



QK21020245-V3

**Transport vzorků pro mikrobiologické vyšetření –
doporučení pro postup mikrobiologických analýz
v syrovém mléce při porušení chladového režimu
během transportu vzorků do laboratoře**

(typ výsledků „Nmet“ – Metodika)

Zpracovali

doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D.¹, prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D.¹, Mgr. Hana Nejeschlebová¹, doc. MVDr. Lenka Necedová, Ph.D.², doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.², prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D.², RNDr. Danka Haruštiaková, Ph.D.³, doc. Mgr. Natália Martínková, Ph.D.³

¹Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o., Praha

²Veterinární univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie

³Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno

ISBN 978-80-88390-06-0

2023

Vydavatel:

Pro: Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. a Veterinární univerzitu Brno, Fakultu veterinární hygieny a ekologie, a Masarykovu univerzitu, Přírodovědeckou fakultu, Brno vydal MILCOM a.s., Ke Dvoru 12a, Praha 6, 16000

Forma vydání:

Metodika je vydávána pouze elektronicky ve formátu PDF

Zveřejněno na webové stránce:

https://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/cm_transport_2023.pdf

1. Vydání 2023

ISBN 978-80-88390-06-0

Podíl autorů na tvorbě certifikované metodiky:

doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D. – 20 %

prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D. – 7, 34 %

Mgr. Hana Nejeschlebová – 6 %

doc. MVDr. Lenka Necidová, Ph.D. – 11,11 %

doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D. – 11,11 %

prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D. – 11,11 %

RNDr. Danka Haruštiaková, Ph.D. – 16,67 %

doc. Mgr. Natália Martínková, Ph.D. – 16,66 %

Jména oponentů a organizace pro vydání osvědčení:

- 1) Odborník z daného oboru: Ing. Václava Genčurová, Ph.D., (odborník v oboru laktologie),
Vápenka Vitošov: vaclava.gencurova@seznam.cz
- 2) Pracovník státní správy: Ing. Zdenka Majzlíková, Česká plemenářská inspekce, Slezská
100/7, 120 00 Praha 2: majzlikovaz@cpins.cz

Dedikace na projekt:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu na rozvoj výzkumné organizace č. MZe NAZV QK21020245 s názvem: Vliv míry porušení chladírenského řetězce při odběru a transportu úředně odebraných vzorků na jejich mikrobiální profil.

Obsah

- 1) Cíl metodiky
- 2) Vlastní popis metodiky
- 3) Srovnání novosti
- 4) Popis uplatnění
- 5) Ekonomické aspekty
- 6) Seznam použité související literatury
- 7) Seznam publikací, které předcházely metodice

Příloha 1

Výsledné hodnoty (geometrický průměr a log KTJ/ml) stanovení počtu mikroorganismů vykultivovaných při 30 °C (Tabulka 4, Graf 1)

Výsledné hodnoty (geometrický průměr a log KTJ/ml) stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů vykultivovaných při 6,5 °C (Tabulka 5, Graf 2)

Výsledné hodnoty (geometrický průměr a log KTJ/ml) stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů vykultivovaných při 21 °C (Tabulka 6, Graf 3)

Výsledné hodnoty (geometrický průměr a log KTJ/ml) stanovení počtu koliformních bakterií (Tabulka 7, Graf 4)

Výsledné hodnoty (geometrický průměr a log KTJ/ml) stanovení počtu *Staphylococcus aureus* (Tabulka 8, Graf 5)

Příloha 2

Stanovení mezí reprodukovatelnosti pro stanovení počtu mikroorganismů vykultivovaných při 30 °C

Stanovení mezí reprodukovatelnosti pro stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů vykultivovaných při 6,5 °C

Stanovení mezí reprodukovatelnosti pro stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů vykultivovaných při 21 °C

Stanovení mezí reprodukovatelnosti pro stanovení počtu koliformních bakterií

Stanovení mezí reprodukovatelnosti pro stanovení počtu *Staphylococcus aureus*

Příloha 3

Doporučení pro stanovení počtu mikroorganismů vykultivovaných při 30 °C (Tabulka 10)

Doporučení pro stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů vykultivovaných při 6,5 °C (Tabulka 11)

Doporučení pro stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů vykultivovaných při 21 °C (Tabulka 12)

Doporučení pro stanovení počtu koliformních bakterií (Tabulka 13)

Doporučení pro stanovení počtu *Staphylococcus aureus* (Tabulka 14)

1) Cíl metodiky

Cílem metodiky je nezávazné doporučení pro sdružení prvovýrobců mléka, akreditované vzorkaře syrového mléka a akreditované a jiné laboratoře zpracovávající vzorky syrového mléka pro mikrobiologickou analýzu. Metodika předkládá návrh zacházení se vzorky nekonzervovaného kravského mléka a jejich možnou analýzu na stanovení celkového počtu mezofilních mikroorganismů (CPM), psychrotrofních mikroorganismů (CPP), koliformních bakterií (Koli) a *Staphylococcus aureus* (SA) při zjištění nedodržení chladového režimu při jejich transportu do laboratoře. Z výsledků výzkumného sledování je:

- determinována teplota a doba, která musí být dodržena, aby nedocházelo k překročení meze reprodukovatelnosti, stanovené normou (v případě CPM) nebo odvozené z výsledků projektu (CPP, Koli, SA),
- odvozeno doporučení pro zpracování vzorků na mikrobiologický profil tak, aby výsledné hodnoty mikrobiologických analýz byly hodnověrné a akceptovatelné.

2) Vlastní popis metodiky

2.1. Celkový počet mikroorganismů (CPM)

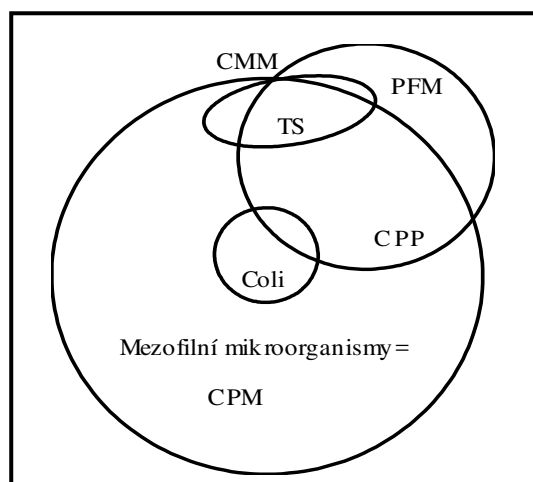
Při kontrole jakosti syrového kravského mléka je hlavním hygienickým ukazatelem CPM (celkový počet mezofilních mikroorganismů) a PSB (počet somatických buněk). Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 stanovuje limitní hodnoty, na kterých jsou výrobci mléka finančně zainteresováni, které jsou pro CPM $\leq 100\ 000$ KTJ (kolonie tvořící jednotky) a PSB $\leq 400\ 000$ buněk v 1 ml vzorku mléka. Zvýšení hodnoty CPM signalizuje zhoršení stavu některého z níže uvedených faktorů seřazených přibližně podle důležitosti, které mohou být i vzájemně ovlivněny:

- technický a hygienický stav dojícího a úchovného zařízení;
- hygienická úroveň dojení (dostatečná sanitace a množství teplé vody, čistota vemen a program jejich toalety);
- doba a úroveň chlazení mléka;
- kvalita krmiv;
- hygienická úroveň stáje (kvalita podlah, kanalizací a ostatních stavebních konstrukcí, podestýlky, větrání);
- kontrolní mastitidní program (např. léčba v zaprahlosti).

Vzhledem k dlouholetým sledováním fázových vzorků syrového kravského mléka lze říci, že zhoršená technická a hygienická úroveň dojícího zařízení při dojení jsou nejhlavnější

příčinou zvýšených výskytů CPM, CPP a koliformních bakterií. V Obr. 1 je uvedeno schéma nejpravděpodobnějšího propojení kontaminující mléčné mikroflóry podle technologicko-fyzikálního dělení a ve vztahu k hlavnímu hygienickému ukazateli CPM (Ticháček a kol., 1998).

Obr. 1. Schéma možného technologicko-fyziologického dělení základní kontaminující mléčné mikroflóry



| | | | |
|-----|------------------------------|------|-----------------------------|
| CMM | celková mikroflóra mléka | PFM | psychrofilní mikroorganismy |
| CPM | celkový počet mikroorganismů | TS | termorezistentní sporuláty |
| CPP | celkový počet psychrotrofů | Coli | koliformní bakterie |

CPM v sobě zahrnuje mléčnou mikroflóru, běžně se v mléce vyskytující, dále mikroflóru, která se do mléka dostává z prostředí během dojení a představuje technické a zdravotní problémy, nicméně i mikroflóru, která může kontaminovat finální mléčné výrobky během technologického zpracování mléka jako suroviny. Mezi bakterie významné v mlékařství patří například následující chemoorganotrofní bakterie: rod *Pseudomonas*, aerobní, gramnegativní, bakterie (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi*, *P. aeruginosa*); grampozitivní, obligátně aerobní koky rodu *Micrococcus* (*M. flavus*, *M. luteus*, *M. lylae*); fakultativně anaerobní, grampozitivní koky rodu *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. haemolyticus*); fakultativně anaerobní, grampozitivní koky rodu *Streptococcus* (*S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *S. pyogenes*); grampozitivní, obligátně anaerobní, nesporulující koky rodu *Sporosarcina* (*Sporosarcina ureae* – dříve *Sarcina*); grampozitivní, fakultativně anaerobní koky rodu *Kocuria* (*K. rosea* - dříve *Micrococcus roseus*); grampozitivní, fakultativně anaerobní koky rodu *Lactococcus* (*L. lactis* subsp. *lactis*, *L. cremoris* – oba dříve *Streptococcus*); grampozitivní, fakultativně anaerobní koky rodu *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*); grampozitivní, fakultativně anaerobní koky rodu *Leuconostoc* (*L.*

citrovorum, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*); grampozitivní, fakultativně nebo obligátně anaerobní nesporeující tyčky rodu *Lactobacillus* (*L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*); grampozitivní, fakultativně anaerobní tyčky rodu *Microbacterium* (*M. lacticum*); grampozitivní, aerobní a fakultativně anaerobní tyčky rodu *Corynebacterium* (*C. diphtheriae*, *C. bovis*); grampozitivní, anaerobní až aerotolerantní tyčky rodu *Propionibacterium* (*P. freudenreichii*); gramnegativní, obligátně aerobní tyčky rodu *Alcaligenes* (*A. faecalis* subsp. *faecalis*); gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčky rodu *Escherichia* (*E. coli*); gramnegativní, fakultativně anaerobní pohyblivé tyčky rodu *Serratia* (*S. marcescens*); gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčky rodu *Proteus* (*P. vulgaris*); gramnegativní, fakultativně anaerobní pohyblivé tyčky rodu *Salmonella* (*S. enterica* subsp. *enterica* – sérovary typhi, paratyphi, typhimurium, enteritidis); grampozitivní, obligátně anaerobní tyčky, tvořící endospóry rodu *Clostridium* (*C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. botulinum*, *C. sporogenes*); grampozitivní, obligátně aerobní nebo fakultativně anaerobní tyčky, tvořící endospóry rodu *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mesentericus*); grampozitivní, fakultativně anaerobní krátké tyčky rodu *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*); gramnegativní, fakultativně anaerobní nesporeující tyčky rodu *Yersinia* (*Y. enterocolitica*); gramnegativní, většinou fakultativně anaerobní, pleomorfní mikroorganismy rodu *Mycoplasma* (*M. bovis*, *M. californicum*, *M. canadense*, *M. bovigenitalium*, *M. alkalescens*); grampozitivní, aerobní kokobacily rodu *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*); grampozitivní, aerobní nebo fakultativně anaerobní tyčky ve tvaru V, rod *Actinomyces* (*A. bovis*), řasy (*Protoheca bovis*, *P. blasckae*) a kvasinky (*Kluyveromyces marxianus*, *C. inconspicua*, *Pichia kudriavzevii*, *Candida parapsilosis*, *Yarrowia lipolytica* aj.) – Murray a kol. (1999); Vyleťlová (2010); Banykó a Vyleťlová, 2009; Klimešová a kol., 2021a; Libisch a kol., 2022; Nejeschlebová a kol., 2022; Klimešová a kol., 2022).

Nežádoucí výskyt mikroorganismů, které infikují mléčnou žlázu a mohou způsobit i alimentární onemocnění u lidí, může mít pak za následek rovněž zvýšení počtu mezofilních mikroorganismů (cca o 5 až 10%; vlastní pozorování 1992 - 2004). Nejčastěji se vyskytující mikrobiální původci nebo doprovodná mikroflóra tohoto onemocnění v posledních letech jsou: *Streptococcus uberis*, *S. agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Mycoplasma bovis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*. Pořadí uvedených mikroorganismů není stálé a mění se v čase a prostoru.

2.2. Celkový počet psychrotrofních mikroorganismů, koliformních bakterií a *S. aureus* (CPP, Koli, *S. aureus*)

Jak bylo uvedeno výše, CPM a PSB jsou hlavními hygienickými ukazateli mikrobiologické kvality syrového mléka. Ostatní skupiny mikroorganismů, kterými jsou CPP (celkový počet psychrotrofních mikroorganismů), koli (koliformní mikroorganismy), termorezistentní a sporotvorní anaerobní mikroorganismy jsou doplňkovými ukazateli kvality syrového mléka, u kterých se může provádět vyšetření podle podmínek odběratele/zpracovatele mléka pro potřebu výroby jejich mléčných výrobků. Vzájemné vazby doplňkových ukazatelů k CPM jsou rovněž znázorněny v Obr. 1.

2.2.1. Psychrotrofní mikroorganismy

Psychrotrofní mikroorganismy se vyznačují schopností růstu i při teplotě pod 7 °C, ačkoliv jejich optimální teplota růstu je vyšší kolem 21 °C (Görner a Valík, 2004; Tančinová a kol., 2012; Janštová a Navrátilová, 2014). V syrovém kravském mléce byli izolováni jak gram-negativní zástupci psychrotrofních bakterií (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Serratia*), tak gram-pozitivní (*Bacillus* spp., zejména druhy *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. cereus*, *B. subtilis* a *B. weihenstephanensis*, dále *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* a *Microbacterium*) (Sorhaug a Stepaniak, 1997; Páčová a kol., 2003; Munsch-Alatossava a Alatossava, 2006; Vyletělová, 2010; Janštová a kol., 2012; Navrátilová a kol., 2012; Tančinová a kol., 2012). Přítomnost psychrotrofních bakterií je v mléce nežádoucí, protože produkují enzymy s lipolytickou a proteolytickou aktivitou, ovlivňující kvalitu mléčných výrobků tím, že řada z těchto enzymů je termorezistentní a tudíž mohou způsobovat kažení i tepelně ošetřeného mléka. (Vyletělová a kol., 2000; Hantsis-Zacharov a Halpern, 2007; Navrátilová a kol., 2012).

Počet psychrotrofních mikroorganismů v mléce je, podobně jako u CPM, ovlivněn hygienou mléka, kam se dostávají primárně z krmiv, prachu a z kontaminované vody. Nejvýznamnějším sekundárním zdrojem psychrotrofních bakterií jsou pak nedostatečně čištěné a dekontaminované plochy, které se dostávají do styku s chlazeným mlékem, dále potrubí a chladič tanky, ve kterých se mléko uchovává (Görner a Valík, 2004). Podle některých studií tvoří počet psychrotrofních mikroorganismů z celkového počtu mikroorganismů 10 až 35 %, a to při získávání mléka při zachování běžných hygienických předpisů (Burdychová a Baranová, 2005; Vyletělová a kol., 1999). Procentuální podíl psychrotrofní mikroflóry na celkové mikroflóře syrového mléka v mléce získaného za špatných hygienických podmínek může dosahovat až 75 % (Ducková a Čanigová, 2004; Burdychová a Hoferková, 2008).

2.2.2. Koliformní bakterie

Koliformní bakterie jsou gram-negativní tyčinky, fakultativně anaerobní, které metabolizují laktózu s tvorbou kyseliny a plynu. Jsou podskupinou celkového počtu mezofilních mikroorganismů – CPM (Obr. 1). V mléce a mléčných výrobcích jsou zastoupeny převážně rody *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* a *Citrobacter* a dále i rody *Yersinia*, *Serratia* a *Hafnia* a další. Koliformní bakterie jsou termolabilní a nepřežívají pasterační záhřev nad 65 °C a jejich přítomnost v pasterovaném mléce nebo v mléčných výrobcích značí špatně provedenou pasteraci nebo sekundární kontaminaci během zpracování mléka. Koliformní bakterie se označují za indikátory fekálního znečištění, jsou součástí přirozené střevní mikroflóry a tak se podílejí na kontaminaci půdy, podestýlky, dojicího zařízení a potažmo na kontaminaci získávaného mléka a sekundární kontaminaci finálních produktů (Janštová a Navrátilová, 2012; Martin a kol., 2016). *E. coli* je povinně vyšetřována při zpracování mléka podle podmínek uvedených v Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 (Tabulka 1).

2.2.3. *Staphylococcus aureus*

V současné době existuje povinnost vyšetřovat mléko na přítomnost *Staphylococcus aureus*, která je dána národní legislativou. Jedná se o vyhlášku 289/2007 Sb. o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství, a která uvádí limit pro *S. aureus* 5.10^2 KTJ/ml při prodeji syrového mléka (Tabulka 1). Dále je ve vyhlášce 445/2017 Sb. deklarováno, že pro výrobu výrobků ze syrového, mlékárensky neošetřeného (nepasterovaného) mléka musí být použito syrové mléko pocházející od zvířat, která splňují požadavky stanovené v příloze III oddílu IX kapitole I části I nařízení 128/2009 Sb. Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, ve kterém po nadojení nepřesahuje obsah *S. aureus* 5.10^2 KTJ v 1 ml.

Nařízení komise (ES) 2073/2005 specifikuje kritéria bezpečnosti potravin podle kategorie potravin a mikroorganismů a jejich toxinů. V Tabulce 1 jsou uvedené limity pro koagulázopozitivní stafylokoky (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus* aj.) a stafylokokové enterotoxiny (např. hemolyzin, exfoliatin způsobující syndrom opařené kůže – epidermolýzu, TSST-1 - syndrom toxického šoku) ve vztahu k mléku a mléčným výrobkům.

Tabulka 1. Mikrobiologické ukazatelé pro mléko a mléčné výrobky podle platných a dříve platných vyhlášek (v KTJ/ml)

| Vyšetření | Předpis/Druh mléka a výrobku | n | m | M | c |
|--|---|---|-----------------|-----------------|---|
| Nariadení EP a Rady (ES) č. 853/2004 | | | | | |
| CPM | Syrové kravské mléko | 2 | - | ≤ 100 000 | - |
| Vyhláška č. 128/2009 Sb. a 445/2017 Sb. | | | | | |
| <i>S. aureus</i> | Syrové mléko pro výrobu výrobků z neošetřeného (nepasterovaného) mléka | - | - | 500 | - |
| Vyhláška č. 289/2007 Sb., příloha 6 | | | | | |
| <i>S. aureus</i> | Prodej syrového mléka | - | - | 500 | - |
| Nariadení komise (ES) 2073/2005 | | | | | |
| <i>koagulázopozitivní stafylokoky</i> | Sýry ze syrového mléka | 5 | 10 ⁴ | 10 ⁵ | 2 |
| | Sýry z mléka, podrobenému nižší tepelnému ošetření než pasterace, zrající sýry z pasterizovaného nebo silněji tepelně ošetřeného mléka nebo syrovátky | 5 | 100 | 1000 | 2 |
| | Nezrající měkké sýry z paster. nebo silněji ošetřeného mléka nebo syrovátky | 5 | 10 | 100 | 2 |
| | Sušené mléko a sušená syrovátka | 5 | 10 | 100 | 2 |
| <i>staf.enterotoxiny</i> | Sušené mléko a sušená syrovátka podle kritérií pro CPS | 5 | neg.ve 25 g | | 0 |
| <i>E. coli</i> | Sýry vyrobené z tepelně ošetřeného mléka nebo syrovátky | 5 | 100 | 1000 | 2 |
| | Máslo a smetana ze syr. mléka nebo z mléka, podrobenému nižšímu tepelnému ošetření než pasterace | 5 | 10 | 100 | 2 |

Vysvětlivky: n = počet analyzovaných podjednotek pro jeden vzorek materiálu; m = prahová hodnota počtu mikroorganismů v 1 ml (vzorek je považován za uspokojivý, nepřesahují-li počty bakterií ve všech podjednotkách vzorku hodnotu m); M = maximální hodnota počtu mikroorganismů v 1 ml (vzorek je považován za neuspokojivý, přesahuje-li počet bakterií v jedné či více podjednotkách vzorku hodnotu M); c = počet podjednotek vzorku, ve kterých počet bakterií může být mezi hodnotami m a M (vzorek může být ještě přijatelný, nepřesahují-li počty bakterií ve zbývajících podjednotkách hodnotu m)

2.3. Podmínky svozu syrového mléka pro mikrobiologické analýzy

Mikrobiologické, hygienické, chemické a fyzikální parametry mléka jsou analyzovány v akreditované laboratoři. Sběr vzorků mléka a mléčných výrobků je prováděn oprávněnými a školenými pracovníky a teplota při jeho přepravě do laboratoře by neměla překročit 10 °C (Nariadení komise (ES) 2073/2005). Vzorky mohou být konzervovány pouze takovými činidly, aby nedošlo k narušení následné mikrobiologické nebo sensorické analýzy. V případě nekonzervovaného vzorku mléka je nutné jeho doručení do laboratoře v co nejkratší době a

opět při teplotě do 10 °C. V zájmu prvovýrobců mléka je, aby reprezentativní vzorek mléka byl při předání do akreditované laboratoře v takovém stavu, aby vyšetřované hodnoty odpovídaly hodnotám při odběru vzorků mléka na farmě. Dodržení nízké teploty zásadně ovlivňuje výsledek laboratorní zkoušky. V některých případech však jsou kontrolní vzorky dopravovány mimo chladicí box nebo v boxech s nedostatečným chlazením a dochází tak k překročení mezní hodnoty teploty vzorku, což je hlavně v letních měsících nežádoucí. K těmto situacím dochází převážně při odběru a přepravě vzorků faremními neškolenými pracovníky.

Metodika se zaměřuje na nekonzervované vzorky mléka, neboť odběr a svoz konzervovaných vzorků byl již dříve dlouhodobě sledován a validován a zahrnut do platných norem pro stanovení hygienických ukazatelů syrového kravského mléka. Také během naší dvouleté studie byla znovu ověřena a potvrzena vhodnost použití konzervačního přípravku Heeschenova činidla (poměr činidla k objemu mléka byl 2,4 ml : 20 ml; Heeschen a kol., 1969). Rozdíly mezi hodnotami (log KTJ) u sady vzorků s konzervačním činidlem při transportu mimo chladicí box a sady nekonzervovaných vzorků mléka uchovávanými v chladicím boxu při teplotě $6,5 \pm 1$ °C byly minimální a statisticky nevýznamné i při vysoké teplotě během transportu, která dosahovala až teploty 30 ± 1 °C (Tabulka 2; Klimešová a kol., 2021b).

Tabulka 2. Srovnání počtu CPM, CPP a Koli ve vzorcích bez konzervačního činidla (sada LB) a vzorků s Heeschenovým činidlem (sada H) pomocí párového *t*-testu.

| | CPM | | CPP | | Koli | |
|---------------------|--------------|--------|--------------|--------|---------------|--------|
| | LB | H | LB | H | LB | H |
| n = 21 | | | | | | |
| x (KTJ/ml) | 15 700 | 11 600 | 2 600 | 6 400 | 172 | 149 |
| xg (KTJ/ml) | 9 200 | 7 900 | 1 000 | 2 200 | 50 | 49 |
| sx (KTJ/ml) | 19 100 | 11 000 | 3 300 | 11 000 | 340 | 250 |
| log x (log KTJ/ml) | 3,9636 | 3,8993 | 3,0055 | 3,3135 | 1,6951 | 1,6925 |
| log sx (log KTJ/ml) | 0,4725 | 0,4145 | 0,6742 | 0,6736 | 0,7012 | 0,6596 |
| | CPM LB vs. H | | CPP LB vs. H | | Koli LB vs. H | |
| stupně volnosti | 20 | | 20 | | 20 | |
| <i>t</i> | 2,0087 | | 2,0275 | | 0,0592 | |
| <i>P</i> - hodnota | 0,0583 | | 0,0561 | | 0,9534 | |

Vysvětlivky: n = počet vzorků; x = aritmetický průměr; xg = geometrický průměr; sx = směrodatná odchylka; log x = aritmetický průměr logaritmovaných hodnot; log sx = směrodatná odchylka logaritmovaných hodnot; t = výsledné hodnoty *t*-testu; *P* = hladiny významnosti $P < 0,05$

2.4. Modelace podmínek (porušení chladové režimu) při transportu vzorků mléka pro mikrobiologické vyšetření

V Tabulce 3 je podrobně zobrazené schéma pokusu. Testované bazénové mléko bylo homogenizováno a rozplněno do sterilních vzorkovnic o objemu 100 ml. Výchozí počet mikroorganismů CPM, CPP, Koli, SA (kontrola, 0 hodin) byl stanoven ihned po rozlití mléka a vzorkovnice byly poté uloženy do termostatů o testovaných teplotách 8, 11, 14, 17, 20 a 25 °C tak, že pro každý čas expozice (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 a 4 hodiny) byl sledován vždy samostatný vzorek mléka. Vzorek mléka byl po každém testovaném čase uložen do lednice při teplotě 8 ± 1 °C a znovu analyzován po 3 hodinách, poté opět uložen do lednice a znovu analyzován po 24 hodinách. Kultivace a vyhodnocení probíhala podle platných norem: CPM - ČSN EN ISO 4833-1 Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů - Část 1: Technika přelivem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C (2013)

CPP - ČSN ISO 17410 Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů (2020)

Koliformní bakterie - ČSN ISO 4832 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu koliformních bakterií - Technika počítání kolonií (2010)

S. aureus – ČSN EN ISO 6888-1 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy) - Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera (2000)

ČSN EN ISO 7218 Mikrobiologie potravin a krmiv. Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení (2008)

Tabulka 3. Schéma analýzy

| | |
|-----------------------|---|
| Svoz vzorků a uložení | max. 8 °C |
| Tržní druhy | syrové mléko bez konzervace |
| Objem vzorku | 100 ml |
| Testovaná teplota | 8, 11, 14, 17, 20, 25 °C |
| Doba expozice | 0, 0:30, 1, 1:30, 2, 2:30, 3, 4 h |
| Dílčí vzorky | vychlazený výrobek (kontrola, 0 h), ihned po expozici zvýšené teplotě, za 3 h uložení při teplotě 8 °C a za 24 h při teplotě 8 °C |

2.5. Vyhodnocení datových souborů a stanovení mezí reprodukovatelnosti (nejistoty měření)

2.5.1. CPM, CPP, Koli a *S. aureus*

Výsledné hodnoty (geometrický průměr a log KTJ/ml) pro každou skupinu mikroorganismů (CPM, CPP a Koli) a pro *S. aureus* jsou sumarizovány v Příloze 1 (Tabulka 4 až 8). V Grafu 1 až 5 (Příloha 1) jsou pak znázorněny růstové křivky jednotlivých měření (CPM, CPP, Koli a *S. aureus*) při sledované teplotě a expozičním čase a mezní hodnoty reprodukovatelnosti (nejistoty měření).

2.5.2. Nejistota měření mikroorganismů, limitace měřitelnosti mikrobiologických vzorků podle daných podmínek metodiky

Podklady pro stanovení nejistoty měření = reprodukovatelnosti pro jednotlivá/dílčí měření a mezních hodnot (dolní a horní meze reprodukovatelnosti) jsou uvedeny v Příloze 2 této certifikované metodiky.

Za základ určení oficiální limitace možnosti analyticky změřit počet mikroorganismů v daném biologickém materiálu podle podmínek času transportu vzorku a teploty prostředí

byl zvolen odhad nejistoty výsledků měření na základě opakovaného měření podle metodiky projektu.

Pro stanovení nejistot byla vybrána taková měření, kde bylo provedeno opakovaně u stejných vzorků (4 až 10 krát) různými osobami, proto definičně lze považovat výpočet opakovatelnosti, tzn. směrodatnou odchylku (míru variability) aritmetického průměru opakovaně měřených vzorků mléka (výsledky zpravidla po logaritmické transformaci pro přiblížení se normální frekvenční distribuci hodnot), za reprodukovatelnost měření. Tato hodnota reprodukovatelnosti byla v podstatě jedním zdrojem nejistoty ve vzorci výpočtu nejistoty měření.

Násobení získané hodnoty nejistoty koeficientem 1,96 rozšiřuje konfidenční interval na 95 % možné variability, čímž byla jako hodnota pro grafické odvození (průsečík limitu s růstovou křivkou mikroorganismu) limitace proveditelnosti analýzy získána hodnota rozšířené nejistoty měření. Tuto nelze označit za hodnotu rozšířené kombinované nejistoty měření, neboť byla derivována z jednoho zdroje nejistoty měření.

V mikrobiologii lze hypoteticky (i prakticky), s prodloužením transportu vzorku za zvýšené teploty, počítat s nárůstem výsledku (vzhledem k zamýšleným účelům experimentu), tedy vždy jednostranným posunem ve výsledcích, což by eventuelně naznačovalo, resp. i opravňovalo použití 5 % konvenční limitace na jedné straně variačního oboru (tedy celkem 10 % pro oboustranné, předpokládané variační rozpětí), tedy koeficient 1,64 (pro výpočet rozšířené nejistoty z nerozšířené = směrodatné odchylky = reprodukovatelnosti výsledků měření) podle modelu normovaného rozložení frekvenční distribuce dat, nicméně protože výpočet zahrnuje opakovatelnost, resp. reprodukovatelnost měření jako zdroj nejistoty měření, a tato vykazuje oboustranný trend variability od relevantní střední hodnoty, bylo zvoleno oboustranné omezení oboru v rámci konvenčních 5 % konfidence a tedy koeficient 1,96.

Ačkoliv jsou v mikrobiologických hodnoceních obvyklé logaritmické transformace hodnot (zpravidla pro absenci normální frekvenční distribuce dat), na empirickém základě, u parametru opakovatelnosti měření, který může odpovídat rozdílu v měření, často není log transformace nezbytná. Je běžné, že ačkoliv frekvenční distribuce dat nějakého ukazatele přirozeně nevykazuje normální distribuci, u téhož ukazatele této může být přibližně dosaženo, když jsou jako data aplikovány rozdíly v jeho měření.

Nejistota výsledku měření:

- je vyjádřením stupně spolehlivosti výsledku;
- výsledek \pm nejistota = obor kde na 95 % leží správná hodnota, nejpravděpodobněji nejbližší výsledku;
- kombinovaná z více zdrojů, rozšířená na hladinu pravděpodobnosti 95 % (směrodatná odchylka krát 1,96).

V našem případě byla stanovena průměrná rozšířená nejistota z reprodukovatelnosti, tedy jako rozdíl mezi dvěma jednotlivými logaritmičticky transformovány výsledky, získanými toutéž metodou, ale měřené různými pracovníky, a vypočtena podle vzorce:

$$sx_n = \sqrt{\frac{\sum d^2}{a}} \cdot 1,96$$

kde sx_n = dílčí nejistota měření; d = hodnota difference; a = počet naměřených hodnot.

Průměrná nejistota byla pak pro každé měření označena jako reprodukovatelnost R , vyjádřená v logaritmech (Příloha 2).

2.6. Meze reprodukovatelnosti a růst CPM, CPP, Koli a *S. aureus* při porušení teploty během transportu vzorku do laboratoře

V Tabulce 9 jsou shrnuty vypočtené a navržené hodnoty reprodukovatelnosti pro stanovení horního a dolního limitu pro měření CPM, CPP, Koli a *S. aureus*.

Pro stanovení CPM je legislativně deklarovaná hodnota reprodukovatelnosti $R = 0,45$ log (ČSN EN ISO 4833-1 (2014)). Tato hodnota byla konfrontována s našimi hodnotami reprodukovatelnosti, která byla vypočtena jako průměrná hodnota deseti vybraných měření podle metodiky uvedené výše. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí 0,0864 až 0,6532 log. Vzhledem k tomu, že normovaná hodnota byla téměř shodná s námi stanovenou průměrnou hodnotou ($0,45 \times 0,44$ log), byla pro finální doporučení pro postup analýz CPM v laboratoři potvrzena hodnota $R = 0,45$ log.

Pro měření CPP není hodnota reprodukovatelnosti v normě ČSN ISO 17410 (2020) uvedena. Námi rozšířené hodnoty reprodukovatelnosti se pohybovaly v rozmezí od 0,0736 až 0,5241 log pro teplotu kultivace 6,5 °C a od 0,1349 až 0,8506 log pro teplotu kultivace 21 °C.

Průměrná hodnota pro stanovení mezních hodnot reprodukovatelnosti byla $R = 0,36 \log$ (6,5 °C) a $R = 0,34 \log$ (21 °C).

Pro stanovení koliformních mikroorganismů (Koli) není rovněž hodnota reprodukovatelnosti uvedena v normě ČSN ISO 4832 (2010). Hodnota reprodukovatelnosti byla stanovena jako průměrná hodnota deseti vybraných měření, která se pohybovala od 0,0491 až 0,3110 log. Průměrná hodnota všech měření byla $R = 0,20 \log$.

Podobně pak pro stanovení počtu *S. aureus* není hodnota reprodukovatelnosti v normě ČSN EN ISO 6888-1 (2020) definována. Hodnota reprodukovatelnosti byla rovněž stanovena jako průměrná hodnota deseti vybraných měření, která se pohybovala od 0,0631 až 0,2919 log. Průměrná hodnota všech měření byla $R = 0,19 \log$.

V Tabulce 4 až 8 (Příloha 1) jsou pak zvýrazněné časy a teploty, při kterých jsou překročeny meze reprodukovatelnosti pro stanovení CPM, CPP, Koli a *S. aureus* a vzorky by neměly být analyzovány.

Tabulka 9. Navržené hodnoty reprodukovatelnosti pro stanovení horního a dolního limitu pro měření CPM, CPP, Koli a *S. aureus*

| | reprodukovatelnost dle normy (log)* | průměrná vypočtená reprodukovatelnost (log)** | doporučená reprodukovatelnost R (log) |
|------------------------|-------------------------------------|---|---|
| CPM | 0,45 | 0,4368 | 0,45 |
| CPP 6,5 °C | xxx | 0,3550 | 0,36 |
| CPP 21 °C | xxx | 0,3420 | 0,34 |
| Koli | xxx | 0,1961 | 0,20 |
| <i>S.aureus</i> | xxx | 0,1929 | 0,19 |

Vysvětlivky: * = reprodukovatelnost (R) dle normy ČSN EN ISO 4833-1 (2014); ** = průměrná hodnota reprodukovatelnosti stanovená z deseti vybraných měření

2.7. Doporučení pro postup mikrobiologických analýz v syrovém mléce při porušení chladového režimu během transportu vzorků do laboratoře

2.7.1. Doporučení pro stanovení celkové počtu mezofilních mikroorganismů (CPM)

V Tabulce 10 (Příloha 3) je názorné schéma pro doporučení pro laboratoře pro stanovení CPM u nekonzervovaných vzorků při porušení teplot během transportu po dobu maximálně 4 hodiny:

teplota 8, 11, 14 a 17 °C – pokud dojde ke zvýšení teploty až na 17 °C maximálně po dobu \leq 4 hodin, jsou vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo je možné

vzorky uložit do lednice na maximálně 3 hodiny a poté analyzovat. Vzorky se nedoporučují uchovávat v lednici a analyzovat následující den, tedy po 24 hodinách;

teplota 20 °C - pokud dojde ke zvýšení teploty na 20 °C po dobu max. ≤ 3 hodin, jsou vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo je možné vzorky uložit do lednice na 3 hodiny a poté analyzovat. Pokud dojde k expozici teploty po dobu > 3 až ≤ 4 hodiny, jsou vzorky analyzovatelné pouze ihned po odběru do laboratoře a nesmí se ukládat do lednice. Žádný ze vzorků se rovněž nedoporučuje uchovávat v lednici a analyzovat následující den, tedy po 24 hodinách;

teplota 25 °C - pokud dojde ke zvýšení teploty na 25 °C maximálně po dobu $\leq 2,5$ hodin, jsou vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo je možné vzorky uložit do lednice na maximálně 3 hodiny a poté analyzovat. Pokud dojde k expozici teploty $> 2,5$ až ≤ 3 hodiny, vzorky jsou již analyzovatelné pouze ihned po odběru do laboratoře a nesmí se uložit do lednice. Vzorky vystavené teplotě po dobu > 3 hodin by neměly být analyzovány. Žádné vzorky se rovněž nedoporučují uchovávat v lednici a analyzovat následující den, tedy po 24 hodinách.

2.7.2. Doporučení pro stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů (CPP při 6,5 °C)

V Tabulce 11 (Příloha 3) je názorné schéma pro doporučení pro laboratoře pro stanovení CPP kultivovaných při 6,5 °C u nekonzervovaných vzorků při porušení teplot během transportu po dobu maximálně 4 hodiny:

teplota 8, 11, 14, 17 °C – pokud dojde ke zvýšení teploty až na 17 °C maximálně po dobu ≤ 4 hodin, jsou všechny vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo je možné vzorky uložit do lednice na maximálně 3 hodiny a poté analyzovat. Vzorky se mohou analyzovat i po uložení do lednice na dobu 24 hodin po převzetí do laboratoře;

teplota 20 a 25 °C - pokud dojde ke zvýšení teploty až na 25 °C maximálně po dobu ≤ 3 hodin, jsou vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo je možné vzorky uložit do lednice na maximálně 3 hodiny nebo až 24 hodin a poté analyzovat. Pokud však dojde ke zvýšení teploty na 20 až 25 °C po dobu > 3 až ≤ 4 hodin, jsou vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo po uložení v lednici max. po dobu 3 hodiny. Vzorky není možné uložit do lednice na 24 hodin a poté analyzovat.

2.7.3. Doporučení pro stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů (CPP při 21 °C)

V Tabulce 12 (Příloha 3) je názorné schéma pro doporučení pro laboratoře pro stanovení CPP kultivovaných při 21 °C u nekonzervovaných vzorků při porušení teplot během transportu po dobu maximálně 4 hodiny:

teplota 8 a 11 °C – pokud je během transportu dodržena teplota 8 °C nebo dojde ke zvýšení teploty na 11 °C maximálně po dobu ≤ 4 hodin, jsou vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo je možné vzorky uložit do lednice na maximálně 3 hodiny a poté analyzovat. Vzorky se nedoporučují uchovávat v lednici a analyzovat následující den, tedy po 24 hodinách po jejich odběru;

teplota 14 až 17 °C - pokud dojde ke zvýšení teploty až na 17 °C maximálně jen po dobu ≤ 3 hodin, jsou vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo je možné vzorky uložit do lednice na maximálně 3 hodiny a poté analyzovat. Pokud dojde k expozici teploty po dobu > 3 až ≤ 4 hodiny, jsou vzorky analyzovatelné pouze ihned po odběru do laboratoře a nesmí se ukládat do lednice. Žádný ze vzorků se rovněž nedoporučuje uchovávat v lednici a analyzovat následující den, tedy po 24 hodinách;

teplota 20 °C - pokud dojde ke zvýšení teploty na 20 °C maximálně po dobu $\leq 2,5$ hodin, jsou vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo je možné vzorky uložit do lednice na dobu maximálně 3 hodiny a poté analyzovat. Pokud dojde k expozici teploty $> 2,5$ až ≤ 3 hodiny, vzorky jsou analyzovatelné pouze ihned po odběru do laboratoře a nesmí se uložit do lednice. Vzorky vystavené teplotě po dobu > 3 hodin by neměly být analyzovány vůbec. Žádné vzorky se rovněž nedoporučují uchovávat v lednici a analyzovat následující den, tedy po 24 hodinách po jejich odběru.

teplota 25 °C - pokud dojde ke zvýšení teploty na 25 °C maximálně po dobu 2,5 hodin, jsou vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo je možné vzorky uložit do lednice na maximálně 3 hodiny a poté analyzovat. Vzorky vystavené teplotě po dobu $> 2,5$ hodiny by neměly být analyzovány. Žádné vzorky se rovněž nedoporučují uchovávat v lednici a analyzovat následující den, tedy po 24 hodinách po jejich odběru do laboratoře.

2.7.4. Doporučení pro stanovení počtu koliformních bakterií (Koli)

V Tabulce 13 (Příloha 3) je názorné schéma pro doporučení pro laboratoře pro stanovení koliformních bakterií u nekonzervovaných vzorků při porušení teplot během transportu po dobu maximálně 4 hodiny:

teplota 8 a 11 °C – pokud je během transportu dodržena teplota 8 °C nebo dojde k navýšení teploty na max. 11 °C po dobu max. ≤ 4 hodiny, jsou vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo je možné vzorky uložit do lednice na maximálně 3 hodiny a poté analyzovat. Vzorky je dále možné uchovávat v lednici a analyzovat následující den, tedy po 24 hodinách po jejich svozu do laboratoře;

teplota 14 °C – pokud dojde ke zvýšení teploty na 14 °C po dobu ≤ 3 hodin, jsou vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo je možné vzorky uložit do lednice

na maximálně 3 hodiny nebo 24 hodin a poté analyzovat. Pokud dojde ke zvýšení teploty po dobu > 3 až ≤ 4 hodiny, mohou být vzorky analyzovány ihned nebo po uchování v lednici po dobu 3 hodin. Tyto vzorky se již nedoporučují uchovávat v lednici a zpracovávat následující den, tedy po 24 hodinách;

teplota 17 °C - pokud dojde ke zvýšení teploty na 17 °C maximálně jen po dobu $\leq 1,5$ hodiny, jsou vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo je možné vzorky uložit do lednice na 3 hodiny až 24 hodin a poté analyzovat. Pokud dojde k expozici teploty po dobu $> 1,5$ až ≤ 3 hodin, jsou vzorky analyzovatelné pouze ihned po odběru do laboratoře, nebo po 3 hodinách, ale nesmí se ukládat do lednice na dalších 24 hodin. Pokud dojde ke zvýšení teploty po dobu > 3 až ≤ 4 hodin, mohou být vzorky analyzovány pouze ihned po předání do laboratoře. Tyto vzorky se již nedoporučují uchovávat v lednici a zpracovávat po 3 hodinách nebo následující den, tedy po 24 hodinách;

teplota 20 °C - pokud dojde ke zvýšení teploty na 20 °C maximálně po dobu $\leq 0,5$ hodin, jsou vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo je možné vzorky uložit do lednice na 3 hodiny až 24 hodin a poté analyzovat. Pokud dojde k expozici teploty $> 0,5$ až ≤ 2 hodiny, vzorky jsou analyzovatelné pouze ihned po odběru do laboratoře nebo po 3 hodinách uložení v lednici. Vzorky vystavené teplotě po dobu > 2 až ≤ 4 hodin je možné zpracovat pouze ihned po odběru do laboratoře a nedoporučují se uchovávat v lednici a analyzovat ani po 3 nebo 24 hodinách po jejich uložení,

teplota 25 °C - pokud dojde ke zvýšení teploty na 25 °C maximálně po dobu $\leq 1,5$ hodin, jsou vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo po uložení v lednici po dobu max. 3 hodin. Ostatní vzorky, u kterých došlo ke zvýšení teploty $> 1,5$ až ≤ 4 hodiny, se nedoporučují se uchovávat v lednici a analyzovat ani po 3 nebo 24 hodinách po jejich uložení.

2.7.5. Doporučení pro stanovení počtu *S. aureus* (SA)

V Tabulce 14 (Příloha 3) je názorné schéma pro doporučení pro laboratoře pro stanovení koliformních bakterií u nekonzervovaných vzorků při porušení teplot během transportu po dobu maximálně 4 hodiny:

teplota 8, 11, 14 a 17 °C – pokud dojde během transportu ke zvýšení teploty až na 17 °C po dobu ≤ 4 hodiny, jsou vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo je možné vzorky uložit do lednice na 3 hodiny až 24 hodin a poté analyzovat;

teplota 20 °C – pokud dojde ke zvýšení teploty na 20 °C po dobu ≤ 3 hodin, jsou vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo je možné vzorky uložit do lednice na maximálně 3 hodiny nebo 24 hodin a poté analyzovat. Pokud dojde ke zvýšení teploty po dobu > 3 až ≤ 4 hodiny, mohou být vzorky analyzovány ihned nebo po uchování v lednici po

dobu 3 hodin. Tyto vzorky se již nedoporučují uchovávat v lednici a zpracovávat následující den, tedy po 24 hodinách;

teplota 25 °C - pokud dojde ke zvýšení teploty na 25 °C maximálně po dobu ≤ 2 hodin, jsou vzorky analyzovatelné buď ihned po předání do laboratoře, nebo po uložení v lednici po dobu 3 až 24 hodin. Pokud dojde ke zvýšení teploty po dobu > 2 až ≤ 3 hodiny, mohou být vzorky analyzovány ihned nebo po uchování v lednici po dobu 3 hodin. Tyto vzorky se již nedoporučují uchovávat v lednici a zpracovávat následující den, tedy po 24 hodinách po jejich odběru. Vzorky, u kterých byla zvýšena teplota po dobu > 3 až ≤ 4 hodiny, doporučujeme zpracovat ihned po převzetí v laboratoři. Vzorky není vhodné dále uchovávat v lednici.

3) Srovnání novosti

Navržená metodika v předstihu reaguje i na možné legislativní úpravy pro stanovení celkového počtu mikroorganismů ve vzorcích bez konzervačního činidla, u kterých došlo během transportu k porušení chladového režimu. Metodika přesně definuje podmínky, za kterých jsou takto svážené vzorky mléka ještě vhodné pro mikrobiologické analýzy s věrohodnými a reprodukovatelnými výsledky. Kvalitativní limity byly jednak zohledněny na základě získaných výsledků vlastního výzkumu a vývoje (CPP, Koli a SA) nebo byly dány do souvislosti s platnými hodnotami reprodukovatelnosti podle normy ČSN EN ISO 4833-1 pro stanovení mezofilních mikroorganismů (CPM).

Jedná se o inovovaný postup kontroly podmínek ošetření, transportu syrových vzorků mléka bez konzervačních činidel a jejich mikrobiologického vyšetření pro podporu věrohodnosti získávaných analytických a srovnatelných výsledků. Metodika je rozšířením dosavadních poznatků o nutnosti chladového režimu při transportu vzorků a dále uvedením nových doporučení pro podporu jistoty analytických výsledků v praxi.

4) Popis uplatnění

Potenciálními uživateli metodiky jsou prvovýrobci mléka, organizace provádějící svozné služby, mlékárny, veterinární lékaři a také odborná veřejnost (např. výzkumné ústavy, vysoké školy).

Konkrétním uživatelem metodiky je Svaz výrobců mléka a.s., se sídlem Jílová 1550/1, 787 01 Šumperk (IČ: 47674792), se kterým je uzavřena smlouva o využití uplatněné metodiky. Tento uživatel vzhledem ke své účelovosti, pro kterou byl založen, tj. spolupráce s prvovýrobci mléka při vzájemných konzultacích, setkáních, předávání zkušeností, šíření novostí

v mlékárenském průmyslu, svoz vzorků mléka, spolupráce s odběrateli mléka je pro praktické využití metodiky a její implementace do praxe vhodným společným uživatelem pro sdružené prvovýrobce a zpracovatele mléka.

Vyvinutá certifikovaná metodika byla předána do užívání jmenovaného uživatele v elektronické i písemné formě.

5) Ekonomické aspekty

Mikrobiologická kontrola syrového mléka podporuje kvalitu v mléčném potravinovém řetězci při zpracování na různé mléčné produkty. Náklady na konkrétní zavedení postupu uvedeného v metodice by neměly pro jednotlivé faremní uživatele nebo konkrétního uživatele výsledků překročit, podle kvalifikovaného odhadu, částku 50 tis. Kč (náklady na kvalitních termoboxů, monitoring teploty). Přínos pro uživatele (farmáře) nelze přesně konkretizovat. Jedná se o možný přínos v případě podpory mikrobiologické jistoty syrového mléka, jeho následné zpracování na mléčné produkty a ochranu zdraví spotřebitele. Metodika může přispět i k redukci chybovosti výsledků analýz i v případných sporných jednání nebo hodnocení výsledných hodnot na základě reprodukovatelnosti výsledků (nejistota měření, mezní hodnoty stanovení).

6) Seznam použité související literatury

- BANYKÓ J., VYLETĚLOVÁ M. (2009). Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Lett. Appl. Microbiol.* 48 (3): 318–323.
- BURDYCHOVÁ O., BARANOVÁ M. (2005): Vplyv technologicky nežiadúcej mikroflóry na kvalitu mlieka a mliečnych výrobkov. *Mliekarstvo*, 36, 2: 18–2.
- BURDYCHOVÁ R., HOFERKOVÁ P. (2008): Monitoring of psychrotrophic microorganisms in raw milk. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendel. Brun.*, LVI, No. 4: 21–28.
- ČSN 57 0529: Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování. Praha, 1997.
- ČSN EN ISO 4833-1 Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů - Část 1: Technika přelivem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C (2013).
- ČSN ISO 17410 Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů (2020).

- ČSN ISO 4832 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu koliformních bakterií - Technika počítání kolonií (2010).
- ČSN EN ISO 6888-1 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy) - Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera (2000).
- ČSN EN ISO 7218 Mikrobiologie potravin a krmiv. Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení (2008).
- DUCKOVÁ V., ČANIGOVÁ M. (2004): Psychrotrofná mikroflóra mléka. *Mliekarstvo*, 35, 3: 32–35.
- GÖRNER F., VALÍK L. (2004): Aplikovaná mikrobiológia potravín. Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN: 80-967064-9-7.
- HANTSIS-ZACHAROV E., HALPERN M. (2007): Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *App. Environ. Microbiol.*, 73 (22): 7162-8.
- HEESCHEN W., REICHMUTH J., TOLLE A., ZIEDLER H. (1969): Preservation of milk samples for bacteriologic and cytologic examinations and examinations for inhibitors. *Milchwissenschaft*, 24: 729-734.
- JANŠTOVÁ B., NAVRÁTILOVÁ P. (2014): Produkce mléka a technologie mléčných výrobků. Brno. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-712-1.
- JANŠTOVÁ B., VORLOVÁ L., NAVRÁTILOVÁ P., KRÁLOVÁ M., NECIDOVÁ L., MAŘICOVÁ E. (2012): Technologie mléka a mléčných výrobků. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-635-3.
- KLIMEŠOVÁ M., HANUŠ O., NEJESCHLEBOVÁ H., MORÁVKOVÁ M., KUCHAROVIČOVÁ I., BAČOVÁ R., ROUBAL P., SEYDLOVÁ R., NEJESCHLEBOVÁ L. (2021a): Vliv nebakteriálních původců mastitid na technologické vlastnosti mléka – produkce lytických enzymů. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 189, 32 (6): 7 – 10.
- KLIMEŠOVÁ M., NEJESCHLEBOVÁ H., VORLOVÁ L., HANUŠ O., HARUŠTIAKOVÁ D., NEJESCHLEBOVÁ L., VONDRUŠKOVÁ E., KOPECKÝ J. (2021b): Srovnání celkového počtu vybraných skupin mikroorganismů v syrovém mléce při odběru na farmě a po transportu do laboratoře. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 188, 32 (5): 6–10.
- KLIMEŠOVÁ M., NEJESCHLEBOVÁ H., KUCHAROVIČOVÁ I., ROUBAL P., SEYDLOVÁ R. (2022): Tvorba biofilmu kvasinek izolovaných ze syrového mléka a účinnost dezinfekčních prostředků. *Mlékařské listy – Zpravodaj*, 191, 33 (2): 1–8.

- LIBISCH B., PICOT C., CEBALLOS-GARZON A., MORAVKOVA M., KLIMESOVÁ M., TELKES G., CHUANG S.T., LE PAPE P. (2022): Prototheca infections and ecology from a one health perspective. *Microorganisms*, 10, 938. DOI: 10.3390/microorganisms10050938
- MARTIN N.H., TRMČÍČ A., HSIEH T-H., BOOR K.J., WIEDMANN M. (2016): The evolving role of coliforms as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods. *Front. Microbiol.*, Article 1549, vol. 7, p. 8. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01549.
- MUNSCH-ALATOSSAVA P., ALATOSSAVA T. (2006). Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiol. Res.* 161: 334–346.
- MURRAY P.R., BARON E.J., PFALLER M.A., TENOVER F.C., YOLKEN R.H. (1999): Manual of clinical mikrobiology. 7th edition.
- Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004 stanovující zvláštní hygienické předpisy pro potraviny živočišného původu.
- Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny.
- NAVRÁTILOVÁ P., KRÁLOVÁ P., KRÁLOVÁ-DRÁČKOVÁ M., JANŠTOVÁ B., PŘIDALOVÁ H., CUPÁKOVÁ Š., VORLOVÁ L. (2012): Hygiena produkce mléka. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-624-7.
- NEJESCHLEBOVÁ H., HANUŠ O., SEYDLOVÁ R., KOPECKÝ J., JEDELSKÁ R. (2022): Mléčná užitkovost a kvalita mléka při subklinických mastitidách způsobených řasou *Prototheca*. Fenotyp DKU.CZ, Odborné informace, zprávy a zajímavosti pro chovatele, 1: 12–16.
- PÁČOVÁ Z., ŠVEC P., STENFORS L.P., VYLETĚLOVÁ M., SEDLÁČEK I. (2003): Isolation of the psychrotolerant species *Bacillus weihenstephanensis* from raw cow's milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 48 (2): 93–96.
- SORHAUG T., STEPANIAK L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends Food Sci. Technol.*, 8: 35–41.
- TANČINOVÁ D., MAKOVÁ J., FELŠÖCIOVÁ S., KAČANIOVÁ S., KAČANIOVÁ M., KMEŤ V. (2012): Mikrobiológia potravín. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre. ISBN: 978-80-552-0904-3.
- TICHÁČEK, A., VYLETĚLOVÁ, M., HANUŠ, O. (1998): Odborné poradenství v prvovýrobě mléka s ohledem na mikrobiologické jakostní ukazatele. In *Kvalitativní aspekty prvovýroby mléka*: Sborník referátů VÚCHS Rapotín: 61–69.
- Vyhláška č. 128/2009 Sb. Vyhláška o přizpůsobení veterinárních a hygienických požadavků pro některé potravinářské podniky, v nichž se zachází se živočišnými produkty.

Vyhláška č. 289/2007 Sb. o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství.

Vyhláška č. 445/2017 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 128/2009 Sb., o přizpůsobení veterinárních a hygienických požadavků pro některé potravinářské podniky, v nichž se zachází se živočišnými produkty, ve znění vyhlášky č. 191/2013 Sb.

VYLETĚLOVÁ M., BENDA P., HANUŠ O., KOPUNECZ P. (1999): Determination of total counts of psychrotrophic bacteria in pool milk samples and their relation to total counts of microorganisms. *Czech J. Food Sci.*, 17: 216–222.

VYLETĚLOVÁ M., HANUŠ O., URBANOVÁ E., KOPUNECZ P. (2000): The occurrence and identification of psychrotrophic bacteria with proteolytic and lipolytic activity in bulk milk samples at storage in primary production conditions. *Czech J. Animal Sci.*, 45: 373–383.

VYLETĚLOVÁ, M. (2010): The survival of *Mycoplasma bovis* at different temperatures. *Czech J. Food Sci.*, 28 (1): 74–78.

7) Seznam publikací, které předcházely metodice

ELICH O., KOPÁČEK J., NĚMEČKOVÁ I., KLIMEŠOVÁ M., CIHLÁŘ J., SEYDLOVÁ R., BAZALOVÁ O., NEJESCHLEBOVÁ H., DRBOHLAV J., HYRŠLOVÁ I. (2022): Přednáška: *Klimešová M., Nejeschlebová H., Nejeschlebová L., Vondrušková E. „Hodnocení CPM při porušení doporučeného chladového režimu při transportu vzorků do laboratoře“*. XXIV. DEN VÚM, 2022, on-line, 05. 04. 2022.

HANUŠ O., KLIMEŠOVÁ M., JEDELSKÁ R., HEGEDŮŠOVÁ Z., HOLÁSEK R., KOPECKÝ J. (2021): Ošetření a přeprava vzorků mléka v kontrole užítkovosti a věrohodnost analytických výsledků. Fenotyp DKU.CZ, Odborné informace, zprávy a zajímavosti pro chovatele, 2, 32 – 33.

KLIMEŠOVÁ M., NEJESCHLEBOVÁ H., VORLOVÁ L., HANUŠ O., HARUŠTIAKOVÁ D., NEJESCHLEBOVÁ L., VONDRUŠKOVÁ E., KOPECKÝ J. (2021): Srovnání celkového počtu vybraných skupin mikroorganismů v syrovém mléce při odběru na farmě a po transportu do laboratoře. *Mlékařské listy*, 188, 32 (5): 6–10.

KLIMEŠOVÁ M., NEJESCHLEBOVÁ H., VORLOVÁ L., NECIDOVÁ L., HANUŠ O., NEJESCHLEBOVÁ L., VONDRUŠKOVÁ E., KOPECKÝ J. (2022): Vliv teploty na vybrané ukazatele syrového mléka. *Mlékařské listy*, 194, 33 (5): 16-22.

KLIMEŠOVÁ M., NEJESCHLEBOVÁ L., NECIDOVÁ L., HANUŠ O., BURSOVÁ Š., VORLOVÁ L. (2023): Vliv míry porušení chladírenského řetězce při transportu vzorků syrového mléka malých přežvýkavců na stanovení celkového počtu mikroorganismů. *In Sborník*

přednášek HYGIENA ALIMENTORUM XLIII. „Zdravotná bezpečnost' a kvalita mliečnych a rastlinných komodít – aktuálne problémy a trendy“. Štrbské Pleso, 10. - 12. 5. 2023.

KOPÁČEK J., ELICH O., ČURDA L., BRÁNYIK T., NĚMEČKOVÁ I., KAVKOVÁ M., SVEJCAROVÁ M., KLIMEŠOVÁ M., HYRŠLOVÁ I. (2023): Přednáška: Klimešová M., Nejeschlebová H., Hanuš O., Nejeschlebová L., Vondrušková E. „Doporučení pro postup mikrobiologických analýz v syrovém mléce při porušení chladového režimu během transportu vzorků do laboratoře“. Workshop „XXV. DEN VÚM“, 27. 4. 2023, Praha.

KLIMEŠOVÁ M., NEJESCHLEBOVÁ H., HANUŠ O., NEJESCHLEBOVÁ L., VONDRUŠKOVÁ E. (2023): Vliv porušení teploty při transportu vzorků do laboratoře na stanovení *S. aureus* v syrovém mléce. Workshop, Brno 27. 6. 2023.

Příloha 1

Výsledné hodnoty (geometrický průměr a log KTJ/ml) stanovení počtu mikroorganismů vykultivovaných při 30 °C (Tabulka 4, Graf 1)

Výsledné hodnoty (geometrický průměr a log KTJ/ml) stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů vykultivovaných při 6,5 °C (Tabulka 5, Graf 2)

Výsledné hodnoty (geometrický průměr a log KTJ/ml) stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů vykultivovaných při 21 °C (Tabulka 6, Graf 3)

Výsledné hodnoty (geometrický průměr a log KTJ/ml) stanovení počtu koliformních bakterií (Tabulka 7, Graf 4)

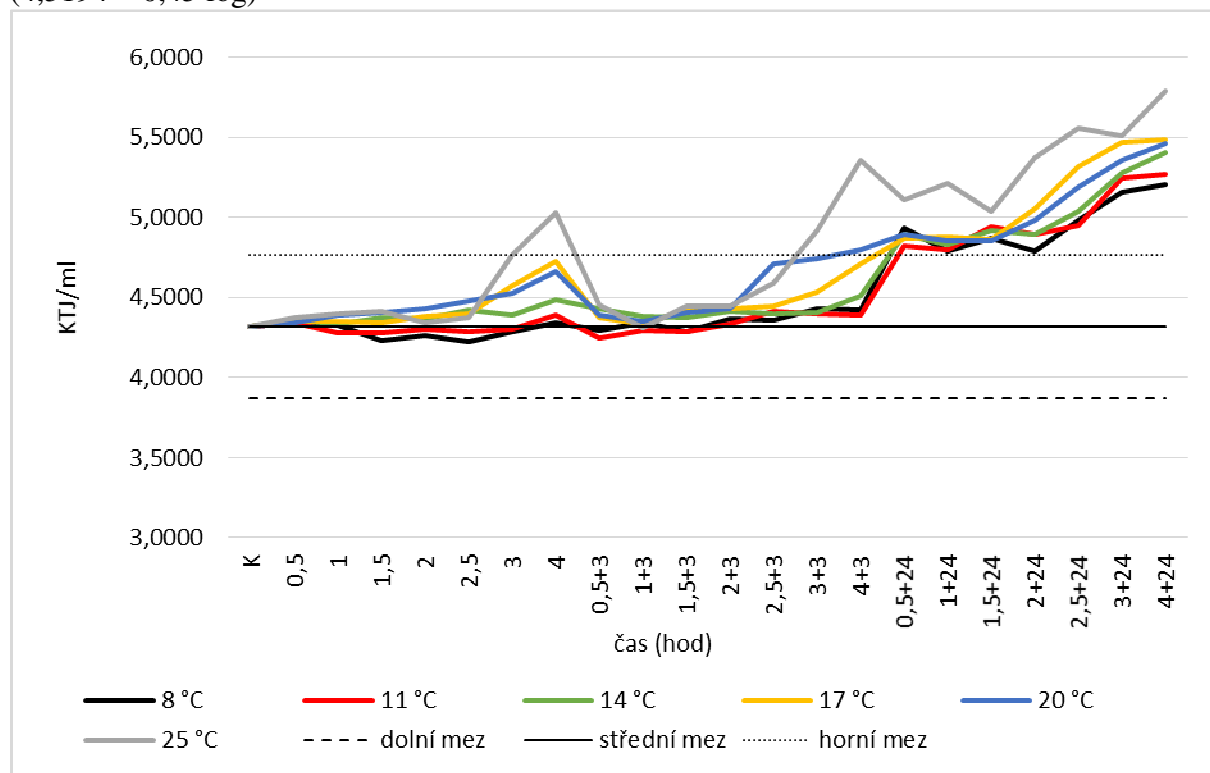
Výsledné hodnoty (geometrický průměr a log KTJ/ml) stanovení počtu *Staphylococcus aureus* (Tabulka 8, Graf 5)

Tabulka 4. Vývoj CPM v kravském mléce a mezní hodnoty reprodukovatelnosti ($4,3194 \pm 0,45 \log$)

| teplota (°C) | 8 | 11 | 14 | 17 | 20 | 25 | 8 | 11 | 14 | 17 | 20 | 25 |
|--------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| čas (hod) | geometrický průměr CPM (v tis. KTJ/ml) | | | | | | log KTJ/ml | | | | | |
| 0 | 20,9 | 20,9 | 20,9 | 20,9 | 20,9 | 20,9 | 4,3194 | 4,3194 | 4,3194 | 4,3194 | 4,3194 | 4,3194 |
| 0,5 | 22,0 | 21,8 | 23,0 | 22,5 | 22,1 | 23,9 | 4,3431 | 4,3382 | 4,3610 | 4,3513 | 4,3448 | 4,3776 |
| 1 | 21,1 | 19,0 | 21,6 | 22,5 | 24,6 | 25,2 | 4,3246 | 4,2797 | 4,3338 | 4,3518 | 4,3910 | 4,4019 |
| 1,5 | 17,0 | 19,1 | 23,6 | 22,2 | 25,7 | 26,1 | 4,2315 | 4,2803 | 4,3728 | 4,3460 | 4,4097 | 4,4162 |
| 2 | 18,2 | 19,9 | 23,2 | 24,3 | 27,1 | 22,0 | 4,2599 | 4,2983 | 4,3654 | 4,3850 | 4,4322 | 4,3428 |
| 2,5 | 16,6 | 19,3 | 26,3 | 25,1 | 30,0 | 23,7 | 4,2207 | 4,2856 | 4,4206 | 4,4004 | 4,4778 | 4,3740 |
| 3 | 19,2 | 20,2 | 24,4 | 37,6 | 33,6 | 58,5 | 4,2825 | 4,3057 | 4,3882 | 4,5755 | 4,5259 | 4,7670 |
| 4 | 22,1 | 24,6 | 30,7 | 53,5 | 45,9 | 106,6 | 4,3439 | 4,3916 | 4,4875 | 4,7285 | 4,6617 | 5,0276 |
| 0,5+3 | 19,7 | 17,7 | 26,9 | 23,5 | 24,7 | 28,4 | 4,2943 | 4,2489 | 4,4301 | 4,3710 | 4,3934 | 4,4536 |
| 1+3 | 22,1 | 19,8 | 24,3 | 21,7 | 22,3 | 20,5 | 4,3439 | 4,2973 | 4,3854 | 4,3370 | 4,3486 | 4,3118 |
| 1,5+3 | 19,5 | 19,3 | 23,5 | 26,4 | 25,4 | 27,8 | 4,2896 | 4,2853 | 4,3710 | 4,4213 | 4,4056 | 4,4444 |
| 2+3 | 23,1 | 21,6 | 25,8 | 26,9 | 26,9 | 28,1 | 4,3641 | 4,3335 | 4,4109 | 4,4293 | 4,4304 | 4,4480 |
| 2,5+3 | 22,8 | 25,9 | 24,9 | 27,7 | 51,3 | 39,0 | 4,3583 | 4,4133 | 4,3954 | 4,4422 | 4,7104 | 4,5914 |
| 3+3 | 26,7 | 25,2 | 25,4 | 34,2 | 54,8 | 83,2 | 4,4267 | 4,4019 | 4,4055 | 4,5335 | 4,7387 | 4,9200 |
| 4+3 | 26,2 | 24,3 | 32,3 | 50,8 | 63,2 | 228,0 | 4,4191 | 4,3864 | 4,5085 | 4,7058 | 4,8008 | 5,3579 |
| 0,5+24 | 86,3 | 65,9 | 78,5 | 74,1 | 78,2 | 127,8 | 4,9358 | 4,8190 | 4,8948 | 4,8697 | 4,8932 | 5,1066 |
| 1+24 | 62,1 | 63,1 | 66,9 | 75,7 | 72,0 | 162,1 | 4,7934 | 4,8003 | 4,8257 | 4,8793 | 4,8571 | 5,2098 |
| 1,5+24 | 73,8 | 87,2 | 82,2 | 72,7 | 70,9 | 109,6 | 4,8681 | 4,9406 | 4,9150 | 4,8613 | 4,8505 | 5,0399 |
| 2+24 | 62,0 | 78,9 | 78,2 | 113,1 | 96,0 | 235,4 | 4,7925 | 4,8972 | 4,8930 | 5,0535 | 4,9821 | 5,3718 |
| 2,5+24 | 95,6 | 89,3 | 109,6 | 205,8 | 153,3 | 357,4 | 4,9806 | 4,9507 | 5,0397 | 5,3134 | 5,1855 | 5,5531 |
| 3+24 | 143,5 | 176,4 | 189,8 | 292,0 | 228,0 | 324,1 | 5,1568 | 5,2466 | 5,2782 | 5,4654 | 5,3580 | 5,5107 |
| 4+24 | 160,8 | 184,8 | 255,4 | 308,1 | 288,1 | 612,9 | 5,2063 | 5,2667 | 5,4072 | 5,4887 | 5,4596 | 5,7874 |

Vysvětlivky: zvýrazněné hodnoty překračují horní mez reprodukovatelnosti = 4,7694

Graf 1. Vývoj CPM (log KTJ/ml) v kravském mléce a mezní hodnoty reprodukovatelnosti ($4,3194 \pm 0,45 \log$)

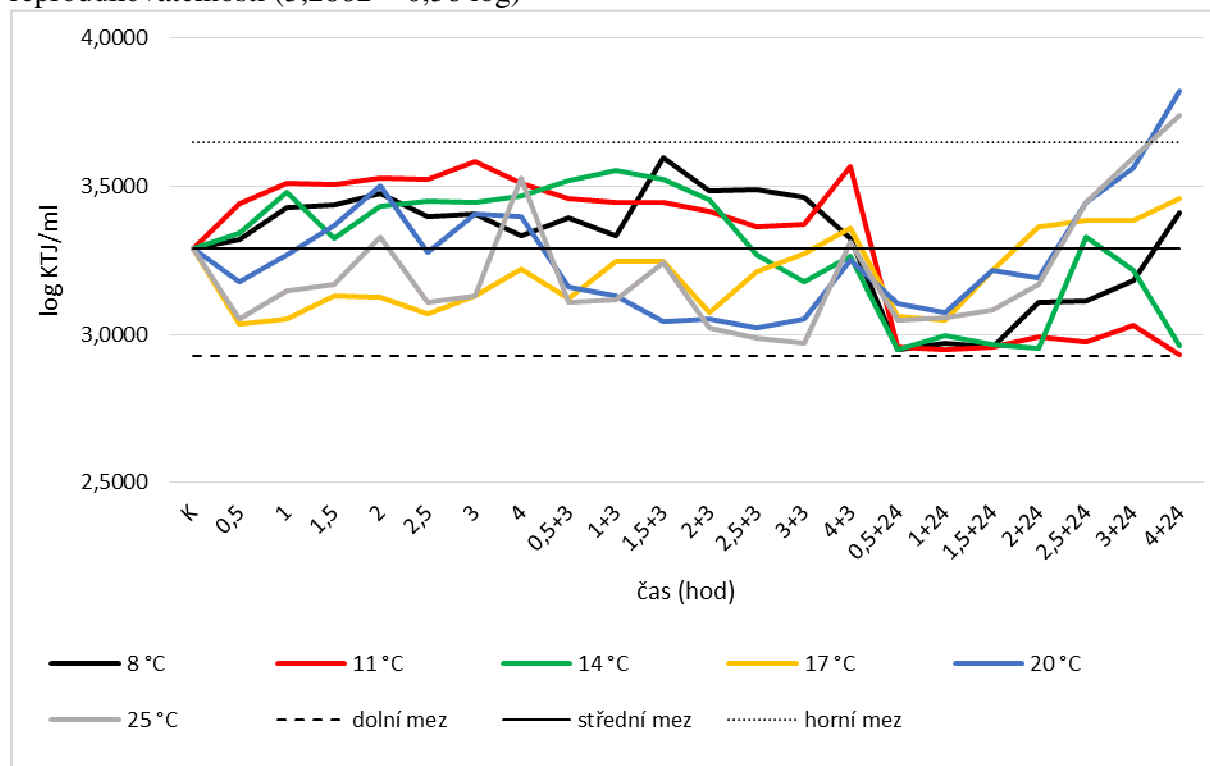


Tabulka 5. Vývoj CPP kultivovaných při 6,5 °C v kravském mléce a mezní hodnoty reprodukovatelnosti ($3,2882 \pm 0,36 \log$)

| teplota (°C) | 8 | 11 | 14 | 17 | 20 | 25 | 8 | 11 | 14 | 17 | 20 | 25 |
|--------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|------------|--------|--------|--------|---------------|---------------|
| čas (hod) | geometrický průměr CPP (v tis. KTJ/ml) | | | | | | log KTJ/ml | | | | | |
| 0 | 1,9 | 1,9 | 1,9 | 1,9 | 1,9 | 1,9 | 3,2882 | 3,2882 | 3,2882 | 3,2882 | 3,2882 | 3,2882 |
| 0,5 | 2,1 | 2,1 | 2,2 | 1,1 | 1,5 | 1,1 | 3,3190 | 3,4416 | 3,3434 | 3,0347 | 3,1759 | 3,0527 |
| 1 | 2,7 | 2,7 | 3,0 | 1,1 | 1,8 | 1,4 | 3,4266 | 3,5121 | 3,4806 | 3,0510 | 3,2660 | 3,1464 |
| 1,5 | 2,7 | 2,7 | 2,1 | 1,3 | 2,3 | 1,5 | 3,4360 | 3,5071 | 3,3234 | 3,1297 | 3,3670 | 3,1695 |
| 2 | 3,0 | 3,0 | 2,7 | 1,3 | 3,2 | 2,1 | 3,4744 | 3,5253 | 3,4332 | 3,1257 | 3,5011 | 3,3298 |
| 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,8 | 1,2 | 1,9 | 1,3 | 3,3966 | 3,5216 | 3,4511 | 3,0695 | 3,2762 | 3,1084 |
| 3 | 2,5 | 2,5 | 2,8 | 1,3 | 2,6 | 1,4 | 3,4058 | 3,5822 | 3,4462 | 3,1285 | 3,4072 | 3,1304 |
| 4 | 2,1 | 3,2 | 2,9 | 1,7 | 2,5 | 3,4 | 3,3320 | 3,5113 | 3,4649 | 3,2221 | 3,3964 | 3,5260 |
| 0,5+3 | 2,5 | 2,9 | 3,3 | 1,3 | 1,5 | 1,3 | 3,3953 | 3,4582 | 3,5205 | 3,1209 | 3,1617 | 3,1089 |
| 1+3 | 2,1 | 2,8 | 3,6 | 1,8 | 1,3 | 1,3 | 3,3320 | 3,4474 | 3,5516 | 3,2476 | 3,1284 | 3,1185 |
| 1,5+3 | 3,9 | 3,9 | 3,3 | 1,8 | 1,1 | 1,7 | 3,5962 | 3,4462 | 3,5217 | 3,2481 | 3,0414 | 3,2417 |
| 2+3 | 3,0 | 3,0 | 2,9 | 1,2 | 1,1 | 1,1 | 3,4842 | 3,4145 | 3,4559 | 3,0726 | 3,0514 | 3,0228 |
| 2,5+3 | 3,1 | 3,1 | 1,9 | 1,6 | 1,0 | 1,0 | 3,4902 | 3,3620 | 3,2701 | 3,2126 | 3,0201 | 2,9873 |
| 3+3 | 2,9 | 2,9 | 1,5 | 1,9 | 1,1 | 0,9 | 3,4626 | 3,3722 | 3,1787 | 3,2714 | 3,0532 | 2,9697 |
| 4+3 | 2,1 | 3,7 | 1,8 | 2,3 | 1,8 | 2,0 | 3,3237 | 3,5665 | 3,2648 | 3,3575 | 3,2495 | 3,3115 |
| 0,5+24 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 1,2 | 1,3 | 1,1 | 2,9499 | 2,9557 | 2,9474 | 3,0614 | 3,1049 | 3,0476 |
| 1+24 | 0,9 | 0,9 | 1,0 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 2,9683 | 2,9479 | 2,9969 | 3,0492 | 3,0749 | 3,0546 |
| 1,5+24 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 1,6 | 1,6 | 1,2 | 2,9583 | 2,9577 | 2,9670 | 3,2165 | 3,2150 | 3,0835 |
| 2+24 | 1,3 | 1,0 | 0,9 | 2,3 | 1,5 | 1,5 | 3,1072 | 2,9895 | 2,9515 | 3,3640 | 3,1883 | 3,1699 |
| 2,5+24 | 1,3 | 0,9 | 2,1 | 2,4 | 2,8 | 2,8 | 3,1126 | 2,9736 | 3,3272 | 3,3838 | 3,4440 | 3,4439 |
| 3+24 | 1,5 | 1,1 | 1,6 | 2,4 | 3,7 | 3,9 | 3,1831 | 3,0295 | 3,2158 | 3,3834 | 3,5631 | 3,5949 |
| 4+24 | 2,6 | 0,9 | 0,9 | 2,9 | 6,6 | 5,5 | 3,4105 | 2,9302 | 2,9632 | 3,4569 | 3,8206 | 3,7381 |

Vysvětlivky: zvýrazněné hodnoty překračují horní mez reprodukovatelnosti = 3,6482

Graf 2. Vývoj CPP (log KTJ/ml) při 6,5 °C v kravském mléce a mezní hodnoty reprodukovatelnosti ($3,2882 \pm 0,36 \log$)

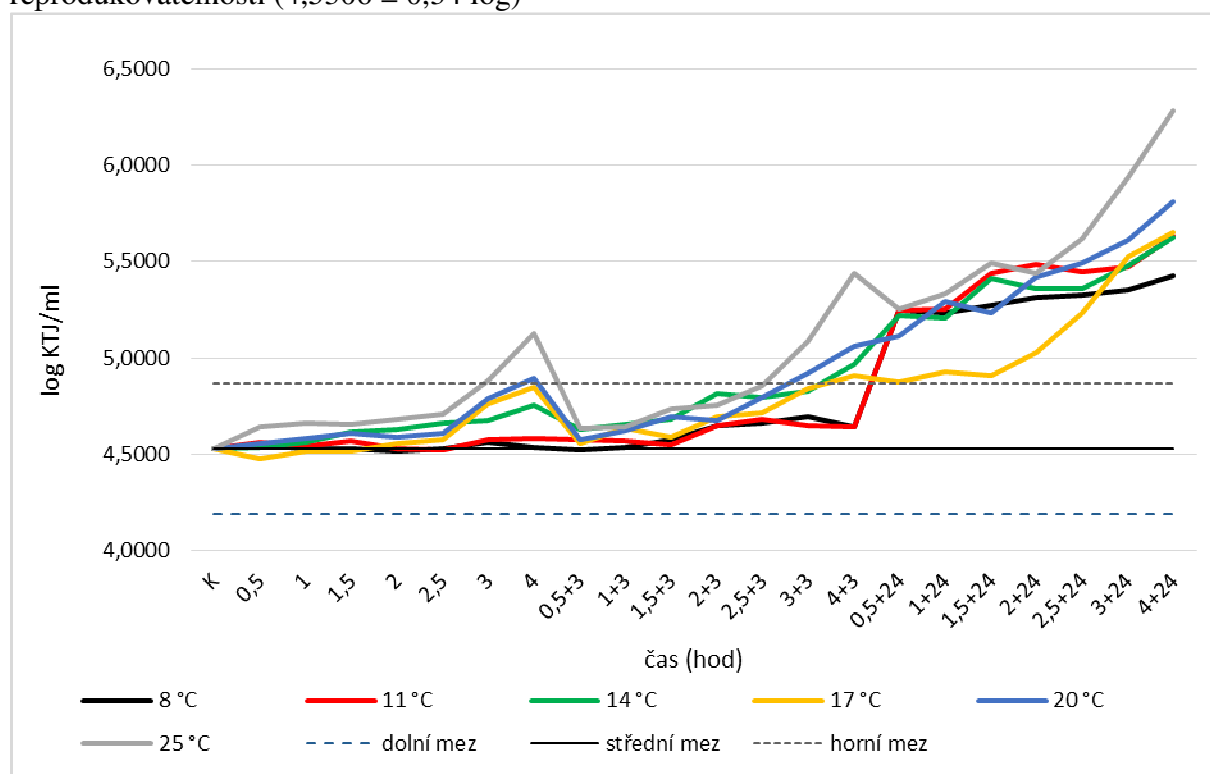


Tabulka 6. Vývoj CPP při 21 °C v kravském mléce a mezní hodnoty reprodukovatelnosti (4,5306 ± 0,34 log)

| teplota (°C) | 8 | 11 | 14 | 17 | 20 | 25 | 8 | 11 | 14 | 17 | 20 | 25 |
|--------------|--|-------|-------|-------|-------|--------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| čas (hod) | geometrický průměr CPP (v tis. KTJ/ml) | | | | | | log KTJ/ml | | | | | |
| 0 | 33,9 | 33,9 | 33,9 | 33,9 | 33,9 | 33,9 | 4,5306 | 4,5306 | 4,5306 | 4,5306 | 4,5306 | 4,5306 |
| 0,5 | 35,6 | 36,5 | 34,2 | 29,9 | 35,9 | 44,0 | 4,5514 | 4,5625 | 4,5342 | 4,4752 | 4,5553 | 4,6435 |
| 1 | 33,9 | 35,0 | 36,6 | 32,8 | 38,1 | 45,8 | 4,5302 | 4,5441 | 4,5631 | 4,5160 | 4,5805 | 4,6604 |
| 1,5 | 33,6 | 37,2 | 41,0 | 32,9 | 40,8 | 45,4 | 4,5267 | 4,5709 | 4,6133 | 4,5177 | 4,6110 | 4,6570 |
| 2 | 32,9 | 34,0 | 42,7 | 35,8 | 39,1 | 48,3 | 4,5173 | 4,5308 | 4,6302 | 4,5535 | 4,5919 | 4,6840 |
| 2,5 | 34,1 | 33,4 | 46,0 | 37,5 | 40,5 | 51,5 | 4,5325 | 4,5240 | 4,6625 | 4,5738 | 4,6071 | 4,7117 |
| 3 | 36,5 | 37,5 | 47,6 | 57,8 | 61,5 | 76,1 | 4,5621 | 4,5744 | 4,6776 | 4,7621 | 4,7892 | 4,8812 |
| 4 | 34,3 | 38,4 | 56,5 | 70,7 | 78,0 | 134,6 | 4,5353 | 4,5839 | 4,7522 | 4,8496 | 4,8920 | 5,1289 |
| 0,5+3 | 33,4 | 37,4 | 42,4 | 35,7 | 37,6 | 43,3 | 4,5235 | 4,5730 | 4,6276 | 4,5533 | 4,5750 | 4,6366 |
| 1+3 | 34,3 | 37,4 | 45,4 | 43,4 | 41,9 | 43,9 | 4,5353 | 4,5725 | 4,6572 | 4,6371 | 4,6227 | 4,6429 |
| 1,5+3 | 37,8 | 35,6 | 47,8 | 39,0 | 49,4 | 54,7 | 4,5776 | 4,5512 | 4,6798 | 4,5914 | 4,6936 | 4,7383 |
| 2+3 | 44,4 | 44,5 | 65,8 | 49,6 | 47,7 | 57,2 | 4,6479 | 4,6481 | 4,8183 | 4,6953 | 4,6781 | 4,7576 |
| 2,5+3 | 46,1 | 47,9 | 62,7 | 51,8 | 62,1 | 71,7 | 4,6639 | 4,6803 | 4,7975 | 4,7141 | 4,7929 | 4,8554 |
| 3+3 | 49,8 | 44,7 | 67,4 | 69,4 | 83,3 | 122,6 | 4,6973 | 4,6499 | 4,8287 | 4,8415 | 4,9209 | 5,0886 |
| 4+3 | 43,6 | 44,1 | 93,3 | 80,6 | 114,2 | 275,7 | 4,6391 | 4,6442 | 4,9698 | 4,9064 | 5,0576 | 5,4404 |
| 0,5+24 | 177,4 | 175,7 | 166,1 | 74,8 | 129,6 | 179,4 | 5,2489 | 5,2449 | 5,2204 | 4,8738 | 5,1125 | 5,2538 |
| 1+24 | 170,8 | 178,0 | 161,5 | 84,7 | 196,7 | 214,5 | 5,2324 | 5,2505 | 5,2081 | 4,9278 | 5,2938 | 5,3314 |
| 1,5+24 | 186,8 | 276,3 | 257,3 | 80,4 | 171,8 | 308,5 | 5,2714 | 5,4414 | 5,4104 | 4,9053 | 5,2349 | 5,4893 |
| 2+24 | 204,1 | 305,9 | 227,3 | 107,0 | 263,8 | 275,5 | 5,3098 | 5,4856 | 5,3565 | 5,0294 | 5,4212 | 5,4401 |
| 2,5+24 | 213,1 | 277,0 | 229,8 | 172,0 | 310,0 | 417,6 | 5,3286 | 5,4425 | 5,3613 | 5,2355 | 5,4913 | 5,6207 |
| 3+24 | 224,8 | 297,0 | 301,9 | 333,3 | 411,3 | 863,8 | 5,3518 | 5,4727 | 5,4799 | 5,5228 | 5,6141 | 5,9364 |
| 4+24 | 266,5 | 428,8 | 420,6 | 451,0 | 650,6 | 1928,7 | 5,4257 | 5,6322 | 5,6239 | 5,6542 | 5,8133 | 6,2853 |

Vysvětlivky: zvýrazněné hodnoty překračují horní mez reprodukovatelnosti = 4,8706

Graf 3. Vývoj CPP kultivovaných při 21 °C (log KTJ/ml) v kravském mléce a mezní hodnoty reprodukovatelnosti ($4,5306 \pm 0,34$ log)

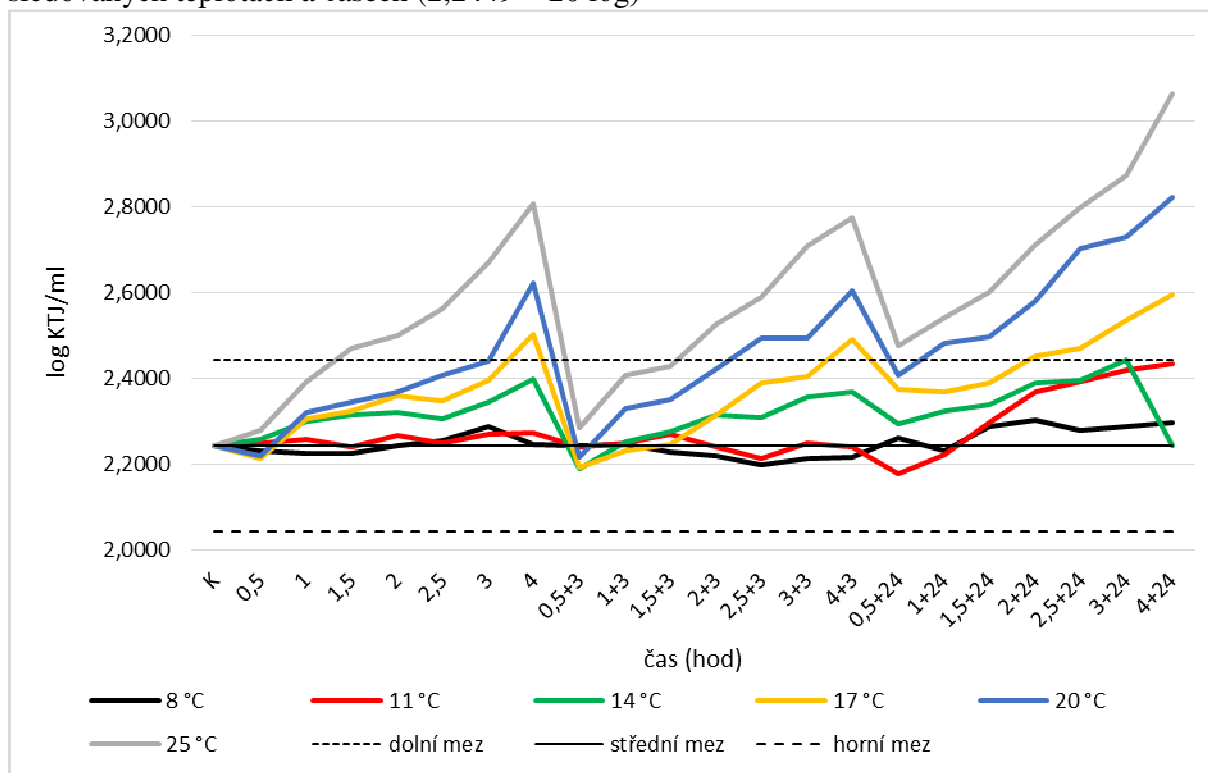


Tabulka 7. Vývoj koliformních bakterií v kravském mléce a mezní hodnoty reprodukovatelnosti ($2,2449 \pm 20 \log$)

| teplota (°C) | 8 | 11 | 14 | 17 | 20 | 25 | 8 | 11 | 14 | 17 | 20 | 25 |
|--------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|------|------------|--------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| čas (hod) | geometrický průměr (x 100 KTJ/ml) | | | | | | log KTJ/ml | | | | | |
| 0 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 2,2449 | 2,2449 | 2,2449 | 2,2449 | 2,2449 | 2,2449 |
| 0,5 | 1,7 | 1,8 | 1,8 | 1,6 | 1,7 | 1,9 | 2,2326 | 2,2488 | 2,2593 | 2,2142 | 2,2205 | 2,2785 |
| 1 | 1,7 | 1,8 | 2,0 | 2,0 | 2,1 | 2,5 | 2,2250 | 2,2590 | 2,3005 | 2,3078 | 2,3223 | 2,3931 |
| 1,5 | 1,7 | 1,7 | 2,1 | 2,1 | 2,2 | 3,0 | 2,2273 | 2,2407 | 2,3164 | 2,3234 | 2,3443 | 2,4698 |
| 2 | 1,8 | 1,9 | 2,1 | 2,3 | 2,3 | 3,2 | 2,2441 | 2,2682 | 2,3216 | 2,3593 | 2,3687 | 2,5017 |
| 2,5 | 1,8 | 1,8 | 2,0 | 2,2 | 2,6 | 3,7 | 2,2544 | 2,2498 | 2,3055 | 2,3483 | 2,4090 | 2,5641 |
| 3 | 1,9 | 1,9 | 2,2 | 2,5 | 2,7 | 4,7 | 2,2884 | 2,2714 | 2,3460 | 2,3960 | 2,4393 | 2,6699 |
| 4 | 1,8 | 1,9 | 2,5 | 3,2 | 4,2 | 6,4 | 2,2479 | 2,2722 | 2,3977 | 2,5047 | 2,6238 | 2,8082 |
| 0,5+3 | 1,7 | 1,7 | 1,6 | 1,6 | 1,7 | 1,9 | 2,2430 | 2,2405 | 2,1913 | 2,1933 | 2,2181 | 2,2847 |
| 1+3 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,7 | 2,1 | 2,6 | 2,2479 | 2,2504 | 2,2529 | 2,2317 | 2,3296 | 2,4075 |
| 1,5+3 | 1,7 | 1,9 | 1,9 | 1,8 | 2,3 | 2,7 | 2,2284 | 2,2707 | 2,2773 | 2,2459 | 2,3522 | 2,4294 |
| 2+3 | 1,7 | 1,7 | 2,1 | 2,1 | 2,6 | 3,4 | 2,2205 | 2,2394 | 2,3139 | 2,3155 | 2,4219 | 2,5275 |
| 2,5+3 | 1,6 | 1,6 | 2,0 | 2,5 | 3,1 | 3,9 | 2,1994 | 2,2145 | 2,3103 | 2,3915 | 2,4943 | 2,5914 |
| 3+3 | 1,6 | 1,8 | 2,3 | 2,5 | 3,1 | 5,1 | 2,2142 | 2,2496 | 2,3559 | 2,4042 | 2,4942 | 2,7094 |
| 4+3 | 1,7 | 1,7 | 2,3 | 3,1 | 4,0 | 5,9 | 2,2181 | 2,2409 | 2,3700 | 2,4905 | 2,6046 | 2,7743 |
| 0,5+24 | 1,8 | 1,5 | 2,0 | 2,4 | 2,6 | 3,0 | 2,2618 | 2,1768 | 2,2942 | 2,3752 | 2,4091 | 2,4779 |
| 1+24 | 1,7 | 1,7 | 2,1 | 2,3 | 3,0 | 3,5 | 2,2327 | 2,2221 | 2,3235 | 2,3687 | 2,4823 | 2,5411 |
| 1,5+24 | 1,9 | 2,0 | 2,2 | 2,4 | 3,2 | 4,0 | 2,2884 | 2,2969 | 2,3399 | 2,3888 | 2,4985 | 2,6010 |
| 2+24 | 2,0 | 2,3 | 2,5 | 2,8 | 3,8 | 5,2 | 2,3043 | 2,3693 | 2,3905 | 2,4522 | 2,5808 | 2,7120 |
| 2,5+24 | 1,9 | 2,5 | 2,5 | 2,9 | 5,1 | 6,3 | 2,2790 | 2,3917 | 2,3973 | 2,4692 | 2,7044 | 2,8000 |
| 3+24 | 1,9 | 2,6 | 2,8 | 3,4 | 5,4 | 7,5 | 2,2875 | 2,4190 | 2,4430 | 2,5352 | 2,7312 | 2,8727 |
| 4+24 | 2,0 | 2,7 | 1,8 | 3,9 | 6,6 | 11,6 | 2,2989 | 2,4342 | 2,2449 | 2,5960 | 2,8223 | 3,0633 |

Vysvětlivky: zvýrazněné hodnoty překračují horní mez reprodukovatelnosti = 2,4449

Graf 4. Růstové křivky koliformních bakterií (log KTJ/ml) v kravském mléce při sledovaných teplotách a časech ($2,2449 \pm 20$ log)

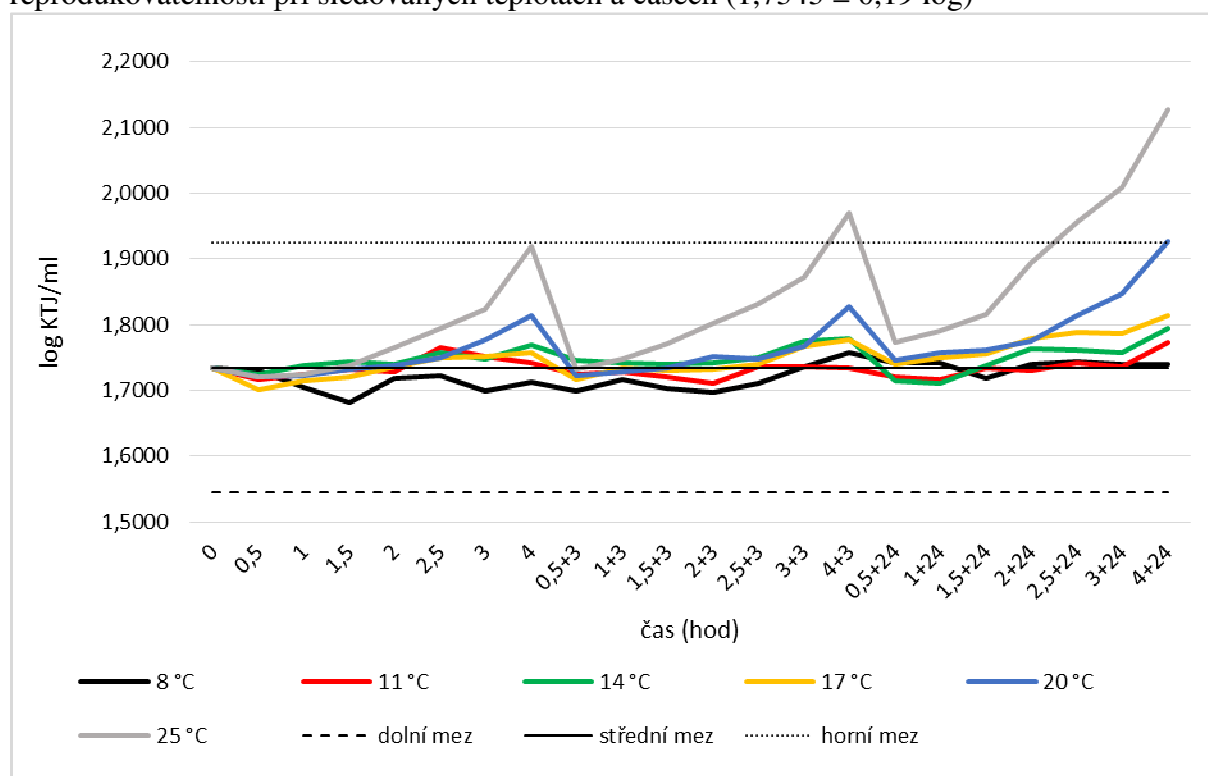


Tabulka 8. Vývoj *S. aureus* (log KTJ/ml) v kravském mléce a mezní hodnoty reprodukovatelnosti ($1,7343 \pm 0,19$ log)

| teplota (°C) | 8 | 11 | 14 | 17 | 20 | 25 | 8 | 11 | 14 | 17 | 20 | 25 |
|--------------|-----------------------------|----|----|----|-----------|------------|------------|--------|--------|--------|---------------|---------------|
| čas (hod) | geometrický průměr (KTJ/ml) | | | | | | log KTJ/ml | | | | | |
| 0 | 54 | 54 | 54 | 54 | 54 | 54 | 1,7343 | 1,7343 | 1,7343 | 1,7343 | 1,7343 | 1,7343 |
| 0,5 | 54 | 52 | 53 | 50 | 53 | 52 | 1,7294 | 1,7172 | 1,7239 | 1,7014 | 1,7205 | 1,7195 |
| 1 | 51 | 53 | 55 | 52 | 53 | 53 | 1,7044 | 1,7240 | 1,7388 | 1,7136 | 1,7217 | 1,7234 |
| 1,5 | 48 | 54 | 55 | 52 | 54 | 55 | 1,6804 | 1,7313 | 1,7440 | 1,7195 | 1,7310 | 1,7383 |
| 2 | 52 | 53 | 55 | 54 | 55 | 58 | 1,7176 | 1,7274 | 1,7398 | 1,7360 | 1,7379 | 1,7644 |
| 2,5 | 53 | 58 | 57 | 56 | 56 | 62 | 1,7225 | 1,7658 | 1,7563 | 1,7488 | 1,7494 | 1,7944 |
| 3 | 50 | 56 | 56 | 56 | 60 | 67 | 1,6995 | 1,7511 | 1,7480 | 1,7514 | 1,7777 | 1,8235 |
| 4 | 52 | 55 | 59 | 57 | 65 | 83 | 1,7134 | 1,7409 | 1,7684 | 1,7580 | 1,8141 | 1,9197 |
| 0,5+3 | 50 | 53 | 56 | 52 | 53 | 54 | 1,6990 | 1,7233 | 1,7465 | 1,7162 | 1,7219 | 1,7327 |
| 1+3 | 52 | 53 | 55 | 54 | 53 | 56 | 1,7160 | 1,7273 | 1,7421 | 1,7342 | 1,7279 | 1,7482 |
| 1,5+3 | 51 | 52 | 55 | 54 | 54 | 59 | 1,7036 | 1,7197 | 1,7404 | 1,7291 | 1,7340 | 1,7714 |
| 2+3 | 50 | 51 | 55 | 54 | 56 | 63 | 1,6978 | 1,7114 | 1,7412 | 1,7321 | 1,7520 | 1,8018 |
| 2,5+3 | 51 | 54 | 56 | 55 | 56 | 68 | 1,7105 | 1,7360 | 1,7504 | 1,7402 | 1,7483 | 1,8306 |
| 3+3 | 54 | 54 | 60 | 59 | 59 | 75 | 1,7360 | 1,7359 | 1,7758 | 1,7678 | 1,7675 | 1,8722 |
| 4+3 | 57 | 54 | 60 | 60 | 67 | 93 | 1,7573 | 1,7336 | 1,7788 | 1,7772 | 1,8272 | 1,9692 |
| 0,5+24 | 55 | 53 | 52 | 55 | 56 | 59 | 1,7411 | 1,7204 | 1,7135 | 1,7394 | 1,7452 | 1,7721 |
| 1+24 | 55 | 52 | 51 | 56 | 57 | 62 | 1,7424 | 1,7164 | 1,7097 | 1,7494 | 1,7580 | 1,7912 |
| 1,5+24 | 52 | 54 | 55 | 57 | 58 | 65 | 1,7175 | 1,7347 | 1,7383 | 1,7558 | 1,7616 | 1,8157 |
| 2+24 | 55 | 54 | 58 | 60 | 59 | 78 | 1,7389 | 1,7305 | 1,7623 | 1,7787 | 1,7741 | 1,8931 |
| 2,5+24 | 55 | 55 | 58 | 61 | 65 | 90 | 1,7437 | 1,7427 | 1,7604 | 1,7886 | 1,8147 | 1,9555 |
| 3+24 | 55 | 54 | 57 | 61 | 70 | 102 | 1,7389 | 1,7355 | 1,7579 | 1,7869 | 1,8471 | 2,0087 |
| 4+24 | 55 | 59 | 62 | 65 | 84 | 134 | 1,7406 | 1,7734 | 1,7937 | 1,8146 | 1,9264 | 2,1267 |

Vysvětlivky: zvýrazněné hodnoty překračují horní mez reprodukovatelnosti = 1,9243

Graf 5. Růstové křivky *S. aureus* (log KTJ/ml) v kravském mléce a mezní hodnoty reprodukovatelnosti při sledovaných teplotách a časech ($1,7343 \pm 0,19 \log$)



Příloha 2

Stanovení mezí reprodukovatelnosti pro stanovení počtu mikroorganismů vykultivovaných při 30 ° C

Stanovení mezí reprodukovatelnosti pro stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů vykultivovaných při 6,5 ° C

Stanovení mezí reprodukovatelnosti pro stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů vykultivovaných při 21 ° C

Stanovení mezí reprodukovatelnosti pro stanovení počtu koliformních bakterií

Stanovení mezí reprodukovatelnosti pro stanovení počtu *Staphylococcus aureus*

**Stanovení mezí reprodukovatelnosti pro stanovení počtu mikroorganismů
vykultivovaných při 30 ° C**

Průměrná nejistota/reprodukovatelnost $R = 0,4368 \log$

| | | | | |
|----|-------|-------|-------|-------|
| x1 | 22000 | 19000 | 37000 | 27000 |
| | 26700 | 24000 | 37000 | 33000 |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx1= | 0,1058 | 0,2074 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 4,6467 | 4,4393 | 4,2319 |
| 44331 | 27498 | 17057 |

| | | | | |
|----|-------|-------|-------|-------|
| x3 | 16300 | 13000 | 26000 | 10000 |
| | 21200 | 31000 | 28000 | |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx3= | 0,1841 | 0,3607 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 4,6473 | 4,2866 | 3,9259 |
| 44396 | 19346 | 8431 |

| | | | |
|----|-------|-------|-------|
| x5 | 23000 | 17000 | |
| | 20000 | 40000 | 34000 |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx5= | 0,1565 | 0,3068 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 4,7121 | 4,4053 | 4,0985 |
| 51530 | 25427 | 12547 |

| | | |
|----|-------|-------|
| x7 | 47000 | 26000 |
| | 70000 | 91000 |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx7= | 0,2367 | 0,4640 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 5,1868 | 4,7228 | 4,2588 |
| 153727 | 52820 | 18149 |

| | | | | |
|----|---------|---------|---------|---------|
| x9 | 750000 | 800000 | 1760000 | 1360000 |
| | 2900000 | 3200000 | 3400000 | 3700000 |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx9= | 0,5871 | 1,1508 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 7,1789 | 6,0281 | 4,8773 |
| 15096208 | 1066842 | 75393 |

| | | | | |
|----|-------|-------|-------|-------|
| x2 | 29200 | 27000 | 23000 | 21700 |
| | 19000 | 34000 | 40000 | |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx2= | 0,1136 | 0,2227 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 4,6523 | 4,4296 | 4,2069 |
| 44903 | 26891 | 16104 |

| | | |
|----|--------|--------|
| x4 | 89000 | 68000 |
| | 195000 | 184000 |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx4= | 0,2284 | 0,4477 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 5,5319 | 5,0842 | 4,6365 |
| 340316 | 121395 | 43303 |

| | | |
|----|--------|--------|
| x6 | 180000 | 120000 |
| | 49000 | 48000 |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| xs6= | 0,2387 | 0,4679 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 5,2601 | 4,7922 | 4,3243 |
| 182024 | 61973 | 21099 |

| | | |
|----|---------|---------|
| x8 | 610000 | 540000 |
| | 1230000 | 1710000 |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx8= | 0,3333 | 0,6532 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 6,4523 | 5,7991 | 5,1459 |
| 2833560 | 629651 | 139916 |

| | | | |
|-----|-------|-------|-------|
| x10 | 17500 | 17500 | 21100 |
| | 19000 | 20000 | 22000 |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx10= | 0,0441 | 0,0864 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 4,3885 | 4,3021 | 4,2157 |
| 24462 | 20049 | 16433 |

sx = tučně označená hodnota = rozšířená nejistota ($sx \cdot 1,96$); mezní hodnoty reprodukovatelnosti jsou vyjádřené v logaritmické formě a transformované na původní hodnoty

Stanovení mezí reprodukovatelnosti pro stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů vykultivovaných při 6,5 °C

Průměrná nejistota/reprodukovatelnost $R = 0,3550 \log$

| | | | | | |
|----|-----|-----|------|------|------|
| x1 | 460 | 480 | 1290 | 1500 | 1600 |
| | 460 | 440 | 1200 | 1080 | 1800 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx1= | 0,2559 | 0,5016 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 3,4525 | 2,9509 | 2,4493 |
| 2835 | 893 | 281 |

| | | | | |
|----|------|------|------|------|
| x3 | 1290 | 1310 | 1400 | 1500 |
| | 700 | 470 | 600 | 900 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx3= | 0,1913 | 0,3749 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 3,3499 | 2,9750 | 2,6001 |
| 2238 | 944 | 398 |

| | | | | |
|----|------|------|------|------|
| x5 | 390 | 510 | 460 | |
| | 1200 | 1390 | 1400 | 1300 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx5= | 0,2528 | 0,4954 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 3,4456 | 2,9502 | 2,4548 |
| 2790 | 892 | 285 |

| | | | | |
|----|------|------|------|------|
| x7 | 990 | 870 | 900 | 800 |
| | 1240 | 1070 | 1300 | 2500 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx7= | 0,1573 | 0,3084 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 3,3618 | 3,0534 | 2,7450 |
| 2300 | 1131 | 556 |

| | | | |
|----|-----|-----|-----|
| x9 | 390 | 460 | 600 |
| | 190 | 140 | |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx9= | 0,2674 | 0,5241 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 3,0155 | 2,4914 | 1,9673 |
| 1036 | 310 | 93 |

| | | | |
|----|-----|-----|-----|
| x2 | 390 | 290 | 310 |
| | 190 | 220 | |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx2= | 0,1237 | 0,2425 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 2,6757 | 2,4332 | 2,1907 |
| 474 | 271 | 155 |

| | | | |
|----|-----|------|------|
| x4 | 390 | 430 | 790 |
| | 840 | 1100 | 1300 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx4= | 0,2127 | 0,4170 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 3,2840 | 2,8670 | 2,4500 |
| 1923 | 736 | 282 |

| | | |
|----|-----|-----|
| x6 | 290 | 120 |
| | 320 | 360 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx6= | 0,2178 | 0,4269 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 2,8277 | 2,4008 | 1,9739 |
| 672 | 252 | 94 |

| | | | |
|----|-----|-----|-----|
| x8 | 250 | 270 | 260 |
| | 290 | 230 | |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx8= | 0,0375 | 0,0736 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 2,4873 | 2,4137 | 2,3401 |
| 307 | 259 | 219 |

| | | |
|-----|-----|-----|
| x10 | 330 | 280 |
| | 440 | 430 |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx10= | 0,0945 | 0,1853 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 2,7459 | 2,5606 | 2,3753 |
| 557 | 364 | 237 |

Stanovení mezí reprodukovatelnosti pro stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů vykultivovaných při 21 °C

Průměrná nejistota/reprodukovatelnost $R = 0,3420 \log$

| | | | | |
|----|-------|-------|-------|-------|
| x1 | 19900 | 19800 | 27000 | 26000 |
| | 33000 | 12700 | 35000 | 26000 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx1= | 0,1419 | 0,2781 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 4,6560 | 4,3779 | 4,0998 |
| 45294 | 23873 | 12582 |

| | | | | |
|----|---------|---------|---------|---------|
| x3 | 520000 | 420000 | 490000 | 550000 |
| | 1900000 | 2000000 | 2000000 | 1700000 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx3= | 0,3154 | 0,6182 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 6,6033 | 5,9851 | 5,3669 |
| 4010984 | 966273 | 232782 |

| | | | | |
|----|--------|--------|--------|--------|
| x5 | 139000 | 152000 | 150000 | 160000 |
| | 360000 | 288000 | 180000 | 200000 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx5= | 0,1485 | 0,2911 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 5,5757 | 5,2846 | 4,9935 |
| 376405 | 192575 | 98525 |

| | | |
|----|--------|--------|
| x7 | 140000 | 128000 |
| | 186000 | 167000 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx7= | 0,0733 | 0,1437 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 5,3301 | 5,1864 | 5,0427 |
| 213832 | 153603 | 110339 |

| | | | | |
|----|--------|--------|--------|--------|
| x9 | 220000 | 240000 | 320000 | 350000 |
| | 390000 | 416000 | 480000 | 400000 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx9= | 0,1188 | 0,2329 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 5,7666 | 5,5337 | 5,3008 |
| 584222 | 341743 | 199904 |

| | | | | |
|----|-------|-------|-------|-------|
| x2 | 21300 | 19500 | 28000 | 24000 |
| | 26000 | 23500 | 31000 | |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx2= | 0,0688 | 0,1349 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 4,5239 | 4,3890 | 4,2541 |
| 33408 | 24491 | 17953 |

| | | | | |
|----|-------|-------|-------|-------|
| x4 | 18800 | 18300 | 27000 | 21000 |
| | 22400 | 21100 | 31000 | 26000 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx4= | 0,0802 | 0,1572 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 4,5161 | 4,3589 | 4,2017 |
| 32819 | 22851 | 15910 |

| | | |
|----|--------|--------|
| x6 | 136000 | 164000 |
| | 21000 | 37000 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx6= | 0,4340 | 0,8506 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 5,6603 | 4,8097 | 3,9591 |
| 457370 | 64521 | 9102 |

| | | |
|----|--------|--------|
| x8 | 76000 | 61000 |
| | 118000 | 107000 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx8= | 0,1327 | 0,2600 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 5,2019 | 4,9419 | 4,6819 |
| 159188 | 87478 | 48072 |

| | | |
|-----|-------|-------|
| x10 | 77000 | 60000 |
| | 25000 | 31000 |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx10= | 0,2313 | 0,4534 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 5,0919 | 4,6385 | 4,1851 |
| 123560 | 43501 | 15315 |

Stanovení mezí reprodukovatelnosti pro stanovení počtu koliformních bakterií

Průměrná nejistota/reprodukovatelnost $R = 0,1961 \log$

| | | | | | |
|----|------|------|------|------|------|
| x1 | 2000 | 1900 | 1900 | 1500 | 1100 |
| | 1000 | 1700 | 1420 | 1300 | |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx1= | 0,1079 | 0,2116 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 3,3863 | 3,1747 | 2,9631 |
| 2434 | 1495 | 919 |

| | | | |
|----|------|------|------|
| x3 | 960 | 980 | 940 |
| | 1900 | 1820 | 1420 |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx3= | 0,1427 | 0,2798 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 3,3861 | 3,1063 | 2,8265 |
| 2433 | 1277 | 671 |

| | | | |
|----|------|------|------|
| x5 | 1110 | 1130 | 1090 |
| | 800 | 780 | 700 |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx5= | 0,0927 | 0,1817 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 3,1444 | 2,9627 | 2,7810 |
| 1394 | 918 | 604 |

| | | | |
|----|-----|-----|-----|
| x7 | 430 | 400 | 400 |
| | 370 | 420 | |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx7= | 0,0251 | 0,0491 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 2,6549 | 2,6058 | 2,5567 |
| 452 | 403 | 360 |

| | | | |
|----|------|------|------|
| x9 | 8000 | 8600 | 5500 |
| | 6700 | 8100 | |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx9= | 0,0794 | 0,1555 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 4,0180 | 3,8625 | 3,7070 |
| 10424 | 7286 | 5093 |

| | | | |
|----|------|------|------|
| x2 | 930 | 820 | 950 |
| | 1870 | 1640 | 1650 |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx2= | 0,1570 | 0,3077 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 3,4017 | 3,0940 | 2,7863 |
| 2522 | 1242 | 611 |

| | | | |
|----|------|------|------|
| x4 | 830 | 880 | 990 |
| | 1800 | 1700 | 1700 |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx4= | 0,1587 | 0,3110 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 3,4069 | 3,0959 | 2,7849 |
| 2552 | 1247 | 609 |

| | | | |
|----|------|------|------|
| x6 | 3300 | 3100 | 2410 |
| | 2060 | 2200 | |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx6= | 0,0908 | 0,1780 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 3,5876 | 3,4096 | 3,2316 |
| 3869 | 2568 | 1705 |

| | | | |
|----|------|------|------|
| x8 | 8700 | 8900 | 6100 |
| | 5500 | 5900 | |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx8= | 0,0994 | 0,1948 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 4,0319 | 3,8371 | 3,6423 |
| 10763 | 6872 | 4388 |

| | | | |
|-----|------|-----|-----|
| x10 | 1120 | 860 | 910 |
| | 1060 | 990 | |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx10= | 0,0469 | 0,0919 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 3,0846 | 2,9927 | 2,9008 |
| 1215 | 983 | 796 |

Stanovení mezí reprodukovatelnosti pro stanovení počtu *Staphylococcus aureus*

Průměrná nejistota/reprodukovatelnost $R = 0,1929 \log$

| | | | | | |
|----|-----|----|----|-----|----|
| x1 | 85 | 78 | 76 | 63 | 60 |
| | 120 | 90 | 80 | 110 | 50 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx1= | 0,1162 | 0,2278 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 2,1235 | 1,8957 | 1,6679 |
| 133 | 79 | 47 |

| | | | | | |
|----|-----|----|----|----|----|
| x3 | 84 | 79 | 78 | 78 | 72 |
| | 100 | 90 | 50 | 50 | 40 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx3= | 0,1296 | 0,2540 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 2,0958 | 1,8418 | 1,5878 |
| 125 | 69 | 39 |

| | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|
| x5 | 216 | 207 | 230 | 230 |
| | 122 | 118 | 140 | 100 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx3= | 0,1490 | 0,2919 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 2,5017 | 2,2098 | 1,9179 |
| 317 | 162 | 83 |

| | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|
| x7 | 176 | 192 | 200 | 280 |
| | 125 | 115 | 120 | 110 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx7= | 0,1463 | 0,2868 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 2,4812 | 2,1944 | 1,9076 |
| 303 | 156 | 81 |

| | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| x9 | 261 | 252 | 248 | 246 | 245 |
| | 320 | 300 | 290 | 350 | 210 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx9= | 0,0658 | 0,1290 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 2,5594 | 2,4304 | 2,3014 |
| 363 | 269 | 200 |

| | | | |
|----|----|----|----|
| x2 | 62 | 55 | 52 |
| | 48 | 44 | |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx2= | 0,0568 | 0,1113 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 1,8260 | 1,7147 | 1,6034 |
| 67 | 52 | 40 |

| | | | |
|----|----|----|----|
| x4 | 72 | 71 | 65 |
| | 56 | 50 | |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx4= | 0,0685 | 0,1343 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 1,9280 | 1,7937 | 1,6594 |
| 85 | 62 | 46 |

| | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|
| x6 | 240 | 222 | 250 | 240 |
| | 118 | 121 | 130 | 150 |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx6= | 0,1456 | 0,2854 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 2,5291 | 2,2437 | 1,9583 |
| 338 | 175 | 91 |

| | | | |
|----|----|----|----|
| x8 | 56 | 44 | 40 |
| | 39 | 36 | |

| | | |
|-------------|---------|---------------|
| sx8= | 0,0739 | 0,1449 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 1,7731 | 1,6282 | 1,4833 |
| 59 | 42 | 30 |

| | | | |
|-----|----|----|----|
| x10 | 51 | 48 | 45 |
| | 43 | 43 | |

| | | |
|--------------|---------|---------------|
| sx10= | 0,0322 | 0,0631 |
| horní mez | střední | dolní mez |
| 1,7249 | 1,6618 | 1,5987 |
| 53 | 46 | 40 |

Příloha 3

Doporučení pro stanovení počtu mikroorganismů vykultivovaných při 30 °C (Tabulka 10)

Doporučení pro stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů vykultivovaných při 6,5 °C (Tabulka 11)

Doporučení pro stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů vykultivovaných při 21 °C (Tabulka 12)

Doporučení pro stanovení počtu koliformních bakterií (Tabulka 13)

Doporučení pro stanovení počtu *Staphylococcus aureus* (Tabulka 14)

Tabulka 10. Doporučení pro analýzu vzorků na stanovení CPM při porušení teploty během transportu (sloupec A) po dobu uvedenou ve sloupci B

| A | B | C | D | E |
|------------------------|--|---|---|--|
| teplota při transportu | doba expozice během transportu (max. 4 hodiny) | analýza vzorků ihned po svozu do laboratoře | analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při teplotě 8 °C (max. 3 hodiny) | analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při 8 °C (max 24 hodin) |
| 8 °C | ≤ 4 | ANO | ANO | NE |
| 11 °C | ≤ 4 | ANO | ANO | NE |
| 14 °C | ≤ 4 | ANO | ANO | NE |
| 17 °C | ≤ 4 | ANO | ANO | NE |
| 20 °C | ≤ 3 | ANO | ANO | NE |
| 20 °C | $> 3 - \leq 4$ | ANO | NE | NE |
| 25 °C | $\leq 2,5$ | ANO | ANO | NE |
| 25 °C | $> 2,5 - \leq 3$ | ANO | NE | NE |
| 25 °C | > 3 | NE | NE | NE |

Tabulka 11. Doporučení pro analýzu vzorků na stanovení psychrotrofních mikroorganismů, (kultivovaných při 6,5 °C) při porušení teploty během transportu (sloupec A) po dobu uvedenou ve sloupci B

| A | B | C | D | E |
|------------------------|--|---|---|--|
| teplota při transportu | doba expozice během transportu (max. 4 hodiny) | analýza vzorků ihned po svozu do laboratoře | analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při teplotě 8 °C (max. 3 hodiny) | analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při 8 °C (max 24 hodin) |
| 8 °C | ≤ 4 | ANO | ANO | ANO |
| 11 °C | ≤ 4 | ANO | ANO | ANO |
| 14 °C | ≤ 4 | ANO | ANO | ANO |
| 17 °C | ≤ 4 | ANO | ANO | ANO |
| 20 °C | ≤ 3 | ANO | ANO | ANO |
| 20 °C | > 3 - ≤ 4 | ANO | ANO | NE |
| 25 °C | ≤ 3 | ANO | ANO | ANO |
| 25 °C | > 3 - ≤ 4 | ANO | ANO | NE |

Tabulka 12. Doporučení pro analýzu vzorků na stanovení psychrotrofních mikroorganismů (kultivovaných při 21 °C) při porušení teploty během transportu (sloupec A) po dobu uvedenou ve sloupci B

| A | B | C | D | E |
|------------------------|---|---|---|--|
| teplota při transportu | doba expozice během transportu (max 4 hodiny) | analýza vzorků ihned po svozu do laboratoře | analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při teplotě 8 °C (max. 3 hodiny) | analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při 8 °C (max 24 hodin) |
| 8 °C | ≤ 4 | ANO | ANO | NE |
| 11 °C | ≤ 4 | ANO | ANO | NE |
| 14 °C | ≤ 3 | ANO | ANO | NE |
| 14 °C | $> 3 - \leq 4$ | ANO | NE | NE |
| 17 °C | ≤ 3 | ANO | ANO | NE |
| 17 °C | $> 3 - \leq 4$ | ANO | NE | NE |
| 20 °C | $\leq 2,5$ | ANO | ANO | NE |
| 20 °C | $> 2,5 - \leq 3$ | ANO | NE | NE |
| 20 °C | > 3 | NE | NE | NE |
| 25 °C | $\leq 2,5$ | ANO | ANO | NE |
| 25 °C | $> 2,5$ | NE | NE | NE |

Tabulka 13. Doporučení pro analýzu vzorků na stanovení koliformních bakterií při porušení teploty během transportu (sloupec A) po dobu uvedenou ve sloupci B

| A | B | C | D | E |
|------------------------|--|---|---|--|
| teplota při transportu | doba expozice během transportu (max. 4 hodiny) | analýza vzorků ihned po svozu do laboratoře | analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při teplotě 8 °C (max. 3 hodiny) | analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při 8 °C (max 24 hodin) |
| 8 °C | ≤ 4 | ANO | ANO | ANO |
| 11 °C | ≤ 4 | ANO | ANO | ANO |
| 14 °C | ≤ 3 | ANO | ANO | ANO |
| 14 °C | $> 3 - \leq 4$ | ANO | ANO | NE |
| 17 °C | $\leq 1,5$ | ANO | ANO | ANO |
| 17 °C | $> 1,5 - \leq 3$ | ANO | ANO | NE |
| 17 °C | $> 3 - \leq 4$ | ANO | NE | NE |
| 20 °C | $\leq 0,5$ | ANO | ANO | ANO |
| 20 °C | $> 0,5 - \leq 2$ | ANO | ANO | NE |
| 20 °C | $> 2 - \leq 4$ | ANO | NE | NE |
| 25 °C | $\leq 1,5$ | ANO | ANO | NE |
| 25 °C | $> 1,5 - \leq 4$ | ANO | NE | NE |

Tabulka 14. Doporučení pro analýzu vzorků na stanovení počtu *S. aureus* při porušení teploty během transportu (sloupec A) po dobu uvedenou ve sloupci B

| A | B | C | D | E |
|------------------------|---|---|---|--|
| teplota při transportu | doba expozice během transportu (max 4 hodiny) | analýza vzorků ihned po svozu do laboratoře | analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při teplotě 8 °C (max. 3 hodiny) | analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při 8 °C (max 24 hodin) |
| 8 °C | ≤ 4 | ANO | ANO | ANO |
| 11 °C | ≤ 4 | ANO | ANO | ANO |
| 14 °C | ≤ 4 | ANO | ANO | ANO |
| 17 °C | ≤ 4 | ANO | ANO | ANO |
| 20 °C | ≤ 3 | ANO | ANO | ANO |
| 20 °C | > 3 - ≤ 4 | ANO | ANO | NE |
| 25 °C | ≤ 2 | ANO | ANO | ANO |
| 25 °C | > 2 - ≤ 3 | ANO | ANO | NE |
| 25 °C | > 3 - ≤ 4 | ANO | NE | NE |