

YU ISSN 0350-2457
UDK 619 (05)

VETERINARSKI GLASNIK

**naučni časopis
scientific journal**

Veterinarski glasnik je časopis Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
Veterinarski glasnik is published by Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade

VET. GLASNIK Vol. 62 Br. 5-6 Str. 257 - 406 Beograd, 2008.



IZDAVAČ:
FAKULTET VETERINARSKЕ MEDICINE UNIVERZITETA U BEOGRADU
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE UNIVERSITY OF BELGRADE
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЈ МЕДИЦИНИ УНИВЕРСИТЕТА В БЕЛГРАДЕ

SUIZDAVAČ: **Veterinarska komora Srbije**
COPUBLISHER: **Veterinary Chamber of Serbia**

GLAVNI I ODGOVORNI UREDNIK – EDITOR IN CHIEF: *Vitomir Čupić*

UREĐIVAČKI ODBOR – EDITORIAL BOARD:
Vojin Ivetić, Milovan Jovičin, Vera Katić, Sanja Kovačević-Aleksić, Zoran Kulišić, Zoran Rašić, Horea Šamanc, Radoljub Tadić, Jadranka Tijanić, Dragiša Trailović

TEHNIČKI UREDNIK – TECHNICAL EDITOR: *Jadranka Tijanić*

LEKTORI – LECTORS:
Sanja Vranić, za srpski jezik / for Serbian language
Danijela Gledić, za engleski jezik / for English language
Boško Bošković, za ruski jezik / for Russian language

GODIŠNJE SE OBJAVLJUJE 6 BROJEVA ČASOPISA

Godišnja pretplata: za pravna lica 6 000 dinara
za individualne pretplatnike 2 000 dinara
za inostranstvo 200 USD
(The annual subscription outside Serbia and Montenegro is 200 US \$)

Žiro račun broj: 205-2982-66

U finansiranju časopisa učestvuje:
Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije
Publication of this journal is financially supported by:
Ministry of Science and Technological Development of Republic Serbia

Štampa – Printers: *SZR „Simić Zuhra”, Beograd, Vitanovačka 15*

Adresa časopisa:
Veterinarska komora Srbije – Veterinarski glasnik, 11000 Beograd,
Bulevar oslobođenja 18, tel/faks 011/2684-597, 2687-475,
e-mail: vetks@eunet.rs; www.vetks.org.rs



VETERINARSKI GLASNIK

VOL. 62

BROJ 5 - 6

STRANA 257 - 406

Beograd 2008.

5-6

VETERINARSKI GLASNIK

ČASOPIS FAKULTETA VETERINARSKJE MEDICINE UNIVERZITETA U BEOGRADU

VET. GLASNIK Vol. 62 Br. 5 - 6 str. 257 - 406 Beograd, 2008.

SADRŽAJ – CONTENTS – СОДЕРЖАНИЕ

PREGLEDNI RADOVI – REVIEW PAPERS – ОБЗОРЫ РАБОТЫ

- Karabasil N., Dimitrijević Mirjana, Kilibarda Nataša, Teodorović V., Baltić Ž. M.:
Značaj salmonela u proizvodnji mesa svinja
Significance of Salmonella in Pork Production Chain
Значение сальмонелл в производстве мяса свиней **259**
- Katić Vera: Značaj koagulaza pozitivnih stafilocoka za mikrobiološku ispravnost hrane
Significance of Coagulase-positive Staphylococci for Microbiological Food Safety
Значение *Brucella melitensis* для безопасности корма **275**
- Sekulovski P.: Značaj *Brucella melitensis* za bezbednost hrane
Importance of *Brucella melitensis* for Food Safety
Значение *Brucella melitensis* для безопасности корма **289**
- Dimitrijević Mirjana, Karabasil N., Kilibarda Nataša, Teodorović V., Baltić Ž. M.:
Kontrola *Listeria monocytogenes* u pogonima za proizvodnju hrane
Control of *Listeria monocytogenes* in Food Production Plants
Контроль *listeria monocytogenes* в цехах для производства корма **301**
- Vasilev D., Vuković I.:
Analiza opasnosti i mogućnosti sprečavanja botulizma iz proizvoda od mesa
Hazard Analysis and Possibilities for Preventing Botulism Originating from Meat Products
Анализ опасности и возможности предупреждения ботулизма из мясных продуктов **317**
- Bulajić Snežana, Mijačević Zora, Savić-Radovanović Radoslava:
Rezistencija bakterija mlečne kiseline na antimikrobne lekove
Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria
Антибиотическое сопротивление бактерий молочной кислоты **329**
- Stanković I.: Alergeni u hrani – preosetljivost na hranu i sastojke namirnica
Food Allergens – Hypersensitivity to Food and Food Constituents
Аллергены в корме – Чрезмерная чувствительность на корм и составные части пищевых продуктов **341**

ORIGINALNI RADOVI – ORIGINAL PAPERS – ОРИГИНАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

■ Vidanović D., Sabo Z., Kilibarda Nataša, Živadinović Mira, Žarković A., Matović K.: Rezistencija na antibiotike i genotipske karakteristike <i>Salmonella</i> Enterica subspecies <i>enterica</i> serovar Mbandaka izolovanih od živine Resistance to Antibiotics and Genotype Characteristics of <i>Salmonella</i> Enterica Sub- species Enterica Serovar Mbandaka Isolated from Poultry Сопротивление на антибиотики и генотиповые характеристики <i>Salmonella</i> En- terica subspecies <i>enterica</i> serovar Mbandaka, изолированных от домашних птиц .	351
■ Miličević D., Jovanović M., Jurić Verica, Daković Aleksandra, Stefanović S., Petrović Z.: Uticaj prisustva rezidua ohratoksina A i toksičnih elemenata u tkivima na bezbednost svinjskog mesa Presence of Ochratoxin A and Toxic Elements Residue in Tissues and their Impact on Safety of Pork Влияние присутствия остатков охратоксина А и токсических элементов в тканях на безопасность свиного мяса	359
■ Petrović Jelena, Milanov Dubravka, Ratajac R.: Savremeni trendovi u bezbednosti hrane: rezistencija zoonotskih patogena prema antimikrobnim lekovima Contemporary Food Safety Trends: Antimicrobial Resistance in Zoonotic Pathogens Современные тенденции в безопасности корма: сопротивление зооноличе- ских патогенов к антимикробным лекарствам	373
■ Janković S., Spirić Aurelija, Radičević Tatjana, Stefanović S.: Monitoring rezidua u životi- njama i primarnim proizvodima animalnog porekla Monitoring Residue in Animals and Primary Products of Animal Origin Мониторинг остатков в животных и первичных продуктах анимального происхождения	383
■ Stefanović D., Vojnović-Miloradov Mirjana, Lemić J., Kurajica M., Kovačević Dragana: Merenje fizičko-hemijskih karakteristika otpadnih voda mlekare Measurements of Physical-chemical Characteristics of Dairy Plant Waste Waters Измерение физическо химических характеристик сточных вод молочной	395
UPUTSTVO AUTORIMA - NOTES FOR CONTRIBUTORS	403

**REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE I GENOTIPSKE
KARAKTERISTIKE *SALMONELLA ENTERICA* SUBSPECIES
ENTERICA SEROVAR MBANDAKA IZOLOVANIH OD ŽIVINE***
***RESISTANCE TO ANTIBIOTICS AND GENOTYPE CHARACTERISTICS
OF *Salmonella enterica* SUBSPECIES *enterica* serovar *Mbandaka*
ISOLATED FROM POULTRY***

D. Vidanović, Z. Sabo, Nataša Kilibarda, Mira Živadinović, A. Žarković,
K. Matović**

*Salmonele su jedan od vodećih patogenih mikroorganizama koji se sa životinja mogu preneti i na ljude, a njihovi rezervoari su živina, goveda i svinje. Na ljude se prenose putem kontaminirane hrane životinjskog porekla. Posebnu opasnost predstavljaju multiplo rezistentni sojevi salmonela, koji mogu preneti gene rezistencije i na druge mikroorganizme. Kontrola salmoneloze primarno zavisi od dobrog sistema nadzora i poznavanja prisustva serovarijeteta sojeva na epizootiološkom području. Na pojedinim geografskim regionima obično samo nekoliko serovarijeteta salmonela ima epidemiološki i epizootiološki značaj. Zbog dominacije nekih serovarijeteta i fagotipova, kada je potrebno dodatno razdvajanje unutar serovara i fagotipa, koristi se DNK genotipizacija. U slučaju kada je potrebno da se uporede izolati koji su prouzrokovali trovanja ljudi sa izolatima iz hrane ili od životinja, koristi se metoda visoke mogućnosti razdvajanja, kao što je elektroforeza u pulsirajućem polju (pulsed field gel electrophoresis – PFGE). Zahvaljujući visokom stepenu razdvajanja, rezultati PFGE omogućavaju da se sa visokim stepenom pouzdanosti donose odluke u sprovođenju epizootioloških i epidemioloških programa rada. Cilj ovog rada je bio da se ispita rezistencija na antibiotike i utvrde genotipske karakteristike *Salmonella en-**

* Rad saopšten na simpozijumu "Bezbednost namirnica animalnog porekla", Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd 16 i 17. oktobar 2008. godine

** Mr sci. med. vet. Dejan Vidanović, Veterinarski specijalistički institut "Kraljevo", Kraljevo; Z. Sabo, dr vet. - spec, dr sci. med. vet. Nataša Kilibarda, Veterinarski specijalistički institut "Subotica", Subotica; Mira Živadinović, dr vet. - spec., Veterinarski specijalistički institut "Sombor" Sombor; mr sci. med. vet. Aleksandar Žarković, mr sci. med. vet. Kazimir Matović, Veterinarski specijalistički institut "Kraljevo", Kraljevo

terica subsp. enterica serovar Mbandaka izolovanih od živine sa nekoliko lokaliteta u Republici Srbiji.

Ključne reči: Salmonella Mbandaka, rezistencija, antibiotici, PFGE profil

Uvod / Introduction

U većini zemalja u svetu salmonela je zoonotski patogeni mikroorganizam, čiji su primarni rezervoari živina, goveda i svinje. Salmonele se prenose na ljude kontaminiranom hranom životinjskog porekla. Međunarodna trgovina životinjama i hranom čini da su salmonele široko rasprostranjene i da se trovanja hranom čiji su uzrok salmonele pojavljuju redovno. Pod dejstvom selektivnog pritiska nametnutog velikom upotrebom antibiotika u odgoju životinja salmonele razvijaju ili stiču veliki broj gena, kompleksa gena ili mutacija koje izazivaju rezistenciju na antibiotike. Posebnu opasnost predstavljaju multirezistentni sojevi salmonela koji mogu preneti gene rezistencije na antibiotike i na druge vrste mikroorganizama.

Na pojedinim geografskim regionima obično samo nekoliko serovarijeteta salmonela ima epidemiološki i epizootološki značaj. Dominantni serovarijeteti se menjaju tokom vremena i razlikuju u zavisnosti od zemlje i regije. Zbog toga je izuzetno važna identifikacija i karakterizacija dominantnih serovara salmonela kod životinja i ljudi, posebno onih koji nose gene rezistencije na određene antibiotike. Analizom salmonela izolovanih od ljudi i životinja može se utvrditi postojanje i širenje istih ili sličnih dominantnih klonova salmonela nosioca gena rezistencije. Međunarodno priznate metode za tipizaciju salmonela su serotipizacija i fagotipizacija, kao i ispitivanje rezistencije na antibiotike. U slučajevima kada je potrebno da se izvrši dodatna diskriminacija unutar serovarijeteta i fagotipova kod izolata koji su izazvali trovanje kod pacijenata, koristi se metoda gelelektroforeze sa visokom moći razdvajanja u pulsirajućem polju (Pulse-Field Gel Electrophoresis – PFGE). U suštini PFGE se zasniva na razdvajanju fragmenata DNK nakon digestije restriktivnim enzimima. Pošto je bakterijska DNK kružni molekul nakon digestije restriktivnim enzimima se dobija 10–20 fragmenata linearne DNK različitih dužina. Ovi fragmenti su suviše veliki da bi se mogli razdvojiti klasičnom elektroforezom u agarozu pa se primenjuje tehnika pulsirajućeg električnog polja. U električnom polju koje menja pravac i dužinu trajanja, manji fragmenti se brže kreću kroz agarozu od većih. Tako, ako je nakon digestije i elektroforeze PFGE profil dve ili više bakterija identičan, one pripadaju istom klonu i obratno, ako se nakon digestije i elektroforeze PFGE profil dve ili više bakterija razlikuje, one ne pripadaju istom klonu. Pri tome se mora uzeti u obzir i to da neki serovarijeteti salmonela imaju ograničenu klonalnu raznolikost.

U Republici Srbiji najčešće izolovani serovarijeteti kod ljudi su *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi B*, *S. Infantis* i *S. Senftenberg*. Poslednjih

godina servarijetet *Salmonella* Mbandaka se nalazi među 15 najčešće izolovanih serotipova salmonela kod ljudi, a vrlo često se izoluje i kod životinja, pre svega živine. Budući da u našoj zemlji do sada nisu vršena obimnija ispitivanja ovog serovarijeteta, cilj ovog rada je bio da se ispita rezistencija na antibiotike i utvrde genotipske karakteristike i pripadnost serovarijeteta *Salmonella* Mbandaka izolovanih iz živine na teritoriji Republike Srbije.

Materijal i metode / Materials and methods

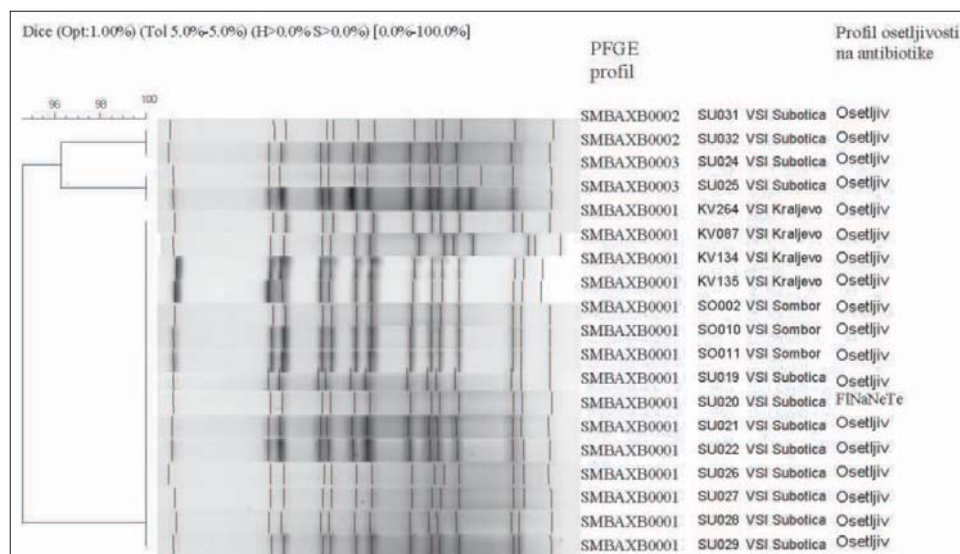
U ispitivanju je korišćeno 19 izolata *Salmonella* Mbandaka od kojih je 12 izolovano u laboratoriji VSI "Subotica", 4 u laboratoriji VSI "Kraljevo" i 3 u laboratoriji VSI "Sombor". Svi izolati su poticali od živine. Njihova biohemijska identifikacija je vršena primenom klasičnih i komercijalnih testova, a serološka tipizacija prema Kauffman i White šemi.

Za ispitivanje osetljivosti na antibiotike korišćena je disk difuziona metoda prema preporukama NCCLS, upotrebom komercijalnih diskova i Mueller-Hinton agara (Bio-rad, USA). Ispitivani izolati su prvo presejani na triptikaza soja agar (TSA) i inkubirani 24 h na temperaturi od 37°C. Od izraslih kolonija pripremane su suspenzije salmonela u fiziološkom rastvoru koje su odgovarale gustini 0,5 McFarland standarda. Suspenzije salmonela su sterilnim brisevima nanošene na podloge Mueller-Hinton agara u petrijevim pločama, a zatim su na njih stavljani diskovi antibiotika. Nakon 18 sati inkubacije očitavane su zone inhibicije rasta, a rezultati interpretirani po preporukama NCCLS ili CLSI iz 2006: osetljiv, intermedijarno osetljiv i rezistentan. U ispitivanjima osetljivosti izolovanih serovarijeteta salmonela korišćeni su: amoksiciklin+klavulonska kiselina (10+20 µg), ampicilin (10 µg), ceftiofur (30 µg), hloramfenikol (30 µg), ciprofloksacin (5 µg), kolistin (50 µg), enrofloksacin (5 µg), flumekvin (30 µg), gentamicin (10 µg), kanamicin (30 µg), nalidiksinska kiselina (30 µg), neomicin (30 UI), streptomycin (10 µg), sulfametoksazol (1,25+23,75 µg), tetraciklin (30 µg) i trimetoprim (5 µg). Za ispitivanje genotipske pripadnosti izolati salmonela su presejavani na TSA i inkubirani 14-18 sati na temperaturi 37°C. Nakon inkubacije, kolonije salmonela su prenošene u sterilne epruvete sa puferom za suspenziju ćelija do gustine od 1,3 do 1,4 koja je određivanja primenom filtera od 610 nm talasne dužine na spektrofotometru. Od tako pripremljenih suspenzija po 200 µL je unošeno u sterilne Eppendorf epruvete, a zatim je dodavano po 10 µL (20 mg/ml) proteinaze K (Invitrogen, USA). Ova suspenzija je zatim mešana sa 200 µL otopljene i na temperaturi od 50°C ohlađene Megabase agaroze (Bio-Rad) i prenošena u kalupe za razlivanje i pripremu plagova. Nakon hlađenja stvrdnuti plagovi su istiskivani iz kalupa u epruvete sa puferom za liziranje ćelija. Liziranje sa proteinazom K je obavljano u vodenom kupatilu sa šejkerom na temperaturi od 54°C u trajanju od 16 sati. Nakon liziranja, plagovi su ispirani u dejonizovanoj vodi dva puta i u Tris-EDTA puferu 4 puta na temperaturi od 50°C. Plagovi su nakon liziranja podvrgnuti di-

gestiji restriktivnim enzimom *Xba*I na temperaturi od 37°C u termostatu uz dodatak H pufera u trajanju od 16 sati. Nakon digestije restriktivnim enzimom plagovi su podvrgavani elektroforezi u 1% Megabase agarozu. Elektroforeza je vršena na CHEF DRIII sistemu (Bio-Rad), a njeni parametri su bili početno vreme 2,2 sekunde, završno vreme 63,8 sekunde pri naponu struje od 200 volti. Dužina trajanja elektroforeze je iznosila 18 sati, a temperatura pufera 14°C. Vizuelizacija fragmenata DNK je vršena bojenjem etidijum bromidom (Bio-Rad), a zatim izlaganjem UV zracima. Snimanje je vršeno GelDoc sistemom, primarna analiza gela je vršena GelDoc softverom, a analiza fragmenata FPQuest softverom (Bio-Rad).

Rezultati ispitivanja / Results

Od ukupno 19 izolata *Salmonella* koji su bili obuhvaćeni ispitivanjem, 18 je bilo osetljivo na sve antibiotike. Kod jednog izolata označenog SU020 utvrđena je multipla rezistencija na flumekvin, nalidiksinsku kiselinu, neomicin i tetraciklin (FINaNeTe profil). Analizom podataka pomoću FPQest softvera dobijeni su PFGE profili koji su svrstani u tri grupe. Profilima su dodeljeni kodovi koji su se sastojali od prvog slova vrste bakterije, tri slova serovara, dva slova



Slika 1. Dendrogram iz FPQest softvera koji pokazuje koeficijent sličnosti (Dice koeficijent, UPGMA) između ispitivanih izolata *S. Mbandaka*, (Levo). Profili osetljivosti na antibiotike ispitivanih izolata (Desno). Antibiotici: FI - flumekvin; Na - nalidiksinska kiselina; Ne - neomicin; Te - tetraciklin

Figure 1. Dendrogram from FPQest software showing similarity coefficient (Dice coefficient, UPGMA) between examined isolates of *S. Mbandaka*, (left). Profile of sensitivity to antibiotics of examined isolates (right). Antibiotics: FI - flumequine; Na - nalidixic acid; Ne - neomycin; Te - tetracycline

korišćenog restriktivnog enzima i četvorocifrenog broja počev od 0001. Profil S. Mbandaka pod oznakom SMBAXB0001 je utvrđen kod 15 izolata, dok su profili pod oznakama SMBAXB0002 i SMBAXB0003 ustanovljeni u po 2 izolata. Iz dendograma, za čiju izradu je korišćen Dice koeficijent, može se videti da je koeficijent sličnosti između različitih PFGE profila veći od 96%. Dendogrami, koeficijenti sličnosti, PFGE i antimikrobni profili su prikazani na slici 1.

Diskusija / Discussion

Cilj epidemiološkog ispitivanja je da se prati širenje mikroorganizama i da se utvrdi da li su prikupljeni izolati iz različitih izvora u istom regionu epidemiološki povezani i da li pripadaju istom klonu (Tenover i sar., 1995). Tačna karakterizacija sojeva je odlučujuća u kontroli infekcija salmonelama, ali valjanost metoda za tipizaciju može značajno da varira. Prva ispitivanja *S. Mbandaka* koja su izvršili Hoszowski i sar., (1999) pokazala su da su biotipiziranje, rezistencija na antibiotike i analiza plazmida nedovoljni za karakterizaciju ovog serovara poreklom od životinja i hrane za životinje. U kasnijim ispitivanjima (2001) isti autori su utvrdili pojavu rezistencije na antibiotike kod 23 od 62 izolata. Ustanovili su i 7 profila rezistencije na antibiotike od čega su dva profila pripadala multirezistentnim izolatima, a od 59 izolata genotipizacijom sa XbaI restriktivnim enzimom su utvrdili 15 PFGE profila. Autori su zaključili da PFGE predstavlja metodu izbora u subtipiziranju ovog serovara. Mogućnost tipizacije se povećava kombinovanjem više metoda. Takođe, autori smatraju da je *S. Mbandaka* preko hrane za životinje dospela do populacije živine, a odatle namirnicama animalnog porekla do ljudi. Liebana i sar., (2001) navode da su kod 15 izolata *S. Mbandaka* elektroforetskom analizom (PFGE) ustanovili 13 profila. Ispitivani izolati su ispoljili rezistenciju na antibiotike u 10 slučajeva. Kod pet izolata je ustanovljena multipla rezistencija na 4 i više antibiotika.

Od 19 izolata *S. Mbandaka* utvrđenih na teritoriji Republike Srbije, kod 18 je ustanovljena osetljivost na 16 antibiotika koji su ispitivani. Kod jednog izolata je utvrđena multipla rezistencija na četiri antibiotika. Rezistencija na flumekvin, nalidiksinsku kiselinu, neomicin i tetraciklin nije neočekivana jer se navedeni antibiotici najčešće koriste u živinarskoj proizvodnji. Rezultati genotipske karakterizacije *S. Mbandaka* koje su izolovane na teritoriji Republike Srbije pokazuju da postoji najmanje 3 različita PFGE profila. Od 19 izolata *S. Mbandaka* koji su poticali sa područja sva tri veterinarska specijalistička instituta kod 15 je utvrđen profil SMBAXB0001. Profili SMBAXB0002 i SMBAXB0003 su utvrđeni kod po dva izolata koji su poticali sa područja VSI Subotica. Ako se rezistencija na antibiotike iskoristi za dodatno razdvajanje unutar PFGE profila, onda bi se iz grupe od 15 izolata sa profilom pod oznakom SMBAXB0001 mogao da izdvoji profil sa oznakom SU020. Kod ovog izolata je otkrivena multipla rezistencija na 4 antibiotika za razliku od ostalih 14 izolata kod kojih nije otkrivena rezistencija na ispitivane antibiotike. Pošto je koeficijent sličnosti između PFGE profila veći od 96%, može se

zaključiti da su ispitivani izolati međusobno srodni i da verovatno predstavljaju podtipove jednog istog soja. Izolacija identičnih PFGE profila u laboratorijama koje se nalaze na različitim lokacijama je očekivana zbog relativne geografske blizine epizootičkih područja i razvijene trgovine hranom za životinje, živinom i živinskim proizvodima. Stepenn genotipske raznolikosti ne mora biti konstantan i može se menjati u vremenu i prostoru.

Zaključak / Conclusion

Od molekularnih metoda koje se koriste u epidemiološkim ispitivanjima PFGE predstavlja jednu od najpouzdanijih metoda za subtipizaciju mnogih mikroorganizama. Visoka moć razdvajanja PFGE se može povećati upotrebom više restriktivnih enzima, kao i u kombinaciji sa drugim metodama za subtipizaciju.

Rezultati dobijeni u ovom ispitivanju poslužili su kao osnov za izradu baze podataka o prevalenciji pojedinih klonova serovara *Salmonella* u Republici Srbiji. Dobijena baza podataka treba da posluži za poređenje učestalosti horizontalnog transfera i konverzije gena, preuređenja genoma i modularne organizacije hromozoma kroz vreme.

Literatura / References

1. Bolton DJ, Meally D, McDowell, Blair IS. A survey for serotyping, antibiotic resistance profiling and PFGE characterization of and the potential multiplication of restaurant *Salmonella* isolates, *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.
2. Carattoli A, Filetici E, Villa L, Dionisi AM, Ricci A, Luzzi I. Antibiotic Resistance Genes and *Salmonella* Genomic Island 1 in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolated in Italy, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, September 2002; 46(9) 2821-8.
3. Doran Geraldine, Dearbhaile Morris, Colette O'Hare, Niall DeLappe, Bernard Bradshaw, Geraldine Corbett-Feeney, and Martin Cormican. Cost-Effective Application of Pulsed-Field Gel Electrophoresis to Typing of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, *Applied and environmental microbiology* 2005; 8236-40.
4. Hoszowski A, Wasyl D, Truszczynski M. 1999. Epidemiological investigation of *Salmonella* serovar Mbandaka strains isolated from animals, their feed and food products in Poland during the years 1995-1997. *Polish J Vet Sci*; 2, 43-8.
5. Hoszowski A, Dariusz W. Typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka isolates, 21 May 2001; 139-48.
6. Li X, Payne JB, Santos FB, Levine JF, Anderson KE, Sheldon BW. *Salmonella* Populations and Prevalence in Layer Feces from Commercial High-Rise Houses and Characterization of the *Salmonella* Isolates by Serotyping, Antibiotic Resistance Analysis, and Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Poultry Science* 2007; 86: 591-7.
7. Liebana E, Guns D, Lourdes GM, Woodward MJ, Felicity A, Clifton-Hadley FA, Davies RH. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: Assessment of methodology. *Journal of Clinical Microbiology* Oct 2001; 3609-16.

8. Tenover CF, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced, by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing, Journal of Clinical Microbiology, Sept 1995; 2233-9.
9. Wonderling L, Pearce R, Wallace FM, Call JE, Feder I, Tamplin M, Luchansky JB. Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis To Characterize the Heterogeneity and Clonality of *Salmonella* Isolates Obtained from the Carcasses and Feces of Swine at Slaughter, Appl Environ Microbiol. 2003 July; 69(7): 4177-82.

ENGLISH

RESISTANCE TO ANTIBIOTICS AND GENOTYPE CHARACTERISTICS OF *Salmonella enterica* SUBSPECIES *enterica* serovar Mbandaka ISOLATED FROM POULTRY

D. Vidanović, Z. Sabo, Nataša Kilibarda, Mira Živadinović, A. Žarković, K. Matović

Salmonellas are one of the main zoonotic pathogens whose reservoirs are poultry, cattle and pigs. By means of the food chain salmonellas can be transferred to humans through contaminated food of animal origin. Multiresistant strains *Salmonella* are particularly dangerous since they can transfer genes of resistance to antibiotics to other microorganisms. Control of salmonellas primarily depends on a good surveillance system and knowledge of the strain types present in the epizootiologic area. In some geographical regions only a few *Salmonella* serotypes are usually of epidemiological importance. Due to the predomination of some serotypes and fagotypes, when an additional discrimination within serotypes and fagotypes is needed, DNA genotyping is used. In cases when it is necessary to compare the strains which caused the poisoning of patients, with strains isolated from food or animals, a highly discriminatory method is used – pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Due to a high degree of discrimination the results of PFGE testing enable decision making with a higher degree of certainty in epizootiologic and epidemiologic research work.

The aim of this testing was to determine the antibiotics resistance and genotype characteristics of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka isolated from poultry from some areas of the territory of Serbia.

Key words: *Salmonella* Mbandaka, serovar, antibiotics resistance, PFGE profile

**СОПРОТИВЛЕНИЕ НА АНТИБИОТИКИ И ГЕНОТИПОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
SALMONELLA ENTERICA SUBSPECIES *ENTERICA* SEROVAR MBANDAKA,
ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ ДОМАШНИХ ПТИЦ**

**Д. Виданович, З. Сабо, Наташа Килибарда, Мира Живадинович, А. Жаркович,
К. Матович**

Сальмонеллы один из ведущих патогенных микроорганизмов, которые с животных могут передаваться и на людей, а их резервуары домашние птицы, крупный рогатый скот и свиньи. На людей передаются путём контаминированного корма животного происхождения. Отдельную опасность представляют собой мультиплотные сопроотивляемые штаммы сальмонелл, которые могут перенести гены сопроотивления и на другие микроорганизмы. Контроль сальмонеллёзов первично зависит от хорошей системы надзора и познания присутствия серовариететов штаммов на эпизоотологическом районе. На некоторых географических регионах обычно только несколько серовариететов сальмонелл имеет эпидемиологическое и эпизоотологическое значение. Из-за доминанции некоторых серовариететов и фаготипов, когда нужно дополнительное раздвоение внутри серовара и фаготипа, используется ДНК генотипизация. В случае, когда нужно сравнить изоляты, которые причинили отравления людей с изолятами из корма или от животных, используется метод высокой возможности раздвоения, как электрофорез в пульсирующем поле (*pulsed field gel electrophoresis* – *PFGE*). Благодаря высокой степени раздвоения, результаты *PFGE* дают возможность, что с высокой степенью надёжности приносят решения в проведении эпизоотологических и эпидемиологических программ работы. Цель этой работы была испытать сопроотивление на антибиотики и утвердить генотиповые характеристики. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka, изолированных от домашних птиц с несколько мест в Республике Сербии.

Ключевые слова: *Salmonella Mbandaka*, сопроотивление, антибиотики, *PFGE* профиль

UTICAJ PRISUSTVA REZIDUA OHRATOKSINA A I TOKSIČNIH ELEMENATA U TKIVIMA NA BEZBEDNOST SVINJSKOG MESA*

PRESENCE OF OCHRATOXIN A AND TOXIC ELEMENTS RESIDUE IN TISSUES AND THEIR IMPACT ON SAFETY OF PORK

D. Milićević, M. Jovanović, Verica Jurić, Aleksandra Daković,
S. Stefanović, Z. Petrović**

Cilj ovog rada je bio da se utvrdi prisustvo rezidua ohratoksina A (OTA) i toksičnih elemenata (kadmijum, olovo, živa i arsen) u tkivima zaklanih, tovnih svinja, poreklom iz različitih regiona Srbije. Tokom veterinarsko-sanitarnog pregleda zaklanih svinja, na liniji klanja, metodom slučajnog uzorkovanja uzimani su uzorci krvi, a zatim pripadajuća jetra i bubrezi, odgovarajuće životinje (n=90). Prisustvo rezidua OTA utvrđeno je u 26,6% uzoraka jetre u količini od 0,22 do 14,5 ng/g, dok je zastupljenost rezidua OTA u uzorcima krvne plazme i bubrega bila skoro identična (31,1 i 33,3%, ponaosob). Sadržaj OTA u uzorcima krvne plazme kretao se od 0,22 do 220,8 ng/mL, dok se u uzorcima bubrega kretao od 0,17 do 52,5 ng/g. Distribucija OTA u ispitanim tkivima (u %) u odnosu na sadržaj kretala se sledećim redosledom: krvna plazma > bubrezi > jetra (100 > 34 > 17), dok se u odnosu na zastupljenost rezidua kretala sledećim redosledom bubrezi > krvna plazma > jetra (100 > 93,4 > 79,9). Rezultati naših istraživanja ukazuju na to da je u 2,2% ispitanih uzoraka bubrega utvrđen sadržaj OTA iznad maksimalno dozvoljene granice (10 ng/g). Nizak stepen pozitivne korelacije utvrđen je između sadržaja OTA u krvnoj plazmi i jetri ($r=0,319$), kao i između sadržaja OTA u jetri i bubrezima ($r=0,341$). Vrlo visok stepen pozitivne korelacije utvrđen je između sadržaja OTA u krvnoj plazmi i bubrezima ($r=0,973$).

* Rad saopšten na simpozijumu "Bezbednost namirnica animalnog porekla", Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd 16 i 17. oktobar 2008. godine

** Dr sci. med. vet. Dragan Milićević, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd; dr sci. med. vet. Milijan Jovanović, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za patološku morfoloiju, Beograd; dr. sci. med. vet. Verica Jurić, profesor, Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Departman za stočarstvo, Novi Sad; Aleksandra Daković, Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, Beograd; Srđan Stefanović, dr vet. med., Zoran Petrović, dr vet. med., Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

Prisustvo rezidua žive utvrđeno je u 33,3% uzoraka bubrega, u odnosu na učestalost nalaza rezidua kadmijuma koja je bila nešto manja (27,7%). Sadržaj žive kretao se u granicama predviđenim pravilnikom (0,005-0,055 mg/kg), dok je sadržaj kadmijuma u jednom uzorku bio iznad maksimalno dozvoljene granice (1,23 mg/kg). Prisustvo arsena utvrđeno je samo u jednom uzorku, dok prisustvo olova nije utvrđeno.

Ključne reči: svinje, ohratoksin A, toksični elementi, rezidue

Uvod / Introduction

Ohratoksin A je nefrotoksičan mikotoksin, proizvod sekundarnog metabolizma relativno malog broja plesni iz roda *Aspergillus* i *Penicillium*, prvenstveno *P. verrucosum* u hladnim područjima i *A. ochraceus* u tropskim i suptropskim krajevima (Frisvad i Thrane, 2000; Larsen i sar., 2001), poseduje teratogeno, imunotoksično (Creppy, 1999; WHO/IPCS, 2001), genotoksično i verovatno neurotoksično dejstvo (Bruinink i Sidler, 1985), kod različitih životinjskih vrsta, a naročito kod svinja.

Posebnu opasnost predstavlja mogućnost da se u organizmu životinja koje su uzimale kontaminiranu hranu mogu naći rezidue (mikotoksini i/ili njihovi metaboliti) u različitim koncentracijama, pa može doći do ispoljavanja štetnih efekata i kod ljudi. Na taj način preko namirnica animalnog porekla, OTA ulazi u lanc ishrane. Na bazi velikog broja podataka o kancerogenom dejstvu OTA na različite životinjske vrste i za sada nedovoljnom broju podataka na ljude, Internacionalna agencija za izučavanje raka (IARC) je 1993. klasifikovala OTA kao mogući kancerogeni agens za ljude i svrstala ga u grupu 2B (IARC, 1993).

U našem regionu OTA predstavlja poseban problem zbog povezanosti sa oboljenjem ljudi poznatim kao balkanska endemska nefropatija (BEN) (Krogh, 1979). Balkanska endemska nefropatija (BEN) je degenerativno, ireverzibilno oboljenje bubrega, terminalnog stadijuma, sa smrtnim ishodom, zastupljeno u određenim delovima Evrope i severne Afrike. Novija istraživanja ukazuju na mogućnost uloge OTA u razvoju kancera testisa kod ljudi (Schwartz, 2002). Učestalost pojave kancera testisa u 20 zemalja bio je u signifikantnoj korelaciji sa konzumiranjem kafe i svinjskog mesa po stanovniku ($r=0,49$ i $r=0,54$). Ohratoksin A se smatra primarnim uzročnikom BEN-a, međutim nefrotoksično dejstvo ispoljavaju čitav niz bioloških i hemijskih agenasa.

Zagađenje životne sredine i prisustvo toksičnih elemenata u lancu ishrane predstavlja globalan, sve veći problem u svetu. Po svojoj toksičnosti najznačajniji su olovo (Pb), kadmijum (Cd), živa (Hg) i metaloid arsen (As). To su stabilni elementi, ne metabolišu se, imaju jako dugo vreme polueliminacije, poseduju bioakumulativno svojstvo i ispoljavaju opštu toksičnost za sve ćelije organizma. Procenjuje se da se svake godine u životnu sredinu oslobodi od 25.000 do 30.000 tona kadmijuma (ATSDR, 1999) i oko 10.000 tona žive (UNEP/GEMS,

1992). Kadmijum je kao pulmonalni kancerogen svrstan u grupu 1 (*human carcinogen*) (IARC, 1993).

Uzimajući u obzir da bezbednost hrane predstavlja jedan od državnih prioriteta, kako u pogledu unapređenja javnog zdravlja tako i u pogledu harmonizacije nacionalnih propisa sa regulativama EU, cilj naših istraživanja je bio da se stekne detaljniji uvid u prisustvo rezidua OTA i toksičnih elemenata u tkivima zaklanih, tovni svinja, poreklom iz Vojvodine i dela zapadne Srbije.

Materijal i metode / *Materials and methods*

Za ispitivanja prisustva rezidua OTA i toksičnih elemenata u tkivima zaklanih svinja poreklom sa farmi iz Vojvodine i dela zapadne Srbije, na liniji klanja metodom slučajnog uzorkovanja uzimani su uzorci krvi (Hult i sar., 1980), a zatim pripadajuća jetra i bubrezi, odgovarajuće životinje. Tokom šestomesečnog perioda ispitivanja (septembar 2006 – februar 2007) ukupno je zaklano 762 svinje iz regiona Vladimirci, 363 svinje iz regiona Senta i 322 svinje iz regiona Bogatić, a za analizu je uzeto po 90 uzoraka krvi, jetre i bubrega svinja iz svakog regiona.

Ispitivanje prisustva rezidua OTA izvršeno je tehnikom visoko efikasne tačne hromatografije sa fluorescentnim detektorom (*HPLC-FL, Waters Alliance*, kolona *Waters Symmetry Shield RP 18, 150x4,6 mm, 5 µm*). Uzorci krvne plazme analizirani su po metodi *Curtui i Gareis* (2001) (Curtui i Gareis, 2001a), a uzorci jetre i bubrega po metodi *Matrella i sar.*, (2006) (Matrella, 2006). U uzorcima u kojima je utvrđeno prisustvo rezidua OTA iznad maksimalno dozvoljene količine (10 ng/g), izvršena je potvrda metodom tačne hromatografije sa masenom detekcijom (*LC-MS/MS*).

Određivanje prisustva rezidua toksičnih elemenata izvršeno je tehnikom atomske apsorpcione spektrometrije, uz prethodnu pripremu uzorka po metodi proizvođača uređaja za mikrotalasnu digestiju *Milestone TC (Touch Control)*. Detektovanje kadmijuma i olova izvršeno je plamenom tehnikom (acetilenskim plamenom). Detektovanje žive izvršeno je hidridnom tehnikom hladne pare, a arsena hidridnom tehnikom u plamenu uz korišćenje uređaja za generisanje hidridnih para sa kontinuiranim protokom *Varian VGA-77*. Očitavanje apsorbanci vršeno je na uređaju *Varian SpectrAA 220*, a svi rezultati izraženi su na vlažnu masu (mg/kg). Za proveru kvaliteta ispitivanja korišćen je liofilizovan bubreg svinje u formi homogenizovanog praha, registrovan kao sertifikovani referentni materijal BCR No. 186.

Statistička obrada podataka / *Statistical analysis*

Rezultati ispitivanja grupisani su u odgovarajuće statističke serije i obrađeni korišćenjem standardnih programa i to OriginLab 7 i MS Excel 2003. Analiza statističke značajnosti sadržaja OTA i toksičnih elemenata između praće-

nih regiona, izvršena je one-way ANOVA ($p < 0,05$), a naknadne analize statističkih razlika između pojedinih regiona izvršene su Studentovim t -testom ($p < 0,05$).

Rezultati i diskusija / Results and disussion

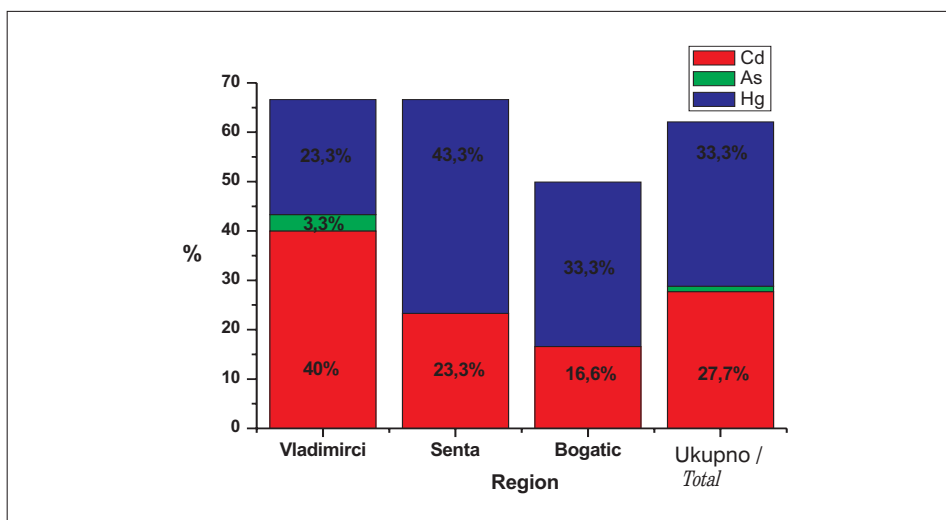
Zastupljenost rezidua OTA i toksičnih elemenata u tkivima zaklanih svinja poreklom sa praćenih regiona prikazana je u tabeli 1 i slikom 1. Dobijeni rezultati analize uzoraka krvne plazme i organa klinički zdravih, zaklanih, tovnih svinja, poreklom iz različitih lokaliteta Vojvodine i Srbije, ukazuju na prisustvo rezidua OTA i toksičnih elemenata. O nalazu rezidua OTA u krvnoj plazmi i jestivim tkivima svinja postoje obimni podaci (Curtui i sar., 2001; Gareis i Scheuer, 1999; Jorgensen and Vahl, 1999; Lusky i sar., 1997; Milićević i sar., 2007; Stoev i sar., 1998). Rezultati ovih istraživanja približno su jednaki rezultatima dobijenim u našim ispitivanjima.

U tabeli 1 prikazana je zastupljenost rezidua ohratoksina A u uzorcima krvne plazme, bubrega i jetre poreklom iz praćenih regiona. Iz prikazane tabele se može uočiti da je najveća zastupljenost rezidua OTA utvrđena u uzorcima bubrega (33,3%), dok je zastupljenost rezidua OTA u uzorcima krvne plazme bila neznatno niža (31,1%), ali su zato prosečne vrednosti bile daleko više. U pogledu zastupljenosti i sadržaja rezidua OTA u ispitanim tkivima, najmanja zastupljenost i prosečan sadržaj rezidua OTA utvrđen je u uzorcima jetre (26,6%). Analizirajući rezultate ispitivanja prisustva rezidua OTA u tkivima po regionima, može se uočiti da je zastupljenost rezidua OTA u uzorcima bubrega poreklom iz lokaliteta Senta i Bogatić bila podjednaka (36,6%), dok je u uzorcima poreklom iz lokaliteta Vladimirci prisustvo rezidua OTA utvrđeno u 26,6% uzoraka. Posmatrajući zbirno za ceo period ispitivanja, sadržaj OTA u ispitanim uzorcima kretao se od 0,17 do 52,5 ng/g. Najveći sadržaj rezidua OTA (52,5 ng/g) utvrđen je u uzorku poreklom iz lokaliteta Bogatić. Analizom uzoraka krvne plazme utvrđene su dosta velike varijacije kako u zastupljenosti tako i u sadržaju OTA između regiona sa kojih su uzorci uzimani za analizu. Najveća zastupljenost rezidua OTA utvrđena je u uzorcima poreklom iz lokaliteta Senta (43,3%), u odnosu na uzorke poreklom iz lokaliteta Vladimirci gde je utvrđena najmanja zastupljenost (16,6%) rezidua OTA. Sadržaj OTA u uzorcima krvne plazme kretao se od 0,22 do 220,8 ng/mL, a najveći sadržaj rezidua OTA (220,8 ng/mL) utvrđen je u uzorku poreklom iz regiona Bogatić. Kao i u prethodnom slučaju, analizom uzoraka jetre zabeležene su dosta velike varijacije u zastupljenosti rezidua OTA između praćenih regiona, ali su zato prosečne vrednosti sadržaja OTA bile dosta slične. Najveća zastupljenost rezidua OTA utvrđena je u uzorcima jetre poreklom iz regiona Vladimirci (36,6%), dok je najmanja zastupljenost rezidua OTA utvrđena u uzorcima poreklom iz regiona Senta (13,3%). Međutim, najveći sadržaj rezidua OTA utvrđen je u uzorku poreklom iz lokaliteta Senta (14,5 ng/g).

Tabela 1. Zastupljenost rezidua ohratoksina A u uzorcima krvne plazme, bubrega i jetre poreklom sa praćenih regiona /
Table 1. Presence of OTA residue in samples of blood plasma, kidneys and liver originating from monitored regions

Region / Region	N	Krvna plazma / Blood plasma (ng/mL)				Bubrezi / Kidneys				Jetra / Liver			
		n (%)				n (%)				n (%)			
		<LD	0.1 ^a -1	1,1-5	>5	<LD	0.14 ^a -1	1,1-5	>5	<LD	0.14 ^a -1	1,1-5	>5
Vladimirci	30	25 (83,4)	3 (10)	2 (6,6)	/	22 (73,3)	5 (16,6)	2 (6,6)	1 (3,3)	19 (63,3)	5 (16,6)	6 (20)	/
Senta	30	17 (56,7)	6 (20)	4 (13,3)	3 (9,9)	19 (63,3)	5 (16,6)	4 (13,3)	2 (6,6)	26 (86,6)	1 (3,3)	2 (6,6)	1 (3,3)
Bogatić	30	20 (66,7)	5 (16,6)	2 (6,6)	3 (9,9)	19 (63,3)	5 (16,6)	4 (13,3)	1 (3,3)	21 (70)	2 (6,6)	6 (20)	1 (3,3)
Ukupno / Total	90	62 (68,9)	14 (15,5)	8 (8,8)	6 (6,6)	60 (66,6)	15 (16,6)	10 (11,1)	4 (4,4)	66 (73,3)	8 (8,8)	14 (15,5)	2 (2,2)

N – ukupan broj analiziranih uzoraka; n – broj uzoraka u opsegu koncentracija, ^aLD – limit detekcije /
N – total number of analyzed samples; n – number of samples within concentration range, ^aLD – limit of detection



Slika 1. Zastupljenost rezidua toksičnih elemenata u uzorcima bubrega poreklom sa praćenih regiona /

Figure 1. Representation of toxic elements residue in kidney samples originating from monitored regions

Analizirajući rezultate ispitivanja sadržaja OTA, može se konstatovati da je u najvećem broju ispitanih uzoraka (66,6-73,3%), sadržaj OTA bio ispod limita detekcije. U uzorcima tkiva u kojima je utvrđeno prisustvo rezidua OTA, sadržaj OTA kretao se u veoma širokom opsegu. U uzorcima krvne plazme sadržaj OTA kretao se od 0,22 do 220,8 ng/mL, što je i uticalo da prosečne vrednosti sadržaja budu visoke, dok je u bubrezima utvrđen sadržaj od 0,17 do 52,5 ng/g. Iako je opseg koncentracija bio veoma širok, najveća zastupljenost rezidua OTA utvrđena je u količini do 1 ppb. Sadržaj OTA u uzorcima jetre kretao se od 0,22 do 14,5 ng/g, a u najvećem broju ispitanih uzoraka (15,5%) utvrđen je sadržaj između 1 i 5 ng/g. Rezultati naših istraživanja pokazuju da je u 2,2% ispitanih uzoraka bubrega utvrđen sadržaj OTA iznad maksimalno dozvoljene granice (10 ng/g). I pored postojanja izraženih razlika, sadržaj rezidua OTA u uzorcima poreklom sa ispitanih regiona nije se statistički značajno razlikovao ($p > 0,05$).

Relativno nizak sadržaj OTA u krvnoj plazmi potvrđuje činjenicu da nivo OTA u krvi veoma pouzdano reflektuje prisustvo ovog toksina u hrani kojom su životinje bile hranjene. Zbog visoke konstante asocijacije OTA za proteine krvne plazme (Hagelberg i sar., 1989) i relativno dugog vremena polueliminacije iz organizma životinja (do 6 dana) (Kühn i sar., 1993), heterogena distribucija OTA, često zabeležena u hrani, pojaviće se u homogenoj formi u krvi, čak i u slučajevima ingestije vrlo malih količina OTA. Primenom regresione jednačine moguće je izračunati nivo rezidua OTA u bubrezima, jetri, mišićima i masnom tkivu na bazi poznate koncentracije OTA u krvi (Mortensen, 1983). Krvni serum i urin su se po-

kazali kao odlični biomarkeri izloženosti ljudi i životinja ovom toksinu putem hrane, te se analiza krvi može uspešno koristiti kao sredstvo u dijagnostici ohratoksikoza, naročito supkliničkih (Gremmels i sar., 1995) koje su najčešće za-beležene na našim prostorima.

Prisustvo rezidua OTA u bubrezima svinja predstavlja rezultat selektivne akumulacije (glomerularna filtracija) u bubrežnom tkivu i spore eliminacije (reapsorpcija u proksimalnim tubulima bubrega). Nalaz OTA u jetri ukazuje na pretežno alimentarnu izloženost životinja toksinu. Nakon resorpcije, najveći deo ohratoksina se nalazi u jetri, gde se vrši njegova detoksifikacija, a u znatno manjoj meri u bubrezima i muskulaturi. Veliki broj mikotoksina izaziva promene na jetri, koja je zbog svog topografskog položaja, izložena tzv. prvom prolazu celokupne količine mikotoksina nakon ingestije (Sinovec Snežana, 1996). Analizirajući rezultate ispitivanja međusobne zavisnosti između sadržaja OTA u ispitanim tkivima, nizak stepen pozitivne korelacije utvrđen je između sadržaja OTA u krvnoj plazmi i jetri ($r=0,319$), kao i između sadržaja OTA u jetri i bubrezima ($r=0,341$), dok je vrlo visok stepen pozitivne korelacije utvrđen između sadržaja OTA u krvnoj plazmi i bubrezima ($r=0,973$).

Distribucija OTA u ispitivanim tkivima u odnosu na sadržaj kretala se sledećim redosledom: krvna plazma>bubrezi>jetra ($100>34>17$), dok se u odnosu na zastupljenost rezidua, kretala sledećim redosledom: bubrezi>krvna plazma>jetra ($100>93,4>79,9$). Rezultati naših ispitivanja distribucije OTA u ispitanim tkivima u skladu su sa rezultatima dobijenim u istraživanjima drugih autora (Curtui i sar., 2001; Kühn, 1993; Mortensen i sar., 1983).

Odnos između sadržaja OTA u mišićnom tkivu i bubrezima bio je predmet istraživanja mnogih autora (WHO/IPCS, 2001; Curtui i sar., 2001; Madsen i sar., 1982). Rezultati ovih istraživanja pokazuju da se odnos između sadržaja OTA u bubrezima i mišićnom tkivu kretao u širokom opsegu, od 10:1 do 10:9. Sadržaj OTA u mišićnom tkivu i bubrezima, kao i njihov odnos, zavisi od više faktora od kojih su najznačajniji: sadržaj OTA u hrani, period ishrane kontaminiranom hranom, način na koji je hrana kontaminirana (prirodno ili veštački), kao i poštovanje karence. Na osnovu poznate količine OTA u bubrezima primenom regresione jednačine može se odrediti sadržaj OTA u tkivima (Tabela 2).

Tabela 2. Regresiona jednačina za izračunavanje sadržaja OTA u tkivima (Krogh i sar., 1976)
Table 2. Regression equation for calculating OTA content in tissues (Krogh et al., 1976)

Tkivo / Tissue	Regresiona jednačina / Regression equation
Jetra / Liver	$y = -0,7 + 0,7x$
Mišićno tkivo / Muscle tissue	$y = -0,6 + 0,4x$
Masno tkivo / Fatty tissue	$y = -0,8 + 0,3x$

y – rezidua OTA u tkivima (ng/g), x – sadržaj OTA u bubrezima (ng/g) $X \geq 2$ /
y – residue of OTA in tissues (ng/g). x – content of OTA in kidneys (ng/g) $X \geq 2$

Danski sistem kontrole prisustva rezidua OTA u mesu uspostavljen 1978. zasniva se na analizi makroskopski promenjenih bubrega ("bledi, mekani i uvećani") i prediktivnom modelu odnosa sadržaja OTA u mišićnom tkivu/bubreg oko 40% (Büchmann i Hald, 1985). Prema tom modelu, pri nalazu OTA u bubrezima od 25 ng/g, sadržaj OTA u mesu bi trebao da bude oko 10 ng/g. Međutim, uzimajući u obzir preporuke organizacija kao što su Naučni komitet za hranu (SCF- *Scientific Committee on Food*) i JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) o tolerantnom dnevnom unosu (TDI) OTA ($1,5-14 \text{ ng/kg}^{-1} \text{ TM dnevno}^{-1}$), sa stanovišta zaštite zdravlja ljudi, sadržaj OTA u mesu od 10 ng/g ne zadovoljava pomenute preporuke (JECFA, 2001; SCF, 1998).

Rezultati ispitivanja prisustva rezidua toksičnih elemenata u bubrezima svinja poreklom sa ispitanih regiona ukazuju na to da je tokom naših ispitivanja najčešće utvrđeno prisustvo rezidua žive (33,3%), dok je učestalost nalaza rezidua kadmijuma bila nešto manja (27,7%) (Slika 1). Prisustvo rezidua žive najčešće je utvrđeno u uzorcima poreklom iz regiona Senta (43,3%), u odnosu na rezultate analize uzoraka iz regiona Vladimirci, gde je utvrđena najmanja zastupljenost rezidua žive (23,3%). Međutim, prosečan sadržaj žive u uzorcima poreklom iz ova dva regiona bio je isti (0,003 mg/kg). Rezultati ispitivanja pokazuju da je prisustvo rezidua kadmijuma najčešće utvrđeno u uzorcima bubrega poreklom iz regiona Vladimirci (40%), dok je najmanja učestalost pojave rezidua kadmijuma zabeležena u uzorcima poreklom iz regiona Bogatić (16,6%). Sadržaj žive u ispitanim uzorcima kretao se u granicama predviđenim Pravilnikom (Pravilnik o količinama..., "Sl. list SRJ", br. 5/92) (0,005-0,055 mg/kg), dok je sadržaj kadmijuma u jednom uzorku poreklom iz regiona Vladimirci bio iznad maksimalno dozvoljene granice (1,23 mg/kg). Osim numeričkih, razlike u sadržaju Cd u ispitanim uzorcima poreklom iz regiona Vladimirci i Senta, kao i razlike u sadržaju Cd u uzorcima poreklom iz regiona Vladimirci i Bogatić, pokazale su se statistički visoko značajne ($p < 0,001$).

Dobijeni rezultati u skladu su sa rezultatima istraživanja drugih autora (Gillian i sar., 1997; Karavoltsos i sar., 2002) i potvrđuju činjenicu da živa predstavlja jedan od najznačajnijih kontaminenata životne sredine (Storelli i Marcotrigiano, 1999). Nizak sadržaj žive i kadmijuma ukazuju na pretežno alimentarnu izloženost životinja, odnosno upotrebu kontaminirane hrane. Živa je često prisutna u ribljem brašnu, dok se kadmijum pojavljuje kao strukturni kontaminant mineralnih hrana. Kadmijum je pored žive najznačajniji i najčešće zastupljen nefrotoksični metal (Friber i sar., 1986; Goyer i Cherian, 1995). Pored zagađene vode i mulja, glavni izvori Cd su industrijski otpad i fosfatna đubriva (Menzer, 1991). U našim ispitivanjima prisustvo olova nije utvrđeno i to se može smatrati rezultatom globalne redukcije njegove primene u industriji. Zbog svoje ekskretorne funkcije i dobre vaskularizovanosti bubrezi predstavljaju ciljno tkivo hronične izloženosti teškim metalima (Friberg i sar., 1986; Goering i sar., 1995). U bubrežnom korteksu i jetri se vezuju za protein metalotionien. Vezivanje toksičnih elemenata za ovaj protein predstavlja ključ njihovog dugog vremena polueliminacije (10 do 30 godina) (Ja-

rup i sar., 1998). Sadržaj toksičnih elemenata u mišićnom tkivu je daleko niži u odnosu na sadržaj u bubrezima i jetri (Kostal, 1986). Hronična trovanja Cd, osim što dovode do oštećenja bubrega, oštećuju jetru, dovode do plućnog emfizema, koštanih oboljenja (osteomalacija i osteoporoza) i kancera različitih organa, posebno bubrega (Waalkes i Misra, 1996).

Zaključak / Conclusion

Rezultati ispitivanja prisustva rezidua OTA i toksičnih elemenata u tkivima zaklanih, tovni svinja poreklom sa različitih lokaliteta Srbije i Vojvodine, potvrđuju prisustvo rezidua OTA i toksičnih elemenata. Najveća zastupljenost rezidua OTA utvrđena je u uzorcima bubrega (33,3%), dok je u uzorcima krvne plazme zastupljenost rezidua OTA bila neznatno niža (31,1%). U pogledu zastupljenosti i sadržaja rezidua OTA u ispitanim tkivima, najmanja zastupljenost i prosečan sadržaj rezidua OTA utvrđen je u uzorcima jetre, gde je prisustvo rezidua OTA utvrđeno u 26,6% uzoraka u količini od 0,22 do 14,5 ng/g. Sadržaj OTA u uzorcima krvne plazme kretao se od 0,22 do 220,8 ng/mL, u odnosu na bubrege gde se sadržaj OTA kretao od 0,17 do 52,5 ng/g. Rezultati naših istraživanja ukazuju da je u 2,2% ispitanih uzoraka bubrega utvrđen sadržaj OTA iznad maksimalno dozvoljene granice (10 ng/g). Prisustvo rezidua žive utvrđeno je u 33,3% uzoraka bubrega, a učestalost nalaza rezidua kadmijuma bila nešto manja (27,7%). Sadržaj žive kretao se u granicama predviđenim pravilnikom (0,005-0,055 mg/kg), dok je sadržaj kadmijuma u jednom uzorku bio iznad predviđene granice. Prisustvo arsena utvrđeno je samo u jednom uzorku, dok prisustvo olova nije utvrđeno.

Iako su dobijene vrednosti sadržaja OTA i toksičnih metala u tkivima niske i u skladu su sa preporukama internacionalnih agencija (SCF, JECFA) o toleranтном dnevnom unosu, treba napomenuti da analiza rizika od mikotoksina i upravljanje ovom vrstom hemijske opasnosti još uvek nije dovoljno razvijeno u našoj zemlji. Sinergističko dejstvo pojedinih kontaminenata životne sredine na zdravlje ljudi i životinja predstavlja nedovoljno istraženu oblast, naročito u uslovima prisustva kontaminenata u niskim koncentracijama zabeleženih u našim ispitivanjima. Iako naša zemlja pripada malobrojnim zemaljama koje regulišu maksimalno dozvoljeni sadržaj OTA u hrani za životinje i životnim namirnicama, neophodno je da se postojeća zakonska regulativa uskladi sa regulativama EU i novim naučnim saznanjima i preporukama međunarodnih organizacija (JECFA, IARK) u pogledu MDK i TDI. Primena integrisanih sistema menadžmenta bezbednosti hrane zasnovanih na standardima serije ISO 22000 predstavljaju osnovne preduslove za bezbednost hrane.

Literatura / References

1. Agency for Toxic Substances and Disease (ATSDR), Toxicological profile for cadmium. Registry, Atlanta, GA, 1999.
2. Bruinink A, Sidler C. The neurotoxic effects of ochratoxin A are produced by protein binding but are not affected by/phenylalanine. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 146: 173-9.
3. Büchmann NB, Hald B. Analysis, occurrence and control of ochratoxin A residues in Danish pig kidneys. *Food Addit Contam* 1985; 2: 193-9.
4. Creppy EE. Human ochratoxicosis. *J Toxicol Toxin Rev* 1999; 18: 277-93.
5. Curtui VG, Gareis M. A simple HPLC method for the determination of the mycotoxins ochratoxin A and B in blood serum of swine. *Food Addit Contam* 2001a; 18(7): 635-43.
6. Curtui VG, Gareis M, Usleber E, Martlbauer E. Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and zearalenone. *Food Addit Contam* 2001; 18: 730-8.
7. Friberg L, Elinder C-G, Kjellstrom T, Nordberg GF (Eds.). *Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal*, 1986. CRC Press, Boca Raton, FL, 1: 103-78.
8. Frisvad JC, Thrane U. Mycotoxin production by common filamentous fungi. In: *Introduction to food-and airborne fungi*. R.A. Samson, E.S. Hoekstra, J. C. Frisvad and O. Filtenborg (eds.). Sixth Edition. Centraalbureau voon Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. ISBN 90-70351-42-0. 2000.
9. Gareis M, Scheuer R. Prevention of mycotoxin contamination of meat and meat products. *Proceedings of International Symposium of Mycotoxicology '99 Mycotoxin Contamination: Health Risk and Prevention Project (Chiba, Japan) Mycotoxins Supplement '99* 1999; 101-7.
10. Goering PL, Waalkes MP, Klaassen CD. Toxicology of cadmium. In: *Goyer, R.A., Cherian, M.G. (Eds.), Toxicology of Metals: Biochemical Aspects. Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer, New York, 1995; 115: 189-213.
11. Goyer RA, Cherian MG. Renal effects of metals. In: *Goyer RA, Klaassen CD, Waalkes MP (Eds.). Metal Toxicology*. Academic Press, San Diego, 389-412, 1995.
12. Gremmels JF, Jahn A, Bloom MJ. Toxicity and metabolism of ochratoxin A. *Natural Toxins* 1995; 3: 214-20.
13. Hagelberg S, Hult K, Fuchs R. Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *J Appl Toxicol* 1989; 9: 91-6.
14. Hult K, Hokby E, Gatenbeck S, Rutquist L. Ochratoxin A in blood from slaughter pigs in Sweden: use in evaluation of toxin content in consumed feed. *Appl and Environ Microbiol* 1980; 39: 822-30.
15. IARC. Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufact Industry. IARC, Lyon Monograph. 58, 1993.
16. IARC: Ochratoxin A. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenetic Risk to Human*, Lyon: IARC Press, 1993; 56: 489-521.
17. Jarup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. Health effects of cadmium a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian Journal of Environmental Health* 1998; 24(1): 1-51.
18. JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Fifty-sixth Meeting, Geneva, Switzerland, 6-15 February, 2001.

19. Jorgensen K, Vahl M. Analysis of ochratoxin A in pig kidney and rye flour using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *Food Addit Contam* 1999; 16: 451-6.
20. Karavoltzos S, Sakellari A, Dimopoulos M, Dasenakis M and Scoullou M. Cadmium content in foodstuffs from the Greek market. *Food Addit Contam* 2002; 19(10): 954-62.
21. Kostal K. Cadmium. Trace Elements in Human and Animal Nutrition. 5th edn. Vol. 2 edited by W. Mertz (San Diego: Academic Press) 1986; 319-45.
22. Krogh P, Elling F, Hald B, Larsen AE, Lillehoy EB, Madsen A, Mortensen HP. Time-dependent disappearance of ochratoxin A residues in tissues of bacon pigs. *Toxicology* 1976; 6: 235-42.
23. Krogh P. Environmental ochratoxin A and Balkan (endemic) nephropathy: Evidence for support of causal relationship. In: Strahinjić S, Stefanović V, ed. Endemic (Balkan) nephropathy, Niš, Yugoslavia, Grafika, 1979; 35-43.
24. Kühn I. Quantitative Untersuchungen zum Transfer und zur Elimination von Ochratoxin A bei wachsenden Schweinen nach langfristiger oraler Applikation. *Landbau-forschung völknerode, Sonderheft* 1993; 137.
25. Larsen TO, Svendsen A, Smedsgaard J. Biochemical characterisation of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Appl And Environ Microbiol* 2001; 67: 3630-5.
26. Lusky K, Tesch D, Göbel R, Haider W. Gleichzeitige Verabreichung der Mykotoxine Ochratoxin A und Zearalenon über das Futter an Schweine- Einfluß auf, 1997.
27. Madsen A, Mortensen HP, Hald B. Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs Part 2: Naturally contaminated barley given for 6 weeks from 20 kg compared with normal barley supplemented with crystalline ochratoxin A and/or citrinin. *Acta Agriculture Scandinavica* 1982; 32: 369-72.
28. Matrella R, Monaci L, Milillo MA, Palmisano F, Tantillo MG. Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. *Food control* 2006; 17: 114-7.
29. Menzer RE. The basic Science of Poisons. 4th ed. Mc Graw – Hill, New York 1991.
30. Milićević D, Jurić V, Mandić M, Đorđević M. The presence of ochratoxin A residue in blood plasma of slaughtered swine. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, Novi Sad 2007; 113: 55-62.
31. Mortensen HP, Hald B, Madsen A. Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. 5. Ochratoxin A in pigs blood. *Acta Agric Scand* 1983; 33: 235-9.
32. Pravilnik o količinama pesticide, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemoterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama ("Sl. list SRJ", br. 5/92, 11/92 - ispr. i 32/2002).
33. Schwartz GG. Hypothesis: Does ochratoxin A cause testicular cancer? *Cancer cause and Control* 2002; 19: 91.
34. Scientific Committee on Food (SCF). Opinion on Ochratoxin A. CS/CNTM/MYC/14 final (September), 1998.
35. Sinovec Snežana. Patohistološke i ultrastrukturalne promene u jetri i srcu pacova tretiranih T-2 toksinom i procena mogućnosti njihove restitucije. Doktorska disertacija, Veterinarski fakultet, Beograd, 1996.
36. Stoev SD, Grozeva N, Hald B. Ultrastructural and toxicological investigations in spontaneous cases of porcine nephropathy in Bulgaria. *Vet Arhiv* 1998; 68: 39-49.

37. Storelli MM, Marcotrigiano GO. Cadmium and total mercury in some cephalopods from the South Adriatic Sea (Italy). *Food Addit Contam* 1999; 16(6): 261-5.
38. UNEP/GEMS, The contamination of food. Mercury. *Environmental Library*, 1992; 5: 22-4.
39. Waalkes MP, Misra RR. Cadmium carcinogenicity and genotoxicity. In: Chang, L. (Ed.), *Toxicology of Metals*. CRC Press, Boca Raton, 1996; 231-44.
40. WHO/IPCS, Safety evaluation of certain mycotoxins in food. 2001.
41. Ysart G, Miller P, Croasdale M, Crews H, Robb P, Baxter M, de L'Argy C, Harrison N. 1997 UK Total Diet Study dietary exposures to aluminum, arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, mercury, nickel, selenium, tin and zinc. *Food Addit Contam* 2000; 17(9): 775-86.

ENGLISH

PRESENCE OF OCHRATOXIN A AND TOXIC ELEMENTS RESIDUE IN TISSUES AND THEIR IMPACT ON SAFETY OF PORK

D. Milićević, M. Jovanović, Verica Jurić, Aleksandra Daković, S. Stefanović, Z. Petrović

The aim and task of this study was to determine the presence of ochratoxin A (OTA) in blood serum, liver and kidneys of fattening swine, slaughtered regularly, originating from different areas of Serbia. During meat inspection on the slaughterhouse line samples of blood, kidney and liver per animal were randomly sampled (n=90) and analyzed by HPLC for ochratoxin A. Also, the presence of nephrotoxic (cadmium, lead, mercury and arsenic) elements in kidneys was carried out. Of the 90 liver samples, 26.6% contained OTA in the range of 0.22-14.5 ng/g, while the incidence of OTA in serum and kidney samples were very similar (31 and 33.3%, respectively). The analyses showed that serum samples were positive in the range of 0.22-221 ng/mL, while ochratoxin A concentrations in the kidney were between 0.17 and 52.5 ng/g. The mean distribution of OTA residue followed the pattern: serum>kidneys>liver (100>34>17), while in respect to occurrence it followed the pattern: kidneys>serum>liver (100>93.4>79.9). The results of this study showed that 2.2% of kidney sample had a content of ochratoxin A above the maximum permitted limit in Serbia of 10 ng/g. The results from this survey indicated that there was a low correlation between the OTA level in serum and liver as well as in the OTA level in kidney and liver ($r=0.319$ and 0.341 , respectively) while the strongest correlation was found between the OTA level in serum and in kidney ($r=0.973$).

The presence of mercury was found in 33.3% of kidney samples in the range of 0.005-0.055 mg/kg, while the presence of cadmium was found to a lesser degree (27.7%). The Hg concentrations in the kidney samples were lower than 0.10 mg/kg and did not exceed the guideline level established in Serbia, while concentration of cadmium in only one kidney sample was greater than 1.0 mg/kg, and exceeded the limit proposed by the Serbian Rule Book. The presence of arsenic was found only in one sample, while the presence of lead was not established. This study shows the presence of OTA in Serbian slaughtered pigs at levels comparable to those reported in other countries.

Key words: swine, ochratoxin A, toxic elements, residue

ВЛИЯНИЕ ПРИСУТСТВИЯ ОСТАТКОВ ОХРАТОКСИНА А И ТОКСИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ В ТКАНЯХ НА БЕЗОПАСНОСТЬ СВИНОГО МЯСА

**Д. Миличевич, М. Йованович, Верица Юрич, Александра Дакович,
С. Стефанович, З. Петрович**

Цель этой работы была утвердить присутствие остатков охратоксина А (ОТА) и токсических элементов (кадмий, свинец, ртуть и мышьяк в тканях убитых, откормочных свиней, происхождением из различных регионов Сербии. В течение ветеринарно-санитарного осмотра убитых свиней на линии убоя, методом случайного образчикования браны образчики крови, а затем принадлежащая печень и почки, отвечающего животного (n=90). Присутствие остатков ОТА утверждено нами в 26,6% образчиков печени в количестве от 0,22 до 14,5 нг/г, пока представленность остатков ОТА в образчиках кровяной плазмы и почек была почти идентичная (31,1 и 33,3%, по отдельности). Содержание ОТА в образчиках кровяной плазмы двигалось от 0,22-220,8 нг/мл, пока в образчиках почек двигалось от 0,17-52,2 нг/г. Дистрибуция ОТА в испытанных тканях в отношении содержания двигалась следующей очередностью: кровяная плазма>почки>печень (100>34>17), пока в отношении представленности остатков двигалась следующей очередностью почки>кровяная плазма>печень (100>93,4>79,9). Результаты наших исследований указывают, что в 2,2% испытанных образчиков почек утверждено нами содержание ОТА сверх максимально разрешенной границы (10 нг/г). Низкая степень положительной корреляции утверждена нами между содержанием ОТА в кровяной плазме и печени ($r=0,319$), словно и между содержанием ОТА в печени и почках ($r=0,314$). Очень высокая степень положительной корреляции утверждена нами между содержанием ОТА в кровяной плазме и почках ($r=0,973$).

Присутствие остатков ртути утверждено нами в 33,3% образчиков почек, в отношении частоты результатов остатков кадмия, которая была немного меньше (27,7%). Содержание ртути двигалось в границах, предвиденных регламентом (0,005-0,055 мг/кг), пока содержание кадмия в одном образчике было сверх максимально разрешенной границы (1,23 мг/кг). Присутствие мышьяка утверждено нами только в одном образчике, пока присутствие свинца не утверждено.

Ключевые слова: свиньи, охратоксин А, токсические элементы, остатки

**SAVREMENI TRENDОВI U BEZBEDNOSTI HRANE:
REZISTENCIJA ZOONOTSKIH PATOGENA PREMA
ANTIMIKROBNIM LEKOVIMA***
*CONTEMPORARY FOOD SAFETY TRENDS: ANTIMICROBIAL
RESISTANCE IN ZOONOTIC PATHOGENS*

Jelena Petrović, Dubravka Milanov, R. Ratajac**

Upotreba antimikrobnih lekova u profilaksi i terapiji životinja čiji se proizvodi koriste u ishrani ljudi dovela je do pojave ozbiljnog problema vezanog za rezistenciju zoonotskih bakterija. Danas je vrlo aktuelan problem razvijanja rezistencije patogenih sojeva bakterija još u organizmu životinje i prenošenje rezistentnih bakterija od životinja putem namirnica na ljude, kao i pojava oboljenja ljudi koja se zbog rezistencije teško mogu lečiti. Campylobacter spp. i Salmonella spp. su najčešći patogeni koji se prenose hranom, a upravo kod njih je ustanovljen porast broja rezistentnih sojeva. Monitoring program za praćenje rezistencije još uvek ne postoji u Srbiji. Zato su u okviru više projekata Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad", koje je finansiralo Ministarstvo poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva Srbije – Uprava za veterinu, izvršena pilot ispitivanja raširenosti rezistencije kod zoonotskih patogena izolovanih iz namirnica. Izvršenim ispitivanjima je ustanovljena situacija vrlo slična onoj u Evropskoj uniji. Rezistencija prema jednom ili više antimikrobnih lekova je ustanovljena kod 25,00%–40,58% Salmonella spp. i 40,00%–75,32% Campylobacter spp. sojeva izolovanih sa klanično obrađenih trupova svinja i živine. Kontrola zoonotskih patogena u hrani mora biti primenjena u kompletnom sistemu, počev od primarne proizvodnje, preko klanične obrade i distribucije hrane sve do gotovog jela u tanjiru konzumenta tzv. farm-to-fork sistem (eng.), odnosno od farme do viljuške.

Ključne reči: bezbednost hrane, rezistencija, antimikrobni lekovi

* Rad saopšten na simpozijumu "Bezbednost namirnica animalnog porekla", Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd 16 i 17. oktobar 2008. godine

** Dr sci. med. vet. Jelena Petrović, naučni saradnik, dr sci. med. vet. Dubravka Milanov, istraživač saradnik, mr sci. med. vet. Radomir Ratajac, istraživač saradnik, Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad

Uvod / Introduction

Većina antimikrobnih lekova koja se koristi u terapiji životinja pripada istim grupama kao antimikrobni lekovi koji se koriste u humanoj terapiji. Neki antimikrobni lekovi (enrofloksacin, flumekvin) koji su razvijeni samo za upotrebu u veterinarskoj medicini pripadaju istoj grupi kao i humani lekovi (fluorohinoloni), dok se drugi antimikrobni lekovi koriste podjednako i u humanoj i u veterinarskoj medicini (kloksacilin, dikloksacilin, gentamicin, ampicilin, amoksicilin). Ovi podaci su bitni za problematiku antimikrobne rezistencije obzirom da je dobro poznato da rezistencija prema jednom leku iz grupe može predstavljati rezistenciju prema celoj podgrupi ili grupi antimikrobnih lekova (beta laktamski antibiotici, makrolidi, linkozamidi), (EFSA, 2008).

Upotreba antimikrobnih lekova kod životinja namenjenih za proizvodnju hrane može dovesti do razvijanja rezistencije kod bakterija u organizmu tretiranih životinja i mogućeg prenosa kroz lanac ishrane na čoveka. Razvijanje rezistencije kod Enterobakterija prema veterinarskim antibioticima je osnovni faktor preživljavanja ovih mikroorganizama u njihovom prirodnom okruženju. Aplikovanje lekova ne samo da dovodi do razvijanja rezistencije prema primenjenom leku, već multirezistentni fenotipovi imaju selekcionu prednost. Danas je vrlo aktuelna rezistencija prema fluorohinolonom, cefalosporinima treće i četvrte generacije kao i prema makrolidima, s obzirom na to da su ovi lekovi neophodni u terapiji sistemskih bakterijskih infekcija kod ljudi.

Zoonoze koje se najčešće javljaju u Evropi su alimentarna oboljenja izazvana bakterijama iz roda *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Listeria* itd. Rezistencija *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. danas ima veliki značaj za bezbenost hrane s obzirom na to da se upravo ovi patogeni najčešće prenose alimentarnim putem (kontaminirano živinsko meso, jaja, svinjsko i goveđe meso). U USA i Holandiji je ustanovljena korelacija između uvođenja fluorohinolona u terapiju bolesti živine i značajnog povećanja broja rezistentnih *C. jejuni* izolovanih iz živih jedinki, sa mesa živine i od obolelih ljudi. Šta više, pre uvođenja fluorohinolona u terapiju obolele živine nije bilo prijavljenih rezistentnih sojeva izolovanih kod ljudi koji prethodno nisu bili lečeni ovim lekovima (Piddock, 1998; Endtz i sar., 1991; Engberg, 2001). Upotreba avoparcina kao dodatka hranivima u industrijskoj proizvodnji živine i svinja u Danskoj je dovela do pojave vankomicin rezistentnih enterokoka u crevima svinja i živine (80% živine) ali i crevima ljudi koji su konzumirali namirnice poreklom od ovih životinja. Nakon zabrane upotrebe avoparcina 1995, učestalost nalaza vankomicin rezistentnih enterokoka je pao na 3% (Prescott i sar., 2000). U Velikoj Britaniji je nakon izbijanja velike epidemije izazvane sa rezistentnom *S. Typhimurium* DT29 tokom 1963-65. godine, Švanov komitet predložio da se kao promoteri rasta mogu koristiti samo oni antimikrobni lekovi koji imaju malu ili nikakvu terapijsku upotrebu kod ljudi i životinja, i koji neće uticati na efikasnost terapijskog leka u smislu razvijanja rezistencije. Takođe, komisija je preporučila da se terapijski antimikrobni lekovi mogu koristiti u lečenju

životinja samo ako ih propiše veterinar (Aarestrup, 1999). Na žalost, ovaj vodič nije prihvaćen i antibiotici su selektovali široko rasprostranjenu rezistenciju među bakterijama koje dovode do pojave oboljenja i ljudi i životinja.

Od januara 2006. godine upotreba svih antimikrobnih lekova kao aditiva za hranu za životinje je zabranjena u EU upravo da bi se redukovao broj rezistentnih bakterija kod farmских životinja (Regulation (EC) No 1831/2003). Efekti ove zabrane na raširenost antimikrobne rezistencije kod farmских životinja, ali i pozitivan uticaj na zdravlje ljudi još uvek nisu poznati (EFSA, 2008). WHO, FAO, uključujući Codex Alimentarius i OIE su obrađivali ovu oblast i obezbedili vodiče, preporuke i liste klinički značajnih antimikrobnih lekova. Najnovija aktivnost u ovoj oblasti je "Codex Task Force" eng. (radna grupa kodeksa alimentariusa), koja ima za cilj da izvrši analizu rizika za zdravlje ljudi vezanu za prisustvo organizama rezistentnih prema antimikrobnim lekovima, gena vezanih za antimikrobnu rezistenciju i rezidua antimikrobnih lekova u namirnicama i hrani za životinje kao i da donese preporuke za upravljanje ovim rizikom.

Rezistencija patogena koji se prenose hranom / *Resistance of food-borne pathogens*

Iako različite vrste hrane mogu biti izvor alimentarnih oboljenja ipak su meso i proizvodi od mesa najvažniji izvor *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp. Ova dva patogena su najčešće prijavljeni uzročnici zoonotskih bolesti. U EU je u 2005. godini ustanovljena incidenca od 38,2–51,6 slučajeva na 100 000 stanovnika (EFSA, 2005). Ove bakterije su prijavljene kod svih životinja koje se uzgajaju radi proizvodnje mesa, ali su u Evropi najviše raširene u populaciji živine. *C. jejuni* je čest komensal kod živine i goveda dok je *C. coli* više prisutan kod svinja i živine. Kod životinja proizvođača crvenog mesa *Salmonella* spp. je najčešće izolovana kod svinja, a zatim i kod goveda. Meso živine kao i jaja predstavljaju važan izvor humanih infekcija izazvanih sa *Salmonella* spp. *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* su najčešće prijavljeni sojevi izolovani kod humane salmoneloze i iz proizvoda od mesa živine. Najčešći način da ljudi budu inficirani sa zoonotskim entero-patogenima je putem ingestije hrane kontaminirane animalnim fecesom. Ovakva kontaminacija obično nastaje u preradi mesa. Oralna medikacija velike grupe životinja naročito lako favorizuje nastanak i širenje rezistentnih mikroorganizama. Pored toga nepovoljni uslovi animalne proizvodnje kao što su prenaseljenost, slaba ventilacija, slaba ishrana i neadekvatna kontrola bolesti olakšavaju širenje bakterija. Alimentarna oboljenja izazvana sa *Salmonella* spp. i termofilnim *Campylobacter* spp. obično ne zahtevaju antimikrobnu terapiju, ali u slučajevima imuno-deficijentnih pacijenata (deca, stari i bolesni) terapija je neophodna i tada se obično koriste eritromicin i ciprofloksacin (Smith i sar., 1999).

Raširenost rezistencije među patogenima koji se prenose hranom *Spread of resistance among food-borne pathogens*

Rezistencija patogena koji se prenose hranom prema antimikrobnim lekovima je čest problem u evropskim zemljama. Monitoring program u EU obuhvata potrošnju antimikrobnih lekova u veterinarskoj medicini, ali i raširenost rezistencije kod humanih i zoonotskih patogena (Tabela 1).

Tabela 1. Raširenost rezistentnih sojeva *Campylobacter* spp. i *Salmonella* spp. izolovanih iz hrane (Mayhofer i sar., 2004; MARAN, 2002)
Table 1. Distribution of resistant strains of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp isolated from food (Mayhofer et al., 2004; MARAN, 2002)

Antimikrobni lek / <i>Antimicrobial medicine</i>	Raširenost rezistentnih sojeva (%) / Distribution of resistant strains (%)			
	Austrija / <i>Austria</i>		Holandija / <i>The Netherlands</i>	
	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Campylobacter</i> spp.
Fluorohinoloni / <i>Fluoroquinolones</i>	42,0	40,7	32,7	26,9
Tetraciklini / <i>Tetracyclines</i>	33,0	/	21,5	57,1
Streptomycin / <i>Streptomycin</i>	27,0	9,7	0,0	51,3
Ampicilin / <i>Ampicillin</i>	17,0	8,6	43,9	16,8
Eritromicin / <i>Erythromycin</i>	/	4,0	0,1	34,5
Gentamicin / <i>Gentamicin</i>	/	1,5	0,0	16,8
Hloramfenikol / <i>Chloramphenicol</i>	/	0,7	0,0	0,0
Trimetoprim / <i>Trimetoprim</i>	/	/	58,9	/
Trim/Sulfametoksaz / <i>Trim/Sulfamethoxaz</i>	/	/	48,6	37,0
Florfenikol / <i>Florfenicol</i>	/	/	0,9	0,0
Metronidazol / <i>Metronidazole</i>	/	/	/	37,8

Monitoring program se još uvek ne primenjuje u Srbiji, zato je Uprava za veterinu Ministarstva za poljoprivredu, šumarstvo i vodoprivredu finansirala tri projekta Naučnog instituta za veterinarstvo Novi Sad da bi se stekao uvid u situaciju u našoj zemlji.

1. Ispitivanje antimikrobne rezistencije bakterijskih vrsta: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. i *E. coli* iz kliničkih uzoraka poreklom od živine i svinja: ugovor br. 401-00-02380/2004. Novi Sad, Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", 2005.

2. Monitoring raširenosti rezistentnih zoonotskih bakterija u klaničnoj obradi brojlera. Ugovor broj 104-00-6733/2005-05. Novi Sad, Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", 2006.

3. Monitoring raširenosti rezistentnih zoonotskih bakterija na trupovima klanično obrađenih svinja. Ugovor br. 401-00-13675/2006-05. Novi Sad, Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", 2007.

Na osnovu izvršenih ispitivanja ustanovljena je situacija slična onoj u EU. Raširenost *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp. je vrlo velika i na trupovima živine i na trupovima svinja (Tabele 2 i 3). Raširenost bakterija na klanično obrađenim trupovima varira u zavisnosti od velikog broja faktora: organizma, geografskih faktora, uslova uzgoja životinja i klanja i prerade mesa. U nekoliko studija je prikazano da živina biva kontaminirana sa *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp. još na nivou farme (Stojanov i Orlić, 2000; Stojanov i Orlić, 2001). Ovi zoonotski patogeni u objektu za klanje i preradu mesa mogu kontaminirati radnu sredinu, opremu i finalni proizvod. Uticaj uzgojnih uslova na farmi i proizvodnih uslova u klanici je veliki s obzirom na to da su sojevi *Campylobacter* spp. u nekim klanicama izolovani svega sa 11,43% trupova živine, a u drugim objektima čak sa 90,00% trupova. Slična situacija je ustanovljena i u objektima za klanje svinja.

Tabela 2. Raširenost *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp. na trupovima svinja (Petrović i sar., 2007a)

Table 2. Distribution of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in pig carcasses (Petrovic et al., 2007a)

Raširenost patogena na trupovima (%) / Distribution of pathogens on carcasses (%)	Oznaka klanice / <i>Abattoir</i>				
	A	B	C	D	E
<i>Salmonella</i> spp.	1,85	6,06	3,70	1,85	0,00
<i>Campylobacter</i> spp.	3,70	22,22	14,81	5,55	1,85

Tabela 3. Raširenost *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp. na trupovima živine (Petrović i sar., 2007b)

Table 3. Distribution of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in poultry carcasses (Petrovic et al., 2007b)

Raširenost patogena (%) / Distribution of pathogens (%)		Oznaka klanice / <i>Abattoir</i>						
		A	B	C	D	E	F	G
<i>Salmonella</i> spp.	jetra / <i>liver</i>	22,86	32,50	11,43	6,00	60,00	20,00	3,70
	trup / <i>carcass</i>	2,86	5,00	5,71	2,00	8,57	2,86	0,00
<i>Campylobacter</i> spp.	jetra / <i>liver</i>	40,00	5,00	8,56	6,00	34,28	2,86	5,71
	trup / <i>carcass</i>	90,00	14,28	51,43	20,01	68,57	11,43	31,43

Rezistentni sojevi *Salmonella* spp. su izolovni sa 40,57% trupova živine i 25,0% trupova svinja (tabela 4). Rezistencija je najčešće ustanovljena prema amoksicilinu i sulfametoksazolu. Većina izolovanih sojeva *S. Enteritidis* je bila senzitivna (66,67% sojeva poreklom od živine odnosno svi sojevi 100% poreklom od svinja). Samo jedan soj je bio rezistentan prema tri antimikrobna leka: doksiklin, hloramfenikol i sulfametoksazol. Ustanovljena rezistencija prema hloram-

fenikolu je važna činjenica s obzirom na to da je ovaj lek zabranjen za upotrebu kod životinja za proizvodnju hrane. Pošto *S. Typhimurium* izaziva daleko ozbiljnije posledice po zdravlje ljudi u odnosu na *S. Enteritidis*, alarmanтна informacija je da je raširenost rezistencije kod izolovanih sojeva *S. Typhimurium* veoma visoka; 76,92% sojeva *S. Typhimurium* izolovanih iz živine i 33,33% sojeva izolovanih iz svinja su bili rezistentni. Sojevi izolovani od obe vrste životinje su najčešće bili rezistentni prema amoksicilinu i sulfametoksazolu. Slične podatke su ustanovili i drugi autori. Prema MARAN izveštaju 2002. godine u Holandiji sojevi *Salmonella* spp. izolovani iz hrane su najčešće bili rezistentni prema amoksicilinu, doksiciklinu, trimetoprimu i sulfametoksazolu.

Tabela 4. Raširenost rezistentnih sojeva *Campylobacter* spp. i *Salmonella* spp. izolovanih sa trupova živine i svinja (Petrović i sar., 2007a)

Table 4. Distribution of resistant strains of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. isolated from carcasses of poultry and pigs (Petrovic et al., 2007a)

Antimikrobni lek / Antimicrobial medicine	Rezistentni sojevi (% izolovanih) / Resistant strains (% isolated)			
	<i>Salmonella</i> spp.		<i>Campylobacter</i> spp.	
	Trupovi živine / Poultry carcasses	Trupovi svinja / Pig carcasses	Trupovi živine / Poultry carcasses	Trupovi svinja / Pig carcasses
Amoksicilin / <i>Amoxicillin</i>	23.19	25.00	40.51	10.00
Cefuroksim / <i>Cefuroxime</i>	0.00	0.00	/	/
Imipenem / <i>Imipenem</i>	0.00	0.00	1.90	0.00
Gentamicin / <i>Gentamicin</i>	7.25	0.00	5.69	0.00
Doksiciklin / <i>Doxycycline</i>	4.35	0.00	8.23	0.00
Trimetoprim / <i>Trimetoprim</i>	0.00	0.00	48.73	0.00
Ciprofloksacin / <i>Ciprofloxacin</i>	0.00	0.00	46.20	0.00
Hloramfenikol / <i>Chloramphenicol</i>	1.45	0.00	0.00	0.00
Streptomycin / <i>Streptomycin</i>	5.80	0.00	16.46	40.00
Sulfametoksazol / <i>Sulfamethoxazole</i>	13.04	25.00	8.23	30.00
Eritromicin / <i>Erythromycin</i>	/	/	7.59	0.00

Campylobacter spp. je znatno češće izolovan sa trupova svinja u odnosu na *Salmonella* spp. Raširenost kampilobakterija na trupovima je u velikoj meri varirala po objektima. Samo su sojevi *C. coli* izolovani sa trupova svinja dok su na trupovima živine dominirali sojevi *C. jejuni* (89,87% svih izolovanih sojeva *Campylobacter* spp). Rezistencije je češće ustanovljena kod izolovanih *Campylobacter* spp. u odnosu na *Salmonella* spp.; 75,32% sojeva *Campylobacter* spp. izolovanih sa trupova živine i 40,00% sojeva izolovanih sa trupova svinja su bili rezistentni. Multipla rezistencija je ustanovljena kod 75% izolovanih sojeva *Campylobacter* spp. poreklom sa trupova svinja i kod 82.79% sojeva poreklom sa tru-

pova živine. Sojevi *Campylobacter* spp. izolovani sa trupova svinja su najčešće bili rezistentni prema amoksicilinu, streptomycinu i sulfametoksazolu, dok su sojevi *Campylobacter* spp. izolovani sa trupova živine najčešće bili rezistentni prema trimetoprimu 48,73%, ciprofloksacinu 46,20%, i amoksicilinu 40,51%. Rezistencija prema eritromicinu (7,59% sojeva) ima poseban značaj obzirom da je on lek prvog izbora u terapiji humanih enteričnih infekcija izazvanih sa *C. jejuni* i *C. coli*.

Sojevi izolovani sa trupova živine prema holandskom MARAN (2002) izveštaju, kao i u našoj studiji, su pokazali da *Salmonella* pokazuje najčešće rezistenciju prema amoksicilinu, a sojevi *Campylobacter* spp. prema trimetoprimu i ciprofloksacinu. Rezistencija izolovanih *Campylobacter* spp. i *Salmonella* spp. sojeva ustanovljena u ovoj studiji je u korelaciji sa antimikrobnim lekovima koji se najčešće koriste u veterinarskoj medicini u Srbiji (beta-laktamski antibiotici i fluorohinoloni). Iako je obrazac multiple rezistencije varijabilan, velika raširenost multiple rezistencije kod izolovanih sojeva *Campylobacter* spp. ukazuje na to da treba preduzeti striktno mere koje bi osigurale pravilnu upotrebu antimikrobnih lekova u lečenju životinja. U našoj zemlji upotreba antimikrobnih lekova je vrlo liberalna i zato se javljaju različiti vidovi nepravilne upotrebe: upotreba od strane nestručnih lica, kod oboljenja i vrsta (kategorija) životinja za koje primenjeni antimikrobni lekovi nemaju indikacije, predoziranje, a naročito subdoziranje, neadekvatna dužina aplikovanja leka, upotreba antimikrobnih lekova kao prečice za rešavanje uzgojnih problema.

Životinje i hrana animalnog porekla imaju važnu ulogu u prenošenju kampilobakterioze i salmoneloze na čoveka zato je neophodno primeniti epidemiološki nadzor i preventivne mere kojima se može izbeći rasejavanje rezistentnih sojeva u animalnoj i humanoj populaciji.

Zaključak - kontrolne strategije / Conclusion – control strategies

Da bi se smanjio broj rezistentnih patogena partneri počev od farmara, veterinara, prerađivača mesa, lekara, državnih organa uprave pa sve do potrošača treba da rade zajedno da bi sprečili nepravilnu i preteranu upotrebu antimikrobnih lekova.

U primarnoj proizvodnji treba primeniti principe preduslovnih programa koji podrazumevaju primenu GHP i GMP tj. Dobre higijenske i Dobre proizvodne prakse. Na taj način će biti sprečena, odnosno značajno umanjena pojava i širenje oboljenja među životinjama a samim tim i potreba za antimikrobnom terapijom. Ukoliko je terapija neophodna mora se aplikovati samo na pravilan način uz nadzor veterinara. U objektima za klanje i preradu mesa primenom preduslovnih programa i HACCP koncepta može biti značajno umanjena mogućnost kontaminacije mesa sadržajem digestivnog trakta odnosno rezistentnim zoontskim patogenima. Takođe, pravilna primena HACCP omogućuje sprečavanje umnožavanja zoonotskih patogena i treba da bude aplikovana u daljoj distribuciji mesa.

Osim preventivnih i kontrolnih mera u primarnoj proizvodnji i preradi mesa neophodno je da se uvede sistem nadzora i kontrole distribucije, aplikacije veterinarskih lekova kao i adekvatan monitoring rezistencije odnosno monitoring svih podataka relevantnih za problematiku rezistencije. EU reguliše uslove i načine sprovođenja monitoringa putem Direktive 2003/99EC. Takođe 2001. godine WHO je objavila Globalnu strategiju za ograničavanje antimikrobne rezistencije gde su navedene preporuke i uputstva za pacijente, lekare, javnost i farmaceute.

Literatura / References

1. Aarestrup F. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int J of Antimicrob Agents* 1999; 12: 279-85.
2. EFSA Report of the EFSA Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to *Campylobacter* in animals and foodstuffs. Annex to The EFSA Journal 2005; 173: 1-105.
3. EFSA. Foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. Draft Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards (Question No EFSA-Q-2007-089). Draft endorsed on 6 March 2008.
4. Endtz H, Ruijs G, Van Klingeren B, Jansen W, Van der Reyden T, Mouton R. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27(2): 199-208.
5. Engberg J, Aarestrup F, Taylor D, Gerner-Smidt P, Nachamkin I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerging Infectious Diseases* 2001; 7(1): 24-34.
6. MARAN. 2002. Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2002. www.vwa.nl
7. Mayrhofer S, Paulsen P, Smulders F, Hilbert F. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. *Int J of Food Microbiol.* 2004; 87(1): 23-9.
8. Petrović J, Baltić M, Kljajić R, Kapetanov M. Rezistencija zoonotskih patogena koji potiču iz mesa živine prema antimikrobnim lekovima. *Tehnologija mesa* 2007; 301:147-52.
9. Petrović J, Karabasil N, Baltić M, Kljajić R, Dimitrijević M, Krasić J. Ispitivanje osetljivosti na različite antimikrobne lekove sojeva salmonela izolovanih u lancu proizvodnje mesa živine i svinja. Zbornik radova 1. Međunarodni kongres Tehnologija, kvalitet i bezbednost hrane [i] I Simpozijum biotehnologije i mikrobiologije hrane; 2007 Nov 13-15; Novi Sad, Institut za prehrambene tehnologije: 105-11.
10. Piddock L. Quinolone-resistant campylobacter in the United Kingdom. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. Report and Proceedings of a WHO Meeting; 1998 June 2-5; Geneva, Switzerland: 189-98.
11. Prescott JF, Baggot JD, Walker R. Fluoroquinolones. In: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, editors, *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, Third Edition, Ames: Iowa State University Press, 2000: 315-39.

12. Smith K, Besser J, Hedberg C, Leano F, Bender J, Wicklund J, Johnson B. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. Investigation Team. N Engl J Med 1999; 340(20): 1525-32.
13. Stojanov I, Orlić D. Infections in parental flock and eggs on *Campylobacter* and *Salmonella* strains. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke 2000; 101: 101-7.
14. Stojanov I, Orlić D. Types of *Campylobacter* strains in laying hens with or without diarrhoea. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke 2001; 98: 61-6.

ENGLISH

CONTEMPORARY FOOD SAFETY TRENDS: ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN ZOONOTIC PATHOGENS

Jelena Petrović, Dubravka Milanov, R. Ratajac

Antimicrobial resistance is a daunting public health threat affecting both human and animal health and it is a cause for concern wherever antimicrobial agents are in use. The usage of antimicrobial drugs in food producing animals could result in a significant food safety issue – antimicrobial resistance among zoonotic bacteria in these animals. The resistant bacteria may then be transmitted to humans through the food supply and increase risk of treatment failures. *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. are two examples of food borne pathogens in which increasing resistance gives rise to concern. No monitoring program has been applied in Serbia. Therefore, the Veterinary Directorate of the Ministry of Agriculture financed three projects of the Scientific Veterinary Institute "Novi Sad" to screen the spread of resistant food borne pathogens. The examinations have shown a similar situation as in the EU. Resistance to one or more antimicrobial drugs was found in 25-40.58% *Salmonella* spp. and 40-75.32% *Campylobacter* spp. isolates from poultry and pig carcasses. Zoonotic pathogens in food have to be controlled through a complete, continuous farm-to-fork system. Application of prophylactic and sanitary measures in farm breeding, slaughtering, food distribution and preparation of food in the kitchen may considerably reduce risk from the incidence of resistant zoonotic pathogens.

Key words: food safety, antimicrobial resistance

РУССКИЙ

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В БЕЗОПАСНОСТИ КОРМА: СОПРОТИВЛЕНИЕ ЗООНОТИЧЕСКИХ ПАТОГЕНОВ К АНТИМИКРОБНЫМ ЛЕКАРСТВАМ

Елена Петрович, Дубравка Миланов, Р. Ратајач

Употребление антимикробных лекарств в профилактике и терапии животных чьи продукты пользуются в питании людей привело до явления серьезной проблемы, связанной для сопротивления зоонотических бактерий. В настоящее время очень актуальная проблема развития сопротивления патогенных штаммов бактерий ещё в организме животного и переноска сопротивляемых бактерий от животных путём пищевых продуктов на людей, словно и явление заболеваний

людей, которые из-за сопротивления тяжело могут лечиться. *Campylobacter spp.* и *Salmonella spp.* самые частые патогены, переносимые кормом а именно у них установлен рост числа сопротивляемых штаммов. Мониторинг программа для слежки сопротивления всё ещё не существует в Сербии потому в рамках больше проектов Научного института для ветеринарии "Нови Сад", которые финансировало Министерство сельского хозяйства, водного хозяйства и лесоводства Сербии - Управление для ветеринарии, совершены пилот испытания расширённости сопротивления у зоонотических патогенов, изолированных из пищевых продуктов. Современными испытаниями установлена ситуация очень подобная той в Европейской Унии. Сопротивление к одному или больше антимикробных лекарств установлено у 25,00-40,58% *Salmonella spp.* и 40,00-75,32% *Campylobacter spp.* штаммов, изолированных с бойней, обработанных туловищей свиней и домашних птиц. Контроль зоонотических патогенов в корме должен быть применён в комплектной системе начав от первичного производства, через бойню обработку и дистрибуцию корма всё до готового блюда в тарелке потребителя так называемая *farm-to-fork* система (англ.) то есть от фермы до вилки.

Ключевые слова: безопасность корма, сопротивление, антимикробные лекарства

**MONITORING REZIDUA U ŽIVOTINJAMA I PRIMARNIM
PROIZVODIMA ANIMALNOG POREKLA***
*MONITORING RESIDUE IN ANIMALS AND PRIMARY PRODUCTS OF
ANIMAL ORIGIN*

S. Janković, Aurelija Spirić, Tatjana Radičević, S. Stefanović**

Cilj kontrole i sistematskog praćenja (monitoringa) rezidua je da se, ispitivanjem odgovarajućeg broja uzoraka, obezbedi efikasno praćenje nivoa rezidua u tkivima i organima životinja kao i u primarnim proizvodima animalnog porekla. Time se stvara mogućnost za blagovremeno preduzimanje mera u cilju obezbeđivanja bezbednosti hrane životinjskog porekla i zaštite javnog zdravlja. Rezidue mogu biti posledica neadekvatnog korišćenja lekova u veterinarskoj medicini i pesticida u poljoprivredi i veterini kao i zagađenja okoline toksičnim elementima, dioksinima, polihlorovanim bifenilima i dr. Monitoring rezidua u Srbiji sprovodi se od 1972. godine, a 2004. godine značajnim ulaganjima Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, nacionalni monitoring doveden je do nivoa koji postoji u zemljama članicama EU. O tome svedoče i direktive EU, kojima je našoj zemlji dozvoljen izvoz svih vrsta mesa i primarnih proizvoda animalnog porekla koji su obuhvaćeni Programom monitoringa rezidua. Program sistematskog ispitivanja rezidua usaglašen je sa zahtevima Evropske unije, kako po vrsti ispitivanih supstanci, tako i po broju uzoraka i primenjenim analitičkim tehnikama. Pored razvoja metoda i uključivanja novih štetnih supstanci u monitoring program, neophodno je i usaglašavanje nacionalnih propisa, kojim se definišu maksimalno dozvoljene količine pojedinih lekova i kontaminenata, sa regulativom EU, kako bi se efikasnije štitilo zdravlje potrošača, a naša zemlja ravnopravno učestvovala u međunarodnoj trgovini.

Gljučne reči: monitoring, rezidue, primarni proizvodi animalnog porekla

* Rad saopšten na simpozijumu "Bezbednost namirnica animalnog porekla", Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd 16 i 17. oktobar 2008. godine

** Saša Janković, dipl. farm. med. biohem, dr sci. med. vet. Aurelija Spirić, mr Tatjana Radičević, istraživač-saradnik, Srđan Stefanović, dr vet. med., Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

Uvod / Introduction

Savremeni uzgoj životinja ne može se zamisliti bez upotrebe različitih hemioterapeutika, kako u cilju prevencije i lečenja bolesti, tako i u cilju boljeg iskorišćenja hrane. Ilegalna i/ili neadekvatna primena, nepoštovanje propisanih doza i karenci može imati za posledicu kontaminaciju namirnica animalnog porekla ostacima tih jedinjenja. Takođe, u lanac ishrane mogu dospeti i kontaminanti okoline, posebno u industrijski razvijenim oblastima. Monitoring rezidua u životinjama i primarnim proizvodima animalnog porekla predstavlja sistematsko ispitivanje odgovarajućeg broja uzoraka tkiva i/ili organa, ekskreta životinja, hrane i vode za napajanje životinja i primarnih proizvoda životinjskog porekla radi utvrđivanja prisustva rezidua veterinarskih lekova, fitosanitarnih preparata i kontaminenata životne sredine. Rezultati takvog sistematskog ispitivanja treba da omoguće blagovremeno preduzimanje mera neophodnih za obezbeđivanje zdravstvene ispravnosti namirnica i zaštitu javnog zdravlja.

Pod reziduama podrazumevamo ostatke supstanci i njihovih metabolita u tkivima i/ili organima i primarnim proizvodima životinjskog porekla.

U Srbiji se monitoring rezidua sprovodi od 1972. godine, kada je započela kontrola prisustva teških metala, organohlorinih pesticida i antibiotika u tkivima zaklanih životinja. Sa povećanjem broja supstanci koje su se primenjivale u veterini i agroindustriji, kao i usavršavanjem analitičkih metoda, povećavao se broj jedinjenja koja su uključena u monitoring program. Od 2004. godine Ministarstvo poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva Srbije preuzima finansiranje realizacije monitoringa i, značajnim ulaganjima, uz donacije Evropske agencije za rekonstrukciju, osavremenjuje analitičku opremu i intenzivira kontakt sa relevantnim službama Evropske unije, u cilju neophodne edukacije i logističke podrške. Sve to ima kao rezultat činjenicu da nacionalni monitoring programi Republike Srbije uspešno prolaze procese evaluacije od strane nadležnih službi u EU. Odlukama Komisije EU, od kojih je poslednja br 407 od 2. juna 2008. godine (Off. J. of the EU 2008; L 147), našoj zemlji je dozvoljen izvoz svih vrsta mesa i primarnih proizvoda animalnog porekla koji su obuhvaćeni programom monitoringa rezidua.

Zakonodavstvo / Legislation

Osnovu Monitoring programa u Srbiji čini regulativa EU, prvenstveno direktiva 96/23/EC (Off J of the EU 1996; L 125), kojom se definišu principi i zadaci monitoringa, grupe farmakološki aktivnih supstanci i kontaminenata koje treba ispitivati, utvrđuje se strategija uzorkovanja, kao i mere koje treba preduzeti ukoliko se utvrdi prisustvo nedozvoljene količine rezidua. Direktivu 96/23/EC, u delu koji se bavi minimalnim brojem uzoraka koji se moraju ispitivati u odnosu na proizvodnju iz prethodne godine, dopunjuje odluka 97/747/EC iz 1997. godine (Off J of the EU 1997; L 196), koja definiše uzorkovanje mleka, jaja, divljači i meda.

Aneksom I direktive 96/23/ EC sve supstance koje se ispituju podeljene su u dve grupe - grupu A i grupu B. U grupu A spadaju supstance čija je primena u veterinarskoj medicini zabranjena ili je ograničena na izuzetna patološka stanja, uz striktnu kontrolu, a rezidue takvih supstanci ne smeju biti prisutne u namirnicama. Cilj kontrole supstanci iz grupe A je sprečavanje ilegalne primene anabolika i lekova, pa se stoga uzorkovanje obavlja i na farmama, a rezidue ispituju u odgovarajućem matriksu (urin, krv, voda za napajanje životinja, hrana za životinje). Grupa A je podeljena na 6 podgrupa. Grupu A1 čine stilbeni, njihove soli i estri (dietilstilbestrol, heksestrol, dienestrol); u grupu A2 spadaju tireostatici (tiouracil i njegovi derivati, tapazol); grupu A3 čine steroidi (prirodni i sintetski hormoni); A4 grupa predstavljena je laktonima rezorcilne kiseline, uključujući i zernol; u grupu A5 spadaju beta-agonisti (klenbuterol, salbutamol i dr.), dok su u grupu A6 svrstane supstance čija je primena zabranjena, a pripadaju različitim vrstama hemijskih jedinjenja (hloramfenikol, nitrofurani, nitroimidazoli, hlormpromazin). Postoje i druge supstance čija je upotreba zabranjena, a nisu navedene u grupi A₆ već su svrstane u druge grupe, kao što su malahit zeleno (upotrebljava se ilegalno kao antiektoparazitik kod riba), zatim olakvindoks i karbadoks (antimikrobni lekovi koji su se, u svojstvu stimulatora rasta, dodavali hrani za životinje) i nitrofuran nifursol. Kontrola ovih jedinjenja je od najvećeg značaja u EU, a i od trećih zemalja, u koje spada i Srbija, imperativno se zahteva njihova kontrola u odgovarajućim matriksima. Nesprovođenje ovih ispitivanja može imati za posledicu neprihvatanje plana kontrole rezidua kao i zabranu izvoza proizvoda na tržište EU (Spirić i sar., 2007).

U grupu B su svrstane farmakološki aktivne supstance koje se mogu koristiti u profilaksi i lečenju životinja, kao i kontaminanti okoline. Grupa B je, takođe, podeljena, pa su u grupu B1 svrstani antibiotici i sulfonamidi, u grupu B2 ostale farmakološki aktivne supstance, podeljene na podgrupe: B2a (anthelmin-tici), B2b (kokcidistatici), B2c (karbamati i piretroidi), B2d (sedativi), B2e (nesteroidni antiinflamatorni lekovi). Grupa B3 podeljena je na B3a (organohlorni pesticidi i polihlorovani bifenili), B3b (organofosforna jedinjenja), B3c (hemijski elementi), B3d (mikotoksini) i B3e (boje). Monitoringom supstanci iz grupe B se kontroliše i sprečava neadekvatna primena lekova (način aplikovanja, doze, poštovanje karence) i prati nivo perzistentnih kontaminanata okoline u tkivima i organima životinja i primarnim proizvodima animalnog porekla. Za supstance iz grupe B, u Evropskoj uniji, postoje definisane maksimalno dozvoljene količine (MDK), obuhvaćene aneksima I, II i III Regulative Saveta (EEC) No 2377/90 (Off J of the EU 1990; L 67). Te se vrednosti redovno preispituju i usaglašavaju sa najnovijim naučnim, toksikološkim, farmakokinetičkim i drugim saznanjima. Nažalost, sem za toksične elemente, naša zemlja nije, do sada, uskladila propisane MDK vrednosti sa propisima EU, što otežava interpretaciju i prezentaciju rezultata realizacije nacionalnog Programa kontrole rezidua i, što je još bitnije, ometa uklapanje naše zemlje u međunarodne trgovinske tokove.

Aneksom II direktive 96/23/EC definiše se za koje je vrste životinja i primarne proizvode animalnog porekla neophodno, odnosno preporučeno ispitivanje pojedinih grupa iz aneksa I.

Minimalni broj uzoraka koje treba uzimati za ispitivanje, na godišnjem nivou, u okviru plana sistematske kontrole rezidua, po vrsti životinje/proizvoda, definisan je u aneksu IV direktive 96/23 i u odluci 97/747, a zasnovan je na obimu proizvodnje u prethodnoj godini.

Lista supstanci koje se mogu kontrolisati, odn. koje se mogu naći u namirnicama, broji preko 1000 jedinjenja. Zbog toga je za definisanje racionalnog monitoring programa neophodno ostvariti saradnju svih relevantnih činilaca (agencija za lekove, inspekcijски organi, laboratorije), kako bi se planom obuhvatile one supstance koje se najčešće primenjuju, a koje mogu predstavljati problem sa toksikološkog aspekta (Sanders, 2007).

Elementi pomenutih dokumenata Evropske unije uneti su i u nacionalno Uputstvo za uzorkovanje koje je Uprava za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede donela u februaru 2005. godine.

Pored toga što laboratorije koje učestvuju u realizaciji monitoring programa moraju biti akreditovane u skladu sa zahtevima standarda ISO 17025, odlukom Komisije EU 2002/657 (Off J of the EU 2002; L 221), posebno se regulišu neophodne performanse analitičkih metoda koje se mogu primenjivati, i to, kako skrining (trijažne), tako i konfirmativnih, potvrđujućih metoda. Poseban deo navedene odluke propisuje i procedure validacije primenjenih metoda uvodeći u analitičku terminologiju pojmove granica odluke - $C_{c\alpha}$ i sposobnost detekcije - $C_{c\beta}$, kao parametre koji uzimaju u obzir i meru nesigurnost, a proistekli su iz primenjenog postupka validacije. Takođe, ovom odlukom se uvodi i MRPL (minimum required performance limit-najmanja zahtevana granica izvođenja), pojam koji se definiše kao minimalna količina analita u nekom uzorku koja se može detektovati i konfirmisati (potvrditi). Ove vrednosti predstavljaju referentne nivoe akcije kod procene ispravnosti uzoraka, odnosno proizvoda za koje nije ustanovljena maksimalno dozvoljena količina.

Rezultati i diskusija / Results and disussion

U tabeli 1 dat je prikaz rezultata ispitivanja po monitoring programu u Srbiji u 2006. godini.

U tabeli 2 dat je prikaz rezultata ispitivanja po monitoring programu u Srbiji u 2007. godini.

U 2006. godini, u 58 uzoraka utvrđen je sadržaj rezidua iznad maksimalno dozvoljenih količina propisanih domaćim pravilnicima.

Od 95 uzoraka junadi ispitanih na prisustvo benzimidazola (B2a grupa) dva uzorka su bila pozitivna, dok je u jednom bubregu, od ispitanih 34, sadržaj kadmijuma bio iznad MDK. Ponovljenim uzorkovanjem i ispitivanjima na prisustvo benzimidazola u klanici u kojoj je prekoračenje ustanovljeno, pozitivan nalaz nije

Tabela 1. Broj ispitanih i pozitivnih uzoraka po grupama i vrstama životinja i proizvoda u Srbiji u 2006. /
Table 1. Number of examined and positive samples according to groups and species of animals and products in Serbia in 2006.

Vrsta/grupa / Specie/group	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2	B3
Junad / Bullocks	ukupno ispitano / totally examined	68	32	66	64	78	67	103	95
	+	0	0	0	0	0	0	2	1
Svinje / Pigs	ukupno ispitano / totally examined	47	24	49	48	47	52	209	200
	+	0	0	0	0	0	0	10	0
Ovce / Sheep	ukupno ispitano / totally examined	2	2	1	1	2	2	15	19
	+	0	0	0	0	0	0	2	0
Konji / Horses	ukupno ispitano / totally examined	1	1	1	3	1	2	6	5
	+	0	0	0	0	0	0	0	12
Brojleri / Broilers	ukupno ispitano / totally examined	22				19	23	44	49
	+	0				0	0	1	2
Ribe / Fish	ukupno ispitano / totally examined	22					21	45	47
	+	0					0	0	1
Divljac / Game	ukupno ispitano / totally examined								130
	+								26
Mleko / Milk	ukupno ispitano / totally examined						230	230	210
	+						0	0	0
Jaja / Eggs	ukupno ispitano / totally examined						144	142	140
	+						1	0	0
Med / Honey	ukupno ispitano / totally examined						18	48	37
	+						0	0	0

+ – broj uzoraka sa sadržajem rezidua iznad maksimalno dozvoljenih količina /
+ – number of samples with residue content above maximum permitted quantities

Tabela 2. Broj ispitanih i pozitivnih uzoraka po grupama i vrstama životinja i proizvoda u Srbiji u 2007. /
Table 2. Number of examined and positive samples according to groups and species of animals and products in Serbia in 2007.

Vrsta/grupa / Specie/group	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2	B3
	ukupno ispitano / totally examined	ukupno ispitano / totally examined	ukupno ispitano / totally examined	ukupno ispitano / totally examined	ukupno ispitano / totally examined	ukupno ispitano / totally examined	ukupno ispitano / totally examined	ukupno ispitano / totally examined	ukupno ispitano / totally examined
Junad / Bullocks	91	50	88	87	91	92	125	158	23
	+	0	0	0	0	2	0	0	0
Svinje / Pigs	57	57	57	57	57	58	264	206	39
	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Ovce / Sheep	1	1	1	1	1	1	10	12	3
	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Konji / Horses	1	1	1	1	1	1	2	8	16
	+	0	0	0	0	0	0	0	12
Brojleri / Broilers	100				100	104	100	99	98
	+	0			0	0	0	1	0
Ribe / Fish	16					16	51	19	39
	+	0				0	0	0	0
Divljac / Game									130
	+								36
Mleko / Milk						246	246	260	41
	+					2	0	0	0
Jaja / Eggs						160	146	174	67
	+					0	0	43	0
Med / Honey						9	28		21
	+					0	0		0

+ – broj uzoraka sa sadržajem rezidua iznad maksimalno dozvoljenih količina /
+ – number of samples with residue content above maximum permitted quantities

utvrđen, dok se povećan sadržaj kadmijuma, kao kontaminanta okoline, objašnjava starošću životinje i akumulacijom kadmijuma u bubrezima životinja, vezivanjem za protein metalotionein.

Kod svinja u 2006. godini problem je predstavljao karbadoks. Primena karbadoksa u zemljama članicama EU nije dozvoljena, a kao reakcija na činjenicu da je od ispitanih 209 u 10 uzoraka utvrđeno prisustvo kvinoksalinske kiseline (metabolita karbadoksa), doneta je odluka da se od 2007. godine karbadoks ne koristi ni u Srbiji.

U ispitanim uzorcima tkiva i organa ovaca detektovana su dva pojedinačna slučaja povećanog sadržaja salinomicina, koja, u ponovljenom uzorkovanju, nisu potvrđena. Kada se govori o povećanom sadržaju neophodno je naglasiti da se važećim Pravilnikom o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama (SI list SRJ br. 5/92), u delu koji se odnosi na lekove, sem ograničenja od 0,1 mg/kg sulfonamida kao grupe, ne postoje definisane vrednosti MDK, kao što je to slučaj u zemljama EU. U navedenom Pravilniku je naznačeno da u namirnicama ne sme biti rezidua lekova "u količinama koje se mogu dokazati propisanim ili priznatim metodama", pa je svaka dokazana količina ujedno i nedozvoljena. Naravno, od 1992. godine analitika je napredovala i limiti detekcije primenjivanih metoda su sve niži, pa je neophodno usaglašavanje nacionalnih propisa, kojim se definišu maksimalno dozvoljene količine pojedinih lekova sa regulativom EU.

Kada su konji u pitanju, uočen je problem povećanog sadržaja kadmijuma u bubrezima i jetri kod svih 12 ispitanih uzoraka. Slično kao i kod starijih goveda, vezivanjem kadmijuma za metalotionein, koga najviše ima u bubrezima, dolazi do njegove akumulacije, a s obzirom na to da se u Srbiji kolju, uglavnom, starija grla, za posledicu imamo izuzetno visoke količine kadmijuma. Sličan problem javljao se i kod divljači, gde je sadržaj kadmijuma bio iznad MDK u 26 od ispitanih 130 uzoraka.

Imajući u vidu navedeno, Institut za higijenu i tehnologiju mesa je bio inicijator i nosilac projekta "Sadržaj kadmijuma u proizvodima od iznutrica konja i goveda" koji je finansirala Uprava za veterinu Ministarstva poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva Srbije. U okviru tog projekta na sadržaj kadmijuma ispitano je 240 uzorka proizvoda iz prometa i samo u jednom uzorku je sadržaj kadmijuma bio iznad MDK. Zaključak je da bi se iznutrice (prvenstveno konja), s obzirom na dokazane količine kadmijuma, mogle koristiti isključivo u preradi, jer ne postoji način da se količine kadmijuma smanje.

Kod brojlera je u 2006. godini, od 43 ispitana uzorka u jednom dokazano prisustvo kvinolona, odnosno u dva od 49 ispitanih uzoraka dokazan je kokcidostatik salinomicin. Dokazane vrednosti su bile ispod normi EU, a ponovljenim ispitivanjima uzoraka istog porekla kvinoloni, odnosno salinomicin nisu detektovani.

Jedini slučaj u 2006. godini kod kojeg je detektovano prisustvo supstanci iz A grupe je uzorak jaja, u kojem je dokazan hloramfenikol (A6). Akcijom inspekcijske službe, farma sa koje je uzet navedeni uzorak stavljena je pod nadzor, a pojačanim uzorkovanjima nije dokazano prisustvo hloramfenikola.

U 2006. godini, u svim ispitanim uzorcima mleka i meda rezidue nisu detektovane, ili su vrednosti bile ispod MDK.

U 2007. godini problemi sa nalazom kadmijuma u bubrezima i jetri konja i bubrezima divljači su se ponovili. Svih 12 uzoraka konja imali su povišen sadržaj kadmijuma, a od 130 ispitanih uzoraka divljači, u 36 je sadržaj kadmijuma bio iznad MDK.

U okviru grupe A ponovo je detektovan hloramfenikol, i to u dva uzorka mleka i u dva uzorka urina junadi. Pojačano uzorkovanje pokazalo je da su u pitanju pojedinačni izolovani slučajevi čiji uzrok nije utvrđen.

Kod svinja, ovaca, riba i u medu, rezidue lekova i kontaminenata nisu detektovane ili su utvrđene vrednosti ispod MDK. Kod brojlera samo je jedan uzorak, od 24 ispitana, bio pozitivan na kokcidiostatik maduramicin.

Razvojem osetljivije metode za određivanje kokcidiostatika, u 2007. godini ustanovljen je problem sa detektovanjem ove grupe lekova u jajima. U 15 uzoraka dokazano je prisustvo salinomicina, u 22 lasalocida i u 6 uzoraka maduramicina, od ukupno ispitana 174 uzorka. Problem sa kokcidiostaticima, koji su dozvoljeni u profilaksi kokcidioze kod živine, je tzv. unakrsna kontaminacija u mešaonama stočne hrane, kada se kokcidiostatik javlja i u hrani u kojoj nije predviđeno da ga bude.

Poslednji dostupan izveštaj zemalja članica EU o primeni i realizaciji monitoring programa je za 2006. godinu (Working document, Brussels, SEC, 2008).

U tabeli 3 dat je prikaz rezultata realizacije monitoring programa u zemljama članicama EU za 2006. godinu.

Za razliku od Srbije, u EU su, pored hloramfenikola, iz grupe nedozvoljenih sredstava detektovani i hormoni (grupa A3), zeranol (grupa A4) i β agonisti iz grupe A5. U grupi A6 dokazano je prisustvo hloramfenikola u 41 uzorku, od ukupno 48 pozitivnih uzoraka. Detektovano je još i prisustvo 4 metabolita nitrofurana i 3 nitroimidazola, što vodi ka zaključku da i u zemljama članicama EU postoji problem ilegalne primene hloramfenikola.

Dok u Srbiji problem primene antibiotika i sulfonamida nije uočen, u EU preko polovine (52%) svih pozitivnih uzoraka potiče od rezidua baš tih supstanci.

Sistematskim praćenjem rezidua kod riba u EU, utvrđeno je da problem predstavlja i ilegalna primena boje malahit zeleno, kao antiektoparazitika. Detektovan je kod 68 od 2374 ispitana uzorka.

Kod jaja je izražen problem kokcidiostatika. Od 3508 ispitanih uzoraka neispravna su bila 82 uzorka, od kojih čak 63 zbog povećanog sadržaja kokcidiostatika.

Tabela 3. Broj ispitanih i pozitivnih uzoraka po grupama i vrstama životinja i proizvoda u EU u 2006. godini /
Table 3. Number of examined and positive samples according to groups and species of animals and products in the EU in 2006.

Vrsta/grupa / Specie/group	A1											B3		
	ukupno ispitano / totally examined											B2		
Junad / Bullocks	13093											27012		
	0											164		
Svinje / Pigs	6502											58884		
	0											10		
Ovce / Sheep	565											11715		
	0											2		
Konji / Horses	111											585		
	0											1		
Brojleri / Broilers	3095											16352		
	0											4		
Ribe / Fish	237											176		
	0											2		
Divljac / Game														
Mleko / Milk												1300		
												4		
Jaja / Eggs												1108		
												0		
Med / Honey												5891		
												28		

+ – broj uzoraka sa sadržajem rezidua iznad maksimalno dozvoljenih količina /
+ – number of samples with residue content above maximum permitted quantities

Od kontaminenata, u EU najzastupljeniji je kadmijum. Kod junadi je 63 uzorka bilo neispravno zbog povećane količine toksičnih elemenata, a od toga je 48 uzoraka bilo sa sadržajem kadmijuma iznad MDK. Kod konja je, od 109 neispravnih uzoraka, 97 njih imalo povišen sadržaj kadmijuma, dok je kod divljači od ukupno 185 neispravnih uzoraka, 133 imalo nedozvoljenu količinu kadmijuma.

Poređenjem rezultata dobijenih u toku realizacije nacionalnog programa kontrole rezidua sa rezultatima u EU može da se konstatuje da postoje mnogi zajednički problemi, kao što su rezidue hloramfenikola, kokcidostatika, kadmijuma. Može se očekivati da u narednom periodu, uvođenjem savremenijih, kako trijažnih, tako i konfirmativnih metoda, i eventualna neadekvatna primena antibiotika i sulfonamida bude otkrivena i da se blagovremeno preduzmu mere da rezidue ne uđu u lanac ishrane.

Zaključak / Conclusion

Osavremenjivanjem analitičkih tehnika i kontinuiranom edukacijom, monitoring program rezidua u Srbiji daje rezultate u smislu otkrivanja potencijalnih problema, što omogućava da se, pre svega, preventivno, a zatim i primenom restriktivnih mera očuva bezbednost hrane, a time štiti i zdravlje potrošača.

Naravno, od interesa za našu zemlju je i usaglašavanje nacionalnih propisa sa regulativom EU, kako bi se dobijeni rezultati adekvatno tumačili i primenjivale sankcije samo u slučajevima gde je to, po evropskim standardima, zasnovanim na dugogodišnjim toksikološkim studijama, opravdano.

Literatura / References

1. Commission Decision 2008/407/EC. Amending Decision 2004/432/EC on the approval of residue monitoring plans submitted by third countries in accordance with Council Directive 96/23/EC. Off J of the EU 2008; L 147.
2. Commission Decision 97/747/EC. Fixing the levels and frequencies of sampling provided for by Council Directive 96/23/EC for the monitoring of certain substances and residues thereof in certain animal products. Off J of the EU 1997; L 196.
3. Commission Decision 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off J of the EU 2002; L 221.
4. Council Directive 96/23/EC. On measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products. Off J of the EU 1996; L 125.
5. Commission staff working document on the implementation of national residue monitoring plans in the member states in 2006, Brussels, SEC 2008; 2375
6. Council Regulation (EEC) No 2377/90 (with amendments). Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Off J of the EU 1990; L 67.
7. http://europa.eu/food/food/chemicalsafety/residue/control_en.htm
8. Residues of Veterinary Medicinal Products – Third Countries, 2007.

9. Sanders P. Veterinary drug residue control in the European Union. Tehnologija mesa 2007; 48 (1-2): 59-68.
10. Spirić A, Janković S, Batas V, Petronijević R. Strategija monitoringa rezidua i kontaminata - stanje i perspektive. Tehnologija mesa 2007; 48 (1-2): 69-75.

ENGLISH

MONITORING RESIDUE IN ANIMALS AND PRIMARY PRODUCTS OF ANIMAL ORIGIN

S. Janković, Aurelija Spirić, Tatjana Radičević, S. Stefanović

The objective of control and systematic monitoring of residue is to secure, by the examination of a corresponding number of samples, the efficient monitoring of the residue level in tissues and organs of animals, as well as in primary products of animal origin. This creates possibilities for the timely taking of measures toward the securing of food hygiene of animal origin and the protection of public health. Residue can be a consequence of the inadequate use of medicines in veterinary medicine and pesticides in agriculture and veterinary medicine, as well as the polluting of the environment with toxic elements, dioxins, polychlorinated biphenyls, and others. Residue is being monitored in Serbia since 1972, and in 2004, national monitoring was brought to the level of EU countries through significant investments by the Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management. This is also evident in the EU directives which permit exports of all kinds of meat and primary products of animal origin, covered by the Residue Monitoring Program. The program of systematic examinations of residue has been coordinated with the requirements of the European Union, both according to the type of examined substance, as well as according to the number of samples and the applied analytical techniques. In addition to the development of methods and the including of new harmful substances into the monitoring programme, it is also necessary to coordinate the national regulations that define the maximum permitted quantities of certain medicines and contaminants with the EU regulations, in order to protect the health of consumers as efficiently as possible, and for the country to take equal part in international trade.

Key words: monitoring, residue, primary products of animal origin

РУССКИЙ

МОНИТОРИНГ ОСТАТКОВ В ЖИВОТНЫХ И ПЕРВИЧНЫХ ПРОДУКТАХ АНИМАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

С. Янкович, Аурелия Спирич, Татьяна Радичевич, С. Стефанович

Цель контроля и систематической слежки (мониторинга) остатков, что испытанием отвечающего числа образчиков, обеспечить эффективную слежку уровня остатков в тканях и органах животных словно и в первичных продуктах животного происхождения. Тем создаётся возможность для своевременного принятия мер с целью обеспечения безопасности корма животного происхождения и

охраны явного здоровья. Остатки могут быть последствие неадекватного пользования лекарств в ветеринарной медицине и пестицидов в сельском хозяйстве и ветеринарии словно загрязнения окрестности токсическими элементами, диоксинами, полихлорованными бифенилами и др. Мониторинг остатков в Сербии проводится от 1972 года, а 2004 года значительными вложениями Министерства сельского хозяйства, лесного хозяйства и водного хозяйства, национальный мониторинг доведён до уровня, имеющие страны члены ЕУ. Об этом свидетельствуют и директивы ЕУ, которыми нашей стране разрешен вывоз всех видов мяса и первичных продуктов животного происхождения, охваченные Программой мониторинга остатков. Программа систематического испытания остатков согласована с требованиями Европейской Унии, как по виду испытанных субстанций так и по числу образчиков и применённым аналитическим техникам. Возле развития методов и включения новых вредных субстанций в мониторинг программу, необходимо и согласование национальных правил, которым определяют максимально разрешенное количество некоторых правил, которым определяют максимально разрешенное количество некоторых лекарств и контаминентов с регулятивой ЕУ, как бы более эффективно охранялось здоровье потребителей а наша страна равноправно участвовала в международной торговле.

Ключевые слова: мониторинг, остатки, первичные продукты животного происхождения

**MERENJE FIZIČKO-HEMIJSKIH KARAKTERISTIKA
OTPADNIH VODA MLEKARE***
*MEASUREMENTS OF PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF
DAIRY PLANT WASTE WATERS*

D. Stefanović, Mirjana Vojnović-Miloradov, J. Lemić, M. Kurajica,
Dragana Kovačević**

Karakteristike otpadnih voda mlekarske industrije su specifične i bitno se razlikuju od otpadnih voda drugih grana prehrambene industrije. Složenost proizvodnje u mlekarama sa više pogonskih jedinica za različite proizvode čini problem otpadnih voda ove industrije posebno kompleksnim.

Izvršeno je uzorkovanje a zatim ispitivanje hemijskih karakteristika otpadnih voda mlekare AD "Imlek" u različitim godišnjim dobima i različitim periodima dana 2001. i 2007. godine. Dobijene koncentracije su upoređene sa maksimalno dozvoljenim koncentracijama datim "Pravilnikom o tehničkim i sanitarnim uslovima za upuštanje otpadnih voda u gradsku kanalizaciju grada Beograda".

Ključne reči: HPK – hemijska potrošnja kiseonika, BPK – biološka potrošnja kiseonika, otpadne vode mlekare, maksimalno dozvoljene koncentracije

Uvod / Introduction

Karakteristike otpadnih voda mlekarske industrije su specifične i bitno se razlikuju od otpadnih voda drugih grana prehrambene industrije. Složenost proizvodnje u mlekarama sa više pogonskih jedinica za različite proizvode, čini problem otpadnih voda ove industrije posebno kompleksnim.

Pogonske jedinice za prijem mleka, pasterizaciju, sterilizaciju i pakovanje mleka, proizvodnju kiselomlečnih proizvoda, sira, maslaca, mleka u prahu ili

* Rad primljen za štampu 19. 12. 2008. godine

** Mr sci. Dragoslav Stefanović, AD "Imlek" Padinska Skela, Beograd; dr sci. Mirjana Vojnović-Miloradov, profesor emeritus, Tehnički Fakultet, Novi Sad; dr sci. Jovan Lemić, "Lad Group" Beograd; dr sci. Milorad Kurajica, Fizički fakultet, Beograd; mr sci. Dragana Kovačević, ITNMS – Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, Beograd

drugih mlečnih proizvoda, tokom proizvodnje dovode do stvaranja otpadnih voda. Sadržinu ovako nastalih otpadnih voda čini surutka, sa primesama kazeina i drugih proteina, laktoze i masti, kao i sredstva za čišćenje sistema. Ostaci sredstava za čišćenje sistema u ovoj vodi utiče na velika variranja pH otpadnih voda.

U otpadnim vodama se mogu naći laktoze i masti, što su takođe nepoželjni elementi u otpadnim vodama mlekarske industrije. Ukoliko se u otpadnoj vodi ne nalaze dovoljne količine kiseonika dolazi do anaerobnog razlaganja laktoze, a nastala mlečna kiselina utiče na pH i omogućava taloženje kazeina. Na taj način se stvaraju jaki i neugodni mirisi. Svojom hidrofobnom prirodom otežava čišćenje sistema. Ostaci masti prisustni u otpadnim vodama povećavaju biološku potrošnju kiseonika, zadržavajući se na zidovima kanalizacionog sistema i sistema za prečišćavanje otpadnih voda (Stefanović, 2004).

Ključni parametri kvaliteta otpadnih voda mlekarske industrije su: biološka potrošnja kiseonika (BPK_5), sa prosečnom vrednošću od 0,8 do 2,5 kg/t mleka u netretiranom efluentu; hemijska potrošnja kiseonika (HPK), normalno oko 1,5 puta veća od vrednosti BPK; ukupne suspendovane materije, sa vrednošću od 100 – 1 000 mg/l; ukupne rastvorene materije: fosfor (10 – 100 mg/l) i azot (oko 6% vrednosti za BPK) (Dairy Industry, 1998).

Za pravovremeno preduzimanje mera u cilju sprečavanja nepoželjnog opterećenja otpadnih voda mlekarske industrije, važno je kontinuirano uzimanje uzoraka i merenje ključnih parametara. Preporučuje se najmanje jednomesečni monitoring finalnog efluenta na ključne parametre, a ako protok značajnije varira i češće (Stefanović, 2004).

Dobijeni podaci su statistički obrađeni.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Predmet ovih istraživanja je ispitivanje kvaliteta otpadnih voda mlekara. Uzorkovanje je rađeno tri puta pri čemu su obavljena fizičko-hemijska ispitivanja otpadnih voda mlekare.

Kontinuirano uzorkovanje i ispitivanje fizičko-hemijskih karakteristika otpadnih voda mlekare AD "Imlek" rađeno je u periodu od minimalno 24 sata 2001. i 2007. godine.

2001. godine uzorkovanje je vršeno više dana, u dva godišnja doba i u određenim vremenskim intervalima u toku 24 sata u različitim periodima dana.

U toku 2007. godine uzorkovanje je rađeno u toku jednog dana od 14⁰⁰–22⁰⁰ na svaka dva sata (ukupno četiri uzorka) i od toga je pripremljen i analiziran kompozitni uzorak. Od 22⁰⁰–06⁰⁰ izvršeno je uzorkovanje otpadne vode četiri puta na svaka dva sata i analiziran kompozitni uzorak kvaliteta otpadne vode. Drugog dana u periodu od 08⁰⁰–22⁰⁰ izvršeno je uzorkovanje i analiza kvaliteta pojedinačnih uzoraka otpadnih voda. Frekvencija uzorkovanja iznosila je dva sata tako da je analizirano ukupno osam uzoraka.

Sva uzorkovanja, ispitivanja i tumačenja izvršena su u skladu sa "Zakonom o vodama" ("Sl. glasnik SRS", br. 46/91), "Pravilnikom o načinu i minimalnom broju ispitivanja otpadnih voda" (Sl. glasnik SRS br. 47/83) i "Pravilnikom o tehničkim i sanitarnim uslovima za upuštanje otpadnih voda u gradsku kanalizaciju grada Beograda" ("Sl. list grada Beograda", 1986).

Tokom uzorkovanja 2001. godine, na osnovu količine potrošene pitke vode, sezonski promenljive količine prerađenog mleka (pa time i količine ispuštene otpadne vode iz mlekare) ustanovljeno je da je prosečni protok otpadnih voda mlekare $Q_{sr \text{ dnevno}} = 1920 \text{ m}^3/\text{dan}$ ili preračunato u druge jedinice (Stefanović, 2004):

Q_{sr} časovno ($\text{m}^3/\text{čas}$)	80,00
$Q_{sr \text{ min}}$ (m^3/min)	1,33
$Q_{sr \text{ sec}}$ (m^3/sec)	0,022
$Q_{sr \text{ sec}}$ (l/sec)	22,22

Tokom uzorkovanja 2007. godine, od početka ispitivanja, kontinuirano je meren protok otpadne vode ultrazvučnim meračem na bazi doplerovog efekta – "Nivus". Srednja vrednost protoka, maksimalni protok, minimalni protok i ukupni protok u toku 33h. Obračunato je merenje srednjeg, maksimalnog, minimalnog i ukupnog protoka otpadne vode tokom uzorkovanja 2007. godine.

Q_{sr} (l/s) celo merenje	22,00
Q_{max} (l/s) celo merenje	43,67
Q_{min} (l/s) celo merenje	6,86
Q_{uk} ($\text{m}^3/33\text{h}$) celo merenje	2638,65

Odmah po uzorkovanju tokom 2001. godine izvršena su "in situ" merenja sledećih parametara kvaliteta otpadnih voda: temperatura vode, pH vrednost.

Za određivanje kvaliteta otpadnih voda 2001. godine, urađena je fizičko-hemijska analiza vode u laboratoriji „Ekolab“ – Padinska skela standardnim i akreditovanim metodama.

Temperatura – termometrom ($0^\circ\text{--}100^\circ \text{C}$); pH – potenciometrijski pH-metar (EL 113050055-21); HPK – hemijska potrošnja kiseonika, bihromatna metoda; ($\text{mg O}_2/\text{L}$); BPK₅ – biološka potrošnja kiseonika za 5 dana; ($\text{mg O}_2/\text{L}$); N_t – ukupan azot (Kjeldahl); (mg/L); amonijak (NH_4^+), spektrofotometrijski (Nessler); (mg/L); NO_3^- (N), volumetrijski; (mg/L); NO_2^- (N) volumetrijska metoda; (mg/L); ukupni fosfati PO_4^{3-} , spektrofotometrijska metoda (mg/L); sulfati (SO_4^{2-}), gravimetrijska metoda; (mg/L); hloridi (Cl^-), volumetrijska metoda (mg/L); kalcijum (Ca^{2+}), atomska apsorpciona spektrometrija (mg/L); alkalitet HCO_3^- , metoda po Winnkleru; (mg/L); ukupne masti, ekstrakcija petroletrom, gravimetrijski; (mg/L).



Slika 1. Uzorkovanje otpadne vode /
Figure 1. Sampling of waste waters

Odmah po uzorkovanju 2007. godine izvršena su "in situ" merenja sledećih parametara kvaliteta otpadnih voda: temperatura vode, vidljive otpadne materije, vidljiva boja, miris, pH vrednost i specifična elektroprovodljivost. Fizičko hemijska ispitivanja vršena su u laboratoriji Instituta za vodoprivredu "Jaroslav Černi" – Beograd. Izvršena je analiza sledećih parametara: utošak KMnO_4 , hemijska potrošnja kiseonika – HPK, biološka potreba za kiseonikom – BPK_5 , ukupni isparni ostatak na 105°C , ukupni ostatak posle žarenja na 550°C , taloženje po Imhofu nakon 2 sata, nitrati, nitriti, amonijum jon, ukupni Kjeldal azot, ukupni fosfor, suspendovane materije, deterdženti i ukupna ulja i masti.

Rezultati rada i diskusija / Results and Discussion

Rezultati našeg rada pokazali su sledeće:

U monitoring programu određivanja kvaliteta otpadne vode mlekare definisane su njene hemijske karakteristike koje su prikazane u tabelama 1, 2 i 3.

U tabeli 1 prikazane su hemijske karakteristike otpadne vode mlekare uzorkovane u periodu januar–februar 2001. (Stefanović i sar., 2001).

U tabeli 2 prikazane su hemijske karakteristike otpadnih voda u periodu juni/juli 2001. (Stefanović i sar., 2001).

Prikazane su maksimalne, srednje i minimalne vrednosti pojedinih parametara, kao i maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK). Uočava se širok dijapazon vrednosti parametara, što je karakteristično za otpadne vode višeprogorskog tehnološkog procesa, kakav je u mlekari AD "Imlek".

U uzorcima uzimanim svakodnevno u toku 15 dana utvrđeno je da su i minimalne vrednosti za hemijsku i biološku potrošnju kiseonika, HPK i BPK₅, iznad maksimalno dozvoljenih vrednosti.

Tabela 1. *Hemijske karakteristike uzoraka otpadne vode mlekare AD "Imlek" (Uzorkovano januar/februar 2001) /*
 Table 1. *Chemical characteristics of samples of waste waters from AD Imlek dairy plant (Sampled in January/February 2001)*

Paremetri / Parameters	MDK* / MPC*	Maksimalna vrednost / Maximum value	Srednja vrednost / Mean value	Minimalna vrednost / Minimum value
HPK – hemijska potrošnja kiseonika (mg O ₂ /l) / Chemical utilization of oxygen (mg O ₂ /l)	450	9600	1777	580
BPK ₅ – biološka potrošnja kiseonika za pet dana (mg O ₂ /l) / Biological utilization of oxygen in five days (mg O ₂ /l)	300	2740	1322	430

*MDK – maksimalno dozvoljene koncentracije ("Pravilnik o tehničkim i sanitarnim uslovima za upuštanje otpadnih voda u gradsku kanalizaciju grada Beograda"; "Sl. list grada Beograda, 1986; Milojević, 1993) /

*MPC – maximum permitted concentration (Regulations on technical and sanitary conditions for release of waste waters into Belgrade City Sewers; City of Belgrade Official Gazette, 1986; Milojevic, 1993)

Tabela 2. *Hemijske karakteristike uzoraka otpadne vode mlekare AD "Imlek" (Uzorkovano juni/juli 2001) /*
 Table 2. *Chemical characteristics of samples of waste waters from AD Imlek dairy plant (Sampled in June/July 2001)*

Paremetri / Parameters	MDK* / MPC*	Maksimalna vrednost / Maximum value	Srednja vrednost / Mean value	Minimalna vrednost / Minimum value
HPK – hemijska potrošnja kiseonika (mg O ₂ /l) / Chemical utilization of oxygen (mg O ₂ /l)	450	13335	2145	115
BPK ₅ – biološka potrošnja kiseonika za pet dana (mg O ₂ /l) / Biological utilization of oxygen in five days (mg O ₂ /l)	300	5250	845	82

U tabeli 3 prikazane su hemijske karakteristike uzoraka otpadnih voda uzorkovane dva dana u toku decembra 2007. godine.

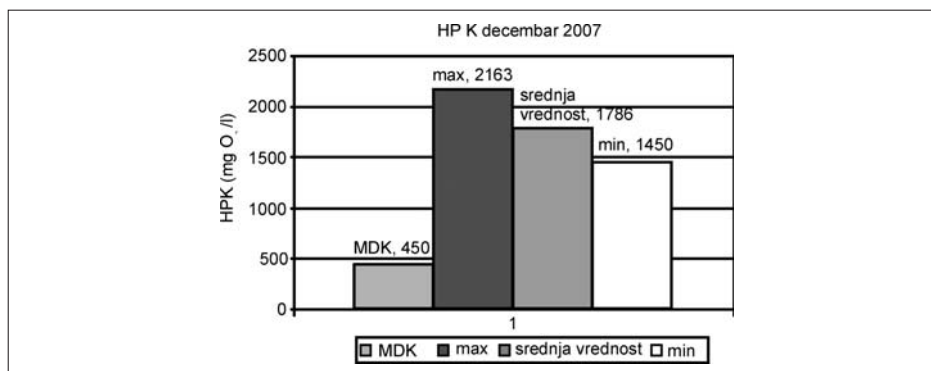
Za vode uzorkovane 2001. godine karakteristično je da su maksimalne i srednje vrednosti HPK i BPK₅ veće od dozvoljenih. (Stefanović, 2004)

Za vode uzorkovane 2007. godine karakteristično je da su maksimalne, srednje i minimalne vrednosti HPK i BPK₅ veće od dozvoljenih.

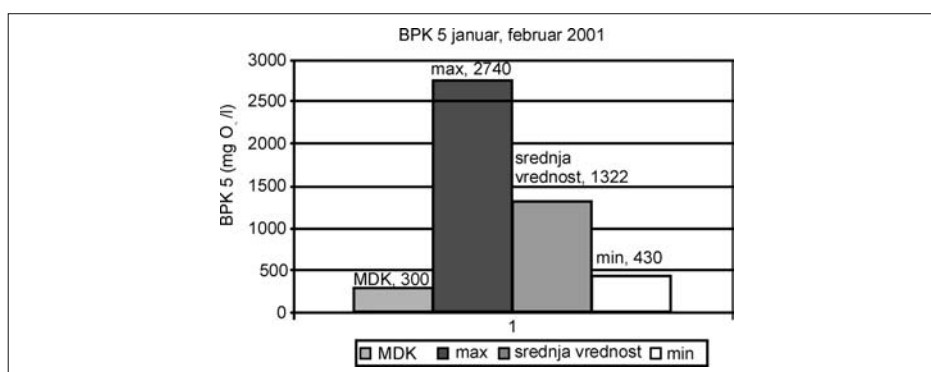
Tabela 3. Hemijske karakteristike uzoraka otpadne vode mlekare AD "Imlek" (Uzorkovano dva dana u decembru 2007. godine) /
Table 3. Chemical characteristics of samples of waste waters from AD Imlek dairy plant (Sampled in two days in December 2007)

Paremetri / Parameters	MDK* / MPC*	Maksimalna vrednost / Maximum value	Srednja vrednost / Mean value	Minimalna vrednost / Minimum value
HPK – hemijska potrošnja kiseonika (mg O ₂ /l) / Chemical utilization of oxygen (mg O ₂ /l)	450	2163	1786	1450
BPK ₅ – biološka potrošnja kiseonika za pet dana (mg O ₂ /l) / Biological utilization of oxygen in five days (mg O ₂ /l)	300	1610	892	256

Iz histograma 1 vidi se HPK u decembru 2007. godine: MDK, maksimalne, srednje i minimalne vrednosti merenja dok histogram br. 2 prikazuje vrednosti za BPK₅ u januaru, februaru 2001: MDK, maksimalne, srednje i minimalne vrednosti merenja.



Histogram 1.



Histogram 2.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu iznetih podataka ispitivanja, o otpadnim vodama mlekare možemo zaključiti sledeće:

– HPK (hemijska potrošnja kiseonika) uzoraka (uzorkovano: januar/februar 2001, juni/juli 2001, dva dana – decembar 2007. g) kretao se za maksimalne vrednosti od 2163 do 13600, srednje vrednosti od 1777 do 2145 i minimalne vrednosti od 115 do 1450 (mg O₂/l);

– BPK₅ (biološka potrošnja kiseonika za pet dana) uzoraka (uzorkovano: januar/februar 2001, juni/juli 2001, dva dana – decembar 2007. g) kretao se za maksimalne vrednosti od 1610 do 5250, srednje vrednosti od 845 do 1322 i minimalne vrednosti od 82 do 115 (mg O₂/l).

Na osnovu srednjih vrednosti HPK (hemijska potrošnja kiseonika) i BPK₅ (biološka potrošnja kiseonika za pet dana) ova tri merenja, zaključili smo da je u pogonu u kome su zastupljene sve faze prerade mleka, od prijema preko pasterezacije i sterilizacije do proizvodnje kiselomlečnih proizvoda, srednja vrednost HPK za otpadne vode industrije mleka oko 2000 mg/lit, što je oko pet puta više od MDK, a srednja vrednost BPK₅ između 800 i 900 mg/lit, što je oko tri puta više od MDK.

Ovi parametri pokazuju da su otpadne vode mlekare izuzetno opterećene i da se moraju prečišćavati pre upuštanja u kanizacioni sistem PKB Energotehnika.

Literatura / References

1. Stefanović D, Pucarević M, Damjanović B. Ispitivanje kvaliteta otpadnih voda mlekare AD "Imlek", standardnim i dokumentovanim metodama, Otpadne vode i komunalni čvrsti otpad, Subotica, 2001; 29-33.
2. Stefanović D. Uticaj prirodnih aluminosilikata na poboljšanje kvaliteta otpadnih voda mlekare AD „Imlek”, magistarski rad. Centar za interdisciplinarne i multidisciplinarne studije Univerzitet u Novom Sadu, 2004.
3. Izveštaj o ispitivanju kvaliteta otpadnih voda u AD "Imlek" Mlekara Beograd, Institut za vodoprivredu "Jaroslav Černi", Beograd, 2008.
4. Pravilnik o tehničkim i sanitarnim uslovima za upuštanje otpadnih voda u gradsku kanalizaciju. Službeni list grada Beograda 2/86 g.
5. Milojević M Uslovi za upuštanje industrijskih otpadnih voda u gradsku kanalizaciju, Voda i sanitarna tehnika, Beograd, 1993.
6. World Bank Group. Pollution Prevention and Abatement Handbook: Dairy Industry. July 1998; 295-7.

ENGLISH

MEASUREMENTS OF PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF DAIRY PLANT WASTE WATERS

D. Stefanović, Mirjana Vojnović-Miloradov, J. Lemić, M. Kurajica, Dragana Kovacević

Characteristics of waste waters of the dairy industry are specific and differ essentially from waste waters of other branches of the food industry. The complexity of production in dairy plants with several units for different products render the problem of waste waters of this industry particularly complex.

Waste waters of the AD Imlek dairy plant were sampled and their chemical characteristics were determined at different seasons of the year and at different times of the day in the years 2001 and 2007. The obtained concentrations were compared with the maximum permitted concentrations listed under the Regulations on technical and sanitary conditions for releasing waste waters into the City Sewers of the City of Belgrade.

Key words: chemical utilization of oxygen, biological utilization of oxygen, dairy plant waste waters, maximum permitted concentrations

РУССКИЙ

ИЗМЕРЕНИЕ ФИЗИЧЕСКО ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СТОЧНЫХ ВОД МОЛОЧНОЙ

Д. Стеванович, Миряна Войнович-Милорадов, Й. Лемич, К. Миодраг, Драгана Ковачевич

Характеристики сточной воды молочной промышленности специфические и существенно различаются от сточных вод других отраслей пищевой промышленности. Сложность производства в молочных с больше движущих единиц для различных продуктов, причиняет проблему сточных вод этой промышленности отдельно комплексной.

Нами совершено образчикование а затем испытание химических характеристик сточных вод молочной АО "Имлек" в различных временах года и различном времени для 2001 и 2007 года. Полученные концентрации сравненные с максимально разрешенными концентрациями, данным "Регламентом о технических и санитарных условиях для выпуска сточных вод в городскую канализацию города Белграда".

Ключевые слова: ХПК - химическое потребление кислорода, БПК - биологическое потребление кислорода, сточные воды молочной, максимально разрешенные концентрации

ZNAČAJ SALMONELA U PROIZVODNJI MESA SVINJA* SIGNIFICANCE OF SALMONELLA IN PORK PRODUCTION CHAIN

N. Karabasil, Mirjana Dimitrijević, Nataša Kilibarda, V. Teodorović,
M. Ž. Baltić**

Životinje, stočna hrana, meso i proizvodi od mesa često se transportuju na velike razdaljine i predstavljaju značajan deo međunarodne trgovine, što omogućava i diseminaciju salmonela, uključujući i rezistentne sojeve. Svinje su životinje sa kojima se relativno teško manipuliše, zbog njihovog temperamenta, građe, oštih zuba, lake nadražljivosti, dobrog čula mirisa, slabog vida i osetljivosti na stres. Životinje iz različitih uzgajivališta treba da su razdvojene u stočnom depou da bi se preventivno sprečila kontaminacija patogenima kao što su salmonele, ali i uznemirenost i agresivnost životinja usled mešanja sa drugim svinjama. Ove životinje predstavljaju značajan rezervoar salmonela, koje se nalaze "unutar" gastrointestinalnog trakta i pripadajućem limfnom tkivu. Za razliku od nas, u Evropskoj uniji čak i zemlje koje istorijski gledano imaju nisku prevalencu salmonela, kao što je Finska, imaju svoj program kontrole. Osnova programa mora biti garancija da će svi relevantni faktori imati učešća u prevenciji kontaminacije salmonelom.

Ključne reči: kontrola, klanica, meso svinja, salmonela, svinje, higijena

Uvod / Introduction

Salmoneloza je zoonoza i uzročnici koji izazivaju oboljenja životinja i ljudi, mogu dovesti i do letalnog ishoda. Većina salmonela ulazi u organizam domaćina per os kontaminiranom hranom ili vodom. Infektivna doza, kada su u pitanju infekcije salmonelama varira i zavisi od soja i imunološkog statusa pacijenta. Dostupni epidemiološki podaci ukazuju na to da infekcija može nastati ingestijom

* Rad saopšten na simpozijumu "Bezbednost namirnica animalnog porekla", Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd 16 i 17. oktobar 2008. godine

** Dr sci. med. vet. Neđeljko Karabasil, docent, dr sci. med. vet. Mirjana Dimitrijević, asistent, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Fakultet veterinarske medicine, Beograd; mr sci. med. vet. Nataša Kilibarda, Veterinarski specijalistički institut Subotica; dr sci. med. vet. Vlado Teodorović, redovni profesor, dr sci. med. vet. Milan Ž. Baltić, redovni profesor, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

10 – 45 bakterijskih ćelija (D'Aoust i sar., 1985; Lehmacher i sar., 1995). Infektivna doza je niža ukoliko se salmonele nalaze u namirnicama sa visokim sadržajem masti i proteina, koji štite bakterijsku ćeliju od uticaja niskog pH želudačnog soka (Blaser i Newman, 1982).

U većini zemalja Evropske unije, najčešći nalaz kod gastroenteritisa ljudi, čine *S. Enteritidis* (naročito fagotip 4, PT4) i *S. Typhimurium* (Anon, 2001b, 2001c, 2001d). Od ostalih serotipova koji se relativno često spominju kao uzročnici alimentarnih trovanja su: *S. Agona*, *S. Hadar*, *S. Heidelberg*, *S. Infantis*, *S. Newport*, *S. Panama*, *S. Saint-Paul*, *S. Thompson* i *S. Virchow* (Anon, 2001c).

Prema podacima iz Godišnjeg izveštaja Instituta za zaštitu zdravlja Srbije kod nas je najzastupljenija *S. Enteritidis*, koja je u odnosu na ostale serotipove prisutna sa 90.05 % (podaci za 2000-2004) (Anon, 2001a; 2002a; 2003; 2004a; 2005a). Ovi podaci nisu vezani samo za sojeve izolovane iz kliničkog/humanog materijala nego i iz namirnica, sa radnih površina i dr. Ostali serotipovi imaju značajno manju procentualnu zastupljenost. Na drugom mestu se nalazi *S. Typhimurium* koja procentualno čini 3,21 % od ukupnog broja izolovanih sojeva. Zatim slede *S. Hadar* (1.91 %) i *S. Infantis* (1.33 %), dok je nalaz *S. Stanleyville*, *S. Agona*, *S. Thompson*, *S. Virchow*, *S. Paratyphi B* i *S. Bovismorbificans* ispod 0,5 % za svaki navedeni serotip od ukupnog broja sojeva.

Hrana kao vektor u nastanku alimentarnih trovanja /

Food as vector in occurrence of alimentary poisonings

Manji broj epidemija je istražen u potpunosti, dok je u većini slučajeva ostalo nerazjašnjeno o kojoj namirnici kao izvoru patogenog agensa se radi u određenom slučaju. U WHO izveštaju (Anon, 2001c) za period 1993-1998. godine navode se namirnice koje su bile izvor patogena, a salmonela vrste su označene kao najčešći uzrok trovanja i činile su 54,6 % prijavljenih slučajeva. Najčešće izolovani serotipovi u 2000. godini prema podacima Evropske Komisije (Anon, 2002b) za devet zemalja EU, bili su *S. Enteritidis* (59,14 %), *S. Typhimurium* (13,03 %), *S. Hadar* (1,36 %) i *S. Virchow* (1,36 %). Tokom vremena, primetne su varijacije u procentu zastupljenosti serotipova kao i animalni izvori iz kojih su izolovani.

Pored mesa živine i jaja, meso svinja i proizvodi od mesa svinja su jedan od važnijih izvora infekcije salmonelama, najčešće kao rezultat kontaminacije sa *Salmonella Typhimurium* (Berends i sar., 1998a; 1998b; 1997). U Holandiji, od alimentarne salmoneloze, svake godine oboli približno 450 ljudi na 100.000 stanovnika, a od tog broja oko 15 % slučajeva su posledica konzumacije kontaminiranog mesa svinja. Podaci za Dansku su slični kao za Holandiju (Dahl i sar., 1997), dok je u Nemačkoj oko 20 % slučajeva alimentarne salmoneloze vezano za meso svinja (Steinbach i Hartung, 1999).

Prevalenca salmonela u svežem mesu je u direktnoj vezi sa nalazom kod životinja i naravno zavisi od daljeg tehnološkog procesa kojim se podvrgava

trup/meso kao namirnica. Prevalenca salmonela na trupovima svinja (bris sa trupa) prema prijavljenim podacima za Belgiju iznosi 17,4 %; Norvešku i Finsku 0,0 %, a Švedsku 0.03 % (Anon, 2002b). Nalaz salmonela u mesu svinja u malo-prodajnoj mreži je sledeći: 1,12 % Danska, 0,27 % Norveška, 0,0 % Finska i 3,7 % Nemačka (Anon., 2002b). Prema D'Aoust-u (2000) prevalenca salmonela u mesu svinja kreće se od 0,8 % do 17,5 %, na osnovu pregledanih 57540 uzoraka (zbirni prikaz za Australiju, Kanadu, Dansku, Nemačku, Indiju, Japan, Portugal, Rumuniju i SAD).

Sposobnost salmonela kao i drugih patogena da se adaptiraju na uslove sredine, npr. na kiselu sredinu, predstavlja rizik sa aspekta higijene namirnica. Izlaganjem salmonela uslovima subletalne kisele pH reakcije, može dovesti do adaptacije i posledično tome bolje sposobnosti da prežive ekstremne uslove istog ili nekog drugog faktora sredine (Leyer i Johnson, 1993; Fratimico, 2003).

Rasprostranjenost salmonela / *Distribution of salmonella*

Salmonela je često izolovana iz vode (Cherry i sar., 1972), koja može da služi kao bakterijski rezervoar i, naravno, za transmisiju između domaćina (Foltz, 1969). Salmonele se stalno izlučuju u spoljašnju sredinu od inficiranih ljudi, farmских životinja, kućnih ljubimaca i divljih životinja (Baudart i sar., 1992). Salmonele mogu biti diseminovane u zemlji i sedimentu (Abdel-Monem i Dowider, 1990; Chao i sar., 1987). Za partikule zemlje i sedimenta se veruje da predstavljaju mikroekološku nišu u kojoj bakterijske vrste mogu da prežive i verovatno se razmnožavaju (Brettar i Hofle, 1992).

Prema fiziološkim i metaboličkim osobinama salmonele nisu ograničene na određeni habitat. Većina serotipova je široko rasprostranjena i to omogućava transmisiju na čoveka, biljke, životinje, površine. Salmonele mogu da prežive na različitim površinama kao što su keramika, staklo, metal (McDade i Hall, 1964). Patogeni mikroorganizmi mogu preživeti na različitim površinama na farmi tokom dužeg vremenskog perioda (Bale i Hinton, 1992; Heard, 1969). Relativno manje ima dostupnih podataka vezanih za preživljavanje patogena na površinama i u sredinama gde borave životinje pre klanja.

Higijena površina, poda i zidova u stočnom depou može značajno uticati na vidljivu (ne)čistoću i nalaz patogena na koži životinja za klanje. Pošto su često kontaminirani patogenima, podovi su značajni kao potencijalni izvor kontaminacije, kako u stočnom depou tako i u boksu za omamljivanje (Small i sar., 2002). Small i sar. (2003) navode da patogeni mikroorganizmi (*Salmonella* Kedougou, *E.coli* O157 i *Campylobacter jejuni*) bolje preživljavaju u prostirci (slama) nego na ostalim materijalima koji se koriste u klanici (beton, metal). Isti autori navode da je manja redukcija patogena (tokom vremena) u uzorcima materijala koji su kontaminirani fecesom. Pri 10⁰ C, D-vrednost za *S. Kedougou* u uzorcima slame kontaminiranim fecesom, i uzorcima koji nisu kontaminirani fecesom je suk-

cesivno 31,2 i 22,2 dana. Pri višoj temperaturi (25° C) prosečna D-vrednost je niža (22,5 i 7,9 dana sukcesivno za uzorke slame kontaminirane fecesom i uzorke koji nisu kontaminirani fecesom).

Epidemije alimentarnih oboljenja najčešće su vezane za sledeće faktore: neadekvatan termički režim, kontaminirana sirovina, kros-kontaminacija, ali i loša higijena personala koji radi sa namirnicama. Na primer, dostupni podaci govore da 25 % ljudi uopšte ne pere površine na kojima je prethodno sečeno sirovo meso, dok sapunom ove površine pere 66 %, a pribor kojim je vršeno sečenje njih 55 % (Klontz i sar., 1995; Anon, 1995). Samim tim higijena površina i higijena "inficiranog" osoblja je odgovorna za najmanje 45 % slučajeva alimentarnih trovanja (Bean i sar., 1990).

Nalaz salmonela kod svinja /

Salmonella findings in pigs

Blagovremeno utvrđivanje prisustva salmonela kod svinja je od vitalnog značaja iz više razloga. Prvo pomaže doktorima veterinarske medicine da na terenu odrede efektivan tretman kliničkih slučajeva oboljenja. Drugo, unapređenjem interventnih mera može se smanjiti prevalenca salmonela kod svinja. Na kraju, najveća korist jeste u tome da što manji broj kliconoša dospe u klanicu, čime se smanjuje rizik od kasnije kontaminacije trupa na liniji klanja i eventualnih alimentarnih oboljenja ljudi.

Van der Wolf i sar. (2001) navode da je salmonela u proseku izolovana iz 11 % uzoraka fecesa sa farmi i 2,3 % iz postmortalnog materijala (sadržaj intestinalnog trakta uginulih životinja). Ovako nizak procenat pozitivnih postmortem uzoraka, ukazuje na to da salmonele imaju mali udeo u kliničkom oboljenju svinja. Bilo da se radi o fecesu ili postmortalnom materijalu, *S. Typhimurium* je predstavljala najčešći nalaz (88 %).

Stočna hrana može biti izvor salmonela. Kod peletirane hrane zbog primenjene temperature/vremena smanjuje se broj ovih bakterija. Naravno redukcija ili, što je još poželjnije, eliminacija salmonela iz stočne hrane ne obezbeđuje u potpunosti naš cilj – svinje slobodne od salmonela. Postoje brojni drugi izvori salmonela – površine na farmi, boksevi, ptice, pacovi i druge životinje. Svinje mogu biti nosioci većeg broja serotipova, najčešće samo kao tranzitne flore, bez vidljivih kliničkih znakova. Kretanje stoke na farmi može dovesti do diseminacije salmonela. Kontrola ovih bakterija na farmi podrazumeva strukturne promene na objektu, ograničeno kretanje životinja i personala, dezinfekciju bokseva, korišćenje peletirane hrane dobijene pri visokim temperaturama i sl. Međutim, i pored svih napora veoma je teško eliminisati salmonele iz uzgajivališta svinja (Osterom i Nothermans, 1983).

Danska ima Nacionalni program za kontrolu salmonela koji je integrisan u lanac proizvodnje svinja "od farme do trpeze". Tokom uzgoja vrši se testiranje uzoraka krvi serološkim testovima, dok se na klanici rade serološka ispiti-

vanja iz mesnog soka. Od momenta uvođenja programa 1993. godine pa do 1998. godine, bakteriološkim pregledom uzoraka evidentirano je smanjenje inficiranih svinja salmonelama za 50 % (sa 14,7 % na 7,2 % na manjim farmama; i sa 22 % na 10,4% na velikim farmama svinja) (Christensen i sar., 2002).

Brojne studije ukazuju na to da je prevalenca *Salmonella enterica* 3-10 puta veća kod svinja nakon transporta (stočna pijaca) i klanja u poređenju sa nalazom na samoj farmi (Berends i sar., 1995; Hurd i sar., 2001; Hurd i sar., 2002). Jedan od razloga za povećanje nalaza, jeste dug period tokom koga se životinje drže u "kontaminiranom" prostoru stočnog depoa (preko 12 h) (Morgan i sar., 1987). Na većini klanica u SAD-u, životinje se ne zadržavaju duže od 6–8 h u stočnom depou. U eksperimentalnim uslovima svinje se mogu inficirati *S. Typhimurium* za ne više od dva časa tokom boravka u kontaminiranim boksevima. *Salmonella Typhimurium* je izolovana iz fecesa i cekuma 30 do 60 minuta nakon ekspozicije životinja sa infektom (Hurd i sar., 2001a, Hurd i sar., 2001b). Sa druge strane, sa aspekta kvaliteta i poboljšanja kvaliteta mesa preporučeno je da se svinje drže najmanje dva časa u stočnom depou. Ovaj vremenski period smatra se minimalnim periodom neophodnim da bi se životinje oporavile nakon transporta (Warris i sar., 1992).

Stres kao posledica transporta predstavlja jedan od razloga većeg nalaza *S. enterica* u fecesu i prostirci (McGlone i sar., 1993). Isaacson i sar. (1999) beleže veći nalaz *S. enterice* nakon transporta, ali naglašavaju da samo transport bez ostalih faktora ne doprinosi ovom povećanju. Kao potpora ovakvom zaključku, govore rezultati studije po kojoj nije primećena razlika u nalazu salmonela kod svinja koje su direktno transportovane i onih koje su bile izložene stresu mešanjem sa drugim svinjama, ishranom i držanjem 18 h u čistom i dezinfikovanim objektu (Hurd i sar., 2001).

Prema opsežnom istraživanju u Holandiji, sprovedenom 1996. i 1999. godine prevalenca salmonela bila je sledeća: za svinje koje su pred kraj tova iznosila je 23,7 % i 24,5 %: i krmače 40,5 % i 60,4% sukcesivno. Izolovani su sledeći serotipovi: *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Panama*, *S. London*, *S. Bovismorbifikans* (Van der Wolf i sar., 2001a i 2001b).

U poređenju sa ostalim zemljama EU, prevalenca salmonela kod svinja u Norveškoj je relativno niska. Prema objavljenim podacima, farme retko kada imaju problem sa salmonelom i procenjuje se da oko 2,5-10 % farmi ima zabeležen slučaj salmonele (Sandberg i sar., 2002). Izvor infekcija salmonelama na Norveškim farmama nije poznat i verovatno nastaje kontaktom svinja-feces, ptica ili spoljašnja sredina. Inače *S. Typhimurium* predstavlja najčešći nalaz, ne samo kod svinja nego i kod ptica i iz pijaće vode (Knapperud i sar., 1998). Postavlja se pitanje zašto je infekcija salmonelama u Norveškoj tako niska? Jedan od odgovora možda bi bio da su u Norveškoj uglavnom zastupljene male farme sa malim brojem životinja (Anderson i May, 1991). Do sada je zabeležena samo jedna farma gde je salmonela bila prisustna tokom dve godine (*S. Derby*), a farma je za Norveške standarde bila velika. Sigurno da striktno poštovanje higijene na farmi,

ograničeno kretanje osoblja i životinja, ishrana sa termički tretiranom hranom, niske temperature tokom zimskim meseci, geografski položaj koji omogućava efektivnu izolaciju relativno malih farmi jedne od druge, jesu faktori koji doprinose niskom nalazu salmonela.

Nalaz salmonela u klanici i lancu proizvodnje mesa svinja /

Salmonella findings in abattoir and pork production line

Prethodno je naglašeno da meso svinja predstavlja značajan izvor salmonela i samim tim proizvodnja svinja "slobodnih od salmonela" značajno bi smanjio rizik od ovih zoonoza. Nažalost, infekcija salmonelama je prilično česta kod svinja (Van der Wolf i sar., 1999), pa dok ne budemo u mogućnosti da proizvedemo svinje "slobodne od salmonela", razdvajanje inficiranih i neinficiranih grupa svinja je jedini način da se spreči unakrsna kontaminacija tokom transporta, boravka životinja u stočnom depou i prilikom klanja.

Da bi se utvrdili izvori kontaminacije salmonelama u lancu proizvodnje mesa, značajan podatak predstavlja informacija o nalazu ovih bakterija na farmi (Korsak i sar., 2003; Letellier i sar., 1999a, 1999b). Prilikom transporta svinja od farme do klanice prevalenca salmonela približno se poveća za jednu trećinu, što ukazuje na to da se radi o unakrsnoj kontaminaciji. Bakteriološkom analizom, pet od šest pregledanih briseva kože svinja bilo je pozitivno, dok su uzorci limfnih čvorova i cecalnog sadržaja bili negativni na salmonela. Ovaj podatak ide u prilog činjenici da je unakrsna kontaminacija u klanici značajan problem sa aspekta bezbednosti hrane (Kranken i sar., 2003; Alban i Stark, 2002; Hurd i sar., 2002). Istrazivanjima u SAD-u i Evropi zaključeno je da je *S. enterica* široko rasprostranjena na površinama u stočnom depou svinja (Karabasil, 2006; Rostagno i sar., 2003; Swanenburg i sar., 2001a). Slični rezultati su objavljeni u Velikoj Britaniji za površine u stočnom depou goveda i ovaca (Small i sar., 2002).

Transport i boravak životinja u stočnom depou su glavni razlog veće prevalence *S. enterice* kod svinja. Prema rezultatima Hurd-a i sar. (2001) utvrđen je sedam puta češći nalaz salmonela u uzorcima svinja uzetih iz stočnog depoa (39,9 %; 114 od 286 pregledanih uzoraka svinja) u odnosu na uzorke svinja sa farme (5,3 %; 15 od 281). Izolacijom na klanici, serotipova koji nisu detektovani na farmi, ukazuje da su svinje naknadno inficirane ovim sojevima na samoj klanici. Ovi rezultati ukazuju da su boksevi za držanje životinja u stočnom depou važan izvor *S. enterica* i predstavljaju kontrolnu tačku u proizvodnom lancu dobijanja mesa svinja. Od 353 izolata salmonela poreklom iz uzoraka svinja (244 uzoraka - cecalni sadržaj i 109 uzoraka - ileocekalni limfni čvorovi), 19 % su identifikovani kao isti serotip izolovan sa površina u boksu u kome su držane svinje, 27 % je identifikovano kao isti serotip izolovan sa površina u transportnom sredstvu, dok se 23 % izolata poklapao sa serotipovima koji su izolovani sa površina u stočnom depou i površinama u transportnom sredstvu (Rostagno i sar., 2003).

Svinje se mogu inficirati salmonelama direktno preko kontaminirane hrane ili kontaktom sa drugim životinjama iz grupe ili indirektno putem kontaminiranih površina u boksu, opreme ili personala. S obzirom da se ove životinje drže u stočnom depou najmanje od dva do osam časova pre klanja, ovaj prostor može predstavljati važan izvor infekcije salmonelama. Prema jednom istraživanju u Brazilu, 20 % uzoraka je bilo pozitivno na salmonele u stočnom depu (Lazaro i sar., 1997). Salmonele veoma brzo, nakon eksperimentalne aplikacije, prodiru u organizam svinja (Fedorka-Cray i sar., 1995), pa se samim tim može pretpostaviti da svinje lako mogu biti inficirane tokom boravka u stočnom depou pre klanja. Rezultati Swanenburg-a i sar. (2001a) jasno pokazuju da stočni depo predstavlja značajan izvor salmonela i može imati uticaj na broj inficiranih svinja koje dolaze na liniju klanja. Svinje istražuju sredinu, kao deo normalnog ponašanja, njuškaju, riju, piju vodu, prilikom čega mogu da se inficiraju. Fedorka-Cray i sar. (1995) zaključuju na osnovu sprovedenih eksperimenata da *S. Typhimurium* može biti izolovana iz tonzila, cekuma, kolona i torakalne muskulature tri časa po intranazalnoj inokulaciji. Ovo potvrđuju i radovi Blaha i sar. (1997) koji navode da se *S. Typhimurium* može izolovati četiri časa nakon oralne aplikacije iz ileocekalnih limfnih čvorova kao i 30 minuta nakon aplikacije iz tonzila.

Premortalni pregled životinja treba da omogući da se za klanje koriste samo vizuelno čiste i zdrave životinje, ali se njime ne može prevenirati klanje svinja koje u intestinalnom traktu ili na koži nose potencijalne patogene za čoveka. Primarna proizvodnja mesa svinja podrazumeva niz operacija kao što je omamljivanje, klanje, šurenje, uklanjanje površinskog epitela i dlake, poliranje, pranje pre evisceracije, evisceraciju, rasecanje i pranje. Ovi brojni procesi na liniji klanja i obrade nose i odgovarajući rizik od kontaminacije trupova patogenim mikroorganizmima prilikom manipulacije.

Na liniji klanja svinja postoje brojne tačke na kojima je moguća kontaminacija sa potencijalno patogenim mikroorganizmima i sam proces klanja i obrade nema nijednu tačku gde bi rizik mogao biti kompletno eliminisan. Izvori kontaminacije na liniji klanja svinja su brojni: od samih životinja, kao što je fekalni i faringealni sadržaj i sredine u kojoj borave životinje. U takvim uslovima salmonele kontaminiraju površinu trupa uglavnom tokom evisceracije, pa poštovanje dobre proizvodne prakse i higijene pogona ima presudan uticaj na nivo bakterijske kontaminacije trupa. Mašine u kojima se obavlja uklanjanje dlake, mogu predstavljati izvor kontaminacije. U nekim slučajevima feces iz anusa može kontaminirati mašinu, preko koje se kontaminacija prenosi na sledeći trup. Na ovaj način mašina može biti kontaminirana i sa salmonelom (Gill i Bryant, 1993). Bakterijska rekontaminacija trupova se smanjuje ako se koristi vruća voda (60-62° C) za uklanjanje zaostale dlake i drugog materijala iz mašine. Zaostala dlaka sa trupa se uklanja opaljivanjem, pri čemu se i prisutni mikroorganizmi na koži uništavaju. Međutim i ova operacija ne mora uvek da bude efikasna. Šurenje pri temperaturama od 60-62° C oštećuje pojedina područja kože (epitel) i prilikom uklanjanja dlake (u narednoj fazi) mikroorganizmi mogu biti "potisnuti" u subepitelijalno tkivo

gde su zaštićeni. Naravno ako je ova faza efikasno izvedena ukupan broj mezofila i enterobakterija na površini kože je najmanji (Snijders i Gerats, 1976) u odnosu na ostale operacije obrade trupa, s tim što broj bakterija zavisi i od mesta sa koga se uzima uzorak (ukupan broj bakterija sa kože vrata je 10 puta veći nego sa kože abdomena) (Rahkio i sar., 1992). Prilikom evisceracije, trup i unutrašnji organi, vrlo često se kontaminiraju fekalnom florom. Naročito je osetljiva operacija odvajanja anusa od trupa. Pri ovoj manipulaciji radnik može preneti fekalne kontaminante (*E. coli*, salmonele) na ostatak trupa i organe. Salmonele mogu biti prisutne u jetri, slezini, hepatičnim, pa i mandibularnim limfnim čvorovima (Wood i sar., 1989). Incizijom limfnih čvorova prilikom pregleda mesa salmonela se može naći na nožu pregledača mesa.

Pranjem trupova, ukloni se jedan deo površinske kontaminacije, ali isto tako i redistribuiraju prisutni mikroorganizmi po trupu sa jednog mesta na drugi. Sama operacija pranja izgleda da ima mali uticaj na *E. coli* i salmonele (Childers i sar., 1973). Po završenoj obradi, na trupu svinja nalazi se oko 10^2 - 10^4 cm⁻² mezofila, dok je taj broj nešto veći na organima. Enterobakterije, koliformi i *E. coli* su čest kontaminant trupa svinja u poređenju sa trupovima goveda (Mackey i Roberts, 1993), dok psihrotrofna flora se kreće u granicama oko 10^2 - 10^3 cm⁻². Hlađenje predstavlja kritičnu kontrolnu tačku i onemogućava rast mezofila i mezofilnih patogena (npr. salmonela), i ograničava rast psihrotrofne flore. Ukoliko na kraju procesa obrade na trupu ima mali broj salmonela, a ne poštuju se temperaturni režimi ispod 7 °C, broj im se može i povećati.

Incidenca salmonela na trupu obrađenih svinja varira u širokim granicama. U Kanadi salmonele su detektovane na 11,2 % pregledanih trupova (ukupno pregledano 596 trupova svinja) (Lammerding i sar., 1988). Naravno, prisustvo salmonele na trupu u velikoj meri zavisi i od prisustva u intestinalnom traktu. Takođe uticaj ima i način obrade i higijenske mere koje se preduzimaju prilikom rada.

Bonardi i sar. (2003) su ispitivali prisustvo patogenih mikroorganizama na trupovima svinja u klanici. Prema jednoj studiji urađenoj u Holandiji, približno 70 % kontaminiranih trupova svinja potiču od zdravih nosioca salmonela (Berends i sar., 1997) i u najvećem broju slučajeva serotip koji je izolovan iz crevnog sadržaja izolovan je i sa površine trupa zaklanih svinja, pa se može hipotetički pretpostaviti da je verovatno nastala "auto-kontaminacija". Kontaminacija trupa može nastati i pri uklanjanju tonzila. Serotipizacijom izolovanih sojeva utvrđeno je da se radi o istom serotipu izolovanom sa površine trupa i tonzila sa tog istog trupa (Bonardi i sar., 2003).

Berends i sar. (1997) zaključuju, pošto su svinje najvažniji izvor salmonela u klanici i kasnije u mesu svinja, da je kontaminacija trupa neminovna koliko god se industrija trudila da poštuje dobru proizvođačku praksu (GMP) dok god u klanicu ulaze salmonela pozitivne svinje. Jasno je da neke operacije na liniji klanja, o kojima je govoreno ranije u tekstu, utiču na kontaminaciju trupova salmonelama. Po završenoj obradi, nalaz salmonela može varirati od 0 - 100 %, premda

je najčešće između 5 – 30 % trupova kontaminirano (Osterom i Notermans, 1983; Morgan i sar., 1987). Šurenje i uklanjanje dlake obično redukuju broj salmonela na površini trupa, čak i do 97 % (Kampelmacher i sar., 1963). Gerats (1990) na primer, nije izolovao nijednu salmonelu sa 105 trupova nakon uklanjanja dlake, ali je izolovao salmonelu sa trupova (21 %) na kraju linije obrade. Sigurno da evisceracija, rasecanje i druge manipulacije sa trupom kao što je pregled mesa imaju udela u ukupnoj kontaminaciji trupa. Operacija evisceracije doprinosi oko 55 - 90 % kontaminaciji trupa salmonelama, dok oprema za poliranje 5 - 15 %, rasecanje i pregled mesa sa oko 5 - 30 %. Da bi se postigla bolja kontrola kontaminacije salmonelama, operacija evisceracije treba da bude što pažljivije izvršena, a osoblje upoznato sa problemom. Kada se jednom linija klanja i obrade kontaminira salmonelama ona može biti izolovana sa mašina, ruku radnika pa sve do završetka radnog vremena, do čišćenja i dezinfekcije. Tokom radnog vremena kontaminacija i unakrsna-kontaminacija se ne može izbeći (Berends i sar., 1995). Verovatno su radnici važniji izvor kontaminacije nego oprema koja se koristi za klanje i obradu trupa svinja pošto su ruke, noževi i kanije za noževe mnogo češće i više kontaminirani salmonelama (Gerats, 1990; Berends i sar., 1995). Što se tiče pregleda mesa i zasecanja na trupu, sam čin pregleda bi trebalo da podrazumeva vizuelni pregled, jer patološke promene koje se u današnje vreme sreću na mesu svinja u Evropi praktično nemaju uticaj na zdravlje ljudi nego na sam kvalitet mesa (Berends i sar., 1993).

Swanenburg i sar. (2001b) istraživali su kakav je efekat ukoliko se kolju odvojeno seropozitivne (salmonela) i seronegativne životinje. Rezultati su pokazali da je kontaminacija trupa jednim delom vezana za nalaz salmonela pre klanja a jednim delom i za rezidentnu floru u samoj klanici. Trupovi koji potiču od seronegativnih životinja bili su kontaminirani salmonelom ali sa nižom prevalencom nego trupovi koji potiču od seropozitivnih životinja. Naravno odvojeno klanje seronegativnih i seropozitivnih grupa svinja ima svog smisla, jer se na taj način smanjuje prevalenca salmonela na trupu nakon klanja i obrade. Da bi se izbegla unakrsna kontaminacija rezidentnim mikroorganizmima neophodno je unaprediti mere čišćenja i dezinfekcije prevoznog sredstva, stočnog depoa i same linije klanja. Najčešći nalaz činili su sledeći serotipovi: na trupu - *S. Typhimurium*, *S. Infantis* i *S. Brandenburg*; a na površinama u klanici: *S. Vichow*, *S. Infantis* i *S. Typhimurium*.

U SAD-u je uveden PR/HACCP sistem (Pathogen Reduction/Hazard Analysis and Critical Control Point) fazno u industriju hrane, shodno broju zaposlenih i godišnjoj zaradi. Velike klanice (>500 zaposlenih) imale su obavezu da implementiraju PR/HACCP do 26. januara 1998., srednje klanice (>10, <500 zaposlenih) do 25. januara 1999. i male klanice (<10 zaposlenih) do 25. januara 2000. godine. FSIS (USDA) je od 1998. do 2000. sproveo niz uzorkovanja mesa (pileće, svinjsko, goveđe, juneće i td), sa ciljem da utvrdi prevalencu salmonela vrsta. Odabran je ovaj mikroorganizam pošto predstavlja najčešći nalaz kod alimentarnih trovanja, a često se može izolovati iz svih vrsta mesa i relativno se lako

detektuje. Takođe, ako se interventnim merama eliminišu salmonele u sirovom mesu, trebalo bi takođe efikasno da se eliminišu i ostali patogeni mikroorganizmi. Rose i sar. (2002) ukazuju da je prevalenca salmonela opala za većinu testiranih vrsta mesa po uvođenju PR/HACCP sistema. Norma koju mora da zadovolji industrija mesa sa aspekta higijene proizvodnje, a kada je meso svinja u pitanju to je: maksimalan broj koji sme da bude pozitivan na salmonele - šest od 55 pregledanih trupova svinja. Pored praćenja salmonele na trupovima industrija mora da zadovolji još jedan parametar a to je *E. coli* kao indikator fekalne kontaminacije i predstavljan je u vidu broja *E. coli* kao prihvatljiv ($\log 1 \text{ CFU cm}^{-2}$), granični ($\log 1-4 \text{ CFU cm}^{-2}$) i neprihvatljiv ($\log 4 \text{ CFU cm}^{-2}$). Više od tri rezultata sa graničnom vrednošću (za broj *E.coli*) od 13 pregledanih uzoraka smatra se da industrija nije uspela da zadovolji tražene kriterijume i signalizira na preispitivanje procesa proizvodnje i primenu korektivnih akcija ukoliko je to neophodno. Kao u SAD-u i u EU postoje zadati kriterijumi za praćenje higijene proizvodnje. Atributi higijene u EU su praćenje ukupnog broja bakterija (UBB), enterobakterija (UBE) i salmonele (Anon, 2005). Za trupove svinja UBB je predstavljen kao prihvatljiva ($\log < 4 \text{ CFU cm}^{-2}$), granična ($\log 1-4 \text{ CFU cm}^{-2}$) i neprihvatljiva ($\log > 5 \text{ CFU cm}^{-2}$) vrednost. Za enterobakterije takođe kao prihvatljiva ($\log < 2 \text{ CFU cm}^{-2}$), granična ($\log 2-3 \text{ CFU cm}^{-2}$) i neprihvatljiva ($\log > 3 \text{ CFU cm}^{-2}$) vrednost. Za razliku od SAD-a gde je navedeno da su više od tri marginalna rezultata neprihvatljiva, EU regulativa navodi da marginalni rezultat (ne govori o broju) znači da proces proizvodnje treba ispitati. Norma koju mora da zadovolji industrija, po pitanju salmonela na trupovima svinja, iskazana je kao maksimalan broj koji sme da bude pozitivan na salmonele – pet od 50 pregledanih trupova svinja.

Zaključak / Conclusion

Sistematsko praćenje i primena programa za suzbijanje salmonela u EU doveli su do opadanja prevalence kod životinja. Sve te aktivnosti imaju za cilj povećanje bezbednosti namirnica, odnosno smanjenje rizika od nalaza salmonela u namirnicama animalnog porekla. S obzirom na to da u Srbiji ne postoji sveobuhvatni i multidisciplinarni program monitoringa salmonela, kao ni odgovarajuća regulativa koja bi ga pordžavala, trebalo bi ga uspostaviti kao garanciju da će svi relevantni faktori imati učešća u njemu.

Literatura / References

1. Abdel-Monem MHA, Dowidar A. Recoveries of Salmonella from soil in eastern region of Saudi Arabia Kingdom. J Egypt Public Health Assoc 1990; 65: 61-75.
2. Alban L, Stark K. Simulating Salmonella prevalence from the growing pig to the slaughtered carcass: where should the effort be put to increase food safety, In: Proceedings of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine, Cambridge, United Kingdom 2002; 98-110.

3. Anderson RM, May RM. Infectious Diseases of Humans Dynamics and Control, 1st edn, Oxford Univ. Press, Oxford 1991.
4. Anon. Healthy People 2000 review, National Center for Health Statistics. Public Health Service. Hyattsville, Md 1995.
5. Anon. Godišnji izveštaj o teritorijalnoj rasprostranjenosti *Salmonella* i *Shigella* na teritoriji Republike Srbije u 2000. godini, Institut za zaštitu zdravlja Srbije 16. mart, 2001a.
6. Anon. Second Report on Salmonella in Eggs. ACMSF [Advisory Committee on Microbiological Safety of Foods (UK)], The Stationery Office, London, ISBN 011 2001b.
7. Anon. WHO (World Health Organisation) Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe, Seventh Report 1993-1998 (eds K Schmidt and C Tirado), Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine (BgVV), Berlin, ISBN 3-931675-70-X, ISSN 2001c.
8. Anon. International outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT 104 – update from Enter-net. WHO (World Health Organisation) Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe, Newsletter No.69, September 2001; 4-5.
9. Anon. Godišnji izveštaj o teritorijalnoj rasprostranjenosti *Salmonella* i *Shigella* na teritoriji Republike Srbije u 2001. godini, Institut za zaštitu zdravlja Srbije 2002a.
10. Anon. Trends and Sources of Zoonotic Agents in Animals, Feedstuffs, Food and Man in the European Union and Norway to the European Commission in accordance with Article 5 of the Directive 92/117/EEC, prepared by the Community Reference Laboratory on the epidemiology of Zoonoses, BgVV, Berlin, Working document SANCO/927/2002 2002b; Part 1: 45-122.
11. Anon. Godišnji izveštaj o teritorijalnoj rasprostranjenosti *Salmonella* i *Shigella* na teritoriji Republike Srbije i Crne Gore u 2002. godini. Institut za zaštitu zdravlja Srbije 2003.
12. Anon. Godišnji izveštaj o teritorijalnoj rasprostranjenosti *Salmonella* i *Shigella* na teritoriji Republike Srbije i Crne Gore u 2003. godini, Institut za zaštitu zdravlja Srbije 2004a.
13. Anon. Godišnji izveštaj o teritorijalnoj rasprostranjenosti primooizolata salmonela i šigela iz medicinskih mikrobioloških laboratorija u Srbiji u 2004. godini, Institut za zaštitu zdravlja Srbije 2005a.
14. Anon. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union 2005.
15. Bale MJ, Hinton M. Bacteria and agriculture animals: survival and gene transfer. Plant and microbial biotechnology research series 2 (JC Fry and MJ Day, ed.), Cambridge University Press, Cambridge; 1992: 14-23.
16. Baudart J, Lemarchand K, Brisabois, Lebaron P. Diversity of salmonella strains isolated from aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. Appl Environ Microbiol 1992; 66: 1544-52.
17. Bean NH, Griffin PM, Goulding JS, Ivey CB. Foodborne disease outbreaks, 5-years study summary, 1983-1987. J Food Protection 1990; 53: 711-28.
18. Berends BR, Burt SA, Snijders JMA. Critical control points in relation to breaking *Salmonella* and *Listeria* cycles in pork production. In: Burt SA and Bauer F (editors), New Challenges in meat Hygiene: Specific Problems in Cleaning and Disinfecting. ECCEAMST. Utrecht, The Netherlands 1995: 11-17.

19. Berends BR, Snijders JMA, Van Logtestijn JG. Efficacy of current EC meat inspection procedures and some proposed revisions with respect to microbiology safety: a critical review. *Vet Rec* 1993; 133: 411-5.
20. Berends BR, Van Knapen F, Mossel DA, Burt SA, Snijders JMA. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in the Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *Intern J Food Microbiol* 1998a; 44: 219-29.
21. Berends BR, Van Knapen F, Mossel DA, Burt SA, Snijders JM. *Salmonella* spp. On pork at cutting plants and at the retail level and the influence of particular risk factors. *Int J Food Microb* 1998b; 44: 207-17.
22. Berends BR, Van Knapen F, Snijders JM, Mossel DA. Identification and quantification of risk factors regarding *salmonella* spp., on pork carcasses. *International J Food Microb* 1997; 36: 199-206.
23. Blaha Th, Solano-Aguilar G, Pijoan C. The early colonisation pattern of *S. typhimurium* in pigs after oral intake, Proceedings of the Second International Symposium of epidemiology and Control of Salmonella in Pork. Danish agricultural and Veterinary Research Council, European Commision, Copenhagen, 1997.
24. Blaser MJ, Newman LS. A review of human salmonellosis, I. Infective dose. *Rev Infect Dis* 1982; 4: 1096-106.
25. Bonardi S, Brindani F, Piyyin G, Lucidi L, Incau MD, Liebana, Morabito S. Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and Verocytotoxin *Escherichia coli* O 157 in pigs at slaughter in Italy. *Int J Food Microb* 2003; 85: 101-10.
26. Brettar I, Hofle MG. Influence of ecosystematic factors on survival of *Escherichia coli* after large-scale release into lake water mesocosms. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 2201-10.
27. Chao W, Ding R, Chen R. Survival of pathogenic bacteria in environmental microcosms. *Chinese J Microbiol Immunol* (Taipei) 1987; 20: 339-48.
28. Cherry WB, Hanks JB, Thomason BM, Murlin AM, Biddle JW, Croom JM. *Salmonella* as an index of pollution of surface waters. *Appl Microbiol* 1972; 24: 334-40.
29. Childers AB, Keahey EE, Vincent PG. Sources of *Salmonella* contamination of meat following approved livestock slaughtering procedures. *Journal of Milk and Food Technology* 1973; 36: 635-8.
30. D'Aoust J-Y, Warburton DW, Sewell AM. *Salmonella Typhimurium* phage-type 10 from cheddar cheese implicated in a major Canadian foodborne outbreaks. *J Food Protection* 1985; 48: 1062-6.
31. D'Aoust J-Y. *Salmonella*; Chapter 45 in "The Microbiological safety and quality of food" (Lund BM, Baird-Parker AC, Gould GW., eds) 2000; Vol II: 1233-99.
32. Dahl J, Wingstrand A, Nielsen B, Baggesen DL. Elimination of *Salmonella typhimurium* infection by the strategic movement of pigs. *Vet Rec* 1997; 140: 679-81.
33. Fedorka-Cray PJ, Collins-Kelley L, Stabel TJ, Gray JT, Laufer JA. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella typhimurium* in swine. *Infect Immun* 1995; 63: 2658-64.
34. Foltz VD. *Salmonella* Ecology. *J Am Oil Chem Soc* 1969; 46: 222-4.
35. Fratimico PM. Tolerance to Stress and Ability of Acid – Adapted and Non Acid-Adapted *Salmonella enterica* Seroovar Typhimurium DT104 to invade and Survive in Mammalian Cells *in vitro*. *J Food Protection* 2003; 66(7): 1115-25.
36. Gerats GEC. Working towards quality, Aspects of quality control and hygiene in the meat industry, Thesis, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands 1990.

37. Gill CO, Bryant J. The presence of *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* in pig carcass dehairing equipment. Food Microbiology 1993; 10: 337-44.
38. Heard TW. Housing and Salmonella infections. Vet Res 1969; 85: 482-3.
39. Hurd HS, McKean JD, Wesley IV, Karriker LA. The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. J Food Protection 2001; 64: 1155-8.
40. Hurd HS, McKean JD, Griffith RW, Wesley IV, Rostagno MH. Salmonella enterica Infections in Market Swine with and without Transport and Holding. Applied and Environmental Microbiology 2002; 68: 2376-81.
41. Hurd HS, Gailey JK, Mc Kean JD, Rostagno MH. Experimental rapid infection in market swine following exposure to a *Salmonella* contaminated environment. Berl Muench Tieraerztl Wochenschr 2001a; 114: 382-4.
42. Hurd HS, Gailey JK, McKean JD, Rostagno MH. Rapid infection in market – weight swine following exposure to a *Salmonella Typhimurium* contaminated environment. Am J Vet Res 2001b; 62: 1194-7.
43. Isaacson RE, Firkins LD, Weigel RM. Effect of transportation and feed withdrawal on shedding of *Salmonella Typhimurium* among experimentally infected pigs. Am J Vet Res 1999; 60: 1155-8.
44. Klontz KC, Timbo B, Fein SB, Levy A. Prevalence of selected food consumption and preparation behaviours associated with increased risks of food-borne disease. J Food Protection 1995; 58: 927-30.
45. Kampelmacher EH, Guinee PAM, Hofstra K, Van Keulen A. Further Studies on *Salmonella* in slaughterhouses and in normal slaughter pigs. Zbl Vet Med 1963; 10: 1-27.
46. Karabasil N. Putevi kontaminacije trupova svinja u klanici salmonelama i njihovo ponašanje u mesu. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu 2006.
47. Knapperud G, Lassen J, Hasseltvedt V. Salmonella infection in Norway: descriptive epidemiology and a case-control study. Epidemiol infect 1998; 121: 569-77.
48. Korsak N, Jacob B, Groven B, Etienne G, China B, Ghafir Y, Daube G. Salmonella Contamination of Pigs and Pork in an Integrated Pig Production Systems. J Food Protection 2003; 66(7): 1126-33.
49. Soren K, Alban L, Boes J, Dahl J. Longitudinal Study of Salmonella enterica Serotype Typhimurium Infection in Three Danish Farrow-to-Finish Swine Herds. J Clin Microbiology 2003; 41(6): 2282-8.
50. Lammerding AM, Garcia MM, Mann ED, Robinson Y, Dorward WJ, Truscott RB, Tittiger F. Prevalence of Salmonella and thermophilic *Campylobacter* in fresh pork, beef, veal and poultry in Canada. Journal of Food Protection 1988; 51: 47-52.
51. Lazaro NS, Tibana A, Hofer A. *Salmonella* spp. in healthy swine and in abattoir environments in Brazil. J Food Prot 1997; 60: 1029-64.
52. Lehmacher A, Bockemuhl J, Aleksis S. A nationwide outbreak of human salmonellosis in Germany due to contaminated paprika and paprika-powdered potato chips. J Infect Dis 1995; 115: 501-11.
53. Letellier A, Messier S, Quessy S. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in finishing swine at Canadian abattoirs. J Food Protection 1999b; 62: 22-5.
54. Letellier A, Messier S, Pare J, Menard J, Quessy. Distribution of *Salmonella* in swine herds in Quebec. Vet Microbiol 1999a; 67: 299-06.

55. Leyer GJ, Johnson EA. Acid adaption induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella* typhimurium. Appl Environ Microbiol 1993; 59: 1842-7.
56. Mackey BM, Roberts TA. Improving slaughter hygiene using HACCP and monitoring. Fleischwirtschaft International 1993; 2: 40-5.
57. Sandberg M, Hopp P, Jarp J, Sjerne Ezstein. An evaluation of the Norwegian Salmonella surveillance and control program in live pig and pork. Int J Food Microb 2002; 72: 1-11.
58. McDade JJ, Hall LB. Survival of Gram-negative bacteria in the environment. I. Effect of relative humidity on surface-exposed organisms. Amer J Hyg 1964; 80: 192-204.
59. McGlone JJ, Salak JL, Lumpkin EA, Nicholason RI, Gibson M, Norman R. Shipping stress and social status effects on pig performance, plasma cortisol, natural killer cell activity, and leukocyte numbers. J Anim Sci 1993; 71: 888-96.
60. Morgan IR, Kraut FL, Kraven JA. Effect of time in lairage on caecal and carcass salmonella contamination of slaughter pigs. Epidemiol Infect 1987; 98: 323-30.
61. Osterom J, Notermans S. Further research into the possibility of salmonella-free fattening and slaughter pigs. Journal of Hygiene (Cambridge) 1983a; 91: 59-69.
62. Rahkio M, Korkeala H, Sippola I, Peltonen M. Effect of pre-scalding brushing on contamination level of pork carcasses during the slaughter process. Meat science 1992; 32: 173-83.
63. Rose BE, Hill W, Umholtz R, Ransom GM, James WO. Testing for Salmonella in Raw Meat and Poultry Products Collected at Federally Inspected Establishments in the United States, 1998 through 2000. J Food Protection 2002; 65(6): 937-47.
64. Rostagno MH, Hurd HS, McKean JD, Ziemer CJ, Gailey JK, Leite RC. Preslaughter Holding Environment in Pork Plants Is Highly Contaminated with *Salmonella enterica*. Appl Environ Microb 2003; 4489-94.
65. Small A, Reid C-A, Avery SM, Karabasil N, Crowley C, Buncic S. Potential for the spread of *Escherichia coli* O 157, *Salmonella* and *Campylobacter* in the lairage environments at abattoirs. J. Food Prot. 2001; 65: 931-6.
66. Small A, Reid CA, Buncic S. Conditions in Lairages at Abattoirs for Ruminants in south-west England and *In Vitro* Survival of *Escherichia coli* O157, *Salmonella Kedougou* and *Campylobacter jejuni* on Lairage Related Substrates. J Food Protection 2003; 66(9): 1570-5.
67. Snijders JMA, Gerats GE. Hygiene of pig slaughtering IV. Bacteriological status of carcasses factors on dehairing. Fleischwirtschaft 1976; 56: 238-41.
68. Steinbach G, Hartung M. Versuch einer Schätzung des Anteils menschlicher Salmonellaerkrankungen, die auf vom Schwein stammende Salmonellen zurückzuführen sind, An attempt to estimate the share of human cases of salmonellosis attributable to Salmonella originated from swine. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1999; 112: 296-300.
69. Swanenburg M, Urlings HAP, Keuzenkamp DA, Snijders JMA. Salmonella in the Lairage of Pig Slaughterhouses. Journal of Food Protection 2001a; 64(1): 12-16.
70. Swanenburg M, Van der Wolf PJ, Urlings HAP, Snijders JMA, Van Knapen F. Salmonella in slaughter pigs the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of Salmonella in pork. Int J Food Microb 2001b; 70: 231-42.
71. Van der Wolf PJ, Bongers JH, Elbers ARW. Salmonella infections in finishing pigs in the Netherlands: bacteriological her prevalence, serogroup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection. Vet Microbiology 1999; 67: 263-75.

72. Van der Wolf PJ, Wolbers WB, Elbers ARW, Van der Heijden HMJF, Koppen JMCC, Hunneman WA, van Schie FW, Tielen MJM. Herd Level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* prevalence in finishing pig herds in the Netherlands. *Veterinary Microbiology* 2001; 78: 205-19.
73. Van der Wolf PJ, ARW Elbers, HMJF van der Heijden, FW van Schie, WA Hunneman, MJM Tielen. *Salmonella* seroprevalence at the population and herd level in pigs in the Netherlands. *Veterinary Microbiology* 2001a; 80: 171-84.
74. Van der Wolf PJ, Lo Fo Wong DMA, Wolbers WB, Elbers ARW, van der Heijden HMJF, van Schie FW, Hunneman WA, Willeberg P, Tielen MJM. A longitudinal study of *Salmonella* enterica infections in high- and low-seroprevalence finishing swine herds in the Netherlands. *Vet Quart* 2001b; 23: 116-21.
75. Warris PD, Brown SN, Edwards JE, Anil MH, Fordham DP. Time in lairage needed by pigs to recover from the stress of transport. *Vet Rec* 1992; 131: 194-6.
76. Wood RL, Popischil A, Rose R. Distribution of persistence *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. *American Journal of Veterinary Research* 1989; 50: 1015-21.

ENGLISH

SIGNIFICANCE OF SALMONELLA IN PORK PRODUCTION CHAIN

N. Karabasil, Mirjana Dimitrijević, Nataša Kilibarda, M. Ž. Baltić, V. Teodorović

Animals, feed, meat and meat products are often transported across long distances, being an important part of international trade, which enables a dissemination of salmonella, including even of some resistant strains. Pigs are animals which are difficult to manipulate because of their temperament, build, sharp teeth, irritability, good sense of smell, bad sight and their sensitivity to stress. Animals coming from different farms should be separated in stock yards to prevent both contamination with pathogens such as salmonella and their irritation and aggressiveness caused by contacts with other pigs. These animals are usually a significant reservoir of salmonella which are "inside" the gastrointestinal tract and gut associated lymph tissue. In contrast to our country, in the EU, even countries which have always had low salmonella prevalence, e.g. Finland, have a control program. The program has to be based on a guarantee that all relevant factors will participate in the prevention of salmonella contamination.

Key words: abbatoir, control, hygiene, pigs, pork, salmonella

РУССКИЙ

ЗНАЧЕНИЕ САЛЬМОНЕЛЛОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ МЯСА СВИНЕЙ

Н. Карабасил, Миряна Дмитриевич, Наташа Килибарда, М. Ж. Балтич, В. Теодорович

Животные, корм для скота, мясо и продукты из мяса часто транспортируются на большие удалённости и представляют собой значительную долю между-

народной торговли, что дает возможность и диссеминацию сальмонелл, включая и сопротивляемые штаммы. Свиньи животные с которыми реляивно тяжело манипулируется, из-за их темперамента, телосложения, острых зубов, лёгкой раздражительности, хорошего чутья обоняния, слабого зрения и чуткости на стресс. Животные из различных комплексов выращивания надо раздвоить в скотовом депо, чтобы превентивно предупредила контаминация патогенами как сальмонеллы, но и беспокойство и агрессивность животных вследствие мешания с другими свиньями. Эти животные представляют собой значительный резервуар сальмонелл, находямые "внутри" гастроинтестинального тракта и принадлежащей лимфной ткани. В отличие от нас, в Европейской Унии даже и страны, имеющие исторически смотрено низкую превалентность сальмонелл, как финляндия имеют свою программу контроля. Основа программы должна быть гарантией, что все релевантные факторы имеют участия в предупреждении контаминации сальмонеллой.

Ключевые слова: контроль, бойня, мясо свиней, сальмонелла, свиньи, гигиена

**ZNAČAJ KOAGULAZA POZITIVNIH STAFILOKOKA ZA
MIKROBIOLOŠKU ISPRAVNOST HRANE***
*SIGNIFICANCE OF COAGULASE-POSITIVE STAPHYLOCOCCI FOR
MICROBIOLOGICAL FOOD SAFETY*

Vera Katić**

Alimentarne intoksikacije hranom, kod kojih je glavni simptom povraćanje i dijareja, nastaju posle unosa enterotoksina koje su u hrani stvorili enterotoksogeni sojevi koagulaza pozitivnih stafilocoka. Enterotoksini stafilocoka se normalno ili veoma malo inaktivišu za vreme procesa proizvodnje, skladištenja, distribucije ili za vreme kulinarske pripreme hrane. Stoga, ukoliko koagulaza pozitivne stafilokoke mogu da se razmnožavaju u hrani do broja većeg od $10^5 - 10^6$ cfu/g/ml pre nego što budu uništene, konzumiranje takve hrane predstavlja rizik od intoksikacije.

U "Pravilniku o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica u prometu" (Sl. list SRJ 26/93) propisani su kriterijumi za koagulaza pozitivne stafilokoke u hrani. Međutim, broj koagulaza pozitivnih stafilocoka nije uvek dobar indikator za prisustvo enterotoksina stafilocoka, budući da broj ćelija može da se smanji, a da enterotoksin bude prisutan u hrani. Mikrobiološki kriterijum za koagulaza pozitivne stafilokoke i/ili enterotoksine stafilocoka u hrani su neophodni i korisni za zaštitu zdravlja ljudi.

Ključne reči: koagulaza pozitivne stafilokoke, enterotoksini stafilocoka, hrana, bezbednost hrane

Uvod / Introduction

Alimentarne intoksikacije, kod kojih su dominantni simptomi povraćanje i dijareja, nastaju posle konzumiranja hrane koja sadrži termostabilne enterotoksine koagulaza pozitivnih stafilocoka uglavnom *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). U većini zemalja intoksikacija enterotoksinima stafilocoka jedna je od najčešće opisanih bakterijskih intoksikacija nastalih posle konzumiranja hrane

* Rad saopšten na simpozijumu "Bezbednost namirnica animalnog porekla", Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd 16 i 17. oktobar 2008. godine

** Dr sci med. vet. Vera Katić, redovni profesor, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

(Balaban i Rasooly, 2000). U Evropi, mleko i proizvodi od mleka su opisani u 1–9% (prosečno 4,8%) od svih alimentarnih intoksikacija izazvanih enterotoksinima *S. aureus* (EC, 2003). Jedna od najvećih epidemija alimentarnih intoksikacija, nastalih posle konzumiranja proizvoda od mleka, zabeležena je 2000. godine u Japanu (Asao i sar., 2003). Najčešće su u slučajevima alimentarnih intoksikacija enterotoksinima stafilocoka opisani nepasterizovano mleko i sirevi.

Proizvodi od mleka, kao i drugi proizvodi sa visokim sadržajem proteina, dobar su substrat za rast *S. aureus*. Takvi proizvodi su uključeni u alimentarne intoksikacije zbog prisustva koagulaza pozitivnih stafilocoka u sirovom mleku, unakrsne kontaminacije za vreme proizvodnje i moguće kontaminacije posle završenog procesa proizvodnje.

Mossel i sar., (1995) navode da je za nastajanje simptoma povraćanja kod odraslih osoba potrebno da se hranom unese u organizam 10–20 µg stafilokoknih enterotoksina/kg telesne mase. Drugi autori (Martin i sar., 2001) smatraju da manje od 1 µg stafilokoknih enterotoksina može izazvati simptome trovanja kod osetljivih osoba. U velikoj epidemiji trovanja, izazvanog enterotoksinom A stafilocoka u Japanu, utvrđeno je da je ukupan unos stafilokoknog enterotoksina A u mleku sa smanjenim sadržajem mlečne masti bio oko 0,02–0,1 µg (Asao i sar., 2003).

Diferenciranje enterotoksogenih sojeva od ostalih stafilocoka moguće je samo na osnovu dokazivanja enterotoksina. Iako danas ima razvijenih tehnika za rutinsko dokazivanje enterotoksina stafilocoka u hrani, one su još uvek skupe, pa je uobičajeno da se u hrani dokazuju stafilokoke sa osobinama patogenih vrsta. Jedna od osobina patogenih vrsta je stvaranje koagulaze, pa je prema "Pravilniku o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica u prometu" (Sl. list SRJ 26/93) predviđeno dokazivanje koagulaza pozitivnih stafilocoka. Međutim, sve koagulaze pozitivne stafilokoke ne stvaraju enterotoksine. Pasterizacijom mleka se uništavaju koagulaze pozitivne stafilokoke, ali ne i enterotoksini. Budući da su enterotoksini stafilocoka mnogo stabilniji u poređenju sa ćelijama *S. aureus* moguće je da se ispitivanjem proizvoda dobije negativan nalaz *S. aureus*, a da je enterotoksin prisutan u hrani. Negativan nalaz koagulaza pozitivnih stafilocoka u određenoj količini hrane ne znači da u toj hrani sigurno nema enterotoksina stafilocoka, kao što i pozitivan nalaz koagulaza pozitivnih stafilocoka u određenoj količini hrane ne znači uvek i prisustvo enterotoksina u hrani. Stoga u cilju zaštite zdravlja ljudi od intoksikacija enterotoksinima stafilocoka kriterijum za utvrđivanje koagulaza pozitivnih stafilocoka, kakav je danas u pravilniku, nije dobar pa je potrebna njegova izmena.

Novi mikrobiološki kriterijum za određivanje broja *S. aureus* i/ili enterotoksina, koji treba da osigura zaštitu zdravlja ljudi od intoksikacija enterotoksinima stafilocoka, treba da bude zasnovan na podacima o razmnožavanju stafilocoka i stvaranju enterotoksina u toku proizvodnje namirnica animalnog porekla, epidemiološkim podacima, kao i na osnovu danas raspoloživih metoda za detekciju *S. aureus* i enterotoksina stafilocoka.

Izvori kontaminacije hrane bakterijom *S. aureus* i uslovi za razmnožavanje /
*Sources of food contamination with *S.aureus* and conditions for multiplication*

Bakterijom *S. aureus* hrana se kontaminira iz više izvora. Primarna kontaminacija nastaje iz inficiranog tkiva ili obolele mlečne žlezde. Sekundarna kontaminacija nastaje od ljudi kliconoša, a ređe sa opreme i iz vazduha (Stojanović i sar., 1999). *S. aureus* je ubikvitarni mikroorganizam koji se nalazi na koži i mukoznim membranama najvećeg broja toplokrvnih životinja uključujući i one životinje koje su namenjene za proizvodnju hrane. Često se dokazuje u hrani animalnog porekla, kao što su sirovo mleko i sirovo meso, međutim, zbog slabe kompeticije prema drugim mikroorganizmima retko dovodi do intoksikacija posle konzumiranja sirovih proizvoda (izuzev kada se radi o mleku krava sa subkliničkim mastitisima). Oko 50 % ljudi ima ovaj mikroorganizam na površinama kože i sluzokože, pa radnici koji rade u proizvodnji i prometu hrane mogu da budu izvor kontaminacije hrane. Pored toga, ovaj mikroorganizam dobro preživljava u spoljašnjoj sredini pa može da bude deo mikroflore opreme za proizvodnju hrane. U objektima za proizvodnju hrane, zbog njegove otpornosti na sušenje, *S. aureus* se često nalazi u prašini, u ventilacionim sistemima i ciklonima. Bakterija takođe može da kolonizuje opremu za proizvodnju hrane koja se teško čisti i ostavlja vlažna (Bockelmann i sar., 1997).

S. aureus se razmnožava u rasponu od 7°C do 47,8°C temperature medijuma, optimum 37°C, a enterotoksin stvara pri 10°C do 48°C, optimum 40°C do 45°C (Tatini, 1973) (tabela 1). Ove temperature su određene za *S. aureus* umnožavan u bujonu u čistoj kulturi. Međutim, za proučavanje ponašanja ovog patogena u hrani, moraju se uzeti u obzir i drugi faktori koji utiču na rast. Za predviđanje stvaranja enterotoksina u hrani mora se uzeti u obzir sledeće: a) u bilo kojoj hrani, optimalna temperatura za stvaranje enterotoksina je za nekoliko stepeni viša od temperature za razmnožavanje, b) temperatura znatno više utiče na stvaranje enterotoksina nego na razmnožavanje *S. aureusa* (Smith i sar., 1983). Drugi važan faktor od koga zavisi razmnožavanje *S. aureus* i stvaranje enterotoksina je pH vrednost. *S. aureus* može da se razmnožava u rasponu pH vrednosti od 4,0 do 10, optimum 6,0 do 7,0 (tabela 1). Međutim, raspon pH vrednosti za stvaranje enterotoksina se menja sa drugim uslovima posebno anaerobiozom. Na primer minimalna pH vrednost za stvaranje enterotoksina u aerobnim uslovima se kreće od 4,9 do 5,7, a u anaerobnim uslovima od 5,7 do 7,0 (Varnam, 1996).

Poznavanje sposobnosti *S. aureus* da se razmnožava i stvara enterotoksine, pri relativno niskoj aktivnosti vode, veoma je važno za definisanje sadržaja vode u hrani. *S. aureus* se razmnožava pri a_w od 0,83 do 0,99, a enterotoksin stvara pri a_w od 0,85 do 0,99. *S. aureus* je halotolerantan mikroorganizam koji može da raste pri 10 do 20% NaCl, ali toksin ne stvara pri više od 10% NaCl (Smith i sar., 1983) (tabela 1).

Tabela 1. Faktori koji utiču na razmnožavanje *S. aureus* i stvaranje enterotoksina /
Table 1. Factors that affect multiplication of *S.aureus* and production of enterotoxins

Faktor / Factor	Rast <i>S. aureus</i> / Growth of <i>S.aureus</i>		Stvaranje enterotoksina / Production of enterotoxins	
	Optimum / Optimum	Interval varijacija / Variation interval	Optimum / Optimum	Interval varijacija / Variation interval
Temperatura (°C) / Temperature (°C)	37	7-47,8	40-45	10-48
pH	6-7	4-10	7-8	4-9,6
Aktivnost vode / Water activity	0,98	0,83->0,99 ¹	0,98	0,85 ->0,99 ²
NaCl (%)	0	0-20	0	0-10
Redoks potencijal / Redox potential	> +200mV	<-200mV do > +200mV	> +200mV	<-100mV do > +200mV
Atmosfera / Atmosphere	Aerobna / Aerobic	Anaerobna-aerobna / Anaerobic-Aerobic	Aerobna (5-20% rastvorenog O ₂) / Aerobic (5-20% diluted O ₂)	Anaerobna-aerobna / Anaerobic-Aerobic

¹ Aerobna (anaerobna 0,90 - >0,99) / Aerobic (anaerobic 0.90->0.99)

² Aerobna (anaerobna 0,92 - >0,99) / Aerobic (anaerobic 0.92->0.99)

Ćelije *S. aureus* se uništavaju toplotnim tretmanima, koji se najčešće koriste u industriji hrane. Otpornost na grejanje menja se pod uticajem različitih faktora, kao što su: sredstvo za zagrevanje, starost ćelija i temperatura pri kojoj je umnožavan *S. aureus*. Veća otpornost je utvrđena ako je patogen rastao pri 46°C nego pri 37°C. Vrednost decimalne redukcije (D₆₀) se kreće od 0,43 do 7,9 minuta, a z vrednost od 4,5°C do 10°C (Roberts, 1982). Ćelije *S. aureus* se uništavaju u mleku ako se primeni odgovarajući toplotni tretman. *S. aureus* je potpuno inaktivisan u mleku posle aplikacije sledećih temperatura u vremenu: 57,2°C u trajanju od 80 min; 60°C u trajanju od 24 min; 62,8°C u trajanju od 6,8 min; 65,6°C u trajanju od 1,9 min i 71,7°C u trajanju od 0,14 min (Bergdoll, 1989). Enterotoksini *S. aureus* su termorezistentniji od samih ćelija, preživljavaju kuvanje i najveći broj toplotnih tretmana koji se primenjuju u pripremi hrane. Stabilnost molekula enterotoksina je pod uticajem različitih faktora sredine i postoje podaci da inaktivacija toplotom može da nastane pri temperaturama nižim od opšte prihvaćenih. Na primer termorezistencija enterotoksina A i B je mnogo niža u fermentisanoj soji nego u *brain-heart infusion* bujonu. Kuvanjem fermentisane soje, jedan minut pri 80°C, kompletno se inaktiviraju enterotoksin A i 92% enterotoksina B (Nout i sar., 1988). Enterotoksini stafilokoka su otporniji na delovanje gama zraka od ćelija *S. aureus*. Ćelije stafilokoka i enterotoksini su otporni na sušenje, hlađenje, zamrzavanje i uslove skladištenja (tabela 2).

Tabela 2. Faktori koji utiču na destrukciju *S. aureus* i enterotoksina (Baird-Parker, 1990; Concon 1998) /

Table 2. Factors that affect destruction of *S.aureus* and enterotoxins (Baird-Parker, 1990, Concon, 1998)

Faktor / Factor	<i>S. aureus</i>	Enterotoksin stafilocoka / <i>Staphylococcal enterotoxins</i>
Toplota / Heat	Bujon / <i>Bouillon</i> (D _{60°C}) 0,43-8,0 min Mleko / <i>Milk</i> (D _{60°C}) 3,16-3,29 min	Bujon / <i>Bouillon</i> (D _{121°C}) 3-8,0 min
Radijacija / Radiation (D-kGy)	0,1 - 0,6	>30
Sušenje, hlađenje, zamrzavanje, uslovi skladištenja / <i>Drying, cooling, freezing, storage conditions</i>	Otporan / <i>Resistant</i>	Otporan / <i>Resistant</i>

*Otpornost na toplotu je iskazana kao D- vrednost, odnosno kao vreme u minutima pri datoj temperaturi potrebno da se postigne redukcija 90 % živih ćelija /

*Resistance to heat is presented as D-value, actually as time in minutes at a given temperature required for achieving reduction of 90% living cells.

S. aureus je slab u kompeticiji sa drugim mikroorganizmima i retko dostiže veliki broj i ne stvara značajne količine enterotoksina ako je prisutna mikroflora kvara. Stvaranje toksina je pod većim uticajem temperature nego prisustva drugih mikroorganizama (Herten i sar., 1989). Inhibitorni efekat bakterija mlečne kiseline iz starter kultura je značajan sa aspekta sprečavanja razmnožavanja *S. aureus* i stvaranja toksina u hrani. Prvo se smatralo da inhibicija rasta stafilocoka nastaje zbog stvaranja mlečne kiseline. Danas se zna da i drugi proizvodi, koji nastaju pri razmnožavanju bakterija mlečne kiseline, kao što su vodonik peroksid i bakteriocini, utiču na razmnožavanje *S. aureus*. Pri proučavanju razmnožavanja *S. aureus* u hrani i stvaranja enterotoksina moraju se uzeti u obzir svi faktori u vezi sa hranom i sredinom u kojoj se hrana proizvodi i skladišti.

Enterotoksini stafilocoka / *Staphylococcal enterotoxins*

Enterotoksini stafilocoka su termostabilni proteini koje stvaraju mnogi sojevi *S. aureus*. Enterotoksine mogu da stvaraju i neke druge koagulaza pozitivne stafilokoke, kao što su: *S. aureus* subsp. *aureus*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* i *S. lutrae*. Prema Casman i saradnicima (1963) enterotoksini stafilocoka su označeni velikim slovima abecede po redu otkrivanja. Do danas je opisano 16 imunološki različitih enterotoksina: A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N i O (EC, 2003). Za enterotoksin F stafilocoka, koji je opisan u slučaju *toxic shock syndrome* (TSS) (Bergdoll i sar., 1981), u kasnijim istraživanjima je utvrđeno da nije enterotoksin i da ne daje simptome povraćanja, pa je ovaj enterotoksin isključen iz sistema no-

menklature enterotoksina stafilokoka i danas se opisuje kao *toxic shock syndrome toxin* (TSST) (Betley i sar., 1990).

Enterotoksini stafilokoka predstavljaju grupu serološki različitih ekstracelularnih proteina i imaju zajedničke osobine kao što su: sposobnost da izazovu povraćanje i gastroenteritis kod primata; superantigenost (nespecifična aktivacija T limfocita praćena oslobađanjem citokina i sistemski šok) koji su opisali Fraser i sar., (2000), Papageorgiou (2000) i Ulrich (2000); otpornost na toplotu i digestiju pepsinom; i strukturna sličnost (dva domena molekula i intramolekularna disulfidna veza) koje su opisali Balaban i Rasooly (2000) i Dinges i sar., (2000).

Enterotoksini stafilokoka su slične molekulske mase između 25.000–29.000 kD. Stvaranje enterotoksina je kodirano pomoću profaga (npr. enterotoksin A; Betley i Mekalanos, 1985), plasmida (enterotoksin D; Bayles i landolo, 1989) ili hromozomalnih ostrvaca patogenosti (npr. enterotoksin B) (Yarwood i sar., 2002).

Enterotoksigenost sojeva stafilokoka je različita u zavisnosti od porekla. Enterotoksin češće stvaraju sojevi poreklom od ljudi (70% do 80%), a ređe sojevi poreklom od životinja (15%). Najznačajniji sa gledišta alimentarnih trovanja su enterotoksini A i D. Količina enterotoksina potrebna da dođe do alimentarnih trovanja je veća od 1 µg (Stojanović, 1980; Bennett, 1986; Olivera Bunčić, 1986).

Sinteza enterotoksina je specifična za određeni soj, međutim, jedan soj *S. aureus* može da sintetiše više enterotoksina. Sinteza enterotoksina je selektivna i enterotoksini A i D se stvaraju u logaritamskoj fazi rasta stafilokoka, a enterotoksini B i C se stvaraju za vreme kasne logaritamske faze i na početku stacionarne faze. Stvaranje enterotoksina A i D je u uskoj korelaciji sa razmnožavanjem *S. aureus*, a umnožavanje sojeva koji stvaraju enterotoksin B i C nije u korelaciji sa stvaranjem enterotoksina. U mnogim ispitivanjima je ustanovljeno, da je za stvaranje količine enterotoksina, koja se može detektovati, potreban veliki broj *S. aureus* (više od $2,8 \times 10^8$ /ml; Otero i sar, 1987). Na stvaranje enterotoksina utiče više različitih ekstracelularnih faktora (hranljive komponente, pH vrednost, temperatura, aktivnost vode, atmosferski pritisak, NaCl, drugi inhibitori i drugi mikroorganizmi).

Definicija enterotoksogenih sojeva nije jasna budući da neki sojevi poseduju gen za stvaranje enterotoksina, ali ga ne stvaraju. Prema podacima iz literature neki sojevi koji mogu da stvaraju enterotoksine ne stvaraju ih u siru (EC, 2003).

Metode za dokazivanje enterotoksina / *Methods for proving enterotoxins*

Za dokazivanje enterotoksina koriste se tri tipa metoda: biološke metode, metode molekularne biologije i imunološke metode.

Biološke metode se zasnivaju na praćenju emetičke aktivnosti na majmunima i mačićima. Simptomi alimentarne intoksikacije toksinima stafilokoka su zapaženi kada je doza unetog enterotoksina bila iznad 200 ng. Zbog slabe

osetljivosti metode i teškoće za njeno izvođenje ona nema više praktičnu primenu.

Druga grupa metoda su metode molekularne biologije kao što je lančana reakcija polimeraze (*polymerase chain reaction*- PCR). Ovom metodom dobijaju se podaci o prisustvu ili odsustvu gena za enterotoksin stafilokoka, a ne dobija se informacija o prisustvu ili odsustvu ekspresije tog gena za vreme proizvodnje i skladištenja hrane. Ova metoda takođe nije primenjiva za detekciju enterotoksina stafilokoka u hrani. Međutim, ona omogućava karakterizaciju sojeva *S. aureus* izolovanih u slučaju alimentarnih trovanja.

Danas se za dokazivanje enterotoksina u hrani koriste imunološke metode, koje se zasnivaju na upotrebi specifičnih antitela za enterotoksine. Detekcija enterotoksina stafilokoka u hrani zahteva osetljivije metode od metoda koje se koriste za ispitivanje enterotoksogenosti sojeva, pošto količina enterotoksina stafilokoka u hrani može da varira od manje od 0,1 do više od 20 ng/g hrane. Stoga metode za dokazivanje enterotoksina treba da budu dovoljno osetljive za procenu bezbednosti hrane.

Za dokazivanje enterotoksina u hrani razvijeno je nekoliko imunoloških metoda: imunodifuzija, Radio imunoAssay (RIA), Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA) i Enzyme Immunoassay (EIA).

Na principu difuzije u gelu razvijene su tri metode za dokazivanje enterotoksina stafilokoka. Prva metoda mikro slajd tehnike je bila prva semikvantitativna metoda za dokazivanje enterotoksina stafilokoka u hrani. Ovom metodom se može dokazati 100 ng/ ml enterotoksina u hrani. Druge metode razvijene iz metode gel difuzije nisu bile dovoljno osetljive za dokazivanje enterotoksina stafilokoka u hrani.

Radio imunoassay je prva metoda dovoljno osetljiva da se dokaže manje od 1 ng enterotoksina po gramu hrane. Međutim, pri izvođenju ove metode koriste se radionuklidi, kao što je J^{125} . Iz razloga bezbednosti pri radu sa radionuklidima i problema pri odlaganju upotrebljenog materijala ova metoda se ne koristi u većini laboratorija.

U metodi Reversed Passive Latex Agglutination koriste se specifična antitela povezana za lateks partikule. Granica detekcije ove metode je 1 ng enterotoksina stafilokoka po gramu hrane, pa nije adekvatna za detekciju malih količina enterotoksina u hrani.

Razvojem Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) zamenjena je upotreba RIA metoda za dokazivanje enterotoksina u hrani. Monoklonska antitela prema enterotoksinima stafilokoka su upotrebljena za razvoj ELISA sendvič metode za primenu pri službenoj kontroli proizvoda od mleka. Ovom metodom može se detektovati manje od 0,1 ng enterotoksina stafilokoka po gramu hrane.

Kriterijumi za koagulaza pozitivne stafilokoke u hrani /

Criteria for coagulase-positive staphylococci in food

Diferenciranje enterotoksogenih sojeva od ostalih stafilocoka moguće je samo na osnovu dokazivanja enterotoksina. Iako danas ima razvijenih tehnika za rutinsko dokazivanje enterotoksina stafilocoka u hrani, one su još uvek skupe, pa je uobičajeno da se u hrani dokazuju stafilokoke sa osobinama patogenih vrsta. Jedna od osobina patogenih vrsta je stvaranje koagulaze, pa je u "Pravilniku o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica u prometu" (Sl. list SRJ 26/93) predviđeno dokazivanje koagulaza pozitivnih stafilocoka. Osim ako navedenim pravilnikom za pojedine namirnice nije drugačije određeno, namirnice u prometu ne smeju sadržavati koagulaza pozitivne stafilokoke u 0,01 gramu ili mililitru hrane. Sve koagulaza pozitivne stafilokoke nisu i enterotoksogene. Enterotoksini stafilocoka su otporniji na toplotu od ćelija stafilocoka. Budući da je za nastanak alimentarnih intoksikacija potrebna određena količina enterotoksina koju stvara 10^5 do 10^6 enterotoksogenih stafilocoka/g ili /ml hrane kriterijum koji je danas propisan u "Pravilniku..." (Sl. list SRJ 26/93) nije pouzdan za donošenje zaključka o bezbednosti određene hrane.

Na osnovu naučnih saznanja o uslovima za razmnožavanje koagulaza pozitivnih stafilocoka i stvaranje enterotoksina u hrani, u količini koja dovodi do alimentarnog trovanja, epidemioloških podataka i metoda za dokazivanje enterotoksina potrebna je promena dosadašnjih kriterijuma za koagulaza pozitivne stafilokoke u hrani.

S gledišta bezbednosti hrane samo enterotoksogeni sojevi *S. aureus* predstavljaju rizik po zdravlje ljudi, a kriterijumi koji se primenjuju treba da spreče stvaranje enterotoksina stafilocoka za vreme procesa proizvodnje i pojavu enterotoksina u finalnom proizvodu. (Katić i sar. 2000).

Broj *S. aureus* u mleku s farme je u korelaciji sa subkliničkim mastitisima i varira od 10 do nekoliko hiljada po mililitru mleka (Asperger i sar., 2002; Mijačević, 1983). Mleko je dobar medijum za razmnožavanje *S. aureus* i stvaranje enterotoksina (pogodan pH, visoka aktivnost vode, hranljive materije) pa se pri temperaturi iznad 10 °C, broj *S. aureus* može brzo povećati čak i u slučajevima kada je početni broj nizak.

S ciljem da se zaštiti zdravlje ljudi, potreban je kriterijum za utvrđivanje broja *S. aureus*. Ukoliko sirovo mleko sadrži veliki broj *S. aureus*, za vreme prerade mleka u proizvode može doći do stvaranja enterotoksina. Opisana su alimentarna trovanja enterotoksinima stafilocoka posle konzumiranja maslaca i sira proizvedenih od sirovog mleka. Stoga sirovo mleko namenjeno za preradu u proizvode ne treba da sadrži veliki broj *S. aureus*. Utvrđivanje mikrobioloških kriterijuma za sirovo mleko, namenjeno za preradu u proizvode, ima značajnu ulogu u zaštiti zdravlja ljudi.

Kriterijumi za određivanje koagulaza pozitivnih stafilocoka, za sireve proizvedene iz sirovog mleka ili termiziranog mleka, imaju značajnu ulogu u oceni

tih proizvoda sa gledišta bezbednosti po zdravlje ljudi. *S. aureus* može biti prisutan u sirovom mleku, a kombinacija vremena i temperature za vreme termizacije nije dovoljna da u svakom slučaju garantuje uništavanje velikog broja *S. aureus*. Ako postoji mogućnost da se enterotoksogeni *S. aureus* umnoži u velikom broju u prvih 48 časova proizvodnje sira, stvoriće se i enterotoksin. Tokom zrenja i skladištenja sira često dolazi do smanjenja broja *S. aureus*, međutim, enterotoksin ostaje prisutan za sve vreme roka upotrebe sira.

U zavisnosti od vrste sira kritičan period za stvaranje enterotoksina su prva 2 do 3 dana od početka proizvodnje sira, kada broj *S. aureus* može da se poveća. U kasnijim fazama proizvodnje sira broj *S. aureus* se obično smanjuje i na osnovu njegovog broja određenog u tim fazama ne može se dobiti prava informacija o mogućnosti stvaranja enterotoksina u siru.

Zbog intrinzič i ekstrinzič faktora, od kojih zavisi razmnožavanje *S. aureus* i stvaranje enterotoksina, nivo stvorenog enterotoksina u optimalnim laboratorijskim uslovima u poređenju sa sumnjivim sirom mora biti mnogo veći. Stoga određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka ne može biti kriterijum za prisustvo enterotoksina stafilokoka u siru.

Tokom proizvodnje i skladištenja svežeg sira, *S. aureus* može da se razmnožava i stvara enterotoksin, posebno ako u proizvodnju sira nije uključena mlečnokiselinska fermentacija. Kontaminacija *S. aureus* svežih sireva, napravljenih iz termički obrađenog mleka, može da nastane posle toplotne obrade, a visoka aktivnost vode (0,94–0,96) i visoka pH vrednost (6,0–6,2) u surutki sira omogućavaju razmnožavanje ovog mikroorganizma.

Pasterizacija mleka je efikasan postupak u eliminaciji *S. aureus*, pa broj ovih mikroorganizama u mekom siru proizvedenom iz pasterizovanog mleka ukazuje na kontaminaciju posle pasterizacije. Ukoliko je broj *S. aureus* visok u prvih 48 časova proizvodnje sira, postoji rizik od stvaranja enterotoksina. Utvrđeno je da se broj *S. aureus* smanjuje za vreme zrenja i skladištenja mekog sira, međutim, enterotoksin ostaje u siru za sve vreme roka upotrebe. Kriterijum za koagulaza pozitivne stafilokoke je validan samo ako se primeni 48–72 časa od početka proizvodnje sira. Ako se sir ispituje posle tog vremena, umesto određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilokoka treba ispitati sir na prisustvo enterotoksina. Enterotoksini mogu da se dokazuju direktno u siru. Sir koji sadrži enterotoksine nije prihvatljiv za ishranu ljudi. Alternativno se može prvo izvršiti ispitivanje sira na prisustvo TNaze. Ukoliko je reakcija na TNazu pozitivna, sir se obavezno ispituje na prisustvo enterotoksina.

S. aureus može da se razmnožava i stvara enterotoksine za vreme proizvodnje mleka u prahu (npr. u tanku za skladištenje zgusnutog mleka pre sušenja). Zbog nepovoljnih uslova za razmnožavanje *S. aureus* u mleku u prahu tokom skladištenja njegov broj se smanjuje. Međutim, odsustvo *S. aureus* ne isključuje prisustvo enterotoksina stafilokoka, budući da se oni mogu stvoriti pre procesa sušenja. Međutim, ako se mleko u prahu koristi u pripremi određenih namirnica, *S. aureus* može da se umnožava i stvara enterotoksine. Mleko u prahu i

proizvodi koji sadrže mleko u prahu opisani su u slučajevima alimentarnih intoksikacija toksinima stafilocoka.

Pri utvrđivanju mikrobioloških kriterijuma za bezbednost mleka u prahu treba uzeti u obzir mogućnost da je došlo do stvaranja enterotoksina u mleku u prahu za vreme proizvodnje kao i mogućnost da je proizvod kontaminiran bakterijom *S. aureus* posle proizvodnje. Stoga mleko u prahu treba ispitivati na broj koagulaza pozitivnih stafilocoka i prisustvo enterotoksina.

S. aureus može da se razmnožava tokom proizvodnje zamrznutih proizvoda od mleka, ali ne i tokom njihovog skladištenja.

Zaključak / Conclusion

Alimentarne intoksikacije enterotoksinima stafilocoka nastaju kao posledica konzumiranja hrane koja sadrži enterotoksine koagulaza pozitivnih stafilocoka, najčešće *S. aureus*. Do danas ni u jednom slučaju alimentarnih intoksikacija enterotoksinima stafilocoka nisu dokazane koagulaza negativne stafilokoke. Međutim, sve koagulaza pozitivne enterotoksogene stafilokoke ne stvaraju enterotoksine u svakoj vrsti hrane. Stvaranje enterotoksina stafilocoka u hrani zavisi od međusobnog odnosa brojnih faktora kao što su: aktivnost vode, pH, redoks potencijal, temperatura i inhibitorno dejstvo drugih bakterija. Razmnožavanje enterotoksogenih stafilocoka i stvaranje enterotoksina u fermentisanim proizvodima od mleka mogu da spreče bakterije mlečne kiseline. Opšte je prihvaćeno da izolati poreklom od ljudi mnogo češće stvaraju enterotoksin nego izolati poreklom od goveda i da su izolati stafilocoka iz obolelog vimena rezistentniji od izolata iz zdravog vimena. Izolati stafilocoka iz hrane najčešće stvaraju enterotoksin A i enterotoksin D.

Enterotoksini stafilocoka su mnogo otporniji na štetno delovanje okoline nego ćelije stafilocoka. Enterotoksini stafilocoka se normalno ne inaktiviraju ili veoma slabo inaktiviraju za vreme proizvodnje, skladištenja, distribucije ili kulinarne pripreme hrane. Stoga, ako su enterotoksogene stafilokoke mogle da se razmnožavaju u hrani do broja većeg od 10^5 – 10^6 cfu/g ili/ml, pre nego što su uništene, postoji rizik od intoksikacije toksinima stafilocoka.

Enterotoksogene stafilokoke mogu da se razmnožavaju i stvaraju enterotoksin u prvim fazama proizvodnje sira kada je pH grušića veći od 5,0 i kada bakterije mlečne kiseline nisu prisutne u velikom broju. Period pogodan za umnožavanje *S. aureus* u siru kreće se od nekoliko časova do najviše 48 časova u zavisnosti od vrste sira.

Budući da su enterotoksini stabilniji od ćelija *S. aureus* mikrobiološkim kriterijumima treba definisati graničnu vrednost za broj koagulaza pozitivnih stafilocoka u ranoj fazi proizvodnje sira (2–3 dana od početka proizvodnje), a graničnu vrednost za enterotoksine u kasnijim fazama proizvodnje sira.

Rizik od alimentarnih intoksikacija toksinima stafilokoka može se smanjiti primenom dobre higijenske praxe, dobre proizvođačke prakse i integrisanim pristupom proizvodnji hrane zasnovanom na principima HACCP-a.

Literatura / References

1. Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H, Kozaki S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol Infect* 2003; 130: 33-40.
2. Asperger H, Zangerl P. *Staphylococcus aureus*. In Encyclopedia of Dairy Sciences (eds Roginski H, Fuquay JW, Fox P). Academic press, Elsevier Science, London, 2002; 2563-9.
3. Baird-Parker AC. The staphylococci: an introduction. *J Appl Bact Symp* 1990; Suppl. 1S-8S.
4. Balaban N, Rasooly. Review – Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol* 2000; 61: 1-10.
5. Bayles KW, Landolo JJ. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol* 1989; 171: 4799-806.
6. Bennett RW, Yetevo M, Smith W. *Staphylococcus aureus* identification characters and enterotoxigenity. *J Food Sci* 1986; 51: 1337-9.
7. Bennett RW. Atypical toxigenic *Staphylococcus* and non-*Staphylococcus aureus* species on the horizon? An update. *J. Food Protect.* 1996; 59(10): 1123-6.
8. Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Bobbins RN, Davis PD. A new staphylococcal enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet* 1981; 1017-21.
9. Bergdoll MS. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP (ed). Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker, Inc, New York, Basel, 1989; 463-523.
10. Betley MJ, Schlievert PM, Bergdoll MS, Bohach GA, Landolo JJ, Khan SA, Pattee PA, Reiser RF. Staphylococcal gene nomenclature. *ASM News*, 1990; 56: 182.
11. Bockelmann W, Krusch U, Engel G, Klijn N, Smit G, Heller KJ. The microflora of Tilsit cheese. Part 1. Variability of the smear flora. *Nahrung*, 1997; 41: 208-12.
12. Bunčić O. Antagonističko delovanje laktobacila izolovanih iz fermentovanih kobasica na razmnožavanje *Staph. aureus* i stvaranje enterotoksina. Doktorska disertacija, Beograd, 1986.
13. Condon JM. Food toxicology (in two parts). Part B: contaminants and additives, Marcel Dekker, Inc, New York, Basel, 1988; 802-3.
14. Council Directive 92/46, 1992, The health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat-treated milk and milk-based products.
15. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, 2003, Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on Staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses.
16. Fraser J, Arcus V, Kong P, Baker E, Proft T. Super antigens- powerful modifiers of the immune system. *Mol Med Today* 2000; 6: 125-32.
17. Genigeorgis CA. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *Int. J Food Mic* 1989; 9: 327-60.

18. Herten B, Board RG, Mead GC. Conditions affecting growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* on temperature-abused chicken meat. Lett Appl Mic 1989; 9: 145-8.
19. Jay MJ, Loessner MJ, Golden DA. Staphylococcal Gastroenteritis, In: Dennis R. Heldman, editor, Modern food microbiology, VII th edition, Springer, 2005; 545-90.
20. Katić V, Stojanović L. Mikrobiološki kriterijumi za ocenu higijenske ispravnosti mleka i proizvoda od mleka. J Sci Agric Research/Arh. poljopr. nauke, 2000; 61 (1-2): 147-58.
21. Khambaty FM, Bennett RW, Shah DB. Application of pulse field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. Epidemiol Infect 1994; 113: 75-81.
22. Martin SE, Mayers ER, Iandolo JJ. *Staphylococcus aureus* In: Hui YH, Pierson MD, Gorham JR (eds) Foodborne disease handbook, Vol. 1 Bacterial pathogens. New York Basel: Marcel Dekker Inc. 2001; 345-81.
23. Mijačević Z. Biohemijska aktivnost stafilokoka u mleku pri različitim tehnološkim uslovima obrade i prerade mleka. Doktorska disertacija, Beograd, 1983.
24. Nout MJR, Notermans S, Rombouts FM. Effect of environmental conditions during soya-bean fermentation on the growth of *Staphylococcus aureus* and production thermal stability of enterotoxins A and B. Int J Food Microb 1988; 7: 299-309.
25. Pravilnik o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica u prometu (Sl. list SRJ 26/93).
26. Papageorgiou AC, Acharya KR. Microbial super antigens: from structure to function. Trends Microbiol 2000; 8: 369-75.
27. Roberts D. Bacteria of public health significance. In: Meat Microbiology, Brown, M. (Ed). Applied Science Publishers: London and New York, 1982.
28. Smith JL, Buchanan RL, and Palumbo SA. Effect of food components on staphylococcal enterotoxin syntesis: a review. J Food Protec 1983; 46: 545-55.
29. Stojanović L. Uticaj ekoloških činilaca na dinamiku stvaranja i održivost stafilokoknih enterotoksina. Doktorska disertacija, Beograd, 1980.
30. Stojanović L, Bunčić O, Katić V. Toksini aerobnih mikroorganizama u hrani. Zbornik radova i kratkih sadržaja "11. savetovanja veterinara Srbije", Zlatibor, 1999; 50-5.
31. Tatini SR. Influence of food environments on growth *S. aureus* and production of staphylococcal enterotoxins. J. Milk Fd. Tech. 1973; 36: 559-63.
32. Ulrich RG. Envolving superantigens of *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol 2000; 27: 1-7.
33. Vaugh VC. Poisonous or sick cheese. Public Healt, 1884; 10: 241-5.
34. Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, Orwin PM, Kapur V, Schlievert PM. Characterization and sxpression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. J Biol Chem 2002; 277: 1338-47.

ENGLISH

SIGNIFICANCE OF COAGULASE-POSITIVE STAPHYLOCOCCI FOR MICROBIOLOGICAL FOOD SAFETY

Vera Katić

Staphylococcal foodborne intoxication, in which major symptoms are vomiting and diarrhoea, occurs after ingestion of thermostable staphylococcal enterotoxins produced in food by enterotoxigenic strains of coagulase-positive staphylococci. Staphylococcal enterotoxins are normally not or only slightly inactivated during food processing, storage, distribution or during the preparation of the food in the kitchen. Therefore, if enterotoxigenic staphylococci are able to grow in food to more than 10^5 - 10^6 cfu/g/ml before they are killed there is still a risk of intoxication with consumption.

The legislation of the Republic of Serbia lays down criteria for coagulase-positive staphylococci in food. However, the number of coagulase-positive staphylococci may not always be a good indicator of the presence of staphylococcal enterotoxins, and the number of cells may have already decreased although the product still contains enterotoxins. The microbiological criteria for coagulase-positive staphylococci and/or staphylococcal enterotoxins in food are essential and useful to protect public health.

Key words: coagulase-positive staphylococci, staphylococcal enterotoxins, food, food safety

РУССКИЙ

ЗНАЧЕНИЕ КОАГУЛЯЗ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ СТАФИЛОКОККОВ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ИСПРАВНОСТИ КОРМА

Вера Катич

Алиментарные интоксикации кормом, у которых главный симптом рвота и диаря, возникают после вноса энтеротоксинов, которые в корме создали энтеротоксигенные штаммы коагуляз положительных стафилококков. Энтеротоксины стафилококков нормально или очень мало инактивируются во время процесса производства, склада, дистрибуции или во время кулинарной подготовки корма. Оттого, насколько коагуляза положительные стафилококки могут размножиться в корме до числа большего от 10^5 - 10^6 цфу/г/мл прежде чем, что будут уничтожены, потребление корма представляет собой риск от интоксикации.

В Регламенте о микробиологической исправности пищевых продуктов в обороте (Сл. Лист СРЮ 26/93) предписанные критерии для коагулязы положительного стафилококка в корме. Между тем, число коагулязов положительных стафилококков не всегда хороший индикатор для присутствия энтеротоксинов стафилококков, так как число клеток может уменьшиться, а что энтеротоксин будет присутствующий в корме. Микробиологический критерий для коагулязы положительного стафилококка и/или энтеротоксины стафилококков в корме необходимы и полезны для охраны здоровья людей.

Ключевые слова: коагуляз положительного стафилококка, энтеротоксины стафилококков, корм, безопасность корма

ZNAČAJ *BRUCELLA MELITENSIS* ZA BEZBEDNOST HRANE* IMPORTANCE OF *BRUCELLA MELITENSIS* FOR FOOD SAFETY

P. Sekulovski**

Bruceloza je zarazna bolest uzrokovana mikroorganizmima iz roda Brucella. Različiti pripadnici ovog roda zaražavaju različite vrste životinja uključujući goveda, ovce, koze, svinje, pse, morske sisare i mnoge druge. Infekcija ljudi nastaje direktno preko kontakta se zaraženim životinjama ili preko proizvoda životinjskog porekla, posebno nepasterizovanog mleka, pavlake, sira i drugih proizvoda od mleka. Zastupljenost bruceloze kod ljudi na Balkanu i u Mediteranskim zemljama već nekoliko decenija unazad ne pokazuje tendenciju smanjenja. Preporučene su preventivne mere za održavanje lance hrane bezbednim.

Ključne reči: bruceloza, bezbednost hrane

Uvod / Introduction

Bruceloza je bakterijska zoonoza od globalne važnosti. Uzročnik je gram negativan fakultativno intracelularan patogen koji napada veliki broj različitih sisara uključujući ljude, goveda, ovce, koze, svinje, glodare i vodene sisare. U većini domaćina bolest primarno napada reproduktivni sistem sa istovremenim gubitkom u produktivnosti obolelih životinja. Kod ljudi je infekcija praćena različitim manifestacijama i karakterističnim povratnim febrilnim epizodama, pa se ova bolest opisuje kao talasasta groznica. Bolest dovodi do jake iznurenosti i ima izrazito dug tok što potvrđuje više dokumentovanih slučajeva sa znacima povezanim sa ovom bolešću i više od 30 godina. Veruje se da je jedna takva individua i Florens Najtingejl, koja je podnosila bolest više od 25 godina praćenu promena u ponašanju (neurobruceloza) i spondilitisom koji ju je vezao za krevet 6 godina.

Ozbiljnost ove bolesti i nedostatak humane vakcine doveli su do istraživanja bruceloze kao biološkog oružja. Američka vojska je 1954. razrađivala upotrebu *Brucelle suis*, ali promene u globalnoj politici su rezultirale zabranom ovakvih napora praćenom konvencijom o biološkom i toksičnom oružju iz 1972.

* Rad saopšten na simpozijumu "Bezbednost namirnica animalnog porekla", Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd 16 i 17. oktobar 2008. godine

** Dr sci med. vet. Pavle Sekulovski, docent, Fakultet veterinarske medicine, Skopje, Makedonija / Doc. D-r Pavle Sekulovski, Fakultet za veterinarna medicina, Skopje, Makedonija

Opšte karakteristike

Prema Hughesu (1897), kliničku sliku bolesti kompatibilnu brucelozi opisao je Hipokrat (oko 450 p.n.e.). Tokom XVIII i XIX veka nekoliko lekara je povezalo slučajeve kontinuirane i intermitentne groznice sa brucelozom. Većina autoriteta se slaže da je prvi odgovarajući opis bruceloze kao posebne bolesti dao Marston (1861), lekar Britanske armije koji je tokom zime 1860. pisao o "Mediterranskoj gastričnoj remitentnoj groznici" (Wilson, 1946).

Sir David Bruce (1887) je prvi izolovao uzročnika bruceloze iz slezina četvero britanskih vojnika umrlih od Malteške groznice i nazvao ga *Micrococcus melitensis*. Ubrzo je (1888. i 1893.) objavio dopunske radove u kojima je dao kratko kliničko razmatranje bolesti. Uspeva da bolest prenese na majmune. Istražujući bolest domorodaca u Ugandi, Mukinyo, 1910. godine otkrio je da se radi o brucelozi, a da su izvor zaraze kože (Wilson, 1946).

Sadašnji sistem taksonomije roda *Brucella* zasnovan je na preporukama Subkomiteta za taksonomiju *Brucella* Internacionalnog komiteta za bakteriološku nomenklaturu 1963, i dopunjen u kasnijim izveštajima. Po tom sistemu taksonomije brucele su podeljene u šest vrsta : *Brucella melitensis* sa 3 biotipa, *Brucella abortus* sa 7 biotipova, *Brucella suis* sa 5 biotipova, *Brucella neotomae*, *Brucella ovis*, *Brucella canis*, *Brucella ceti*, *Brucella pinnipedalis* i *Brucella microti* (International Committee on Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*, 2008).

Brucele su mali, sitni, nesporulirajući gram negativni štapići ili kokobacili (0,5–0,7 x 0,6–1,5 µm). Nemaju kapsulu, iako su slabo razvijene kapsule dokazane na svežim izolatima uz upotrebu specijalnih boja, ne boje se bipolarno. Po gramu se boje gram negativno. Za diferenciranje od drugih bakterija koristi se bojenje po Kozlovskom – brucele se boje crveno, a ostale bakterije plavo. Modificiranim Ziehl-Neelsen-ovim bojenjem pojavljuju se kao mali crveni kokobacili. Javljaju se pojedinačno, u parovima, grupisani u gomilice ili u kratkim lancima od po nekoliko bakterija u nizu. Ne poseduju flagele i nisu pokretne (Alton, 1988; Marković, 1983; Quinn i sar., 1994; Wilson i Miles, 1946).

Striktni su aerobi, a neki tipovi su karboksifilni (bolje rastu u prisustvu 5–10 % CO₂). Katalaza pozitivni, oksidaza pozitivni (osim *B. ovis* i *B. neotomae*), ureaza pozitivni (osim *B. ovis*), redukuju nitrate (osim *B. ovis*). Vodonik-sulfid proizvode *B. abortus*, *B. suis* i *B. neotomae*. Brucele ne rastapaju želatin, ne koagulišu mleko i ne produkuju indol. Većina brucela razlaže D-ribozu, D-galaktozu, alanin, asparagin i glutaminsku kiselinu (Sokolovski, 1992; Marković, 1983; Kelser i Schoening, 1948; Gillespie i Timoney, 1992).

Rast na čvrstim podlogama je spor, nakon 2 dana kolonije su jedva vidljive, a maksimalnu veličinu dostižu nakon 5–7 dana. Nakon 3–5 dana inkubacije na čvrstoj selektivnoj podlozi izrastaju tačkaste, glatke, blistave, plavičaste, providne kolonije. Starenjem kolonije postaju zamućene i dostižu dijametar od 2–3 mm (Quinn i sar., 1994).

Bruceloza

Bruceloza je bolest ljudi i životinja, posebno domaćih životinja, pa su stoga ovce, koze, goveda, svinje, psi najvažniji izvori infekcije ljudi. Svaka vrsta brucela ima svog primarnog domaćina, mada se i neke druge vrste farmskih i domaćih životinja, kao što su konj, bufalo, kamila, bizon, jak, javljaju kao domaćini i izvori infekcije ljudi, što je posledica sposobnosti brucela da migriraju sa jednog domaćina na drugog. *B. melitensis* i *B. abortus* su najспособnije za migriranje, pa se mogu naći u veoma velikom broju različitih životinjskih vrsta. Migracija *B. suis* i *B. ovis* je izuzetno retka. Osim domaćih životinja, registrovan je veliki broj divljih životinja i ptica inficiranih brucelama. U većini slučajeva one ne predstavljaju nezavisan izvor infekcije već se zaraza na njih prenosi na zajedničkim pašnjacima u onim rejonima u kojima postoji epizootija bruceloze domaćih životinja. Prestankom epizootije domaćih životinja, prestaje njeno širenje i na divlje životinje. Zabeležni su samo sporadični slučajevi prenošenja na ljude sa divljih životinja (Elberg, 1981; Sokolovski, 1992).

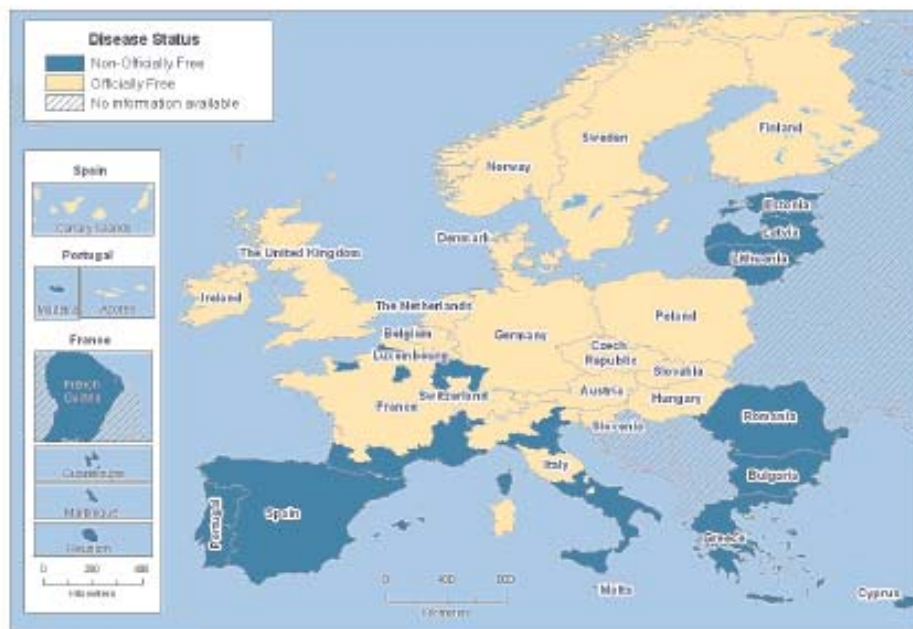
U nezaražena stada bruceloza se unosi zaraženim životinjama, kliconošama, koje su bez kliničkih simptoma, a za vreme porođaja ili pobačaja, a i mlekom izlučuju ogromne količine brucela. Kliconošama se zaraza širi i na zajedničkim pašnjacima, gde mogu oboleti i druge vrste pa i divlje životinje. Životinje se zaraze najčešće oralnim putem, pasući travu i preko sluzokože disajnih organa. Zaražene životinje izlučuju brucele mlekom, mokraćom, fekalijama, ejakulatom, vaginalnim sekretom. Iscedak iz nosa domaćih životinja nije infektivan. Najveći izvor zaraze predstavljaju fetus, placenta i plodove ovojnice. Gnoj iz abscesa takođe može da sadrži veliki broj brucela.

Glavni načini prenošenja bruceloze na ljude su ingestija i kontakt. Infekcija je moguća i kao posledica inhalacije i akcidentalne inokulacije.

Ingestija – Nastaje uglavnom kroz mukozne membrane gornjih delova intestinalnog aparata. Brucele mogu ući i kroz mukoznu membranu želuca ako je kiselost želudačnog soka smanjena ili je isti veoma razređen (Elberg, 1981).

Kontakt – Pri kontaktnim infekcijama, brucele najčešće ulaze u ljudsko telo preko kože ruku, sa kojih mogu biti prenete na konjunktive i na ostale sluzokože. Najveći rizik od zaraze postoji pri pomaganju pri porođaju ili pobačaju i manuelnom odvajanju posteljice, zbog mogućeg izlaganja velikom broju brucela u vreme kada je koža ruku razmekšana. Ručna muža, šišanje ovaca, klanje i obrada zaklanih obolelih životinja su takođe česti načini kontaktne infekcije (Elberg, 1981).

Inhalacija – Dokazana je eksperimentalno ali i epidemiološkim nalazima pri izbijanju bruceloze u nekoliko klanica. Ovaj način prenošenja i širenja zaraze je veoma čest i među laboratorijskim radnicima koji se bave manipulacijom sa živim kulturama brucela i spravljanjem vakcina. Aerogeno zaražavanje je moguće i preko prašine u torovima i štalama u kojima borave obolele životinje (Elberg, 1981).



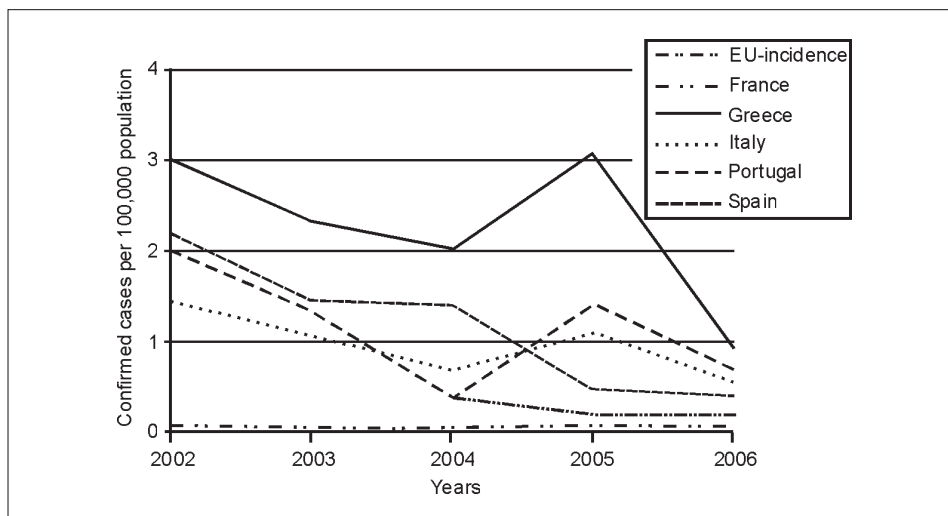
Slika 1. Status bruceloze ovaca i koza u EU, 2006. /
Figure 1. Status of brucellosis in sheep and goats in EU, 2006

Inokulacija – Do zaraze inokulacijom živih brucela dolazi veoma retko, slučajno, pri rukovanju iglama, špricovima i živim vakcinama (Elberg, 1981).

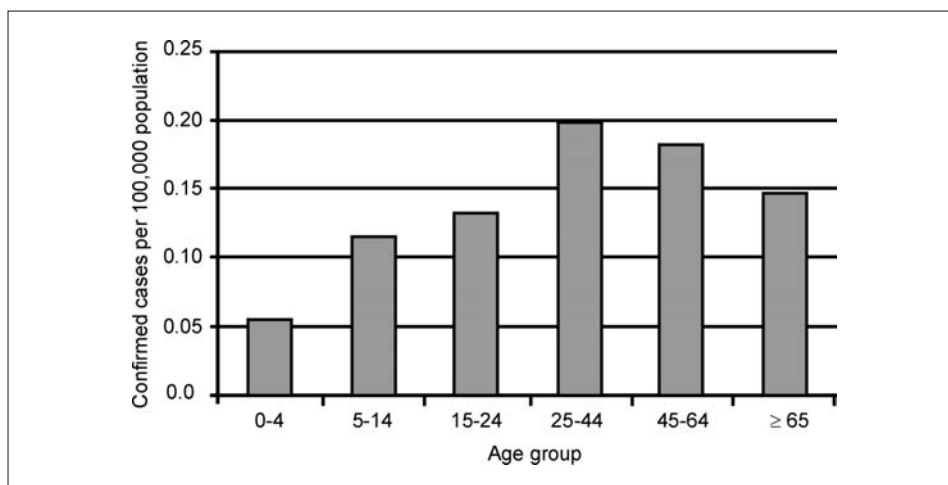
Interhumano prenošenje bruceloze se uglavnom ne javlja, mada postoje retki slučajevi koji ukazuju na seksualnu transmisiju.

Tabela 1. Pregled zemalja EU koje su prijavile pojavu Bruceloze u 2006. /
Table 1. Survey of EU countries that have reported incidence of brucellosis in 2006

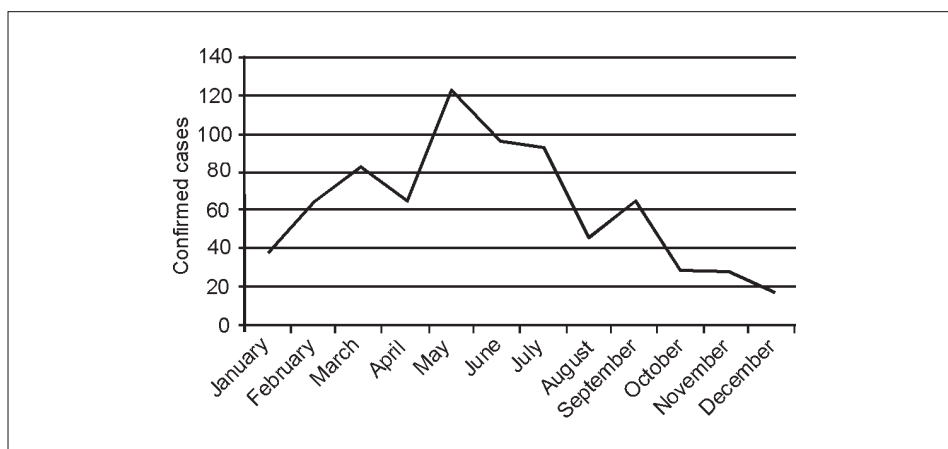
	Broj zemalja članica koje prijavljuju / <i>Number of member-states that report</i>	Zemlje / <i>Countries</i>
Ljudi / <i>Humans</i>	20	Sve zemlje članice osim: CZ, DK, HU, LU, SL / <i>All member-states except: CZ, DK, HU, LU, SL</i> Nečlanice: BG, IS, LI, NO, RO / <i>Non-members: BG, IS, LI, NO, RO</i>
Hrana / <i>Food</i>	3	Zemlje članice: BE, IT, PT / <i>Member-states: BE, IT, PT</i>
Životinje / <i>Animals</i>	24	Zemlje članice: sve osim MT / <i>Member-states: All except MT</i> Nečlanice: CH, NO, RO / <i>Non-members: CH, NO, RO</i>



Grafikon 1. Pojava humane bruceloze u non-OBF zemljama članicama EU /
Graph 1. Incidence of human brucellosis in non-OBF member-states of EU



Grafikon 2. Starosna distribucija humanih slučajeva bruceloze u EU, 2006 /
Graph 2. Age distribution of brucellosis cases in humans in EU, 2006



Grafikon 3. Sezonska distribucija humanih slučajeva bruceloze u EU, 2006 /
Graph 3. Seasonal distribution of brucellosis cases in humans in EU, 2006

Dokazi o opasnosti hrane

Bruceloza nažalost još uvek uzrokuje veliki broj oboljenja kod ljudi posebno u zemljama na niskom stepenu ekonomskog razvoja. Nedostatak kontrolnih programa za suzbijanje bruceloze, nedovoljna edukacija potrošača i nedostatak navike termičke obrade mleka, glavni su razlozi širenja bruceloze među ljudima.

Mleko i proizvodi od mleka

U regionima gde je bruceloza životinja endemična, zaraza se na ljude najčešće prenosi konzumacijom mleka i proizvoda od mleka. Termička obrada mleka (pasterizacija i sterilizacija) pre njegove dalje prerade i puštanja u promet, najsigurniji je način sprečavanja njenog širenja na ljude.

Objavljeni podaci o rezistentnosti brucela na termičku obradu su uglavnom češće prezentovani u obliku letalne ili neletalne kombinacije vreme/temperatura nego u obliku D- ili z- vrednosti. Pored toga, retko se navode inicijalni nivoi kontaminacije. Većina podataka je dobijena upotrebom komercijalnih pasterizatora i eksperimentalno. Prema Stumbou, brucele u mleku imaju D-vrednost pri 65,6°C od 0,10 do 0,20 minuta i z-vrednost između 4,4°C i 5,6°C.

Metodi proizvodnje koji se koriste za određene tipove sireva (tvrde sireve) eliminišu brucele ili termičkim tretmanom na početku procesa proizvodnje ili za vreme zrenja kombinovanim delovanjem smanjene aktivnosti vode i niske pH vrednosti. Česta je praksa zadržavanja sireva za empirijski određeni vremenski period u magacinima pre njihove prodaje potrošačima.

Kod mekih sireva preživljavanje brucela zavisi od pH vrednosti proizvoda, koncentracije soli u salamuri i temperature skladištenja. Nijedan od ovih faktora ne garantuje odsustvo brucela u siru u vreme njegovog plasmana na tržište. Zbog toga se smatra da je upotreba termički obrađenog mleka za proizvodnju mekih sireva neophodna da bi se brucele eliminisale iz finalnog proizvoda. Fosfataza test, sa određenim limitacijama, može se koristiti za proveru da li je mleko koje se koristi za proizvodnju ovih vrsta sireva pravilno pasterizovano.

Iako je optimalan pH za rast brucela 7,3–7,5, one su sposobne za razmnožavanje i pri niskim pH vrednostima, od 4,5 do 5,1. Brucele preživljavaju u veštački kontaminiranim fermentisanim proizvodima pri temperaturama hlađenja od 4-10°C i više od 100 dana. U puteru preživljavaju više od 56 dana pri temperaturama od 4°C i 20-25°C (Zuniga, 2005).

Tabela 2. Uzorci mleka i sira testirani na brucelozi u EU, 2006 /
Table 2. Samples of milk and cheese tested for brucellosis in EU, 2006

	Opis / Description	N	Pozitivni / Positive	% Pozitivni / %Positive
Sirovo kravje mleko / <i>Raw cow's milk</i>				
Belgija / <i>Belgium</i>	Za preradu / <i>For processing</i>	73,482	0	0
Italija / <i>Italy</i>		12,845	109	0,8
Sir od kravljeg mleka / <i>Cheese made from cow's milk</i>				
Italija / <i>Italy</i>	Mek i polumek sir / <i>Soft and semi-soft cheese</i>	192	0	0
Italija / <i>Italy</i>		52	0	0
Sir od ovčijeg mleka i mleka drugih vrsta životinja / <i>Cheese made from milk of sheep and other animals</i>				
Italija / <i>Italy</i>	Kozje mleko, mek i polumek sir / <i>Goat's milk, soft and semi-soft cheese</i>	40	0	0
Italija / <i>Italy</i>	Ovčije mleko, mek i polumek sir / <i>Sheep's milk, soft and semi-soft cheese</i>	42	0	0
Italija / <i>Italy</i>	Bafalo / <i>Buffalo</i>	217	0	0
Italija / <i>Italy</i>	Nespecificirano mleko / <i>Non-specified milk</i>	104	0	0

Radi ilustracije spomenimo dva sveža slučaja alimentrane bruceloze prouzrokovane konzumacijom mlečnih proizvoda.

Španija 2002 - U periodu januar-mart 2002 u Andaluziji (oblast u Španiji) zabeleženo je 11 slučajeva alimentarne bruceloze (Mendez, 2003). Svih 11 osoba je obolelo posle konzumacije nepasterizovanog kozjeg sira sa jedne farme. Niko od obolelih nije pripadao rizičnim kategorijama niti je imao direktan kontakt sa obolelim životinjama.

Grčka 2008 - Najsvežiji slučaj alimentarne bruceloze zabeležen je ove godine u Grčkoj. Od 1. aprila pa do 17. juna 2008. na ostrvu Tasos, prijavljeno je

55 slučajeva bruceloze ljudi. Od toga, 53 je konzumiralo nepasterizovano mleko i/ili mlečne proizvode; 8 lica se bavilo visokorizičnim poslovima (6 vlasnika stada i 2 mesara), a 9 osoba je imalo kontinuiran kontakt sa ovcima i kozama (Vorou i sar., 2008).

Meso i organi životinja

Meso i organi obolelih životinja od bruceloze još uvek izazivaju polemiku u naučnim krugovima kao vektori i uzročnici bruceloze ljudi. Jedine do sada publikovane podatke u kojima se izveštava o izolaciji *Brucella melitensis* iz mesa obolelih životinja (koza) objavili su Rabndhawe i Kalre (1970), kao i Entela (1960) koji je iz tri uzorka vratne muskulature uspeo da izoluje *Brucella melitensis*. Brojni drugi naučnici izveštavaju o izolaciji brucela iz slezine, bubrega, ilijačnih limfnih čvorova (Entel 1959, 1960), pluća, jetre, mozga (Ribeiro, 1990), testisa, oka, zglobova (Garin-Bastuji, 1990), vimena, supramamarnih limfnih čvorova, uterusa (Pefanis, 1988) i submaksilarnih limfnih čvorova (McCullough, 1951).

Našim istraživanjima u Makedoniji u periodu od 1996–1997, iz mesa ovaca obolelih od bruceloze nismo uspeli da izolujemo brucele. Izolacija iz limfnih čvorova i organa je bila uspešna pri čemu smo utvrdili zastupljenost od 6% u ilijačnim medijalnim limfnim čvorovima, 18% u supramamarnim limfnim čvorovima, u slezini 10%, jetri 4% i bubrezima 8% (Sekulovski i sar., 1997)

Održavanje prehrambenog lanca bezbednim / *Keeping the food chain safe*

Uzimajući u obzir sve prethodno navedeno i iskustva drugih zemalja, očito je da se najveći broj ljudi zarazi brucelom putem konzumacije mleka i proizvoda od mleka, kao i u direktnom kontaktu sa obolelim životinjama. Zbog toga je neophodno preduzimanje mera za održavanje lanca hrane bezbednim, čime bi se sprečilo širenje bruceloze kako među ljudima tako i među životinjama.

U tom pogledu treba preduzeti sledeće mere:

- praćenje epidemiološke i epizootičke situacije na endemo-epidemijskim područjima;
- rano otkrivanje obolelih, utvrđivanje izvora zaraze i načina širenja;
- šira epidemiološka i laboratorijska istraživanja na endemo-epidemijskim područjima;
- sprečavanje ulaska mleka poreklom od obolelih životinja u lanac hrane;
- obavezna pasterizacija mleka ovaca i koza;
- kontrola pasterizacije fosfataza testom;
- u slučaju klanja seropozitivnih životinja, neškodljivo uklanjanje unutrašnjih organa i upotreba mesa pod strogim nadzorom veterinarske inspekcije;

- informisanost zdravstvene i veterinarske službe o pojavi bruceloze kod ljudi i životinja;
- sistematski pregledi svih profesionalno izloženih lica na zaraženom području;
- zdravstveno-vaspitni rad sa stanovništvom (da ne piju nekuvano mleko i ne jedu mlečne proizvode od nepasterizovanog mleka, koristiti samo dovoljno kuvano ili pečeno meso);
- edukacija zaposlenih u klanicama, mesarama i mlečnoj industriji;
- edukacija lovaca o korišćenju zaštitnih sredstava prilikom obrade životinja i
- dezinfekcija kontaminiranih površina, obavezno uklanjanje placente, izlučevina i fetusa životinja koje su abortirale.

Literatura / References

1. Anon. International Committee on Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella* 2008. <http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm>
2. Alton GG, Jones M Lois, Angus RD, Verger JM. Techniques for the Brucellosis laboratory, Institut national de la Recherche Agronomique, Paris, 1988.
3. Entel HJ. Brucella bakterien in Fleisch und Fleischerzeugnissen. Berl. Munch. Tierarztl Wschr 1959; 72, 461-3.
4. Entel HJ. Zur frage des Brucellen vorkommens bei serologisch oder allergisch positiv sowie negativ reagirenden Schafen. Rinertuberk. U Brucellose 1960; 9, 51-9.
5. Garin-Bastuji B, Oudar J, Richard Y, Gastellu J. Isolation of brucella melitensis biovar 3 froma chamois (*Rupicapra rupicapra*) in the southern french Alps, Journal of Wildlife Diseases 1990; 26(1): 116-8.
6. Gillespie JH, Timoney JF. Hagan and Bruners infectious diseases of domestic animals, p. 127-150, Comstock Publishing associates, London, 1992.
7. Kelser RA, Schoening HW. Manual of Veterinary Bacteriology, 5th Ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA, 1948; 223-43.
8. Marković B. Mikrobiologija II, Bakterije, kvasci i plesni, Beograd, 1983.
9. McCoulough, Eisele, Pavelchek. Public Health Reports (U.S.) 1951; 66, 205.
10. Méndez Martínez C, Páez Jiménez A, Cortés Blanco M, Salmoral Chamizo E, Moledano Moledano E, Plata C, Varo Baena A, Spain. Martíñez Navarro F. Brucellosis outbreak due to unpasteurized raw goat cheese in Andalusia (Spain), january - march 2002; Eurosurveillance, Volume 8, Issue 7, 01 July 2003.
11. Mims CA, Playfair JHL, Roitt IM, Wakelin D, Rosamund Williams. Medical Microbiology, Mosby Year Book, St. Louis, 1993.
12. Pefanis SM, Gummow B, Pieterse PM, Williamson C, Venter CG, Herr S. The isolation and serology of the FSA *Brucella melitensis* Rev. 1 mutant in a flock of sheep. Onderstepoort J Vet Res 1988; 55: 181-3.
13. Randhawa AS, Kalra DS. Human pathogens from goat meat – Brucellae, Indian J Med Res 1970; 58: 181-6.

14. Ribeiro LM, Herr S, Chaparro F, van der Vyver FH. The isolation and serology of *Brucella melitensis* in a flock of goats in central RSA. Onderstepoort J Vet Res 1990; 57(2): 143-4.
15. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. Wolfe Publishing. Clinical Veterinary Microbiology 1994; 261-8.
16. Sekulovski P, Markic Z, Mrenoski S. Izolacija na bruceli od seropozitivni ovci, Makedonski medicinski pregled 1997; 51(24): 38.
17. Sokolovski B, Nikolovski B. Bruceloza. Savezni sekretarijat za narodnu odbranu, Beograd, 1992.
18. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. The EFSA Journal 2007; 130: 176-88.
19. Vorou, Gkolfinopoulou K, Dougas G, Mellou K, Pierrotsakos IN, Papadimitriou T. Local brucellosis outbreak on Thassos, Greece: a preliminary report. Eurosurveillance, 19 June 2008; Volume 13, Issue 25.
20. Wilson GS, Miles AA. Topley and Wilsons Principles of Bacteriology and Immunity, 3rd Ed. Edward Arnold & Co, London 1946; 1693-729.
21. Zúñiga EA, Mota de la GL, Sánchez MM, Santos LEM, Filardo KS, López MA. :Survival of *Brucella abortus* in milk fermented with a yoghurt starter culture; Rev Latinoam Microbiol 2005; 47(3-4): 88-9.

ENGLISH

IMPORTANCE OF *BRUCELLA MELITENSIS* FOR FOOD SAFETY

P. Sekulovski

Brucellosis is an infectious disease caused by members of the *Brucella* spp. Various species of *Brucella* spp. infect different animals including cattle, sheep, goats, pigs, dogs, sea mammals and a variety of other animals. Infection of humans occurs directly via contact with infected animals or through animal products, in particular unpasteurised milk, cream, cheese and other dairy products. The incidence of brucellosis in humans in the Balkan and Mediterranean countries has not shown any declining tendency in previous decades. Preventive measures for keeping the food chain safe are recommended.

Key words: brucellosis, food safety

РУССКИЙ

ЗНАЧЕНИЕ *BRUCELLA MELITENSIS* ДЛЯ БЕЗОПАСНОСТИ КОРМА

П. Секуловски

Бруцеллёз – заразная болезнь, обусловленная микроорганизмами из рода *Brucella*. Различные животные, принадлежащие этому роду заражают различные виды животных, включая крупный рогатый скот, овцы, козы, свиньи, со-

баки, морские млекопитающие и многие другие. Инфекция людей возникает прямо через контакт с заражёнными животными или через животных продуктов, отдельно непастеризованного молока, сливок, сыра и других молочных продуктов. Пред-
сталенность бруцеллёза у людей в Балканских и Средиземноморских странах уже
несколько десятилетий назад не показывает тенденцию уменьшения. Превентив-
ные меры для содержания пищевой цепи безопасной рекомендованы.

Ключевые слова: бруцеллёз, безопасности корма

KONTROLA *LISTERIA MONOCYTOGENES* U POGONIMA ZA PROIZVODNJU HRANE*

CONTROL OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN FOOD PRODUCTION PLANTS

Mirjana Dimitrijević, N. Karabasil, Nataša Kilibarda, V. Teodorović,
M. Ž. Baltić**

L. monocytogenes je ustanovljena u različitim pogonima za proizvodnju hrane, uključujući mlekare, klanice, pogone za obradu i preradu ribe, kao i one za pripremu hrane spremne za jelo (RTE-Ready to eat), što se razmatra kao primarni mehanizam kontaminacije hrane ovom bakterijom. Kontaminirana proizvodna oprema je takođe brojna i raznolika, jer poseduje pojedine delove koji su nepristupačni za propisno čišćenje i dezinfekciju. Temperatura, mesto, kao i materijal radne površine takođe su povezani sa kontaminacijom pogona ovom bakterijom.

Dosadašnja istraživanja su doprinela boljem razumevanju načina i vremena kontaminacije namirnica u toku proizvodnog procesa, ali i dalje ima nerazjašnjenih problema, među kojima je svakako najveći adherencija bakterija i stvaranje biofilma, pri čemu je bakterija u tom stanju otpornija na tzv. stres faktore koji se uobičajeno koriste u industriji hrane u cilju dekontaminacije površina sa kojima hrana dolazi u kontakt.

Kontrola *L. monocytogenes* u pogonima za proizvodnju hrane moguća je prvenstveno primenom integrisanog programa, kompatibilnog sa sistemima Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) i Good Hygienic Practice (GHP), neophodnih u proizvodnji hrane bezbedne za potrošača. U osnovi, kontrolne mere koje mogu da doprinesu smanjenju učestalosti nalaza *L. monocytogenes* u gotovom proizvodu, kao i smanjenju nivoa kontaminacije ovom bakterijom su sa

* Rad saopšten na simpozijumu "Bezbednost namirnica animalnog porekla", Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd 16 i 17. oktobar 2008. godine

** Dr sci. med. vet. Mirjana Dimitrijević, docent, dr sci. med. vet. Nedeljko Karabasil, docent, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Fakultet veterinarske medicine, Beograd; mr sci. med. vet. Nataša Kilibarda, Veterinarski specijalistički institut "Subotica", Subotica; dr sci. med. vet. Vlado Teodorović, redovni profesor, dr sci. med. vet. Milan Ž. Baltić, redovni profesor, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

jedne strane vezane za postupke higijene u proizvodnom procesu, a sa druge za tehnološke postupke u njemu.

Ključne reči: Listeria monocytogenes, pogoni za proizvodnju hrane, kontrola

Alimentarna listerioza / *Alimentary listeriosis*

Termin "alimentarna listerioza" se koristi za pojavu listerioze kod ljudi, nastalu kao posledica infekcije preko hrane, i najčešće je povezana sa nedovoljnim znanjem o patogenim bakterijama koje se mogu preneti hranom i izazvati oboljenja. Serijom izbijanja infekcija u Severnoj Americi tokom osamdesetih godina, generalno je prihvaćeno da je hrana glavni izvor infekcije i sredstvo prenošenja listerioze na ljude. Iako je listerioza relativno retko oboljenje kod ljudi (sa manje od deset slučajeva na milion osoba), veoma je aktuelno i zabrinjavajuće, s obzirom na visoku stopu mortaliteta (od 20%) (Gellin i Broome, 1989). Manifestacije listerioze kod ljudi mogu se podeliti u dve kategorije: invazivna (septikemična forma) i ne-invazivna listerioza.

Invazivnoj listeriozi prethodi inicijalna infekcija digestivnog trakta sa *L.monocytogenes*, nakon koje dolazi do infekcije drugih organa i tkiva kao što su gravidni uterus, CNS, ili više organa odjednom. Ovaj oblik infekcije je redak, sa učestalošću na godišnjem nivou od 2-9 slučajeva na milion, ali sa visokom stopom smrtnosti, koja se kreće od 20% do 30% (Mead *et al.*, 1999; Anonymous 2003a). Vreme inkubacije kod ove forme oboljenja varira od jednog dana do nekoliko nedelja. Infektivna doza je nepoznata i pretpostavlja se da je individualna (Crum, 2002).

Neinvazivna listerioza (koja je označena kao febrilni listerialni gastroenteritis) praćena je tokom mnogobrojnih epidemija gde su se u većini slučajeva ispoljavali simptomi gastroenteritisa (dijareja, temperatura, bolovi u glavi i mišićima), kao i dermatitisa, nakon kratkog perioda inkubacije od 18h do 28h (Aureli i sar., 2000; Sim i sar., 2002). Ove epidemije su uglavnom nastale kao posledica ingestije visokih doza *L. monocytogenes* (1.9×10^5 - 1.6×10^9 cfu/g) od strane klinički zdravih osoba (Frye sar., 2002). Stopa incidencije i faktori uključeni u ovu infektivnu formu neinvazivne listerioze još uvek nisu u potpunosti poznati.

Prisustvo *L.monocytogenes* u namirnicama animalnog porekla / *Presence of L. monocytogenes in foods of animal origin*

Kao najčešći izvor infekcije kod ljudi smatra se kontaminirana hrana (oko 90% obolelih) (Mead *et al.*, 1999). Kao kontaminant *L. monocytogenes* se pojavljuje kod mnogih vrsta namirnica, kako animalnog, tako i biljnog porekla. Mnoge domaće i divlje životinje (ovce, krave, koze, zečevi, psi, mačke, jeleni i pilići) mogu pasivno da nose uzročnika, a samim tim i da predstavljaju značajan

rezervoar ovog mikroorganizma. Epidemiološko-epizootički aspekt listerioze (rasprostranjenost *L. monocytogenes* u životnoj sredini i hrani), otkrivanje izvora zaraze i način prenošenja na ljude i životinje, veoma je čest predmet izučavanja brojnih istraživača. Ustanovljeno je da njeno prisustvo u hrani može biti posledica postprocesne kontaminacije u proizvodnoj okolini, unakrsne kontaminacije usled manipulacije hranom, ili nakon kontakta sa kontaminiranim površinama ili drugom hranom u okolini skladištenja.

Tabela 1. *Epidemije alimentarne listerioze /*
Table 1. Epidemics of alimentary listeriosis

Izvor infekcije / <i>Source of infection</i>	Godina / <i>Year</i>	Broj slučajeva (smrtnih) / <i>Number of cases (fatalities)</i>	Zemlja / <i>Country</i>	Reference / <i>Reference</i>
Pasterizovano mleko / <i>Pasteurized milk</i>	1983	49 (14)	USA	Fleming i sar. 1985
Meksički sir / <i>Mexican cheese</i>	1985	142 (48)	USA	Linnan i sar. 1988
Meki sir / <i>Soft cheese</i>	1983-87	122 (34)	Švajcarska	Bille 1990
Pate / <i>Pate</i>	1987-89	366 (nepoznat)	UK	McLauchlin i sar. 1991
Blue mould ili tvrdi sir / <i>Blue mould or hard cheese</i>	1989-90	27 (nepoznat)	Danska	Jensen i sar. 1994
Rakovi ^a / <i>Shellfish^a</i>	1989	10 (0)	USA	Riedo i sar. 1994
Procesirano meso ili pate / <i>Processed meat or pate</i>	1990	11 (nepoznat)	Australija	Watson i Ott 1990
Svinjski jezici u želeu / <i>Pig tongues in gelatin</i>	1992-93	279 (85)	Francuska	Goulet i sar. 1993
Rillettes / <i>Rillettes</i>	1993	38 (1)	Francuska	Goulet i sar. 1998
Salata od pirinča ^a / <i>Rice salad^a</i>	1993	18 (0)	Italija	Salamina i sar. 1996
Čokoladno mleko ^a / <i>Chocolate milk^a</i>	1994	48 (0)	USA	Dalton i sar. 1997
Pastrmka / <i>Trout</i>	1994-95	8 (2)	Švedska	Ericsson i sar. 1997
Sir od sirovog mleka / <i>Cheese made from raw milk</i>	1995	20 (0)	Francuska	Goulet i sar. 1995
Pastrmka ^a / <i>Trout[*]</i>	1997	5 (0)	Finska	Miettinen i sar. 1999
Salata od tune i kukuruza ^a / <i>Tuna and corn salad^a</i>	1997	1566 (0)	Italija	Aureli i sar. 2000
Mesni proizvodi / <i>Meat products</i>	1998	40 (4)	USA	Anonymous 1998
Rillettes / <i>Rillettes</i>	1999-2000	10 (3)	Francuska	De Valk i sar. 2001
Svinjski jezici u želeu / <i>Pig tongues in gelatin</i>	1999-2000	32 (5)	Francuska	De Valk i sar. 2001

nastavak Tabele 1. / cont. Table 1				
Deli ćureće meso / <i>Deli turkey meat</i>	2000	29 (4)	USA	Anonymous 2000
RTE meso ^a / <i>RTE meat</i> ^a	2000	7 (0)	Novi Zeland	Sim i sar. 2002
RTE meso ^a / <i>RTE meat</i> ^a	2000	21 (0)	Novi Zeland	Sim i sar. 2002
Meksički sir / <i>Mexican cheese</i>	2000-01	12 (0)	USA	Anonymous 2001
Ćuretina ^a / <i>Turkey</i> ^a	2001	16 (0)	USA	Frye i sar. 2002

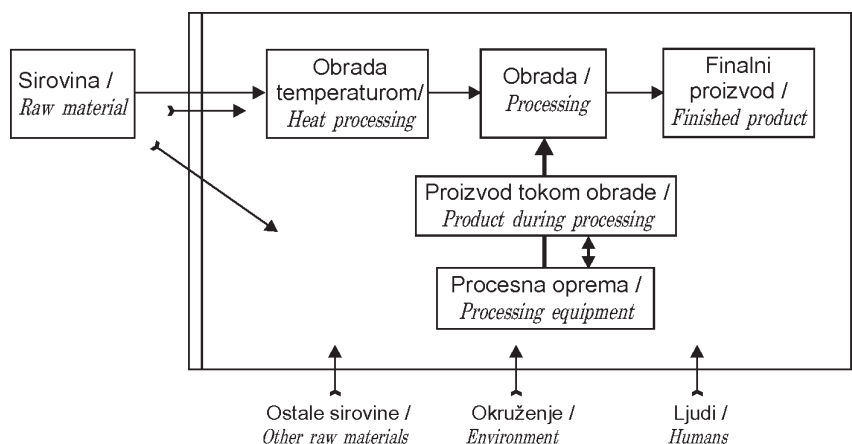
Legenda: ^a ...gastroenteritis / *gastroenteritis*

Tako je *L. monocytogenes* izolovana iz različitih namirnica, ali najčešće iz sirove hrane. Iako je nađena u sirovoj ribi i mleku, čini se da je ova bakterija prisutnija kod goveđeg, svinjskog i živinskog mesa (Johansson i sar. 1999, Jayarao i Henning 2001). Nalaz *L. monocytogenes* u hrani spremnoj za jelo (RTE), koja obuhvata širok spektar različitih namirnica, kreće se od niskog do veoma visokog. Naročiti rizik predstavljaju proizvodi kod kojih je u toku proizvodnje uključena manipulacija, kao na primer, slajsovanje. Hladno dimljeni proizvodi od ribe predstavljaju takođe, veoma rizične namirnice (Johansson i sar. 1999, Loncarevic i sar. 1996, Dimitrijević 2007). Ustanovljeno je da je nalaz ovog patogena veći kod vakuum pakovanih proizvoda od ribe, nego kod nevakumiranih (Keto i Rahkio 1998, Dimitrijević 2007). Među mlečnim proizvodima, naročito meki sirevi su često kontaminirani ovom bakterijom, ali se listerija takođe može naći i u drugim sirevima i mlečnim proizvodima.

Prisustvo *L.monocytogenes* u pogonima za proizvodnju hrane / *Presence of L.monocytogenes in food production plants*

Poznato je da je *L. monocytogenes* široko rasprostranjena u prirodi, pa stoga postoji velika verovatnoća da se hrana često može kontaminirati tokom proizvodnje i skladištenja i na taj način postati izvor infekcije za ljude (Shema 1). Ustanovljeno je da je ova bakterija čest kontaminant proizvodnih pogona. Dokazana je i u sirovinama, proizvodnoj okolini, na opremi i u finalnom proizvodu (Daphin i sar., 2001; Fonnesbech i sar., 2001; Berrang 2002; Hansen i sar., 2006). Izolovana je kako iz delova pogona gde se obrađuje sirovina, tako i u delovima nakon termičke obrade (Thevenot i sar., 2005). Ustanovljena je u različitim pogonima za proizvodnju hrane, uključujući mlekare, klanice i one za pripremu hrane spremne za jelo (RTE). Uglavnom je više bila prisutna u proizvodnoj okolini i delovima koji nisu u kontaktu sa namirnicama. Stoga, kontaminacija proizvodne okoline ne mora uvek da uslovi kontaminaciju opreme unutar iste fabrike (Pritchard i sar., 1995). Najčešće navedena mesta na kojima je dokazana ova bakterija, a koja nisu u dodiru sa hranom su podovi, zidovi, kamioni, cipele, vrata, kvake na vratima i toaleti (Norton i sar., 2001; Suihko i sar., 2002). Mesta u kontaktu sa hranom uglavnom budu kontaminirana od proizvodne opreme, ali je

takođe oprema radnika zabeležena kao rezervoar *L. monocytogenes*. Kontaminirana proizvodna oprema je brojna i raznolika, a uključuje kontejnere, bazene za prihvatanje namirnica, mašine za hlađenje i smrzavanje, mašine za skidanje kože, sečenje, rezanje, filetiranje i pakovanje (Aguado i sar., 2001; Miettinen i sar., 2001; Norton i sar., 2001; Chasseignaux i sar., 2002; Lunden i sar., 2002; Suihko i sar., 2002). Kako ova oprema ima pojedine delove koji su nepristupačni, teško se čiste i dezinfikuju, stoga ne iznenađuje čest nalaz *Listeria monocytogenes* na njima.



Schema 1. Mogući putevi kontaminacije gotovog proizvoda /
Schematic presentation 1. Possible pathways of contamination of finished product

U radovima Chasseignaux i sar. (2002) se navodi da su temperatura i mesto radne površine takođe povezani sa nalazom listerija u proizvodnim pogonima. Dokazana je na radnim površinama pri niskim temperaturama, dok je nalaz manji pri višim temperaturama ($> 10^{\circ}\text{C}$). Isti autori takođe ukazuju na to da su materijal i stanje površine bitni za prisustvo listerija na njima, koje je veće na oštećenim, neravnim površinama, ali i na onim koje nisu od metala.

U klanicama za goveda i svinje *L. monocytogenes* je takođe prisutna. Žive životinje su rezervoari listerije, jer se one normalno nalaze u fecesu, tonzilama i na koži (Bunčić i sar., 1991, 2001). Smatra se da se pojedine listerije mogu adaptirati na opremi i u klanici (Giovannacci i sar., 1999) i na taj način kontaminirati meso. Nalaz *L. monocytogenes* u mesu živine je veoma redak. Ova vrsta životinja je često negativna pri kontroli prisustva listerija ili se nađe u veoma niskom broju, što ukazuje na to da je proizvodna oprema u klanicama najčešći izvor za kontaminaciju mesa živine (Ojenyi i sar., 2000). Isto se može reći i za meso ribe. Sa radnih površina i opreme u toku obrade i prerade ribe bakterije se takođe lako prenose na ribu, te je i posledična rekontaminacija ribe moguća u svim fazama proizvodnog procesa (Lundén i sar. 2000; Fonnesbech i sar. 2001). U proizvodnji hladno dimljene ribe faza soljenja ribe, kao i faze koje slede iza toga (kačenje i skidanje sa

ramova, sortiranje pre pakovanja) jesu faze u kojima najčešće dolazi do rekontaminacije ribe. Različiti sojevi *L. monocytogenes* se mogu izolovati iz sveže ribe, kao i iz finalnih ribljih proizvoda, što ukazuje na to da riba može biti kontaminirana tokom bilo kog procesa između ulova i konzumacije. Kako se ova bakterija može naseliti u proizvodnim pogonima, ova činjenica se uzima kao primarni mehanizam kontaminacije ribljih proizvoda. Drugi nepovoljni uslovi u proizvodnom pogonu samo doprinose prisustvu ovog patogena, kojeg je veoma teško izolovati i otkloniti. Posle završene proizvodnje, vreme i temperature skladištenja su sledeći faktori koji utiču na dalji rast eventualno prisutne *L. monocytogenes*. Iz literaturnih podataka (Hoffman i sar., 2003) se može zaključiti da nivo listerija do trenutka konzumacije proizvoda retko prelazi 10^3 cfu g⁻¹.

Dosadašnja brojna istraživanja su delimično pomogla boljem razumevanju načina i vremena kontaminacije ribe u toku proizvodnog procesa, ali je i dalje puno nerazjašnjenih pitanja, među kojima je svakako najveći adherencija bakterija i stvaranje biofilma. Pripajanje *L. monocytogenes* za proizvod ili opremu, kao stvaranje biofilma imaju veoma veliki značaj za održavanje higijene, jer je bakterija u tom stanju znatno otpornija na tzv. stres faktore koji se uobičajeno koriste u industriji hrane u cilju dekontaminacije površina sa kojima hrana dolazi u kontakt. Sama adherencija bakterija (koja prethodi stvaranju biofilm formacije) odvija se u dve faze (Dunne, 2002). Bakterije se najpre vezuju reverzibilno na površine, uglavnom elektrostatičkim i hidrofobnim interakcijama, a zatim nastaje ireverzibilna faza adherencije, koja uključuje stvaranje egzopolisaharida (EPSs-exopolysaccharides), koji su opisani kao učvršćivači bakterija za površine. Stvoreni biofilm se definiše kao stadijum kada su bakterije ireverzibilno vezane za površine (tj. kada se one ne mogu ukloniti uobičajenim pranjem), kao i kada u sebi sadrže uglavnom egzopolisaharide (Donlan, 2002). Pokazalo se da *L. monocytogenes* može da adherira na nekoliko tipova materijala koji dolaze u kontakt sa hranom (na primer nerđajućim čelikom, gumom i plastikom), kao i da postaje otpornija na sredstva za čišćenje, desinficijense i na toplotu. Same razlike u stepenu adherencije, zavisno od vrste materijala kontakt površine, postoje, ali su veoma male (Beresford i sar., 2001).

Brojna istraživanja su pokazala da postupci čišćenja i sanitacije mogu da uklone prisutnu *L. monocytogenes* sa linije proizvodnje, kao i sa opreme, ali se rekontaminacije može pojaviti ubrzo posle obnavljanja, tj. otpočinjanja nove proizvodnje. Kako se listerija lako može ustaliti u proizvodnom pogonu (Autio i sar., 1999), većina autora se slaže da se primenom propisane sanitacije i čišćenja kritičnih zona može održavati inicijalno nizak nivo kontaminacije, ali još uvek nije realno očekivati proizvode slobodne od listerija nakon primene samo ovih mera.

Mogućnost kontrole *L.monocytogenes* u pogonima za proizvodnju hrane / Possibilities for control of *L.monocytogenes* in food production plants

Listeria monocytogenes je u uslovima *in vitro* osetljiva na delovanje većeg broja dezinficijenasa koji se koriste u industriji namirnica. Međutim, ustanovljeno je da prisutne organske materije mogu smanjiti njihovo dejstvo (efekat dezinficijensa), a takođe stvaranje biofilma povećava otpornost bakterija na iste (Reij M. i E.D. De Aantrekker, 2004). Takođe, različiti serotipovi *L. monocytogenes* mogu da se adaptiraju na neke vrste dezinficijenasa (Lundén i sar., 2003).

Food Safety and Inspection Service (FSIS) je preduzela regulativne mere koje bi pomogle smanjenju pojave ovog patogena u mesnim i živinskim proizvodima spremnim za jelo (RTE). Objavljene su smernice "najbolje prakse" koje bi pomogle razvijanje efektivnih kontrolnih programa za *L. monocytogenes*, kao i privremene norme za pogone koje proizvode RTE mesne i živinske proizvode, koje bi sprečile kontaminaciju sa *L. monocytogenes*. FSIS je takođe u studiji "FSIS Risk Assessment for *Listeria monocytogenes* in Deli Meats", od maja 2003. godine, ukazala na to da su najznačajniji nalazi ove procene rizika – da rigorozna sanitacija površina koje su u kontaktu sa hranom, koja je potvrđena testovima, daje proporcionalno niže nivoe redukcije *L. monocytogenes* u gotovim mesnim proizvodima. Takođe, ukazuje se na to da je kombinacija mera (sanitacija površina koje su u kontaktu sa hranom, letalne mere pre i posle pakovanja, inhibicija rasta) mnogo efektivnija, nego kada se one koriste pojedinačno. Kombinacija pomenutih mera doprinosi smanjenju potencijalne kontaminacije finalnog RTE proizvoda sa *L. monocytogenes*, pa samim tim i smanjuje rizike infekcije kod ljudi.

Koristeći nalaze dobijene na osnovu procene rizika FSIS je doneo neophodne privremene mere "Control of *Listeria monocytogenes* in RTE meat and poultry products" (68 FR 34208) (objavljene u oktobru, 2003. godine). Ovim merama se zahteva od proizvođača primena HACCP planova i preduslovnih programa (SSOP - Sanitation Standard Operating Procedures) u cilju kontrole kontaminacije proizvoda sa *L.monocytogenes*. Takođe je doneta Direktiva 10,240.4, "Verification Procedures for the *Listeria monocytogenes* Regulation and Microbial Sampling of RTE Products for the FSIS Verification Testing Program", kojom bi FSIS upravljao verifikacionim programima za testiranje koji se baziraju na riziku, kako bi procenio efektivnost operacija kod RTE hrane u kontroli *L. monocytogenes*, sa još intenzivnijom verifikacijom pogona koji imaju visok rizik na prisustvo ove bakterije. Sve ovo ima za cilj svođenja rizika na minimum.

Kontrolu *L. monocytogenes* u pogonima za proizvodnju i obradu hrane moguće je prvenstveno obezbediti primenom integrisanog programa koji bi obuhvatio sve proizvodne programe i smanjio prisustvo listerije u proizvodnoj okolini, a samim tim i prevenirao unakrsnu kontaminaciju tokom proizvodnje i skladištenja. Takvi sveobuhvatni programi moraju da uključe strategiju koja je kompatibilna sa sistemima Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) i pre-

duslovnim programina, kao što su GMP (Good Manufacturing Practices), SSOP (Sanitation Standard Operating Procedures) Good Hygienic Practice (GHP), koji su neophodni u proizvodnji hrane bezbedne za potrošača. U osnovi, kontrolne mere koje mogu da doprinesu smanjenju učestalosti nalaza *L. monocytogenes* u gotovom proizvodu, kao i smanjenju nivoa kontaminacije ovom bakterijom, sa jedne strane su vezane za higijenske postupke u proizvodnom procesu, a sa druge za tehnološke postupke u njemu. Tako se u proizvodnji hladno dimljenog lososa pokazalo da su identifikacija kritičnih kontrolnih tačaka (Critical control Point-CCP) u kojima najčešće dolazi do kontaminacije sa *L. monocytogenes* i sprovođenje odgovarajućih kontrolnih mera u tim tačkama (sanitacija parom, vodom ili vazduhom zagrejanim na 80°C, lična higijena radnika, uvođenje zabrane posetilaca) imali uticaja na smanjenje nivoa ovog patogena u proizvodima od ribe. Efikasnim su se takođe pokazali i postupci odvajanja nekih radnih postupaka koje obavljaju radnici, a koji sprečavaju rekontaminaciju proizvoda. Značajan nivo kontaminacije ovim patogenom smatra se da potiče sa površina u proizvodnom pogonu, gde listerije stvaraju tzv. biofilmove, te je veoma važna primena režima čišćenja i sanitacije, kao i njihovo regularno praćenje. Stvaranje biofilмова moglo bi se sprečiti na sledeće načine:

- korišćenjem opreme koja se lako čisti i koja ima glatku površinu od materijala koji je neporozan, otporan na toplotu;
- korišćenjem specifičnih sredstava za dezinfekciju po preporučenom uputstvu za koncentraciju, temperaturu, pH;
- povećanjem učestalosti čišćenja (vremenski intervali ne smeju da prelaze 8h), jer je stare biofilmove teže ukloniti od novih;
- povremenim menjanjem vrste dezinfekcionog sredstva (npr. hipohlorit, QUAT);
- temeljnim uklanjanjem nagomilane nečistoće pre upotrebe sredstva za dezinfekciju;
- mehaničkim čišćenjem površina koje su dostupne;
- edukovanjem osoblja o važnosti efekta čišćenja i
- implementiranjem protokola testiranja koji uključuju korake kontrole kvaliteta.

Upotreba toplote (visokih temperatura) je najsigurnija fizička mera za uklanjanje *L. monocytogenes*, ali se pri tome mora tačno za svaki tip proizvoda odrediti decimalno redukciono vreme ili D-vrednost (Tabela 2).

Kod toplo dimljenih proizvoda treba obratiti pažnju na to da se proizvod ne kontaminira tokom procesa dimljenja (temperiranja). Principi dobre higijenske prakse (GHP-a) usmereni su ka higijenskim aspektima u proizvodnji namirnica. Oni su preduslovi da bi se uopšte uveo bilo koji sistem koji bi garantovao zdravstvenu bezbednost namirnice. GHP ukazuje na najbolji način održavanja higijene u proizvodnom pogonu, a bazira se na naučnim istraživanjima i samoj dostupnosti primene. Osnovni principi GHP-a bi podrazumevali:

- tehnički i konstrukcioni plan fabrike koji zadovoljava higijenske kriterijume;
- upotreba higijenski sigurnih i ispravnih mašina i opreme;
- postojanje plana održavanja, čišćenja i sanitacije;
- stalnu edukaciju osoblja o ličnoj higijeni i njenim uticajima na bezbednost namirnice;
- usvojene standardne operativne procedure (SOPs) i
- identifikaciju sledljivosti.

Tabela 2. Limitirajući faktori rasta i toplotna osetljivost *L. monocytogenes* (FAO 1999)
Table 2. Limiting growth factors and heat sensitivity of *L. monocytogenes* (FAO 1999)

Parametar / <i>Parameter</i>	Opseg / <i>Range</i>
aW	>0.92
Temperatura (°C) / <i>Temperature (°C)</i>	-0.4-45 (optimum 30-37)
pH	4.5-9.6
NaCl	<0.5-10
Toplotna osetljivost / <i>Heat sensitivity</i>	D ₆₀ = 2.4-16.7 min u mesu / <i>min in meat</i> D ₆₀ = 1.95-4.48 min u ribi / <i>min in fish</i>

Sami principi GHP-a su nedovoljni, naročito kod visoko-rizičnih namirnica i trebalo bi da su preduslovi šireg sistema koji razmatra bezbednost hrane. Istraživanja koja smo mi sprovedi pokazala su da se kontaminacija proizvoda uglavnom javlja tokom proizvodnje i pretpostavlja se da se bakterija nastanjena na proizvodnoj opremi kasnije prenosi na proizvod. Mnogi autori su tokom svojih ispitivanja ustanovili da su udubljenja na mašinama i opremi bitni za kontaminaciju proizvoda (Norton i sar. 2001; Lundén i sar. 2002; 2003). Smatra se da se to dešava zbog otežanog i nepotpunog čišćenja i dezinfekcije. Iako se može zaključiti da je kontaminacija proizvoda povezana sa linijom proizvodnje, ostaje nerazjašnjena inicijalna kontaminacija, koja, s obzirom da je *L. monocytogenes* ubikvitaran mikroorganizam, može poticati od sirovog materijala, drugih materijala koji se koriste u proizvodnji, unutrašnjeg transporta i ljudi.

Primena i razvijanje principa dobre higijenske prakse (GHP-a) i dobre proizvodne prakse (GMP-a), kao preduslovnih programa za uvođenje HACCP sistema, omogućava smanjenje broja patogena koji bi se mogli naći u namirnicama. Tako Reij i De Aantrekker (2004), kao i Dimitrijević i sar. (2007) napominju da ukoliko se kombinuju mehaničko čišćenje sa hemijskim dezinficijensima koji se adekvatno upotrebljavaju, *L. monocytogenes* se može ukloniti iz proizvodnog pogona. Isto tako Thevenot i sar. (2005) ukazuju na značaj čišćenja pogona, jer se na taj način odstranjuju organske materije koje se nalaze na površinama proizvodne linije, a takođe i biofilm koji *L. monocytogenes* može da stvara. Neki autori preporučuju korišćenje dezinfekcionog sredstva u koncentraciji jačoj od pre-

poručene, na mestima gde bi se moglo očekivati postojanje biofilмова, naročito onim koji su manje dostupni za mehaničko čišćenje.

Zaključak / Conclusion

S obzirom na to da se, ukoliko je prisutna u proizvodnom pogonu, *L. monocytogenes* brzo adaptira na uslove tokom proizvodnog procesa, distribucije i maloprodaje, postprocesna kontaminacija se ne može isključiti i otuda nije realno očekivati proizvode slobodne od listerija i pored primene svih propisanih mera sanitacije. Međutim, proizvodni procesi i pogoni moraju biti pod stalnom kontrolom, kako bi se mogućnost rekontaminacije proizvoda smanjila na minimum tokom proizvodnje.

Literatura / References

1. Aguado V, Vitas AI, Garcia-Jalon I. Random amplified polymorphic DNA typing applied to the study of cross contamination by *L.monocytogenes* in processed food products. J. Food. Prot. 2000; 64: 716-2.
2. Anonymous. Multistate outbreak of listeriosis - United States. MMWR. Morb. Mortal. Wkly Rep. 1998; 47: 1085-6.
3. Anonymous. Multistate outbreak of listeriosis- United States. MMWR. Morb. Mortal. Wkly Rep. 2000; 49: 1129-30.
4. Anonymous. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese- North Carolina, October 2000-January 2001. MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 2001; 50: 560-2.
5. Anonymous. Infection register. National Public Health Institute. 1.9.2003;<http://www.ktl.fi/ttr>
6. Aureli P, Fiorucci GC, Caroli D, Marchiaro G, Novara O, Leone L and Salmaso S. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. N. Eng. J.Med. 2000; 342: 1236-41.
7. Autio T, Hielm S, Miettinen M, Sjöberg A, Aarnisalo K, Bjørkroth J, Mattila-Sandholm T, Korkeala H. Sources of *Listeria monocytogenes* Contamination in a Cold-Smoked Rainbow Trout Processing Plant Detected by Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing. Applied and Environmental Microbiology 1999; 65 (1):150-5.
8. Beresford MR, Anrew PW, Shama G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food processing environments. J. Appl. Microbiol. 2001; 90: 1000-5.
9. Bille J. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. In: Miller AJ, Smith JL and Somkuti GA, editors. Foodborne Listeriosis. Elsevier, Amsterdam, 1990. 71-4.
10. Berrang ME, Meinersmann RJ, Northcutt JK, Smith DP. Molecular characteriyation of *Listeria monocytogenes* isolated from a poultry further processing facility and from fully cooked product. J. Food Prot. 2002; 65, 1574-9.

11. Buncic S, Avery SM, Rocourt J, Dimitrijevic M. Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? Int. J. Food Microbiol. 2001; 65: 201-12.
12. Bunčić S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia. Int. J. Food Microbiol. 1991; 12:173-80.
13. Chasseignaux E, G  rault P, Toquin MT, Salvat G, Colin P, Ermel G. Ecology of *L.monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. FEMS Microbiol. Lett. 2002; 210: 271-5.
14. Crum NF. Update on *Listeria monocytogenes* infection. Curr. Gastroenterol. Rep. 2002; 4: 287-96.
15. Dalton CB, Austin CC, Sobel J, Hayes PS, Bibb WF, Graves LM, Swaminathan B, Proctor ME, Griffin PM. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. N. Eng. J. Med. 1997; 336: 100-5.
16. De Valk H, Vaillant V, Jacquet C, Rocourt J, Le Querrec F, Stainer F, Quelquejeu N, Pierre O, Pierre V, Descenclos JC, Goulet V. Two consecutive nationwide outbreaks of Listeriosis in France, October 1999-February 2000. Am. J. Epidemiol. 2001; 154: 944-50.
17. Dauphin G, Ragimbeau C, Malle P. Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. International Journal of Food Microbiology. 2001; 64:51-61.
18. Dimitrijević M. Ispitivanje puteva kontaminacije i preživljavanja razli  itih sojeva *Listeria monocytogenes* u dimljenom mesu riba. 2007; Doktorska disertacija.
19. Donlan R M. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg. Infect. Dis. 2002; 8: 881-90.
20. Dunne WM. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15: 155-166.
21. European Commission. Directive no. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. 22.12.2005. Off. J. Eur. Union L3381:1-26.
22. Ericsson H, Ekl  w A, Danielsson-Tham ML, Loncarevic S, Mentzing LO, Persson I, Unerstad H and Tham W. An outbreak of Listeriosis Suspected To Have Been Caused by Rainbow Trout. Journal of Clinical Microbiology. 1997; 35 (11): 2904-7.
23. FAO Fisheries Report. No. 604. Report of the FAO Expert Consultation on the Trade impact of *Listeria* in Fish Products. FAO Fish Utilisation and Marketing Service; FAO Food Quality and Standard Service.1999; Amhest, MA, USA, 34.
24. Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL, Brondum J, Hayes PS, Plikaytis BD, Holmes MB, Audurier A, Broome CV, Reinhold AL. Pasteurized milk as a vehicle of infection in a outbreak of listeriosis. N. Eng. J. Med. 1985; 312: 404-7.
25. Fonnesbech Vogel B, Huss H, Ojeniyi B, Ahrens P, Gram L. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. Appl. Environ. Microbiol. 2001; 67: 2586-95.
26. Fraye DM, Zweig R, Sturgeon J, Tormey M, LeCavalier M, Lee I, Lawani L, Mascola L. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*. CID. 2002; 35: 943-9.
27. Gellin BG, Broome CV. Listeriosis. JAMA 1989; 261 (9): 1313-20.
28. Giovannacci I, Ragimbeau C, Oueguiner, Salvat G, Vendeuvre JL, Carlier V, Ermel G. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants: use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. Int. J. Food Microbiol. 1999; 53: 127-40.

29. Goulet V, Lepoutre A, Rocourt J, Courtier AL, Dehaumont P, Veit P. Epidémie de listeriosis en France-bilan final et resultants de l'enquête épidémiologique. Bull. Epidemiol. Hebdom. 1993; 4:13-4.
30. Goulet V, Jacquet C, Vallant V, Rebiere I, Mouret E, Lorente C, Maillot E, Stainer F, Rocourt J. Listeriosis from consumption of raw.milk cheese. Lancet 1995; 345: 1501-2.
31. Goulet V, Rocourt J, Rebiere I, Jacquet C, Moyse C, Dehamount P, Salvat G, Veit P. Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. J. Inf. Dis. 1998; 177: 155-60.
32. Hansen CH, Vogel BF, Gram L. Prevalence and Survival of *Listeria monocytogenes* in Danish Aquatic and Fish-Processing Environments. Journal of Food Protection, 2006; 69(9): 2113-2112.
33. Hoffman AD, Gall KL, Norton DM, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* contamination patterns for the smoked fish processing environment and for raw fish. J. Food Prot. 2003; 66(1): 52-60.
34. Jensen A, Fredriksen W and Gerner-Smidt P. Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989-1990. Scand. J. Infect. Dis. 1994; 26: 171-8.
35. Johansson T, Rantala L, Palmu L and Honkanen-Buzalski T. Occurence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packaged fish products and in a prouction plant. Int. J. Food Microbiol. 1999; 47: 111-9.
36. Keto R, Rahkio M. *Listeria* review. *Listeria* in fish products. The microbiological quality and safety of fresh cheeses. National Food Administration, Research notes 5/1998. Helsinki. 28 +app.
37. Linnan MJ, Mascola L, Lou XD, Goulet V, May S, Salminen C, Hird DW, Yonekura ML, Hayes P, Weaver R, Audurier A, Plikaytis BD, Fannin SL, Kleks A, Broome CV. Epidemic listeriosis associated with Mexican style cheese. N. Engl. J. Med. 198; 319: 823-8.
38. Loncarevic S, Tham W and Danielsson-Tham L. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in Smoked and "Gravad" Fish. Acta Vet. Scand. 1996; 37: 13-8.
39. Lundén JM., Autio T, Markkula A, Hellstrom S, Korkeala H. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. Int. J. Food Microbiol. 2003; 82: 265-72.
40. Lundén JM, Autio TJ, Korkeala HJ, Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants asociated with a dicing machine. J. Food. Prot. 2002; 65: 1129-33.
41. McLauchlin J, Hall SM, Velani SK, Gilbert RJ. Human listeriosis and pate: a possible association. Br. Med. J. 1991; 303: 773-5.
42. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCraig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases. 1999; 5: 607-25.
43. Miettinen MK, Siitonen A, Heiskanen P, Haahanen H, Korkeala B. Molecular Epidemiology of an Outbreak of Febrile Gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in Cold Smoked Rainbow Trout. J Clin Microbiol. 1999; 37(7): 2358-60.
44. Miettinen MK, Aarnisalo K, Salo S, Sjöberg AM. Evaluation of surface contamination and the presence of *L.monocytogenes* in fish processing factories. J. Food. Prot. 2001; 64: 635-9.

45. Norton DM, McCamey MA, Gall KL, Boor JM, Wiedmann M. Molecular Studies on the Ecology of *Listeria monocytogenes* in Fish Processing Industry, Appl Environ Microbiol. 2001; 67 (1): 198-205.
46. Ojenyi B, Christensen J and Bisgard M. Comparative investigations of *Listeria monocytogenes* isolated from a turkey processing plant, turkey products, and from human cases of listeriosis in Denmark. Epidemiol. Infect. 2000; 125: 303-8.
47. Pritchard TJ, Flanders KJ, Donnelly CW. Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. Int. J. Food Microbiol. 1995; 26: 375-84.
48. Reij M, De Aantrekker E.D. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. Int. J. Food Microbiol. 2004; 91: 1-11.
49. Riedo F, Pinner R, Toscs M, Cartter M, Graves L, Reeves M, Weaver R, Plikaytis B, Broome C. A Point-Source Foodborne Listeriosis Outbreak: Documented Incubation period and Possible Mild Illness. Journal of Infectious diseases. 1994; 170, 693-6.
50. Rørsvick LM. *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. International Journal of Food Microbiology 2000; 62 (3): 183-90.
51. Salamina G, Dalle Donne E, Niccolini A, Poda G, Cesaroni D, Bucci M, Fini R, Maldini M, Schuchat A, Swaminathan B, Bibb W, Rocourt J, Binkin N and Salmaso S. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. Epidemiol. Infect. 1996; 117: 429-36.
52. Sim J, Hood D, Finnie L, Wilson M, Graham C, Brett M, Hudson JA. Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. Lett. Appl. Microbiol. 2002; 35: 409-13.
53. Suihko ML, Salo S, Niclasen O, Gudbjörnsdóttir B, Torkelsson G, Bredholt S, Sjöberg AM, Gustavsson P. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from the meat, poultry and seafood industries by automated ribotyping. Int. J. Food Microbiol. 2002; 72: 137-46.
54. Thevenot D, Delignette-Muller ML, Christieans S, Vernozy-Rozand C. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. International Journal of Food Microbiology 2005; 102 (1) : 513-23.
55. U.S. Food and Drug Administration, Food Safety and Inspection Services. Interpretative summary: quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Food Safety and Inspection Services, 2003; U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C.
56. Watson C, Ott K. *Listeria* outbreak in Western Australia. Commun. Dis. Intell. 1990; 24: 9-12.

ENGLISH

CONTROL OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN FOOD PRODUCTION PLANTS

Mirjana Dimitrijević, N. Karabasil, Nataša Kilibarda, V. Teodorović, M. Ž. Baltić

L. monocytogenes has been established in different plants for the production of food, including dairy plants, abattoirs, plants for the processing of fish, as well as those

for the production of ready-to-eat (RTE) food and this fact is being considered as the primary mechanism of food contamination with this bacteria. There is also the factor of numerous and diverse contaminated production equipment, because it has certain parts that are inaccessible for the necessary cleaning and disinfection. The temperature, position, as well as the material of the work surface are also linked to the contamination of plants with this bacteria.

Investigations carried out so far have helped toward the better understanding of the manner and time of contamination of food items in the course of the production process, but there are still unresolved problems, including most certainly the biggest one – the adherence of bacteria and the creation of a biofilm, when the bacteria is in that condition more resistant to so-called stress factors which are usually used in the food industry for the purpose of decontamination of the surfaces with which foods come into contact.

The control of *L.monocytogenes* in food production plants is possible primarily by using an integrated programme, compatible with the systems Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) and Good Hygiene Practice (GHP), necessary in the production of food that is safe for the consumer. Essentially, the control measures that can contribute to reducing the incidence of findings of *L.monocytogenes* in the finished product, as well as the reducing of the level of contamination with this bacteria are linked, on the one hand, with hygiene procedures in the production process, and, on the other, with the applied technological procedures.

Key words: *Listeria monocytogenes*, food production plants, control

РУССКИЙ

КОНТРОЛЬ *LISTERIA MONOCYTOGENES* В ЦЕХАХ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КОРМА

Миряна Димитриевич, Н. Карабасил, Наташа Килибарда, В. Теодорович,
М. Ж. Балтич

L. monocytogenes устновлена в различных цехах для производства корма, включая молочные, бойни, цехи для обработки и переработки рыбы, словно и те для подготовки корма готовые для корма (RTE – Ready to eat) и этот факт рассматривается как первичный механизм контаминации корма этой бактерией. Контаминированное оборудование также численное и разнообразное, ибо обладает некоторыми частями, которые недоступны для предписанной чистки и дезинфекции. Температура, место, словно и материал рабочей поверхности также связаны с контаминацией цеха этой бактерией.

Прежние исследования помогли лучшему пониманию способа и времени контаминации пищевых продуктов в течение производственного процесса, но и дальше имеет необъяснимых проблем, между которыми во всяком случае самое большое сдильание бактерий и создание биофильма, при чём бактерия в этом состоянии более устойчивая на так называемый стресс факторы, которые привычно пользуются в промышленности корма с целью деконтаминации поверхностей с которыми корм доходит в контакт.

Контроль *L. monocytogenes* в цехах для производства корма возможен в первую очередь применением интегрированной программы, компатибельной с системами Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) и Good Hygienic Practice (GHP),

необходимых в производстве корма безопасны для потребителя. В основе, контрольные меры, которые могут внести свой вклад уменьшению частоты результатов *L. monocytogenes* в готовом продукте, словно и уменьшению уровня контаминации этой бактерией с одной стороны, связанные для поступков гигиены в производственном процессе, а с другой для технологических поступков в нём.

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, цехи для производства корма, контроль

**ANALIZA OPASNOSTI I MOGUĆNOSTI SPREČAVANJA
BOTULIZMA IZ PROIZVODA OD MESA*****HAZARD ANALYSIS AND POSSIBILITIES FOR PREVENTING
BOTULISM ORIGINATING FROM MEAT PRODUCTS****D. Vasilev, I. Vuković****

*U radu su navedeni važniji podaci o bakteriji Clostridium botulinum, pojavljivanju botulizma, analizi opasnosti i mogućnostima za sprečavanje botulizma. Proteolitički sojevi C. botulinum grupe I, čije su spore otporne na toplotu, stvaraju toksine pretežno u konzervama slabokiselih namirnica, pod uslovom da spore nisu inaktivisane prilikom sterilizacije. Neproteolitički sojevi grupe II su osetljiviji na vi-
soke temperature, ali poseduju sposobnost da rastu i stvaraju toksine na nižim temperaturama. Tip E najčešće stvara toksin u vakuum-pakovanoj dimljenoj ribi, a neoproteolitički soj tipa B u suvim šunkama i nekim pasterizovanim proizvodima od mesa. U sprečavanju botulizma značajnu ulogu imaju: svođenje na minimum kontaminacije mesa spora klostridija, sprovođenje mera dobre higijenske i proizvodne prakse prilikom klanja životinja, zatim inaktivacija spora C. botulinum prilikom sterilizacije ($F > 3$), a kod suvih šunki i pasterizovanih proizvoda sprečavanje rasta bakterije i stvaranja toksina održavanjem niskih temperatura u toku proizvodnje i skladištenja, kao i pravilna upotreba supstanci koje inhibiraju razmnožavanje bakterije i proizvodnju toksina (nitriti, kuhinjska so itd).*

Ključne reči: botulizam, proizvodi od mesa, analiza opasnosti, sprečavanje

Uvod / Introduction

Clostridium botulinum je anaerobna sporogena bakterija koja je široko rasprostranjena u prirodi. U kasnoj fazi logaritamskog rasta bakterija stvara neurotoksine koji, kada se unesu hranom u organizam, izazivaju alimentarnu neuroin-

* Rad saopšten na simpozijumu "Bezbednost namirnica animalnog porekla", Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd 16 i 17. oktobar 2008. godine

** Mr sci. med. vet. Dragan Vasilev, asistent; dr sci. med. vet. Ilija Vuković, redovni profesor, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd

toksinaciju poznatu kao botulizam. Pored alimentarne forme botulizma, koja je i najčešća, poznati su i drugi oblici ove intoksikacije, kao što su infanтни botulizam, koji se javlja kod novorođenčadi posle unošenja spora *C. botulinum* hranom, pre svega medom, zatim botulizam iz rana, infektivni botulizam, inhalacioni botulizam i jatrogeni botulizam (Varnam i sar., 1996; Lindström i sar., 2006).

Na osnovu antigenih karakteristika toksina, razlikuje se osam tipova *C. botulinum*, koji se obeležavaju slovima A, B, C₁, C₂, D, E, F i G. Botulizam kod ljudi izazivaju tipovi A, B, E i F, a prema nekim podacima i tip C (Lücke i sar., 1993; Varnam i sar., 1996; Peck i sar., 2005). Pored *C. botulinum* i neki sojevi *C. baratii* i *C. butyricum* mogu da stvaraju neurotoksine. Na osnovu različitih genotipskih i fenotipskih karakteristika bakterije, tipovi *C. botulinum* svrstani su u četiri grupe (Peck i sar., 2005):

- grupa I - proteolitički tipovi A, B i F *C. botulinum*,
- grupa II - neproteolitički tipovi E, B i F *C. botulinum*,
- grupa III - *C. botulinum*, tipovi C i D,
- grupa IV - *C. botulinum*, tip G.

Alimentarni botulizam je neurointoksikacija koja se javlja posle konzumiranja hrane u kojoj je stvoren toksin. Botulinusni toksini su izuzetno jaki: svega 30 ng toksina, za šta je dovoljno uneti u organizam oko 0,1 g namirnice koja sadrži toksine, izaziva botulizam sa fatalnim ishodom (Lindström i sar., 2006; Peck i sar., 2005). Botulinusni toksini su termolabilni proteini koji mogu da se inaktiviraju zagrevanjem, na primer pri 80 °C za 10 min; stabilni su u kiselj sredini, ali im ne odgovara pH vrednost veća od 7,0. Da bi delovali, toksini moraju prethodno da se aktiviraju, pri čemu se njihovi molekuli razlažu na laki i teški polipeptidni lanac. Toksine proteolitičkih tipova *C. botulinum* aktiviraju proteaze koje stvara sama bakterija, a toksini neproteolitičkih tipova aktiviraju se u digestivnom traktu pod dejstvom tripsina, zbog čega su oni slabiji od toksina proteolitičkih tipova (Miyazaki i sar., 1976; Varnam i sar., 1996). Botulinusni toksini se resorbiraju u crevima i krvotokom dospevaju do centralnog nervnog sistema, gde sprečavaju oslobađanje neurotransmitera iz presinaptičkih holinergičkih završetaka, što kao posledicu ima paralizu odgovarajućih moždanih nerava (Varnam i sar., 1996; Lindström i sar., 2006; Peck i sar., 2005). Početni znaci botulizma su muka, povraćanje, dijareja, bolovi u trbuhu i nadutost stomaka, a zatim se javljaju karakteristični simptomi, kao što su smetnje u govoru i gutanju, nejasan vid i dvostruka slika, suvoća sluznica, malaksalost, zastoj mokraće, slabost i prestanak rada organa za disanje; u težim slučajevima bolest može da ima fatalan ishod (Šašić i sar., 1996).

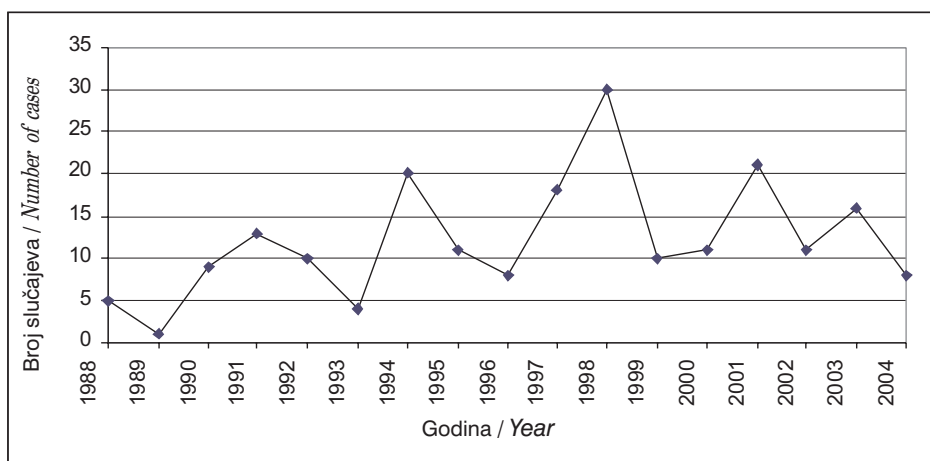
Pojavljivanje botulizma / Appearance of botulism

Kao što je opšte poznato, reč botulizam potiče od latinske reči *botulus* koja znači *kobasica*, a dovodi se u vezu sa trovanjima koja su se pre više vekova često javljala u centralnoj Evropi posle konzumiranja kuvanih kobasica - krvavica i jetrenjača. Krajem devetnaestog veka, posle jedne veće epidemije botulizma u

Flandriji, čiji su izvor bile suve šunke, Emile van Ermengem (1897) je iz šunke i slezine čoveka, koji je umro od botulizma, izolovao jednu istu bakteriju i nazvao je *Bacillus botulinum*.

Botulizam se danas relativno često javlja u krajevima gde se u većoj meri konzumiraju prehrambeni proizvodi izrađeni u domaćinstvima i koji se koriste bez prethodne toplotne obrade (Tompkin, 1980; Lücke i sar., 1993; Vuković, 2000). Konzerve iz industrijske proizvodnje u kojoj postoje dobri higijenski uslovi i sistematska kontrola danas se retko pominju kao izvori botulizma. S druge strane, proizvodi izrađeni u domaćinstvima i zanatskim radionicama, u kojima su uslovi u proizvodnji na nižem higijenskom nivou i gde ne postoji stalna kontrola, predstavljaju najčešći izvor botulizma. Sušeni proizvodi od svinjskog mesa su potencijalni izvori botulizma, ako su dobijeni u nehygienskim uslovima i ako ne sadrže dovoljno kuhinjske soli koja inhibira stvaranje botulinusnih toksina u mesu (Tompkin, 1980; Lücke i sar., 1993; Vuković, 2000). U mnogim zemaljama Evrope (Nemačka, Francuska, Belgija, Norveška, Španija) najčešći izvor botulizma je suva šunka (Lücke i sar., 1993), u kojoj toksine stvara pretežno neproteolitički tip B *C. botulinum*. Interesan je podatak da je broj slučajeva botulizma u Evropi veći nego na severnoameričkom kontinentu, ali je broj slučajeva sa fatalnim ishodom u Evropi manji. To se dovodi u vezu sa činjenicom da na evropskom kontinentu botulizam izaziva pretežno neproteolitički tip B, koji je slabije toksičan, dok su u Severnoj Americi izazivači botulizma jako toksični proteolitički tipovi A i B *C. botulinum* (Tompkin, 1980).

U Srbiji je u periodu od 1988. do 2004. godine registrovano 196 slučajeva botulizma (slika 1), a samo jedan fatalni ishod zabeležen je 1988. go-



Slika 1. Kretanje broja prijavljenih slučajeva botulizma u Srbiji (bez Kosmeta) u priodu 1988–2004. (Vuković, 2005/a)

Figure 1. Number of reported cases of botulism in Serbia (without Kosovo-Metohija) during the period 1988–2004 (Vuković 2005/a)

dine (Vuković, 2005/a). Najviše slučajeva botulizma bilo je devedesetih godina 20. veka, u vreme ekonomske krize i povećane potrošnje mesa i proizvoda od mesa iz domaćinstava, a najveći broj slučajeva (30) registrovan je 1998. godine. Prema podacima navedenim u tabeli 2., najčešći izvor botulizma bili su suvi proizvodi od svinjskog mesa koji se tradicionalno konzumiraju bez prethodne toplotne obrade. Od ukupno 140 slučajeva botulizma, koliko je zabeleženo od 1994. do 2002. godine, kod 116 (83 %) slučajeva izvor botulizma bila je suva šunka izrađena u domaćinstvima (Vuković, 2005/a).

Tabela 1. *Pojavljivanje botulizma u svetu čiji su izvor proizvodi od mesa i ribe (Peck i sar., 2005)*

Table 1. *Appearance of botulism world-wide originating from meat and fish products (Peck, 2005)*

Godina i zemlja / Year and country	Vrsta namirnice / Type of food item	Broj slučajeva: ukupno/fatalno / Number of cases: total/fatalities	Tip C. botulinum / Type C. botulinum
1991, Egipat / 1991, Egypt	Neviscerirana usoljena riba / Non-eviscerated salted fish	> 91/18	Tip E / Type E
1993/94, Švajcarska / 1993/94, Switzerland	Suva šunka / Dried ham	12 /0	Tip B (nije identifikovan soj) Type B (strain not identified)
1997, Nemačka / 1997, Germany	Vakuum pakovana dimljena riba / Vacuum-packed smoked fish	2/0	Tip E / Type E
1997, Argentina / 1997, Argentina	Šunka iz domaćinstva / Home-made ham	6 /0	Tip E / Type E
1997, Nemačka / 1997, Germany	Vakuum-pakovana dimljena riba iz domaćinstva / Home-made vacuum-packed smoked fish	4/0	Tip E / Type E
1998, Hrvatska / 1998, Croatia	Šunka / Ham	20/0	dokazan toksin, nisu identifikovani tip i soj / Proven toxin, type and strain not identified
1999, Maroko / 1999, Morocco	Mortadela / Mortadella	78 /20	Tip B ^a / Type B ^a
2001, Kanada / 2001, Canada	Fermentisana ikra lososa / Fermented salmon roe	4/0	Tip E / Type E
2002, Južna Afrika / 2002, South Africa	Sardina u konzervi / Canned sardines	2 /2	Tip A / Type A
2003, Francuska / 2003, France	Kobasica proizvedena prema halal zahtevima / Halal sausage	4/0	Tip B ^a / Type B ^a
2003, Južna Koreja / 2003, South Korea	Kobasica u konzervi / Canned sausage	3/0	b
2003, Nemačka / 2003, Germany	Suva riba iz domaćinstva / Home-made dried fish	3/0	Tip E / Type E

Tabela 2. Proizvodi od mesa i ribe izvori botulizma u Srbiji u periodu od 1994–2002. (Vuković, 2005/a) /

Table 2. Meat and fish products that were sources of botulism in Serbia during the period 1994–2002 (Vuković, 2005/a)

Proizvod / Product	Broj slučajeva / Number of cases
Suva šunka iz domaćinstva / Home-made dried ham	116
Fermentisane suve kobasice iz domaćinstva / Home-made fermented dried sausages	4
Suvo svinjsko meso iz domaćinstva / Home-made dried pork	2
Kulen – fermentisana suva kobasica iz Mađarske / Kulen – fermented dried sausage from Hungary	2
"Pig meat" – konzerva iz humanitarne pomoći proizvedena u Danskoj / "Pig meat" can produced in Denmark as humanitarian aid	4
Jetrena pašteta u crevu / Liver pate in sausage casing	3
Jetrena pašteta u konzervi (aluminijumska posuda) / Canned liver pate (aluminum container)	2
Konzerve ribe / Canned fish	6
Nepoznat izvor / Unknown source	1
Ukupno / Total	140

Analiza opasnosti / Hazard analysis

Tipovi *C. botulinum* grupa I i II razlikuju se po svojim osobinama i na osnovu toga ne predstavljaju opasnost za konzumente kod istih vrsta namirnica. Proteolitički tipovi grupe I, čije su spore vrlo termorezistentne, stvaraju toksine uglavnom u konzervama slabokiselih namirnica, ukoliko spore nisu inaktivisane prilikom sterilizacije. Spore neproteolitičkih tipova grupe II su slabije otporne na toplotu i uništavaju se prilikom kuvanja ili jače pasterizacije, ali kao psihro-tolerantne vrste stvaraju toksine na temperaturi frižidera. *C. botulinum* tipa E predstavlja rizik za bezbednost vakuum-pakovane dimljene ribe, a neproteolitički tip B stvara toksin najčešće u suvoj šunki (Vuković, 2000; Vuković, 2005/a; Lindström i sar., 2006; Peck i sar., 2008).

Proteolitički tipovi *C. botulinum* / Proteolytic types of *C. botulinum*

Optimalna temperatura rasta proteolitičkih tipova *C. botulinum* je 35 °C, a minimalna temperatura je 10 °C. Spore proteolitičkih tipova A i B *C. botulinum* su veoma otporne na toplotu. Vreme decimalne redukcije (D-vrednost)

spora iznosi 0,21 min pri 121,1 °C. Za inaktivaciju ovih spora u konzervama slabo kiselih namirnica (pH veća od 4,5) usvojeno je opšte pravilo da letalnost postupka sterilizacije mora biti takva da može da smanji broj spora za 10^{-12} (12D-koncept), odnosno da letalnost sterilizacije iznosi najmanje $F=2,5$ min (Stumbo, 1973). Na temperaturama pasterizacije spore proteolitičkih tipova *C. botulinum* ne mogu biti inaktivisane. Vegetativni oblici *C. botulinum* mogu da se inaktiviraju zračenjem u dozama od 3 do 5 KGy, a spore mogu da se inaktiviraju samo visokim dozama zračenja koje izazivaju i senzorne promene hrane (Varnam i sar., 1996). Optimalne vrednosti pH za rast svih tipova *C. botulinum* su od 6,8 do 7,0. Proteolitički tipovi *C. botulinum* ne mogu da rastu u namirnicama čija je pH vrednost manja od 4,5. Optimalna vrednost redoks-potencijala (E_h) za rast *C. botulinum* u namirnicama je -350 mV, a ne mogu da rastu pri vrednostima većim od +150 mV. Isključivanje spora i stvaranje toksina proteolitičkih sojeva sprečava se pri $a_w < 0,95$ za tip A i pri $a_w < 0,94$ za tip B. Proteolitički tipovi A, B i F mogu da tolerišu koncentraciju NaCl u vodi maksimalno do 10 %. Poseban značaj za inhibiciju *C. botulinum* u proizvodima od mesa imaju nitriti, i to kako uneta tako i rezidualna količina nitrita u proizvodu. Nitriti se proizvodima od mesa dodaju u količini od 100 do 150 mg/kg i deluju baktericidno na klostridije i druge bakterije (Varnam i sar., 1996; Vuković, 2005/a).

Neproteolitički tipovi C. botulinum / Non-proteolytic types of C. botulinum

Neproteolitički tipovi grupe II *C. botulinum* optimalno rastu i stvaraju toksin pri temperaturi od 30 °C, minimalna temperatura rasta je 3,3 °C, a maksimalna 45 °C (Varnam i sar., 1996). Spore neproteolitičkih tipova *C. botulinum* su znatno manje otporne na toplotu. Vreme decimalne redukcije (D-vrednost) spora iznosi 30 minuta pri 82,2 °C, što znači da preživljavaju uobičajene procese pasterizacije (Stumbo, 1973). Preživljavanje i germinacija spora zavise i od prisustva pojedinih materija u namirnici, kao što su lizocim, proteini i masti. Lizocim koji se nalazi u mnogim namirnicama (jaja, sirova riba, ekstrakti voća i povrća itd.) difunduje kroz omotač toplotom oštećenih spora i podstiče germinaciju. Zbog prisustva lizocima u mnogim namirnicama i njegove relativno visoke termostabilnosti, on nepovoljno utiče na bezbednost namirnica u kojima spore neproteolitičkih tipova *C. botulinum* nisu potpuno inaktivisane (Peck i sar., 2005). Neproteolitički tipovi *C. botulinum* su osetljiviji na smanjenje a_w , tako da tip E ne raste pri a_w vrednostima manjim od 0,97. Neproteolitički tipovi B, E i F ne mogu da rastu pri koncentraciji NaCl u vodi većoj od 5 %, a minimalna pH vrednost rasta je 5,0 (Peck i sar., 2005).

Mogućnosti sprečavanja botulizma / *Possibilities for prevention of botulism*

Primarnu ulogu u sprečavanju botulizma iz proizvoda od mesa ima svođenje kontaminacije mesa na najmanju moguću meru, odnosno sprovođenje svih mera kontrole za vreme transporta životinja u klanicu, klanja, hlađenja,

skladištenja, transporta mesa i izrade proizvoda. Ukoliko su životinje pre klanja bile u stanju stresa ili ako nisu bile izložene dijeti, moguća je endogena kontaminacija mesa, pri čemu spore klostridija, koje se nalaze i u crevima zdravih životinja, probijaju prirodne odbrambene barijere i krvotokom dospevaju u meso (Lücke i sar., 1993; Vuković, 2005/a; Anon, 2005). Proizvodi od mesa svinja su češći izvor botulizma, nego proizvodi od mesa drugih životinja, a jedan od razloga za to je prisustvo spora klostridija u crevima svinja, naročito kod životinja iz slobodnog uzgoja, koje konzumiraju zemlju u kojoj se nalaze brojne spore; kod svinja sa farmi, zbog boljih higijenskih uslova držanja spore klostridija unose se u manjoj meri u organizam (Lücke i sar., 1993). Prilikom klanja životinja meso se najčešće kontaminira sporama klostridija sa kože i iz digestivnog trakta. U toku procesa klanja mora se sprečiti kontakt kože sa površinom trupa, podvezati jednjak i rektum i evisceracija obaviti bez oštećenja želudačno-crevnog trakta. Ukoliko dođe do vidljivog zagađenja trupa crevnim sadržajem, takvi delovi se isecaju, ako je to moguće, a nikako ne peru, jer se time samo kontaminiraju čiste površine. Da bi se smanjili izvori kontaminacije, preporučuje se pranje životinja pre klanja, a kod izbora metoda šurenja, prednost ima šurenje u vertikalnom položaju (kabineti sa vrelom vodom ili vodenom parom), u odnosu na šurenje u bazenima, u kojima je voda kontaminirana brojnim mikroorganizmima, koji potiču sa kože i iz crevnog trakta svinja. Od posebnog je značaja da životinja pre ubacivanja trupa u bazen za šurenje bude klinički mrtva, jer u suprotnom dolazi do usisavanja bazenske vode u presečene krvne sudove u kojima vlada negativan pritisak, a topla voda podstiče kontrakcije mišića i spore klostridija na taj način dospevaju u najdublje partije muskulature (Vuković, 2005/a). Hlađenje mora biti efikasno, odnosno mora biti obezbeđena pravilna distribucija hladnog vazduha u komori i što brže opadanje temperature mesa. Redovno mora da se sprovodi čišćenje i dezinfekcija prostorija za klanje, komora za hlađenje i skladištenje, kao i održavanje "hladnog lanca" prilikom transporta i distribucije mesa (Anon, 2005).

Suva šunka / Dried ham

U našoj zemlji suva šunka izrađena u domaćinstvima je najčešći izvor botulizma. Osnovni razlozi za to su klanje svinja u nehigijenskim uslovima, koji omogućavaju kontaminaciju mesa sporama, i nepostojanje minimalnih higijenskih i tehnoloških uslova za obradu mesa i proizvodnju šunke, što omogućava stvaranje toksina u šunki. Zato u cilju sprečavanja botulizma treba voditi računa o više činilaca. Pored klanja svinja u higijenskim uslovima, pri izboru sirovine treba kontrolisati temperaturu u dubini svinjskih butova i pH u tamnijim mišićima (*m. quadriceps*, *m. gracilis*, *m. adductor*). Trupovi svinja moraju biti ohlađeni tako da temperatura u dubini buta iznosi 0–4 °C. Nije preporučljivo korišćenje mesa čiji je pH veći od 6,0, jer u takvo meso sporije prodiru soli, a sušenje je usporeno zbog veće sposobnosti vezivanja vode. Soljenje i prosoljavanje treba da se odvijaju na temperaturama ispod 5 °C, sve dok kuhinjska so ne difunduje u dubinu šunke i a_w ne opadne ispod 0,96, kako bi se sprečilo razmnožavanje neproteolitičkog tipa B

C. botulinum na početku sušenja (Anon, 2005; Vuković, 2005/a; Vuković i sar., 2005/b). Difuzija soli u mesu je relativno spora i zato period prosoljavanja šunki treba da traje dovoljno dugo. Za inhibiciju tipa B *C. botulinum* potrebno je da koncentracija soli u vodi proizvoda bude veća od 5,0 %. Posle usoljavanja i prosoljavanja u trajanju od 10 sedmica, sadržaj natrijum-hlorida u dubini usoljenih šunki iznosi oko 2,5 %, a koncentracija soli u vodi proizvoda je manja od 4,0 %, što nije dovoljno za inhibiciju *C. botulinum* (Vuković i sar., 2005/b). Da bi se sprečilo stvaranje toksina u šunki, temperatura vazduha na početku sušenja mora biti manja od 15 °C (Anon, 2005; Vuković, 2005/a; Vuković i sar., 2005/b). Pošto se suva šunka konzumira bez prethodne toplotne obrade, ne postoji mogućnost za inaktivaciju eventualno prisutnih neurotoksina. Međutim, ni kuvanje delimično osušene šunke, koje se ponegde praktikuje u domaćinstvima, nije uvek dovoljno za inaktivaciju botulinusnih toksina, jer su i takve šunke bile izvor trovanja. Za pojavu botulizma važna je činjenica da razmnožavanje neproteolitičkog tipa B *C. botulinum* i stvaranje toksina u suvoj šunki kao posledicu nema truležni kvar i značajnije promene mirisa i ukusa proizvoda, pa konzumenti ne mogu da budu upozoreni na potencijalnu opasnost (Lücke i sar., 1993; Vuković, 2000).

Jetrena pašteta u crevu / Liver pate in sausage casing

Jetrena pašteta u crevu je u jednom periodu bila izvor botulizma u našoj zemlji. Ovi proizvodi se izrađuju pretežno od iznutrica (jetra, pluća i srce), kožica, masnog tkiva, mesa svinjskih glava i krvi, odnosno od sirovina koje su, po pravilu, više konatminirane sporama nego meso. Na primer, broj spora klostridija u jednom kilogramu mesa iznosi od 0 do 20, a u jednom kilogramu jetre, svinjskih glava ili kožica broj spora klostridijuma dostiže i jednu hiljadu. Jeterne paštete u crevu se najčešće konzervišu pasterizacijom (80 °C–85 °C), pri čemu se ne inaktiviraju spore svih tipova *C. botulinum*, a ređe se obrađuju na temperaturama kuvanja (96–98 °C) pri kojima se inaktiviraju samo spore neproteolitičkih tipova *C. botulinum*. Povoljne okolnosti za rast klostridija u jetrenim paštetama su te što one sadrže veću količinu gvožđa koje potiče iz jetre i krvi i imaju pH vrednost veću od 6,0, što ima kao posledicu smanjen baktericidni efekat nitrita u proizvodu; takođe, redoks-potencijal ovih proizvoda je niži nego u mesu i pogoduje razmnožavanju klostridija (Vuković, 2000). Stoga pasterizovane jeterne paštete u crevu treba da se skladište na temperaturi manjoj od +5 °C, a proizvodi koji su konzervisani na temperaturi kuvanja treba da se čuvaju ispod +10 °C (Vuković, 2000).

Sterilisane konzerve od mesa / Sterilized meat cans

Konzerve od mesa proizvedene u našoj zemlji su vrlo retki izvori botulizma. Jedna manja epidemija botulizma zabeležena je 1997. godine, a izvor trovanja bila je konzerva od svinjskog mesa ("pig meat") iz humanitarne pomoći, proizvedena u Danskoj. U cilju prevencije botulizma važnu ulogu imaju hermetičnost posuda za konzerve, adekvatna toplotna obrada i temperatura skladištenja. Posude za konzerve (limenke, staklenke, aluminijumske i plastične folije)

treba da obezbede dobru hermetičnost proizvoda, da su bez oštećenja, da poseduju dovoljnu čvrstoću i da su otporne na koroziju. Mašine za zatvaranje konzervi moraju da funkcionišu besprekorno, a pre početka i na kraju proizvodnje mora da se ispita kvalitet dvostrukog šava, odnosno hermetičnost praznih posuda. Toplotna obrada mora biti pravilno izvedena, a letalnost postupka sterilizacije mora biti takva da može da izvrši 12 decimalnih redukcija najotpornijih spora tipova A i B *C. botulinum*, što iznosi najmanje $F_0=3$ (ne više od $F_0=5$). Prema principima HACCP-koncepta, svaki postupak sterilizacije mora biti kontrolisan i dokumentovan. Hlađenje konzervi na kraju sterilizacije mora biti takvo da ne izazove oštećenje limenki i drugih posuda, odnosno ne omogući naknadnu kontaminaciju sadržaja sporama. Sterilisane konzerve se skladište na temperaturama do 25 °C i mogu biti održive do 4 godine (Anon, 2005; Vuković, 2000).

"Shelf-stable" proizvodi / Shelf-stable products

SSP-proizvodi (engl. Shelf Stable Products) se pune u hermetički zatvorene posude ili u omotače i obrađuju toplotom na temperaturama pasterizacije, kuvanja ili blagom sterilizacijom, a održivi su bez primene hladnoće. Prilikom pasterizacije uništavaju se vegetativni oblici bakterija, a prilikom kuvanja i blage sterilizacije i spore mezofilnih bacila i psihrotrofnih neproteolitičkih klostridija. Blagi postupci toplotne obrade obezbeđuju visoku biološku vrednost proizvoda i senzorni kvalitet, a održivost i ispravnost proizvoda počivaju na kombinovanim efektima toplotne obrade i inhibiciji preživelih spora klostridija nekim od antimikrobnih parametara, kao što su a_w , pH, količina kuhinjske soli i nitrita. U zavisnosti od toga koji je parametar primaran, razlikuju se a_w -SSP, pH-SSP, F-SSP i kombi-SSP. Održivost proizvoda tipa a_w -SSP zasniva se na aktivnosti vode manjoj od $a_w=0,95$ i može da iznosi i do 12 meseci pri 20 °C. U proizvode se dodaje svega 40–50 mg/kg nitrita, radi postizanja stabilne boje i arome, a prilikom pasterizacije u centru proizvoda treba ostvariti temperaturu od 75 °C da bi bili inaktivisani vegetativni oblici bakterija. Održivost proizvoda tipa pH-SSP zasniva se na niskim pH vrednostima (5,4–5,6) i iznosi nekoliko meseci pri 20 °C; prilikom pasterizacije u proizvodu treba ostvariti temperaturu od najmanje 72 °C. Održivost proizvoda u tipu F-SSP zasniva se na inaktivaciji spora neproteolitičkih tipova *C. botulinum* blagom sterilizacijom ($F_0>0,4$), a za inhibiciju preživelih spora proteolitičkih tipova *C. botulinum* potrebno je dodati najmanje 100 mg/kg nitrita, kao i da pH vrednost bude manja od 6,5 i a_w -vrednost manja od 0,97. Ovi proizvodi mogu biti održivi nekoliko meseci bez primene hladnoće (Vuković, 1981; Vuković, 2005/a; Anon, 2005).

Ohlađene namirnice produžene održivosti /

Refrigerated Processed Foods of Extended Durability

U grupu ohlađenih namirnica produžene održivosti (engl. RPFED= Refrigerated Processed Foods of Extended Durability) može da se ubroji veliki broj različitih namirnica, kao što su vakuum-pakovano sveže meso, kuvano sala-

mureno i nesalamureno meso upakovano u atmosferi zaštitnih gasova, upakovana jela, riba i plodovi mora upakovani u atmosferi zaštitnih gasova, vakuum-pakovana dimljena riba itd. (Peck i sar., 2005). Zajedničko za ove proizvode je da poseduju visoku nutritivnu vrednost i senzorni kvalitet, da se izrađuju bez ili sa što je moguće manje konzervanasa, da se neki od njih podvrgavaju blagoj toplotnoj obradi i da su održiviji od konvencionalnih proizvoda. Termički tretirani proizvodi se pasterizuju na temperaturama od 70 do 90 °C, posle čega se brzo hlade i skladište pri +1 do +8 °C, a održivost proizvoda iznosi do 42 dana. Prema Pecku i sar. (2008) u pasterizovanim proizvodima u kojima vladaju anaerobni uslovi postoji realna opasnost od stvaranja botulinusnih toksina, a jedan od najznačajnijih faktora rizika je povećanje temperature proizvoda na putu od mesta prodaje do domaćinstva, koje može da bude i do 20 °C, kao i porast temperature u kućnim frižiderima (od 0 do 11 °C). Da bi se kod ovih proizvoda sprečio rast neproteolitičkih sojeva *C. botulinum*, koji stvaraju toksine pri temperaturama iznad 3,3 °C, Peck i sar. (2005, 2008), daju sledeće preporuke za čuvanje i održivost ovih proizvoda: (1) do 42 dana pri +3 °C, (2) do 10 dana pri +5 °C, (3) do 5 dana pri +10 °C, (4) do 42 dana pri +8 °C, ukoliko je toplotna obrada iznosila 10 minuta pri 90 °C, ili 36 minuta pri 85 °C, ili 129 minuta pri 80 °C, (5) do 42 dana pri +8 °C, ukoliko su u proizvod dodati nitriti koji sprečavaju rast *C. botulinum* ili ako u proizvodu deluju i drugi inhibitorni činioci, kao što su pH vrednost manja od 5,0, koncentracija soli u vodi veća od 3,5 %, a_w vrednost manja od 0,97 itd.

Zaključak / Conclusion

Najčešći izvor botulizma u Srbiji je suva šunka proizvedena u domaćinstvima. U ovom proizvodu toksin pretežno stvara psihrotrofni tip B *Clostridium botulinum*, koji kao neproteolit gotovo da ne menja miris i ukus proizvoda. Drugi proizvodi od mesa, uključujući i konzerve, vrlo su retki izvori botulizma.

U sprečavanju botulizma značajnu ulogu imaju svođenje na minimum kontaminacije mesa sporama klostridija, vođenje računa o dobrobiti životinja za klanje, primena mera dobre higijenske prakse prilikom klanja, inaktivacija spora *C. botulinum* prilikom sterilizacije, a kod pasterizovanih i sušenih proizvoda od mesa sprečavanje stvaranja botulinusnih toksina primenom niskih temperatura u toku proizvodnje i skladištenja. Važnu ulogu u sprečavanju botulizma imaju i pH, a_w , Eh, sadržaj kuhinjske soli i nitrita u proizvodima od mesa.

Literatura / References

1. Anon. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to the effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products. The EFSA Journal 2003; 14: 1-34. <http://www.efsa.eu.int>.
2. Anon. Microorganisms in foods 6. Microbial ecology of food commodities. In: ICMSF Kluwer Academic/Plenum Publishers 2005; 10-88.

3. Ermengem van E. Über einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehung zum Botulismus. Zeitschrift f. Hygiene und Infektionskrankheiten 1897; 6: 1-56.
4. Lindström M, Kiviniemi K, Korkeala H. Hazard and control of group II (non-proteolytic) *Clostridium botulinum* in modern food processing. International Journal of Food Microbiology 2006;108: 92-104.
5. Lücke FK, Roberts TA. Clostridium botulinum Ecology and Control in Foods. In: Hauschild AHW, Dodds K, Control in Meat and Meat Products. New York, 1993; 177-207.
6. Miyazaki S, Kozaki S, Sakaguchi S, Sakaguchi G. Comparison of Progenitor Toxins of Nonproteolytic with Those of Proteolytic *Clostridium botulinum* Type B. Infection and Immunity 1976; 13(3): 987-9.
7. Peck MW, Goodburn KE, Betts RP, Stringer SC. Assessment of the potential for growth and neurotoxin formation by non-proteolytic *Clostridium botulinum* in short shelf-life commercial foods designed to be stored chilled. Trends in Food Science and Technology 2008; 19: 207-16.
8. Peck MW, Stringer SC. The safety of pasteurised in-pack chilled meat products with respect to the foodborne botulism hazard. Meat Science 2005; 70: 461-75.
9. Stumbo CR. Thermobacteriology in Food Processing. In: Academic Press, New York 1973.
10. Šašić M, Dragojlović-Krušedolac J, Milošević B, Ćirić B, Kačar A. Neurointoksikacije izazvane toksinima *Clostridium botulinum*. Acta Infectologica Yugoslavica 1996; 1: 31-6.
11. Tompkin RB. Botulism from meat and poultry products – a historical perspective. Food Technology 1980; 229-35.
12. Varnam AH, Evans G. Foodborne pathogens. In: Manson Publishing, London 1996; 289-311.
13. Vuković I. Ispitivanje uticaja odabranih fizičkih i hemijskih faktora na održivost proizvoda od mesa. Doktorska disertacija. Veterinarski fakultet: Beograd, 1981.
14. Vuković I. Botulizam u Jugoslaviji i mogućnosti sprečavanja. Tehnologija mesa 2000; 41: 19-28.
15. Vuković I. *Clostridium botulinum*: inhibicija i inaktivacija u proizvodima od mesa. Tehnologija mesa 2005/a; 46(3-4): 101-9.
16. Vuković I, Dimitrijević M, Tubić M, Vasilev D, Kričković D. HACCP u proizvodnji suve sremeske šunke. Tehnologija mesa 2005/b; 46(3-4): 115-20.

ENGLISH

**HAZARD ANALYSIS AND POSSIBILITIES FOR PREVENTING BOTULISM
ORIGINATING FROM MEAT PRODUCTS**

D. Vasilev, I. Vuković

The paper presents the more important data on the bacteria *Clostridium botulinum*, the appearance of botulism, hazard analysis and the possibilities for preventing botulism. Proteolytic strains of *C. botulinum* Group I, whose spores are resistant to heat, create toxins predominantly in cans containing slightly sour food items, in the event that the spores are not inactivated in the course of sterilization. Non-proteolytic strains of Group II

are more sensitive to high temperatures, but they have the ability to grow and create toxins at low temperatures. Type E most often creates a toxin in vacuum-packed smoked fish, and the non-proteolytic strain type B in dried hams and certain pasteurized meat products. The following plays an important role in the prevention of botulism: reducing to a minimum meat contamination with spores of clostridia, implementing good hygiene measures and production practice during the slaughter of animals, the inactivation of spores of *C. botulinum* during sterilization ($F>3$), and, in dried hams and pasteurized products, the prevention of bacterial growth and toxin forming by maintaining low temperatures in the course of production and storage, as well as the correct use of substances that inhibit the multiplication of bacteria and the production of toxins (nitrites, table salt, etc.).

Key words: botulism, meat products, hazard analysis, prevention

РУССКИЙ

АНАЛИЗ ОПАСНОСТИ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ БОТУЛИЗМА ИЗ МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ

Д. Василев, И. Вукович

В работе приведены более важные данные о бактерии *Clostridium botulinum*, появления ботулизма, анализе опасности и возможностях для предупреждения ботулизма. Протеолитические штаммы *C. botulinum* группы I, чьи споры сопротивлены на теплоту, создают токсины преимущественно в консервах слабокислых пищевых продуктов, при условии, что споры не инактивизированы при стерилизации. Нейролептические штаммы группы II более чувствительные на высокие температуры, но обладают способностью расти и создавать токсины на более низких температурах. Тип Е чаще всего создает токсин в вакуум-упаковыванной копчёной рыбе, а неопротеолитический штамм типа Б в копчёной рыбе, а неопротеолитический штамм типа Б в копчённых ветчинах и некоторых пастеризованных мясных продуктах. В предупреждении ботулизма значительную роль имеют сведение на минимум контаминации мяса спорами клостридий, проведение мер хорошей гигиенической и производственной практики при убойе животных, затем инактивация спор *C. botulinum* при стерилизации ($F>3$), а у копчённых ветчин и пастеризованных продуктов предупреждение роста бактерии и создания токсинов поддержанием низких температур в течение производства и склада, словно и правильное употребление субстанций, тормозящие размножение бактерии и производство токсинов (нитриты, поваренная соль и т.д.).

Ключевые слова: ботулизм, мясные продукты, анализ опасности, предупреждение

**REZISTENCIJA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE NA
ANTIMIKROBNE LEKOVE******ANTIBIOTIC RESISTANCE OF LACTIC ACID BACTERIA*****Snežana Bulajić, Zora Mijačević, Radoslava Savić-Radovanović****

Saznanja o rezistenciji na antimikrobne lekove bakterija mlečne kiseline su još uvek ograničena, verovatno zbog velikog broja rodova i vrsta koje postoje kod ove grupe, kao i zbog razlika u njihovom spektru rezistencije. Evropska agencija za bezbednost hrane EFSA smatra rezistentnost na antimikrobne lekove, posebno prenosive rezistencije, važnim kriterijumom kod donošenja odluke o kvalifikovanoj proceni bezbednosti-QPS statusu određenog soja. Ne postoje prihvaćeni standardi za fenotipsku ili genotipsku evaluaciju rezistencije na antimikrobne lekove kod izolata hrane. Takođe, izbor medija je problematičan, kao i specifikacija minimalne inhibitorne koncentracije MIC vrednosti kao posledica velikih varijacija u vrsti i moguće rezultirajuće varijacije u MIC vrednostima između vrsta i roda. Tekuća istraživanja u ovoj oblasti pokazala su da bi se na kraju mogao dobiti niz različitih MIC vrednosti specifičnih za vrstu ili rod koje bi mogle još više da prodube sadašnju kompleksnost. Još jedan problem koji postoji u vezi sa određivanjima bezbednosti starter sojeva jeste da, kada se jednom identifikuju fenotip rezistencije i asocirana determinanta rezistencije, postaje teško da se pokaže da ta determinanta nije prenosiva, posebno ukoliko se gen rezistencije ne nalazi na plazmidu i ukoliko nema standardnih protokola za prikazivanje genetskog transfera. Usled postojanja takvih problema, sistem o kvalifikovanoj proceni bezbednosti QPS treba da ostavi prostora za interpretaciju rezultata, posebno kada se oni odnose na metodologiju određivanja fenotipa rezistencije, određivanje MIC vrednosti za određeni rod, vrstu, ili soj, na nemogućnost ustanovljavanja genetske baze fenotipa rezistencije, kao i prenosivost gena rezistencije.

Ključne reci: bakterije mlečne kiseline, rezistencija, antimikrobni lekovi

* Rad saopšten na simpozijumu "Bezbednost namirnica animalnog porekla", Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd 16 i 17. oktobar 2008. godine

** Dr sci. med. vet. Snežana Bulajić, docent; dr sci. med. vet. Zora Mijačević, redovni profesor, mr sci. med. vet. Radoslava Savić Radovanović, asistent, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Uvod / Introduction

Bakterije mlečne kiseline (BMK) pripadaju taksonomski heterogenoj grupi nesporogenih gram pozitivnih mikroorganizama čija je osnovna biološka karakteristika fermentisanje šećera i posledično produkcija mlečne kiseline. Zahvaljujući sposobnosti da rastu u anaerobnoj sredini, a da su aerotolerantni, članovi zajednice BMK zauzimaju veliki broj prirodnih niša (Carr i sar., 2002). Tipični predstavnici su vrste iz rodova *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* i *Pediococcus* (Carr i sar., 2002). Bakterije mlečne kiseline učestvuju u proizvodnji i konzervisanju fermentisanih proizvoda, bilo kao prirodno prisutni kontaminanti, i tada učestvuju u procesima spontane fermentacije, ili kao namerno dodati starteri u kontrolisanim procesima.

Njihova acidogena sposobnost, pored ostalih tehnološki važnih karakteristika, koja se ogleda u snižavanju pH vrednosti matriksa namirnice, vodi ka ostvarivanju poželjnih organoleptičkih i reoloških svojstava. Kisela sredina je nepovoljna za rast patogenih vrsta bakterija, a istovremeno obezbeđuje postojani kvalitet i higijensku ispravnost konačnog proizvoda. Metabolička aktivnost bakterija mlečne kiseline ogleda se u stvaranju mlečne kiseline koja ujedno deluje i kao selektivni faktor i tako ostvaruje dominaciju istih mikroorganizama. Zahvaljujući njihovoj dugogodišnjoj bezbednoj primeni u proizvodnji fermentisanih proizvoda, BMK imaju "Generally Regarded As Safe" (GRAS) status, priznat od strane Američke agencije za hranu i lekove. Bakterije mlečne kiseline predstavljaju i deo prirodne populacije gastrointestinalnog i genitourinarnog sistema vertebrata i smatra se, da u toj sredini, ispoljavaju povoljan efekat na zdravlje domaćina. U kontekstu toga, zaživela je i njihova primena kao probiotika, pri čemu se probiotik definiše kao nepatogeni mikroorganizam, koji u slučaju da se unese u određenom broju pozitivno utiče na fiziološko i zdravstveno stanje domaćina pored osnovnog nutritivnog delovanja.

U današnje vreme mnogi istraživači ističu hipotezu da komenzalne bakterije, pre svega bakterije mlečne kiseline, mogu predstavljati rezervoar gena rezistencije na antimikrobne lekove (Perreten i sar., 1997; Levy i Salyers, 2002). Upravo iz ovog razloga, populacija komenzala je veoma značajna u spoznavanju mehanizama perzistencije i širenja gena rezistencije u svetu mikroorganizama (Levy i Miller, 1989). Takvi mikroorganizmi koji se označavaju kao "rezervoari" mogu se naći u različitim namirnicama, pre svega fermentisanim proizvodima od mleka i mesa koji su u velikom broju opterećeni nepatogenim bakterijama kao rezultat njihovog prirodnog procesa proizvodnje.

Prema ovoj teoriji, lanac hrane se može smatrati jednim od glavnih puteva transmisije rezistentnih bakterija između populacije ljudi i životinja (Witte, 1997). Pre svega, fermentisani proizvodi od mleka i mesa, koji nisu termički tretirani, predstavljaju sredstvo prenosa rezistentnih bakterija i time postoji direktna povezanost između mikroorganizama koji se nalaze u organizmu životinja i gastrointestinalnog sistema ljudi. Projekt pod imenom "Rezervoari antibiotske rezis-

tencije" (Levy i Salyers, 2002) postavljen je još daleke 1998. godine u cilju promovisanja studija o selekciji i diseminaciji nepatogenih bakterija rezistentnih na antibiotike kod ljudi, tokom procesa proizvodnje hrane, kao i u neposrednom okruženju. Iako mnoge bakterije mlečne kiseline, uključene u procese fermentacije namirnica imaju "*Generally Regarded As Safe* (GRAS)" status, potencijalan rizik po zdravlje ljudi usled transfera gena rezistencije od tzv. rezervoar sojeva bakterija mlečne kiseline na bakterije koje predstavljaju stalno prisutnu populaciju mikroorganizama u gastrointestinalnom sistemu ljudi, još nije u potpunosti definisan.

Fenomen rezistencije na antimikrobne lekove, prirodna i stečena rezistencija *Phenomenon of resistance to antibiotics, natural and acquired resistance*

Detaljni izveštaji o enormnoj primeni antimikrobnih lekova u humanoj i veterinarskoj medicini (WHO, 1997), poljoprivredi i akvakulturi na veoma dobar način dokumentuju razvoj rezistencije bakterija na antimikrobne lekove (Levy, 1997). Evolucija rezistencije na antimikrobne lekove u zajednicama mikroorganizama je pojačana horizontalnim transferom gena rezistencije i to preko granica mogućnosti vrsta i rodova mikroorganizama, putem konjugativnih plazmida, transpozona, posedovanjem integrona i insercionih elemenata, kao i litičnih bakteriofaga i profaga (Davies, 1994). Tokom 50 i više godina globalne upotrebe antimikrobnih sredstava, uspostavilo se nekoliko mehanizama rezistencije, uključujući inaktivaciju antimikrobnih lekova enzimima (enzimska inaktivacija) (npr. β -laktamaze, aminoglikozid acetil-, nukleotidil-fosforil-transferaze), ograničeni unos antimikrobnih lekova (npr. penicilin vezujući proteini), aktivni iznos antimikrobnih lekova ili pak modifikacija ciljnog mesta delovanja antimikrobnih lekova (metilacija 23S rRNA, mutacija aminokiselinske sekvence topoizomeraze) i/ili osiguravanje alternativnog metaboličkog puta ("premošćavanje"), pošto je originalni put metabolizma narušen (Levy, 1997). Kod pojedinih patogenih i potencijalno patogenih bakterija, kao što su stafilokoke i enterokoke, razvoj visoko rezistentnih klonova bakterija je pokrenuo krizu rezistencije na antimikrobne lekove (Neu, 1992). U slučaju vankomicin rezistentnih enterokoka, još uvek ne postoji mogućnost uspešne terapije antimikrobnim lekovima (Jett i sar., 1994).

Neophodno je praviti razliku između prirodne ("intrinzič") i stečene (prenosive) rezistencije. Rezistencija na dati antimikrobni lek može biti intrinzična u odnosu na bakterijsku vrstu ili rod (prirodna rezistencija), a karakteriše se sposobnošću jednog mikroorganizma da preživi u prisustvu određenog antimikrobnog agensa, usled karakteristika urođene rezistencije. Prirodna rezistencija se ne prenosi horizontalno. Suprotno ovom tipu, stečena rezistencija je karakteristika pojedinih sojeva unutar vrste obično osetljive na primenjeni antimikrobni lek, a može se horizontalnim putem prenositi među bakterijama. Stečena rezistencija na određeni antimikrobni agens nastaje bilo iz mutacije u genomu bakterije ili usled sticanja dodatnih gena koji kodiraju mehanizam rezistencije. Ovakve genet-

ske promene pojačavaju odbrambenu sposobnost bakterija. Rezistencija se vrlo verovatno razvila daleko pre kliničke primene antimikrobnih lekova. Geni rezistencije mogu voditi poreklo od mikroorganizama, prirodnih producenata antimikrobnih materija, koji su snabdeveni dotičnim genima u cilju samozaštite (Davies, 1997). Drugi potencijalni izvor gena rezistencije mogu predstavljati geni čiji produkti imaju ulogu u metabolizmu bakterija. Takvi geni su mogli biti izloženi "pametnim" mutacijama, koje su izmenile spektar supstrata (po mutaciji supstrat predstavlja antimikrobni lek u odnosu na pređašnje supstrate biosinteze ili biodegradacije).

Determinante rezistencije na antimikrobne lekove se prenose vertikalno ili horizontalno u prirodnim mikrobnim zajednicama. Vertikalna diseminacija se odvija klonalnim širenjem određenog rezistentnog soja. Kod horizontalnog transfera gena identifikovana su tri mehanizma (Davies, 1994): prirodna transformacija sa preuzimanjem i ugradnjom ("inkorporacijom") slobodne DNK iz ekstrakcelularnog medijuma; konjugacija -mehanizam DNK transfera zavisen od ćelijskog kontakta koji kao takav postoji kod većine bakterijskih rodova i transdukcija-transfer posredovan bakteriofagima. Veruje se da konjugacija predstavlja glavni način transfera gena (Salyers, 1995). Mnogi geni rezistencije na antimikrobne lekove se nalaze na mobilnim elementima kao što su plazmidi i konjugativni transpozoni.

Stečena rezistencija na antimikrobne lekove, predstavlja karakteristiku pre svega onih mikroorganizama, čija primarna staništa podrazumevaju sredine permanentno izložene opterećenju usled kontinuirane primene antimikrobnih lekova (intestinum ljudi i životinja) (Teuber i sar., 1999). Profili rezistencije na antimikrobne lekove kod bakterija koje predstavljaju komensalne mikroorganizme nekog ekosistema, npr. bakterije mlečne kiseline, indikatori su selektivnog pritiska koji dotični mikroorganizmi podnose u uslovima kontaminacije staništa antimikrobnim sredstvima. Sirovo mleko i meso kontaminiraju se tokom proizvodnje fekalnim materijalom, gde se mogu naći i bakterije mlečne kiseline rezistentne na antimikrobne lekove. Na taj način se geni rezistencije prenose u krajnje proizvode, pre svega sireve proizvedene od sirovog mleka i fermentisane kobasice. Kako molekularna analiza gena rezistencije lokalizovanih na plazmidima i transpozonima pokazuje identične genetske elemente kod ljudi i životinja, čini se mogućim da namirnice animalnog porekla služe kao sredstvo prenošenja rezistentnih bakterija, odnosno determinanti rezistencije na antimikrobne lekove. Naučna javnost, poslednjih godina pokušava odgovoriti na pitanje da li komensalne bakterije iz namirnica mogu preneti gene rezistencije na crevne bakterije ljudi tokom prolaza kroz creva.

Rezistencija bakterija mlečne kiseline na antimikrobne lekove / *Antibiotic resistance of lactic acid bacteria*

Veliki broj bakterija mlečne kiseline prisutan u fermentisanim proizvodima sasvim sigurno pomaže u ostvarivanju različitih mehanizama rezistencija na

Tabela 1. Minimalne inhibitorne koncentracije nekih antimikrobnih lekova (µg/mL) za pojedine bakterije mlečne kiseline
Table 1. Minimal inhibitory concentrations of some antibiotics (µg/mL) for certain lactic acid bacteria

Antimikrobni lek / Antibiotic	Vrste / Types							
	Obligatno ho- mofermentativni laktobacili / Obligatory homofermentative lactobacilli	Heterofermenta- tivni laktobacili* / Heterofermentative lactobacilli**	Lactobacil- lus planta- rum	Enterococ- cus spp.	Pediococ- cus spp.	Leu- conostoc spp.	Lactococ- cus spp.	Streptococ- cus thermo- philus
Ampicilin / Ampicillin	4	4	4	8	4	4	4	4
Vankomicin / Vancomycin	4	IR	IR	8	IR	IR	4	4
Gentamicin / Gentamicin**	8	8	64	512	4	4	8	8
Kanamycin / Kanamycin**	16	16	64	1024	4	8	8	8
Streptomycin / Streptomycin**	16	16	64	1024	4	8	16	16
Neomicin** / Neomycin**	16	16	32	1024	8	8	8	8
Eritromicin / Erythromycin	4	4	4	4	4	4	4	4
Klindamicin / Clindamycin	4	4	4	4	4	4	4	4
Kvinupristin+Dalfoipristin / Quinupristin+Dalfoipristin	4	4	4	4	4	4	4	4
Tetraciklin / Tetracycline	8	8	32	16	4	4	4	4
Hloramfenikol / Chloramphenicol	4	4	8	8	4	4	8	8
Trimetoprim/ Trimetoprim**	8	8	8	8	8	8	ND	nd
Linezolid / Linezolid	4	4	4	4	4	4	4	4

Tabela je preuzeta od FEEDAP Panel izveštaja (European Commission, 2002). Sojevi sa MIK vrednošću većom od naznačenih graničnih vrednosti smatraju se rezistentnim. / Table taken over from FEEDAP Panel Report (European Commission, 2002). Strains with MIC values higher than the marked border values are considered resistant.

IR – intrinzično rezistentni; * uključujući i *Lactobacillus salivarius*; ** opisana interferencija antibiotika sa medijumom koji se koristi pri određivanju osetljivosti/rezistencije na antimikrobne lekove / IR – intrinsically resistant; * including *Lactobacillus salivarius*; ** described interference of antibiotic and me-
dium used for determination of sensitivity/resistance to antibiotics

antimikrobne lekove putem mutacija. Dodatno, bakterije mlečne kiseline su snabevene mobilnim genetskim elementima, pre svega plazmidima i transpozonima, koji omogućavaju horizontalan prenos i širenje gena rezistencije. Po usvajanju svojstva rezistencije, determinante rezistencije se amplifikuju i mogu se predati drugom domaćinu. Zbog toga je sasvim opravdan zahtev da se starter i probiotski sojevi bakterija mlečne kiseline ispituju na sposobnost prenosive rezistencije na antimikrobne lekove, pored potrebe da se kompletno fiziološki i tehnološki okarakterišu. Od vitalnog značaja jeste jasno definisanje graničnih vrednosti na osnovu kojih se vrši kategorizacija na rezistentne i osetljive sojeve. Posebnu vrednost ima razlikovanje prirodne (nespecifične, neprenosive) i stečene rezistencije, putem postupka koji zahteva poređenje profila rezistencije na antimikrobne lekove velikog broja bakterija mlečne kiseline poreklom iz različitih izvora (Teuber i sar., 1999). Uz tradicionalne kliničke granične vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) od pomoći kliničarima u odabiru efikasnog antimikrobnog leka, predstavljen je i koncept mikrobioloških graničnih vrednosti, i to na osnovu proučavanja distribucije minimalnih inhibitornih koncentracija na dati antimikrobni lek u određenoj populaciji bakterija (Olsson-Liljequist i sar., 1997). Prema datom konceptu, onaj deo populacije koji pokazuje jasno odstupanje od osetljive većine smatra se rezistentnim delom populacije, odnosno delom populacije sa stečenom i potencijalno prenosivom rezistencijom. U tabeli 1. dat je prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija na osnovu kojih se pojedine vrste bakterija mlečne kiseline kategorizuju kao rezistentne. Definisane MIK vrednosti trebalo bi smatrati pragmatičnim odgovorom na postojeći problem razdvajanja sojeva sa stečenom rezistencijom od osetljivih sojeva.

Određivanje profila rezistencije bakterija mlečne kiseline na antimikrobne lekove / *Determining profile of resistance to antibiotics of lactic acid bacteria*

Kako za određivanja profila rezistencije na antimikrobne lekove kod BMK postoje brojne metode, ne postoji konačni konsenzus o graničnim vrednostima za većinu antimikrobnih lekova. Pometnja u ovom domenu prvenstveno proizilazi iz činjenice da se za definisanja rezistencije koriste različite metode (E test: Danielsen i Wind, 2003; agar dilucija: Herrero i sar., 1996; disk difuzioni test: Charteris i sar., 1998; i mikrobujonska kultura: Klein i sar., 2000) i tako se dobijeni rezultati ne mogu direktno upoređivati. Pored toga, pojedini testovi se ne smatraju pouzdanim za određeni antimikrobni lek. Npr. disk difuzioni test se ne smatra pouzdanim za detekciju rezistencije niskog nivoa na vankomicin kod enterokoka (MIK od 8 do 32 µg/mL) (Swenson i sar., 1992). Na rezultate ispitivanja rezistencije bakterija na antimikrobne lekove može da utiče i sastav podloge (Huys i sar., 2002), kao što su varijacije u sadržaju katjona ili koncentraciji kritičnih sastojaka poput timina ili folne kiseline, kao i veličina inokuluma, temperatura i period inkubacije. Pored toga, većina vrsta BMK pokazuje relativno slab rast na uobičajenim podlogama za testiranje, kao što je Mueller-Hinton (Difco) ili Isosensitest (Oxoid),

dok MRS medijum može čak i inaktivirati pojedine antimikrobne lekove (npr. imipenem).

Poseban problem pri utvrđivanju profila rezistencije predstavlja specifikacija MIK vrednosti. Ne postoje standardi po tom pitanju, a Institut za kliničke i laboratorijske standarde ("Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI", bivši NCCLS) ne navodi MIK granične vrednosti sa izuzetkom enterokoka. Svakako da problem predstavlja i velika varijabilnost vrsta i s tim u vezi varijacije u MIK vrednostima između vrsta i rodova bakterija mlečne kiseline (Danielsen i Wind, 2003). Iz ovog razloga Naučni komitet za ishranu životinja ("Scientific Committee on Animal Nutrition-SCAN") pravi razliku između laktobacila i pediokoka u odnosu na MIK vrednosti za različite antimikrobne lekove (European Commission, 2002). Demonstraciju složenosti postojeće problematike, ali i dodatnu konfuziju stvorila je i odluka FEEDAP (Scientific Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed, 2005), po kojoj treba da se izvrši ispravka postojećih MIK vrednosti. Tom prilikom postavljene su i granične vrednosti za različite grupe bakterija mlečne kiseline, vrste, ali i sojeve; npr. za homofermentativne i heterofermentativne laktobacile, enterokoke, *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., sojeve *L. plantarum*, sojeve *L. lactis*. Pored toga, Danielsen i Wind (Danielsen i Wind, 2003) predlažu i do tri različite MIK granične vrednosti i to na osnovu razlike u rezistenciji svega 14 ispitivanih vrsta laktobacila. Stoga, ukoliko se za ostale (>60 vrsta) *Lactobacillus* vrste, ali i druge grupe bakterija mlečne kiseline, za koje do sada nisu ispitane ni postavljene MIK vrednosti, u budućnosti utvrde značajne razlike, ovaj složeni proces evaluacije i utvrđivanja kriterijuma bi se mogao završiti postavljanjem MIK graničnih vrednosti, specifičnih ne samo za dati rod nego i ispitivanu vrstu bakterija mlečne kiseline, a možda i pojedine sojeve, što dodatno usložnjava problematiku.

Fenotipsko određivanje rezistencije se dopunjuje molekularnim metodama gde se sojevi direktno ispituju na prisustvo determinanti rezistencije. Ove metode uključuju amplifikaciju putem PCR tehnike primenom specifičnih prajmera za pojedine ili multiple gene rezistencije (Strommenger i sar., 2003), RT PCR (Volkman i sar., 2004) ili korišćenje DNK matrice koja sadrži veliku kolekciju gena rezistencije (Perreten i sar., 2005). Postojeće genetičke studije na osnovu kojih se potvrđuje prenošenje poznatih determinanti rezistencije su ograničene mnogim eksperimentalnim faktorima, zbog čega su i njihovi rezultati različiti. Osim toga, nisu dostupni pozitivni kontrolni sojevi za izvođenje konjugacije i/ili transpozicije, a ne postoji ni standardni protokol demonstracije transfera gena.

Profili rezistencije bakterija mlečne kiseline na antimikrobne lekove / *Profiles of resistance to antibiotics of lactic acid bacteria*

Profili rezistencije na antimikrobne lekove kod *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* i *Propionibacterium* vrsta su sasvim različiti, iako se ne zapažaju jasno odvojeni, po vrstu specifični profili rezis-

tencije. S jedne strane, većina vrsta je rezistentna na metronidazol ($\text{MIK} \geq 256 \mu\text{g/mL}$), i trimetoprim ($\text{MIK} \geq 30 \mu\text{g/mL}$) (Charteris i sar., 1998; Katla i sar., 2001). Ovi mikroorganizmi imaju ograničenu sposobnost biosinteze i ne poseduju metabolički put sinteze folne kiseline, pa se smatraju prirodno rezistentnim na ove agense (Katla i sar., 2001). S druge strane, bakterije mlečne kiseline i bifidobakterije su osetljive na piperacilin i piperacilin plus tazobaktam ($\text{MIK} \leq 16 \mu\text{g/mL}$) (Delgado i sar., 2005). *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Leuconostoc* vrste pokazuju rezistenciju visokog nivoa na cefoksitin ($\text{MIK} \geq 30 \mu\text{g/mL}$) (Charteris i sar., 1998; Delgado i sar., 2005). Većina laktobacila, pediokoka i *Leuconostoc* vrsta je rezistentna na visoke koncentracije vankomicina ($\text{MIK} \geq 256 \mu\text{g/mL}$), dok je većina laktokoka veoma osetljiva na isti antimikrobni lek ($\text{MIK} \leq 2 \mu\text{g/mL}$) (Danielsen i Wind, 2003; Delgado i sar., 2005). Rezistencija *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Leuconostoc* spp. na vankomicin objašnjava se postojanjem D-Ala-D-Laktata u peptidoglikanu, umesto D-Ala-D-Ala dipeptida koji predstavlja ciljno mesto delovanja antimikrobnog leka. Time se rezistencija kod ovih vrsta smatra prirodnom i ne može se upoređivati sa stečenom, plazmidima kodiranom rezistencijom, utvrđenom kod enterokoka. Ispitivanjem molekularne osnove rezistencije kod BMK, a na osnovu poređenja identiteta nukleotidne sekvence sa sekvencom gena originalno opisanih kod filogenetski udaljenih bakterijskih grupa, utvrđeno je da sama rezistencija vodi poreklo od drugih mikroorganizama, sa kojih je, na neki način prenešena na bakterije mlečne kiseline i bifidobakterije.

Zaključak / Conclusion

Bakterije mlečne kiseline, kao deo interaktivne populacije mikroorganizama, podložne su izmeni gena rezistencije kao mehanizmu adaptacije na sredinu opterećenu antimikrobnim lekovima, a u cilju preživljavanja u takvim sredinama. Izvan svake sumnje jeste to da se distribucija bakterija sa prenosivim determinantama rezistencije treba izbeći (WHO, 1997). Mere uključuju korišćenje odgovarajućih, pažljivo selekcionisanih startera, kao i odgovarajućih supstrata za procese fermentacije, uz neophodnu potvrdu da starter i probiotski sojevi ne sadrže gene koji prenose rezistenciju na antimikrobne lekove. Pažljiva i opravdana upotreba antimikrobnih lekova, kako u veterini, poljoprivrednom sektoru i humanoj medicini, uz pasterizaciju ili drugi termički tretman sirovih supstrata (mleka ili mesa) predstavljaju neophodne mere u rešavanju problema rezistencije na antimikrobne lekove. Neophodnim se smatra i zabrana korišćenja antimikrobnih lekova, promotora rasta u uzgoju životinja, pre svega onih koji se klinički primenjuju, kako u veterinarskoj, tako i u humanoj medicini: zabranjeni su antimikrobni lekovi koji dovode do ukrštene rezistencije kod bakterijskih uzročnika, (tilozin, virginiamicin) ili oni koji se koriste samo u humanoj medicini, kao što je baci-tracin. Urođena rezistencija na antimikrobne lekove utvrđena je na vankomicin kod *Leuconostoc* vrsta, određenih laktobacila ili pak na nalidiksinsku kiselinu. Razliku između prirodne i stečene rezistencije je teško postaviti budući da je ne-

moгуće pratiti ispitivani soj u preantibiotskoj eri. Ukoliko bakterije mlečne kiseline žive u biotopu koji je opterećen antimikrobnim lekovima (digestivni sistem ljudi i životinja, vime krava), stečena rezistencija na antimikrobne lekove se utvrđuje kod mnogih vrsta koje naseljavaju takve sredine, uključujući *Enterococcus*, *Lactococcus* i *Lactobacillus* vrste.

Ne postoji barijera između patogenih (streptokoke), potencijalno patogenih (enterokoke) i komenzalnih (laktobacili, laktokoke) BMK s obzirom na mogućnost preuzimanja i sticanja determinanti rezistencije na antimikrobne lekove. Utvrđeni su identični geni odgovorni za rezistenciju na tetraciklin - *tet* (M), eritromicin - *ermAM*, hloramfenikol - *cat*, streptomycin - *str*, streptogramin - *sat*, u sve tri grupe mikroorganizama. Ovi podaci potvrđuju gledište da u sredinama, u kojima su korišćene enormne količine antimikrobnih lekova, bakterije mlečne kiseline, kao i drugi mikroorganizmi, učestvuju u sistemima komunikacije, putem kojih i prenose osobine rezistencije preko granica vrsta, pa čak i rodova.

Do sada, multirezistencija, na sreću, nije uobičajena kod bakterija mlečne kiseline. Ipak, u sve većem broju se izoluju sojevi koji pokazuju atipične nivoje rezistencije na pojedine antimikrobne lekove (posebno tetraciklin i eritromicin). Takvi sojevi nose gene rezistencije za koje se veruje, a u mnogim slučajevima je i potvrđeno, da su stečeni horizontalnim prenošenjem. Stoga je sasvim opravdana inicijativa Evropske agencije za bezbednost hrane za neophodnim ispitivanjem prisustva prenosivih determinanti rezistencije onih sojeva bakterija mlečne kiseline koji se primenjuju kao starter ili probiotski sojevi. Takvi zahtevi su definisani usvajanjem sistema kvalifikovane pretpostavke bezbednosti ("Qualified Presumption of Safety" – QPS) (EFSA, 2004).

Literatura / References

1. Carr FJ, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria: a literature survey. Crit. rev. Microbiol. 2002; 28: 281-370.
2. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. J. Food Prot. 1998; 61: 1636-43.
3. Danielsen M, Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. Int. J. Food Microbiol. 2003; 82: 1-11.
4. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science 1994; 64: 375-82.
5. Davies J. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. In: Chadwick DJ, Goode J (Eds.), Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread, Ciba Foundation Symposium, Vol. 207. Wiley, Chichester, 1997; 15-27.
6. Delgado S, Florez AB, Mayo B. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. Curr. Microbiol. 2005; 50: 202-7.
7. European Commission. Opinion of the Scientific Committee on animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of microorganisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. European Commission, Health and

- Consumer Protection Directorate, Directorate C, Scientific Opinions, Brussels, Belgium. 2002.
8. European Food Safety Authority. EFSA Scientific Colloquium Summary Report. QPS: qualified presumption of safety of microorganisms in food and feed. European Food Safety Authority, Brussels, Belgium, 2004.
 9. Herrero M, Mayo B, Gonzales B, Suarez JE. Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 1996; 81: 565-70.
 10. Huys G, D'Haene K, Swings J. Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. *Lett. Appl. Microbiol.* 2002; 34: 402-6.
 11. Katla AK, Kruse H, Johnsen G, Herikstad H. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 2001; 67: 147-52.
 12. Klein G, Hallmann C, Casas IA, Abad J, Louwers J, Reuter G. Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *J. Appl. Microbiol.* 2000; 89: 815-24.
 13. Levy SB. Antibiotic resistance an ecological imbalance. In: Chadwick, D.J., Good, J. (Eds.), *Antibiotic Resistance. Origins, Evolution, selection and Spread*. John Wiley & Sons, Chichester. 1997; 1-14.
 14. Levy SB, Miller RV. Horizontal gene transfer in relation to environmental release of genetically engineered microorganisms. *Gene Transfer in the Environment*. McGraw-Hill Publishing Company, New York, 1989; 405-20.
 15. Levy SB, Salyers AA. Reservoirs of antibiotic resistance (ROAR) Network. <http://www.healthsci.tufts.edu/apua/Roar/roarhome.htm>, 2002.
 16. Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science*. 1992; 257: 1064-73.
 17. Ollson-Liljequist B, Larsson P, Walder M, Miorner H. Antimicrobial susceptibility testing in Sweden. III. Methodology for susceptibility testing. *Scand. J. Infect. Dis.* 1997; Suppl. 105: 13-23.
 18. Perreten V, Schwarz F, Cresta L, Boeglin M, Dasen G, Teuber M. Antibiotic resistance spread in food. *Nature* 1997; 389: 801-2.
 19. Perreten V, Vorlet-Fawer L, Slickers P, Ehrlich R, Kuhnert P, Frey J. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of Gram-positive bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 2291-302.
 20. Salyers AA. *Antibiotic Resistance Transfer in the Mammalian Intestinal Tract: Implications from Human Health, Food Safety and Biotechnology*. Springer-Verlag, 1995.
 21. Scientific Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed. Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J.* 2005; 223: 1-12.
 22. Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 4089-94.
 23. Swenson JM, Ferraro MJ, Sahm DF, Charache P, Tenover FC. New vancomycin disk diffusion breakpoints for enterococci. The National Committee for Clinical Labo-

- ratory Standards Working Group on Enterococci. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 2525-28.
24. Teuber M, Meile L, Schwarz F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. Antonie Van Leeuwenhoek 1999; 76: 115-37.
25. Volkmann H, Schwartz T, Bischoff P, Kirchen S, Obst U. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). J. Microbiol. Meth. 2004; 56: 277-86.
26. WHO. The Medical Impact of the Use of Antimicrobials in Food Animals. Report of a WHO Meeting, Berlin, Germany, 1997 13-17 October, WHO, Geneva.

ENGLISH

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF LACTIC ACID BACTERIA

Snežana Bulajić, Zora Mijačević, Radoslava Savić Radovanović

Knowledge on the antibiotic resistance of lactic acid bacteria is still limited, possibly because of the large numbers of genera and species encountered in this group, as well as variances in their resistance spectra. The EFSA considers antibiotic resistances, especially transferable resistances, an important decision criterion for determining a strain's QPS status. There are no approved standards for the phenotypic or genotypic evaluation of antibiotic resistances in food isolates. Also, the choice of media is problematic, as well as the specification of MIC breakpoint values as a result of the large species variation and the possible resulting variation in MIC values between species and genera. The current investigations in this field showed that we might end up with a range of different species- or genus-specific breakpoint values that may further increase the current complexity. Another problem associated with safety determinations of starter strains is that once a resistance phenotype and an associated resistance determinant have been identified, it becomes difficult to show that this determinant is not transferable, especially if the resistance gene is not located on a plasmid and no standard protocols for showing genetic transfer are available. Encountering those problems, the QPS system should allow leeway for the interpretations of results, especially when these relate to the methodology for resistance phenotype determinations, determinations of MIC breakpoints for certain genera, species, or strains, the nondeterminability of a genetic basis of a resistance phenotype and the transferability of resistance genes.

Key words: lactic acid bacteria, antibiotic resistance

РУССКИЙ

АНТИБИОТИЧЕСКОЕ СОПРОТИВЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Снежана Булаич, Зора Миячевич, Радослава Савич Радванович

Познания о сопротивлении на антибиотики бактерий молочной кислоты всё ещё ограниченные, вероятно из-за большего числа рода и видов, существующих у этой

группы, словно и из-за разниц в их спектре сопротивления. Европейское агенство для безопасности корма ЕАБК считает резистентность на антибиотики, отдельно переносимого сопротивления, важным критерием у принятия решения о квалифицированной оценке безопасности - КОБ статусу определённого штамма. Не существуют принятые стандарты для фенотипического и генотипического определения ценности сопротивления на антибиотики у изолятов корма. Также выбор медиа проблематичный, словно и спецификация минимальной ингибиторной концентрации МИК стоимости как следствие больших вариаций в виде и возможные являющиеся результатом вариации в МИК стоимостях между видами родами. Текущие исследования в этой области показали, чтобы на конце мог получиться ряд различных МИК стоимостей специфических для вида или рода, которые бы могли ещё больше углубить теперешнюю комплексность. Ещё одна проблема, сущая в связи с определениями безопасности стартер штаммов, когда однажды идентифицируют фенотип сопротивления и ассоциированный детерминант сопротивления, становится тяжело показать, что этот детерминант не переносный, отдельно поскольку ген сопротивления не находится на плазмиде и поскольку не имеет стандартных протоколов для генетического трансфера. Вследствие существования таких проблем, система о квалифицированной оценке безопасности КОБ надо оставить пространства для интерпретации результатов, отдельно, когда они относятся на методологию определения фенотипа сопротивления, определения МИК стоимости для определённого рода, вида, или штамма, на невозможность установливания генетической базы фенотипа сопротивления, словно и переносность гена сопротивления.

Ключевые слова: бактерии молочной кислоты, антибиотическая резистентность

**ALERGENI U HRANI – PREOSETLJIVOST NA HRANU I
SASTOJKE NAMIRNICA******FOOD ALLERGENS – HYPERSENSITIVITY TO FOOD AND FOOD
CONSTITUENTS*****I. Stanković****

Reakcije na hranu koje se manifestuju samo kod malog broja osetljivih osoba mogu da se podele na reakcije psihološke intolerancije (averzija i sl.) i na reakcije prave fiziološke preosetljivosti na određene namirnice ili sastojke hrane. Reakcije preosetljivosti dalje se klasifikuju na nealergijske reakcije preosetljivosti, koje mogu da budu posledica nepoznatih mehanizama ili metaboličkih abnormalnosti, i alergije na hranu koje su injicirane imunološkim mehanizmima.

Najveći broj potvrđenih alergija na hranu uključuje produkciju IgE antitela i lanac interakcija između određenih tipova ćelija i hemijskih medijatora. Ova vrsta alergijskih reakcija označava se kao IgE-posredovana alergija ili reakcija preosetljivosti tipa I. Simptomi se javljaju vrlo brzo nakon unošenja određene namirnice, a najopasniji, ali na sreću vrlo redak, jeste sistemski odgovor (anafilaksa) koji može da ima fatalni ishod ukoliko se u kratkom roku ne pruži odgovarajuća medicinska pomoć. Simptomi alergije na hranu mogu da budu gastrointestinalni (otok usana i grla, mučnina, povraćanje, abdominalni bolovi, dijareja i dr.), respiratorni (bronhospazam, astma, rinitis) i dermatološki (svrab, eritem, urtikaria, ekcem, konjunktivitis).

Preosetljivost na hranu zahteva poseban dijetalni tretman. Restriktivne dijetne mogu biti relativno lake za sprovođenje ukoliko se radi o alergenima koji nisu prisutni u velikom broju namirnica npr. preosetljivost na kikiriki ili susam. Međutim, neke od njih, kao što je dijeta bez glutena veoma su teško sprovodljive zbog velikog broja namirnica koje mogu da sadrže gluten žitarica, bilo kao sastojak ili kao onečišćenje. Zbog toga je važno da proizvođači namirnica imaju dobre sisteme kontrole i sledljivosti i da pravilno označe moguće prisustvo potencijalnih aler-

* Rad saopšten na simpozijumu "Bezbednost namirnica animalnog porekla", Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd 16 i 17. oktobar 2008. godine

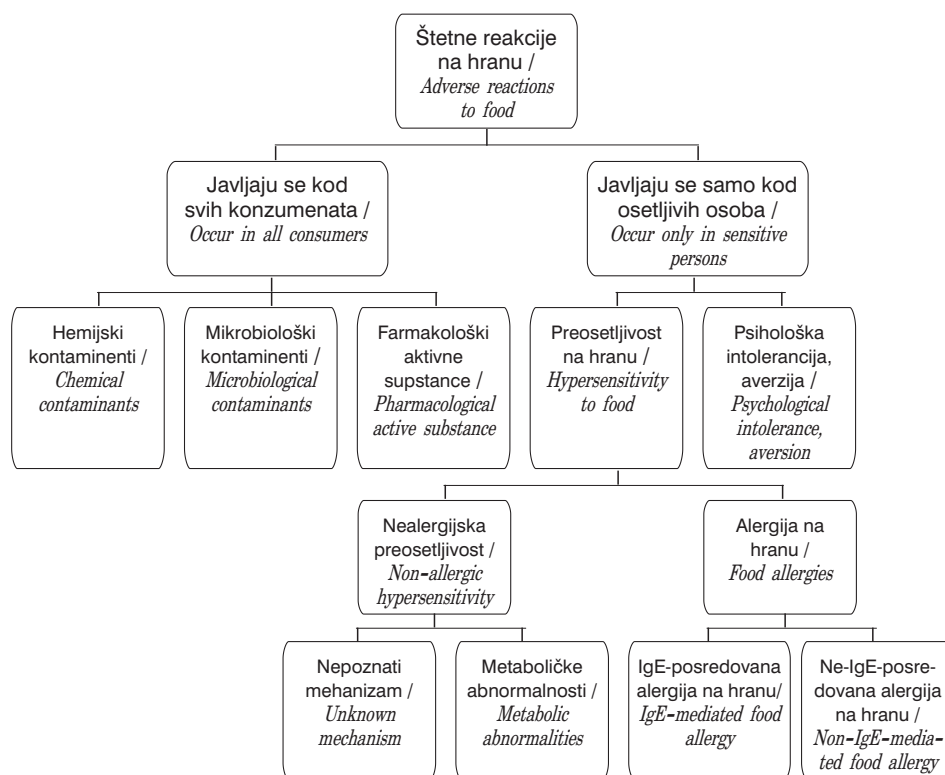
** Dr sci Ivan Stanković, profesor, Institut za bromatologiju, Farmaceutski fakultet, Beograd

gena kako bi pomogli preosetljivim osobama u striktnom sprovođenju restriktivnih dijeta, koje su često i njihov doživotni tretman.

Ključne reči: alergeni, hrana, preosetljivost

Uvod / Introduction

Reakcije štetnog dejstva hrane i njihovih sastojaka na zdravlje ljudi mogu da se podele na one koje pogađaju sve konzumente hrane i one na koje reaguje mali broj osetljivih osoba (Johansson i sar. 2001) (slika 1).



Slika 1. Klasifikacija štetnih efekata hrane na zdravlje ljudi Evropske akademije za alergologiju i kliničku imunologiju (EAACI) /
Figure 1. Classification of adverse effects of food on human health by the European Academy for Allergology and Clinical Immunology (EAACI)

Reakcije na namirnice koje sadrže hemijske ili mikrobiološke kontaminante ili farmakološki aktivne supstance ispoljavaju se kod svih osoba koje takve

namirnice konzumiraju u dovoljno velikoj količini. Iako neke od tih reakcija mogu da budu veoma slične alergijskim reakcijama, npr. intoksikacija histaminom koji nastaje u pokvarenoj ribi iz aminokiseline histidina, za ove reakcije je zajedničko to da se ispoljavaju kod celokupne populacije koja je konzumirala takve namirnice.

Reakcije koje se dešavaju samo kod osetljivih pojedinaca, koji predstavljaju veoma mali deo populacije, mogu da se podele na reakcije psihološke intolerancije (averzija i sl.) i na reakcije prave fiziološke preosetljivosti na određene namirnice ili sastojke hrane. Reakcije preosetljivosti mogu dalje da se podele na nealergijske reakcije preosetljivosti, koje mogu da budu posledica nepoznatih mehanizama ili metaboličkih abnormalnosti, i alergije na hranu, koje mogu da budu posredovane IgE antitelima ili nekim drugim mehanizmima.

Psihološka intolerancija / Psychological intolerance

Psihološka intolerancija (averzija) na određenu hranu je relativno čest fenomen i može da predstavlja problem ukoliko je udružena sa određenim simptomima. Neke osobe koje veruju da imaju alergiju na hranu u stvari imaju averziju prema određenim namirnicama udruženu sa pratećim stanjima anksioznosti ili panike. Neki svoju averziju prema određenim namirnicama više vole da pripišu medicinskim problemima, jer im je u društvu lakše da kažu da su alergični na neku namirnicu nego da ne vole tu namirnicu. Osobe sa averzijom prema nekoj vrsti hrane mogu imati kliničku istoriju reakcija sličnih alergijama, čak i pozitivne rezultate kožnih proba, ali su kod njih rezultati dobro sprovedenih dvostruko slepih ispitivanja na alergene hrane negativni i ne postoje potvrde IgE posredovanih alergijskih reakcija. Studija (Young i sar. 1994) je pokazala da oko 20% populacije Velike Britanije veruje da ima neki oblik alergije ili intolerancije na hranu i to povezuju sa određenim kožnim problemima, abdominalnim bolovima, respiratornim problemima, gubitkom na težini ili glavoboljama. Oni često na svoju ruku primenjuju određene dijetе koje mogu da budu nutritivno neadekvatne, naročito kod dece. Međutim, samo 19% osoba koje su verovalе da imaju alergiju na hranu i koje su pristale da se podvrgnu ispitivanjima imale su reakcije preosetljivosti ili alergiju na hranu potvrđenu dvostruko slepim ispitivanjima.

Nealergijska preosetljivost na hranu / Non-allergic hypersensitivity to food

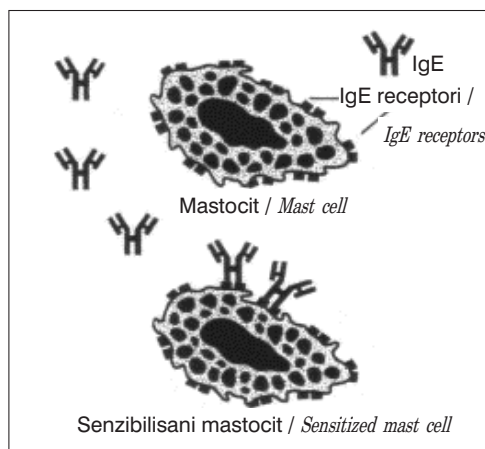
Nealergijska preosetljivost na hranu može da bude nepoznatog porekla ili posledica deficita određenih enzima. Npr. osobe sa intolerancijom na laktozu imaju nedovoljnu količinu enzima laktoze koji hidrolizuje laktozu na glukozu i galaktozu. Kod ovih osoba laktoza se ne hidrolizuje i fermentira pod dejstvom bakterija gastrointestinalnog trakta. Pri tome se stvaraju gasovi, kratkolančane masne kiseline, dolazi do osmotskog efekta, dijareja, abdominalnih bolova, povraćanja, grčeva i sličnih problema, onda kada se konzumira mleko.

Alergije na hranu / Food allergies

Alergije na hranu su reakcije preosetljivosti na određene namirnice inicirane imunološkim mehanizmima.

Najveći broj potvrđenih alergija na hranu uključuje produkciju IgE antitela i lanac interakcija između određenih tipova ćelija i hemijskih medijatora. Ova vrsta alergijskih reakcija označava se kao IgE-posredovana alergija ili reakcija preosetljivosti tipa I. Simptomi se javljaju vrlo brzo nakon unošenja određene namirnice. Najopasnija, ali na sreću vrlo retka manifestacija, jeste anafilaksa, koja može da ima fatalni ishod ukoliko se u kratkom roku ne pruži odgovarajuća medicinska pomoć. Simptomi alergije na hranu mogu da budu gastrointestinalni (otok usana i grla, mučnina, povraćanje, abdominalni bolovi, dijareja i dr.), respiratorni (bronhospazam, astma, rinitis) i manifestacije na koži i sluzokoži (svrab, eritem, urtikaria, ekcem, konjunktivitis). Mnogi od ovih simptoma nisu specifični samo za alergije na hranu i mogu da budu posledica drugih poremećaja u organizmu.

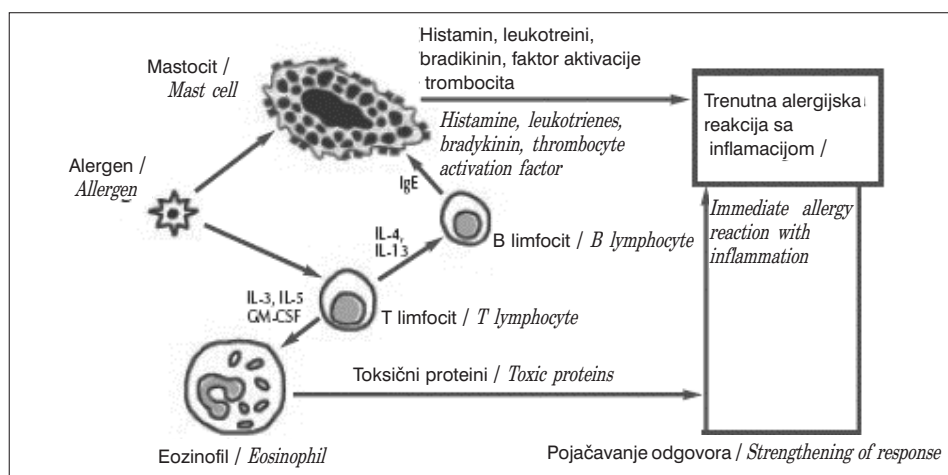
Nakon prvog kontakta sa alergenom kod osoba koje imaju genetsku predisponiranost (atopija) dolazi do senzibilizacije. B-limfociti proizvode IgE antitela koja imaju afinitet za specifični deo molekule antigena (epitop). Drugi deo IgE molekule vezuje se za receptore na površini mastocita koje tako postaju senzibilisane na određeni alergen (slika 2).



Slika 2. Senzibilizacija mastocita
Figure 2. Sensibilization of mast cells

Ponovljeni kontakt senzibilisanih mastocita sa istim alergenom (ili čak sa istim epitopom na drugom alergen) rezultira trenutnom IgE-posredovanom alergijskom reakcijom sa inflamacijom, t.j. dolazi do oslobađanja hemijskih medijatora kao što su histamin i druge biološki aktivne supstance i produkcije proinfla-

maternih supstanci kao što su leukotrieni i prostaglandini koji dovode do inflamatornog odgovora (otok, svrab, crvenilo) (slika 3). Mastociti i T limfociti oslobađaju medijatore koji stimuliraju B limfocite da proizvode nova IgE antitela, a T limfociti proizvode i medijatore koji stimuliraju eozinofile da migriraju na mesto inflamacije gde iz svojih granula oslobađaju različite hemijske supstance koje dovode do dodatnog oštećenja tkiva čime se intenzivira i produžava inflamatorni odgovor.



Slika 3. Pojednostavljen prikaz medijatora uključenih u IgE-posredovanu alergijsku reakciju

Figure 3. Simplified presentation of mediators included in IgE-mediated allergy reaction

Drugi mehanizam kod alergija na hranu je reakcija kasne preosetljivosti celularnog tipa ili preosetljivost tipa IV, koja se razvija posle nekoliko sati ili dana nakon unošenja alergena. Ona nije posredovana IgE antitelima, već su za njenu pojavu ključni mehanizmi reakcije između određenih ćelija i hemijskih medijatora. Simptomi ovih reakcija javljaju se najčešće na koži ili u gastrointestinalnom traktu i mnogo su teži za ispitivanje i potvrđivanje nego trenutni simptomi IgE posredovanih reakcija. Međutim, verovatno imaju značajnu ulogu kada alergije na hranu mogu da dovedu do određenih hroničnih stanja (Jackson 2003).

Celijačna bolest / / Celiac disease

Celijačna bolest (gluten-senzitivna enteropatija) se odlikuje specifičnom preosetljivošću na gluten, odnosno prolaminsku frakciju glutena nekih žitarica. Celijačni bolesnici su preosetljivi na gliadin iz pšenice, sekalini iz raži, hordein iz ječma i avenin iz ovasa dok prolamini kukuruza i pirinča nisu za njih toksični. Bolest se karakteriše oštećenjem mukoze tankog creva koju prate dijareja i drugi simptomi koji su posledica poremaćaja u apsorpciji nutrijenata. Oštećenja mu-

koze su reverzibilna i za oporavak pacijenta je važno isključivanje glutena iz ishrane. Ove osobe imaju visok titar antiprolamin serumskih antitela IgA, IgG i IgM klase. Dijeta bez glutena je doživotni tretman celijačnih bolesnika i uslovljava njihovo lečenje.

Prevalencija alergija na hranu / Prevalence of food allergies

Podaci pokazuju da je oko 2% odrasle svetske populacije preosetljivo na neke namirnice, a da oko 1% odrasle populacije ima pravu alergiju na hranu. Kod dece je ovaj procenat veći i smatra se da oko 5 do 8% dece ima neki oblik preosetljivosti na namirnice, a 1 do 2,5% ima pravu alergiju na hranu. Visoka prevalencija potvrđene alergije na hranu kod dece ukazuje na to da je deo alergija prolaznog tipa i ispoljava se samo u dečijem uzrastu. Klinička iskustava potvrđuju da oko 80% dečijih alergija na mleko i oko 50% alergija na jaja nestaje u kasnijem periodu života. S druge strane, alergija na kikiriki uglavnom ostaje do kraja života, a manifestacije mogu da budu ozbiljnije u kasnijim godinama života.

Dijetalna ograničenja i označavanje alergena u namirnicama / Dietary limitations and marking allergens in foods

Većina alergija na hranu nije izlečiva i pacijenti moraju da se naviknu na život sa alergijom na hranu. Isključivanje alergena iz ishrane je često jedini dijetalni tretman. Relativno mali broj namirnica odgovoran je za većinu slučajeva alergija na hranu. U EU Direktiva 2000/13/EC propisuje obavezno označavanje prisustva sledećih 12 najznačajnijih nutritivnih alergena, što je od velikog značaja za preosetljive osobe koje te alergene isključuju iz ishrane:

1. žita koja sadrže gluten (pšenica, raž, ovas i ječam) i njihovi proizvodi,
2. ljuskari i proizvodi od ljuskara,
3. jaja i proizvodi od jaja,
4. riba i proizvodi od ribe,
5. kikiriki i proizvodi od kikirikija,
6. soja i proizvodi od soje,
7. mleko i mlečni proizvodi,
8. jezgrasto voće,
9. celer,
10. senf,
11. susam,
12. sumpor-dioksid i sulfiti u količini većoj od 10 mg/kg ili 10 mg/l.

Mnoge druge namirnice mogu da budu alergeni za pojedine osobe, ali je prevalenca ovih alergija znatno ređa nego kod ovih 12 alergena.

Termički tretman može da smanji alergenost nekih namirnica. Poznato je da se alergenost voća, jaja i mleka smanjuje kuvanjem, što se objašnjava promenom sekundarne i tercijarne strukture molekula proteina i prostornog rasporeda epitopa usled denaturisanja i koagulacije.

Neki aditivi mogu izazvati alergijske reakcije kod osetljivih osoba. Tako je poznato da sulfiti koji se koriste kao konzervansi za proizvode od voća i povrća i u proizvodnji vina mogu kod astmatičara da provociraju bronhospazam i astmatični napad. Neke boje (npr. tartrazin), benzoati i glutaminati mogu da izazovu alergijske reakcije.

Interindividualne razlike u osetljivosti na pojedine alergene su veoma velike. Neke osobe mogu da reaguju veoma burno već u kontaktu sa malom količinom alergena. Literaturni podaci pokazuju da 10 – 190 mg ovoalbumina jajeta, 1 mg – 6 g proteina kravljeg mleka ili 100 µg – 50 mg kikirikija izazivaju ozbiljne reakcije kod preosetljivih osoba (Jackson, 2003).

Nova hrana i genetski modifikovana hrana takođe mogu da imaju alergogeni potencijal za preosetljive osobe (FAO and WHO, 2001).

Zaključak / Conclusion

Preosetljivost na hranu i sastojke namirnica je veliki problem relativno malog procenta populacije, koji zahteva poseban dijetalni tretman, odnosno restriktivne dijetete koje predstavljaju osnovu njihove terapije. Ponekad su te dijetete relativno lake za sprovođenje, ako se radi o alergenima koji nisu prisutni u velikom broju namirnica, npr. preosetljivost na kikiriki ili susam. Međutim, neke od njih kao što je dijeta bez glutena, veoma se teško sprovode zbog velikog broja namirnica koje mogu da sadrže prolamine žitarica, bilo kao sastojak ili kao onečišćenje. Zbog toga je veoma važno da proizvođači namirnica imaju dobre sisteme kontrole i sledljivosti i da pravilno označe moguće prisustvo potencijalnih alergena kako bi pomogli preosetljivim osobama u sprovođenju restriktivnih dijeta koje su često i njihov doživotni tretman.

Literatura / References

1. Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council on the approximation of the laws of the Member States relating to the labelling, presentation and advertising of foodstuffs. Official Journal of the European Communities 2000; 109: 29-42.
2. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO). Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods: Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology. Rome: FAO, 2001.
3. Jackson WF. Food Allergy. ILSI Europe publication, Brisel, Belgija 2003; 3-36.
4. Johansson SGO, Hourihane JO'B, Bousquet J, *et al.* (the EAACI Nomenclature Task Force). A revised nomenclature for allergy (position paper), Allergy 2001; 56: 813-24.
5. Young E, Stoneham MD, Petrukevitch A, Barton J, Rona R. A population study of food intolerance, Lancet 1994; 343: 1127-30.

ENGLISH

FOOD ALLERGENS – HYPERSENSITIVITY TO FOOD AND FOOD CONSTITUENTS

I. Stanković

Adverse reactions to food which occur only in susceptible individuals may result from true physical hypersensitivity to components of foods or from psychological factors. Non-allergic food hypersensitivity may be due to a metabolic defect in the affected individual, while in food allergy immune mechanism is involved. Food allergy can be further subdivided into IgE-mediated food allergy and non-IgE-mediated food allergy, depending on the underlying allergic mechanism.

Most cases of confirmed food allergy involve the production of IgE antibodies and a network of interactions between various cell types and chemical mediators. This type of allergic reaction is known as an IgE-mediated allergy (or a type I hypersensitivity reaction), and it produces immediate symptoms. The most severe form of IgE-mediated allergy is systematic answer known as anaphylaxis that can be fatal in the absence of adequate medical help. Other less severe allergy manifestations are symptoms like swelling, itching, redness and heat in the mouth, gut, skin or respiratory tract. Hypersensitivity to food requires special dietary treatment, but total exclusion of some foods from the diet can be very difficult, because of the wide distribution of some foodstuffs in the diet or their presence as impurities in other foods. It is very important that producers have good systems of control, traceability and labelling of possible presence of food allergens in order to help people with food allergies to conduct their restrictive diets that are in most cases their lifelong treatment.

Key words: allergens, food, hypersensitivity

РУССКИЙ

АЛЛЕРГЕНЫ В КОРМЕ – ЧРЕЗМЕРНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ НА КОРМ И СОСТАВНЫЕ ЧАСТИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

И. Станкович

Реакции на корм, манифестируемые у маленького числа чувствительных особей могут разделить на реакции психологического нетерпения (отвращение и т.п.) и на реакции настоящей физиологической чрезмерной чувствительности на определённые пищевые продукты или составные части корма. Реакции чрезмерной чувствительности дальше классифицируются на неаллергические реакции чрезмерной чувствительности, которые могут быть послевствие незнакомых механизмов или метаболических ненормальностей и аллергии на корм, инициированные иммунологическими механизмами.

Наибольшее число подтверждённых аллергий на корм включает продукцию IgE антител и цепь интеракций между определёнными типами клеток и химических медиаторов. Этот вид аллергических реакций обозначается как IgE-посредственная аллергия, или реакция чрезмерной чувствительности типа I. Симптомы являются очень быстро после внесения определённого пищевого продукта, а

самый опасный, но на счастье очень редкий, системный ответ (анафилактика), который может иметь фатальный исход насколько в коротком сроке не окажется отвечающая медицинская помощь. Симптомы аллергии на корм могут быть гастроинтестинальные (отёк губ и горла, тошнота, рвота, абдоминальные боли, диарея и пр.), респираторные (бронхоспазм, астма, ринит) и дерматологические (зуд, эритема, крапивница, экзема, конъюнктивит).

Чрезмерная чувствительность на корм требует отдельное диетное лечение. Иногда рестриктивные диеты релятивно лёгкие для проведения насколько дело идёт о аллергенах, которые не присутствующие в большем числе пищевых продуктов например чрезмерная чувствительность на арахис или кунжут, но некоторые из них, как диета без глютена очень тяжело могущие быть проведёнными из-за большего числа пищевых продуктов, которые могут содержать глютен хлебов, хоть как составная часть или как очистка. Вследствие этого важно, что производители пищевых продуктов имеют хорошие системы контроля и последовательности и чтобы правильно обозначить возможное присутствие потенциальных аллергенов как бы помогли чрезмерно чувствительным особям в пунктуальном проведении рестриктивных диет, которые часто и их пожизненное лечение.

Ключевые слова: аллергены, корм, чрезмерная чувствительность

UPUTSTVO AUTORIMA ZA PRIPREMANJE RUKOPISA

VETERINARSKI GLASNIK je časopis Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, koji se izdaje u saradnji sa Veterinarskom komorom Srbije. Časopis objavljuje originalne, stručne i pregledne radove, izveštaje sa kongresa i stručnih sastanaka, prikaze knjiga, radove iz istorije veterinarske medicine, dopise za rubriku Sećanje, kao i komentare i pisma Uredništvu u vezi sa objavljenim radovima.

Sve prispele rukopise Uređivački odbor, odnosno glavni i odgovorni urednik šalje recenzentima radi stručne procene. Ukoliko recenzenti predlože izmene i dopune, tada se kopija recenziranog rukopisa dostavlja autoru (autorima) s molbom da tražene izmene unesu u tekst ili pak u protivnom da argumentovano izraze svoje neslaganje sa datim primedbama recenzenta. Konačnu odluku o prihvatanju rada za štampu donosi glavni i odgovorni urednik zajedno sa uređivačkim odborom.

Časopis se štampa na srpskom jeziku, a kratak sadržaj se prevodi na engleski i ruski. Radovi stranih autora, van srpskog, hrvatskog i bošnjačkog govornog područja se štampaju na engleskom jeziku sa kratkim sadržajem na srpskom i engleskom jeziku.

Molimo saradnike da svoje radove za *Veterinarski glasnik* pišu jasno, koncizno, racionalno, gramatički ispravno i u skladu sa sledećim uputstvima.

OPŠTA UPUTSTVA

Tekst rada se kuca u programu za obradu teksta Word, latinicom, u fontu Times New Roman, sa duplim proredom i veličinom slova 12 tačaka (12 pt). Levu i desnu marginu podesiti na 20 mm, a gornju i donju na 30 mm, veličinu stranice na A₄, sa levim poravnanjem i uvlačenjem svakog pasusa za 10 mm. Ukoliko su u tekstu prisutni specijalni znaci (simboli), koristiti font Symbol. Rukopis rada dostaviti odštampan jednostrano na belom papiru formata A₄ u dva primerka, zajedno sa elektronskom verzijom. Stranice numerisati redom u okviru donje margine (sa desne strane) počev od naslovne strane. Podaci o korišćenoj literaturi u tekstu označavaju se u zagradi prezimenom autora, iza kojeg se stavlja zarez i godina. Ukoliko rad ima više od dva autora u zagradi treba navesti samo prezime prvog autora uz dodatak «i sar.» pa godina (npr. Petrović i sar., 1987).

NASLOVNA STRANA

Na posebnoj, prvoj stranici treba navesti sledeće:

- Naziv članka, odnosno rada napisan velikim slovima bez podvlačenja i bez skraćenica;
- Autore ispod naslova, pri čemu se za muška lica navodi samo početno slovo imena, a za ženska puno ime i puno prezime svakog autora, bez

podvlačenja i veznika, već razdvojena samo zarezom. Iznad prezimena se zvezdicom (jednom ili više) označava ustanova u kojoj radi autor (autori). Zvezdice se stavljaju u superskriptum na kraju svakog prezimena;

– Tačne nazive ustanova (i mesta u kojima se one nalaze) u kojima autori rade, treba navoditi onim redosledom koji odgovara redosledu navođenja imena autora u radu;

– Na dnu stranice treba navesti ime i prezime jednog od autora i njegovu adresu, broj telefona, faksa ili e-mail, radi korespondencije.

KRATAK SADRŽAJ

Na posebnoj stranici uz rad treba priložiti i kratak sadržaj rada, obima 200-300 reči. Pored naslova i imena autora i ustanova, ovaj deo treba da sadrži najvažnije činjenice iz rada. Takođe, ispod kratkog sadržaja treba navesti ključne reči optimalno od tri do šest.

PISANJE TEKSTA

Svi podnaslovi se pišu malim boldovanim slovima. U radu treba koristiti kratke i jasne rečenice. Sve strane reči za koje postoji odgovarajući domaći termin treba zameniti tim terminom tako da prevod bude u duhu srpskog jezika. Za nazive lekova koristiti isključivo njihova internacionalna nezaštićena imena (ili kako to još neko naziva generička imena) i pisati ih onako kako se izgovaraju (ne na latinskom ili engleskom jeziku). Ukoliko se pak želi ipak istaći ime nekog preparata, onda se njegovo ime, (zajedno sa imenom proizvođača) stavlja u zagradu iza naziva aktivne supstancije. Uređaji ili aparati se takođe označavaju njihovim trgovačkim nazivima, s tim što se i ovde u zagradi mora navesti ime i mesto proizvođača. Određene supstancije ili hemikalije, koje se označavaju slovima i brojkama, moraju se precizno označiti stavljanjem broja iznad (superskriptum) ili ispod slova (subskriptum) (npr. IL-6, H₂O, B₁₂, CD₈). U radu se mogu koristiti određene skraćenice, ali samo kada je to neophodno (npr. kod dugačkih imena hemijskih jedinjenja) ili kada se takve skraćenice već nalaze u literaturi, odnosno kao takve su već prepoznatljive (npr. DNK). Za svaku skraćenicu, koja se prvi put javlja u tekstu treba navesti i pun naziv. Skraćenice nikako ne koristiti u naslovu, i u kratkom sadržaju ih takođe treba izbegavati. Decimalne brojeve pisati sa zarezom i bar još jednom nulom. Obim rukopisa bez priloga, ne treba da bude veći od 8 stranica kucanog teksta. Treba izbegavati veliki broj priloga.

Tabele se označavaju arapskim brojevima (iznad tabela) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Koristiti font Times New Roman i veličinu slova 12 pt, sa jednostrukim proredom i bez uvlačenja. Ukoliko se u tabeli koriste skraćenice, treba ih objasniti u legendi ispod tabele. Svaku tabelu treba odštampati na posebnom listu papira i za svaki primerak rukopisa dostaviti po jednu.

Grafikoni se takođe označavaju arapskim brojevima (ispod grafikona) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Koristiti font Times New Roman i veličinu slova 12 pt, sa jednostrukim proredom i bez uvlačenja. Ukoliko se koriste skraćenice, treba ih objasniti u legendi ispod grafikona. Svaki grafikon treba odštampati na posebnom listu papira i za svaki primerak rukopisa dostaviti po jedan.

Sheme (crteži) se označavaju arapskim brojevima (ispod shema) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Koristiti font Times New Roman i veličinu slova 10 pt, sa jednostrukim proredom i bez uvlačenja. Ukoliko se koriste skraćenice, treba ih objasniti u legendi ispod sheme. Svaku shemu treba odštampati na posebnom listu papira i za svaki primerak rukopisa dostaviti po jednu.

Fotografije se označavaju arapskim brojevima (ispod fotografije) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Primaju se isključivo originalne fotografije (crno-bele ili u boji) na sjajnom (glatkom, a ne mat) papiru. Na poleđini svake fotografije treba napisati redni broj i strelicom označiti gornji deo slike. Za svaki primerak rukopisa dostaviti po jednu sliku.

POGLAVLJA RADA

Poglavlja rada su: **Uvod, Materijal i metode rada, Rezultati, Diskusija (ili Rezultati i diskusija zajedno), Zaključak i Literatura.**

U uvodu treba ukazati na najvažnije, odnosno najnovije činjenice i poglede vezane za temu rada, sa kratkim obrazloženjem cilja sopstvenih ispitivanja.

Materijal i metode rada. – U ovom poglavlju treba opisati uslove pod kojima su ogledi izvedeni, materijal i životinje na kojima su izvedeni, kao i metode koje su korišćene u ogledu.

Rezultati. – Rezultate prikazati pregledno uz pomoć tabela ili grafikona. Svuda treba da stoji redni broj i tekst koji opisuje šta određena slika, tabela ili grafikon prikazuje. Redni broj sa tekstom se stavlja iznad tabela, a kod svih ostalih prezentacija ispod. Autor mora precizno da naznači mesto u tekstu na kojem želi da bude prikazan određeni prilog.

Diskusija. – U ovom poglavlju autor analizira dobijene rezultate i upoređuje ih sa rezultatima i mišljenjima drugih autora, te ističe njihov teorijski i praktični značaj.

Literatura. – U ovom poglavlju autor treba da iznese podatke koji se tiču literature, odnosno radova koje je koristio u toku izrade svog rada. Poželjno je da korišćena literatura bude što novija i, ako je moguće, da ne bude starija od 5 godina. Reference treba pisati jednu ispod druge (numerisati ih arapskim brojevima) i abecednim redom prema prvom slovu prezimena prvog autora. Ukoliko tekst reference ne može da stane u jedan red već se prenosi u sledeći, onda se red koji sledi uvlači ispod prethodnog jednim pritiskom na tabulator. Broj referenci nije ograničen, ali se preporučuje da ne bude veći od 30. Izbegavati korišćenje apstrakta kao reference. Reference članaka koji su prihvaćeni za štampu treba

označiti kao «u štampi» i priložiti dokaz o prihvatanju rada. Reference se citiraju prema Vankuverskim pravilima, koja su zasnovana na formatima koja koriste *National Library of Medicine* i *Index Medicus*. Naslove časopisa takođe treba skraćivati prema načinu koji koristi *Index Medicus* (ne stavljati tačke posle skraćenice). Stranice se citiraju tako što se navede pun broj početne stranice i nepotpun broj završne stranice bez cifara koje se ponavljaju (npr. 134-138 se navode kao 134-8).

Primeri:

1. Članak u časopisu:
Petrović M, Rakić L. Uticaj selena na razvoj pilića. *Živinarstvo* 2005; 2(7): 234-9.
2. Knjige i druge monografije:
Colson JH, Armour WJ. *Sports injuries and their treatment*. 2nd rev. ed. London: S Paul, 1986.
3. Poglavlje u knjizi:
Weinstein L, Swartz MN. Pathologic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, editros. *Pathologic physiology: mechanisms of disease*. Philadelphia: Saunders, 1974: 457-72.
4. Rad sa naučno-stručnog skupa (Zbornik radova):
Vivian VL, editor. *Child abuse and neglect: a medical community response*. Proceedings of the first AMA National Conference on Child Abuse and Neglect; 1984 Mar 30-31; Chicago: American Medical Association, 1985.
5. Članak u zborniku radova sa naučno-stručnog skupa:
Vivian VL. *Child abuse and neglect*. In: Gammage RB, Kaye SV, editors. *Indoor air and human health*. Proceedings of the Seventh Life Sciences Symposium; 1984 Oct 29-31; Knoxville (TN). Chelsae (MI): Lewis, 1985:69-78.

NAPOMENA

Rad koji ne ispunjava sve gore navedene uslove neće biti poslat na recenziju i biće vraćen autorima da ga dopune i isprave.

ADRESA ČASOPISA

Veterinarska komora Srbije – Veterinarski glasnik
11000 Beograd
Bulevar oslobođenja 18,
tel/faks 011/ 2684-597, 2687-475;
e-mail: vetks@Eunet.yu