

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA

V NITRE

FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

1132903

**Mikrobiálne hodnotenie komponentov pri výrobe
vitamínov**

2011

Adriana Kubatková

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

Mikrobiálne hodnotenie komponentov pri výrobe vitamínov

Bakalárska práca

Študijný program: Agropotravinárstvo

Študijný odbor: (4170700) Spracovanie poľnohospodárskych produktov

Pracovisko: Katedra mikrobiológie

Vedúca záverečnej práce: doc. Ing. Soňa Javoreková, PhD.

Konzultant: MVDr. Mária Turzová

2011

Adriana Kubatková

ČESTNÉ VYHLÁSENIE

Podpísaná Adriana Kubatková vyhlasujem, že som záverečnú prácu na tému „Mikrobiologické hodnotenie komponentov pri výrobe vitamínov“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre 20. 05. 2011

.....

POĎAKOVANIE

Touto cestou chcem poďakovať vedúcej bakalárskej práce doc. Ing. Soni Javorekovej, PhD. a pracovníkom Zentiva a. s. Hlohovec, najmä konzultantke MVDr. Márii Turzovej, za cenné rady a pripomienky, ktoré mi poskytli pri spracovaní a písaní bakalárskej práce.

Abstrakt

Vitamíny sú zaradené medzi tzv. funkčné potraviny, a plnia úlohu výživových doplnkov v strave človeka. Majú významný biologický účinok, a to či už v syntetickej alebo v prírodnej forme. Samotné vitamíny i komponenty v nich, vstupujúce do výrobného procesu, musia vyhovovať okrem iného aj požiadavkám mikrobiologickej kvality. Na hodnotenie finálnych výrobkov v rámci Slovenskej republiky sa používa technologická norma udaná v Potravinovom kódexe a v prípade vstupných surovín sa využíva hodnotenie podľa Slovenského liekopisu. V prípade deklarovania mikrobiologickej nezávadnosti vitamínov a ich komponentov je dôležité potvrdiť najmä neprítomnosť patogénnych a podmiennečne patogénnych mikroorganizmov, ako sú napríklad mikroorganizmy čeľade *Enterobacteriaceae*, predovšetkým patogénne druhy *Salmonella*, *Escherichia coli* a druhy rodov *Pseudomonas* a *Staphylococcus*. Prítomnosť vysokého počtu kvasiniek a mikroskopických húb vo vstupnej surovine, negatívne ovplyvňuje stabilitu a účinnosť výživových doplnkov a vitamínov. Na základe niekoľkoročných výsledkov v mikrobiologickom hodnotení vitamínov, výživových doplnkov a ich komponentov v Zentive a. s. Hlohovec je dôležité sledovať prítomné mikroorganizmy, najmä ak sa jedná o suroviny transportované loďou s vysokou vlhkosťou, kde hrozí zvýšené nebezpečenstvo množením nežiaducich mikroorganizmov.

Kľúčové slová: vitamíny, výživové doplnky, mikroorganizmy, vstupné suroviny

Abstract

Vitamins are classified as so called functional food, and fulfill the role of nutrition supplements in the diet of humans. They have a significant biological effect in both, the synthetic or natural form. Vitamins and their components, entering the production process must meet, inter alia, the requirements of microbiological quality. For the evaluation of final products in the Slovak Republic, technology standards given in the Slovak Food Codex are used and in the case of starting materials assessment under the Slovak Pharmacopoeia is used. In case of declaration of microbiological safety of vitamins and their components is important to acknowledge in particular the absence of pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms, such as microorganisms of the *Enterobacteriaceae* family, particularly pathogenic species of *Salmonella*, *Escherichia coli* and species of the genera *Pseudomonas* and *Staphylococcus*. The presence of a large number of microscopic fungi and yeast in the feed, adversely affects the stability and effectiveness of nutritional supplements and vitamins. Based on several years of results in the microbiological assessment of vitamins, nutritional supplements and their components in Zentiva a. p. Hlohovec, it is important to monitor the micro-organisms, especially when dealing with raw materials transported on a ship with high humidity, where there is a high chance of presence of genera mentioned above.

Key words: vitamins, nutrition supplements, micro-organisms, starting materials

Použité pojmy a skratky

AMK	- Aminokyseliny
API	- Active pharmaceutical ingredient (aktívne farmaceutické zložky)
CPKP	- Celkový počet kvasiniek a plesní
CPM	- Celkový počet mikroorganizmov
EIEC	- Enteroinvazívne <i>E.coli</i>
EHEC	- Enterohemoragické <i>E. coli</i>
EPEC	- Enteropatogénne <i>E. coli</i>
ETEC	- Enterohemoragické <i>E. coli</i>
FDA	- Food and Drug Administration (kontrola potravín a liečiv)
HACCP	- Hazard analysis and critical control point system (analýza rizík kritických kontrolných bodov systému)
HVLP	- Hromadne vyrábané liečivé prípravky
KTJ	- Kolónie tvoriace jednotky
MP	- Metodický pokyn
PK	- Potravinový kódex
SL	- Slovenský liekopis
ŠOP	- Štandardný operačný postup
STN	- Slovenská technická norma
SVP	- Správna výrobná prax
ŠÚKL	- Štátny ústav pre kontrolu liečiv
ZoP	- Zákon o Potravinách

Obsah

Úvod.....	8
1 Ciele práce	9
2 Metodika práce.....	10
3 Výsledky práce – štúdia o súčasnom stave riešenej problematiky	11
3.1 Vitamíny a výživové doplnky.....	12
3.1.1 Vitamíny.....	12
3.1.2 Výživové doplnky.....	16
3.2 Výroba vitamínov a výživových doplnkov v Zentiva a. s. Hlohovec.....	18
3.3 Mikrobiálne hodnotenie vitamínov, ich komponentov a výživových doplnkov .	19
3.4 Charakteristika hodnotených mikroorganizmov v komponentoch pri výrobe vitamínov a výživových doplnkov	24
3.4.1 Žlčtolerantných gramnegatívnych baktérií.....	25
3.4.2 Charakteristika druhov rodu <i>Salmonella</i>	27
3.4.3 Charakteristika rodu <i>Escherichia coli</i>	28
3.4.4 Charakteristika rodu <i>Staphylococcus</i>	29
3.4.5 Charakteristika rodu <i>Pseudomonas</i>	31
3.5 Mikrobiologické hodnotenie procesu výroby vitamínov v Zentive a.s. Hlohovec.....	32
3.6 Metódy stanovenia sledovaných mikroorganizmov aplikované v Zentive a.s. Hlohovec.....	35
4 Záver.....	38
5 Zoznam použitej literatúry	40

Úvod

Farmaceutická výroba patrí medzi odvetvia, ktoré si vyžadujú dodržiavanie správnej výrobnéj praxe (SVP). Podľa Turzovej (2007) je jedným z kritérií správnej výrobnéj praxe aj mikrobiálna čistota komponentov vstupujúcich do výrobného procesu pri výrobe vitamínov a výživových doplnkov. Príprava komponentov sa má uskutočňovať v oddelených priestoroch tak, ako to zabezpečenie kvality vyžaduje, aby sa znížilo riziko mikrobiálnej kontaminácie. Vstupné materiály a pomocné látky z hľadiska mikrobiologickej kvality musia spĺňať požiadavky definované v Slovenskom liekopise (Chalabala, 2000).

Na zabezpečenie výroby kvalitných, zdravotne neškodných a hygienicky bezchybných výrobkov sa pri výrobe požívatín využíva systém mikrobiálnych kontrol. V tomto kroku výrobného procesu je možné vyselektovať vstupné materiály, ktoré svojím zložením nespĺňajú limity vyšpecifikovaných mikroorganizmov a podľa Slovenského liekopisu nevyhovujú predpisom a stanoveným normám. Pri komponentoch vstupujúcich do výrobného procesu pri výrobe vitamínov sa sleduje prítomnosť mikroorganizmov rodov *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Žltolerantné gramnegatívne baktérie* a rody *Staphylococcus* a *Pseudomonas*, ktoré môžu po spracovaní u konzumenta vyvolať alimentárne ochorenia. Aktivita týchto mikroorganizmov je ovplyvňovaná rôznymi faktormi, napr: teplota, vlhkosť aeróbne alebo anaeróbne podmienky. Finálne farmaceutické prípravky a vstupné materiály musia taktiež vyhovovať predpisom pre potravinové doplnky, u ktorých sú limity mikroorganizmov udané potravinovým kódexom v kapitole – potravinové doplnky. Účinná látka môže vplyvom extraktov mikroorganizmov chemicky zreagovať, čo negatívne pôsobí na stabilitu a účinnosť vitamínov a výživových doplnkov. Táto skutočnosť ovplyvňuje nielen vzhľad, ale aj konzistenciu výrobku. Pri výrobe, balení, skladovaní a distribúcii výživových doplnkov je potrebné zabezpečiť vhodnými opatreniami ich mikrobiologickú kvalitu.

1 Ciele práce

1. S využitím dostupných domácich a zahraničných vedeckých literárnych zdrojov charakterizovať mikroorganizmy, ktorých prítomnosť sa sleduje počas mikrobiálnej kontroly surovín vstupujúcich do výrobného procesu pri výrobe vitamínov, ako vo vstupnom materiáli, tak aj vo finálnom výrobku.
2. Charakterizovať sledované mikroorganizmy a ich hodnotiace metódy.
3. Na základe dostupných písomných materiálov a informácií poskytnutých pracovníkmi firmy Zentiva a. s. Hlohovec zhodnotiť predmetnú problematiku v tejto firme.

2 Metodika práce

Predkladaná bakalárska práca má kompilačný charakter. Pri jej vypracovaní sme okrem dostupnej literatúry použili aj informácie poskytnuté pracovníkmi Zentiva a.s. Hlohovec. V súlade s cieľom práce sme:

- zisťovali informácie štúdiom vedeckých recenzovaných a odborných knižných publikácií, vedeckých odborných časopisov zaoberajúcich sa riešenou problematikou,
- našťudovali poznatky, ktoré sme spracovali do celkov (kapitol a podkapitol) podľa stanoveného cieľa,
- zo získaných poznatkov vyvodili všeobecne platné závery v predmetnej oblasti.

3 Výsledky práce – štúdia o súčasnom stave riešenej problematiky

Podľa ZoP 195/2007 Z. z. sú potraviny definované ako látky určené na to, aby ich ľudia požívali v nezmenenom, upravenom alebo spracovanom stave, predovšetkým na výživové účely. Z pohľadu kvality suroviny a spôsobu spracovania rozlišujeme potraviny na Biopotraviny a Funkčné potraviny. Biopotraviny sú potraviny vyrobené len zo surovín pochádzajúcich z ekologickej poľnohospodárskej výroby. Funkčné potraviny – ide o prírodné komponenty v koncentrovanom stave bez straty ich biologickej hodnoty. Tieto koncentráty tvoria funkčnú zložku funkčnej potraviny. Za takéto zložky sú považované: vláknina, polysacharidy, polynenasýtené mastné kyseliny, alkoholické cukry, peptidy a proteíny, baktérie mliečneho kvasenia a vitamíny (Frančáková *et. al.*, 2010). Okrem základného rámca vymedzených vplyvov dominantných zložiek potravy je potrebné vymedziť aj význam jej esenciálnych vplyvov, ktoré predstavujú vitamíny a výživové doplnky (Keresteš, 2009).

V Spojených štátoch amerických patria výživové doplnky do podmnožiny potravín a ich štandardy sleduje kontrola pre potraviny a liečivá (FDA). Po uvedení vitamínov a výživových doplnkov na trh je úlohou FDA vykonávať monitoring bezpečnosti výrobku a na základe písomnej informácie o produktoch pripraviť správu o prípadných nedostatkoch výrobku. Tak isto, pre porovnanie, aj austrálsky výrobca výživových doplnkov musí byť držiteľom výrobnjej licencie SVP pre liečivá a podlieha rovnako kontrole FDA. Tento kódex sa vzťahuje na všetky lieky a výživové doplnky vyrábané v Austrálii, vrátane výživových doplnkov. Vzhľadom na dodržiavanie SVP, ktorá sa deklaruje v EÚ a teda aj na Slovensku, môže Farmaceutická inšpekcia vykonávať ohlásené alebo neohlásené kontroly u výrobcu vitamínov a výživových doplnkov za účelom dodržiavania zásad SVP pre látky uvádzané na trh (Jordan *et.al.*, 2009). V prípade Slovenskej republiky sa kontrola FDA vykonáva periodicky v rozsahu 3 až 5 rokov.

Z výsledkov práce je zrejmé, že je dôležité oboznámiť sa s viacerými faktami zo sféry mikrobiológie, analytickej chémie a tiež spracovania dát a SVP. Spojením práce týchto odvetví je možné získať efektívny spôsob, ako dosiahnuť vyhovujúci a kvalitný výrobok (Grivet, Delort, 2009).

3.1 Vitamíny a výživové doplnky

Vieme, že pre normálny rast a vývoj človeka nestačí len potrava, ktorá obsahuje uhľohydráty ako zdroj energie, bielkovinové látky, ako stavebné kamene pre organizmus a minerálne soli. Okrem týchto živín sú potrebné ešte nevelké množstvá látok, ktoré voláme vitamíny a výživové doplnky (Betina, 1959).

Mundisová a Mindell (2006) uvádzajú, že vitamíny sú využívané v terapeuticknej forme (množstvo účinnej látky má liečebný charakter) alebo v podpornej forme (obsah účinnej látky je udaný na dennú spotrebu výživy) a označené sú ako výživové doplnky. Vitamíny sa môžu pripravovať dvomi úplne odlišnými metódami. Syntetický vitamín sa dá vytvoriť chemickou syntézou a prírodný vitamín sa dá extrahovať z rôznych organizmov. Rozdiel medzi vitamínovým preparátom a výživovým doplnkom charakterizuje zloženie, teda množstvo účinnej látky vo vitamínoch a množstvo jednotlivých prvkov obsiahnutých v produkte (Chalabala *et al.*, 1991).

V bežnom spôsobe stravovania je nutné uprednostňovať prísun vitamínov prírodnou cestou a ku výživovým doplnkom (s minerálnymi a stopovými prvkami) siahnuť až v prípade potreby – v čase zvýšenej námahy, stresu, choroby, či v čase, kedy sa organizmu prirodzenou stravou nedarí doplniť všetky potrebné látky. Výživové doplnky by sa nemali užívať stále (Zittlau, 2006). Nutričná terapia perorálnymi výživovými doplnkami a vitamínmi vedie k zvýšeniu subjektívnej kvality života (Norman *et al.*, 2007).

3.1.1 Vitamíny

Slovo vitamín pochádza z latinského slova *vita*, čo znamená život a *amín*, čo je zlúčenina dusíka. V roku 1912 Kazimierz Funk, poľský biochemik, predstavil výraz vitamín po prvýkrát (Marley *et al.*, 2006).

Vitamíny sú teda organické látky, ktoré sa v tele nesyntetizujú alebo sa syntetizujú len v malom množstve. Sú to látky rastlinného alebo mikrobiálneho pôvodu, známe tiež ako biologicky aktívne látky, ktoré zabezpečujú mnoho životne dôležitých funkcií. Pre

Ľudský organizmus sú tieto látky esenciálne, čo znamená, že ich musíme prijímať potravou. Sú neoddeliteľnou zložkou výživy. Ich nedostatok (avitaminóza) vyvoláva chorobné stavy, ale k závažným poruchám môže dôjsť aj pri ich nadbytku (hypervitaminóza). Príčinou avitaminóz môže byť porucha trávenia a vstrebávania alebo poškodenie črevnej mikroflóry. Porucha z nedostatku vitamínov môže vzniknúť tiež ako následok podávania liečivých prípravkov, ktoré pôsobia ako antagonisti vitamínov (Ursellová, 2004).

Definícia vitamínov hovorí, že predstavujú organickú zložku potravy, ktorá nie je stavebnou látkou ani zdrojom energie, ale je nevyhnutná pre život, zdravie, rast a chod organizmu. Ich nedostatok spôsobuje trvalé poškodenie (Kysela, 1990). Vitamíny sa zapájajú do celej škály procesov v mnohých systémoch ľudského organizmu. Väčšina z nich sa podieľa (ako súčasť enzýmov - urýchľovačov biochemických reakcií) na dôležitých procesoch látkovej premeny. Označovanie jednotlivých vitamínov písmenami latinskej abecedy má historický pôvod a poradie je dané iba časom, kedy boli objavené (Agerbo, 1997). Podľa Magulu (2001) majú v ľudskom organizme vitamíny funkciu katalyzátorov biochemických reakcií. Podieľajú sa na metabolizme bielkovín, tukov a cukrov. Existuje 13 základných typov vitamínov. Ľudský organizmus si, až na niektoré výnimky, nedokáže vitamíny sám vyrobiť a preto ich musí získavať prostredníctvom stravy vo forme tzv. provitamínov. Tie sa potom menia na vitamíny. Vitamíny rozdeľujeme na vitamíny rozpustné vo vode a vitamíny rozpustné v tukoch.

Do skupiny vitamínov rozpustných vo vode patria:

- **Vitamín B₁**, nazývaný tiamín, je vo vzťahu k protizápalovým účinkom tiež uvádzaný ako aneuricín. Dlhodobo sú známe jeho účinky na funkciu nervov a svalov, mozgu, srdca, žalúdka, dýchania buniek a pod. Je termolabilný a nestály v kyslom prostredí (Keresteš, 2009). V nesyntetizovanej forme sa nachádza v obilninách, strukovinách, zelenine a ovocí (Ursellova, 2004).
- **Vitamín B₂**, nazývaný riboflavín, je rastový vitamín. Nedostatok, ale aj nadbytok spôsobuje opuchy na perách, jazyku, zápal očných spojiviek. Je potrebný na opúzdrenie nervových dráh. V nesyntetizovanej forme ho nájdeme predovšetkým v mliečnych výrobkoch a zelenine (Zittlau, 2006).
- **Vitamín B₃** je známy pod názvom kyselina nikotinová alebo vitamín *PP*. Je dôležitým vitamínom pri metabolizme cukrov, najmä pri cukrovke a organizmus ho

vyžaduje 10-20 mg denne. Z rastlinných produktov ho obsahuje najmä ryža, obilné celozrnné múky a výrobky z nich, zemiaky, kapusta a tiež huby (Muchová *et al.*, 2011).

- **Vitamín B₅**, nazývaný tiež kyselina pantotenov, má podľa Myttermayra (2004) široké využitie v škále obohatených potravinárskych výživových doplnkov. U nás sú dostupné pantenolové prípravky vo forme tabliet a sprayov. Má pozitívne účinky na sliznice, vlasy, pokožku a pod. Príznaky nedostatku sa prejavujú zastavením rastu. V prirodzenej forme sa vyskytuje v otrubách a v droždí (Michalík, 2008).
- **Vitamín B₆**, známy pod názvom pyridoxín, podporuje tvorbu krviniek a ukládanie tukov. Podieľa sa na premene glykogénu na glukózu, ktorú môže mozog využívať. Fajčenie a veľká konzumácia rýb zvyšuje potrebu pyridoxínu (Zittlau, 2006).
- **Vitamín B₈**, triviálne nazývaný Inozitol, podľa Mundisovej a Mindella (2006) hrá významnú úlohu v membránach buniek a v myokarde tvorí zásobu energie pre prípad nedostatku glukózy. Medzi najvýznamnejšie zdroje patria obilniny, klíčky obilnín, dyňa cukrová, ale aj pivovarnícke kvasnice.
- **Vitamín B₉**, je názov pre kyselinu listovú. Zohráva dôležitú úlohu pri látkovej premene bielkovín a spolu s vitamínom B₁₂ bráni vzniku anémie, lebo oba vitamíny sú potrebné na tvorbu červených krviniek v kostnej dreni (Ungerová, 1999).
- **Vitamín B₁₂** sa vyskytuje v dvoch formách: kyanokobalamín a hydroxokobalamín. Má kľúčový význam pri tvorbe červených krviniek v kostnej dreni a udržiava zdravý nervový systém. Najdôležitejšie prírodné zdroje sú pečeň, živočíšne vnútornosti a mliečne výrobky (Mundisová, Mindell, 2006).
- **Vitamín C**, nazývaný aj kyselina askorbová, je najznámejší vitamín. Je dôležitý pre správnu funkciu a stavbu spojivového tkaniva a cievnej steny, činnosť enzýmov a metabolizmus látok. Uvádza sa aj jeho účinok na zvýšenie celkovej odolnosti organizmu. Zdrojom je ovocie a zelenina (Vokurka, Hugo, 2000).
- **Vitamín H**, známy pod názvom biotín, sa podieľa na bio-regulačných vplyvoch na pokožku, šedivenie, redukcia tukových rezerv, spavosť, ale i brzdenie rastu detí (Michalík, 2008).

Do skupiny vitamínov rozpustných v tukoch patria:

- **Vitamín A** podporuje rast organizmu a zrkové vnemy, zvyšuje odolnosť voči infekčným chorobám. Nedostatok vitamínu A je najrozšírenejším vitamínovým deficitom v celosvetovom meradle. β – karotén, provitamín vitamínu A, chráni organizmus pred rôznymi rakovinotvornými ochoreniami. Je dôležitý pre oči, kožu sliznice a rast kostí (Agerbo, 1997).
- **Vitamín D** podporuje vstrebávanie vápnika, čo je základ pre zdravý vývoj zubov a kostí. Okrem toho pozitívne ovplyvňuje zápaly. Nedostatok vitamínu D môže viesť k závažným poruchám mineralizácie kostry (Zittlau, 2006).
- **Vitamín E**, známy pod triviálnym názvom tokoferol, sa podieľa na oxidačno redukčných procesoch a dýchaní, bráni tvorbe krvných zrazenín a má liečebné účinky v hojení rán, kožných chorôb a pod. Je jedným z mála vitamínov, u ktorých bol vedecky dokázaný protirakovinový účinok. Má močopudné účinky a tým môže znižovať krvný tlak (Mundisová, Mindell, 2006).
- **Vitamín K** je tiež uvádzaný ako vitamín K₁, K₂, K₃. Tieto vitamíny majú známe účinky pri zrážanlivosti krvi i vo väzbe na krvácanie niektorých orgánov a v terapii používaných sulfónamidov. Vitamíny skupiny K sú všeobecne citlivé na ultrafialové žiarenie a chemické vplyvy (Keresteš, 2009).

Do systému zdravej výživy je treba uviesť aj integrujúce bioelementy, všeobecne nazývané minerálne látky, v rozličnej forme viazané na organické i anorganické látky. Delia sa na:

- **mikroelementy**, ktoré obsahujú sodík, draslík, vápnik, horčík, fosfor, chlór a síru.
- **stopové prvky**, patrí sem železo, zinok, meď, mangán, nikel, kobalt, molybdén, jód, flór, selén, chróm, lítium, kremík, stroncium, bróm a vanád.

Okrem minerálnych látok biogénneho a zdravotného významu je dôležité menovať ešte prvky nebezpečné zdraviu. Uvádzané sú v poradí hliník, olovo, arzén, kadmium, hélium a ortuť (Keresteš, 2009). Potreba vitamínov stúpa napríklad pri telesnej a duševnej záťaži, u mladistvých vo fáze rastu je vyššia, ako u dospelých, aj tehotné a dojčiace ženy majú vyššiu potrebu vitamínov. O to, aby bola strava bohatá na vitamíny je treba sa v zásade snažiť cieleným výberom potravín (Ungerová, 1999).

3.1.2 Výživové doplnky

Výživové doplnky (potravinové doplnky) predstavujú koncentrovanú formu základných živín (monosacharidov, aminokyselín, mastných kyselín, vitamínov, minerálnych látok alebo stopových prvkov) v rôznych typoch liekových foriem – tabliet, kapsúl, práškov, nápojov a pod. Patria medzi potraviny určené na výživové účely, ktoré sa na základe svojho špecifického zloženia alebo osobitného spôsobu výroby odlišujú od ostatných potravín, sú vhodné na daný účel výživy a zodpovedajú osobitným potrebám výživy určitých skupín obyvateľstva (Zákon 195/2007 Z. z.). Niekedy obsahujú iba jediný typ živín (vitamíny alebo minerálne látky), inokedy spojenie dvoch alebo troch živín alebo spojenie multivitaminových komplexov. Výživové doplnky môžu obsahovať celé spektrum živočíšnych a rastlinných produktov, ktoré sú vhodnou živnou pôdou pre rast mikroorganizmov (Magula *et al.*, 2001). Probiotické baktérie (bifidobaktérie, laktobaktérie) majú priaznivé účinky v prevencii i liečbe ochorení tráviacej sústavy.

Účinky probiotických baktérií:

- potláčajú rast patogénnych mikroorganizmov tvorbu kyseliny mliečnej, octovej a maslovej,
- pôsobia imunostimulačne, zvyšujú odolnosť proti bakteriálnym infekciám,
- napomáhajú obnoviť črevnú mikroflóru v období rekonvalescencie,
- produkujú vitamíny skupiny B, vitamín K, uľahčujú vstrebávanie a využitie vitamínov,
- zvyšujú vstrebávanie a lepšie využitie viacerých minerálnych látok z potravy: vápnika, železa a niektorých mikroelementov a stopových prvkov.

Výživové doplnky sa používajú na doplnenie prirodzenej stravy a sú koncentrovanými zdrojmi živín, ako sú vitamíny a minerálne látky alebo iných látok s výživovým alebo fyziologickým účinkom, jednotlivo alebo v kombinácii (Potravinový kódex SR, 1997). Sú určené pre ľudí, ktorých výživa je neprimeraná alebo dočasne nedostatočná.

Výživové doplnky môžu obsahovať tieto vitamínové zložky:

- vitamíny A retinol, betakarotén, D (kalciferoly), E (tokofroly), K (naftochinóny), B₁ (thiamín), B₂ (riboflavín), PP faktor nikotínamid kyselina pantothenová, B₆

(pyridoxín), B₁₂ (kobalamín), C (kyselina askorbová), H (biotín), B₉ (kyselina listová),

- minerálne látky vápnik (Ca), fosfor (P), horčík (Mg), železo (Fe), fluór (F), zinok (Zn), meď (Cu), jód (J), selén (Se), molybdén (Mo), chróm (Cr), mangán (Mn) (Potravínový kódex SR, 1997).

Výživové doplnky sa umiestňujú na trh v dávkovanej forme, ako sú kapsuly, pastilky, tablety, piluly, vrecúška s práškom, ampulky s tekutinami, fľašky s dávkovačom kvapiek a ostatné podobné formy tekutín a práškov navrhnuté tak, aby ich bolo možné brať v odmeraných malých jednotkových množstvách (Potravínový kódex SR, 1997).

Výživové doplnky – rozdelenie

Podľa Očenáša (2003) sa rozdeľujú výživové doplnky do viacerých základných skupín a podskupín. Pre jednoduchšiu orientáciu v širokej ponuke je toto rozdelenie nasledovné:

Prvá skupina

Do tejto časti môžeme zahrnúť skupinu vitamínov a minerálov. Tvoria ju jednak prípravky obsahujúce jeden druh alebo jednu skupinu vitamínov, či minerálov a jednak takzvané multivitamínové alebo multiminerálové prípravky.

Druhá skupina

Sem patria najmä výrobky z liečivých rastlín. Okrem najbežnejšej formy, teda čaju a alkoholového výluhu vo forme tinktúr, sa pripravujú aj výluhy a výlisky v olejoch. Produkty tejto skupiny sú prírodného charakteru a prevažne v prirodzenej forme sa prijímajú do organizmu. Rôznorodú skupinu tvoria špeciálne prípravky, ktoré sú určené na veľmi špecifické účely. Najznámejšie sú včelie produkty, ktoré zahŕňajú napríklad výrobky z peľu, medu, propolisu alebo materskej kašičky a podskupina špeciálne tuky, kam patrí lecitín a omega 3 mastné kyseliny. Menej rozšírená je podskupina enzýmov.

Tretia skupina

Do tejto skupiny patria produkty, ktoré sa využívajú najmä v profesionálnom športe, avšak sú využiteľné aj ako doplnky výživy pri väčších športových výkonoch a počas znižovania hmotnosti. Osobitné športové výživové doplnky môžu byť užitočné, v niektorých prípadoch je však potrebné vyhnúť sa vysokým dávkam týchto doplnkov, aby sa zabránilo škodlivým organickým efektom na ľudský organizmus (Maughan *et al.*, 2004).

Štvrtá skupina

Štvrtá skupina je označená ako doplnková zahŕňa v sebe produkty, ktoré sa už nedajú považovať za výživové doplnky. Sú to hlavne prípravky liečebnej kozmetiky. Napriek tomu sa jedná o produkty podporujúce celkovú starostlivosť o zdravie ľudského tela.

Podľa Turzovej (2007) sa vitamíny a výživové doplnky dostávajú medzi farmaceuticky pripravené lieky zo všetkými možnými pozitívnymi i negatívnymi dôsledkami. Rozdiel medzi potravinovými vitamínovými doplnkami, ktoré vyrábajú potravinárske podniky a farmaceutickou firmou je v tom, že obsah účinných látok (v potravinových doplnkoch vyrábaných farmaceutickou firmou) má terapeutický účinok. V uvedenom prípade sa tieto farmaceutické výrobky dostávajú do lekární na predpis lekára. V súvislosti s tým musí aj výrobok spĺňať požiadavky správnej výrobných praxe a vyhovovať vysokým mikrobiologickým štandardom v procese výroby.

3.2 Výroba vitamínov a výživových doplnkov v Zentiva a. s. Hlohovec

Zentiva a. s. Hlohovec je na trhu liečiv považovaná za špičkového poskytovateľa farmaceutických produktov a služieb v strednej a východnej Európe. Vyvíja, vyrába a predáva farmaceutické produkty, ktoré pomáhajú zlepšovať kvalitu ľudského života. História farmaceutickej výroby na Slovensku sa začala v roku 1941, keď bola v Bratislave založená spoločnosť Slovenské alkaloidy na výrobu morfia. Samostatný národný podnik na výrobu liekov pod názvom Slovakofarma vznikol 1. januára 1950. V roku 1992 sa Slovakofarma transformovala na akciovú spoločnosť a v roku 2003 bola spoločnosť začlenená do vzniknutej skupiny Zentiva. V dôsledku toho sa meno spoločnosti zmenilo na Zentiva a.s. Hlohovec. Spoločnosť Zentiva je najvýznamnejším slovenským farmaceutickým výrobcou, je súčasťou národnej korporácie a pôsobí ako najdôležitejší domáci farmaceutický subjekt a partner zdravotného systému Slovenskej republiky. Cieľom spoločnosti je rozširovať kvalitnú liečbu, najmä v oblasti primárnej starostlivosti. V produktoch skupiny Zentiva sa okrem liečiv nachádzajú v oblasti doplnkov stravy aj vitamínové prípravky a výživové doplnky. Výrobca uskutočňuje klinické štúdie na dôkaz účinnosti svojich výrobkov (Ursellová, 2004). Pri ich výrobe sa v rámci Slovenska

Zentiva a. s. riadi Európskymi normami, ktoré sú dostupné v Slovenskom liekopise (Chalabala *et al*, 2000). Firma svojou ponukou pokrýva na trhu širokú škálu vitamínových preparátov a výživových doplnkov, ktoré produkuje v rôznych formách. Tieto výrobky sú uvedené v tabuľke č. 1.

Tabuľka č.1: Prehľad a rozdelenie vitamínov a výživových doplnkov produkovaných skupinov Zentiva a. s. Hlohovec.

FORMA	Výživový doplnok	Vitamínový preparát
Tablety		Celaskon (vitamín „C“- rôzne príchute) Pyridoxín Vitalcalcín Thiamín
Kapsule tvrdé	Ercé-Flóra (probiotiká) Celaskon (s postupne sa uvoľňujúcim efektom)	
Kapsule mäkké		Vitamín E Vitamín A Vitamín AD Vitamín D
Tablety šumivé		Celaskon (vitamín“C“- rôzne príchute) Calcium
Dražé	Calibrium	Spofavit B-komplex B-komplex-forte
Tablety žuvacie	Calibrium-junior Celaskon-limetka	
Injekčný roztok		Pyridoxín Thiamín Vitamín B ₁₂

3.3 Mikrobiálne hodnotenie vitamínov, ich komponentov a výživových doplnkov

Komponenty vstupujúce do výrobného procesu sa musia pre kontrolu správneho technologického postupu výroby a ich trvanlivosti pravidelne mikrobiologicky vyšetrovať.

Výrobca zodpovedá za výrobu a uvádzanie na trh kvalitných a bezpečných výrobkov. Táto povinnosť musí byť adekvátne kontrolovaná samotným výrobcom (Golian, Šiška, 2008). Mikrobiologické hodnotenie sa uskutočňuje jednak pri samotnej výrobe vitamínových a výživových doplnkov, ale dôraz sa kladie najmä na suroviny používané pri výrobe hotových produktov. Po uskutočnení nákupu surovín všetky komponenty vstupujúce do výrobného procesu sa musia podrobiť mikrobiálnej kontrole podľa platných noriem Slovenského liekopisu (Chalabala, 2000). Najčastejšie pri hodnotení komponentov a hotových vitamínov nastávajú problémy:

- v prípade transportu v nevhodnom PVC obale,
- transportu vo vysokej vlhkosti (lod'ou),
- pri dlhodobom transporte (vstupná surovina obsahuje už zárodoky plesní, no ich počet je v limite),
- pri viacnásobnej manipulácii s tovarom (prekladanie tovaru, preskladňovanie).

Nevhodné a mikrobiálne kontaminované obaly môžu mať za následok množenie mikroorganizmov. Pre úplné posúdenie mikrobiologickej kvality vstupnej suroviny sa vzorky odoberajú z každého balenia komponentov. V takomto prípade jednotlivé vzorky, ktoré sa dostanú na laboratórne posúdenie majú rozdielny počet mikroorganizmov, aj keď sa jedná o jednu edíciu. Vysoký počet CPM bol zaznamenaný ak:

- surovina nebola dostatočne vysušená,
- sa jedná o surovinu na báze škrobu,
- sa jedná o surovinu na báze prírodného farbiva.

Vysoký počet patogénnych mikroorganizmov čeľade *Enterobacteriaceae* sa vyskytol:

- u surovín rastlinného pôvodu, ak sa pri technológii spracovania nepoužíva vysoká teplota,
- u surovín získaných spôsobom samovoľného postupného sušenia (bylinky),
- u surovín živočíšneho pôvodu, kde technológie spracovania nevyužívajú vysoké teploty.

V prípade vysokých počtov *žltolerantných* mikroorganizmov najčastejšou príčinou je surovina rastlinného pôvodu pestovaná voľne na poli a vysoký podiel vody v surovine.

Pomocné látky, ako vstupné suroviny, boli v minulosti využívané len málo, v súčasnosti sú starostlivo vyberané pre ich vplyv na účinnosť liekov a výrobnú ekonomiku (Ludiflash, 2008). Kvalitnú surovinu je možné použiť len v jej dobe spotreby, čo v Zentive a.s. sú spravidla tri mesiace. Po uplynutí tejto doby nie je možné surovinu použiť vo výrobnom

procesu a hodnotenie treba zopakovať. Izolované mikroorganizmy sa posudzujú pri výrobe vitamínov a výživových doplnkov z hľadiska:

- použitia produktu vzhľadom na dobu spotreby,
- povahy produktu (schopnosť inhibovať alebo podporovať rast mikroorganizmov),
- spôsobu ich užívania, ktorý je spravidla perorálny.

Pri výrobe vitamínov a výživových doplnkov sa hodnotia suroviny, ktoré sú zatriedené podľa Slovenského liekopisu do kategórií na prírodnej báze alebo na báze syntetickej výroby (Tab. 2).

Tabuľka č.2: Rozdelenie surovín pri výrobe vitamínov a výživových doplnkov podľa pôvodu.

Prírodná báza	Syntetická báza
Tokoferol acetat (vitamín E-zdroj rastlinný olej)	Kyselina askorbová
Oleum vegetabile (rastlinný olej)	L- karnitin
Soja lecitín (zdroj-sojové bôby)	Tokoferol
Rubou ponceau (Košeniľová červená-organické farbivo)	Natrii hydrogen carbonas
Soybean lecitín (zdroj-sojové bôby)	Sorbitolum
Beta karotén (zdroj-keľ, brokolica, mrkva)	Acesulfanum calicum
Luteín (extrakt z okvetných lístkov nechtíka lekárskeho)	Acidum stericum
Schizandra (rastlina rastúca v tropoch, významná obsahom minerálnych solí)	
Ergokalciferolum (vitamín "D"-zdrojom je rybí tuk a pečeň)	
Rutín (bioflavonoid- zdrojom je pohánka)	

Za kontaminanty sa podľa Potravinového kódexu považujú aj endogénne alebo sekundárne cudzorodé látky, ktoré vznikajú v komponentoch pôsobením fyzikálnych, chemických, biochemických a biologických faktorov alebo vzájomným pôsobením zlomkov komponentov alebo predmetov prichádzajúcich s nimi do styku počas ich výroby, spracovania a uvádzania do obehu (Potravinový kódex SR, 1997). Finálne farmaceutické prípravky hromadne vyrábané (HVLP) a vstupné materiály z hľadiska mikrobiologickej kvality musia spĺňať nasledovné požiadavky:

- vyhovovať požiadavkám mikrobiologickej kvality nesterilných liekových foriem a nesterilných látok pre farmaceutické použitie (Tab. 3),

- vyhovovať predpisom pre potravinové doplnky, u ktorých sú limity mikroorganizmov udané potravinovým kódexom v kapitole – potravinové doplnky (Tab. č. 4 a tab. č. 5).

Nesterilné liekové formy sú finálne farmaceutické produkty, pre ktoré neboli stanovené kritériá požadovanej mikrobiologickej kvality (MP č.126/2009). Tieto nesterilné liekové formy alebo látky nesmú však obsahovať patogénne mikroorganizmy (napr: *Escherichi coli*).

Podľa Slovenského liekopisu (Chalabala, 2000) sa hodnotia mikroorganizmy v nesterilných liekových formách na farmaceutické použitie podľa tabuľky č.3.

Tabuľka č.3: Kritéria mikrobiologickej kvality nesterilných liekových foriem a nesterilných látok pre farmaceutické použitie.

	CPM KTJ/g/ml	CPKP KTJ/g/ml	Špecifické mikroorganizmy
Produkty pre perorálne podanie, ktoré neobsahujú vodu	10^3	10^2	Neprítomnosť <i>Escherichia coli</i> , v 1g alebo 1ml
Farmaceutické substancie pre výrobu produktov: obsahujúce suroviny prírodného pôvodu	10^3	10^2	- Žlčtolerujúce gramnegatívne baktérie, 10^2 CFU/g alebo ml
Farmaceutické substancie pre výrobu produktov: obsahujúce suroviny prírodného pôvodu			- neprítomnosť <i>Salmonella</i> , v 10g alebo ml - neprítomnosť <i>Escherichia coli</i> , v 1g alebo 1ml - neprítomnosť <i>Staphylococcus</i> v 1g alebo 1ml

Podľa Potravinového kódexu hlava IV, (druhá časť Potravinového kódexu), sa potravinové doplnky minerálne, vitamínové a kombinované, hodnotia podľa tabuľky 4 a tabuľky 5.

Tabuľka č. 4: Potravinové doplnky minerálne, vitamínové a kombinované, napr.: tablety, prášok, dražé, kapsuly, želé, tekuté prípravky a podobne (Potravinový kódex SR, 1997).

Skupina mikroorganizmov	n	c	m	M
Koliformné baktérie	5	0	0_b	-
Plesne	5	2	0_b	$5 \cdot 10^2$

Tabuľka č. 5: Potravinové doplnky minerálne, vitamínové a kombinované obsahujúce rastlinnú zložku, napr.: tablety, prášok, dražé, kapsuly, želé, tekuté prípravky a podobne (Potravinový kódex SR, 1997).

Skupina mikroorganizmov	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	5	2	10 ²	10 ⁴

- „n“ je počet vzoriek určený na mikrobiologické vyšetrenie,
- „m“ je najvyšší prípustný počet mikroorganizmov v rozsahu výberu „n“ v ustanovenom množstve vzorky,
- „M“ je najvyšší prípustný počet mikroorganizmov v ustanovenom množstve vzorky, ktorý sa ešte pripúšťa, ale len v počte vzoriek, ktorý je nižší ako „c“ alebo sa rovná „c“,
- „c“ je počet vzoriek z „n“, v ktorých sa pripúšťa najviac hodnota „M“, pričom platí, že vo vzorkách v počte „n“ mínus „c“ môže byť najviac hodnota „m“,
- „0_b“ znamená, že mikroorganizmy nesmú byť preukázateľne pri zaliati 1,0 cm³ riedenej vzorky riedenia 10⁻¹.

Ak sa vo všetkých vzorkách v počte „n“ pripúšťa len hodnota „m“, v stĺpci „c“ preberacieho postupu sa uvádza nula a v stĺpci „M“ preberacieho postupu sa uvádza znamienko mínus (Potravinový kódex SR, 1997).

Mikrobiálna kontrola hotových produktov sa vykonáva po každej finálne ukončenej šarže, a to odobraním reprezentatívnej vzorky. Po vyhovujúcom vyhodnotení je možné produkt distribuovať k zákazníkovi. Povinnosťou výrobcu je zabezpečiť bezpečnosť a kvalitu vitamínov a výživových doplnkov (Norman *et.al*, 2007).

3.4 Charakteristika hodnotených mikroorganizmov v komponentoch pri výrobe vitamínov a výživových doplnkov

V nasledovnom prehľade sa tieto mikroorganizmy charakterizujú ako nebezpečenstvá, ktoré sa za určitých podmienok môžu v komponentoch nachádzať, rásť a rozmnožovať sa, prekonať procesy opracovania a spracovania a spôsobovať ochorenia

(Valík, Prachar, 2009). Jedná sa o mikroorganizmy z čeľade Žltolerantných gramnegatívnych baktérií, ale aj zástupcov rodov *Salmonella*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus* a rodu *Pseudomonas*. Definuje ich najznámejšia a v bežnej praxi najpoužívanejšia klasifikácia baktérií nachádzajúca sa v diele Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (George, 2005). Podľa Görnera a Valíka (2004) hlavnou vlastnosťou mikroorganizmov je schopnosť zachovať si v potravinách ich životaschopnosť a virulenciu (schopnosť spôsobiť ochorenie). Komponenty vstupujúce do výrobného procesu musia zodpovedať určitej mikrobiálnej čistote. Nepatogénne mikroorganizmy udávané v CPM musia zodpovedať limitu uvedenému v Slovenskom liekopise (Chalabala, 2000). Okrem nepatogénnych mikroorganizmov sa v komponentoch (resp. surovinách) môžu vyskytovať aj patogénne mikroorganizmy alebo podmienne patogénne mikroorganizmy. Patogenita je schopnosť mikrobiálneho druhu vyvolať ochorenie konkrétneho druhu hostiteľa (Bednář, 1996).

Z hľadiska patogenity sa mikroorganizmy delia na:

1. **nepatogénne mikroorganizmy** – geneticky neprispôsobené na vyvolanie ochorenia u daného druhu,
2. **patogénne mikroorganizmy** – vysoko virulentné, vyvolávajú ochorenia u imunologicky kompetentných osôb, majú za následok poškodenie a ochorenie organizmu,
3. **podmienne patogénne mikroorganizmy** – fakultatívne oportunistické patogény – u osôb s neporušenou imunitou ochorenie vznikne len veľmi zriedkavo. Sú súčasťou fyziologickej mikrobiálnej flóry a sú nízko virulentné (Přecechtel, 1988).

3.4.1 Žltolerantných gramnegatívnych baktérií

V podstate sa jedná o mikroorganizmy, ktoré boli doteraz uvádzané ako *Enterobacteriaceae*. Vplyvom novelizácie názvov mikroorganizmov sa táto čeľaď uvádza ako baktérie *Žltolerujúce gramnegatívne baktérie* (Přecechtel, 1988). Indikátorová dôležitosť tejto skupiny baktérií a ich schopnosť rastu na bežných živých pôdach, spôsobila ich intenzívne štúdium v rôznych oboroch vrátane lekárstva, potravinárskeho priemyslu, mikrobiológie vody, biochémie a genetiky (Grones, 2001). Svoje označenie

majú odvodené od miesta, kde sa najčastejšie vyskytujú. Nachádzajú sa v črevnom trakte zvierat a človeka. Z tohto faktu vyplýva ich široké rozšírenie v životnom prostredí. Pri svojom patogénnom pôsobení sa môžu vyskytovať, prakticky, v každom životne dôležitom systéme ľudí a zvierat. Pre tento spôsob života sú prispôsobené ich metabolické cykly, ktoré im umožňujú využívať pre energetický metabolizmus najrôznejšie substráty, a to za aeróbnych aj mikroaeróbných podmienok. Označujeme ich preto ako fakultatívne anaeróbne baktérie (Sabo, 1997). Sú prevažne mezofilné a niektoré druhy rastú aj pri mraziarenských teplotách (Keresteš *et al.*, 2009).

Morfológia:

Žltolerujúce gramnegatívne baktérie zahŕňajú gramnegatívne, fakultatívne anaeróbne paličkovité baktérie o priemere 0,5 až 1,5 μm a dĺžky 2 až 4 μm. *Žltolerujúce gramnegatívne baktérie* môžu byť pohyblivé (peritrichné bičíky) alebo nepohyblivé, netvorí spóry a delia sa podľa odlišnej antigénnej štruktúry a biochemických vlastností na skupiny, rody, druhy a sérotypy (Görner, Valík, 2004). Ako gramnegatívne baktérie majú na rozdiel od grampozitívnych baktérií podstatne zložitejšiu stavbu bakteriálnej steny, ktorej časťou je liposacharidový komplex.

Podľa vydania medzinárodne uznávanej Bergeyovej príručky (2005) sa čeľaď *enterobaktérií* rozdeľuje na 5 podčeladi:

- 1) *Escherichieae* s rodmi *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella* a *Shigella*,
- 2) *Klebsiellaeae* s rodmi *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia* a *Serratia*,
- 3) *Proteeae* s rodom *Proteus*,
- 4) *Yersinieae* s rodom *Yersinia*,
- 5) *Erwinieae* s rodom *Erwinia*.

Žltolerujúce gramnegatívne baktérie sa uvádzajú zásadne na úrovni rodu a druhu, iba výnimočne na úrovni podrodu a poddruhu. Sú biochemicky veľmi aktívne, skvasujú veľa sacharidov, vyšších alkoholov a glykozidov (Záhradnícky *et al.*, 1981). Táto rozsiahla čeľaď *Žltolerujúcich gramnegatívnych baktérií* rastie pri teplote od 18 °C – 24 °C. Bežne sa kultivujú pri teplote 37 °C. Rastie na rastovo nenáročných pôdach, ale pre rutinnú diagnostiku sa používajú selektívne izolačné pôdy (Sabo *et al.*, 1997).

Antigénna štruktúra

Súčasťou bakteriálnej steny *Žltolerantných gramnegatívnych baktérií* je liposacharidovo-proteinový komplex, označovaný tiež ako endoproteín. Je to telový

antigén, O – antigén. Pohyblivé kmene majú aj bičíkovitý H - antigén a niektoré druhy tiež kapsulárny antigén, K - antigén. Tieto antigény okrem svojho patogenického uplatnenia slúžia k sérotypizácii *Enterobacteriaceae* a to predovšetkým u rodov *Salmonella* a *Shigella* (Sabo *et al.*, 1997). Všeobecne platí, že všetky druhy enterobaktérií sú pomerne dobre citlivé na pôsobenie fyzikálno-chemických vplyvov. Podľa patogenity pre človeka, prípadne pre niektoré druhy zvierat možno v súčasnosti známe druhy enterobaktérií rozdeliť do troch skupín:

- **prvú skupinu** tvoria druhy, ktoré sú obligátne patogénne. Sú to takmer všetky známe sérotypy rodu *Salmonella*, *Shigella* a niektoré sérotypy *Escherichia coli*.
- **druhú skupinu** tvoria enterobaktérie fakultatívne patogénne. Patria sem enterobaktérie rodov *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Hafnia*, *Serratia* a niektoré sérotypy *Escherichia coli*,
- **tretiu skupinu** reprezentujú druhy zväčša komenzálne a saprofytické. okrem väčšiny sérotypov *Escherichia coli* patria sem výhradne fytopatogénny príslušníci rodu *Erwinia*. (Záhradnícky *et al.*, 1981).

3.4.2 Charakteristika druhov rodu *Salmonella*

Zástupcovia rodu *Salmonella* patria do čeľade *Enterobacteriaceae* a v súčasnosti je najrozšírenejšou alimentárnou infekciou v rozvojových a rozvinutých častiach sveta.

Jedná sa o gramnegatívne nesporeujúce paličky veľkosti 0,5 až 0,8 x 1,0 až 3,0 µm, ktoré sú vždy pohyblivé pomocou peritrichálne lokalizovaných bičíkov, s výnimkou *Salmonella pulorum* a *Salmonella gallinarum*. Väčšina kmeňov je vybavená fimbriami (Bystrický *et al.*, 1999). Rastú za aeróbnych, ako aj anaeróbnych podmienok na jednoduchých živných pôdach. Môžu sa vyskytovať v retiazkach, ale tiež jednotlivito alebo v pároch. *Salmonella* rastie pri 6 °C až 50 °C. Optimálna teplota kultivácie je pri 37 °C. Nízke teploty znášajú pomerne dobre, kým vysoké teploty ich usmrcujú po 1. minúte pri 100 °C alebo po 5. minútach pri teplote 80 °C. Patogenitu salmonel zapríčiňujú termostabilné endotoxíny. Sú nenáročné na zloženie kultivačného média. Antigény sú viazané v bunkovej stene a v bičíkoch. Z povrchových antigénov je najdôležitejší Vi-antigén *S. enterica Typhi*, ktorý zároveň umožňuje diferencovať kmene *S. enterica typhi* na fagotypy pomocou špecifických Vi- bakteriofágov (Hudecová, Šimkovič, 2009). Sú citlivé voči

chladiarenským a mraziarenským teplotám. Niekedy sú pod vplyvom nízkych teplôt poškodené iba subletálne (Görner, Valík, 2004). *Salmonella enteritidis* má niekoľko typov, ktoré sa líšia biochemickými vlastnosťami. Základný typ skvasuje glukózu, fruktózu, galaktózu, arabinózu, xylózu a maltózu. Laktózu, sacharózu, salicín, inulín, rafinózu, adonitol a inozitol neskvasuje (Arpai, Bartl, 1977).

Tvorí okrúhle mierne vypuklé kolónie, ktoré sú v S- fáze hladké s celistvým okrajom, v R- fáze majú zrnitý povrch s nepravidelne zúbkovaným okrajom. Rastú niekedy aj v tzv. prechodných formách, pri ktorých sú kolónie zvráskavené prstovitými výbežkami. Salmonely niekedy vytvárajú trpasličie kolónie. Na želatíne tvoria jemné, priesvitné, listom podobné kolónie, ktoré substrát prevažne neskvapalňujú.

Salmonelové infekcie sú problémom medicíny. Niekoľko salmonel je patogénnych iba pre človeka, ale väčšina je patogénna pre zvieratá aj pre človeka (Přecechtel, 1988).

Zapríčiňujú choroby, ako týfus, paratýfus, salmonelózy a typické bakteriálne otravy potravinami (Arpai, 1963). Mikroby rodu *Salmonella* patria medzi patogénne mikroorganizmy. U ľudí sa najčastejšie vyskytuje *Salmonella enterica*. Spôsobujú ochorenia ľahšieho alebo ťažšieho typu (Bystrický, 1999).

3.4.3 Charakteristika rodu *Escherichia coli*

Podľa Bednářa (1996), zástupcovia rodu *Escherichia* zodpovedajú všeobecnej charakteristike enterobaktérií a môžeme ich rozdeliť na základe biochemických vlastností na jednotlivé bakteriálne druhy. K najznámejšiemu druhu *Escherichia coli* boli priradené druhy *E. vulneris* a *E. hermani*, ktoré sa považujú za podmienene patogénne.

Eley (1994) rozdeľuje podmienene patogénne kmene *E. coli* do štyroch skupín podľa mechanizmu nimi vyvolaného ochorenia:

1. Enteroinvazívne *E. coli* (EIEC),
2. Enteropatogénne *E. coli* (EPEC),
3. Enterotoxinogénne *E. coli* (ETEC),
4. Enterohemoragické *E. coli* (EHEC).

E. coli je všeobecne termolabilná baktéria, čo platí napríklad aj o EHEC (Ahmed *et al.*, 1995). Druhy rodu *Escherichia* sú väčšinou pohyblivé, niekedy opúzdrené paličky. Pri raste sú málo náročné, dobre rastú na bežných kultivačných pôdach s laktózou a príslušným

indikátorom tvorby kyseliny. Sú aeróbne až fakultatívne anaeróbne. Rastú pri teplote 37 °C, ako aj pri nižších teplotách na bežných živných pôdach. Charakteristická je tvorba 2-3 mm veľkých, mierne vypuklých, lesklých kolónií (Přecechtel, 1988). V ľudskej populácii je najčastejší výskyt druhu *Escherichia coli*. Je dôležitou súčasťou črevnej bakteriálnej flóry človeka. Zahŕňa krátke pohyblivé aj nepohyblivé typické črevné paličky. Bunky sú v tvare paličiek vyskytujúcich sa jednotlivo alebo v pároch. Ich veľkosť kolíše 1 až 1,5 x 2,0 x 6,0 µm. Sú to gramnegatívne nesporulujúce, viac alebo menej pohyblivé paličky. Hodnoty pH pre rast *Escherichia coli* sú minimálne 4,3 pH, optimálne 6,0 – 8,0 pH a maximálne 9,5 pH (Arpai, Bartl, 1977). Je to fermentujúca saprofytická palička často sa vyskytujúca v klinickom materiáli i prostredí. Je komenzálom, až symbiotom svojich hostiteľov. Žije v hrubom čreve teplokrvných živočíchov. *Escherichia coli* skvasuje cukry za intenzívnej tvorby kyselín a plynu. Tvorí hlavne kyselinu mliečnu, pyrohroznovú, octovú a mravčiu. *Escherichia coli* je najpreskúmanejším mikrobiálnym druhom, slúži ako modelový organizmus pre biochemické, genetické a fyziologické štúdie (Hudecová, Šimkovič, 2009).

3.4.4 Charakteristika rodu *Staphylococcus*

Zástupcovia rodu *Staphylococcus* zahŕňajú nepohyblivé, grampozitívne, guľaté bunky. Vyskytujú sa po jednej, v dvojiciach, v tetradách a v nepravidelných zhlukoch, najmä pri raste v bujóne. Mnohé kmene tvoria žltý alebo oranžový pigment, najmä na pôdach s obsahom NaCl. Pre rast na syntetickej pôde si ako zdroj organického dusíka vyžadujú aminokyseliny a prídavok niektorých vitamínov. Rastú veľmi dobre v bujóne, kde tvoria hustý zákal, často s tenkým povlakom. Dobre rastú aj na mäsopeptonovom agare. Tvorí katalázu. Rastú aeróbne a fakultatívne anaeróbne. Niektoré druhy sú patogénne a tvoria toxíny (Arpai, 1963). Stafylokoky sú do istej miery rezistentné k nepriaznivým vplyvom vonkajšieho prostredia. Odolávajú zahriatie na 55 °C, vysychajú a odolávajú vyšším koncentráciám NaCl (Bednář *et al.*, 1996). V súčasnosti je do tohto rodu zaradovaných 40 bakteriálnych druhov a poddruhov, z ktorých celý rad má významnú úlohu v patogenéze ochorení človeka, iné sú príčinou ochorení zvierat. Podľa Jaya (2005), 18 druhov tohto rodu sa spája s prítomnosťou v potravinách. Druhy rodu *Staphylococcus* sa vyskytujú ako na koži a slizniciach človeka, tak aj zvierat a sú

významnou zložkou mikrobiálnych ekosystémov človeka a jeho prostredia (Sabo *et al.*, 1997). Zástupcovia rodu *Staphylococcus* majú sférický tvar, vyskytujú sa jednotlivito alebo v zhlukoch podobných hroznu, sú nepohyblivé. Dobre rastú na pôdach s obsahom 10 až 15% NaCl. Vyskytujú sa prevažne na pokožke ľudí a teplokrvných zvierat, kde môžu spôsobiť vážne ochorenia (Hudecová, Šimkovič, 2009).

Podľa Bednára (1996) z hľadiska patogenity pre človeka je účelné delenie stafylokokov podľa ich schopnosti produkovať enzým plazmakoagulázu na druhy koaguláza – pozitívne (*S. aureus*) a koaguláza – negatívne (*S. epidermidis* a ďalšie). *Staphylococcus aureus* – je patogén produkujúci endotoxíny, ktoré počas jeho delenia sú uvoľňované do potravín živočíšneho pôvodu a vyvoláva intoxikácie ľudí. K stafylokokovej intoxikácii dochádza obyčajne po skonsumovaní menej ako 1 µg toxínu v kontaminovanej potrave (Bystrický, 1999). *Staphylococcus aureus* tvorí koky veľkosti 0,7 až 1,2µm sú nepohyblivé neopúzdrené. V bujónovej kultúre nie sú vždy usporiadané do strapcov, niekedy tvoria aj retiazky. Mladé kultúry sú grampozitívne, staršie gramlabilné až gramnegatívne. Rastú na bežných pôdach, pre rast potrebujú krv a glukózu. Sérum rast spomaľuje. Hlavnou podmienkou je, aby pôdy obsahovali kozymázu, kyselinu nikotínovú a tiamín alebo aspoň jeho zložky – pyrimidín a tiazol. Vo veľmi malom množstve potrebuje oxid uhličitý, pre anaeróbny rast je potrebný uracil. Na agare rastie v kolóniach s priemerom 1 až 4 mm, ktoré sú bohato, zvyčajne zlatožlté alebo oranžovo pigmentované. Najmä na pôdach s vyšším obsahom NaCl a pri kultivácii pri teplote 22 °C sa tvoria veľmi výrazné pigmentované kolónie. Najbežnejšia disociačná fáza je S-fáza, zriedkavé sú R-fázy a M-fázy. Kolónie majú dosť často nepravidelné okraje. Želatínu lievikovite skvapalňuje, tvorí na nej žltkastú blanku a biely až oranžový sediment (Arpai, 1963). *Staphylococcus aureus* sa vyznačuje prítomnosťou adhezínov-proteínov schopných naviazať bakteriálnu bunku na medzibunkové proteíny, ako sú kolagén, fibronektín a iné a tým umožňuje kolonizáciu, inváziu a infekciu kože a slizníc. *Staphylococcus aureus*, vzhľadom k produkcii enzýmov a toxínov, je to veľmi invazívna baktéria. Schopnosť produkovať toxíny je príčinou stafylokokových enterotoxikóz vyvolaných nahromadením toxínu z namnožených stafylokokov v potravinách (majonézy, krémy, mäsové výrobky a pod.) s klinickými príznakmi kŕčov, zvracania hnačiek, s rýchlou dehydratáciou v priebehu 1 – 6 hod. po požití kontaminovanej potravy. Stafylokokové toxíny sú termostabilné a sú veľmi častou príčinou otráv z potravín (Sabo *et al.*, 1997).

Koaguláza negatívne druhy stafylokokov sú za normálnych okolností nepatogénne baktérie, ktoré sú súčasťou mikrobiálnych systémov kože a slizníc človeka a zvierat a ich prostredia. Schopnosť koaguláza negatívnych stafylokokov rásť, je významným faktorom prispievajúcim ku skutočnosti, že koaguláza negatívne stafylokoky sú významným nozokomiálnym patogénom. Vyznačujú sa mimoriadnou rezistenciou na antibiotiká (Sabo *et al.*, 1997). V patogenéze infekcií človeka zohrávajú významné miesto *Staphylococcus epidermidis* tvorí grampozitívne, nepohyblivé, guľaté bunky priemeru 0,5 μm až 0,6 μm . Vyskytuje sa jednotlivo, v dvojiciach a v nepravidelných zhlukoch. Tento druh rastie na želatínových pôdach v podobe bielych kolónií, na agare tvorí okrúhle, hladké, zväčša jasné priesvitné kolónie. Pre rast potrebuje ako zdroj dusíka AMK, ďalej vitamíny skupiny B. Rastie aj na pôdach s obsahom NaCl. Pomaly lievikovite skvapalňuje želatínu, lakmusové mlieko okysľuje. Rastie aeróbne až fakultatívne anaeróbne. Optimálna teplota rastu je 37 °C. Žije na slizniciach a pokožke ľudí a zvierat. Považuje sa za nepatogénny druh (Arpai, 1963).

3.4.5 Charakteristika rodu *Pseudomonas*

Podľa Horníka (1996) patrí rod *Pseudomonas* medzi aeróbne, gramnegatívne, pohyblivé, krátke a nesporulujúce paličky, ktoré sú podmiennečne patogénne. Druh *Pseudomonas aeruginosa* je homogénny druh s morfológickou, biochemickou a antigénnou charakteristikou, v prírode značne rozšírený. Je to drobná palička, dlhá asi 1,5 μm , nerovnomerne sa farbiaca zo zaoblenými koncami. Na jednom konci má 1-3 bičičky (Záhradnícky *et al.*, 1981). Vyskytuje sa v odpadových vodách, v čistej vode sa nemnoží. Kolonizuje sliznice u hostiteľov so zníženou obranyschopnosťou. Je často príčinou nemocničných nákaz. *Pseudomonas aeruginosa* nemá púzdro, je však niekedy obalený slizovou vrstvou. Produkuje látku antibiotického charakteru, ktorá ničí veľa iných mikrobov, predovšetkým patogénne mikroby, najmä koky. Táto látka sa označuje ako pyocyanáza.

Kultivačné a biochemické vlastnosti

Väčšinu kmeňov je možné identifikovať podľa rastu na základných pôdach, kde vytvárajú kovové lesklé kolónie. Prevažná väčšina kmeňov tvorí pigmenty, a to jednak

modrozelený pyocyanín (rozpuštný vo vode a chloroforme) a žltozelený fluoresceín, rozpuštný vo vode. Kultivačná teplota dosahuje optimálne rozmedzie 30 °C - 37 °C, rastie však aj pri izbovej teplote. Antigénne je *Pseudomonas aeruginosa* heterogénny.

Patogenita

Na patogenite zo strany mikróbov sa uplatňujú jednak faktory viazané na bakteriálnu bunku (extracelulárny polysacharid, stenový polysacharid) a jednak extracelulárne produkty (enzýmy, toxíny, pigment). Extracelulárny polysacharid sa tvorí v enormnom množstve pri mukoidných kmeňoch, obaluje celé mikrokolonie baktérií a chráni ich pred obranou hostiteľa. Pseudomonády dobre prežívajú vo vlhku, v nemocničnom prostredí napr. v umývadlách, klimatizačných zariadeniach alebo aj vo zvlhčovačoch vzduchu (Bednář, 1996). Pre jeho rezistenciu odoláva aj účinkom niektorých dekontaminačných činidiel, a preto sa z prostredia ťažko eliminuje (Görner, Valík, 2004). Z dezinfekčných prostriedkov sú účinné chlórové preparáty. Naopak orthosan je neúčinný (Bednář, 1996).

3.5 Mikrobiologické hodnotenie procesu výroby vitamínov v Zentive a.s. Hlohovec

Mikrobiologická kontrola v Zentive a.s. sa zameriava okrem kontroly vstupných surovín aj na kontrolu médií, (voda a plniace plyny), ktoré vstupujú do procesu výroby a na samotný výrobný proces. Vo výrobe sa z pohľadu mikrobiologickej čistoty identifikujú kritické miesta, ktoré by mohli spôsobiť kontamináciu produktu. Kritické miesta sú tie technologické úseky, postupy alebo operácie v procese výroby, v ktorých je najvyššie riziko porušenia zdravotnej nezávadnosti výrobku. Tieto kritické miesta sú pravidelne mikrobiologicky sledované. Výrobca identifikuje každé miesto v technologickom procese, ktoré by negatívne ovplyvňovalo zdravotnú neškodnosť a kvalitu a definuje technické a technologické parametre, ktoré je potrebné dodržiavať. Počas výrobného procesu sa v pravidelných intervaloch vykonáva kontrola pomocou kontaktných doštičiek. Jedná sa o živnú pôdu CASO + agar, ktorá je fixovaná na kontaktnú doštičku. Tieto sa následne inkubujú a o 24 hodín vyhodnotia. Späťne sa dá identifikovať, či celý proces výroby zodpovedal potrebnému hygienickému štandardu (nariadenie európskeho

parlamentu č. 852/2004), ktorý je v súlade s HACCP (1997). Takýto monitoring predchádza vzniku hygienických rizík (Potravinový kódex, 1997). Okrem vstupných surovín sa pri výrobe a príprave nesterilných liečiv sleduje mikrobiálna čistota:

- čistenej a pitnej vody,
- výrobných priestorov,
- výrobných zariadení,
- ochranných a pracovných pomôcok,
- vzduchu.

Jedným z mikrobiologicky hodnotených médií je aj čistená voda.

Čistená voda (AQUA PURIFICATA) je podľa ustanovenia Metodického pokynu č. 106/2009, voda určená na prípravu liekov. Pripravuje sa destiláciou, reverznou osmózou alebo inou vhodnou metódou z pitnej vody. Čistená voda sa uchováva za podmienok, ktoré zabezpečujú požadovanú mikrobiologickú kvalitu. Pri mikrobiologickej kontrole čistenej vody sa vykonáva dôkaz špecifických mikroorganizmov uvedených v tabuľke č. 6.

Tabuľka č. 6: Limity pre mikrobiologickú kvalitu čistenej vody

Špecifické mikroorganizmy	Doporučený limit
Celkový počet nepatogénnych mikroorganizmov	100/CFU/1ml
<i>Enterobacteriaceae</i>	Negatívne/1ml
<i>Pseudomonaceae</i>	Negatívne/1ml

Pitná voda sa využíva ako vstupná surovina na výrobu čistenej vody, na oplach zariadení od hrubých nečistôt a na sanitáciu výrobných priestorov. Pri kontrole pitnej vody sa musia dodržiavať limity ukazovateľov pitnej vody, ktoré udáva nariadenie vlády Slovenskej republiky č. 496/2010 Z.z. a je v súlade s požiadavkami STN 75 7151 (Tab. č.7).

Tabuľka č.7: Mikrobiologické a biologické ukazovatele kvality pitnej vody.

Ukazovateľ	Symbol ukazovateľa	Limit	Jednotka KTJ	Druh limitu	Poznámky
<i>Escherichia coli</i>	EC	0	v 100 ml	NMH	HZ
Koliformné baktérie	KB	0	v 100 ml	MH	HZ
<i>Enterokoky</i>	EK	0	v 100 ml	NMH	HZ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA	0	v 250 ml	NMH	BPV
Kultivovateľné mikroorganizmy pri 22 °C	KM 22	200	v 1 ml	MH	HZ
Kultivovateľné mikroorganizmy pri 37 °C	KM 22	50	V 1 ml	MH	HZ
Bezfarebné bičičkovce	BB	10	jedinice/ml	MH	HZ pitnou vodou nezabezpečovanou dezinfekciou
Živé organizmy	ŽO	0	jedinice/ml	MH	HZ
Vláknité baktérie	VB	0	jedinice/ml	IH	HZ
Mikromycéty stanoviteľné mikroskopicky	MM	0	jedinice/ml	IH	HZ
Mŕtve mikroorganizmy	MO	0	jedinice/ml	MH	HZ
Železité a mangánové baktérie	ŽMB	10	Pokryvnosť poľa v %	MH	HZ
Abiosestón	AB	10	Pokryvnosť poľa v %	MH	HZ
<i>Clostridium perfringens</i>	CP	0	KTJ v 100 ml	IH	Vzťahuje sa na pitnú vodu upravovanú z povrchových alebo podzemných vôd

- „MH“ je medzná hodnota,
- „NMH“ je najvyššia medzná hodnota,
- „IH“ je indikátorová hodnota,
- „HZ“ je hromadné zásobovanie,
- „BPV“ je balená pitná voda.

Jedným z kritérií správnej výrobných praxe (Z. z. č. 274/1998, požiadavky na SVP) pri výrobe vitamínov je aj mikrobiálna čistota výrobných priestorov, kde sa výroba vitamínov uskutočňuje. Okrem iných definovaných parametrov uvedené priestory majú definované limity pre počet mikroorganizmov. Aby sme tieto limity dokázali udržať v požadovaných hodnotách, je dôležitá mikrobiologická kontrola výrobných priestorov. Ide predovšetkým o stanovenie mikrobiologickej čistoty:

- vzduchu – limit definovaný v SOP ≤ 200 mikroorganizmov/m³,
- výrobných priestorov a zariadení – limit definovaný v SOP ≤ 50 mikroorganizmov/25 cm²,
- pracovné pomôcky – limit definovaný v SOP ≤ 100 mikroorganizmov/25 cm².

3.6 Metódy stanovenia sledovaných mikroorganizmov aplikované v Zentive a.s. Hlohovec

Skúšanie a hodnotenie komponentov na farmaceutické použitie z hľadiska počtu mikroorganizmov sa vykonáva podľa požiadaviek uvedených v aktuálnom vydaní Slovenského liekopisu 2.6.12 Mikrobiologické hodnotenie nesterilných produktov: Skúšky na stanovenie mikróbov. Skúšky sú zamerané predovšetkým na zistenie, či produkt vyhovuje mikrobiologickým požiadavkám predpísaným v príslušnom liekopisnom článku. Výber metódy stanovenia sa zvolí na základe charakteru skúšanej látky a výsledku predchádzajúcej validácie.

Skúšobné metódy:

- Membránová filtrácia.
- Platňové metódy (metóda zalievania, metóda povrchového rozotierania).
- Metóda najpravdepodobnejšieho počtu.

Metóda zalievania

Metóda zalievania sa používa pri kontrole produktov obsahujúcich jemný granulát. Pri metóde zalievania sa skúšanie každej vzorky sa robí v dvoch Petriho miskách, kde sa pripravená vzorka zaleje CASO pôdou (agar s kazeínovým a sójovým hydrolyzátom). Teplota pôdy nesmie prevýšiť 45 °C. Naočkované pôdy sa inkubujú pri teplote 30 °C až 35 °C. Pri hodnotení sa určí počet KTJ (kolónie tvoriace jednotky) na gram alebo mililiter produktu.

Metóda rozotierania

Metóda rozotierania sa použije v prípade, že produkt je úplne rozpustný. Pri metóde rozotierania sa skúšanie každej vzorky vykonáva na dvoch Petriho miskách, kde sa očkovaná látka homogénne rozotrie v CASO pôde. Po inkubácii pri 30 °C až 35 °C sa odčíta počet kolónií na každej Petriho miske a vypočíta sa počet KTJ na gram alebo mililiter produktu.

Metóda membránovej filtrácie

Metóda membránovej filtrácie sa použije pre produkty:

- ktoré sú úplne rozpustné v riediacom roztoku,
- pri ktorých sa na skúšanie použije viac roztoku príslušného riedenia ako 1 mililiter,
- vykazujúce inhibíciu. Pri uvedenej metóde je vhodné používať riediaci roztok na premývanie filtra. Množstvo premývacieho roztoku je udané vo validačnej správe. Priamo z filtra sa hodnotí množstvo KTJ na gram alebo mililiter produktu.

Metóda najpravdepodobnejšieho počtu

Najpravdepodobnejší počet baktérií sa určuje vtedy, keď nie je vhodná iná metóda. Výber metódy sa zakladá na faktoroch, ako je napr. povaha produktu a očakávaný počet mikroorganizmov (Chalabala *et al.*, 2000). Táto metóda sa využíva v prípade, že komponent zabráni zviditeľneniu kolónií na pevných pôdach a ak nie je dostupná iná metóda.

Každé stanovovanie počtu mikroorganizmov, kvasiniek a plesní je doplnené skúškou na sterilitu pôdy. Počas uvedeného testovania sa robí aj negatívna kontrola. Jedná sa o kontrolu prostredia spádovou metódou počas času očkovania.

Na základe výsledkov metód stanovenia mikroorganizmov je možné správne vyhodnotiť a posúdiť kvalitu vstupných surovín, ktoré sa následne môžu použiť vo výrobnom procese.

4 Záver

Na základe preštudovaných literárnych domácich a zahraničných zdrojov je možné konštatovať, že pri mikrobiologickom hodnotení vitamínov a ich komponentov sme dospeli k nasledovným záverom:

1. Vitamíny a výživové doplnky sú látky, ktoré predstavujú zložku potravy, ktorá nie je stavebnou látkou ani zdrojom energie, ale je nevyhnutná pre život, zdravie a rast. V našom tele majú mnoho nezastupiteľných funkcií. Organizmus si ich, až na malé výnimky, nedokáže vytvoriť sám a musia sa prijímať prostredníctvom potravy.
2. Mikrobiologická kvalita komponentov a finálnych výrobkov sa hodnotí podľa platných noriem Slovenského liekopisu a stanovenými limitmi v Potravinovom kódexe.
3. Zdroj mikroorganizmov *Pseudomonas aeruginosa* v produkte pochádza s kontaminovanej vody. Vyskytuje sa napríklad u surovín s vysokým obsahom vody.
4. *Staphylococcus aureus* je kontaminant ľudí a personálu a do surovín sa dostáva počas spracovania.
5. Na základe skúseností, ktoré boli uskutočnené v laboratórnych zariadeniach Zentiva a. s. Hlohovec, najčastejšie dochádza ku kontaminácii mikrobiologickými hubami v prípade surovín, ktoré sú dodávané z tretích krajín.
6. Vysoký počet CPM bol indikovaný, ak surovina nie je dostatočne vysušená alebo ak sa jedná o surovinu, ktorá obsahuje prírodné farbivá, alebo s obsahom škrobu.
7. Výskyt vysokého počtu mikroorganizmov z čeľade *Enterobacteriaceae* je spôsobený najmä, ak je surovina rastlinného pôvodu pestovaná voľne na poli a technológia spracovania nevyžaduje vysokú teplotu alebo ak sa jedná o surovinu živočíšneho pôvodu, kde technológia spracovania tiež nevyžaduje vysoké teploty.
8. Mikroorganizmy sú hlavnými mikrobiologickými ukazovateľmi akosti vstupných surovín a ich využiteľnosti. Problematická situácia môže nastať, ak

v okamihu platnosti Ph. Eur. (resp. Slovenského liekopisu) nebude stanovenie hodnotených mikroorganizmov normalizované. Preto je nutné venovať pozornosť hodnoteniu mikroorganizmov z dôvodu odhalenia zmien vo vstupných surovinách.

5 Zoznam použitej literatúry

1. AGERBO, P. 1997. *Vitamíny a minerály pre zdravý život*. Praha : FerrosanA/s, 1997. 147 s. ISBN 80-7169-489-4.
2. AHMED, N. M., - CONNER, D. E., - HUFFMAN, D. L. 1995. Heat-resistance of *Escherichia coli* 0157:H7 in meat and poultry as affected by product composition. *Journal of Food Science*, 60, 606-610.
3. ARPAI, J. – BARTL, V. 1977. *Potravinárska mikrobiológia..* Bratislava : vydavateľstvo Alfa, 1977. 280 s.
4. ARPAI, J. 1963. *Kľúč na rozlišovanie baktérií*. Bratislava : Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry, 1963. 357 s.
5. BEDNÁŘ, M. - FRAŇKOVÁ, V. - SCHINDLER, J. - SOUČEK, A. - VÁVRA, J. 1996. *Lékařská mikrobiologie*. 2. vyd. Praha : Marvil, 1996. 558 s.
6. BERČÍK, I. 2009. *Skúšanie vôd pre farmaceutické účely*. Metodický Pokyn č. 106/2009, 3.vyd.
7. BETINA, V. 1959. *Tajomný svet mikróbov*. Bratislava : Osveta, 1959. 425 s.
8. BYSTRICKÝ, P. 1999. Stanovenie toxín produkujúcich *Staphylococcus aureus*. In *Hygiena alimentorum XX*. Košice : Univerzita veterinárneho lekárstva, 1999, s.93. ISBN 80-7148-036-3
9. ELEY, A. 1994. *Microbial food poisoning* 1. ed. London, Chapman and Hall, 1992, 191 s.
10. FRANČÁKOVÁ, H. - ČUBOŇ, J.- MAREČEK, J - „BOBKO, M. - 2010. *Hodnotenie poľnohospodárskych produktov*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita , 2010. 161 s. ISBN 978-80-552-0360-7.
11. GEORGE, M. - GARRITY, Sc.D. 2005. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Michigan State University : Springer, 2005. 1391 s. ISBN 0-387-24145-0.
12. GOLIAN, J. – ŠIŠKA, B. 2008. Aktuálne problémy hygieny a bezpečnosti potravín. In *Bezpečnosť a kontrola potravín*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2008, s. 5. ISBN 978-80-552-0027-9.
13. GÖRNER, F. – VALÍK, Ľ. 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. Vyd. Bratislava : Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.

14. GRIVET, J. - DELORT, A. 2009. *Biofilms* [on line]. France: Elsevier, 2009 [cit. 2009-02-12]. 53s. Dostupné na www.elsevier.com/locate/pnmrs. ISSN 0079-6565.
15. GRONES, J. 2001. Biológia ekológia chémia. In *Aktuálne problémy vedy*, roč.6, 2001, č. 5, s. 8-9.
16. HORNÍK, A. 1996. *Špeciálna mikrobiológia*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 1996. 67 s. ISBN 80-7137-301-X.
17. HUDECOVÁ, D .- ŠIMKOVIČ, M. 2009. *Mikrobiológia*. 1. Vyd. Bratislava: STU, 293 s. ISBN 978-80-227-3194-2.
18. CHALABALA, M. – BÓZNER, A. – ČUPKOVÁ, V. – ĎURINDA, J. – HELIA, O. – KOPECKÝ, F. – SUCHÝ, V. – VITKOVÁ, M. 1991. *Encyklopédia farmácie*. Martin : Osveta, 1991. 439 s. ISBN 80-217-0260-5.
19. CHALABALA, M. - MARTINCOVÁ, R . -BENKOVÁ, M. 2000. *Slovenský liekopis*. D-H. Bratislava : Herba spol. s r. o., 2000. 1401-2139 s. ISBN 80-967994-3-6.
20. JAY, J. M. - LOESSNER, M. J. - GOLDEN, D. A. 2005. *Modern Food Microbiology* (Seventh Edition. vyd.). New York: Springer, 709s.
21. JORDAN, A. - CUNNINGHAM, G .- MARLES, J. 2009. *Toxicologi and Applied Pharmacology*. Ontario : Bureau of Clinical Trials and Health Sciences, Natural Health Products Directorate, 2009. 216 s.
22. KERESTEŠ, J. 2009. *Biotechnológia, výživa a zdravie*. Považská Bystrica : vydavateľstvo Eminent, 2009. 528s.
23. KYSELA, J. 1990. *Chémie pro všechny*. Praha : Nakladatelsví technické literatury, 1990. 656 s.
24. LUDIFLASH, Excipients are on target. In *ICIS Chemical Business*, 2008, no. 4, 29-32. ISSN 1937-5786.
25. MAGULA, D. 2001. *Výživa a zdravie*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 139/2001. 157 s. ISBN 80-7137-948-4.
26. MARLEY, E. - FONTANNAZ, P. - ILINC, T - HEUDI, O. 2006. *Journal of Chromatography*, Volume 1101, 6. January 2006, Pages 63-68.
27. MAUGHAN, R. J. - KING, D. S.- LEA, T. 2004. Dietary supplements. In *Journal of Sports Science* 22, pages 95-113.

28. MICHALÍK, I. 2008. *Biochémiá*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2008. 225 s. ISBN 978-80-552-0020-0.
29. MYTTERMAYR, R. - TRISCONI, M. - HEUDI, O., 2004. 27. International Symposium on cohabitation High-Performance Liquid-Phase and related techniques, In *Journal of chromatografiou*, published 02.04.2004, pages 1-6.
30. MUCHOVÁ, Z. – FRANČÁKOVÁ, H. – BOJŇANSKÁ, T. – MAREČEK, J. 2011. *Hodnotenie surovín a potravín rastlinného pôvodu*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2011. 220 s. ISBN 978-80-552-0564-9.
31. MUNDISOVÁ, H.- MINDELL, E. 2006. *Nová vitamínová biblia*. 2. vyd. Ikar, CZ, 2006. 576 s. ISBN 80-249-0744-5.
32. NARIADENIE č. 852/2004 EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY z 29. Apríla 2004 o hygiene potravín. Úradný vestník európskej únie, 2004, 32 s.
33. NORMAN, K. - KIRCHNER, H. - FREUDENREICH, M. - OCKENGA, J. - LOCHS, H. - PIRLICH, M. 2007. Quality of life. In *Three mont intervention with protein and energy rich supplements improve muscle function and quality of life in malnourished patients with non-neoplastic gastrointestinal disease-Arandomized controlled trial*, 2007, Berlín, 56 s.
34. OČENÁŠ, F. 2003. [cit. 2003-05-03]. <http://www.zlatnik.sk./article.php?id=13>
35. POTRAVINOVÝ KÓDEX Slovenskej republiky, 1997. Bratislava : Ministerstvo zdravotníctva SR a Ministerstvo pôdohospodárstva SR zo 16. 12. 1997 č.557/1998-100. ISBN 80-215-0508-7.
36. PŘECECHTEL, F. 1988. *Lékařská mikrobiologie*. Brno : Univerzita J. F. Purkyně, 1988. 327 s.
37. SABO, A. 1997. *Vybrané kapitoly z mikrobiológie*. Slovak Academic Press, 1997. 196 s. ISBN 80- 85665-95-6.
38. STN 75 7151: 2002. *Dokumentácia : Požiadavky na kvalitu vody dopravovanej potrubím : 4.1 Oceľové a liatinové potrubia*.
39. ŠIDLÍKOVÁ, I. 2010. Metodický pokyn, č. 126/2009. *Mikrobiologické hodnotenie nesterilných liekov a látok na farmaceutické použitie*.
40. TURZOVÁ, M. *Mikrobiologická kontrola výrobných priestorov*. In *Qalt*, roč. 16, 2007, č. 163, s. 8-9.

41. UNGEROVÁ, U. 1999. *Vitamíny - účinné látky podporujúce zdravie*. Banská Bystrica : Media klub, 1999. 87 s. ISBN 80-88772-96-6.
42. URSELLOVÁ, A. 2004. *Vitamíny a minerálne látky*. Bratislava : Noxi s.r.o. 2004. 128 s. ISBN 80-89179-01-0.
43. VALÍK, Ľ. – PRACHAR, V. 2009. *Pôvodcovia z ochorení z požívatin a mineralizácia ich rizika*. Bratislava : STU, 2009. 167 s. ISBN 978-80-227-3200-0.
44. VOKURKA, M. – HUGO, J. 2000. *Praktický slovník medicíny*. 6.vyd. Praha : Maxdorf, 2000. 490 s. ISBN 80-85912-38-4.
45. Zákon č. 274/1998 Z. z. o požiadavkách na správnu výrobnú prax a správnu veľkodistribučnú prax, str. 1978, prvá časť, SVP, §4.
46. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1997. *HACCP Intoducing the Hazard Analysis and Critical Control Point System*, United States of America.
47. ZÁHRADNÍCKY, J - CTIRAD, J. - SEDLÁK, J. - ŠTEFNOVIČ, J. - KUBELKA, V. - ČATÁR, G. - MANYCH, J. - KMETY, E. - ZÁVADOVÁ, M. 1981. *Mikrobiologické vyšetrovacie metódy*. Martin : Osveta. 1981. 704 s.
48. Zákon č. 195/2007 Z.z, o potravinách, čiastka 88. Účinný od 1.5. 2007.
49. Zákon č.496/2010, Z.z. Požiadavky na vodu určenú na ľudskú spotrebu a kontrolu kvality vody určenej na ľudskú spotrebu.
50. ZITTLAU, J. 2006. *Jak se léčit vhodnou stravou*. Brno : Computer Press, a. s. 2006. 224 s. ISBN 80-251-0982-8.