrofní mikroorganismy $2,4 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, koliformní mikroorganismy $1,1 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, plísně a kvasinky $1,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Přepočítáním výsledků pro chlazená kuřecí stehna ($n = 39$) je hodnota pro CPM chlazených kuřecích stehen vyšší, oproti Del Río a kol., tedy $5,0 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, hodnota pro psychrotrofní mikroorganismy je vyšší, tedy $4,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$, hodnota pro koliformní mikroorganismy je nižší, tedy $2,9 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ a vyšší pro plísně a kvasinky s hodnotou $2,2 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$

7 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vypracování literární rešerše o problematice stanovení veterinárních léčiv v mase drůbeže a mikrobiologii drůbežího masa se zaměřením se na významné druhy mikroorganismů. V praktické části stanovit rezidua veterinárních léčiv screeningovou metodou Premi® Test a provést mikrobiální analýzu a stanovit vybrané skupiny mikroorganismů.

Rezidua veterinárních léčiv v potravinách jsou zdravotním rizikem pro konzumenty, z hlediska vývoje rezistentních kmenů, hypersenzitivních a toxických reakcí. V drůbežím mase mohou být stanovována fyzikálněchemickými metodami, imunologickými screeningovými metodami, mikrobiologickými metodami nebo širokospektrálními komerčními testy. Fyzikálněchemická metoda dokáže kvantitativně i kvalitativně stanovit různé skupiny léčiv i konkrétní látku. Imunologické screeningové metody využívají vazby antigen-protilátka, která je specifická pro každou látku a možnost její kvantifikace. Mikrobiologické metody využívají princip inhibice bakterií antimikrobiálními látkami obsaženými ve vzorku. Pokud vzorek neobsahuje rezidua inhibičních látek, bakterie není inhibovaná v růstu. Screeningové komerční testy využívají schopnosti mikroorganismů produkovat kyselinu a měnit tak zabarvení indikátoru v kytu. Inhibované mikroorganismy rezidui veterinárních léčiv ze vzorku neprodukuje kyselinu, tedy nedojde k barevné reakci s indikátorem.

Významnými skupinami mikroorganismů, které mohou pocházet z drůbežího masa a představují zdravotní riziko pro člověka, jsou bakterie rodu *Salmonella*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Campylobacter* a kmen *Escherichia coli*. Správnou výrobní a hygienickou praxí by měly být hodnoty těchto mikroorganismů na takových úrovních, aby bylo minimalizováno riziko onemocnění.

V praktické části byla prokázána přítomnost nadlimitních hodnot reziduí veterinárních léčiv stanovených v Nařízení Komise (EU) 37/2010. Z celkového počtu testovaných 25 vzorků byly hodnoty RIL překročeny u dvou vzorků. Ani jeden vzorek neměl původ v České republice.

Mikrobiologickou analýzou byly porovnány vzorky kuřecího masa na základě země původu, způsobu skladování a analyzované anatomické části. Byl analyzován celkový počet mikroorganismů, psychrotrofní mikroorganismy, *E. coli*, koliformní mikroorganismy, plísně a kvasinky. Při srovnání mikrobiální kontaminace kuřat na základě země původu lze konstatovat, že kuřata dovážená do české republiky ze

zahraničí dosahovaly prokazatelně nižších hodnot mikrobiální kontaminace ve srovnání s českými kuřaty. Pouze v hodnotách celkového počtu mikroorganismů se hodnoty statisticky významně nelišily. Porovnání chlazeného a mrazeného kuřecího masa ukazuje ($p < 0,05$) rozdíl pro všechny hodnocené skupiny mikroorganismů ve srovnání s mrazeným. Výsledky analýzy pro mikrobiální kontaminaci kuřecí prsní a stehenní svaloviny ukazují rozdíl ($p < 0,05$) pouze v případě koliformních mikroorganismů, plísní a kvasinek. Nižší hodnoty mikroorganismů v těchto případech vykazuje prsní svalovina oproti stehenní.

Dodržováním ochranných lhůt v případě podávání veterinárních léčiv v chovech drůbeže by mělo být zabráněno výskytu překročení jejich reziduí v konečném produktu jatečného opracování. Správnou výrobní a hygienickou praxí při jatečném opracování by měla být řízena rizika spojená s alimentárními mikroorganismy, které by mohly způsobit vážná onemocnění spotřebitelů. Dodržováním těchto zásad by mělo být produkováno kvalitní, zdravotně nezávadné drůbeží maso.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABEL-RAHMAN, H., A., YSSEIN, M.A., AHMED, A.M., HAYASHIDANI, H., ELHELALY, A.E., 2008: Bacterial profile of frozen broiler chickens, Breast, 9(12), 49 – 60s. Online: [2016-04-07] Dostupné na: [<http://vet.scuegypt.edu.eg/attach/c5.pdf>]

AL-GROOM, R., ABU SHAQRA, Q., 2013: Microbiological quality of imported frozen broiler meat in Jordan, *Malaysian Journal of Microbiology*, 10(1), 24 – 28s. ISSN 2231-7538.

AL-MOHIZEA, I. S., MASHHADI, A. S., FAWWAL, A., AL-SHALHAT, A., 1994: Microbiological and shelf life assessment of chilled eviscerated whole chicken broilers in Saudi Arabia, *British Poultry Science*, 35, 519 – 526s. ISSN 0007-1668.

ÁLVAREZ-ASTORGA, M., CAPITA R., ALONSO-CALLEJA C., MORENO, B., GARCÍA-FERNANDEZ, M., C., 2002: Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain, *Meat Science*, 62, 45 – 50s. ISSN 0309-1740.

ANONYM, R-BIOPHARM AG, 2010: Premi® Test Art. No. R3900, PremiTest product launch folder.

ANTUNES, P., MOURAO, J., CAMPOS, J., PEIXE, L., 2016: Salmonellosis: The role of poultry meat, *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 110-121s, ISSN: 1469-0691.

BAKER, S., NICKLIN, J., NAVEED, K., KILLINGTON, R., *Microbiology*. 3. Vyd. New York: Taylor & Francis Group, 2006, 427s. Bios instant notes. ISBN 0-4153-9088-5.

BARRY, A. L., EFFINGER, L. J., 1974: Performance of Mueller Hinton agars prepared by three manufacturers. *American Journal of Clinical Pathology*, 62, 113 – 117s. ISSN 0002-9173.

BERGWEFF, A. A. 2005: Rapid assays for detection of residues of veterinary drugs, 259 – 292s. In van AMERONGEN, A., BARUNG, D., LAUWARS, M., *Rapid methods for biological and chemical contaminants in food and feed*, Wageningen Academic Publishers, 416s.

BERGWEFF, A. A., SCHLOESSER, J., 2003: Residue determination, 254 – 261s. In CABALLERO, B., TRUGO, L., FINGLAS, P., *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2 Vyd., London, UK: Elsevier 6000s. ISBN 978-0-12-227055-0.

CLARK, D. S., 1960: Growth of psychrotolerant pseudomonads and *Achromobacter* on chicken skin, *Poultry Science*, 47, 1575 – 1578s. ISSN 1525-3171.

COHEN, N., ENNAJI, H., BOUHRIF, B., HASSAR, M., KARIB, H., 2007: Comparative Study of Microbiological Quality of Raw poultry Meat at Various Seasons and for Different Slaughtering Processes in Casablanca (Morocco), *The Journal of Applied Poultry Research*, 16(4), 502 – 505s. ISSN 1537-0437

CUNHA, B. A., 2001: Antibiotics side effects. *Medical Clinics of North America*, 85, 149 – 185s. ISSN 0025-7125.

ČSN 56 9609, Pravidla správné hygienické a výrobní praxe – Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace. Praha, Český normalizační institut, c2008.

DANG, P., K., DEGAND, G., DOUNY, C., TON, V., D., MAGHUIN-ROGISTER, G., SCIPPO, M., L., 2011: Optimisation of a new two-plate screening method for the detection of antibiotic residues in meat, *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 2070 – 2076s. ISSN 1365-2621.

DE WASCH, K., OKERMAN, L., CROUBES, S., DE BRABANDER, H., VAN HOOFF, J., DE BACKER, P., 2001: Detection of residues of tetracycline antibiotics in pork and chicken meat: Correlation between results of screening and confirmatory tests, *Analyst*, 123, 2737 – 2741s. ISSN 0003-2654.

DE ZUTTER, L., KOENEN, D. K., VAN HOOFF, J., 1985: Detection of antimicrobial residues in slaughtered animals, Sensitivity of some detection methods to different antibiotics, *Vlaams Diergeneesk Tijdschr*, 54, 445 – 454s. ISSN 0303-9021.

DEL RÍO, E., PANIZO-ORÁN, M., PRIETO, M., ALONSO-CALLEJA, C., CAPITA, R., 2007: Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry, *International Journal of Food Microbiology*, 115, 268-280s. ISSN 0168-1605.

DIPEOLU, M. A., ALONGE, D. O., 2002: Residues of streptomycin antibiotic in meat sold for human consumption in some States of SW Nigeria, *Archivos de Zootecnia*, 51, 477-480s. ISSN 000-405-92.

EKENE, V., E., OBOEGBULEM, S., I., NWANTA, J., A., 2014: Rapid detection of antimicrobial residues in poultry: A consequence of non-prudent use of antimicrobials, *Health*, 6(2), 149 – 152s. ISSN 1461-7196.

FERNANDES, R., *Microbiology handbook meat products*. UK: Leatherhead Publishing, 2009, 297s. ISBN 978-1-905224-66-1.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., SENDRA-NADAL, E., SAYAS-BARBERÁ, E., Slaughtering Equipment and Operation, 79 – 100s, In: GUERRERO-LEGARRETA I., ed. *Handbook of Polutry Science and Technology*, New Jersey, Wiley, 2010.

FORSYTHE, S. J., *The Microbiology of Safe Food*, Blackwell Science, 2000, 412s. ISBN 0-632-05487-5.

GAUDIN, V., CADIEU, N., MARIS, P., 2003: Inter-laboratory studies for the evaluation of ELISA kits for the detection of chloramphenicol residues in milk and muscle, *Food and Agricultural Immunology*, 15, 143 – 157s. ISSN 1465-3443.

GENTILI, A., PERRET, D., MARCHESE, S., 2005: Liquid chromatography tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products, *Trends in Analytical Chemistry*, 24, 704 – 733s. ISSN 0165-9936.

GILL, C. O., PENNEY, N., 1979: Survival of bacteria in carcasses, *Applied and Environmental Microbiology*, 33, 1284 – 1286s. ISSN 2373-6712.

GÖRNER, F., VALÍK, L., 2004: *Aplikovaná mikrobiológia potravín : princípy mikrobiológie potravín, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodky sú prenášané potravinami*, 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 2004, 528s. ISBN 80-967064-9-7.

GROLLIS, E. H., GOSLING, J. P., SREANAN, J. M., KANE, M., 2002: Development and validation of a biosensor-based immunoassay for progesterone in bovine milk, *Journal of Immunological Methods*, 267, 131 – 138s. ISSN 0022-1759.

GRÜNDIG, B., RENNEBERG, R., 2002: Chemical and biochemical sensors, 87 – 98, In KATERKAMP, A., GRÜNDIG, B., RENNEBERG, R., ed., *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, Verlag: Wiley-VCH.

HAKEM, A., TITOUCHE, Y., HOUALI, K., YABRIR, B., MALKI, O., CHENOUF, N., YAHIAOUI, S., LABIAD, M., GHENIM, H., KECHIH-BOURNAR, S., CHIRILA, F., LAPUSAN, A., FIR, N., I., 2013: Screening of Antibiotics Residues in Poultry Meat by Microbiological Methods, *Veterinary Medicine*, 70(1), 77-82s. ISSN 1843-5378.

HUET, A. C., MORTIER, L., DAESÉLIERE, E., FODEY, T., ELLIOTT, C., DELAHAUT, P., 2005: Development of an ELISA screening test for nitroimidazoles in egg and chicken muscle, *Analytica Chimica Acta*, 534, 157 – 162s. ISSN 0003-2670.

CHMU, *Měsíční přehled pozorování*, Online: [2016-04-07] Dostupné na: [<http://portal.chmi.cz/historicka-data/pocasi/mesicni-data#>]

JOHANSSON, M. A., HELLENAS, K. E., 2001: Sensor chip preparation and assay construction for immunobiosensor determination of betaagonists and hormones, *Analytica*, 126, 1721 – 1727s. ISSN 0003-2654.

JONES, G. M., 2009: On farm test for drug residues in milk – *Virginia cooperative extension*, 1 – 5s. ISBN 0-93581709408.

KARRAOUAN, B., BOUCHARIF, B., ZIYATE, N., TALMI, A., ID SIDI YAHIA K., COHEN, N., FASSOUANE, A., 2009: Evaluation of Multi-Plate Microbial assay for the screening of antibacterial residues in Poultry muscle, *European Journal of Scientific Research*, 35(2), 311 – 317s. ISSN 1450-216 X.

KAZAČINKI, L., HADŽIOSMANOVIĆ, M., ZDOLEC, N., 2006: Microbiological quality of poultry meat on the Croatian market, *Veterinarski Archiv*, 76(4), 305 – 313s. ISSN 0372-5480

KEMPE, M., VERACHTERT, B., 2000: Cartridges with molecularly imprinted recognition elements for antibiotics residues monitoring in milk cream, *Pure and Applied Biochemistry*, Lunds Universitét Centre for Chemistry and Chemical Engineering Getingeaven, Lund, 1 – 10s. ISSN 1365-3075.

KIRBI, A., MARINSEK, J., FLAJS, V. C., 2005: Introduction of the HPLC method for the determination of quinolone residues in various muscle tissues. *Biomedical Chromatography*, 19, 259 – 265s. ISSN 1099-0801.

KIRBIS, A., 2007: Microbiological screening method for detection of aminoglycosides, β -lactams, macrolides, te-teracyclines and quinolones in meat samples. *Slovenian Veterinary Research*, 44, 11 – 18s. ISSN 1580-4003.

LINK, N., WEBER, W., FUSSENEGGER, M., 2007: A novel generic dipstickbased technology for rapid and precise detection of tetracycline, streptogramin and macrolide antibiotics in food samples, *Journal of Biotechnology*, 128, 668 – 680s. ISSN 0168-1656.

MATA, L., SANZ, D., RAZQUIN, P., 2014: Validation of the Explorer® 2.0 test coupled to e-Reader® for the screening of antimicrobials in muscle from different animal species, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(9), 1496 – 1505. ISSN 1944-0057.

MATYÁŠ, Z., VONDRKA, K., Podklady pro zavedení HACCP do zemědělské výroby drůbeže a vajec, Praha: Agrospoj, 2000. 60 s.

Ministerstvo zemědělství Zpráva o činnosti Systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice, 2013: Online: [2016-04-07] Dostupné na: [RASFF_2013_final.pdf]

Ministerstvo zemědělství Zpráva o činnosti Systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice, 2014: Online: [2016-04-07] Dostupné na: [RASFF%202014.pdf]

MORETTI, S., DUSI, G., GIUSEPPONI, D., PELLICCIOTTI, S., ROSSI, R., SALUTI, G., CRUCIANI, G., GALARINI, R., 2016: Screening and confirmatory method for multiclass determination of 62 antibiotics in meat, *Journal of Chromatography A*, 1429, 175 – 188s. ISSN 0021-9673.

MULDER, R. A. W. A., DORRESTEIJN, L. W. J., VAN DER BROEK, J. 1978: Cross-contamination during the scalding and plucking of broilers, *British Poultry Science*, 19, 16 – 70s. ISSN 0007-1668.

NAGATA, T., ASHIZAWA, E., HASHIMOTO, H., 2004: Simultaneous determination of residual fourteen kinds of beta-lactam and macrolide antibiotics in bovine muscles by high-performance liquid chromatography with a diode array detector, *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 45, 161 – 164s. ISSN 0015-6426.

NISHA, A. R., 2008: Antibiotic residues – A global health hazard. *Veterinary World*, 1(12), 375 – 377s. ISSN 2231-0916.

NOTERMANS, S., DUFRENNE, J., VAN LEEUWEN, W. J., 1982: Contamination of broiler chickens by *Staphylococcus aureus* during processing: incidence and origin, *Journal of Applied Bacteriology*, 52, 275 – 280s. ISSN 1365-2672.

NOVAIS, Â., COMAS, I., BAQUERO, F., CANTÓN, R., COQUE, M. T., MOYA, A., GONZÁLEZ-CANDELAS, F., GALÁN, J. C., 2010: Evolutionary Trajectories of Beta-Lactamase CTX-M-1 Cluster Enzymes: Predicting Antibiotic Resistance. *PLOS Pathogens*, 6(1), 16s. ISSN 1553-7374.

PAIGE, J. C., TOLLEFSON, L., MILLER, M., 1997: Public health impact on drug residues in animal tissues, *Veterinary and Human Toxicology*, 9, 1 – 27s. ISSN 0145-6296.

PECORELLI, I., BIBI, R., FIORONI, L., GALARINI, R. 2004: Validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC, *Journal of Chromatography A*, 1032, 23 – 29s. ISSN 0021-9673.

PICÓ, Y., BARCELÓ, D., 2008: The expanding role of LC-MS in analyzing metabolites and degradation products of food contaminants, *Trends in Analytical Chemistry*, 27(10), 821 – 835s. ISSN 0165-9936.

PIKEMAAT, M. G., VAN OOSTRA, D., SCHOUTEN, S., RAPALLINI, M., KORTHENHOEVEN, L., VAN EGMOND, H. J., 2009a: Nouws Antibiotic Test: validation of a post-screening method for antibiotic residues in kidney, *Food Control*, 20, 771 – 777s. ISSN 0956-7135.

PIKEMAAT, M. G., VAN OOSTRA, D., SCHOUTEN, S., RAPALLINI, M., VAN EGMOND, H. J., 2008: A new microbialscreening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: the Nouws Antibiotic Test (NAT screening). *Food Control*, 19, 781 – 789s. ISSN 0956-7135.

PIPEK, P., Technologie masa, 167 – 193s In: KADLEC, P., MELZOCH, K., VOLDŘICH, M., ed., *Přehled tradičních potravinářských výroby*, Ostrava, Key Publishing, 2012.

QINGHUA, Y., QINGPING, W., HUIJUAN, H., JUMEI, Z., HUIXIAN, H., 2016: Prevalence and characterization of *Yersinia enterocolitica* isolated from retail foods in China, *Food Control*, 61, 20 – 27s. ISSN 0956-7135.

Rapid Alert System for Food and Feed, 2005: 2005.430. Online: [2016-04-07]
Dostupné na: [<https://webgate.ec.europa.eu/rasff>]

Rapid Alert System for Food and Feed, 2013: 2013.1185. Online: [2016-04-07]
Dostupné na [<https://webgate.ec.europa.eu/rasff>]

Rapid Alert System for Food and Feed, 2013: 2013.1491. Online: [2016-04-07]
Dostupné na: [<https://webgate.ec.europa.eu/rasff>]

RODA, A., MANETTA, A. C., PORTANTI, O., MIRASOLI, M., GUARDIGLI, M., PASINI, P., LELLI, R., 2003: A rapid and sensitive 384-well microtitre format chemiluminescent enzyme immunoassay for 19-nortestosterone, *Luminescence*, 18, 72 – 78s. ISSN 1522-7243.

ROJAS, D. M., LOZANO, M. G., GUERRERO-LEGARRETA, I., Slaughterhouse Building and Facility Requirements, 71 – 78s, In: GUERRERO-LEGARRETA I., ed. *Handbook of Poultry Science and Technology*, New Jersey, Wiley, 2010.

SAMANIDOU, V. F., NIKOLAIDOU, S. I., PAPADOYANNIS, I. N., 2005: Laboratory of Analytical Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of tetracycline antibiotics residues in bovine muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC, *Journal of Separation Science*, 28, 2247 – 2258s. ISSN 1615-9314.

SAMARAJEWA, U., WEI, C. I., HUANG, T. S., MARSHALL, M. R., 1991: Application of immunoassay in the food industry, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29, 403 – 434s. ISSN 2048-7177.

SAMS, R. A., MCKEE, R. S., First Processing: Slaughter Trough Chilling, 25 – 50s, In: OWENS, M., C., ALVARADO, Z., C., SAMS, R., A., *Poultry Meat Processing*, Boca Raton, CRS Press, 2010.

SHAREEF, M. A., FARAG, R. A., AL-RUTHWANI, E. K., 2012: Evaluation of bacterial load of frozen chicken thighs in Mosul markets, *Iraqi Journal of Veterinary Science*, 26(2), 63 – 69s. ISSN 2071-1255.

SCHINDELER, J., 2014: *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*, 2. Vyd., Praha, Grada Publishing, ISBN 978-80-247-4771-2

SIMEONOVÁ, J., MÍKOVÁ, K., INGR, I., KUBIŠOVÁ, S., 2013: *Technologie drůbeže, vajec a minoritních živočišných produktů*, Mendlova univerzita, Brno, 241s. ISBN 978-80-7375-891-2.

Státní veterinární správa, 2007: Chloramfenikol v kuřatech?. Online: [2016-04-07] Dostupné na: [<http://eagri.cz/public/web/svs>]

Státní veterinární správa, 2013: Brazilská prsa s doxycyklinem. Online: [2016-04-07] Dostupné na: [<http://eagri.cz/public/web/svs>]

STEAD, S., SHARMAN, M., TARBIN, J. A., GIBSON, E., RICHMOND, S., STARK, J., 2004: Meeting maximum residue limits: An improved screening technique for the rapid detection of antimicrobial residues in animal food products. *Food additives & Contaminants*, 21, 216 – 221s. ISSN 1464-5122.

TAJICK, M., A., SHOHREH, B., 2006: Detection of Antibiotics Residue in Chicken Meat Using TLC, *International Journal of Poultry Science*, 5(7), 611 – 612s. ISSN 1682-8356.

TANG, H. P., HO, C., LAI, S. S., 2006: High-throughput screening for multi-class veterinary drug residues in animal muscle using liquid chromatography/tandem mass spectrometry with on-line solid-phase extraction, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, 2565 – 2572s. ISSN 1097-0231.

TOTOSAUS-SÁNCHEZ, A., Poultry Packaging, 121 – 129s, In GUERRERO-LEGARRETA I., ed. *Handbook of Polutry Science and Technology*, New Jersey, Wiley, 2010.

VERDON, E., COUEDOR, P., ROUDAUT, B., SANDERS, P., 2005: Multiresidue method for simultaneous determination of ten quinolone antibacterial residues in multimatrix/multispecies animal tissues by liquid chromatography with fluorescence detection: Single laboratory validation study, *Journal of AOAC International*, 88, 1179 –1192s. ISSN 1060-3271.

VOIDAROU, C., VASSOS, D., ROZOS, G., ALEXOPOULOS, A., PLESSAS, S., TSINAS, A., SKOUFOU, M., STAVROPOULOU, E., BEZIRTZOGLU, E., 2011: Microbial challenges of poultry meat production, *Anaerobe*, 17, 341-343s. ISSN 1075-9964.

VOLLARD, E. J., Clasener, H. A. L. 1994: Colonization resistance. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*, 38, 409 – 414s. ISSN 1098-6596.

Vyhláška 132/2004, „o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení“. Online: [2016-04-07] Dostupné na:[www.agris.cz/Content]

WANG, S., ZHANG, H. Y., WANG, L., DUAN, Z. J., KENNEDY, I., 2006: Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review, *Food Additives and Contaminants*, 23, 362 – 384s. ISSN 0265-0057.

WEBER, C. C., LINK, N., FUX, C., ZISCH, A. H., WEBER, W., FUSSENEGGER, M., 2004: Broad-spectrum protein biosensors for class-specific detection of antibiotics. *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 9 – 17s. ISSN 1097-0290.

WHITE, S. 2004: Biosensors for food analysis 2133 – 2148s. In NOLLET, L. M. L., TOLDRA, F., *Handbook of food analysis*, 2 Vyd., New York, Marcel Dekker Inc. 877s.

WREN, S., A., C., TCHELITCHEFF, P., 2006: Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development, *Journal of Chromatography A*, 1119, 140 – 146s. ISSN 0021-9673.

ZUO, P., YE, B. C., 2006: Small molecule microarrays for drug residue detection in foodstuffs, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6978 – 6983s. ISSN 0021-8561.

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: <i>Skupiny antibiotik detekovaných pomocí použitých mikrobiálních kmenů (Hakem a kol., 2013).....</i>	15
Tabulka 2: <i>Infekční dávky střevních patogenů (Forsythe, 2000).....</i>	30
Tabulka 3: <i>Výsledky odečtů barevných změn testovacího agaru širokospektrálního screeningového testu Premi® Test.....</i>	39
Tabulka 4: <i>Maximální limity reziduí antibiotik pro svalovinu kuřat (Nařízení Komise (EU) 37/2010).....</i>	41
Tabulka 5: <i>Detekční limity testovací soupravy Premi® Test.....</i>	42

10 SEZNAM ZKRATEK

AFNOR – Association Française de Normalisation

AFSSA – Agence Française de Sécurité des Aliments

APCI – atmospheric-pressure chemical ionization – chemická ionizace za atmosférického tlaku

C. jejuni – *Campylobacter jejuni*

C. perfringens – *Clostridium perfringens*

CNS - centrální nervová soustava

CPM – celkový počet mikroorganismů

ČR – Česká republika

ČSN – Česká státní norma

DBRC – Dichloran Bengal Rose Chloraphenocol agar

DFU – colony-forming unit – kolonie tvořící jednotky

E. coli – *Escherichia coli*

EC . European Commission – Evropská komise

EHEC – enterohaemorrhagic – enterohemoragická

EIEC – enteroinvasive – enteroinvazivní

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

EPEC – enteropathogenic – enteropatogenní

ESI – electrospray ionization – elektro sprejová ionizace

ETEC – enterotoxigenic – enterotoxigenní

EU – Evropská unie

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Points – Systém analýzy rizika a kritických kontrolních bodů

HPLC – high performance liquid chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HRMS – high resolution mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie s vysokou účinností

ISO – International Organization for Standardization – Mezinárodní organizace standardizací

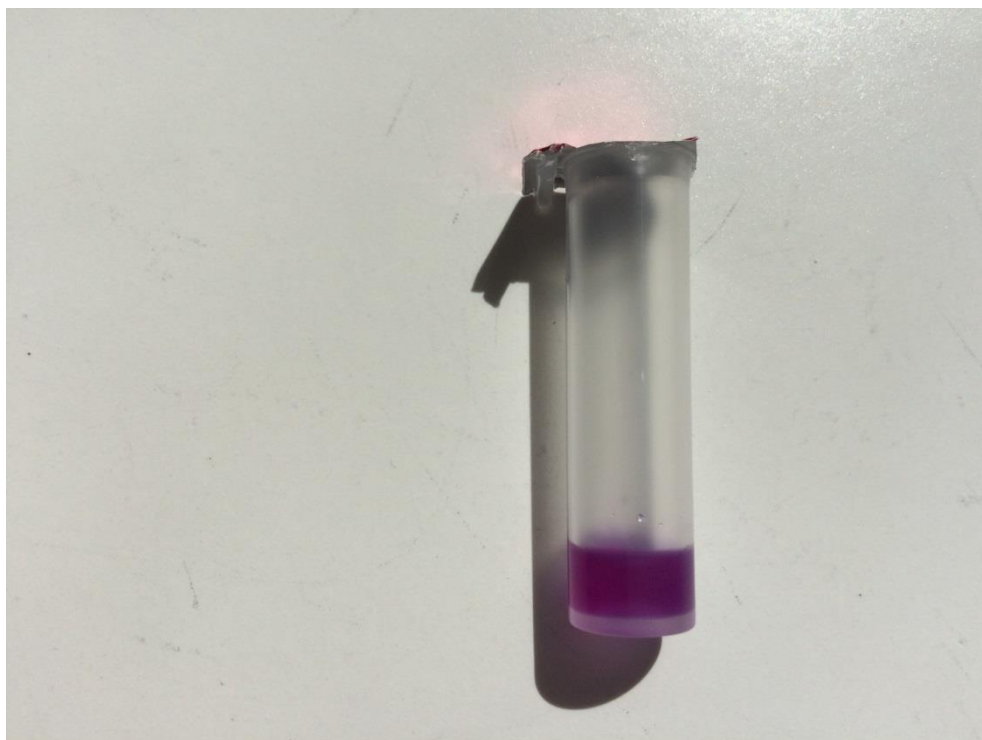
JUT – jatečně upravené tělo

KTJ – kolonie tvořící jednotky

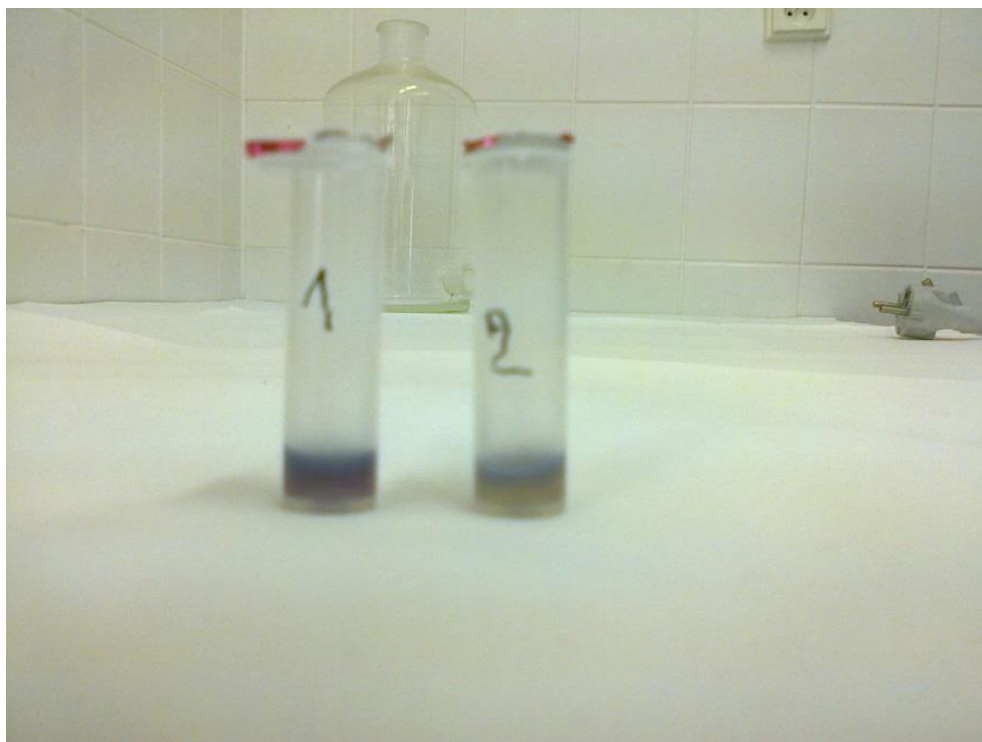
LC – liquid chromatography – kapalinová chromatografie

LOD – low obtain dose – minimální detekční hodnota
MLR – maximální limit reziduí
MS – mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie
NTPT – new two-plate test – nová dvou plotnová zkouška
PCA – Plate count agar
PV – panton-valentine
RASFF – Rapid Alert systém for Food and Feed – Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva
RIA – radioimmunoassay
S. aureus – *Staphylococcus aureus*
SVS – Státní veterinární správa
UPLC – ultra performance liquid chromatography – ultra účinná kapalinová chromatografie
USA – United States of America – Spojené státy americké
UV – ultra violete – ultra fialové
Y. enterocolitica – *Yersinia enterocolitica*

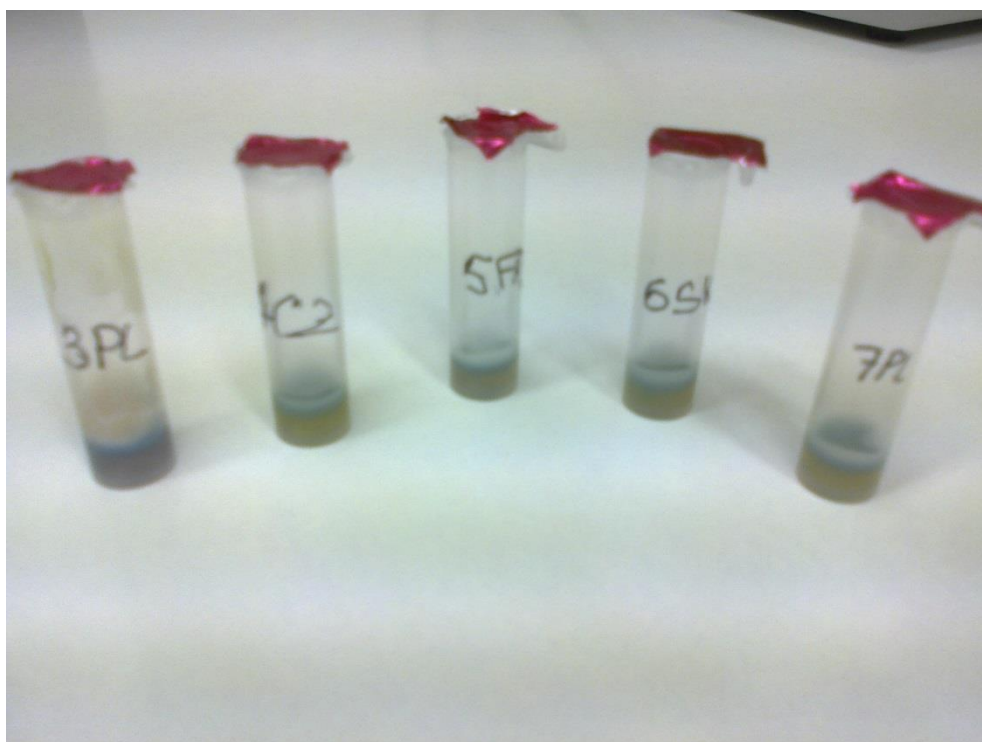
11 PŘÍLOHY



Obrázek 1: Testovací ampule Premi® Test před použitím.



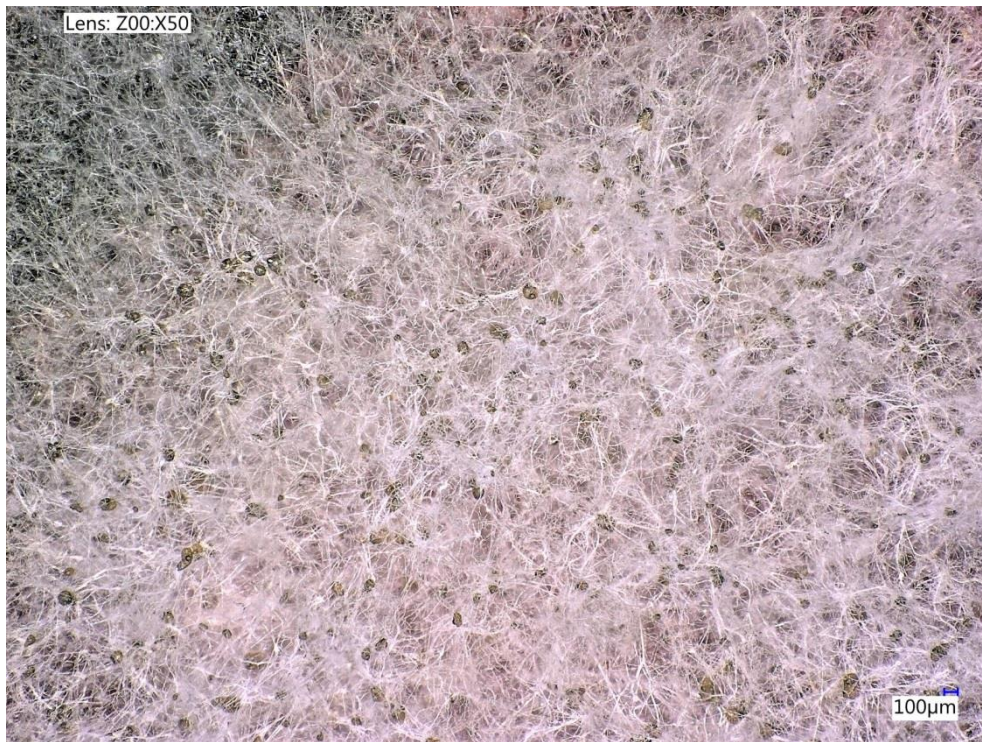
Obrázek 2: Výsledek hodnocení za použití metody Premi® Test, ampule 1 – pozitivní na RIL, ampule 2 – negativní na RIL.



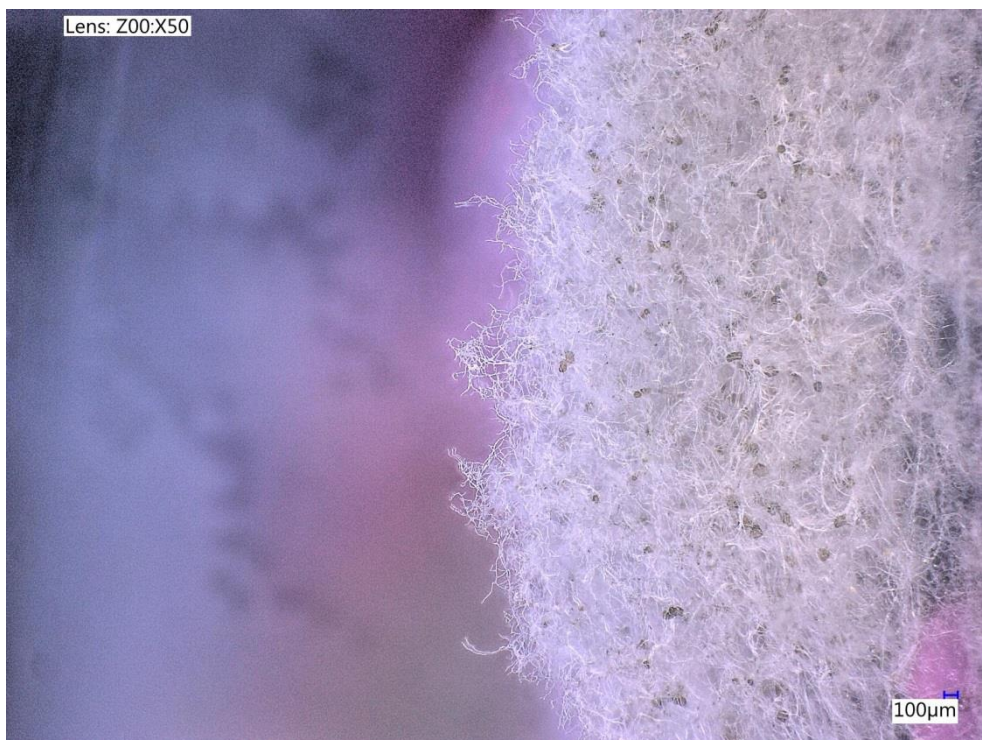
Obrázek 3: Výsledek hodnocení za použití metody Premi® Test, ampule 3 – pozitivní na RIL, ampule 4, 5, 6, 7 – negativní na RIL.



Obrázek 4: Petriho miska s narostlými plísněmi a kvasinkami mikroskopované digitálním mikroskopem VHX 5000.



Obrázek 5: Plíseň analyzovaná v kuřecím mase mikroskopovaná digitálním mikroskopem VHX 5000.



Obrázek 6: Plíseň analyzovaná v kuřecím mase mikroskopovaná digitálním mikroskopem VHX 5000.



Obrázek 7: Kvasinka s plísní analyzované v kuřecím mase mikroskopované digitálním mikroskopem VHX 5000.



Obrázek 8: Kvasinka analyzovaná v kuřecím mase mikroskopovaná digitálním mikroskopem VHX 5000.



Obrázek 9: Kvasinka analyzovaná v kuřecím mase mikroskopovaná digitálním mikroskopem VHX 5000.



Obrázek 10: Kvasinky analyzované v kuřecím mase mikroskopované digitálním mikroskopem VHX 5000.



Obrázek 11: Kvasinka analyzovaná v kuřecím mase mikroskopovaná digitálním mikroskopem VHX 5000.

12 SEZNAM PŘÍLOH

Obrázek 1: <i>Testovací ampule Premi® Test</i>	65
Obrázek 2: <i>Výsledek hodnocení za použití metody Premi® Test, ampule 1 – pozitivní na RIL, ampule 2 – negativní na RIL</i>	65
Obrázek 3: <i>Výsledek hodnocení za použití metody Premi® Test, ampule 3 – pozitivní na RIL, ampule 4, 5, 6, 7 – negativní na RIL</i>	66
Obrázek 4: <i>Petriho miska s narostlými plísněmi a kvasinkami mikroskopované digitálním mikroskopem VHX 5000</i>	66
Obrázek 5: <i>Plíseň analyzovaná v kuřecím mase mikroskopovaná digitálním mikroskopem VHX 5000</i>	67
Obrázek 6: <i>Plíseň analyzovaná v kuřecím mase mikroskopovaná digitálním mikroskopem VHX 5000</i>	67
Obrázek 7: <i>Kvasinka s plísní analyzované v kuřecím mase mikroskopované digitálním mikroskopem VHX 5000</i>	68
Obrázek 8: <i>Kvasinka analyzovaná v kuřecím mase mikroskopovaná digitálním mikroskopem VHX 5000</i>	68
Obrázek 9: <i>Kvasinka analyzovaná v kuřecím mase mikroskopovaná digitálním mikroskopem VHX 5000</i>	69
Obrázek 10: <i>Kvasinky analyzované v kuřecím mase mikroskopované digitálním mikroskopem VHX 5000</i>	69
Obrázek 11: <i>Kvasinka analyzovaná v kuřecím mase mikroskopovaná digitálním mikroskopem VHX 5000</i>	70