

Verifikácia bioluminiscenčnej metódy v procese výroby mliečnych produktov

Katarína Veszelits Laktičová¹

Jana Zahumenská²

Mária Vargová³

František Zigo⁴

Šimon Halás⁵

¹ Katedra verejného veterinárského lekárstva a welfare zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; katarina.veszelitslakticova@uvlf.sk

² Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; jana.zahumenska@uvlf.sk

³ Katedra verejného veterinárského lekárstva a welfare zvierat; Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; maria.vargova@uvlf.sk

⁴ Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; frantisek.zigo@uvlf.sk, simon.halas@student.uvlf.sk

Grant: APVV-22-0457

Název grantu: Non-antibiotic approaches to control mastitis of cows with an increase in the hygiene of dairy farms conditions

Oborové zamčrení: FM - Hygiena

© GRANT Journal, MAGNANIMITAS Assn.

Abstrakt Klasické mikrobiologické metódy v modernej mliekarenskej prevádzke z hľadiska rýchlosti poskytnutia výsledkov nespĺňajú požiadavky praxe, keď sa vyžaduje, čo najrýchlejšie hodnotenie účinnosti sanitácie, hygieny výroby alebo kvality hotového výrobku. Pre výrobu je optimálne spojenie permanentného monitoringu hygienickej úrovne s poskytnutím výsledkov laboratórneho vyšetrenia ešte v čase, kedy sa dajú v prípade nepriaznivých zistení vykonať validované nápravné opatrenia tak, aby sa predišlo znehodnoteniu výrobku a kontaminácii výrobných priestorov. Práve táto skutočnosť potvrdzuje opodstatnenosť tejto metodiky v systémoch riadenia kvality. V súčasnosti sa do sanitčných protokolov implementujú rýchle metódy na báze bioluminiscencie ATP (adenozíntrifosfát), charakteristické vysokou senzitivitou, analytickou rýchlosťou a nízkou personálnou náročnosťou. Cieľom našej práce bolo hodnotenie sanitácie a hygieny prostredia pomocou bioluminiscenčnej metódy v monitorovanej potravinárskej prevádzke orientovanej na výrobu mliečnych produktov (tvarohu a jogurtov). Na základe získaných výsledkov možno konštatovať, že dezinfekčný proces v monitorovanej mliekarenskej prevádzke bol celkovo účinný. Po dezinfekcii došlo v oboch sledovaných častiach výroby k štatisticky významnému zníženiu hodnôt ATP ($p < 0,001$), čo potvrdzuje vysokú účinnosť sanitácie pri odstraňovaní organických zvyškov z povrchov technologických zariadení.

Kľúčová slová: hygiena, mikroorganizmy, biofilm, ATP, dezinfekcia, mliekareň

1. ÚVOD

Sanitačný režim je jednou z najdôležitejších súčastí kontrolného systému HACCP (Hazard analysis and critical control points).

Čistenie a dezinfekcia ako súčasť každodennej výrobnéj praxe sú nepostrádateľné pre správne fungovanie výroby potravín v súlade s legislatívnymi požiadavkami. Kontrola hygieny a kvality čistenia a dezinfekcie je rozhodujúcim faktorom pri splnení základných požiadaviek systému HACCP v potravinárskych prevádzkach (Vojtaššák, 2003).

Účinnosť sanitačných postupov sa tradične hodnotí pomocou rôznych metód (Griffith, a kol., 2000). Výber najvhodnejšej metódy mikrobiologickej analýzy povrchov je podmienený typom vyrábaných potravín a infraštruktúrou laboratória. Je dôležité použiť najlepšiu metódu na izoláciu a detekciu mikroorganizmov v biofilmoch a kvapalných médiách (Salo et al 2006).

Výšetrenia klasickými mikrobiologickými metódami z hľadiska rýchlosti poskytnutia výsledkov nespĺňajú požiadavky praxe, ktorá požaduje, čo najrýchlejšie vyhodnotenie účinnosti sanitácie, stavu hygieny výroby alebo kvality hotového výrobku (Vojtaššák, 2003). Mikrobiologické metódy môžu trvať až 48 hodín, nevýhodou je, že v čase zistenia chyby môže byť vyrobené a predané veľké množstvo neuspokojivých alebo nebezpečných potravín (Moore a Griffith, 2002).

Pre výrobu je optimálne spojenie permanentného monitoringu hygienickej úrovne s poskytnutím výsledkov laboratórneho vyšetrenia ešte v čase, kedy sa dá v prípade nepriaznivých zistení vykonať náprava tak, aby sa predišlo znehodnoteniu výrobku a kontaminácii výrobných priestorov, čo by mohlo zabrániť rozsiahlejším ekonomickým škodám a predovšetkým ohrozeniu zdravia konzumentov, prípadne vzniku alimentárnych ochorení (Lopašovský, 2006).

V súčasnosti sa čoraz v širšom meradle začínajú používať metódy na báze bioluminiscencie (Suková, 2002). Bioluminiscenčné metódy

sú nové moderné metódy, ktorých prednosťami sú predovšetkým rýchlosť, jednoduchosť, časová i personálna nenáročnosť, ľahká manipulácia. Bioluminiscenčná poskytuje odhady celkovej kontaminácie povrchu v reálnom čase. Táto technika sa ukázala byť obzvlášť užitočná vo veľkých výrobných závodoch, kde pravidelné a časté monitorovanie môže poskytnúť manažmentu údaje o trendoch v úrovni hygieny čo umožňuje rýchle výsledky o množstve organických zvyškov a mikrobiálnej kontaminácii na povrchoch prevádzok (Chen, 2000). Hoci táto metóda neidentifikuje množstvo mikroorganizmov alebo druhov kontaminantov, môže sa použiť ako prostriedok na monitorovanie hygieny a overovanie čistoty (Calvert a kol., 2000).

Cieľom našej práce bolo hodnotenie hygieny výrobného prostredia mliečnych produktov pomocou bioluminiscenčnej metódy a analýza rizík spojených s bezpečnou výrobou potravín.

2. MATERIÁL A METODIKA

2.1 Kontrola účinnosti sanitácie pomocou ATP metódy

Práca sa zameriava na kontrolu účinnosti sanitácie v monitorovanej mliekarenskej prevádzke pomocou bioluminiscenčnej metódy. Vzorky sterov sme odoberali počas výroby a po dezinfekcii z vybraných povrchov technológií v časti výroby tvarohu (tvarohárska vaňa, separátor tvarohu, balička) a jogurtov (plnička džemu, plnička jogurtu, balička).

Na meranie bioluminiscencie sme použili systém HY – LITE od firmy Biotrace, pozostávajúci z prenosného zariadenia luminometra a slúži na vyhodnotenie množstva emitovaného svetla vzniknutého v reagenčnej komore odberového pera dodávaného výrobcom. Tieto perá dodávané výrobcom boli použité na stieranie vyšetrovanej plochy 100 cm². Po reakcii ATP obsiahnutého vo vzorke s enzýmom luciferáza v reagenčnej komore pera bola intenzita emitovaného svetla stanovená luminometrom v relatívnych jednotkách RLU (Relative Light Unit).

Na každom odberovom mieste bolo vykonaných päť opakovaných ATP meraní, pričom výsledná hodnota predstavuje aritmetický priemer týchto meraní. Odbery boli realizované na 25 odberových miestach v časti výroby tvarohu a 25 odberových miestach v časti výroby jogurtov, spolu teda na 50 odberových miestach, pričom vzorky boli odoberané počas výroby aj po aplikácii dezinfekčných prostriedkov.

Na hodnotenie výsledkov boli použité odporúčané limity pre mliekarensku prevádzku: vyhovujúce hodnoty < 150 RLU/100 cm², hraničné hodnoty 151–299 RLU/100 cm² a nevyhovujúce hodnoty > 300 RLU/100 cm². Výsledky boli štatisticky spracované pomocou opisnej štatistiky a vyjadrené ako aritmetický priemer ± smerodajná odchýlka (SD), medián, minimálna a maximálna hodnota. Na porovnanie hodnôt ATP nameraných počas výroby a po dezinfekcii bol použitý párový Studentov t-test. Štatistická významnosť rozdielov bola stanovená pri hladine významnosti $p < 0,05$.

2.2 Použitie čistiace a dezinfekčné prostriedky

Monitorovaná mliekareň má integrovaný sanitálny program v rámci systému HACCP, pričom čistenie prebieha bezprostredne po ukončení výroby. Kľúčovým prvkom sanitácie je striedanie alkalických a kyslých čistiacich prostriedkov prostredníctvom uzavretého CIP systému. Súčasný nastavený program začína predoplachom teplou vodou (50 °C). Nasleduje vŕhanie 1,5 % roztoku hydroxidu sodného (NaOH), toto alkalické čistenie pre

maximálny účinok vyžaduje vysokú teplotu (70–80 °C) a turbulentné prúdenie na mechanické odlepenie mliečného tuku. Po mechanickom umytí sa všetky rozoberateľné časti ponoria do 0,2 % roztoku Pedoxu na dobu 15 – 30 minút. Tento dezinfekčný režim sa pravidelne strieda s aplikáciou 10 % chlórnanu sodného, čím sa predchádza vzniku mikrobiálnej rezistencie.

V prvej fáze boli aplikované alkalické (hydroxid sodný) a kyslé detergenty (kyselina dusičná). Hydroxid sodný je práškový koncentrát, ktorý obsahuje 98 % účinnej látky NaOH, práškové polyfosfáty a iné stabilizačné látky. Používa sa ako pracovný roztok v koncentrácii 1 – 1,5 % s časovou expozíciou 15 minút na dezinfekciu potrubia, nádrží a strojového zariadenia s cieľom eliminovať tukové a bielkovinové nánosy mliečného kameňa z povrchu nerezovej ocele. Pôsobí na vegetatívne baktérie, kvasinky, plesne a vírusy, a na spóry v kombinácii s vysokou teplotou. Svetovým výrobcom a dodávateľom pre mliekareň v SR je spoločnosť Ecolab, s.r.o.

Sanitácia zariadení prebiehala v dvoch fázach:

V prvej fáze sa využíva alkalické a kyslé čistenia. Ako alkalický detergent sa aplikuje práškový koncentrát hydroxidu sodného od spoločnosti Ecolab, s.r.o., ktorý obsahuje 98 % účinnej látky NaOH, práškové polyfosfáty a špeciálne stabilizátory. V CIP systéme sa dávkuje pri pracovnej koncentrácii 1,0 až 1,5 % pri dĺžke cyklu 15 minút. Tento krok slúži na úplné odstránenie tukov a bielkovín z nerezových potrubí a nádrží. Minerálne usadeniny a mliečny kameň sa v nasledujúcom kroku odstraňujú kyselinou dusičnou. Roztok NaOH pôsobí deštruktívne na vegetatívne bunky baktérií, kvasinky, plesne a vírusy. Na elimináciu vysoko odolných bakteriálnych spór je nutné roztok lúhu kombinovať s vysokou teplotou (nad 75 °C). Kyslým detergentom je kyselina dusičná, do mliekarní sa dodáva ako 53 % až 65 % roztok. Pracovný roztok v CIP staniaciach sa automaticky riedi vodou na koncentráciu 0,5 % až 1,5 %. Teplota lúhu pre pasteurizátory sa zvyčajne zahrieva na 50 až 70 °C. Vyrába ho firma Ecolab, s.r.o. Používa sa na elimináciu minerálnych nánosov mliečného kameňa z povrchu nerezovej ocele a špecifickú vnútornú dezinfekciu technológií, z dôvodu baktericídneho pôsobenia.

V druhej fáze bola dezinfekcia prevedená oxidačnými dezinfekčnými prostriedkami Pedox a Chlórnan sodný. Pedox PAA/30 je viacložkový prípravok na báze kyseliny peroxyoctovej a peroxidu vodíka. Má baktericídne, fungicídne, sporicídne a vírusinaktivačné účinky. Používa sa dezinfekcia povrchov, priestorov a predmetov, ktoré sú rizikové z hľadiska množenia sa mikroorganizmov. Je určený na v rámci hygienického režimu na udržiavanie hygieny priestorov mliekarní. Výrobcom je Polychem s.r.o., Prievidza, SR. Chlórnan sodný je vysoko koncentrovaný tekutý dezinfekčný prostriedok, ktorý obsahuje 14 % aktívneho chlóru. Pôsobí na baktérie, vírusy, plesne, kvasinky a odbúrava organické nečistoty. Výrobcom je Centralchem s.r.o., Banská Bystrica, SR.

3. VÝSLEDKY

V tabuľke 1 sú uvedené výsledky meraní ATP na povrchoch technologických zariadení v časti výroby tvarohu pred a po dezinfekcii. Priemerná hodnota ATP počas výroby dosiahla 153,88 ± 102,94 RLU/100 cm², pričom hodnoty sa pohybovali od 21 do 351 RLU/100 cm². Po vykonaní dezinfekcie sa priemerná hodnota ATP významne znížila na 6,56 ± 5,58 RLU/100 cm², pričom minimálna hodnota bola 0 RLU/100 cm² a maximálna 17 RLU/100 cm². Párový t-test preukázal štatisticky vysoko významný rozdiel medzi

hodnotami nameranými počas výroby a po dezinfekcii ($p < 0,001$), čo potvrdzuje vysokú účinnosť vykonanej dezinfekcie.

Tabuľka 1. Štatistické vyhodnotenie ATP sterov na testovaných povrchoch technológií pri výrobe tvarohu

Parameter	Počas výroby	Po dezinfekcii	p-hodnota
Priemer $\pm$ SD (RLU/100 cm ²)	153,9 $\pm$ 102,9 ^a	6,56 $\pm$ 5,58 ^b	< 0,001
Medián	144	5	–
Minimum	21	0	–
Maximum	351	17	–
Párový t-test	-	t(24) = 7,30	< 0,001

Poznámka: SD – smerodajná odchýlka; t(24) – Studentov párový t-test (24 stupňov voľnosti);

$p < 0,05$ – štatisticky významný rozdiel. Hodnoty označené rôznymi písmenami (a, b) sa štatisticky významne líšia ($p < 0,05$).

Tabuľka 2 prezentuje výsledky meraní ATP na povrchoch technologických zariadení vo výrobe jogurtov pred a po dezinfekcii. Priemerná hodnota ATP počas výroby bola 29,88 $\pm$ 11,34 RLU/100 cm², pričom namerané hodnoty sa pohybovali v rozmedzí od 12 do 52 RLU/100 cm². Po dezinfekcii sa priemerná hodnota znížila na 10,64 $\pm$ 21,53 RLU/100 cm², pričom minimálna hodnota bola 0 RLU/100 cm² a maximálna 110 RLU/100 cm². Vyššia smerodajná odchýlka po dezinfekcii bola spôsobená jednou odľahlou hodnotou (110 RLU/100 cm²), ktorá môže súvisieť s nedostatočnou dezinfekciou alebo sekundárnou kontamináciou sledovaného povrchu. Napriek tejto odľahlej hodnote párový t-test preukázal štatisticky vysoko významné zníženie ATP po dezinfekcii (t(24) = 4,53; $p < 0,001$), čo potvrdzuje celkovú účinnosť dezinfekčného procesu.

Tabuľka 2. Štatistické vyhodnotenie ATP sterov na testovaných povrchoch technológií pri výrobe jogurtov

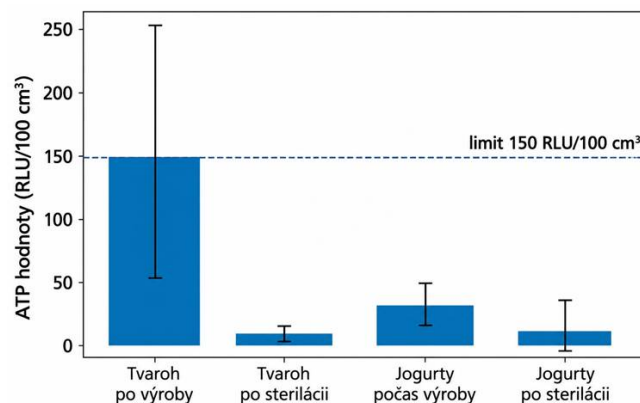
Parameter	Počas výroby	Po dezinfekcii	p-hodnota
Priemer $\pm$ SD (RLU/100 cm ²)	29,9 $\pm$ 11,3 ^a	10,64 $\pm$ 21,53 ^b	< 0,001
Medián	27	5	–
Minimum	12	0	–
Maximum	52	110	–
Párový t-test	-	t(24) = 4,53	< 0,001

Poznámka: SD – smerodajná odchýlka; t(24) – Studentov párový t-test (24 stupňov voľnosti);

$p < 0,05$ – štatisticky významný rozdiel. Hodnoty označené rôznymi písmenami (a, b) sa štatisticky významne líšia ($p < 0,05$).

Graf č. 1 znázorňuje vizuálne porovnanie priemerných hodnôt ATP na sledovaných technologických zariadeniach počas výroby a po dezinfekcii. Z grafu je zrejмый výrazný pokles hodnôt ATP po aplikácii dezinfekčných prostriedkov v oboch sledovaných výrobných úsekoch. Súčasne je viditeľná väčšia variabilita hodnôt počas výroby tvarohu v porovnaní s výrobou jogurtov, čo dokladajú vyššie hodnoty smerodajnej odchýlky. Po dezinfekcii boli priemerné hodnoty ATP v oboch výrobných úsekoch výrazne nižšie ako odporúčaný hygienický limit pre mliekarenskú prevádzku, čo poukazuje na správne nastavený sanitačný proces.

Graf 1. Grafické znázornenie priemerných hodnôt ATP sterov počas výroby a po dezinfekcii v procese výroby mliečnych produktov



4. DISKUSIA

Choroby prenášané potravinami sú prioritou verejného zdravia, pretože každý rok ochorie veľký počet ľudí v dôsledku konzumácie nebezpečných potravín. Hlavné obavy zvyčajne súvisia s prítomnosťou fyzikálnych a chemických kontaminantov, ako aj patogénnych mikroorganizmov (Newell et al. 2010; Petruzzelli, et al 2010). Mikrobiologickú kontamináciu potravín možno pripísať prirodzene kontaminovaným surovinám (Petruzzelli kol., 2014) alebo krížovej kontaminácii (Gorman et al., 2002; Osimani et al., 2013). Aby sa predišlo negatívnym dopadom na spotrebiteľa, rýchla kontrola čistoty povrchov technológií pomocou ATP metódy počas výrobného procesu má svoje opodstatnenie hlavne z dôvodu rýchleho vykonania nápravného opatrenia.

Hoci sa v literatúre diskutuje o limitoch priamej kvantifikácie, viacerí autori potvrdili vysokú mieru zhody medzi výsledkami bioluminiscenčného stanovenia ATP a klasickými kultivačnými postupmi. Tento vzťah bol demonštrovaný tak v podmienkach spracovateľských mliekarenských podnikov (Murphy a kol., 1998), ako aj priamo v prvovýrobe na mliečnych farmách (Vilar a kol., 2008). Pri porovnaní oboch metód, napriek istým obmedzeniam v presnosti, je kľúčovým benefitom ATP metódy jej rýchlosť. Schopnosť identifikovať kritické miesta kontaminácie priamo počas sanitačného auditu predstavuje zásadnú výhodu pre manažment bezpečnosti potravín (Tebbutt a kol., 2007).

Zo získaných výsledkov našej štúdie sme došli k nasledujúcim záverom. V časti výroby tvarohu boli po dezinfekcii všetky namerané hodnoty ATP nižšie ako odporúčaný hygienický limit 150 RLU/100 cm², čo poukazuje na výskor vykonanie sanitácie. Podobné výsledky boli zaznamenané aj vo výrobe jogurtov, kde väčšina meraní po dezinfekcii spĺňala stanovené hygienické kritériá. Jedna odľahlá hodnota (110 RLU/100 cm²) síce zvýšila variabilitu výsledkov, avšak neprekročila odporúčaný limit pre mliekarenskú prevádzku a neovplyvnila celkové hodnotenie účinnosti dezinfekcie. Vysoký štandard hygieny v pracovnom prostredí (povrchy, zariadenia a náčinie) je základným predpokladom prevencie mikrobiálnych kontaminácií nakoľko patogény vrátane *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* a enteropatogénne kmene *Escherichia coli*, môžu prežiť na rôznych povrchoch po dobu od niekoľkých hodín do niekoľkých dní (Martinon a Croin, 2012; Shi a Zhu, 2009; Simoes a kol., 2010) a dokonca tvoriť biofilmy, v ktorých mikrobiálne bunky môžu pretrvávajú a prežiť dekontaminačné postupy, čím predstavujú potenciálny rezervoár kontaminácie potravín. V závodoch na výrobu potravín sa tvorba biofilmov vo všeobecnosti začína, keď sa čistiace a sanitačné postupy nevykonávajú správne, a zvyšky potravín, ktoré zostávajú

na nedostatočne vyčistených povrchoch, predstavujú zdroj živín pre mikroorganizmy, ktoré môžu byť prítomné (Srey a kol., 2013).

5. ZÁVER

Hodnotenie úrovne hygieny a sanitácie v potravinárskej prevádzke musí nadväzovať na jednotlivé odvetvia a výrobné postupy, zohľadňujúce ich špecifitu, pre objektívne hodnotenie zistených výsledkov. Najobjektívnejším ukazovateľom je zisťovanie mikrobiologickej kontaminácie, na základe, ktorej môžeme hodnotiť účinnosť použitého dezinfekčného prostriedku, resp. účinnosť predchádzajúcej mechanickej očisty, ktorá výrazne ovplyvňuje účinnosť sanitčných prác a prijíma opatrenia na zlepšenie hygieny. Bioluminescenčná metóda je vhodná na rýchlu kontrolu účinnosti sanitácie priebežne počas pracovnej smeny. V krátkom čase podá výsledok o hygiene povrchov a zároveň slúži na vyhľadávanie nedostatkov v sanitácii. Získané výsledky potvrdzujú, že ATP bioluminescenčná metóda je vhodným nástrojom na rýchle overovanie účinnosti sanitácie technologických zariadení v mliekarenskej výrobe. Jej využitie umožňuje okamžitú kontrolu hygienického stavu povrchov, včasnú identifikáciu potenciálnych nedostatkov a prijatie nápravných opatrení ešte pred začiatkom ďalšieho výrobného procesu. Významne tak prispieva k zabezpečeniu zdravotnej bezpečnosti potravín a podporuje efektívne fungovanie systému HACCP. Aj keď ATP metóda nenahrádza klasické mikrobiologické vyšetrenia, predstavuje ich vhodný doplnok pri rutinnom monitorovaní hygieny. Jej zavedenie do sanitčných programov môže zvýšiť efektivitu kontroly čistoty technologických zariadení, prispieť k prevencii vzniku biofilmov a znížiť riziko mikrobiálnej kontaminácie potravín.

Zdroje

1. CALVERT, R.M., HOPKINS, H., REILLY, C.M., FORSYTHE, J.S., CAGED, J. ATP – an internal calibration method for ATP bioluminescence assays. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 30(3), 223-227.
2. GORMAN, R., BLOOMFIELD, S., ADLEY, C.C. A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, 76(2), 143-150.
3. GRIFFITH, C. J., COOPER, R. A., GILMORE, J., DAVIS, C., LEWIS, M. An evaluation of hospital cleaning regimes and standards. *Journal of Hospital Infection*, 2000, 45(1), 19-28.
4. CHEN, J. ATP bioluminescence: A rapid indicator for environmental hygiene and microbial quality of meats. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*. 2000, 20(8), 617-620.
5. LOPAŠOVSKÝ, L., POPELKA, P. Využitie moderných metód pri monitorovaní hygieny prostredia bitúnku. In *Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie, Bezpečnosť a kontrola potravín* Nitra, 2006. ISBN 80-8069-682-0.
6. MARTINON, A., CRONIN, U. P., QUEALY, J., STAPLETON, A., WILKINSON, M. G. Swab sample preparation and viable real-time PCR methodologies for the recovery of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* or *Listeria monocytogenes* from artificially contaminated food processing surfaces. *Food Control*, 2012, 24(2), 86-94.
7. MOORE, G., GRIFFITH, C. A comparison of traditional and recently developed methods for monitoring surface hygiene within the food industry: An industry trial. *International Journal of Environmental Health Research*, 2002, 12(4), 317-329.
8. MURPHY, S. C., KOZLOWSKI, S. M., BANDLER, D. K., BOOR, K. J. Evaluation of adenosine triphosphate-bioluminescence hygiene monitoring for trouble-shooting fluid milk shelf-life problems. *Journal of Dairy Science*, 1998, 81(6), 817-820.
9. NEWELL, D. G., KOOPMANS, M., VERHOEF, L., DUIZER, E., AIDARA-KANE, A., SPRONG, H., OPSTEEGH, M., LANGELAAR, M., THREFFALL, J., SCHEUTZ, F., GIESEN, J., KRUSE, H. Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int. J. Food Microbiol.* 2010, 139, 3-15.
10. OSIMANI, A., AQUILANTI, L., TAVOLETTI, S., CLEMENTI, F. Evaluation of the HACCP system in a university canteen: Microbiological monitoring and internal auditing as verification tools. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2013, 10, 1572-1585.
11. PETRUZZELLI, A., BLASI, G., MASINI, L., CALZA, L., DURANTI, A., SANTARELLI, S., FISICHELLA, S., PEZZOTTI, G., AQUILANTI, L., OSIMANI, A., TONUCCI, F. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami manufactured in the Marche Region. *J. Vet. Med. Sci.*, 2010, 72(4), 499-502.
12. PETRUZZELLI, A., FOGLINI, M., VETRANO, V., PAOLIN, F., ORAZIETTI, N., AMBROSINI, B., OSIMANI, A., CLEMENTI, F., TAVOLETTI, S., TONUCCI, F. The occurrence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in raw meat intended for public catering. *Public Health*, 2014, 128(4), 338-390.
13. SALO, S., EHAVALD, H., RAASKA L., VOKK R., WIRTANEN, G. Microbial surveys in Estonian dairies. *LWT - Food Science and Technology*. 2006, 39(5), 460-471.
14. SHI, X., ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci. Technol.*, 2009, 20(9), 407-413.
15. SIMOES, M., SIMOES, L. C., VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Sci. Technol.*, 2010, 43(4), 573-583.
16. SREY, S., JAHID, I. K., HA, S. D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 2013, 31(2), 572-585.
17. SUKOVÁ, I. Rychlá metoda hodnocení hygieny provozu. *Kvalita potravin*, 2002, 1, 18.
18. TEBBUTT, V., BELL, J. Aislabie: Verification of cleaning efficiency and its possible role in programmed hygiene inspections of food businesses undertaken by local authority officers. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, 102(4), 1010-1017.
19. VILAR, M. J., RODRÍGUEZ-OTERO, J. L., DIÉGUEZ, F. J., SANJUÁN, M. L., YUS, E. Application of ATP bioluminescence for evaluation of surface cleanliness of milking equipment. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 125(3), 357-361.
20. VOJTAŠŠÁK, J. *Kontrola hygieny pomocou detektoru Lightning MVP*. Maso, 2003. 14(5) 33-35.