

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Vanja UHAN

**UGOTAVLJANJE KRITIČNIH KONTROLNIH TOČK  
ZA ANALIZO MIKROBIOLOŠKIH TVEGANJ V  
KLAVNICI PERUTNINE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Vanja UHAN

**UGOTAVLJANJE KRITIČNIH KONTROLNIH TOČK ZA ANALIZO  
MIKROBIOLOŠKIH TVEGANJ V KLAVNICI PERUTNINE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF CRITICAL CONTROL POINTS FOR  
MICROBIOLOGICAL RISK ANALYSIS IN THE POULTRY  
SLAUGHTERHOUSE**

GRADUATION THESIS

University Studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen na inštitutu VTT Technical Research Centre of Finland, celotno delo pa je bilo dokončano na Katedri za Biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Biotehniški fakulteti, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija živilske tehnologije je na seji za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina in za recenzenta prof. dr. Janeza Marinška.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzent: prof. dr. Janez Marinšek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultata lastnega raziskovalnega dela.

Vanja Uhan

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

|    |                                                                                                                                                                                                                 |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ŠD | Dn                                                                                                                                                                                                              |
| DK | UDK 614.3+614.97:637.54:658.562(043)=163.6                                                                                                                                                                      |
| KG | nadzor nad živili / kritične kontrolne točke / HACCP / higiena živil / perutninsko meso / klavnice / patogeni mikroorganizmi/ <i>Campylobacter</i> / <i>Salmonella</i> / <i>Listeria monocytogenes</i> / Hygram |
| AV | UHAN, Vanja                                                                                                                                                                                                     |
| SA | SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/MARINŠEK, Janez (recenzent)                                                                                                                                                     |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101                                                                                                                                                                             |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta., Oddelek za živilstvo                                                                                                                                              |
| LI | 2011                                                                                                                                                                                                            |
| IN | UGOTAVLJANJE KRITIČNIH KONTROLNIH TOČK ZA ANALIZO MIKROBIOLOŠKIH TVEGANJ V KLAVNICI PERUTNINE                                                                                                                   |
| TD | Diplomsko delo (Univerzitetni študij)                                                                                                                                                                           |
| OP | X, 64 str., 26 sl., 12 pregl., 68 ref.                                                                                                                                                                          |
| IJ | sl                                                                                                                                                                                                              |
| JI | sl/en                                                                                                                                                                                                           |
| AI |                                                                                                                                                                                                                 |

V dveh slovenskih perutninskih klavnicah smo na podlagi že obstoječega sistema HACCP določili točke vzorčenja. Površine (pred in po čiščenju) smo vzorčili z metodo brisov, kot vzorec izdelka oz. polizdelka pa smo aseptično odvzeli vzorec kože piščanca. Analize vzorcev smo izvajali na Institutu VTT Technical Research Centre of Finland. S pomočjo mikrobioloških analiz smo z uporabo že pripravljenih gojišč (compact Dry TC in Compact Dry EC) ugotovili skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov, število koliformnih mikroorganizmov in število bakterij *E. coli*. Z izolacijo teh skupin mikroorganizmov na nekaterih površinah klavnice po čiščenju smo dokazali pomanjkljivost sanitacijskih postopkov, še posebej v enem od obeh preiskovanih klavniških obratov. Naš cilj je bil določiti tudi prisotnost patogenih bakterij v vzorcih. Osredotočili smo se na detekcijo in izolacijo bakterij vrste *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* in *Salmonella* s standardnimi (ISO) metodami. Bakterije *Campylobacter* smo s standardno kultivacijsko metodo izolirali iz obeh klavnic, rezultate pa potrdili z metodo PCR v realnem času. Prisotnost bakterij *Listeria monocytogenes* smo potrdili v eni od obeh klavnic. Prisotnost bakterij *Salmonella* smo zaznali v zelo nizki koncentraciji le z metodo PCR v eni od obeh klavnic. Dobljene rezultate analiz za patogene mikroorganizme smo obdelali z računalniškim programom Hygram®, ki je bil razvit kot orodje za sistematično analizo tveganja in odkrivanja KKT pri vzpostavljanju sistema varnosti živil. Z grafičnim prikazi smo nekatera izbrana vzorčna mesta potrdili kot kritične kontrolne točke (KKT), nekatera med njimi pa kot kritične točke (KT).

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
 DC UDC 614.3+614.97:637.54:658.562(043)=163.6  
 CX food control / critical control points / HACCP / food hygiene / poultry meat / slaughterhouse / pathogens / *Campylobacter* / *Salmonella* / *Listeria monocytogenes* / Hygram  
 AU UHAN, Vanja  
 AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/MARINŠEK, Janez (reviewer)  
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
 PY 2011  
 TI DETERMINATION OF CRITICAL CONTROL POINTS FOR MICROBIOLOGICAL RISK ANALYSIS IN THE POULTRY SLAUGHTERHOUSE  
 DT Graduation thesis (University studies)  
 NO X, 64 str., 26 fig., 12 tab., 68 ref.  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB

Based on an existing HACCP system we determined the microbiological sampling points in the two Slovenian poultry slaughterhouses. We sampled surfaces (before and after cleaning) with the method of swabing. As a sample of product or halfproduct we aseptically took a sample of the chicken neck skin. All the analysis of samples were preformed at VTT Technical Research Centre of Finland. With microbiological analysis on ready to use plates (Compact Dry TC and Compact Dry EC) we determined the total microbial count and coliform microorganisms with *E. coli*. By isolating of these microorganisms in some areas of the slaughterhouse after cleaning, we confirmed the weaknesses in the cleaning procedures, especially in one of the slaughterhouses, which were examined. Our objective was to identify the presence of pathogenic bacteria in the samples as well. We focused on detection and isolation of *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by the standard ISO methods. We isolated *Campylobacter* from both slaughterhouses with standard cultivation method and confirmed the result by real time PCR method. The presence of *Listeria monocytogenes* has been confirmed by both methods only for the slaughterhouse F1. *Salmonella* was detected in a very low concentration only with real time PCR in slaughterhouse F2. The results obtained for pathogenic microorganisms were processed by a computer programme Hygram<sup>®</sup>, which was developed at VTT for evaluation of risks in food processing. This analysis has confirmed the majority of the analysed sampling points as critical control points (CCPs) by graphic presentation, some others were characterised as control points (CPs).

## KAZALO VSEBINE

|                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....</b>           | <b>IV</b> |
| <b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>                      | <b>V</b>  |
| <b>KAZALO VSEBINE.....</b>                                | <b>VI</b> |
| <b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>                            | <b>IX</b> |
| <b>KAZALO SLIK.....</b>                                   | <b>X</b>  |
| <b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>                          | <b>XI</b> |
| <br>                                                      |           |
| <b>1 UVOD .....</b>                                       | <b>1</b>  |
| 1.1 CILJI NALOGE.....                                     | 2         |
| 1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....                                 | 2         |
| <br>                                                      |           |
| <b>2 PREGLED OBJAV .....</b>                              | <b>3</b>  |
| 2.1 KLAVNICA.....                                         | 3         |
| 2.1.1 Ločevanje čistih in umazanih območij.....           | 3         |
| 2.1.2 Shema proizvodnje .....                             | 4         |
| 2.1.3 Opis proizvodnje .....                              | 5         |
| 2.1.3.1 Sprejem živali v klavnico.....                    | 5         |
| 2.1.3.2 Parilnica .....                                   | 5         |
| 2.1.3.3 Skubilnica .....                                  | 6         |
| 2.1.3.4 Evisceracija.....                                 | 6         |
| 2.1.3.5 Hlajenje .....                                    | 6         |
| 2.2 HACCP .....                                           | 7         |
| 2.2.1 Zgodovina HACCP-a.....                              | 8         |
| 2.2.2 Načela sistema HACCP .....                          | 8         |
| 2.3 KKT .....                                             | 9         |
| 2.3.1 Drevo odločanja KKT .....                           | 10        |
| 2.3.2 KKT v perutninski klavnici: .....                   | 12        |
| 2.4 MIKROORGANIZMI .....                                  | 13        |
| 2.4.1 Skupno število mikroorganizmov.....                 | 14        |
| 2.4.2 Indikatorski mikroorganizmi .....                   | 14        |
| 2.4.2.1 Koliformne bakterije .....                        | 14        |
| 2.4.2.2 Escherichia coli .....                            | 15        |
| 2.4.3 Patogeni mikroorganizmi.....                        | 16        |
| 2.4.3.1 <i>Campylobacter</i> spp. ....                    | 16        |
| 2.4.3.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....               | 18        |
| 2.4.3.3 <i>Salmonella</i> spp. ....                       | 19        |
| 2.5 HYGRAM® .....                                         | 20        |
| 2.5.1 Osnovne informacije v programu HYGRAM® .....        | 21        |
| 2.5.2 Higienški modul in modul tveganja v HYGRAM®-u ..... | 21        |
| 2.5.3 Baza podatkov v programu HYGRAM® .....              | 22        |
| 2.5.4 Prikaz rezultatov v HYGRAM®-u.....                  | 22        |
| <br>                                                      |           |
| <b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>                        | <b>23</b> |
| 3.1 POTEK DELA .....                                      | 23        |
| 3.2 MATERIALI.....                                        | 24        |

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.1 Gojišča.....                                                                                            | 24 |
| 3.2.1.1 Trdna gojišča.....                                                                                    | 24 |
| 3.2.1.2 Tekoča gojišča .....                                                                                  | 24 |
| 3.2.2 Laboratorijski pribor in oprema.....                                                                    | 25 |
| 3.3 METODE.....                                                                                               | 26 |
| 3.3.1 Določitev mest vzorčenja in odvzem vzorcev .....                                                        | 26 |
| 3.3.1.1 Metoda brisov .....                                                                                   | 26 |
| 3.3.1.2 Vzorčenje proizvoda .....                                                                             | 27 |
| 3.3.2 Določanje skupnega števila mikroorganizmov in koliformnih bakterij z <i>E. coli</i> .....               | 27 |
| 3.3.2.1 Izračun mikroorganizmov na površino .....                                                             | 28 |
| 3.3.3 Ugotavljanje prisotnosti patogenih mikroorganizmov.....                                                 | 28 |
| 3.3.3.1 Potrditveni testi .....                                                                               | 28 |
| 3.3.4 PCR v realnem času.....                                                                                 | 31 |
| 3.3.5 Shema detekcije za <i>Campylobacter</i> (VTT – 4377-1).....                                             | 32 |
| 3.3.6 Shema detekcije za <i>Listeria monocytogenes</i> (ISO 11290-1).....                                     | 33 |
| 3.3.7 Shema detekcije za <i>Salmonella</i> spp. (ISO 19250).....                                              | 34 |
| 3.3.8 Vnos podatkov v program Hygram .....                                                                    | 35 |
| 4 REZULTATI .....                                                                                             | 36 |
| 4.1 DOLOČITEV VZORČNIH MEST .....                                                                             | 36 |
| 4.2 DOLOČANJE SKUPNEGA ŠTEVILA MIKROORGANIZMOV IN KOLIFORMNIH MIKROORGANIZMOV Z <i>Escherichia coli</i> ..... | 38 |
| 4.2.1 Rezultat ugotavljanja prisotnosti mikrobioloških indikatorjev snaznosti na proizvodni liniji .....      | 38 |
| 4.2.2 Rezultat ugotavljanja prisotnosti mikrobioloških indikatorjev snaznosti v proizvodnem okolju .....      | 40 |
| 4.3 DOLOČANJE PATOGENIH MIKROORGANIZMOV .....                                                                 | 41 |
| 4.3.1 Patogeni mikroorganizmi na površinah proizvodne linije.....                                             | 41 |
| 4.3.2 Patogeni mikroorganizmi na površinah v proizvodnem okolju .....                                         | 43 |
| 4.3.3 Patogeni mikroorganizmi na proizvodu .....                                                              | 43 |
| 4.4 PRIKAZ REZULTATOV S PROGRAMOM HYGRAM® .....                                                               | 44 |
| 4.4.1 <i>Campylobacter</i> .....                                                                              | 44 |
| 4.4.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....                                                                     | 45 |
| 4.4.3 <i>Salmonella</i> .....                                                                                 | 46 |
| 4.4.4 Celoviti prikaz mikrobiološkega tveganja.....                                                           | 48 |
| 5 RAZPRAVA .....                                                                                              | 49 |
| 5.1 SNAŽNOST.....                                                                                             | 49 |
| 5.1.1 Snažnost na proizvodnji liniji .....                                                                    | 50 |
| 5.1.2 Snažnost v proizvodnem okolju.....                                                                      | 51 |
| 5.2 DOKAZ PATOGENIH MIKROORGANIZMOV .....                                                                     | 51 |
| 5.3 ANALIZA KT, KKT IN DODATNIH VZORČNIH MEST S PROGRAMOM HYGRAM®.....                                        | 53 |
| 6 SKLEPI.....                                                                                                 | 56 |
| 7 POVZETEK .....                                                                                              | 57 |

|                     |           |
|---------------------|-----------|
| <b>8 VIRI.....</b>  | <b>58</b> |
| <b>ZAHVALA.....</b> | <b>64</b> |



## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Preglednica 1: Teoretičen prikaz KKT v perutninski klavnici (Gašperlin in Bem, 2003) .....            | 12 |
| Preglednica 2: Fiziološke lastnosti <i>E. coli</i> (Adamič in sod., 2003; Todar, 2008b). ....         | 15 |
| Preglednica 3: Za <i>E. coli</i> značilne biokemijske reakcije (Jeršek, 2005).....                    | 15 |
| Preglednica 4: Glavne značilnosti kampilobaktrov (Holt in sod., 1994). ....                           | 16 |
| Preglednica 5: Za kampilobaktre značilne biokemijske reakcije (Jeršek, 2005). ....                    | 17 |
| Preglednica 6: Glavne značilnosti listerij (Adamič in sod., 2003; Todar, 2008a). ....                 | 18 |
| Preglednica 7: Za listerijo značilne biokemijske reakcije (Adamič in sod., 2003).....                 | 19 |
| Preglednica 8: Glavne značilnosti salmonel (Adamič in sod., 2003; Holt in sod., 1994). ....           | 19 |
| Preglednica 9: Za salmonelo značilne biokemijske reakcije (Holt in sod., 1994).....                   | 20 |
| Preglednica 10: Seznam uporabljenih trdnih gojišč glede na mikroorganizem.....                        | 24 |
| Preglednica 11: Seznam uporabljenih tekočih gojišč glede na mikroorganizem .....                      | 25 |
| Preglednica 12: Lestvica za ocenjevanje modulov mikrobiološke nevarnosti iz programa<br>Hygram® ..... | 35 |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1: Ločevanje čistih in umazanih območij v perutninski klavnici (Silverstone in Jones, 1992).                                                                                                 | 3  |
| Slika 2: Shematski prikaz postopkov predelave perutnine (Silverstone in Jones, 1992).                                                                                                              | 4  |
| Slika 3: Drevo odločanja KKT (FDA, 1997).                                                                                                                                                          | 11 |
| Slika 4: Analiza tveganja in kritične točke v perutninski klavnici (Interno gradivo podjetja F2)                                                                                                   | 13 |
| Slika 5: Zgradba programa Hygram(a) in elementi, ki so vključeni v mikrobiološko oceno tveganja (b) (Tuominen, 2008).                                                                              | 21 |
| Slika 6: Shema poteka eksperimentalnega dela                                                                                                                                                       | 23 |
| Slika 7: Plošča Compact Dry za skupno število mikroorganizmov in za koliformne z <i>E. coli</i>                                                                                                    | 27 |
| Slika 9: Primer ploščice za Api test                                                                                                                                                               | 30 |
| Slika 8: Primer vpisovanja rezultatov na list                                                                                                                                                      | 1  |
| Slika 10: Prikaz detekcije za bakterijo <i>Campylobacter</i> (VTT – 4377-1, 1991).                                                                                                                 | 32 |
| Slika 11: Prikaz detekcije za bakterijo <i>Listeria monocytogenes</i> (ISO 11290-1, 1996).                                                                                                         | 33 |
| Slika 12: Prikaz detekcije bakterije <i>Salmonella</i> spp. (ISO 19250, 2010).                                                                                                                     | 34 |
| Slika 13: Oznake vzorčnih mest in vzorcev s proizvodne linije v obeh klavnicah.                                                                                                                    | 36 |
| Slika 14: Oznake vzorčnih mest in odvzetih vzorcev iz proizvodnega okolja v obeh klavnicah (modre so dodatne točke, ki so nas zanimale)                                                            | 37 |
| Slika 15: Oznake vzorčnega mesta in vzorcev proizvoda v obeh klavnicah                                                                                                                             | 37 |
| Slika 16: Grafični prikaz skupnega števila mikroorganizmov log (CFU/cm <sup>2</sup> ) pred in po sanitaciji med podjetji F1 in F2 (logaritemska skala) za vzorce brisov proizvodne linije klavnice | 38 |
| Slika 17: Grafični prikaz skupnega števila mikroorganizmov, koliformnih mikroorganizmov in <i>E. coli</i> med klavnicama podjetij F1 in F2                                                         | 39 |
| Slika 18: Primerjava skupnega števila mikroorganizmov, koliformnih mo. in <i>E. coli</i> med klavnicama podjetij F1 in F2                                                                          | 40 |
| Slika 19: Shematičen prikaz rezultata ugotavljanja prisotnosti patogenih m.o. na koži z vratu piščancev                                                                                            | 1  |
| Slika 20: Verjetnost in resnost okužbe z bakterijo <i>Campylobacter</i> v procesu podjetja F1                                                                                                      | 44 |
| Slika 21: Verjetnost in resnost kontaminacije z bakterijo <i>Campylobacter</i> v procesu podjetja F2                                                                                               | 45 |
| Slika 22: Verjetnost in resnost kontaminacije z bakterijo <i>Listeria monocytogenes</i> v procesu podjetja F1                                                                                      | 45 |
| Slika 23: Verjetnost in resnost kontaminacije z bakterijo <i>Listeria monocytogenes</i> v procesu podjetja F2                                                                                      | 46 |
| Slika 24: Verjetnost in resnost kontaminacije z bakterijo <i>Salmonella</i> v procesu podjetja F1                                                                                                  | 47 |
| Slika 25: Verjetnost in resnost kontaminacije z bakterijo <i>Salmonella</i> v procesu podjetja F2                                                                                                  | 47 |
| Slika 26: Celotno mikrobiološko tveganje v klavnici podjetja F1                                                                                                                                    | 48 |

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

|                   |                                                                                               |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| $a_w$             | vodna aktivnost (ang. water activity)                                                         |
| BGA               | gojišče (ang. Brilliant Green Agar)                                                           |
| BPW               | pufer (ang. Buffered Peptone Water)                                                           |
| CFU               | število mikroorganizmov, ki so sposobni tvoriti kolonije (ang. Colony Forming Units)          |
| CSA               | gojišče (ang. Campylobacter Selective Agar)                                                   |
| dH <sub>2</sub> O | destilirana voda                                                                              |
| F1                | oznaka za prvo podjetje, kjer smo opravili vzorčenje                                          |
| F2                | oznaka za drugo podjetje, kjer smo opravili vzorčenje                                         |
| GMP               | dobra proizvodna praksa (ang. Good Manufacturing Practice)                                    |
| HACCP             | sistem analize kritičnih kontrolnih točk (ang. Hazard Analysis Critical Control Point System) |
| ISO               | Mednarodna organizacija za standardizacijo (ang. International Standard Organization)         |
| KKT               | kritična kontrolna točka                                                                      |
| LMBA              | gojišče ( <i>Listeria monocytogenes</i> Blood Agar)                                           |
| MKTTn BROTH       | pufer (ang. Mueller-Kaufmann Tetrathionate Novobiocin Broth)                                  |
| NaCl              | natrijev klorid                                                                               |
| PCR               | verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)                                |
| PS                | pufer (ang. Peptone Saline)                                                                   |
| RVS BROTH         | pufer (ang. Rappaport-Vassiliadis R10 Broth)                                                  |
| TQM               | niz postopkov, ki predstavljajo celovito vodenje kakovosti (ang. Total Quality Management)    |
| TSA               | gojišče (ang. Trypticase Soy Agar)                                                            |
| VTEC              | verotoksigene <i>E. coli</i>                                                                  |
| XLD               | gojišče (ang. Xylose Lysine Desoxycholate Agar)                                               |
| M                 | mejna vrednost, pod katero so rezultati zadovoljivi                                           |
| M                 | mejna vrednost, nad katero rezultati niso zadovoljivi                                         |

## 1 UVOD

Poraba perutnine, zlasti piščančjega mesa, v prehrani strmo narašča, saj je zanjo značilna nižja vsebnost maščob, lahka prebavljivost, enostavna priprava ter cenovna dostopnost. Ta vrsta mesa je zelo priljubljena tudi v rizični skupini, v katero spadajo otroci, starejši in bolniki. Ravno zaradi tega moramo biti še toliko bolj pazljivi glede mikrobiološke neoporečnosti.

*Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* in *Salmonella* spp. so patogeni mikroorganizmi, ki pogosto naseljujejo piščančje meso in povzročajo okužbe in obolenja s hrano. Vse te s hrano prenosljive patogene bakterije lahko uspevajo v gastrointestinalnem traktu živali, ki vstopajo v našo prehranjevalno verigo. Najbolj pogosto zaporedje dogodkov, ki vodi do okužbe z mesom, vključuje zdrave živali, ki so prenašalci patogenih mikroorganizmov. Mikroorganizmi pa pridejo v stik s človekom prek produkcije, rokovanja in zaužitja mesa in mesnih izdelkov (Nørrung in Bunčič, 2008).

Okužbe in zastrupitve z živili so pomemben javnozdravstveni in ekonomski problem v številnih državah. Način prehranjevanja, masovna priprava obrokov in prodaja delno ali v celoti pripravljene hrane prispevajo k temu, da se tveganje za pojav okužbe in/ali zastrupitve s hrano povečuje. Zato je pomembno, da že v začetnih fazah pridelave in obdelave živil vršimo nadzor proizvodnje s sistemom HACCP, ki se je s svojimi sedmimi načeli izkazal kot najprimernejše orodje za zagotavljanje varnosti izdelkov.

Načela sistema HACCP vključujejo: izvedbo analize tveganj, določitev KKT, vzpostavitev mejnih vrednosti, vzpostavitev sistema nadzora, obvladovanja in spremljanja KKT, vzpostavitev korektnih ukrepov, kadar nadzor pokaže, da KKT ni pod kontrolo, vzpostavitev postopkov verifikacije, ki dokazujejo, da je sistem HACCP učinkovit in validiran in vzpostavitev dokumentacije vseh procesov in dokumentov, primernih tem načelom in njihovi aplikaciji, vključno s posodabljanjem (FDA, 1997).

Program Hygram® je bil razvit za manjša in srednje velika živilska podjetja, kot pripomoček k razumevanju, usposabljanju, predvsem pa odkrivanju kritičnih faz v proizvodnem procesu. S tem pa prispeva k razvoju njihovih lastnih sistemov preverjenja tveganja pri upravljanju z živili. Hygram® se lahko uporablja kot orodje za oceno tveganja, s tem da so v oceni tveganja kritične meje procesa opredeljene kot med seboj enako pomembne. Služi pa lahko tudi kot orodje za sistematično analizo tveganja in odkrivanja KKT pri vzpostavljanju sistema varnosti živil.

## 1.1 CILJI NALOGE

Prvi cilj diplomskega dela je bil določitev vzorčnih mest v perutninski klavnici. Te smo določili iz že obstoječih kritičnih točk in kritičnih kontrolnih točk ter nekaterih novih predvidoma kritičnih točk. V teh točkah smo opravili mikrobiološko vzorčenje obrata, pred in po sanitaciji, in jih mikrobiološko analizirali z namenom:

- ugotoviti prisotnost indikatorskih organizmov (skupno število mikroorganizmov in koliformni mikroorganizmi z bakterijo *Escherichia coli*);
- ugotoviti prisotnost patogenih mikroorganizmov: termotolerantni *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* in *Salmonella* (na osnovi standardizirane ISO metode in molekularne identifikacije na osnovi PCR v realnem času);
- rezultate mikrobioloških analiz obdelati s programom Hygram® in ugotoviti kritične kontrolne točke za analizo mikrobioloških tveganj.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Na podlagi podatkov iz podjetij smo pričakovali:

- da bodo rezultati mikrobiološke analize potrdili prisotnost indikatorskih mikroorganizmov v vzorcih, odvzetih pred in po sanitaciji;
- da bomo v vzorcih iz klavnice dokazali patogene mikroorganizme (*Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*);
- da bo obdelava dobljenih podatkov s programom Hygram® potrdila kritične kontrolne točke.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 KLAVNICA

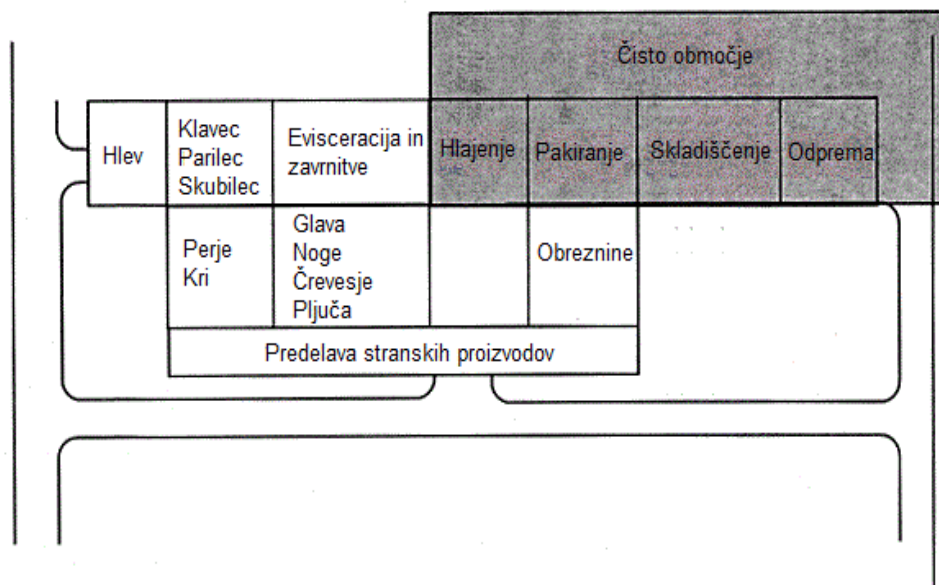
Klavnica je stavba oziroma prostor za klanje živali (SSKJ, 2000).

Za klavnico je pomembno, da so čisti postopki ločeni od umazanih in se izvajajo v za to pripravljenih prostorih. To pomeni, da so v klavnici za perutnino ločeni prostori ali mesta, potrebna za:

- prevzem perutnine,
- omamljanje, klanje, skubljenje,
- evisceracijo, pranje in predelavo drobovine,
- hlajenje,
- rezanje, pakiranje,
- zamrzovanje in skladiščenje,
- odpremo.

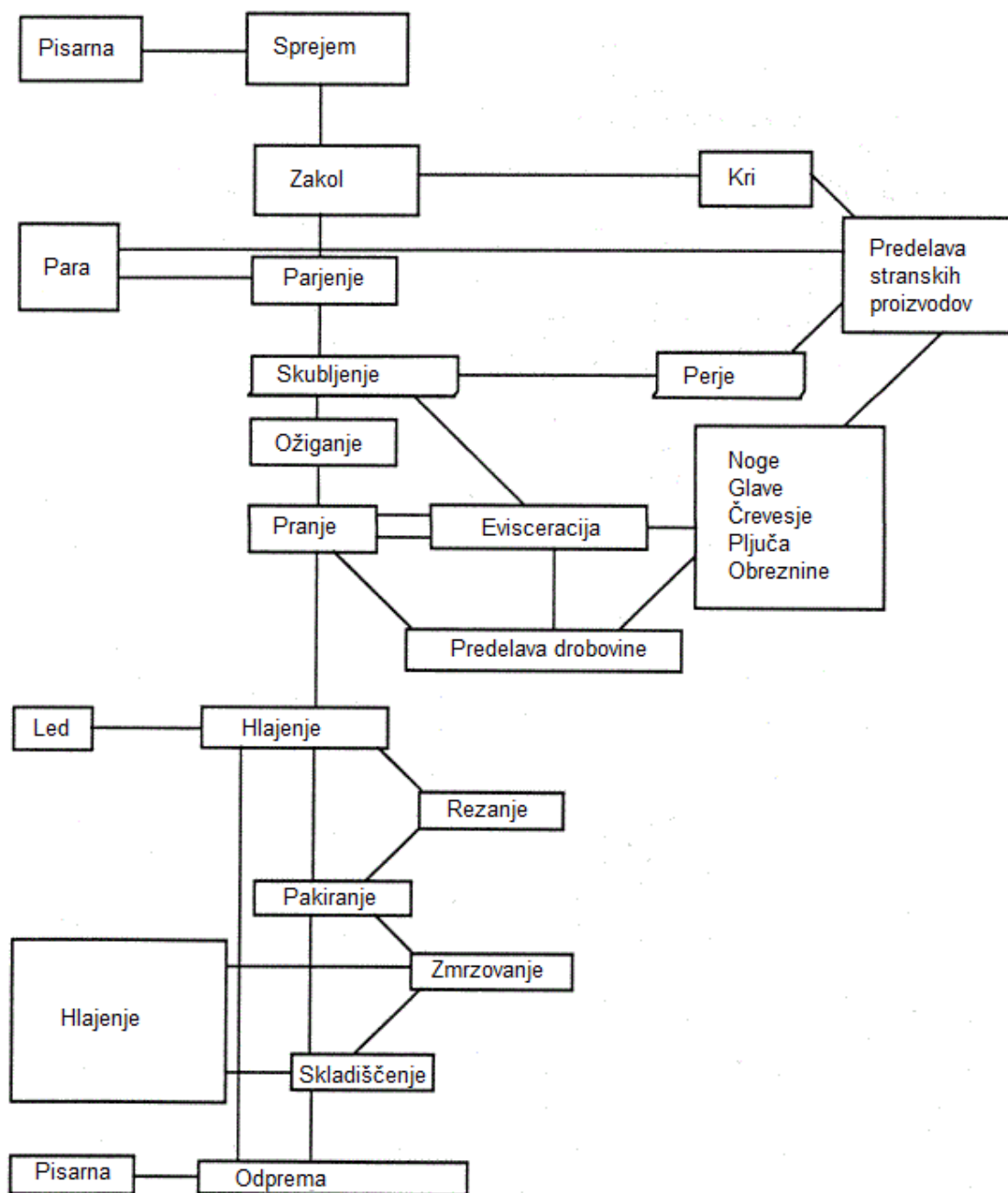
#### 2.1.1 Ločevanje čistih in umazanih območij

Ločevanje čistih in umazanih površin je prikazano na spodnji sliki.



Slika 1: Ločevanje čistih in umazanih območij v perutninski klavnici (Silverside in Jones, 1992).

### 2.1.2 Shema proizvodnje



Slika 2: Shematski prikaz postopkov predelave perutnine (Silverside in Jones, 1992).

## 2.1.3 Opis proizvodnje

### 2.1.3.1 Sprejem živali v klavnico

Po 69. členu Pravilnika o veterinarsko-sanitarnih pogojih za proizvodnjo živil živalskega izvora ter oddajo v promet za javno potrošnjo je potrebno imeti v klavnici prostor z rampo ali pokrito mesto za sprejem in razkladanje. Na rampi za razkladanje mora biti tudi prostor za veterinarsko-sanitarni pregled perutnine, dovod tople in hladne vode ter naprava za umivanje rok. Omogočena mora biti ločitev perutnine, za katero obstaja sum prenosljivih bolezni, v posebnih prostorih in prisotnost kontejnerjev za poginulo perutnino. Kletke, v katerih se transportira perutnina, je potrebno po vsakem praznjenju temeljito oprati in razkužiti (Pravilnik o veterinarsko-sanitarnih pogojih ..., 1999). Zagotovljen mora biti tudi dostop do opreme in možnost, da se lahko ptice neposredno pred zakolom obesijo na lince na tekočem traku (Silverside in Jones, 1992).

Prehod, skozi katerega prihaja obešena perutnina v klavni prostor, mora biti velik le toliko, da je prehod klavne živali možen, s čimer se delno omeji tudi vnos insektov v klavni prostor, čemur pripomore tudi tok zraka, ki mora iti skozi odprtino od prostora za omamljanje v prostor za obešanje perutnine (Pravilnik o veterinarsko-sanitarnih pogojih..., 1999).

Klavni prostor je najbolj umazan del klavnice, saj tu potekajo omamljanje, klanje, parjenje in skubljenje. Vsebuje prhutajoče ptice, umazanijo, blato ter žuželke, ki jih te prinesejo, cisterne za parjenje, skubilnike z gumijastimi prsti za odstranjevanje perja. Zato je jasno, da mora biti ta prostor, oprema in osebje v njem ločen od ostalih (Silverside in Jones, 1992). Perutnina gre tako v klavnem prostoru najprej na omamljanje, nato pa se znajde pred klavcem, ki ji odreže glave. Sledi izkrvavitev; kri se lovi v posodo, trupi pa potujejo naprej na parjenje.

### 2.1.3.2 Parilnica

Trupi piščancev se poparjajo v pretočnem bazenu, katerega velikost in velikost naprave za parjenje mora ustrezati zmogljivosti klavne in obdelovalne linije za perutnino. Bazen in naprava morata imeti termometre za kontrolo temperature ter sisteme za odvod pare (Pravilnik o veterinarsko-sanitarnih pogojih..., 1999). Parjenje je proces, pri katerem je ptica za kratek čas izpostavljena vlažni toploti, z namenom, da se olajša odstranjevanje perja in zrahlja dlačice (Arvanitoyannis in Varzakas., 2009). Parjenje perutnine poteka pri temperaturi med 50 in 55 °C ali pri 55 do 60 °C. Pri temperaturah nad 60 °C se doseže lažje odstranjevanje perja in učinkovitejše zmanjšanje števila mikroorganizmov na površini trupov. Visoka temperatura pa tudi poškoduje epidermis kože, na katerega se bakterije nato lažje pritrdijo in prodirajo v globino tkiva. Taka perutnina je potem neprimerna za prodajo v svežem stanju (Weise, 1996).

Ko so ptice potopljene v uparjalni tank, se nekaj umazanije, fekalnega materiala in drugih onesnaževal na površini ptic odstrani in onesnaži vodo za uparjanje, zato uparjanje lahko pomeni možnost navzkrižne kontaminacije (Yang in sod., 2001).



### 2.1.3.3 Skubilnica

Skubljenje je z mikrobiološkega vidika ena od najbolj kritičnih faz tehnološkega procesa, še posebno kar zadeva navzkrižno kontaminacijo perutninskih trupov s patogenimi mikroorganizmi, kot so *Campylobacter*, *Salmonella* in *E. coli* (Arvanitoyannis in Varzakas, 2009). Do kontaminacije piščančjih trupov lahko pride:

- prek neposrednega stika med okuženimi in neokuženimi trupi;
- prek stiskanja trupov, kar povzroči iztekanje fekalnih snovi iz črevesja in s tem kontaminacijo površine trupa;
- prek mehanskih prstov;
- prek kontaminiranih peres, ki ostajajo v skubilcu.

Na gumijastih nastavkih, ki jih vsebuje naprava za mehansko skubljenje, se zaradi obrabe naredijo razpoke, v katerih se nalagajo mikroorganizmi, ki se tam zadržujejo. Oskubljeno perje je treba med delom po kanalih ali na drug ustrezen način odstranjevati iz skubilca, ter ga transportirati v poseben prostor za zbiranje perja. Ta mora imeti opremo za odcejanje in sušenja perja, dovod hladne in tople vode, drenažni in kanalizacijski sistem, ter ustrezen prezračevalni sistem (Pravilnik o veterinarsko-sanitarnih pogojih..., 1999). Skubljenju sledi spiranje s hladno vodo v prostoru, ki ima ustrezna odcejala (Silverstone in Jones, 1992).

Prostor, v katerem poteka nadaljnja obdelava trupov perutnine - evisceracija, mora biti ločen in samo z odprtino za prehod tekočega traku, povezan z nečistim delom. Prostor mora biti dovolj velik, da so postopki evisceracije ločeni od ostalih opravil, da se prepreči kontaminacija (Pravilnik o veterinarsko-sanitarnih pogojih..., 1999).

### 2.1.3.4 Evisceracija

Evisceracija zajema izsek področja okoli kloake, izvleke notranjih organov in njihovo odstranjevanje iz trupa (Weise, 1996). To pomeni, da se odstrani material, ki vsebuje veliko število mikroorganizmov, ki lahko povzročijo kontaminacijo trupa in posledično zmanjšanje roka uporabnosti (Silverstone in Jones, 1992). V velikih obratih poteka evisceracija avtomatsko, za uspešen potek pa je potrebno predhodno kalibriranje trupov, sicer lahko pride do nepopolne evisceracije, kjer pride do raztrganja črev in posledično do kontaminacije trupov s črevno vsebino. Za zmanjšanje kontaminacije se je kot najbolj učinkovito izkazalo tuširanje med celotnim postopkom evisceracije (Weise, 1996). Takoj po končani evisceraciji je potrebno trupe zaklane perutnine od zunaj in od znotraj dobro oprati s hladno pitno vodo pod pritiskom (Pravilnik o veterinarsko-sanitarnih pogojih..., 1999).

### 2.1.3.5 Hlajenje

Obstaja več postopkov hlajenja eviscerirane perutnine: hlajenje z zrakom, tuširanje in potapljanje. Slednji postopek hlajenja se je izkazal za najpogostejši vir kontaminacije in se zato v Nemčiji že dolgo let ne uporablja več (Weise, 1996). Kot alternativna metoda hlajenja trupov se uporablja hlajenje na zraku z umetnim preprihom, približno 1 m/s, nato pa s pršenjem s hladno vodo ohladijo trupe na 2-4 °C (Silverstone in Jones, 1992). Trupe je dovoljeno hladiti s pitno vodo v bazenih iz nerjavečega materiala, ki imajo urejen pretočni sistem za dovod hladne vode in posredni odvod v kanalizacijo (Pravilnik o veterinarsko-

sanitarnih pogojih..., 1999). Dovoljeni so postopki hlajenja v toku zraka ali s prhanjem s pitno vodo. Središčna temperatura mesa po hlajenju mora biti 4 °C (Weise, 1996). Po hlajenju gredo trupi v skladišče ali v pakirnico, kjer poteka nadaljnja obdelava.

## 2.2 HACCP

Potrošnikovemu zdravju se posveča vse več skrbi, kar pa posledično vodi v vedno nove zahteve za proizvajalce živil (hrana mora biti naravna, varna, zdrava in varovalna). Proizvajalci lahko vse te zahteve potrošnikov izpolnijo z nizom postopkov, ki jih označujemo kot TQM (ang. Total Quality Management) ali celovito vodenje kakovosti. TQM je zbirka vodil, izboljšav in metod za boljšo organizacijo in kakovost proizvodnje, katerega najpomembnejši element je učinkovit in aktiven nadzorni sistem (Marčič in Vidovič, 2002). Tak sistem je HACCP (ang. Hazard Analysis Critical Control Point), ki se širom sveta smatra za primerno orodje za samonadzor, saj je usmerjen pristop k prepoznavanju in nadzorovanju točk oz. faz, ki so bistvene za zagotavljanje varnosti v agro-živilski verigi (Eschriche in sod., 2006).

Nevarnost se smatra kot biološki, kemijski ali fizikalni dejavnik v hrani, ali samo stanje hrane, ki lahko povzroči neželeni učinek na zdravje (FAO, 1997).

Slovenska zakonodaja ločuje uradni zdravstveni nadzor nad proizvodnjo in prometom z živili živalskega izvora, ki ga opravlja veterinarska uprava in nadzor ostalih živil, nad katerimi nadzor vrši zdravstvena inšpekcija. Postavitev sistema HACCP pa je zakonsko predpisana za vse proizvajalce. (Ur.l. RS 52/99 in (Pravilnik o veterinarsko-sanitarnih pogojih..., 1999).

HACCP je le orodje in ni namenjen, da bi bil samostojen program. Za njegovo učinkovitost so potrebna še druga orodja, ki vključujejo upoštevanje dobre proizvodne prakse (GMP), uporabo standardnih sanitarnih operativnih postopkov in programov za osebno higieno (Rushing in Ward, 1999). Uporaba HACCP-a je združljiva z izvajanjem sistemov vodenja kakovosti, kot so serije ISO 9000 in je sistem izbire pri upravljanju varnosti hrane v teh sistemih (ICMR Bulletin, 2000). HACCP identificira in nadzira vsa pomembna tveganja, povezana z določenim proizvodom (Goodrich in sod., 2008).

Postopki HACCP-a morajo biti dokumentirani v vsakem trenutku. Vodenje evidence je nujno za zagotavljanje dokumentacije sistema HACCP in za preverjanje pravilnega delovanja sistema. Dokumentacija in primeri hranjenja zapisov so opisani v temeljni publikaciji (ang. Codex Alimentarius) (Codex Alimentarius, 1997).

Za uspešno izvajanje HACCP-a v živilsko oskrbovalnem sistemu bi se morali odgovorni za varnost živil najprej zavedati potrebe prehoda na sistem, kakršen je HACCP. Dokler te potrebe ne bodo prepoznali, so pričakovanja po zavezi na vseh ravneh malo verjetna.

Motivacija za uvedbo sistema HACCP so dejstva, da se s tem:

- zmanjša pojav s hrano prenosljivih bolezni,
- zagotovi varno oskrbo s hrano,
- spodbuja trgovino z živili (Arvanitoyannis in Kassaveti., 2009).

### 2.2.1 Zgodovina HACCP-a

Nedavna rast zaskrbljenosti glede varnosti živil po vsem svetu med organi javnega zdravstva, potrošniki in ostalimi zainteresiranimi, ki jo poganjajo stalna poročila o izbruhih s hrano povezanih bolezni, so bile pomembna spodbuda za oblikovanje sistema HACCP (Arvanitoyannis in Kassaveti, 2009).

Uporaba sistema HACCP za proizvodnjo hrane se je razvila v šestdesetih letih prejšnjega stoletja. Podjetje Pillsbury je s sodelovanjem nacionalne aeronavtične vesoljske organizacije (NASA) in vojaških laboratorijev ZDA ustvarilo HACCP za zagotavljanje varnosti živil, ki bi jih astronauti uživali v vesolju. NASA je želela zagotoviti sistem brez tveganja glede kontaminacij z bakterijskimi in virusnimi patogeni, toksini in kemijskimi ali fizičnimi nevarnostmi, ki bi lahko povzročile bolezen ali poškodbe.

Do tedaj se je uporabljal sistem, ki je temeljil na pregledovanju končnega produkta. Postalo je jasno, da bo potrebno ta sistem nadgraditi s sistemom preventivne kontrole že med proizvodnjo. Taka kontrola procesa bi zagotavljala visoko zaupanje v končni proizvod (Martimore in Wallace, 1998).

Leta 2004 je bila sprejeta zahteva, v uredbi Evropskega odbora Št. 852/2004, za vsa živilska podjetja v EU, sprejeti izvajanje vseh načel sistema HACCP (Corrigendum to Regulation..., 2004).

### 2.2.2 Načela sistema HACCP

Sistem HACCP je sestavljen iz sedmih načel, ki opisujejo kako vzpostaviti, izvajati in vzdrževati načrt HACCP za pravilno delovanje.

Načela HACCP so mednarodno priznana, podrobnosti tega pristopa so bile objavljene s strani Codex Alimentarius Commission (Codex Alimentarius, 1997) in s strani National Advisory Committee on Microbiological Criteria of Foods (NACMCF, 1992, 1997).

#### 1. Načelo: Analiza tveganj

Analiza nevarnosti je prepoznavanje nevarnih bioloških, kemijskih ali fizikalnih lastnosti v surovinah in predelovalnih postopkih, ter ocena verjetnosti pojava teh nevarnosti in njihovega potenciala, da povzročijo, da hrana ni varna za uživanje (USDA, 1997). Opredelimo vsa možna tveganja tekom celotnega procesa (od vhodnih surovin, do končnega produkta), ki bi lahko ogrožala varnost končnega proizvoda (Martimore in Wallace, 1998).

#### 2. Načelo: Določitev kritičnih kontrolnih točk (KKT)

Ko so opisana vsa tveganja (in nadzorni ukrepi), se vzpostavi točke, kjer je nadzor za zagotovitev varnosti produkta kritičen (Martimore in Wallace, 1998). KKT so koraki v procesu, kjer se lahko izvede kontrola in je tveganja za varnost živil možno preprečiti, odpraviti ali zmanjšati na sprejemljivo raven (Rushing in Ward, 1999).

3. Načelo: Vzpostavitev kritičnih meja za nadzorne ukrepe, povezane z vsako ugotovljeno KKT. Kritične meje v KKT opisujejo razlike med varnim produktom in produktom, ki to ni. Vključevati morajo merljive parametre.

4. Načelo: Vzpostavitev učinkovitega sistema za nadzor KKT

Določiti moramo zahteve za spremljanje KKT znotraj njihovih kritičnih meja. Postopki nadzora se morajo glede na rezultate spreminjanja prilagoditi procesu in vzdrževati nadzorovanje KKT.

5. Načelo: Vzpostavitev popravljivih ukrepov, ki se sprejmejo, ko spremljanje pokaže, da določena KKT ni pod nadzorom

Določiti je potrebno popravljalne ukrepe in odgovornost za njihovo izvajanje. To načelo vključuje procese, ki vrnejo proces nazaj pod nadzor in ukrepe v zvezi z izdelkom, ki je bil izdelan, ko je bil proces izven nadzora.

6. Načelo: Uvedba postopkov za preverjanje, ki potrdijo, da sistem HACCP pravilno deluje

Postopki preverjanja morajo biti razviti, da vzdržujejo sistem HACCP in zagotavljajo, da še naprej učinkovito deluje.

7. Načelo: Vzpostavitev dokumentacije o vseh postopkih in evidenca vseh načel in njihove uporabe

Voditi se mora evidenca, ki dokazuje, da je sistem HACCP pod nadzorom in da so bili, za kakšen koli odklon od kritičnih meja, sprejeti ustrezni popravljalni ukrepi (Martimore in Wallace 1998).

## 2.3 KKT

Kritična kontrolna točka je stopnja v procesu, kjer se lahko izvede kontrola in je bistvenega pomena za preprečitev ali odpravo tveganja za varnost hrane, ali pa to tveganje zmanjša na sprejemljivo raven (Arvanitoyannis, Kassaveti, 2009).

KKT predstavljajo skelet vsakega dobrega sistema HACCP. Vso pozornost je treba posvetiti temu, kako jih postaviti, preveriti, verificirati in spremljati ter povratno uporabljati pridobljene informacije za vodenje sistema na visokem strokovnem nivoju (Raspor, 2003).

Kritične kontrolne točke (KKT) so točke, kjer je nujen neprekinjen nadzor za odpravo ali zmanjšanje nevarnosti na sprejemljiv nivo. Ko je nadzor nad temi točkami izgubljen, se pojavi visoka verjetnost, da so izdelki tvegani za uporabo ali niso dobre kakovosti, ali je učinek določenih nevarnosti resen. Točke, ki niso nadzorovane enkrat mesečno, niso KKT (Eschriche in sod., 2006).

Pod KKT se razume le tiste korake, točke ali postopke, kjer pomanjkanje nadzora privede do nesprejemljivega tveganja za zdravje potrošnika in kjer je s konkretnimi ukrepi možen učinkovit in hiter nadzor. Ostale točke, kjer izguba nadzora ne privede do nesprejemljivega tveganja za zdravje potrošnika in kjer se ne zgodi takojšnja prilagoditev izdelka, se smatra za kontrolne točke (KT) (Escriche in sod., 2006).

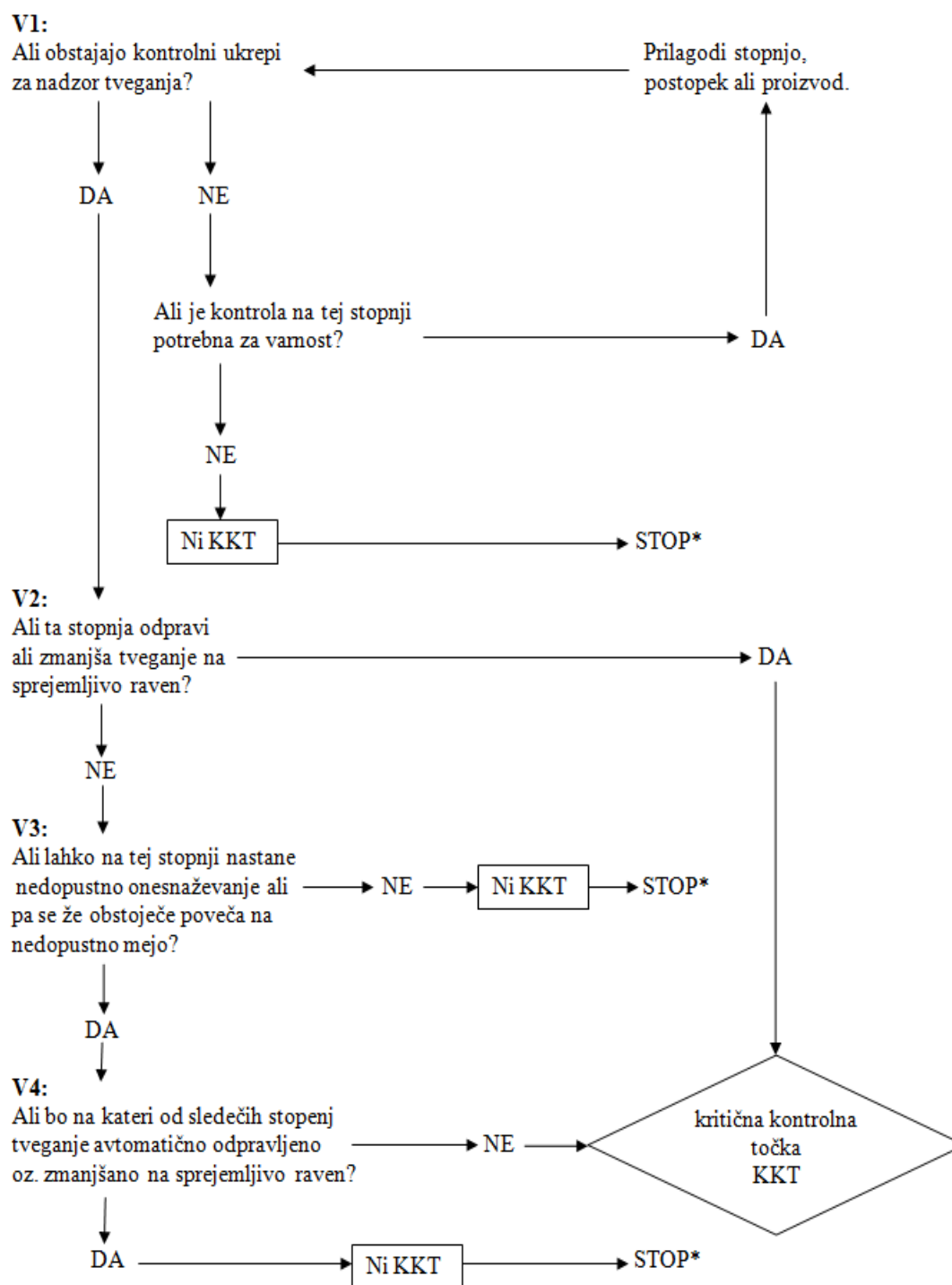
Podjetje se lahko odloči, da navede KKT kot vsako točko, postopek ali fazo procesa, ki vpliva na nekatere nevarnosti. To pa je smiselno le v primeru, če je podjetje sposobno nadzirati vsako točko, kar v večini primerov ni mogoče. Poleg tega so v takem sistemu najpomembnejše KKT slabo nadzorovane. Prav zaradi kompleksnega nadzora ob prevelikem številu KKT naj bi bilo število omejeno le na 5-10 (Escriche in sod., 2006).

Različna podjetja, ki izdelujejo enake produkte, se lahko razlikujejo glede KKT, vendar so nekatere KKT skupne. Bistveno za KKT pa je dejstvo, da so to tista mesta v tehnološkem postopku, kjer če pride do napake, jo nadaljnji tehnološki postopek avtomatsko ne odpravi. Med te spadajo pasterizacija in ostali ukrepi, ki uničijo mikroorganizme, kontrola pH, detekcija kovin, filtriranje, čiščenje steklene embalaže, polnilna temperatura, čas hlajenja, X-žarki (Lopez, 2004).

### **2.3.1 Drevo odločanja KKT**

Eno od razpoložljivih orodij za lažje določanje KKT je drevo odločanja (slika 3). To orodje je bilo razvito leta 1992 s strani Nacionalnega svetovnega odbora o mikrobioloških merilih za živila (NACMCF, 1992).

Drevo odločanja KKT sestavlja niz vprašanj, na katera je mogoče odgovoriti z "Da" ali "Ne". Vprašanja so namenjena za pomoč pri identifikaciji zadnjega koraka na katerem se lahko uporabljajo preventivni kontrolni ukrepi, za odpravo ali zmanjšanje predhodno ugotovljene nevarnosti. Pred uporabo odločitvenega drevesa KKT je potrebno identificirati nevarnosti, ki so povezane s procesom. Odločitveno drevo bo potem pomagalo pri opredelitvi kontrolnih procesov za ugotovljeno nevarnost (Lopez, 2004).



Slika 3: Drevo odločanja KKT (FDA, 1997)

### 2.3.2 KKT v perutninski klavnici:

Preglednica 1: Teoretičen prikaz KKT v perutninski klavnici (Gašperlin in Bem, 2003)

| KKT                    | Kontrola na KKT                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Parjenje</b>        | Kontroliramo temperaturo in vizualno onesnaženost vode.                                                                                                                                                           |
| <b>Skubljenje</b>      | Pri procesu odstranjevanja perja vršimo kontrolo skupnega števila bakterij, števila enterobakterij in število koagulaza pozitivnih stafilokokov v samem stroju in tudi v aerosolu in na koži po končanem procesu. |
| <b>Evisceracija</b>    | Po končani evisceraciji kontroliramo skupno število bakterij, število enterobakterij in število nepravilno evisceriranih trupov s poškodovanim črevesjem.                                                         |
| <b>Hlajenje trupov</b> | Pri hlajenju trupov poteka stroga kontrola temperature.                                                                                                                                                           |

Spodnja shema analize tveganj je povzeta in prirejena po tabelah analize tveganj na procesnih linijah obeh klavnih obratov. Vsak korak v proizvodni liniji predstavlja potencialni tveganje za biološko (B), fizikalno (F) ali kemijsko (K) kontaminacijo.

Najpomembnejši parameter pri vzdrževanju higienskih razmer v perutninsko predelovalnih obratih je temperatura. Nepravilno uravnavanje temperature lahko povzroči velike težave glede varnosti in kakovosti končnega produkta. Piščančje trupe je potrebno čimprej ohladiti, da onemogočimo rast in razmnoževanje mikroorganizmov na površini. To lahko storimo z uporabo zračnega hlajenja ali hlajenja s potapljanjem. Hladilni sistemi morajo biti zasnovani tako, da se končna želena temperatura ohlajenega trupa doseže v času izstopa trupa iz hladilne naprave (Codex Alimentarius Commission, 2010).

Vse naprave za obdelavo zaklane perutnine in same proizvodne površine morajo imeti gladke površine iz nerjavečega materiala, odpornega na čistila. Konstruirane morajo biti tako, da se jih zlahka pomiva in sanira, torej brez tako imenovanih mrtvih kotov, kjer bi se lahko nabirala umazanija in se posledično tvorili biofilmi. Vršiti se mora stalen nadzor nad pitno vodo, ki se uporablja v proizvodnji, odpadna voda pa ne sme škropiti po okolici (Pravilnik o veterinarsko-sanitarnih pogojih..., 1999).

| PREPOZNANO TVEGANJE na PROCESNILINJI  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | KT in KKT |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>SPREJEM ŽIVALI</b>                 | B: prihod bolnih živali v klavnico<br>K: ostanki zdravil ali ostanki pesticidov (krma) v živalih                                                                                                                                                                                                                            | 1.KT      |
| <b>OBEŠANJE</b>                       | F: mehanske poškodbe živali, lomljenje kosti, ostanki delcev kosti v mišicah                                                                                                                                                                                                                                                |           |
| <b>OMAMLJANJE</b>                     | F: mehanske poškodbe živali, lomljenje kosti, ostanki delcev kosti v mišicah zaradi neučinkovitega omamljanja                                                                                                                                                                                                               |           |
| <b>ZAKOL</b>                          | B: kontaminacija s patogenimi MO preko noža za zakol iz kože trupov.<br>F: zastajanje odkrušenih delcev noža za zakol v trupu                                                                                                                                                                                               |           |
| <b>IZKRVAVITEV</b>                    | B: zastajanje krvi v tkivih živali, kontaminacija mesa pri razkosanju                                                                                                                                                                                                                                                       |           |
| <b>PARJENJE</b>                       | F: poškodbe vrhnjih slojev kože in mišičnine zaradi previsoke T parjenja ali neučinkovito parjenje zaradi prenizke T parjenja, ostanek perja na trupih v naslednjih fazah                                                                                                                                                   | 2.KT      |
| <b>SKUBLJENJE</b>                     | F: poškodbe vrhnjih slojev kože, mišičnine, ostanek perja na trupih zaradi nepravilne nastavitve skubilnika ali poškodovanih/obrabljenih prstov skubilnika                                                                                                                                                                  |           |
| <b>ODSTRANITEV GLAV, TRAHEJ</b>       | F: možnost poškodbe vratnega dela in prsi zaradi nepravilne nastavitve stroja                                                                                                                                                                                                                                               |           |
| <b>STROJNO ODPIRANJE TRUPA</b>        | F: mehanske poškodbe trupa zaradi nepravilnega odprtja<br>B: kontaminacija trupa z MO. iz črevesja zaradi nepravilnih nastavitvev stroja                                                                                                                                                                                    |           |
| <b>STROJNA EVISCERACIJA</b>           | B: kontaminacija trupa z MO. (razlitje črevesne vsebine), možnost ostankov organov, črevesja zaradi nepravilnih nastavitvev stroja                                                                                                                                                                                          |           |
| <b>LOČEVANJE DROBOVINE OD TRUPA</b>   | B: kontaminacija trupa z MO. (razlitje črevesja) zaradi nepravilnih nastavitvev stroja, ostanki organov, črevesja v trupu-kontaminacija pri nadaljni obdelavi<br>B: pri ločevanju srca, jeter, vratov, želodcev od črevesja obstaja možnost razlitja žolča po srcu in jetrih, kontaminacija z MO. preko vode ali zaposlenih |           |
| <b>HLAJENJE DROBOVINE</b>             | B: kontaminacija src, jeter, vratov, želodcev zaradi okužene posode ali neustrezne T hlajenja                                                                                                                                                                                                                               | 1.KKT     |
| <b>PREOBEŠANJE in HLAJENJE TRUPOV</b> | F: prelomov členkov kosti beder, ostanki delcev kosti v mišicah<br>B: padanje trupov na tla med preobešanjem- kontaminacija z MO<br>B: rast in razmnoževanje MO. zaradi neustrezne T hlajenja                                                                                                                               | 2.KKT     |

Slika 4: Analiza tveganja in kritične točke v perutninski klavnici (Interno gradivo podjetja F2)

## 2.4 MIKROORGANIZMI

Meso in perutnina ter mesni izdelki so odgovorni za številne izbruhe s hrano prenosljivih bolezni, katerih najpogostejši povzročitelji so bakterije rodov *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium* in *Staphylococcus*. S sistemom HACCP pa moramo zagotoviti nadzor nad večino patogenih mikroorganizmov, vključno z vrstami *L. monocytogenes* in *E. coli* (Marčič in Vidovič, 2002).



### 2.4.1 Skupno število mikroorganizmov

Ocena skupnega števila aerobnih bakterij (število enot sposobnih tvorbe kolonij) se v praksi pogosto uporablja za merjenje svežine in higienskega stanja hrane in sorodnih izdelkov ter proizvodnega okolja, ki jo določajo pravilniki (HyServe, 2005b).

Sveža živila navadno vsebujejo različne mikroorganizme, razen če so sterilizirana, pasterizirana ali obdelana z zaščitnimi sredstvi. Med skladiščenjem se lahko bakterijske celice delijo in tako se njihovo število povečuje. To pa povzroča tveganje, saj se sestavine živil lahko degenerirajo ali pa obogatijo z bakterijskimi sekundarnimi metaboliti in možnost okužbe človeka s patogenimi mikroorganizmi se poveča (HyServe, 2005a).

Na povečano skupno število mikroorganizmov v živilu, razen izvornih surovin in postopka priprave, vpliva tudi neustrezna sanitacija prostorov, naprav, opreme in pribora.

Živilsko predelovalnim podjetjem je v interesu v vsakem trenutku zagotoviti varno in kakovostno živilo potrošniku, zato stremijo k mikrobiološkim testom, ki jih lahko opravljajo sami. Pogosta je uporaba nekonvencionalnih metod štetja aerobnih mikroorganizmov (HyServe, 2005a).

### 2.4.2 Indikatorski mikroorganizmi

Indikatorski mikroorganizmi so najpogosteje uporabljeni kot pokazatelji fekalne onesnaženosti. Uporabljamo jih kot alternativo direktnemu določanju patogenih bakterij, virusov, cist protozojev, ker je neposredno določanje le-teh časovno zamudno, cenovno zelo drago in zanj potrebujemo dobro izurjeni kader.

Idealni indikatorski mikroorganizem fekalne kontaminacije mora dosegati naslednje kriterije:

1. pripadati intestinalni mikroflori toplokrvnih živali,
2. biti prisoten le v primeru fekalne kontaminacije,
3. biti prisoten v večjem številu kot patogeni,
4. biti enako odporen na okolje kot patogen in enako odporen na dezinfekcijo,
5. ne sme se razmnoževati v okolju,
6. biti mora zelo enostavno in hitro določljiv s poceni metodo,
7. ne sme biti patogen (Batič, 2006).

#### 2.4.2.1 Koliformne bakterije

Najpogostejši indikatorski mikroorganizmi so koliformne bakterije, ki jih delimo na skupne koliformne in fekalne koliformne bakterije. Skupne koliformne bakterije so večinoma naravni prebivalci zemlje in vode. Fekalne koliformne bakterije pa običajno najdemo v fekalijah živali (NWGA, 2009). Ta skupina bakterij je že dolgo pokazatelj onesnaženja vode in morebitne prisotnosti črevesnih parazitov in patogenov. Ugotavljanje koliformnih bakterij je relativno preprosto, saj so prisotne v veliko večjem številu kot bolj nevarni patogeni, v naravnem okolju in pri procesih obdelave pa se odzivajo podobno kot patogeni mikroorganizmi. Tako je z opazovanjem koliformnih bakterij mogoče oceniti povečanje ali zmanjšanje števila patogenih bakterij (Treyens, 2009).

#### 2.4.2.2 *Escherichia coli*

Preglednica 2: Fiziološke lastnosti *E. coli* (Adamič in sod., 2003; Todar, 2008b).

|                          |                                                          |
|--------------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>oblika</b>            | paličaste bakterije                                      |
| <b>velikost</b>          | dolžina 1-2 $\mu\text{m}$ , premer 0,1-0,5 $\mu\text{m}$ |
| <b>barvanje po Gramu</b> | negativno                                                |
| <b>giblјivost</b>        | giblјive                                                 |
| <b>odnos do kisika</b>   | aerobne in fakultativno anaerobne                        |
| <b>temperatura rasti</b> | 10 – 46 °C (optimalna 37 °C)                             |
| <b>pH</b>                | > 4,3                                                    |
| <b>a<sub>w</sub></b>     | 0,96 – 0,93                                              |

Leta 1885 je Theodor Escherich prvi opisal bakterijo, ki jo danes poznamo pod imenom *Escherichia coli*.

Postala je eden izmed najbolj proučevanih mikroorganizmov mikrobiologije. Prisotna je v prebavnem traktu človeka in živali. Vendar lahko nekateri sevi *E. coli* povzročijo hudo bolezen pri teh gostiteljih. To je privedlo do podrobnih raziskav teh sevov še zlasti v zadnjih 25-ih letih s pojavom *E. coli* H7:O157 (Smith in sod., 2004) oz. po izbruhu velikih epidemij s hemoragičnim sevom.

Taksonomska uvrstitev:

Kraljestvo: *Bacteria*

Deblo: *Proteobacteria*

Razred: *Gamma Proteobacteria*

Red: *Enterobacteriales*

Družina: *Enterobacteriaceae*

Rod: *Escherichia*

Vrsta: *E. coli* (Todar, 2008b)

Preglednica 3: Za *E. coli* značilne biokemijske reakcije (Jeršek, 2005).

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| <b>Katalaza</b>        | pozitivno |
| <b>Indol</b>           | pozitivno |
| <b>Voges-Proskauer</b> | negativno |
| <b>Metil rdeče</b>     | pozitivno |
| <b>Citrat</b>          | negativno |

### 2.4.3 Patogeni mikroorganizmi

Sveže surovo meso ponavadi pred zaužitjem toplotno obdelamo (kuhanje, pečenje), obstaja pa tudi nekaj izjemnih primerov, ko tega ne storimo. Tako predstavlja meso direktno nevarnost zastrupitve s hrano le v surovi ali premalo toplotno obdelani obliki. Vendar pa z navzkrižno kontaminacijo lahko prav tako povzročimo zastrupitve s hrano, kar pogosto spregledamo (Fernandes, 2009).

Meso in mesni izdelki so pogost vektor patogenih bakterij, kot so *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni/coli*, *Yersinia enterocolitica*, VTEC in tudi *Listeria monocytogenes*. Vse te s hrano prenosljive patogene bakterije lahko uspevajo v gastrointestinalnem traktu živali, ki vstopajo v našo prehranjevalno verigo. Najbolj pogosto zaporedje dogodkov, ki vodi do okužbe z mesom, vključuje zdrave živali, ki so prenašalci patogenih mikroorganizmov. Mikroorganizmi pa pridejo v stik s človekom preko produkcije, rokovanja in zaužitja mesa in mesnih izdelkov (Nørrung in Bunčič, 2008).

Okužbe s kampilobaktri (predvsem s *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli*), so ene najpogostejših povzročiteljev gastrointestinalnih okužb pri nas. Kampilobakterioze imajo specifično epidemiologijo, uvrščamo jih med endemske črevesne kužne bolezni z zoonoznim karakterjem. Po številu okužb lahko ocenimo, da incidenca kampilobakterioz podobno kot v drugih državah iz leta v leto raste. V letu 2009 smo imeli 921 prijav enteritisov, pri katerih je bil povzročitelj kampilobakter (IVZ, 2010).

V letu 2009 smo imeli v Sloveniji šest prijav listerioze, zboleli so štirje moški in dve ženski, od tega so tri osebe umrle (IVZ, 2010).

Salmonele so v naravi zelo razširjene in so ene najpogostejših povzročiteljev gastrointestinalnih okužb, tako v svetu, kot tudi v Sloveniji. Iz črevesja lahko vdrejo v kri nato pa povzročajo bakteriemijo ter vnetna žarišča izven celic. Incidenca salmoneloz je na osnovi prijav v letu 2009 znašala 30,6/100.000 prebivalcev. 306 oseb je bilo hospitaliziranih zaradi salmonelnega enteritisa, kar je polovica okuženih (IVZ, 2010).

#### 2.4.3.1 *Campylobacter* spp.

Preglednica 4: Glavne značilnosti kampilobaktrov (Holt in sod., 1994).

|                          |                                                                     |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>oblika</b>            | Vibroidne paličice                                                  |
| <b>velikost</b>          | 0,2–0,5 µm × 0,5–5,0 µm                                             |
| <b>barvanje po Gramu</b> | gram negativne                                                      |
| <b>gibljivost</b>        | gibljive (vijačno gibanje s pomočjo flagel na enem ali obeh koncih) |
| <b>odnos do kisika</b>   | mikroaerofilni                                                      |
| <b>temperatura rasti</b> | optimalna temperatura rasti od 37 do 45 °C                          |
| <b>pH</b>                | optimalen je med 6,5 do 7,5; pod pH 4,9 pa ne raste                 |
| <b>a<sub>w</sub></b>     | Več kot 0,98                                                        |

### Fiziološke lastnosti:

So vibroidne, 0,2-0,5 µm široke in 0,5–5,0 µm dolge paličice. Lahko so enkrat ali večkrat spiralno zavite in dosežejo dolžino tudi do 0,8 µm. Pojavijo se lahko tudi v obliki črke S, ali pa tvorijo kratke verige. So nesporogene. Celice v starih kulturah lahko tvorijo okrogle oblike (kokoidna telesa). Celice so gibljive z značilnim vijačnim gibanjem s pomočjo flagel na enem ali na obeh koncih celice. So tipični mikroaerofili in imajo dihalni tip presnove. Potrebujemo O<sub>2</sub> v koncentraciji 3 do 15 % in CO<sub>2</sub> v koncentraciji 3 do 5 %. Občasno lahko nekateri sevi rastejo tudi v zračnih pogojih oz. pri 21 % O<sub>2</sub> (Holt in sod., 1994).

Preglednica 5: Za kampilobakte značilne biokemijske reakcije (Jeršek, 2005).

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| <b>Oksidaza</b>        | pozitivno |
| <b>Katalaza</b>        | pozitivno |
| <b>Voges-Proskauer</b> | negativno |
| <b>Metil rdeče</b>     | negativno |
| <b>Ureaza</b>          | negativno |

So kemoorganotrofi. Ogljikovih hidratov niti ne fermentirajo niti oksidirajo. Energijo pridobivajo iz aminokislin ali iz intermediatov cikla trikarboksilnih kislin. So oksidaza pozitivni in ureaza negativni, razen nekaj sevov *C. lari*. Pigmentov ne tvorijo. Nekatere vrste so patogene za človeka in živali. Našli so jih v reproduktivnih organih, prebavnem traktu in ustni votlini ljudi in živali (Holt in sod., 1994). Njihov naravni življenjski prostor je črevesje ptičev, zato jih pogosto izolirajo iz perutnine in drugih klavnih živali, predvsem goveda in prašičev. Za človeka in živali so patogene, a je pri živalih okužba pogosto brez simptomov. Najpomembnejši vrsti sta *C. coli* in *C. jejuni*, ki sta termotolerantni in povzročata veliko črevesnih okužb ljudi, predvsem slednja od omenjenih vrst (Adamič in sod., 2003).

Kampilobakterioza je infekcija, ki jo povzroča zaužitje živih celic. Da pride do infekcije, je potrebno zelo majhno število bakterij (manj kot 500). Infekciji se izognemo s toplotno obdelavo (zadostno kuhanje piščancev, pasterizacija mleka) in kloriranjem vode, ki uničujejo te bakterije. Zamrzovanje pa le zmanjša število bakterij v surovem mesu (ZIRS, 2008).

Kampilobakterioze so v letu 2009 postale pogostejše kot salmoneloze tudi v slovenskih statističnih podatkih o črevesno nalezljivih boleznih ljudi (IVZ, 2010).

V klavnicah in razsekovalnicah mesa so leta 2009 zasledili od 8 do 67 % vzorcev mesa perutnine pozitivnih na kampilobakter, oz. 70 vzorcev od 125 vzorcev perutnine. Od tega 68 od 101 vzorcev mesa piščancev in dva od 24 vzorcev mesa puranov (Letno poročilo VURS 2010a; Epidemiološko, 2010). Podatki monitoringa VURS-a podajajo, da je bilo v prvi polovici leta 2009 preiskanih 72 vzorcev kože piščancev, od katerih je bila prisotnost kampilobaktra ugotovljena v 59 vzorcih, kar predstavlja 82 % (VURS, 2010b).

Optimalna temperatura rasti za kampilobakte je med 37 in 45 °C, v laboratoriju jih gojimo na 42 °C, na temperaturi nižji od 30 °C pa se ne razmnožujejo. Na povišano temperaturo so zelo občutljivi, do poškodb mikroorganizmov pride že pri temperaturi 46°C in več. Noben sev pa ne preživi 15 min pri 60 °C, v normalnih pogojih (Adamič in sod., 2003).

Optimalen pH za rast je 6,5 do 7,5; organizem pa ne raste pod pH 4.9. Minimalna vodna aktivnost za rast je vsaj 0,987 (2 % natrijev klorid). Čeprav je kampilobakter občutljiv na izsušitev, obstajajo poročila o preživetju po določenem času na lesenih deskah za rezanje (Curtis, 2007).

#### 2.4.3.2 *Listeria monocytogenes*

Preglednica 6: Glavne značilnosti listerij (Adamič in sod., 2003; Todar, 2008a).

|                          |                                                      |
|--------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>oblika</b>            | paličaste bakterije                                  |
| <b>velikost</b>          | 0,4–0,5 $\mu\text{m}$ $\times$ 0,5–2,0 $\mu\text{m}$ |
| <b>barvanje po Gramu</b> | gram pozitivne                                       |
| <b>giblјivost</b>        | na sobni temperaturi gibljive; nad 37 °C negibljive  |
| <b>odnos do kisika</b>   | fakultativno anaerobna                               |
| <b>temperatura rasti</b> | 1–45 °C (optimalna 30–37 °C)                         |
| <b>pH</b>                | 4,4–9,6                                              |
| <b>a<sub>w</sub></b>     | 0,97 ali več                                         |

Fiziološke lastnosti:

Bakterije rodu *Listeria* so gram-pozitivne, nesporogene, paličaste bakterije. Sladkorje razgrajujejo do kislin, pri tem pa ne sproščajo plina. Pri sobni temperaturi lahko formirajo flagele, pri temperaturi nad 37 °C pa so negibljive (Todar, 2008a). *Listeria* vključno z *L. monocytogenes* so ubikvitarne in jih lahko najdemo v vodi, blatu, kanalizaciji in rastlinah, kot tudi v kravjem mleku, živalskem in humanem blatu, živalski krmi, pa tudi v hrani in surovinah za hrano (Adamič in sod., 2003).

*L. monocytogenes* lahko preživi v različnih okoljskih razmerah. Je fakultativno anaerobna bakterija, ki dobro uspeva tudi v aerobnih pogojih. Optimalna rast je pri nevtralnem do rahlo alkalnem pH, drugače pa rast zavzema široko pH območje in sicer med 4,4 in 9,6 in a<sub>w</sub> do 0,92. Temperaturno območje rasti *L. monocytogenes* je 1–45 °C, optimalna temperatura za rast je pa je 30–37 °C. Torej lahko bakterija pri temperaturi hladilnika, predstavlja možno tveganje v hladilnicah živilsko predelovalne industrije. Prilagoditve na hladen stres pri *L. monocytogenes* je funkcija mnogih mehanizmov za molekularno prilagoditev in je pomembna karakteristika, saj ji omogoča preživetje in razmnoževanje v hlajenih živilih in mrzlih okoljih (Adamič in sod., 2003). *L. monocytogenes* ne preživi toplotne obdelave na 60 °C, 30 min, torej jo pasterizacija uniči. Če segrevanje ne doseže vseh materialov, ali če je vsebnost bakterij zelo visoka, npr. 10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> CFU/ml, lahko bakterije preživijo (Roberts in sod., 1996).

Preglednica 7: Za listerijo značilne biokemijske reakcije (Adamič in sod., 2003).

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| <b>Oksidaza</b>        | negativno |
| <b>Katalaza</b>        | pozitivno |
| <b>Voges-Proskauer</b> | pozitivno |
| <b>Metil rdeče</b>     | pozitivno |
| <b>Indol</b>           | negativno |
| <b>Citrat</b>          | negativno |

Hemolizna aktivnost na krvnem agarju služi kot označevalec za razlikovanje *L. monocytogenes* od drugih vrst listerij, vendar samo ta kriterij še ne zadošča za identifikacijo in je potrebno opraviti še nadaljnja biokemična testiranja (Todar, 2008a).

Listerioza je infekcija, ki nastane zaradi zaužitja živih celic. Bakterija pride v telo in se začne razmnoževati. Ko jih nastane zadostno število, pa povzroči bolezen listeriozo. Najbolj nevarna je za otroke, novorojenčke, nosečnice, starejše in osebe s slabo imunsko odpornostjo (ZIRS, 2008).

#### 2.4.3.3 *Salmonella* spp.

Preglednica 8: Glavne značilnosti salmonel (Adamič in sod., 2003; Holt in sod., 1994).

|                          |                                  |
|--------------------------|----------------------------------|
| <b>oblika</b>            | ravne paličice                   |
| <b>velikost</b>          | 0,7-1,5 x 2-5 $\mu$ m            |
| <b>barvanje po Gramu</b> | gram negativne                   |
| <b>gibljivost</b>        | gibljive (flagelami)             |
| <b>odnos do kisika</b>   | fakultativno anaerobne           |
| <b>temperatura rasti</b> | 7–48 °C (optimalna T 37 °C)      |
| <b>pH</b>                | med 3,8–9,5 (optimalnem 6,5–7,5) |
| <b>a<sub>w</sub></b>     | več kot 0,94                     |

Fiziološke lastnosti:

Salmonele živijo v prebavnem traktu toplo in hladnokrvnih živali. Nekatere vrste so ubikvitarne, kar pomeni, da jih lahko najdemo pri različnih gostiteljih, druge pa so posebej prilagojene le na določene gostitelje (Todar, 2008c). V okolju se nahajajo v vodi, zemlji, insektih, živalskih iztrebkih, iztrebkih klicenoscev, morski hrani, surovem mesu in v surovi perutnini (ZIRS, 2008).

Večinoma so gibljive, kar jim omogočajo bički, ki so enakomerno porazdeljeni po površini bakterijske celice. Izjema je *S. galinarum* (*S. pullorum*), ki pa je negibljiva (Holt in sod., 1994). Običajno rastejo pri temperaturi od 7 do 48 °C, nekateri sevi pa lahko rastejo tudi pri temperaturah, okoli 4 °C, pa tudi na splošno je *Salmonella* precej odporna na zmrzovanje. Pod 10 °C je rast zelo počasna. Salmonele ne tvorijo spor (Todar, 2008c). Pasterizacija in njej enakovredni postopki obdelave jo uničijo.

Salmonele predstavljajo najštevilčnejši rod enterobakterij, saj obsegajo več kot 2000 do sedaj poznanih serotipov. Za ljudi so najpomembnejše tri:

- *S. typhii*: pri človeku povzroča smrtno nevaren tifus
- *S. enteritidis* in *S. typhimurium*: povzročata enterokolitise

Salmonele povzročajo alimentarno toksikoinfekcijo: intoksikacijo oz. zastrupitev povzročajo endotoksini mrtvih salmonel, v primeru prisotnosti živih salmonel v zadostnem številu (vsaj 500.000/g živila) pa lahko pride tudi do infekcije (ZIRS, 2008).

Preglednica 9: Za salmonelo značilne biokemijske reakcije (Holt in sod., 1994).

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| <b>Oksidaza</b>        | negativne |
| <b>Katalaza</b>        | pozitivne |
| <b>Voges-Proskauer</b> | negativne |
| <b>Metil rdeče</b>     | pozitivne |
| <b>Citrat</b>          | pozitivne |

Salmonele so kemoorganotrofne in imajo oba - respiratorno in fermentativno tip metabolizma. D-glukoza in ostali ogljikovi hidrati so katalizirani s produkcijo kisline in ponavadi tudi plina (Holt in sod., 1994). Kot vir ogljika izkoriščajo citrat iz triptofana, pri tem pa ne tvorijo indola. Vršijo redukcijo nitritov v nitrat. Pri razgradnji glukoze navadno ne tvorijo plina, laktoze pa ne cepijo. Zaradi posebne sestave celice delujejo kot antigeni in spodbujajo tvorbo protiteles. Kot vse enterobakterije, imajo tudi salmonele tri antigena mesta: O – na celici (somatski antigeni), K – na kapsuli (kapsularni antigeni) in H – na flagelah (flagelarni antigeni) (Adamič s sod., 2003).

Veterinarska uprava RS ugotavlja, da se kvaliteta perutnine pri nas izboljšuje, saj leta 2009 niso potrdili prisotnosti salmonel v mesu piščancev, perutnine v razsekovalnicah (VURS, 2010b).

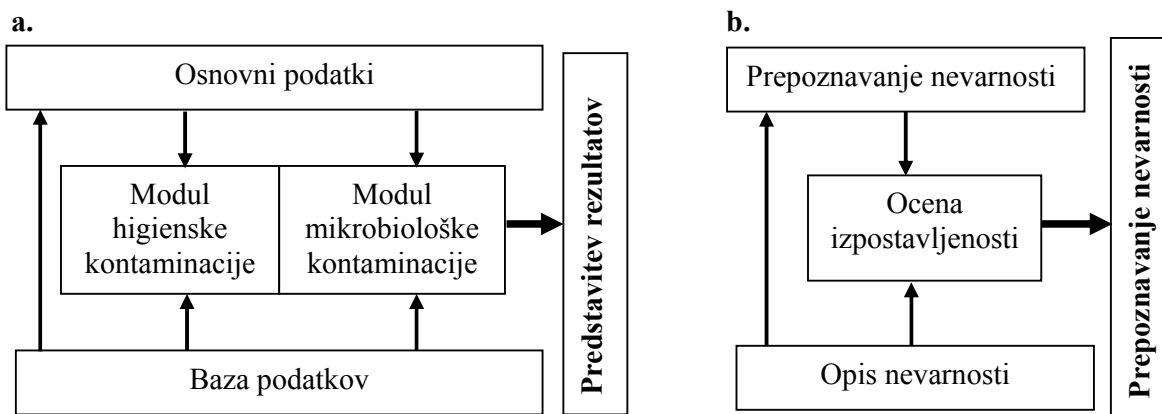
## 2.5 HYGRAM®

To je program, ki so ga razvili finska Agencija za varnost hrane (EVIRA) v sodelovanju z Oddelkom za prehrano in higieno okolja, Veterinarske fakultete Univerze v Helsinkih in Inštituta VTT Tehničnega raziskovalnega centra Finske, z namenom, da se z uporabo raznolikega znanja o varnosti hrane oblikujejo temelji za dobre odločitve za obvladovanje tveganja v malih in srednjih podjetjih (VTT, 2007a).

Namen razvoja programa HYGRAM® je bil ustvariti operativno orodje za oceno tveganja, ki bi bilo dovolj enostavno, da bi ga lahko uporabljali vsi, ki so vključeni v izvajanje sistema HACCP v živilskih obratih. Cilj je bil zagotoviti praktičen in za uporabo enostaven program, ki bi pomagal pri izbiri kritičnih kontrolnih točk in njihovih meja ter pri kvantifikaciji tveganja na način, kjer bi bili različni procesi med seboj primerljivi (Hygram, 2007).

Program sestavlja pet različnih elementov, oz. modulov: osnovne informacije, higienski moduli in moduli tveganj, baza podatkov in moduli za predstavitev rezultatov. Osnovne informacije zajemajo informacije o podjetju in njegovem obratu oz. izdelku, ki ga opisujemo.

Značilnosti glavnih mikrobioloških povzročiteljev bolezni so opisane v banki podatkov (VTT, 2007b).



Slika 5: Zgradba programa Hygram(a) in elementi, ki so vključeni v mikrobiološko oceno tveganja (b) (Tuominen, 2008).

### 2.5.1 Osnovne informacije v programu HYGRAM®

V osnovnih informacijah poteka zbiranje splošnih podatkov o podjetju s poudarkom na okolju, v katerem se bo izvajal sistem HACCP ali lastna kontrola. Predstavljeni so tudi osebje in sedanje stanje sistema varnosti hrane v posameznih obratih. Identifikacija tveganj se prične v zadnjem delu modula "Osnovne informacije", kjer so opisane fizikalne in kemijske lastnosti produkta. Zato je mikrobiološko, fizikalno ali kemijsko tveganje v povezavi s produktom možno prepoznati. Na tej točki je določena tudi ciljna skupina kupcev (npr. rizična skupina ali običajni potrošnik) in glede na to se preverja učinek nadaljnjih procesov na končni proizvod.

Uporabnik programa mora imeti jasno sliko ozadja in politike podjetja, proizvodnih postopkov in končnih proizvodov, da lahko pravilno izpolni podatke, ki jih model zahteva. Uporabljeni so tudi uradni predpisi, informacije o s hrano prenosljivih boleznih in epidemiološke statistike, poznavanje podobnih izdelkov in procesov ter tudi podatki, pridobljeni v samem podjetju (rezultati testiranja surovin in končnih izdelkov) ter reklamacije izdelkov (VTT, 2007b).

### 2.5.2 Higienški modul in modul tveganja v HYGRAM®-u

V Hygramu ocenjevalec opravi semi-kvantitativno oceno izpostavljenosti tveganjem, to je na osnovi verjetnosti in resnosti po skali 1-7 ali 1-5 ali 1-3, pri katerih ena pomeni nizko ali zanemarljivo, najvišje število pa močan učinek v vsaki fazi postopka za testiran modul. Verjetnost se določi z ocenitvijo, kako verjetno je, da bo v koraku, ki je analiziran, kaj narobe, ali kako pogosta je prisotnost nekega mikroba. Resnost opisuje vpliv nevarnosti oz. tveganja na končni proizvod. Dodatna pojasnila in pripombe, ki se pojavijo med oceno, se lahko prav tako upoštevajo, če pripomorejo k večji sledljivosti in preglednosti ocene (Tuominen in sod., 2003).



### 2.5.3 Baza podatkov v programu HYGRAM®

Baza podatkov Hygrama deli produkte v tri kategorije tveganja, glede na sestavine in lastnosti, kot tudi glede na možnost prenosa okužbe in omogočanja rasti mikroorganizmov.

Baza podatkov uporabnika obvešča o najpogostejših s hrano prenosljivih patogenih mikroorganizmih in o njihovem obnašanju pri različnih temperaturah, vrednostih pH,  $a_w$ , in D-vrednostih. Patogeni mikroorganizmi, ki so že vključeni v model mikrobioloških nevarnosti, so *Aeromonas spp.*, *Bacillus cereus*, termotolerantni *Campylobacter spp.*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* (EHEC), *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* in plesni. V najnovejši različici programa so bile dodane še tri kategorije in sicer virusi (norovirusi), kemične in fizikalne nevarnosti (VTT, 2007b).

### 2.5.4 Prikaz rezultatov v HYGRAM®-u

V programu HYGRAM® so lahko rezultati predstavljeni na dva načina:

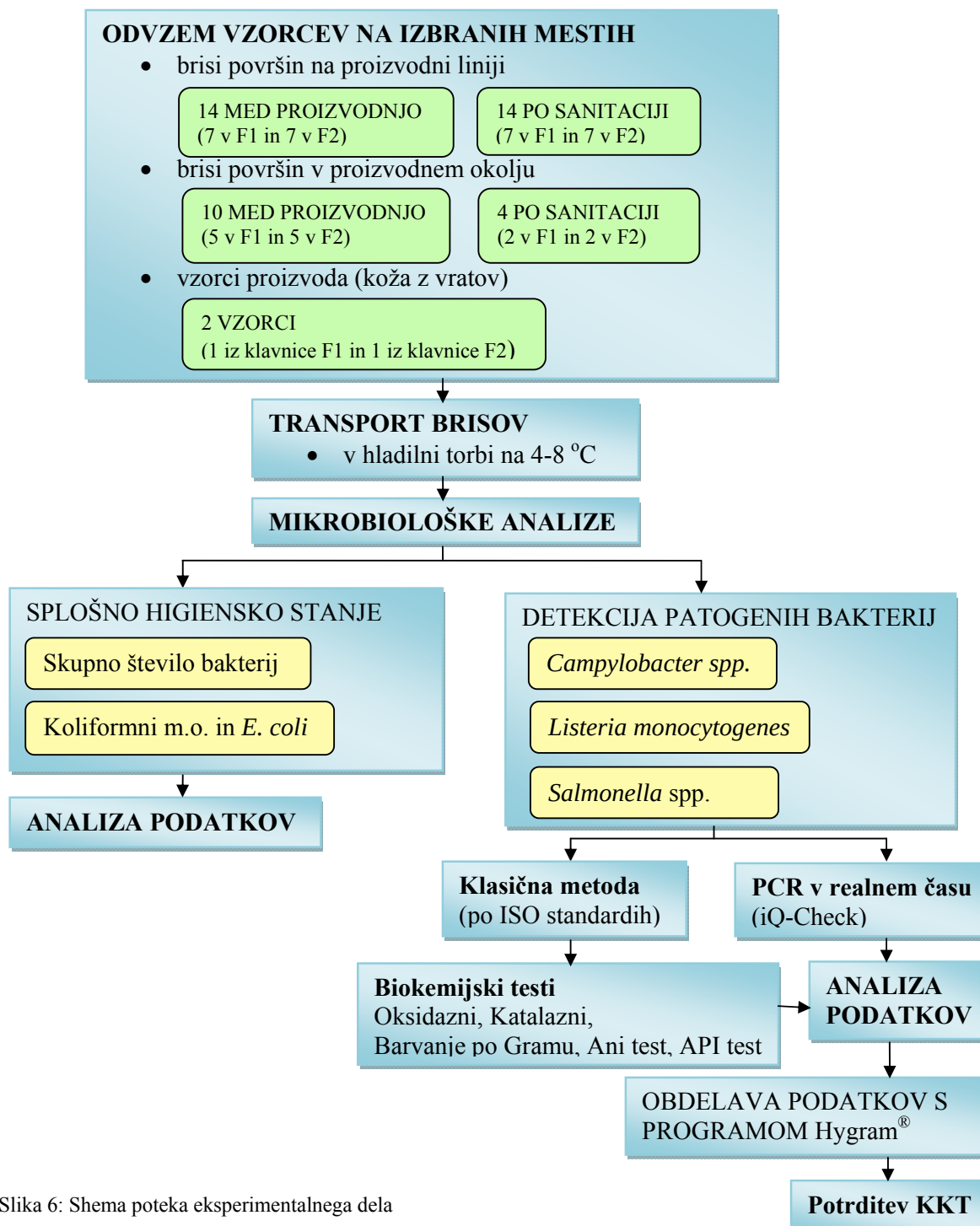
- a) V radialnem grafikonu, kjer se verjetnost in resnost obravnavata kot dve ločeni točki. Čim močnejši je vpliv, tem bolj so točke oddaljene od središča.
- b) V ravnini grafikona, kjer so tveganja predstavljena kot kot točke v ravnini xy, v tem primeru x-os predstavlja verjetnost, y-os pa resnost. V tem primeru so najverjetnejše in najbolj resne nevarnosti prikazane v zgornjem desnem kotu, manj verjetne in manj nevarne pa v spodnjem levem kotu.

Na ta način dobi uporabnik jasno sliko, katere procesne faze predstavljajo največje tveganje za varnost hrane in se nato osredotoči na nadzor in pogostejše spremljanje teh faz. Tako se lahko, glede na potrebe in namen ocene, oceni celotno proizvodno linijo ali le izdelek (VTT, 2007b).

### 3 MATERIALI IN METODE

Raziskovalno delo je potekalo v več različnih stopnjah (slika 6). Materiali in metode, ki smo se jih med raziskovalnim delom posluževali, so predstavljene v spodnjih podpoglavjih.

#### 3.1 POTEK DELA



Slika 6: Shema poteka eksperimentalnega dela

## 3.2 MATERIALI

### 3.2.1 Gojišča

Gojišča smo pripravili po navodilu proizvajalca in sicer smo najprej v laboratorijsko steklenico zatehtali določeno količino suhe snovi in ji nato z merilnim valjem dodali določeno mero topila. V steklenico smo dodali še magnet in jo postavili na magnetno mešalo, da so se vse sestavine raztopile. Gojišča smo nato avtoklavirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C. Po končanem avtoklaviranju, smo gojišča ohladili na 55 °C, jim po navodilih proizvajalca dodali morebiten dodatek, ter jih aseptično nalili v plastične petrijevke. Ko so se gojišča strdila, smo jih zložili v plastične košare in jih do uporabe hranili v hladilni komori na 4 °C.

#### 3.2.1.1 Trdna gojišča

Preglednica 10: Seznam uporabljenih trdnih gojišč glede na mikroorganizem

| <b>Mikroorganizem</b>                                | <b>Okrajšava</b>     | <b>Izdelovalec</b>         | <b>Država</b>                            |
|------------------------------------------------------|----------------------|----------------------------|------------------------------------------|
| <i>Campylobacter</i> spp.                            | CSA Agar             | LAB M                      | Lancashire, ANGLIJA                      |
| <i>Listeria</i> spp.                                 | CHROMOGEN<br>IC AGAR | OXOID LTD.                 | Basingstoke, ANGLIJA                     |
| <i>Listeria</i> spp.                                 | LAMMASVE<br>RI AGAR  | TAMMER-TUTKAN<br>Maljat OY | Tampere,<br>FIN                          |
| <i>Listeria</i> spp.                                 | LMBA                 | TAMMER-TUTKAN<br>Maljat OY | Tampere,<br>FIN                          |
| <i>Listeria</i> spp.                                 | OXFORD<br>AGAR       | OXOID LTD.                 | Basingstoke, ANGLIJA                     |
| <i>Salmonella</i> spp.,<br><i>Campylobacter</i> spp. | TSA                  | BD / Difco™                | Sparks, MD USA /<br>Le Pont de Claix ,FR |
| <i>Salmonella</i> spp.                               | XLD                  | BD / Difco™                | Sparks, MD USA /<br>Le Pont de Claix ,FR |
| <i>Salmonella</i> spp.                               | BGA                  | BD / Difco™                | Sparks, MD USA /<br>Le Pont de Claix ,FR |

#### 3.2.1.2 Tekoča gojišča

Tekoča gojišča smo pripravili na enak način kot trdna gojišča. Suhe snovi smo natehtali in jih prenesli v laboratorijsko steklenico in z merilnim valjem dodali topilo (destilirano vodo). Dodali smo magnetek in mešali na magnetnem mešalu dokler se niso vse sestavine raztopile. Gojišča smo avtoklavirali kar v laboratorijskih steklenicah 15 minut pri 121 °C. Pred uporabo smo počakali, da se ohladijo na sobno temperaturo.

Preglednica 11: Seznam uporabljenih tekočih gojišč glede na mikroorganizem

| <b>Mikroorganizem</b>     | <b>Okrajšava</b> | <b>Izdelovalec</b> | <b>Država</b>                            |
|---------------------------|------------------|--------------------|------------------------------------------|
| <i>Campylobacter</i> spp. | BOLTON BROTH     | LAB M              | Lancashire, ANGLIJA                      |
| <i>Salmonella</i> spp.    | BPW              | Pripravljeno doma  | /                                        |
| <i>Listeria</i> spp.      | FRASER BROTH     | OXOID LTD.         | Basingstoke, ANGLIJA                     |
| <i>Salmonella</i> spp.    | MKTTn BROTH      | LAB M              | Lancashire, UK                           |
| <i>Salmonella</i> spp.    | RVS BROTH        | BD / Difco™        | Sparks, MD USA /<br>Le Pont de Claix ,FR |

### 3.2.2 Laboratorijski pribor in oprema

Raziskovalno delo smo opravili v klasično opremljenem mikrobiološkem laboratoriju. Pri delu smo uporabljali naslednji laboratorijski pribor in opremo:

- halja
- cepilne zanke
- pincete
- rokavice
- skalpeli
- plinski gorilnik
- laboratorijska steklovina (čaše, erlenmajerice, merilni valji, epruvete, laboratorijske steklenice, objektna stekelca, krovna stekelca)
- nastavki za pipetiranje
- laboratorijske rokavice
- plastične petrijeve plošče
- sterilne gaze
- filter papir
- polavtomatske pipete
- avtoklav
- centrifuga
- PCR sistem
- laminarij
- magnetno mešalo
- vodna kopel
- laboratorijska tehnica
- inkubator

### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Določitev mest vzorčenja in odvzem vzorcev

Sprva je bilo potrebno določiti mesta vzorčenja. Pomagali smo si z že obstoječimi kontrolnimi in kritičnimi kontrolnimi točkami v sistemu HACCP, ki ga izvajata obe podjetji, ter dodali še nekaj dodatnih vzorčnih mest. Brise smo jemali na istih mestih na površinah pred začetkom proizvodnje in med potekom proizvodnje in sicer 12. februarja 2009 v klavnicah obeh perutninsko predelovalnih obratov. Vse vzorce smo označili po vnaprej dogovorjenih označbah. Odvzetih je bilo 45 vzorcev v dveh paralelkah.

Vzorčili smo tri skupine vzorčnih mest:

- vzorčna mesta površin neposredno na proizvodni liniji
  - mamillec,
  - klavec,
  - skubilec,
  - lira (skubilnica),
  - trgalec glav,
  - zaboj za drobovino,
  - tekoči trak pred hladilnim tunelom.
- Vzorčna mesta površin v proizvodnem okolju:
  - predpasnik,
  - rokavice,
  - stena,
  - stikalo
  - umivalnik.
- Vzorci proizvoda:
  - koža z vratu piščancev.

##### 3.3.1.1 Metoda brisov

Za vzorčenje z brisi smo uporabili sterilne epruvete z določenim volumnom sterilne fiziološke raztopine (5 ml ali 10 ml). Na notranji strani pokrovčka epruvete pa je pritrjena palčka, ki je na koncu ovita z vato.

Pri vzorčenju površin smo z brisom pobrisali površino določene velikosti (100 cm<sup>2</sup>), tako, da smo bris med vzorčenjem obračali in smer brisanja površine vsaj dvakrat zamenjali. Nato smo dali obris v epruveto s fiziološko raztopino in dobro premešali (Jeršek, 2009).

### 3.3.1.2 Vzorčenje proizvoda

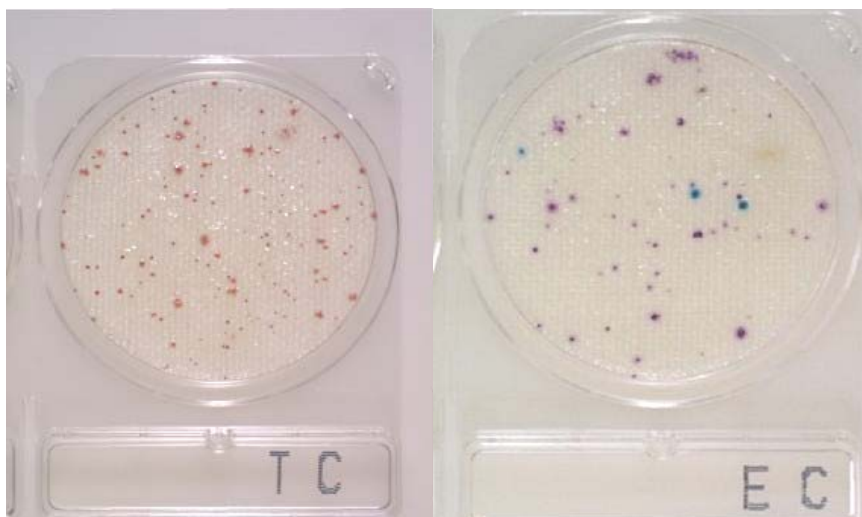
Kot vzorec proizvoda smo odvzeli kožo z vratu piščancev, kot to predvideva standardni postopek opisan v Commission Regulation (EC) 1441/2007 (Commission Regulation..., 2007).

### 3.3.2 Določanje skupnega števila mikroorganizmov in koliformnih bakterij z *E. coli*

Skupno število mikroorganizmov in koliformne mikroorganizme z *E. coli* smo določali s pomočjo že pripravljenih gojišč Compact dry TC (HyServe) in Compact dry EC (HyServe). Compact Dry TC je medij za skupno število živih bakterij, ki vsebuje standardni agar, kolonije, ki zrastejo na njem, pa so zaradi redoks indikatorja (tetrazolijeve soli) rdeče obarvane. Compact Dry EC je medij za *E. coli* in koliformne bakterije. Medij vsebuje dve vrsti kromogenih encimskih substratov: Magenta-Gal in X-Gluc. *E. coli* tako formira modre kolonije. Modre in rdeče kolonije skupaj pa predstavljajo koliformne mikroorganizme (HyServe, 2005a).

Postopek je bil enak tako za določanje skupnega števila mikroorganizmov, kot za določanje koliformnih bakterij.

- Najprej smo odprli aluminijasto folijo in ustrezno označili set štirih ploščic.
- Napravili smo razredčitve vzorcev  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  in  $10^{-3}$ .
- Nato smo odstranili pokrovček in s pipeto prenesli 1 ml vzorca (iz brisa  $10^0$ ) na sredino dehidriranega gojišča. Vzorec je enakomerno difundiral in ob tem spremenil dehidrirano gojišče v gel.
- Po nanosu vzorca smo gojišče zopet pokrili s pokrovčkom.
- Ko smo nanесли na plošče z gojišči še razredčene vzorce, smo plošče prenesli v inkubator. Inkubacija za skupno število mikroorganizmov je potekala 24 ur na 30 °C, inkubacija koliformnih pa 72 ur na 37 °C.
- Po inkubaciji smo prešteli število kolonij, ki so se pojavile v mediju (Spiedel, 2005 ).



Slika 7: Plošča Compact Dry za skupno število mikroorganizmov in za koliformne z *E. coli*

### 3.3.2.1 Izračun mikroorganizmov na površino

Za preračunavanje mikroorganizmov na površino  $10 \times 10$  cm smo uporabili naslednjo formulo:

$$N = \Sigma C / (n_1 + 0,10 * n_2) * R$$

Legenda:

- N - mikroorganizmi (CFU/100 cm<sup>2</sup>)
- $\Sigma C$  - seštevek vseh kolonij
- $n_1$  - število petrijevk v prvi razredčitvi
- $n_2$  - število petrijevk v drugi razredčitvi
- R - prva razredčitev ( $10^{-x}$ )

### 3.3.3 Ugotavljanje prisotnosti patogenih mikroorganizmov

Po nacepljanju vzorcev na obogatitvena in selektivna gojišča, smo za identificiranje kolonij uporabili naslednje potrditvene teste.

#### 3.3.3.1 Potrditveni testi

##### Barvanje po Gramu

Postopek:

- Najprej smo s sterilno ezo vzeli čisto kulturo (s trdnega gojišča) in jo razmazali po objektu stekelcu, na katerega smo predhodno kanili kapljico vode, ter počakali da se posuši na zraku. Potem smo kulturo toplotno fiksirali tako, da smo stekelce hitro potegnili skozi plamen, da se je to rahlo segrelo.
- Preparat smo najprej pobarvali s kristal vijoličnim barvilom in sicer eno minuto nato pa smo stekelce sprali z vodo. Celice so se vijolično obarvale.
- Potem smo fiksirali barvo z raztopino joda v katero smo za eno minuto pomočili preparate, ter ponovno sprali z vodo.
- Nato smo vzorec razbarvali z 95% etanolom. Pri tem se je kristalvijolično barvilo, ki se ni vezalo v celično steno, spralo. Gram-pozitivne bakterije so po tej fazi ostale vijolične, Gram-negativne pa so se razbarvale.
- Sledilo je ponovno spiranje z vodo, s katerim smo zaustavili razbarvanje.
- Nazadnje pa smo stekelce potopili v safranin, ki je obarval vse celice rdeče. Gram-pozitivne celice, ki so pred tem že bile vijolično obarvane, se ne spremenijo. Gram-negativne celice pa se obarvajo rožasto rdeče.
- Preparat smo le še narahlo popivnali in pustili da se posuši, nato pa mikroskopirali (Sutton, 2006)

##### Katalazni test

Z ezo smo z gojišča izolirali čisto kolonijo ter jo zamešali v kapljico 3% vodikovega peroksida, ki smo jo predhodno kanili na objektivno stekelce. Rezultat smo lahko razbrali takoj, bil je bil viden kot pojav mehurčkov (HPA standard methods, 2010a).

### Oksidazni test

Metoda s filtrnim papirjem:

Košček filter papirja smo pomočili v raztopino reagenta. Nato smo z ezo pobrali nekaj kolonij, ki so zrasle na gojišču v petrijevi plošči in jih razmazali po filter papirju. Po desetih sekundah smo odčitali rezultat, ki je bil viden kot sprememba barve in sicer pride do modrega obarvanja (HPA standard methods, 2010b).

### ANI™ Salmonella test

Test je zasnovan za hitro identifikacijo čistih kultur *Salmonella* spp. na osnovi imunskega testa z aglutinacijo.

Postopek:

- Najprej smo odprli testno vrečko in iz nje vzeli testne kartice, jih položili na delovno površino in na reagentno piko kanili eno kapljico pufru za rehidracijo.
- Potem smo izbrali 1-3 kolonije (če so majhne 4-6) iz selektivnega gojišča, ki so bile po velikosti, obliki in barvi podobne salmonelam. Te kolonije smo nato nanegli v tanki plasti poleg reagentne pike.
- Nato smo s pomočjo palčke za mešanje vzorcev zmešali rehidriran in modro obarvan reagent z bakterijami, da je nastala homogena suspenzija. Testno kartico smo nagibali, tako da je suspenzija nemoteno krožila znotraj označenega kroga.
- V eni minuti smo pregledali testno kartico za znake aglutinacije.

Rezultat testa je bil pozitiven, če se je v roku ene minute v krogu pojavila modra aglutinacija. Za pozitivno kontrolno reakcijo smo uporabili poznane kolonije, za katere smo vedeli, da so salmonele in bodo dale pozitiven rezultat. Negativno kontrolno reakcijo in preveritev pravilne rehidracije posušenega reagenta pa smo kontrolirali tako, da smo na reagentno piko nanegli navaden pufer in po eni minuti ni prišlo do aglutinacije (ANI Biotech, 2008).

### API® Listeria test (REF 10 300)

Je standardiziran sistem za identifikacijo bakterij rodu *Listeria*, ki uporablja tako miniaturne biokemijske teste, kot tudi bazo podatkov.

Ko smo opravili barvanje po gramu, oksidazni in katalazni test, smo s tem ugotovili, ali sev spada v rod *Listeria*. Nato smo dobro izolirano kolonijo precepili na petrijevko s krvnim agarjem in inkubirali 24 ur na  $36 \pm 2$  °C, saj lahko z API testom identificiramo le posamezne kolonije z določenih gojišč (npr. TSA).

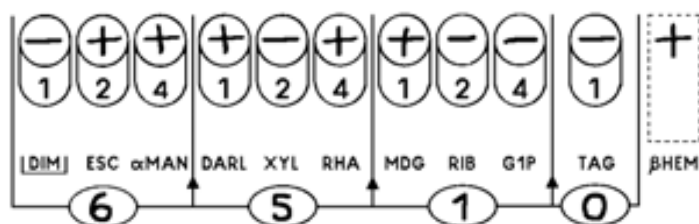
Postopek:

- Najprej smo iz kompleta za API test vzeli inkubacijsko škatlico (pladenj in pokrov). V čašaste prostorčke na pladnju smo s pipeto enakomerno porazdelili 3 ml destilirane vode, da smo ustvarili vlažno atmosfero.



- Nato smo razpakirali trak, ki je sestavljen iz desetih mikrocevk, napolnjenih z dehidriranimi substrati, ki omogočajo delovanje encimatskih testov ali sladkorne fermentacije, in ga položili v inkubacijsko škatlico.
- Potem smo odprli ampulo suspenzijskega medija (2 ml) ter s pipeto pobrali nekaj dobro izoliranih kolonij, ki smo jih vmešali v reagent. To je bil naš inokulum, ki smo ga morali takoj po pripravi s pipeto porazdeliti po vsaki mikro cevki API traku. V cevčice testov (ESC do TAG) smo tako prenesli 50 µl suspenzije, v cevčico z DIM testoma pa 100 µl. Pri tem smo pazili da nismo vnašali mehurčkov.
- Po nanosu smo inkubacijsko škatlico zaprli in dali na inkubacijo za 18 do 24 ur na  $36 \pm 2$  °C pri aerobnih pogojih. Med inkubacijo metabolne spremembe povzročijo spremembo barve, ki je lahko spontana ali pa jo povzroči dodatek reagenta.
- Po inkubaciji smo s pomočjo reakcijske tabele samo še prebrali rezultate in jih zapisali na rezultatni list (kot pozitivne (+) oz. negativne (-) reakcije). V DIM test pa smo za rezultat morali dodati še kapljico ZYM B reagenta. Zapisali pa smo tudi, če smo opazili hemolizo, sicer pa se ta podatek ni upošteval pri razlagi rezultatov.

Glede na podatke o testih, ki smo jih zapisali na rezultatni list, smo določili numerični profil – štirimestno število, iz katerega smo lahko v bazi podatkov našli pripisan sev (BioMérieux®, 2003).



Slika 8: Primer vpisovanja rezultatov na list



Slika 9: Primer ploščice za Api test

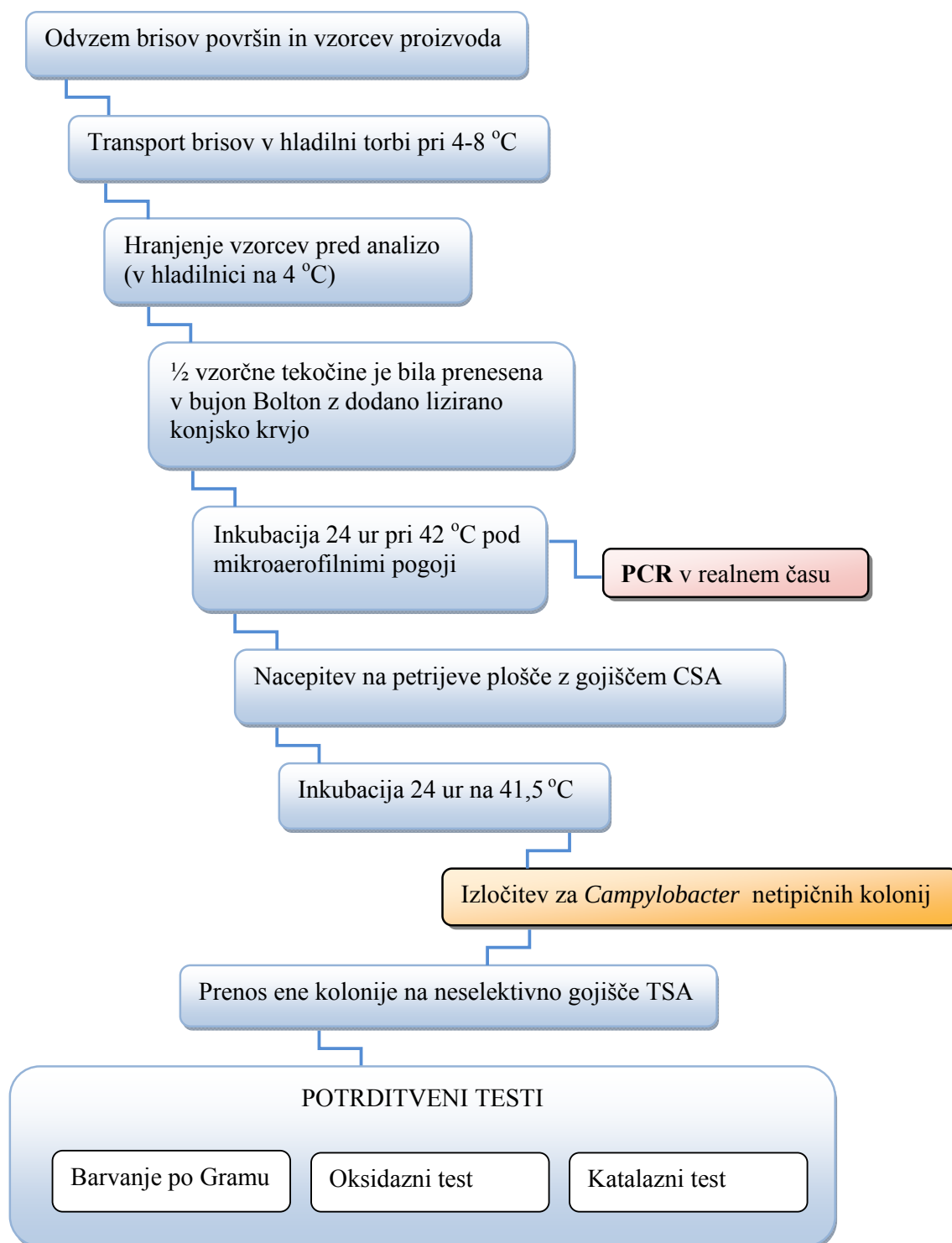
### 3.3.4 PCR v realnem času

Test je bil izveden s sistemom PCR v realnem času (Bio-Rad IQ-Check). Sistem temelji na genskem pomnoževanju z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in detekcijo v realnem času.

Postopek:

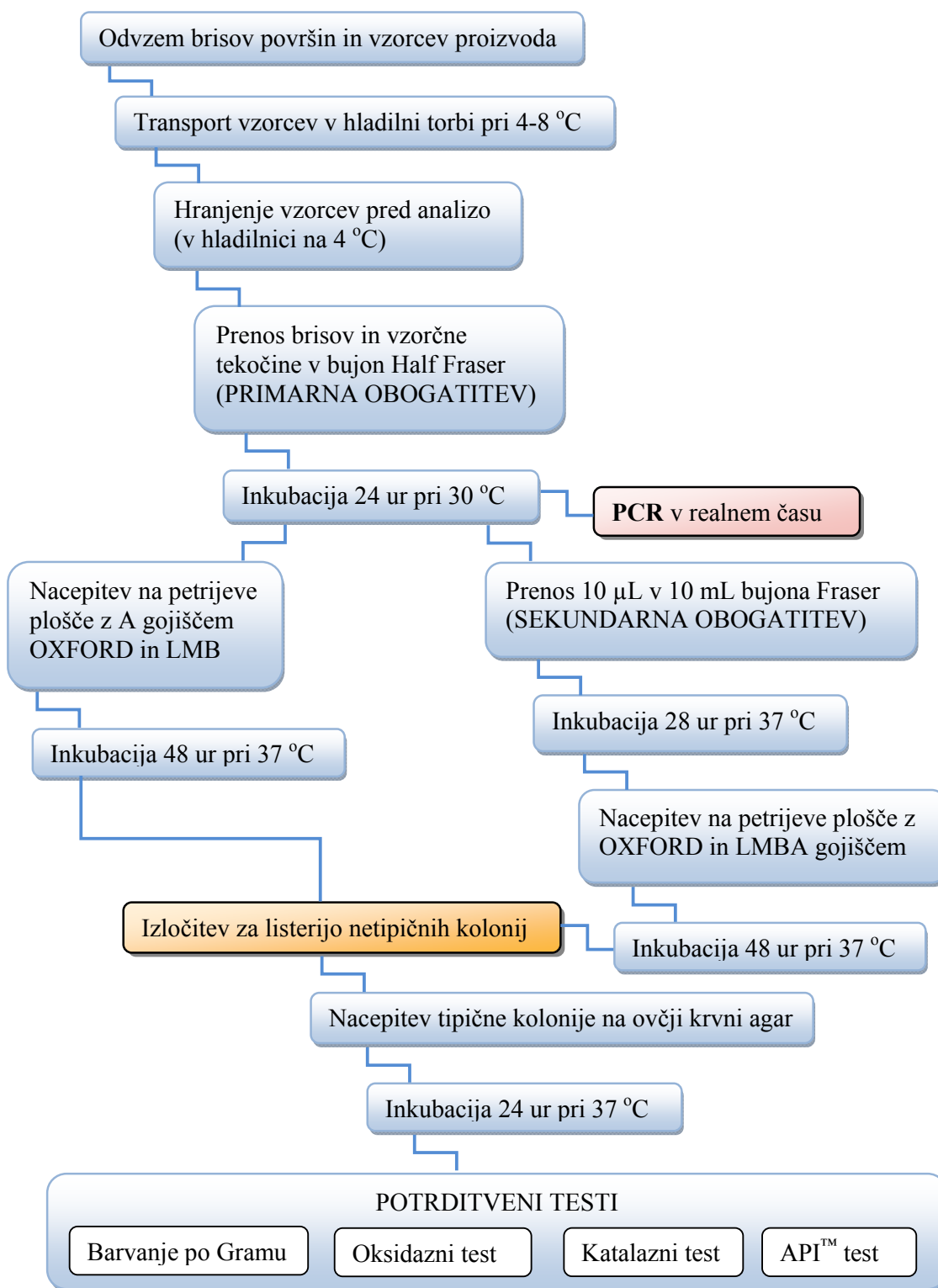
- Najprej smo vzorce prenesli (prelili) v ustrezno obogatitveno gojišče in sicer (BPW za salmonele, Half Fraser za listerije) in vsebino dobro premešali,
- sledila je kultivacija vzorcev  $18 \pm 2$  h na  $37^{\circ}\text{C}$ .
- 1 ml obogatenega vzorca smo nato prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko.
- Nato smo 5 minut centrifugirali na 10.000 do 12.000 obratov na minuto,
- supernatant smo odlili v embalažo za odpad.
- Dolili smo 200  $\mu\text{l}$  lizirajočega reagenta (reagent A), ta je moral biti nenehno na mešalu. S pipeto smo nato premešali sediment z reagentom,
- sledilo je mešanje vsebine na vorteksu pri visoki hitrosti,
- nato smo inkubirali 10 minut na  $100^{\circ}\text{C}$ ,
- ter zopet dobro premešali na vorteksu.
- Ponovno smo centrifugirali 5 min na 10.000 do 12.000 obratov na minuto, ter previdno prenesli v laminarij.
- Po navodilih smo pripravili PCR mešanico reagenta B in C ter jo 45  $\mu\text{l}$  odpipetirali v vdolbinice v mikrotitrski ploščici.
- Nato smo na titrsko ploščico s pipeto prenesli supernatant in kontroli (5  $\mu\text{l}$ ) in pazili, da niso nastali mehurčki.
- Ploščico smo nato prekrili in jo prenesli v aparaturo PCR.
- Na računalniku smo izbrali program glede na vrsto mikroorganizma in izvedli pomnoževanje DNA, ki smo ga spremljali v realnem času (Bio-Rad Laboratories. 2006.).

### 3.3.5 Shema detekcije za *Campylobacter* (VTT – 4377-1)



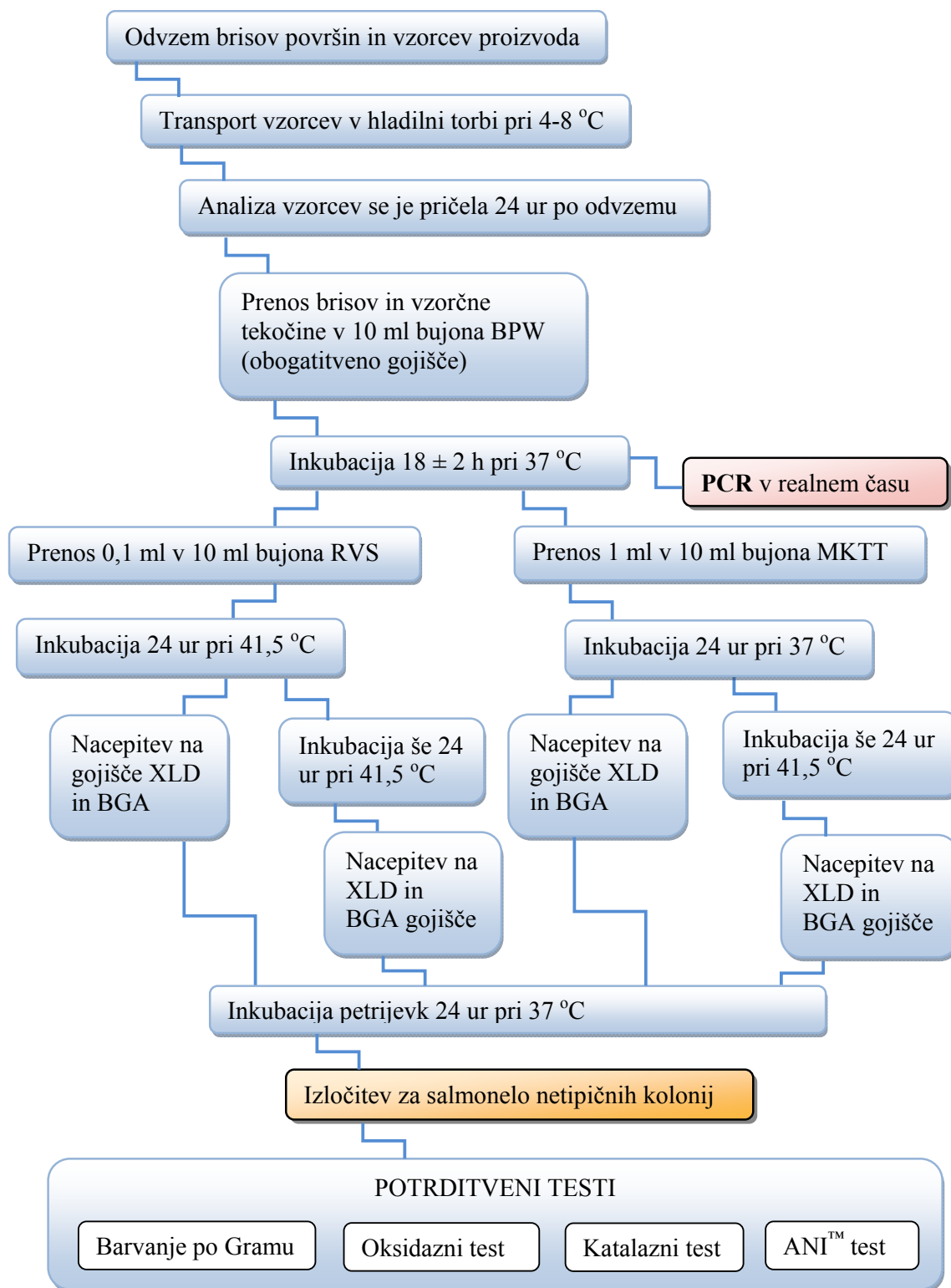
Slika 10: Prikaz detekcije za bakterijo *Campylobacter* (VTT – 4377-1, 1991).

### 3.3.6 Shema detekcije za *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-1)



Slika 11: Prikaz detekcije za bakterijo *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-1, 1996).

### 3.3.7 Shema detekcije za *Salmonella* spp. (ISO 19250)



Slika 12: Prikaz detekcije bakterije *Samonella* spp. (ISO 19250, 2010).

### 3.3.8 Vnos podatkov v program Hygram

Najprej smo zbrali vse podatke o podjetju in produktu, ter jih vstavili v osnovne informacije, ki služijo kot ozadje modula. Informacije smo zbirali glede na okolje, v katerem se bo oz. se že izvaja program HACCP ali lastna kontrola. Identifikacijo tveganj smo pričeli v zadnjem delu "osnovnih informacij", kjer smo izrazili fizikalne in kemijske lastnosti produkta in prepoznali kakršnokoli fizikalno, kemijsko ali mikrobiološko tveganje v zvezi s produktom. Na tej točki smo v programu označili tudi ciljno skupino kupcev (običajni potrošnik).

Z naslednjim korakom smo vnesli procesne faze oz. funkcionalne dele (mamilec, klavec, skubilec, lira-skubilnica, trgalec glav, lira-drobovina, tekoči trak pred hladilnim tunelom, rokavice, predpasnik, stikalo, umivalnik, stena in koža z vratu) v organigram, iz katerega se le te prenesejo v module. Obstajata dve vrsti modulov, preko katerih se lahko določi vpliv procesne faze na izpostavljenost do določene nevarnosti. To so moduli higienskega tveganja in moduli mikrobiološkega tveganja.

#### Modul higienskega tveganja in modul mikrobiološkega tveganja

Pri naši nalogi smo se osredotočili predvsem na modul tveganja mikrobiološke kontaminacije, saj nas je zanimalo predvsem tveganje okužbe za perutnino najbolj rizičnih patogenih mikroorganizmov, to so *Campylobacter*, *Salmonella* in *Listeria monocytogenes*. Glede na rezultate, ki smo jih dobili po tradicionalnih kultivacijskih metodah in po PCR v realnem času, smo ocenili verjetnost in resnost tveganja po skali 1-7 (Preglednica 12), kjer 1 pomeni nizko ali zanemarljivo, 7 pa močan učinek v vsaki fazi postopka za testiran modul. Tako smo opravili semi-kvantitativno oceno izpostavljenosti. Verjetnost smo določili z ocenitvijo, kako verjetno je, da gre v določeni fazi procesa nekaj narobe, in kako pogosta je prisotnost nekega mikroba.

Preglednica 12: Lestvica za ocenjevanje modulov mikrobiološke nevarnosti iz programa Hygram®

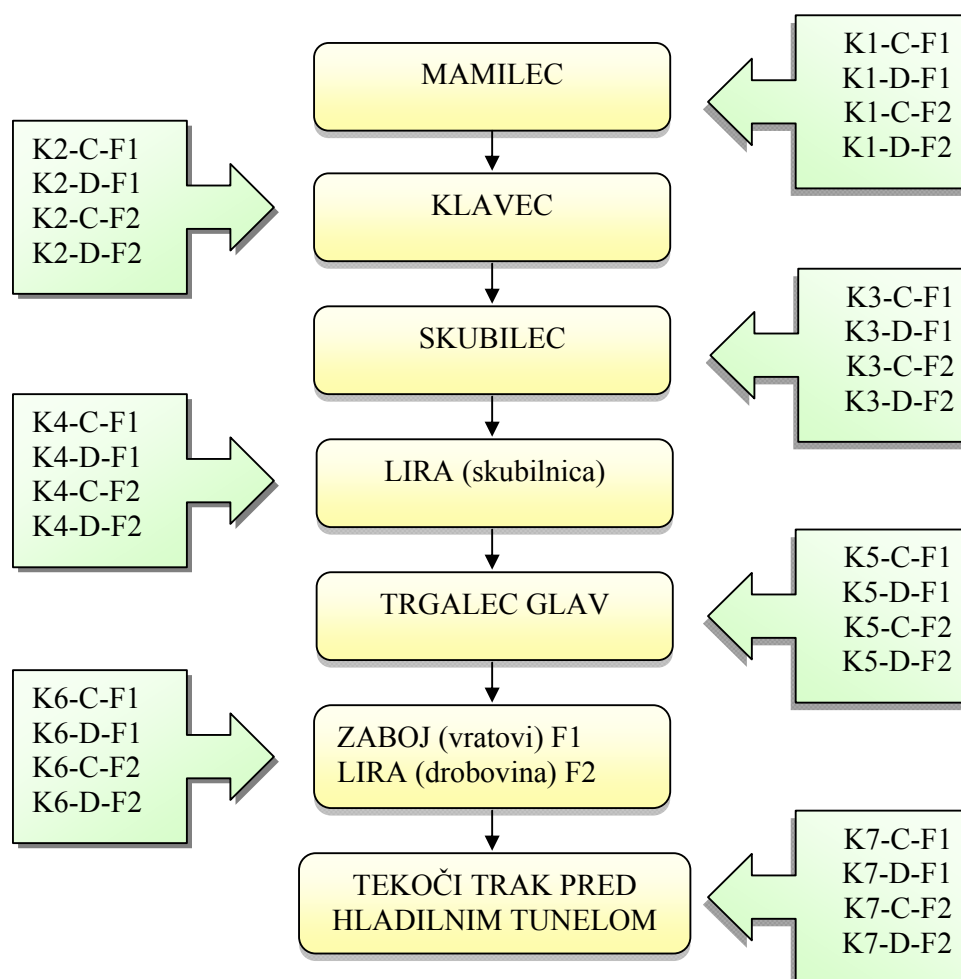
| VERJETNOST                                            |                          | RESNOST                                                                           |                  |
|-------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| - verjetnost pojava mikrobiološke nevarnosti          |                          | - učinek nevarnosti glede na predelavo                                            |                  |
| Kakšna je verjetnost pojava nevarnosti na tem koraku? |                          | Kako velik je vpliv nevarnosti ?<br>Kako velik je vpliv tega koraka na nevarnost? |                  |
| 1.                                                    | Nikoli se ne pojavi      | 1.                                                                                | Nepomemben       |
| 2.                                                    | Zelo redka / zelo majhna | 2.                                                                                | Zelo nizek       |
| 3.                                                    | Redka / majhna           | 3.                                                                                | Nizek            |
| 4.                                                    | Večkrat / do neke mere   | 4.                                                                                | Zmeren           |
| 5.                                                    | Pogosta / velika         | 5.                                                                                | Pomemben         |
| 6.                                                    | Zelo pogosta             | 6.                                                                                | Zelo pomemben    |
| 7.                                                    | Vedno se pojavlja        | 7.                                                                                | Izredno pomemben |

## 4 REZULTATI

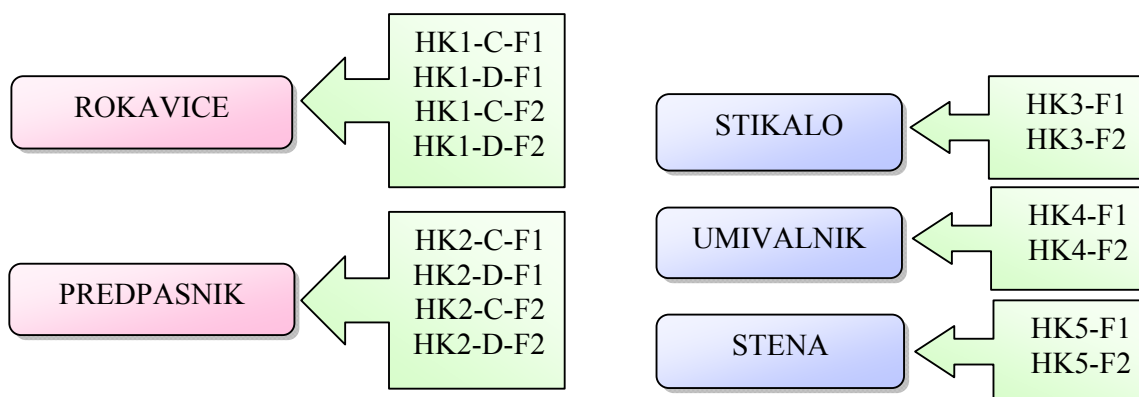
Eksperimentalno raziskovalno delo je potekalo od 13. februarja 2009 do 17. aprila 2009 v mikrobiološkem laboratoriju inštituta VTT na Finskem. Dan pred odhodom na Finsko smo opravili vzorčenje v dveh večjih perutninsko predelovalnih podjetjih v Sloveniji. Predstavljene rezultate smo pridobili s pomočjo mikrobioloških analiz, s katerimi smo ugotavljali prisotnost indikatorskih in patogenih mikroorganizmov.

### 4.1 DOLOČITEV VZORČNIH MEST

Dne 12. februarja 2009 smo v dveh slovenskih perutninsko predelovalnih podjetjih opravili vzorčenje različnih površin in samega izdelka. Vključili smo površine v neposrednem stiku s surovino in/ali izdelki (proizvodna linija, slika 13) in površine, ki niso v neposrednem stiku (proizvodno okolje, npr. stikalo, lijak, umivalnik, slika 14). Pri tem so bile vključene KT in KKT obstoječega sistema HACCP, nekatere točke pa so bile dodane.



Slika 13: Oznake vzorčnih mest in vzorcev s proizvodne linije v obeh klavnicah



Slika 14: Oznake vzorčnih mest in odvzetih vzorcev iz proizvodnega okolja v obeh klavnicah (modre so dodatne točke, ki so nas zanimala)

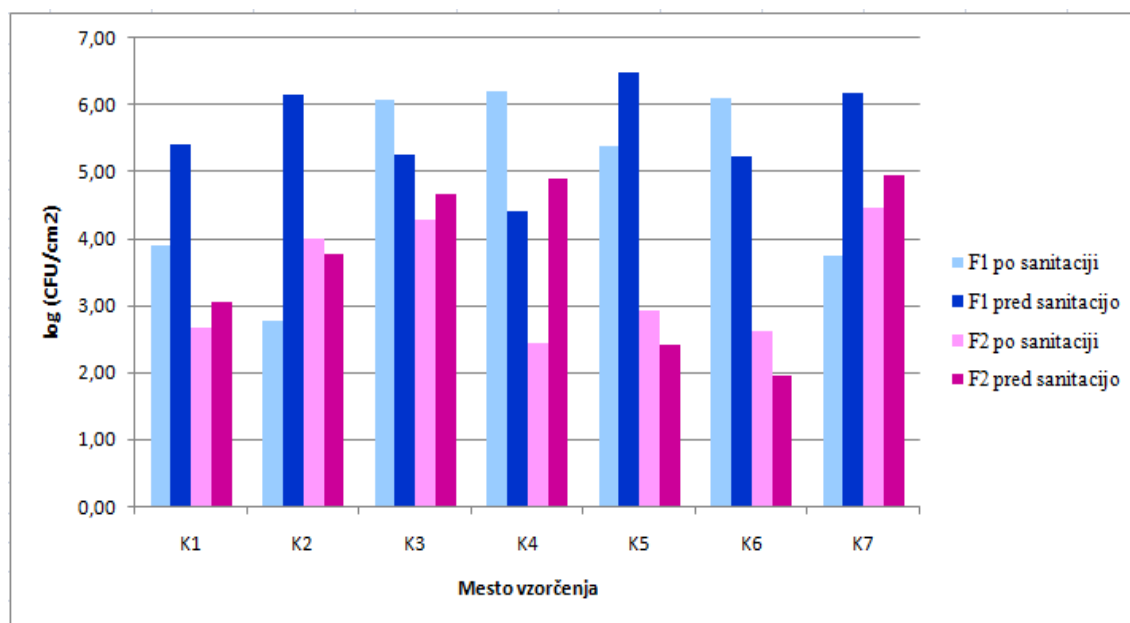


Slika 15: Oznake vzorčnega mesta in vzorcev proizvoda v obeh klavnicah



## 4.2 DOLOČANJE SKUPNEGA ŠTEVILA MIKROORGANIZMOV IN KOLIFORMNIH MIKROORGANIZMOV Z *Escherichia coli*

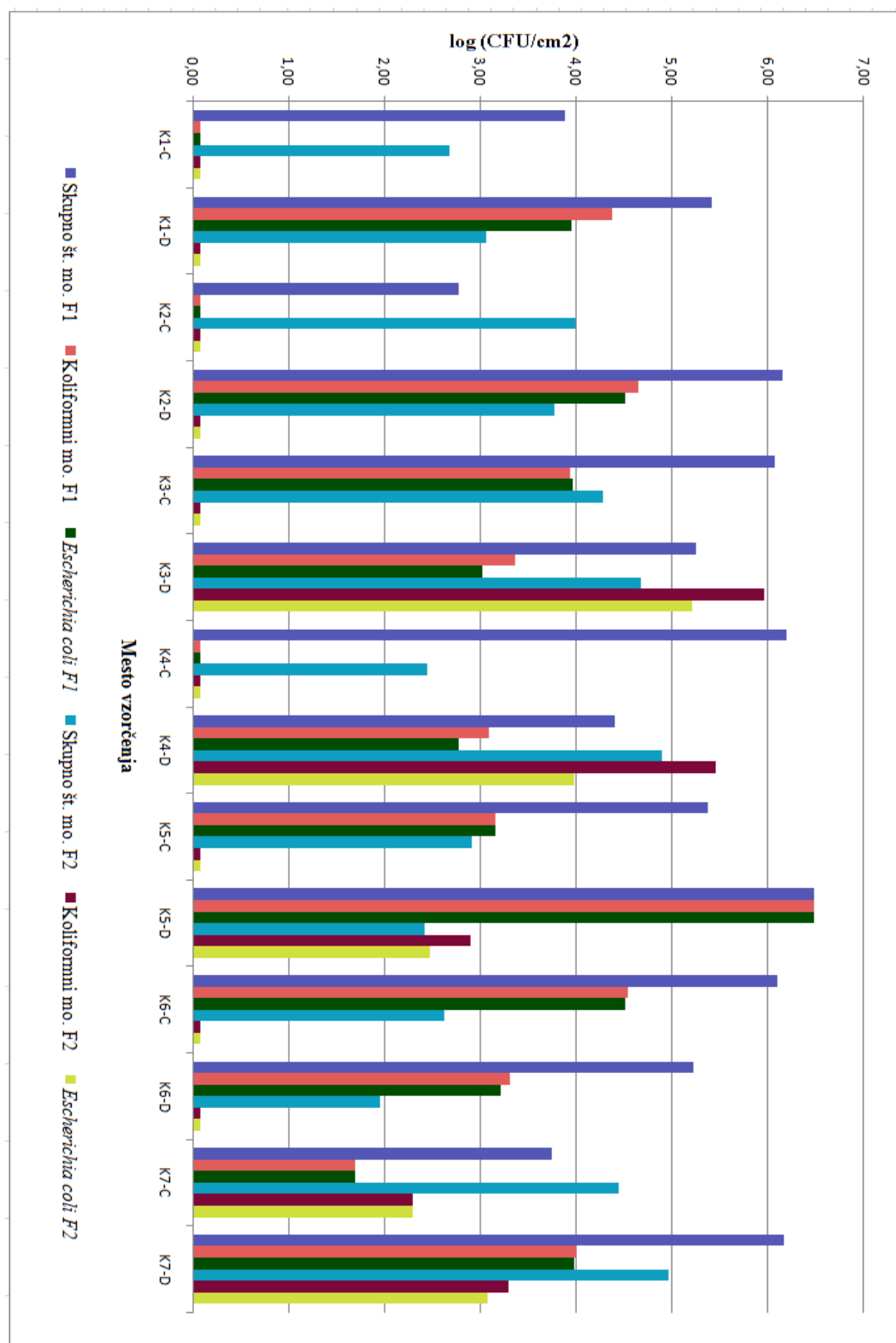
### 4.2.1 Rezultat ugotavljanja prisotnosti mikrobioloških indikatorjev snažnosti na proizvodni liniji



Slika 16: Grafični prikaz skupnega števila mikroorganizmov log (CFU/cm<sup>2</sup>) pred in po sanitaciji med podjetji F1 in F2 (logaritemska skala) za vzorce brisov proizvodne linije klavnice.

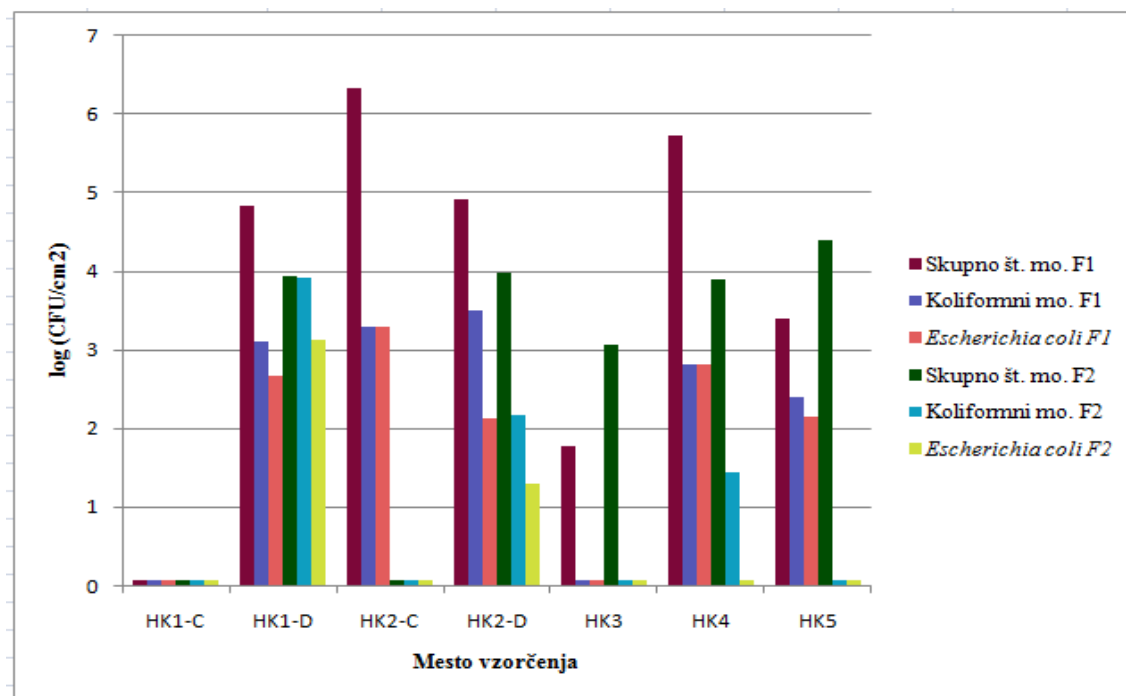
Na grafičnem prikazu se vidi razlika v snažnosti med čistimi in umazanimi površinami, kot tudi razlika v snažnosti med obema klavnicama.

Na sliki 17 je podan grafični prikaz primerjave skupnega števila mikroorganizmov, koliformnih mikroorganizmov in *E. coli* obeh klavnic. V vzorcih s čistih površin mamilca (K1-C), klavca (K2-C) in lire v skubilnici (K4-C) obeh klavnic nismo zaznali koliformnih mikroorganizmov. V klavnici F2 smo dobili negativen rezultat na koliformne mikroorganizme še pri vzorcih s čistih površin skubilca (K3-C) in liri za drobovino (K6-C), ter tudi pri vzorcih, odvzetih med proizvodnjo na površini mamilca (K1-D), klavca (K2-D) in pri liri za drobovino (K6-D); na teh mestih smo v klavnici F1 potrdili koliformne mikroorganizme z *E. coli*. V obeh klavnicah smo odkrili prisotnost koliformnih mikroorganizmov z *E. coli* v vzorcih brisov umazanih površin skubilca (K3-D), lire v skubilnici (K4-D), trgalca glav (K5-D), ter z čiste in umazane površine tekočega traku pred hladilnim tunelom (K7-C,D).



Slika 17: Grafični prikaz skupnega števila mikroorganizmov, koliformnih mikroorganizmov in *E. coli* med klavnicama podjetij F1 in F2

#### 4.2.2 Rezultat ugotavljanja prisotnosti mikrobioloških indikatorjev snaznosti v proizvodnem okolju



Slika 18: Primerjava skupnega števila mikroorganizmov, koliformnih mo. in *E. coli* med klavnicama podjetij F1 in F2

Na sliki 18 je prikazano razmerje med skupnim številom mikroorganizmov, koliformnimi mikroorganizmi, od teh še posebej *E. coli*, za obe klavnici. Grafično so prikazana mesta vzorčenja, ki niso v neposrednem stiku s proizvodom (npr. stikalo, umivalnik, stena). Na površini čistih rokavic (HK1-C) v nobeni klavnici ni bilo prisotnih mikroorganizmov, medtem ko se je na površini rokavic med proizvodnjo pokazala prisotnost visokega skupnega števila mikroorganizmov in koliformnih bakterij z *E. coli*. Razlika med čisto in umazano površino je lepo vidna tudi pri predpasniku (HK2-C,D) v klavnici F2. Na površini stikala so bili v obeh klavnicah prisotni mikroorganizmi (razlika med klavnicama je le za približno 1 log enoto), vendar koliformnih in *E. coli* nismo zaznali. Površina umivalnika v klavnici F1 je pokazala večjo koncentracijo mikroorganizmov kot površina umivalnika v klavnici F2, slednja tudi ni imela prisotnih bakterij *E. coli*. Na steni v klavnici F1 so bili prisotni koliformni mikroorganizmi in *E. coli*, vendar je bilo skupno število za 1 log enoto nižje kot v klavnici F2.

Brisom površin smo dodali vzorce proizvoda. Vsi so vsebovali več kot  $10^6$  CFU/g skupnih mikroorganizmov, koliformne bakterije in *E. coli*.

### 4.3 DOLOČANJE PATOGENIH MIKROORGANIZMOV

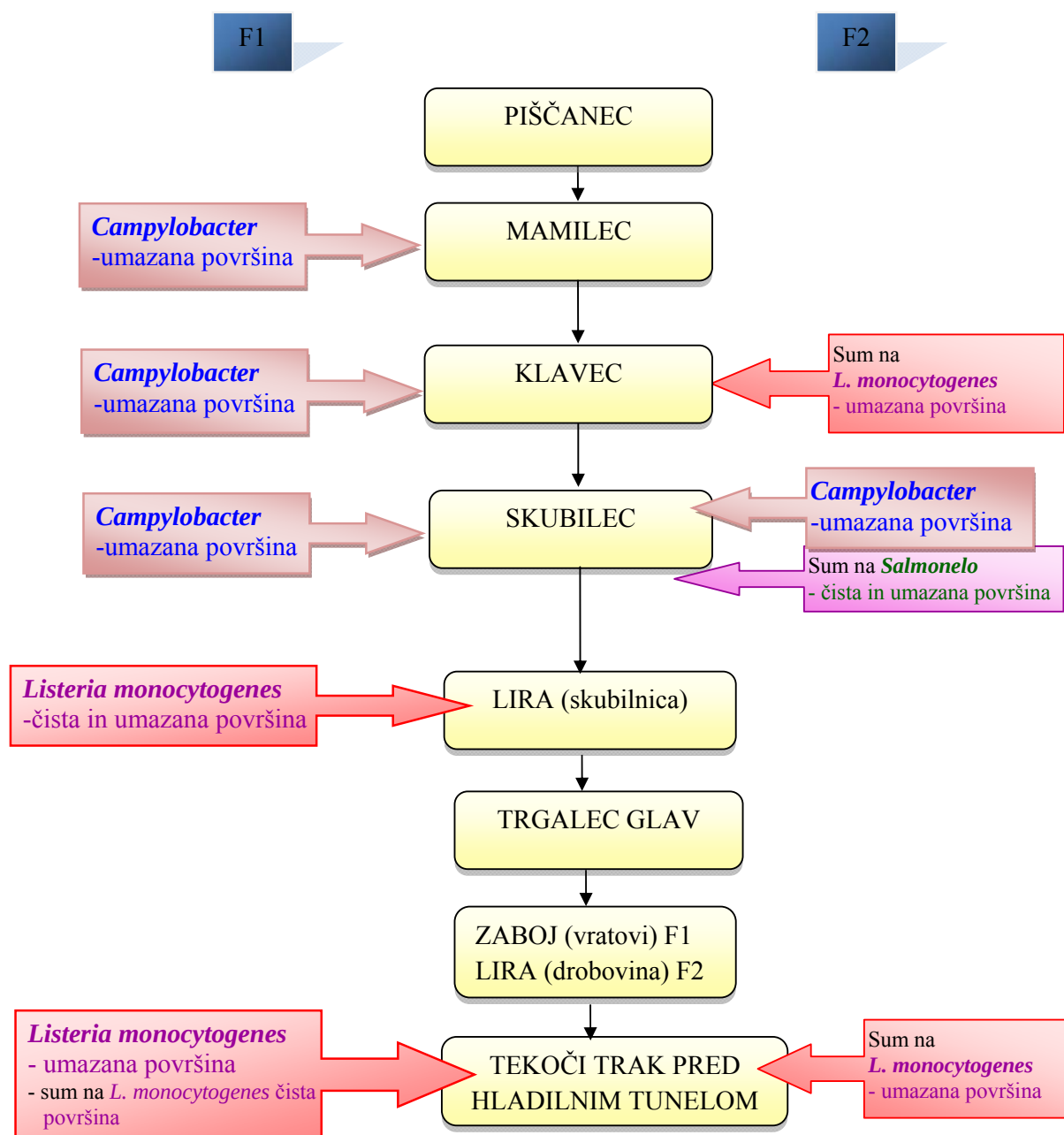
#### 4.3.1 Patogeni mikroorganizmi na površinah proizvodne linije

Na sliki 19 je shematsko prikazana proizvodna linija in rezultati ugotavljanja prisotnosti patogenih mikroorganizmov, ki smo jih pridobili z mikrobiološkimi analizami.

Analize na *Campylobacter* so bile opravljene le za nekaj vzorcev, za katere smo sumili, da bi lahko bili kontaminirani. Analizirali smo devet vzorcev, pet iz klavnice podjetja F1 in štiri iz klavnice podjetja F2. Na sami procesni liniji smo analizo na *Campylobacter* opravljali na treh vzorcih klavnice F1 in dveh vzorcih klavnice F2. Vsi vzorci (mamilec, klavec in skubilec) na procesni liniji v klavnici F1 so bili pozitivni na bakterijo *Campylobacter*, v klavnici F2 pa je bil pozitiven en 1 vzorec (skubilec). Rezultati analize so prikazani na spodnji shemi (Slika 19).

*Listeria monocytogenes* je bila prisotna le v klavnici podjetja F1 in sicer na liri v skubilnici (pred in po sanitaciji), na površini tekočega traku pred hladilnico (pred sanitacijo) in na vzorcu kože z vratu piščanca. Pri čistem vzorcu s tekočega traku pred hladilnim tunelom pa smo zaznali le rast tipičnih kolonij na gojišču, analiza z metodo PCR pa ni potrdila prisotnosti *L. monocytogenes*. V klavnici podjetja F2 o prisotnosti *L. monocytogenes* ne moremo z gotovostjo trditi, saj smo jo detektirali le po eni metodi, pa še tu je bila koncentracija tako nizka, da je PCR v realnem času enkrat pokazal pozitiven rezultat, drugič pa negativnega.

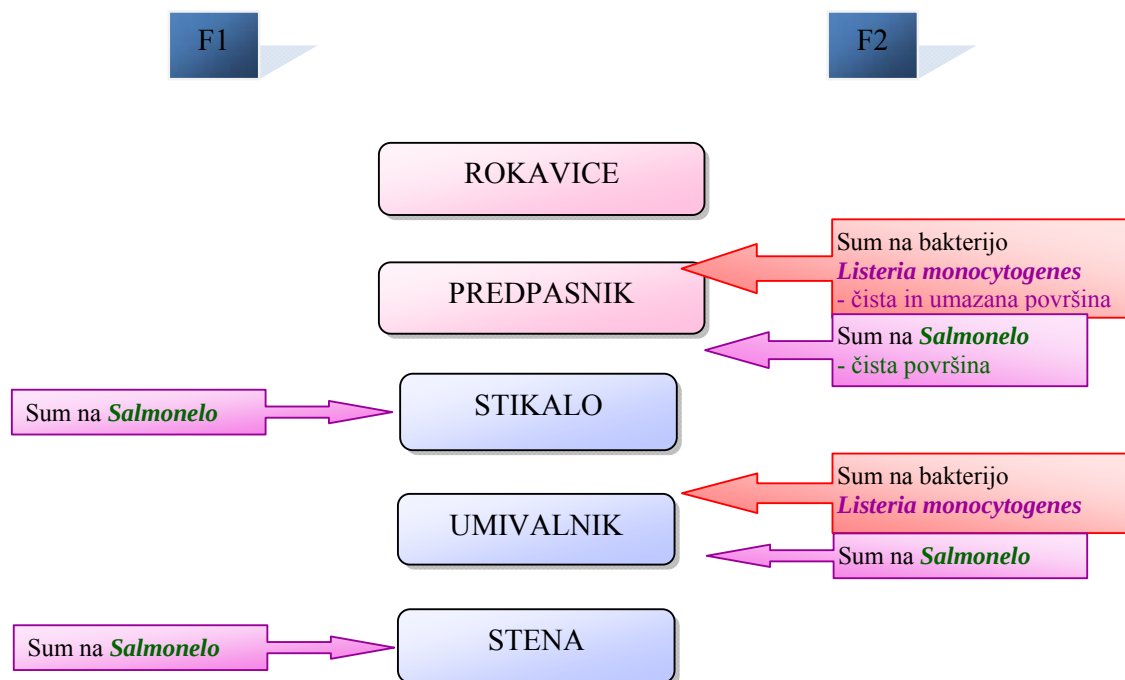
Prisotnost salmonele z obema uporabljenima metodama nismo potrdili v nobeni klavnici.



Slika 19: Shematičen prikaz rezultatov ugotavljanja prisotnosti patogenih mikroorganizmov na površinah v direktnem kontaktu z živilom (proizvodna linija) za F1 in F2.

#### 4.3.2 Patogeni mikroorganizmi na površinah v proizvodnem okolju

Ti vzorci niso bili testirani na bakterijo *Campylobacter*. V podjetju F1 nismo zaznali nobene kontaminacije s preiskovanimi patogenimi mikroorganizmi. Pri podjetju F2 pa so bili nekateri vzorci (predpasnik in umivalnik) pozitivni po molekularni metodi s PCR v realnem času, izolacija po ISO metodah pa nam ni uspela. Rezultati so prikazani na sliki 20.



Slika 20: Shematičen prikaz rezultatov ugotavljanja prisotnosti patogenih mikroorganizmov na površinah iz proizvodnega okolja

#### 4.3.3 Patogeni mikroorganizmi na proizvodu



Slika 19: Shematičen prikaz rezultata ugotavljanja prisotnosti patogenih m.o. na koži z vratu piščancev

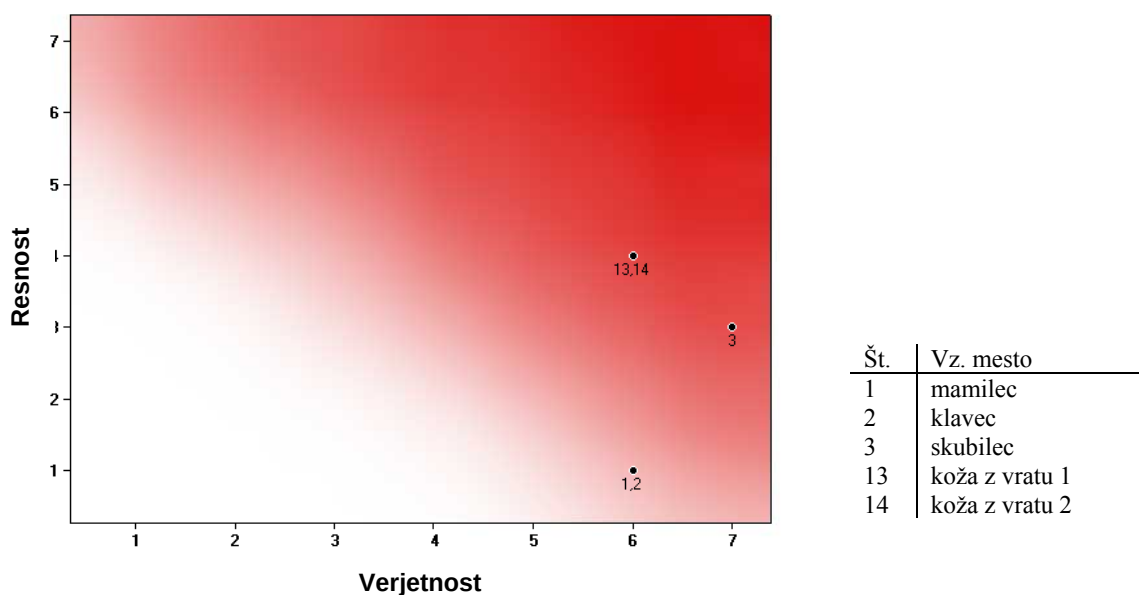
Koža z vratu piščanca je bila v obeh klavnicah kontaminirana z bakterijo *Campylobacter* in *Listeria monocytogenes*.

#### 4.4 PRIKAZ REZULTATOV S PROGRAMOM HYGRAM®

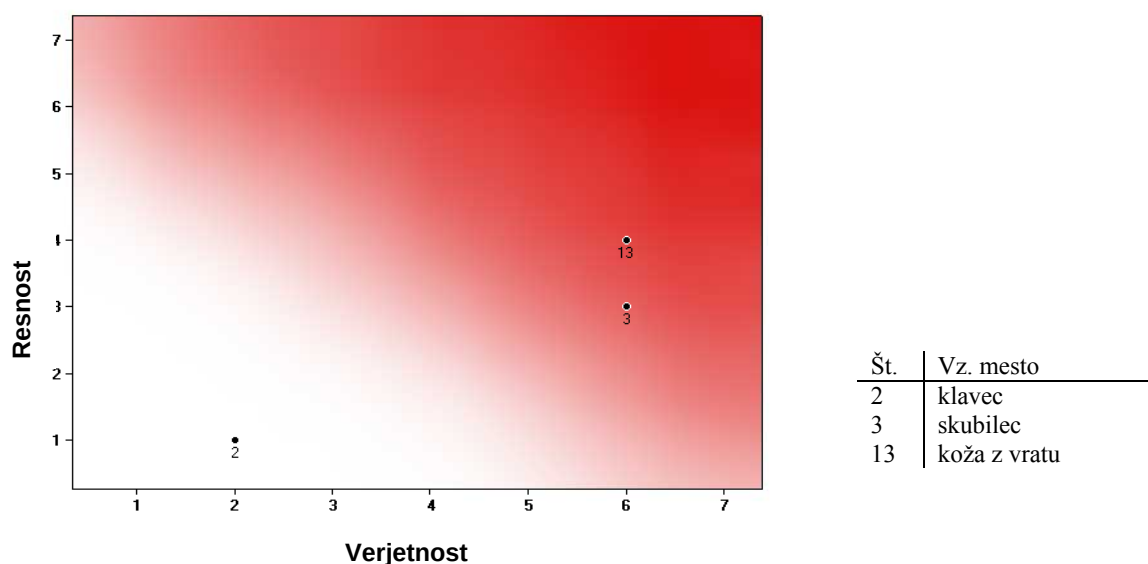
Rezultate mikrobioloških analiz smo na osnovi ocene verjetnosti in resnosti kontaminacije na določeno bakterijo vnesli v računalniški program Hygram®, ki nam je na podlagi teh podatkov izrisal grafe. Čim bolj so točke na grafu v rdečem območju (desni zgornji kot), tem večja je verjetnost oz. resnost kontaminacije.

##### 4.4.1 *Campylobacter*

Analizo na bakterijo *Campylobacter* smo izvedli le za devet vzorcev iz klavnice obeh podjetij (5 iz klavnice F1 in 4 iz klavnice F2).



Slika 20: Verjetnost in resnost okužbe z bakterijo *Campylobacter* v procesu podjetja F1

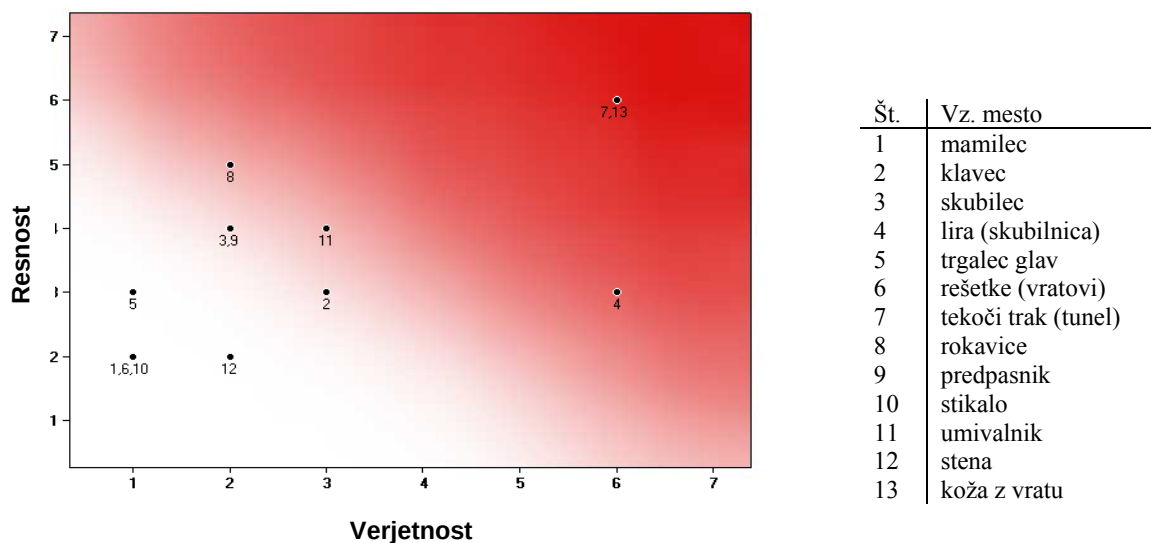


Slika 21: Verjetnost in resnost kontaminacije z bakterijo *Campylobacter* v procesu podjetja F2

Pri podjetju F1 so vse točke v rdečem območju, saj smo v vseh vzorcih (mamilec, klavec, skubilec in 2 vzorca kože z vratu) potrdili prisotnost kampilobaktrov, medtem ko je v podjetju F2 ena točka (klavec) izven rdečega območja, torej prisotnosti kampilobakterjev nismo zaznali.

#### 4.4.2 *Listeria monocytogenes*

Iz vzorcev, na katerih smo napravili analize prisotnosti bakterije *Listeria monocytogenes*, smo tako v klavnici F1, kot v klavnici F2 strnili 13 točk, ki smo jih nato glede na resnost in verjetnost mikrobiološke kontaminacije analizirali s programom Hygram®. Podatke smo vnesli tudi za tiste točke, kjer je bila kontaminacija identificirana le z eno od uporabljenih metod (F2).

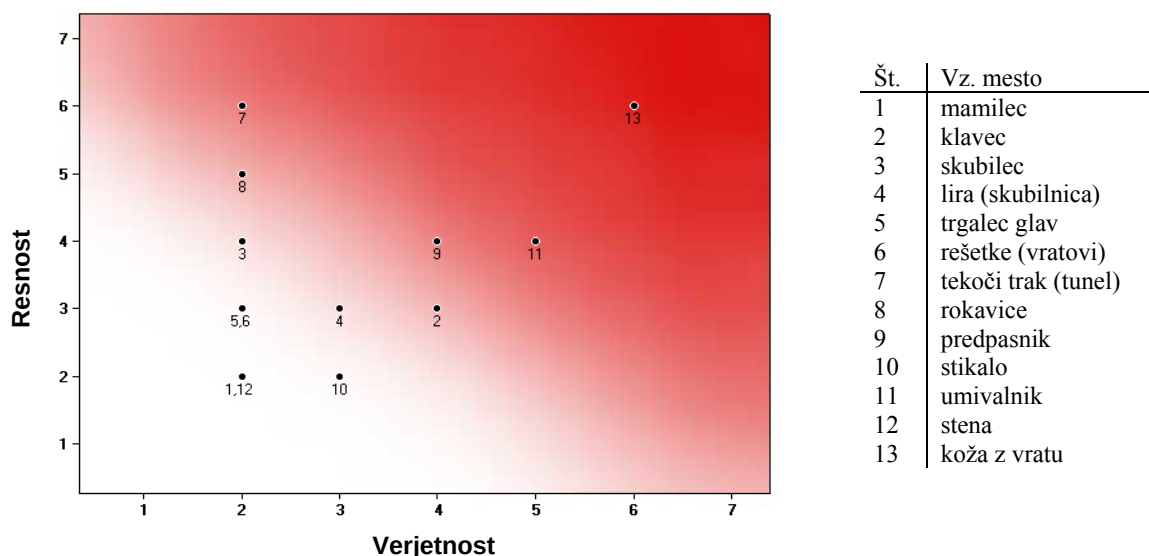


Slika 22: Verjetnost in resnost kontaminacije z bakterijo *Listeria monocytogenes* v procesu podjetja F1



*L. monocytogenes* smo zaznali v obeh podjetjih. V klavnici podjetja F1 smo jo detektirali po obeh metodah. Najbolj kritični mesti sta bili tekoči trak pred hladilnim tunelom in koža vratu (izdelek), ki sta tudi na grafu prikazani v izrazito rdečem območju in ju dojemamo kot najbolj resni glede problema kontaminacije. Sledi jima lira v skubilnici.

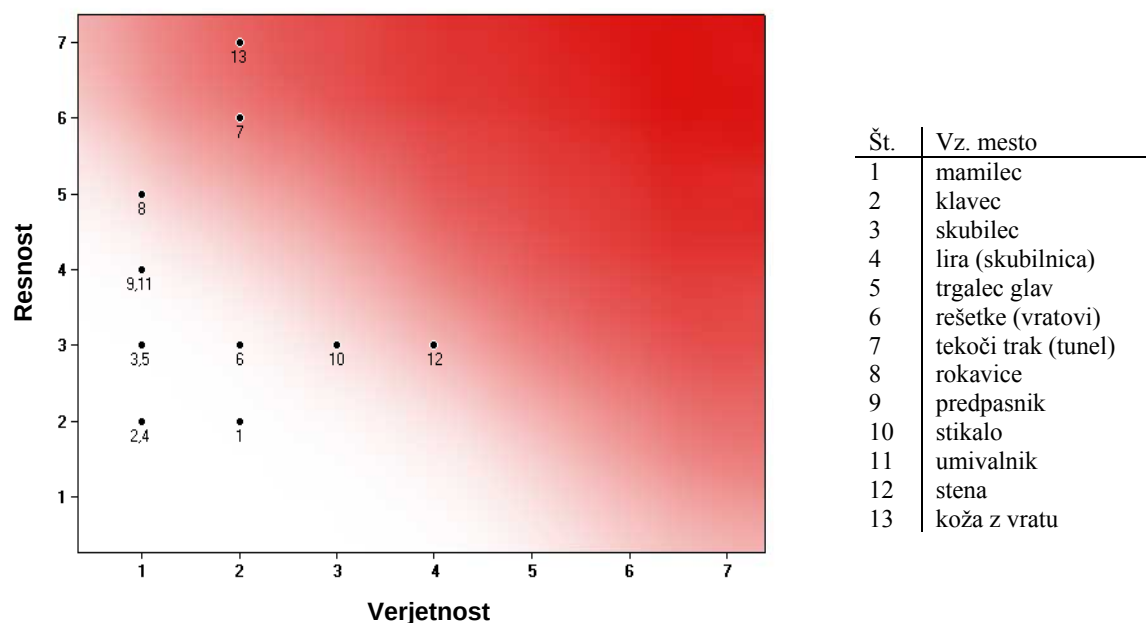
V klavnici F2 kontaminacije nismo zaznali z obema metodama, če pa smo že dobili pozitiven rezultat po molekularni metodi, je bila to nizka pozitivna vrednost, kar pomeni, da obstaja velika verjetnost, da pri naslednji ponovitvi pride do negativnega rezultata. Najbolj kritična točka v klavnici F2 je koža z vratu piščancev, ki se nahaja v skrajno rdečem območju. Ta je rdeča tudi v klavnici F1. V rdeče območje F2 spada še umivalnik.



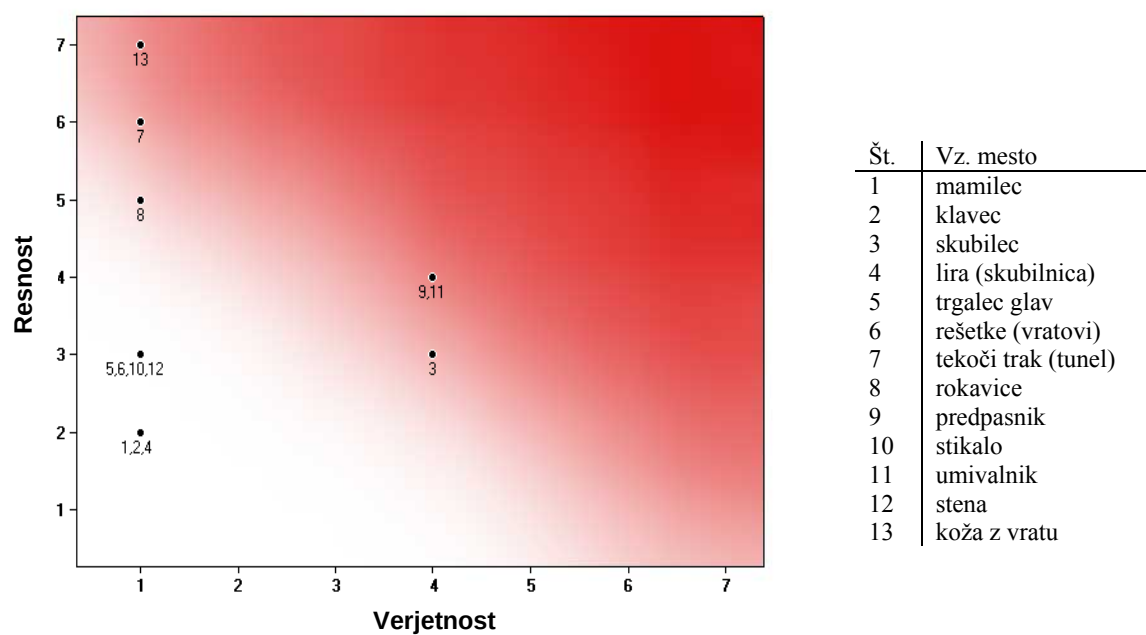
Slika 23: Verjetnost in resnost kontaminacije z bakterijo *Listeria monocytogenes* v procesu podjetja F2

#### 4.4.3 *Salmonella*

Iz vzorcev, na katerih smo napravili analize prisotnosti bakterije *Salmonella* spp., smo strnili 13 točk v klavnici F1, in prav toliko v klavnici F2, ki smo jih nato glede na resnost in pogostost mikrobiološke kontaminacije vstavili v program Hygram®. Podatke smo vnesli, čeprav je bil sum kontaminacija identificiran le z eno od uporabljenih metod.



Slika 24: Verjetnost in resnost kontaminacije z bakterijo *Salmonella* v procesu podjetja F1

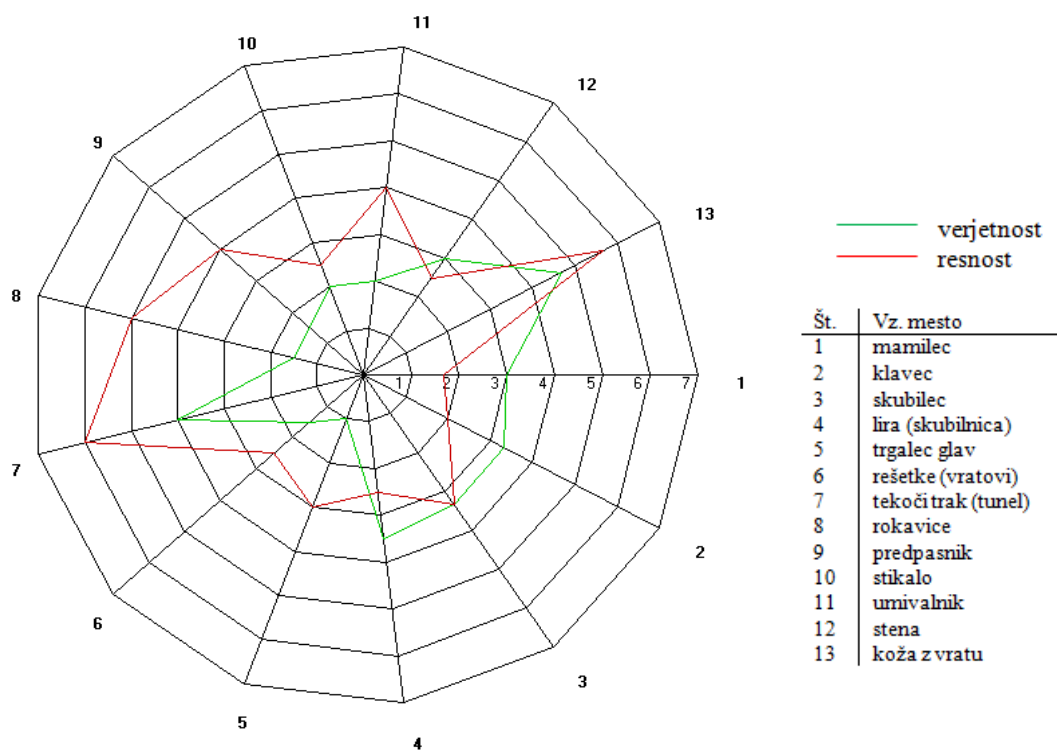


Slika 25: Verjetnost in resnost kontaminacije z bakterijo *Salmonella* v procesu podjetja F2

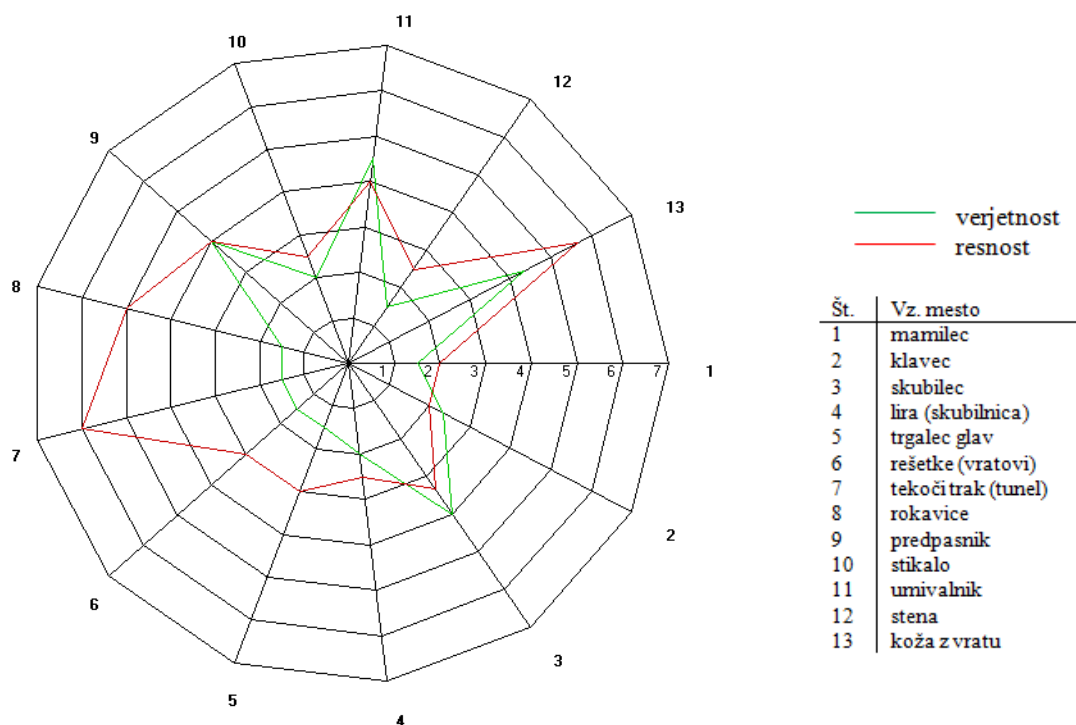
#### 4.4.4 Celoviti prikaz mikrobiološkega tveganja

Program ima možnost celovitega prikaza mikrobiološkega tveganja – v našem primeru za vse tri bakterijske patogene, na katere smo se osredotočili (*Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes* in *Salmonella spp.*). Prikaz mikrobiološkega tveganja je nekoliko drugačen od prikazov tveganja za posamezen patogen mikroorganizem. Mikrobiološko tveganje je prikazano v obliki pajkove mreže, kjer so točke glede na resnost in verjetnost mikrobiološkega tveganja na posamezni fazi procesa različno oddaljene od središča. Čim večja je verjetnost tveganja, tem bolj je točka oddaljena od središča in enako velja za resnost mikrobiološkega tveganja.

Resnost kontaminacije je najvišja pri tekočem traku pred hladilnim tunelom, saj je to zadnja faza obdelave. Visoko resnost kontaminacije predstavljajo rokavice, koža z vratu in umivalnik. V klavnici F1 je bila mikrobiološka kontaminacija pogosta pri samem izdelku (koži z vratu), na tekočem traku, na liri v skubilnici, skubilcu in klavcu. V klavnici F2 pa je bila pogosta mikrobiološka kontaminacija izdelka (kože z vratu), umivalnika, predpasnika in skubilca.



Slika 26: Celotno mikrobiološko tveganje v klavnici podjetja F1



Slika 29: Celotno mikrobiološko tveganje v klavnici podjetja F2

## 5 RAZPRAVA

V diplomskem delu smo ugotavljali pomankljivost sanitarnih postopkov na določenih mestih v perutninski klavnici. Potrdili smo prisotnost indikatorskih skupin (koliformnih bakterij in *E. coli*) in patogenih mikroorganizmov *Campylobacter spp.* in *Listeria monocytogenes*, ki smo jih potrdili z obema uporabljenima metodama. Nekaj rezultatov je izkazovalo tudi sum na prisotnost bakterije *Salmonella spp.*, vendar njena prisotnost ni bila potrjena z obema uporabljenima metodama. Rezultate smo nato obdelali s programom Hygram za oceno resnosti in verjetnosti mikrobiološke kontaminacije.

### 5.1 SNAŽNOST

Glede na sodobnejšo in novejšo opremo v podjetju F1 smo pričakovali, da bodo rezultati nekoliko drugačni in sicer, da bodo vzorci iz podjetja F1 manj mikrobiološko kontaminirani kot vzorci v podjetju F2. Vendar pa rezultati na sliki 18 izkazujejo, da skoraj vsi vzorci podjetja F1 vsebujejo več mikroorganizmov kot vzorci podjetja F2. Eden od možnih vzrokov je različen način sanitacije. V podjetju F2 uporabljajo poleg navadnih čistil in razkužil še čiščenje s penilnimi čistilnimi sredstvi. To poteka tako, da klavnico z vsemi aparaturami do določene višine poškopijo s peno in jo po določenem času delovanja odstranijo. V podjetju F1 pa penilnih čistil ne uporabljajo. Drugi možni vzrok za takšen rezultat pa bi bil lahko tudi odvzem vzorcev oziroma razlika pri odvzemu, saj sta vzorčili dve različni osebi - ena v podjetju F1, druga pa v podjetju F2. Odvzem vzorca je odvisen tudi od površine in sile pritiska na vzorčno mesto.

### 5.1.1 Snažnost na proizvodni liniji

Glede na rezultate, ki so prikazani na slikah 16 in 17, lahko rečemo, da je skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov ponekod preseglo mejne vrednosti, ki po uredbi EU 2073/2005 znašajo  $m=3,5 \log \text{CFU/cm}^2$  in  $M=4,5 \log \text{CFU/cm}^2$  (Commission Regulation, 2007). Iz tega lahko sklepamo, da so bili postopki sanitacije na nekaterih površinah neučinkoviti.

Na proizvodni liniji klavnice F1 smo pri vseh vzorcih, odvzetih pred sanitacijo, razen pri vzorcu K4 (lira - skubilnica) potrdili visoko skupno število mikroorganizmov, ki je po sanitaciji na nekaterih vzorčnih mestih (K1, K2, K7) padlo pod zahtevano zgornjo mejo ( $M=4,5 \log \text{CFU/cm}^2$ ). Ostala vzorčna mesta na proizvodni liniji klavnice F1 po sanitaciji niso ustrezala omenjenemu kriteriju. Na vzorčnem mestu K3 smo vzorčili površino skubilca. Tu poteka odstranjevanje perja, na katerem je veliko nečistoč, tako mikrobioloških kot fizikalnih. Na umazani površini, kjer so ostanki perja in ostale umazanije (blato, insekti,...) lahko pri vzorčenju z brisom pobremo le površinske mikrobe, saj zaradi sluzastega sloja nečistoč, ki nastanejo med procesom skubljenja, ne dosežemo neposredne površine gumijastih prstov. Gumijasti prsti skubilca se s časoma obrabijo in poškodujejo, nastanejo majhne razpoke, v katerih se naberejo mikroorganizmi in tvorijo biofilme, ki jih zavarujejo pred sanitacijo (Arnold, 2007). Tako so po sanitaciji, na navidezno čisti površini, mikroorganizmi lahko prisotni v večjem številu (koncentrirani v razpokah), kot pred sanitacijo.

Na proizvodni liniji klavnice F2 smo pri treh vzorcih pred sanitacijo opazili odstopanje od zgornje kritične meje. Ti vzorci K3, K4 in K7 niso ustrezali kriteriju. Vsi ostali vzorci pa so vsebovali nižje skupno število mikroorganizmov. Tudi vsi vzorci po čiščenju so ustrezali kriteriju.

#### Prisotnost bakterije *E.coli*:

Na nekaterih mestih smo odkrili tudi bakterijo *E. coli*, ki v skladu z mikrobiološkimi kriteriji ne sme biti prisotna na  $100 \text{ cm}^2$  vzorčene površine (LFMFP, Univerza v Ghentu, Belgija).

Tudi v klavnici podjetja F1 je bila *E. coli* prisotna tako pred čiščenjem, kot tudi na nekaterih površinah po čiščenju. Pred čiščenjem smo prisotnost *E. coli* zaznali na vzorcih s celotne procesne linije. Po čiščenju pa smo ugotovili prisotnost *E. coli* v vzorcih K3-C, K5-C, K6-C in K7-C. Iz rezultatov lahko sklepamo, da prisotnost bakterije na proizvodni liniji v klavnici F1 predstavlja higienski problem (slika 17).

V klavnici F2 se je *E. coli* na proizvodni liniji pojavljala le na mestih pred sanitacijo, se pravi med potekom predelovalnega procesa (z izjemo na vzorčnem mestu K7), zato lahko sklepamo, da je prišlo do prenosa na linijo preko piščančjih trupov. Na površinah pred čiščenjem smo *E. coli* zaznali na vzorčnem mestu K3-D, K4-D, K5-D in K7-D. Po sanitaciji so bili vzorci ustrezni (slika 17).

### 5.1.2 Snažnost v proizvodnem okolju

Rezultati snažnosti površin v proizvodnem okolju so še posebej zanimivi za vzorca HK1 in HK2 - rokavice in predpasnik (slika 18). Na površini HK1-C (po sanitaciji) nismo zaznali mikroorganizmov, medtem ko smo na površini pred sanitacijo (HK1-D) v F1 zaznali 4,8 log CFU/cm<sup>2</sup> skupnih mikroorganizmov, kar je nad zgornjo dovoljeno mejo, torej je bil vzorec neustrezen. Pri vzorcu F2 pa je število ugotovljenih skupnih mikroorganizmov znašalo 3,9 log CFU/cm<sup>2</sup>, vendar smo ugotovili tudi prisotnost koliformnih mikroorganizmov in *E. coli*. Slednja je bila prisotna v visokem številu 3,1 log CFU/cm<sup>2</sup>, kar tudi ta vzorec uvrsti v kategorijo neustreznih.

Iz rezultatov lahko potrdimo, da v obeh obratih uporabljajo nove rokavice, ki jih po uporabi zavržejo.

Nekoliko drugače je bilo z vzorci HK2 (predpasniki). V klavnici F1 uporabljajo pralne predpasnike. Pri vzorcih HK2-C (po sanitaciji) smo na čisti površini zaznali več kot 6 log CFU/cm<sup>2</sup> skupnih mikroorganizmov, na HK2-D (pred sanitacijo) pa se je bilo število skupnih mikroorganizmov 4,9 log CFU/cm<sup>2</sup>. Vzorec HK2 iz klavnice F1 je bil mikrobiološko neustrezen, tako pred sanitacijo, kot po njej.

V klavnici F2 pa uporabljajo vsak dan nove predpasnike, ki jih po uporabi zavržejo. Začetno število mikroorganizmov na HK2 je bilo torej zanemarljivo, po uporabi pa je naraslo na približno 4 log CFU/cm<sup>2</sup>. Dodatni vzorci s proizvodnega okolja so bili HK3 (stikalo), HK4 (umivalnik) in HK5 (stena). Število skupnih mikroorganizmov HK3 pri obeh obratih (F1 in F2) spada pod mejno vrednost. Pri F1 smo zaznali 1,8 log CFU/cm<sup>2</sup>, v F2 pa 3,1 CFU/cm<sup>2</sup>, brez koliformnih mikroorganizmov in *E. coli*. Vsebnost skupnih mikroorganizmov vzorca HK4 v klavnici F1 je znašala 5,7 CFU/cm<sup>2</sup>, vključno s koliformnimi bakterijami in *E. coli*. Vzorec HK4 v klavnici F1 je bil s higienskega vidika nezadovoljiv, vzorec HK4 v klavnici F2 pa je vseboval 3,9 log CFU/cm<sup>2</sup> skupnih mikroorganizmov, vključno s koliformnimi bakterijami. Vzorec HK5 v klavnici F1 je vseboval 3,4 log CFU/cm<sup>2</sup> je vseboval, ter koliformne bakterije in *E. coli*, torej je bil nezadovoljiv s higienskega vidika. Ostali vzorci so ustrezali higienskim kriterijem.

### 5.2 DOKAZ PATOGENIH MIKROORGANIZMOV

V skladu z uredbo EU 2073/2005 morajo biti *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* in *Salmonella*, odsotni v 25 g vzorca živila oz. odsotni na testnem območju (100 cm<sup>2</sup>) (Commission Regulation, 2007).

V perutninskih klavnicah smo se osredotočili na izolacijo in dokazovanje prisotnosti patogenih bakterij *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* in *Salmonella* spp., s klasičnimi metodami po ISO standardih in z molekularno metodo PCR v realnem času. Rezultati analiz so potrdili prisotnost bakterijskih vrst *Campylobacter* spp. in *Listeria monocytogenes*, v obeh klavnicah in z pbema metodama. Bakterije vrste *Salmonella* pa smo detektirali le z eno od uporabljenih metod.

### *Campylobacter*

Prisotnost bakterije *Campylobacter* smo zaradi omejitve časa raziskave ugotavljali le v devetih vzorcih, odvzetih iz obeh klavnic (5 vzorcev iz klavnice F1 in 4 vzorci iz klavnice F2). Raziskali smo vzorce površin na začetku procesne linije ter vzorce površine piščančjih trupov (koža z vratov) v obeh klavnicah.

V klavnici F1 smo dobili vseh pet vzorcev pozitivnih. To so bili brisi z umazane površine K1-D (mamilec), K2-D (klavec) in K3-D (skubilec) ter dva vzorca KV (koža z vratu piščancev).

V klavnici F2 pa smo vzeli le štiri vzorce in sicer bris umazane površine K2-D in K3-D ter dva vzorca KV. Kampilobakter je bil prisoten v 75 % vzorcev. Analiza brisa s površine K2-D ni pokazala prisotnosti kampilobaktra, zaznali smo ga v ostalih vzorcih.

Podatke smo vnesli v računalniški program Hygram® in dobili 2 grafična prikaza (slika 22 in slika 23) za vsako klavnico posebej. Če primerjamo grafa med seboj, lahko vidimo, da se vzorec K2 v klavnici F1 nahaja nekje na meji rdečega območja, kar pomeni, da obstaja visoka verjetnost in nizka resnost kontaminacije na tej točki. V klavnici F2 se vzorec K2 nahaja izven rdečega območja, kar pomeni, da je tako resnost, kot tudi verjetnost mikrobiološke kontaminacije s to bakterijo nizka. K3 se v obeh primerih nahaja v rdečem območju, kar pomeni, da smo kontaminacijo s kampilobaktri zaznali in jo ocenili kot precej resno. Zelo resno tveganje v obeh klavnicah predstavljajo tudi vzorci KV, ki so tudi postavljeni v rdeče območje. Ker so bili vzorci za analizo na bakterijo *Campylobacter* vzeti z začetka procesne linije in ker smo njihovo prisotnost zaznali tudi na površini trupov (vzorci kože z vratu), lahko sklepamo, da bi tudi na ostalih mestih med procesno linijo lahko odkrili prisotnost tega patogena, torej bi bile nadaljnje točke pretežno v rdečem območju.

### *Listeria monocytogenes*

Skupno 44 vzorcev smo analizirali na bakterijo *Listeria monocytogenes* in sicer 22 v vsaki klavnici. V klavnici F1 smo v štirih vzorcih ugotovili prisotnost te bakterije, kar 18,2 % analiziranih vzorcev. Vzorce smo analizirali po kultivacijski metodi po ISO standardih in s PCR v realnem času. To so bili vzorci: K4-C in K4-D (lira v skubilnici; po in pred sanitacijo), K7-D (površina tekočega traku pred hladilnico) in KV (koža z vratu piščancev). V klavnici podjetja F2 smo prisotnost listerije potrdili le v vzorcu KV. Pri ostalih vzorcih pa na petrijevih ploščah z gojišči listerije nismo zaznali. Zasledili pa smo jo z molekularno metodo PCR, vendar je bila koncentracija bakterijske DNK zelo nizka, saj je aparatura enkrat pokazala pozitiven, drugič pa negativen rezultat. Zato o prisotnosti *L. monocytogenes* v klavnici F2 ne moremo z gotovostjo trditi, vsekakor pa obstaja sum na ta patogen v vzorcih K2-D, HK2-C in HK2-D ter HK4. Chiarini in sodelavci (2009) so v Braziliji prav tako ugotavljali prisotnost *L. monocytogenes* v dveh različnih perutninskih obratih, kjer so vzeli neprimerljivo več vzorcev kot mi. Ugotovili so, da so sicer *L. monocytogenes* izolirali iz vseh vrst vzorcev v čistem območju, vendar je bila *L. monocytogenes* pogostejše prisotna v vzorcih s klavnice z avtomatsko evisceracijo. V našem primeru smo uspeli detektirati *L. monocytogenes* v klavnici F1, ki je sodobnejša in bolj avtomatizirana kot klavnica F2, ki je starejša.

Podatke smo analizirali tudi z računalniškim programom Hygram®. V obeh klavnicah sta v izrazito rdečem območju prikazana vzorca KV, kar pomeni, da gre za visoko resnost in tudi

verjetnost kontaminacije. V rdeče območje klavnice F1 spada še K7, sledi pa mu še K4. Pri klavnici F2 pa v rdeče območje spada vzorec HK4, tega smo uvrstili dokaj visoko glede resnosti kontaminacije, saj menimo da je kljub nižji verjetnosti kontaminacije to točka, na katero moramo biti še posebno pazljivi. V klavnici se nahaja zato, da očistimo roke in morebitne pripomočke. Poleg tega lahko tu pride do navzkrižne kontaminacije, saj si čistijo roke osebe z različnih delovnih mest na procesni liniji.

### *Salmonella*

Prisotnost salmonele v vzorcih nam v klavnicah ni uspelo dokazati po obeh metodah. V klavnici F1 smo po klasični metodi zaznali rast kolonij, tipičnih za salmonelo, vendar je z molekularno PCR metodo nismo potrdili. To sta bila vzorca HK3 in HK5. V klavnici F2 pa smo v dveh vzorcih po molekularni metodi v enem poizkusu od dveh dobili pozitiven rezultat. To sta bila vzorec čiste površine HK2-C in vzorec HK4. Prav tako pa smo pri vzorcu K3-C in K3-D opazili rast kolonij, tipičnih za salmonelo, vendar smo po analizi s PCR metodo dobili negativen rezultat.

Rezultate smo vnesli v program Hygram<sup>®</sup>. V klavnici F2 sta najbolj kritični točki vzorčenja HK1 in HK4, s slednjo prihaja v stik celotno osebje, zato je nevarnost tveganja razmeroma visoka.

## 5.3 ANALIZA KT, KKT IN DODATNIH VZORČNIH MEST S PROGRAMOM HYGRAM<sup>®</sup>

Mesta vzorčenja, ki smo jih vključili v eksperimentalni del naloge, so skladna z dvema kritičnima kontrolnima točkama v klavnicah. Prva KKT je skubljenje, kjer poteka proces odstranjevanja perja in poteka mikrobiološka kontrola. Na tej točki smo vzorčili notranjo površino skubilca. Druga KKT pa je hlajenje trupov, kjer poteka kontrola temperature. Tu smo vzorčili površino tekočega traka takoj na začetku hladilnega tunela in pa kožo z vratu piščancev. Dobljene rezultate analiz na patogene mikroorganizme smo obdelali z računalniškim programom Hygram<sup>®</sup>. Ta nam je podal grafičen prikaz mikrobiološkega tveganja v obliki pajkove mreže, s katerega smo lahko razbrali resnost in verjetnost kontaminacije vseh vzorčnih mest.

Za skubilec velja, da je na tem mestu tako v klavnici F1, kot v klavnici F2 pogosta mikrobiološka kontaminacija, kar je logično, saj je to najbolj umazana aparatura v klavnici. Na njej poleg perja najdemo blato, insekte, itd. Torej je skubilec KKT, saj pri tem procesu obstaja velika verjetnost mikrobiološke kontaminacije, ki jo lahko kontroliramo z vsakodnevnim temeljitim čiščenjem in rednim vzdrževanjem ter menjavanjem gumijastih prstov v skubilcu. Arnold in Silvers (2000) sta ugotovila, da gumijasti prsti preprečujejo pritrditev bakterij na površino, celo bolje kot nerjaveče jeklo. Nekatere študije so pokazale, da novi gumijasti prsti v skubilcu lahko celo inhibirajo rast naravne mikrobne populacije na piščančjih trupih. Po določenem času pa se pojavijo spremembe na površini prstov v skubilcu, ki jih lahko opazimo s prostim očesom. Formirajo se razpoke in guma nabrekne, v njih pa se nabere nečista tekočina. Te spremembe lahko zagotovijo ugodne niše za bakterijsko pritrditev in razvoj biofilma. Nastanek biofilma je postopek, pri katerem se bakterije pritrdijo in se obdajo z zaščitnim slojem proteinov in polisaharidov. Bakterije, ki povzročajo kvar in



patogene bakterije so lahko ujete v biofilmih in nato lahko kontaminirajo izdelke in ogrožajo varnost živil med predelavo (Arnold, 2007).

Naslednjo KKT (hlajenje trupov) povzemamo z dvema vzorčnima mestoma. Iz grafičnega prikaza rezultatov za vzorčno mesto tekoči trak pred hladilnim tunelom lahko razberemo resen problem, če do kontaminacije pride, saj je to zadnja faza v klavnici. Tu gredo trupi piščancev na proces zračnega hlajenja, ki se dogaja v prekatih hladilnega tunela, pri zelo nizki temperaturi ( $-6^{\circ}\text{C}$  na  $+2^{\circ}\text{C}$ ), ter z 69 % relativno vlažnostjo, približno 100 minut. Na koncu hlajenja imajo piščančji trupi od  $4$  do  $9^{\circ}\text{C}$ . Ta temperatura preprečuje rast mikroorganizmov, ki niso psihrotrofni, in zavre rast psihrotrofnim mikroorganizmom (Arvanitoyannis in Varzakas., 2009). Verjetnost mikrobiološke kontaminacije vzorca površine tekočega traku je bila nekoliko večja v klavnici F1, vendar je mikrobiološko onesnaženje obstajalo na vzorčnih mestih v obeh klavnicah. Za vzorec površine proizvoda (koža v vratu piščanca) lahko zaključimo, da je verjetnost mikrobiološke kontaminacije pogosta in predstavlja resen problem. Thomas in McMeekin sta v Tasmaniji (1980) raziskovala kontaminacijo piščančjih trupov in ugotovila, da na splošno predelovalni postopki povzročijo znatno zmanjšanje števila živih aerobnih mikroorganizmov na površini piščančjih trupov. Število psihrotrofnih bakterij je po vsaki fazi predelave naraslo, še posebno med pranjem in fazami hlajenja, medtem ko je bila koža sveže oskubljenih trupov brez psihrotrofnih mikroorganizmov. Mikroskopski podatki njune študije pa so dokazali, da se pri procesu skubljenja odstrani tudi plast epidermisa in posledično tudi mikrobi, ki naseljujejo roženo plast. Koža je potem bolj izpostavljena kolonizaciji mikroorganizmov, s katerimi pride v stik med postopkom skubljenja in nadaljnjih procesov v predelavi. Glede na to, da predstavljata tako tekoči trak pred hladilnim tunelom kot tudi koža v vratu visoko mikrobiološko tveganje, lahko s pomočjo programa potrdimo tudi to KKT.

Vzorci, odvzeti z dodatnih mest HK3, HK4 in HK5 (stikalo, umivalnik, stena) za informativni pregled higiene v klavnici so nam po obdelavi s programom prikazali zanimiv rezultat. Iz slik 28 in 29 lahko ugotovimo, da bi bilo primerno vršiti kontrolo higiene tudi na nekaterih od teh mest. V klavnici F1 je izstopal vzorec HK5, kjer smo zaznali patogene mikroorganizme, vendar smo ocenili, da je stopnja mikrobiološke kontaminacije nizka.

V klavnici F2 pa je z mikrobiološko kontaminacijo izstopal vzorec HK4 (umivalnik). Tudi v vzorcu HK4 v klavnici F1 smo ugotovili kontaminacijo. Ker smo ocenili, da je stopnja nevarnosti mikrobiološke kontaminacije s produktom visoka, bi bilo smiselno to vzorčno mesto vključiti v KT.

Vzorčno mesto HK3 (stikalo) je bilo pri obeh obratih kontaminirano, kar nikakor ni zanemarljivo. Resnost nevarnosti mikrobiološke kontaminacije pa je bila na tej točki približno enaka kot pri vzorcu HK5, ki ga nismo uvrstili med KT. Vendar je bila verjetnost mikrobiološke kontaminacije na tem mestu nekoliko večja, torej bi bilo smiselno vršiti nadzor nad to točko.

Pri analizi dodatnih vzorčnih mest smo ugotovili, da bi bilo smiselno dve mesti uvrstiti med KT in sicer vzorčno mesto HK3 in vzorčno mesto HK4.

Nadzor s sistemom HACCP in njegovo nenehno izboljševanje ter uvedba nekaterih pomožnih orodij za oceno tveganja v perutninski klavnici, lahko le zmanjšajo število patogenih mikroorganizmov in nekaterih parazitov, ne morejo pa jih popolnoma eliminirati. Torej je glede varnosti hrane še vedno zelo pomembna zadnja faza, to je faza potrošnika in njegovo ravnanje: pravilna priprava in zadostna toplotna obdelava piščančjih proizvodov (Tsola in sod, 2008).

## 6 SKLEPI

Pri našem delu smo ugotavljali mikrobiološko tveganje v dveh perutninskih klavnicah. Poskušali smo določiti prisotnost indikatorskih mikroorganizmov (koliformnih bakterij in *E. coli*) ter treh patogenih mikroorganizmov: *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* in *Salmonella*. Dobljene podatke smo vnesli v računalniški program Hygram® in z njim ocenili resnost in verjetnost kontaminacije ter tako potrditi kritične kontrolne točke.

Na podlagi eksperimentalnega dela smo prišli do naslednjih sklepov:

- ✓ Rezultati mikrobiološke analize so potrdili prisotnost indikatorskih skupin mikroorganizmov pred in tudi po sanitaciji proizvodne linije in okolja.
- ✓ Potrdili smo prisotnost patogenih mikroorganizmov v obeh klavnicah in sicer *Campylobacter* spp. in *L. monocytogenes*. Bakterij *Salmonella* spp. nismo uspeli izolirati.
- ✓ Na podlagi rezultatov obdelave podatkov s programom Hygram® smo potrdili obstoječe kritične kontrolne točke v klavnici. Med kontrolne točke bi bilo smiselno uvrstiti tudi nekatera nova vzorčna mesta (umivalnik, stikalo).

## 7 POVZETEK

Poraba perutnine, zlasti piščančjega mesa, v prehrani strmo narašča. Po njem segajo tudi predstavniki rizičnih skupin (otroci, starejši in nosečnice), zato moramo toliko bolj stremeti k njegovi mikrobiološki neoporečnosti. Današnji hiter ritem življenja je do neke mere spremenil tudi naš način prehranjevanja. Masovna priprava obrokov in prodaja delno ali v celoti pripravljene hrane prispevajo k povečanju tveganja okužbe in/ali zastrupitve s hrano. Zato je pomembno, da imamo že v začetnih fazah pridelave in obdelave živil primerno orodje za nadzor- kot tako se je izkazal sistem HACCP s svojimi sedmimi načeli.

S pomočjo že postavljenega sistema HACCP v klavnicah dveh perutninsko predelovalnih podjetij smo določili vzorčna mesta, iz katerih smo odvzeli 44 vzorcev (v vsaki klavnici 22). Ta mesta so zajemala že obstoječe kritične kontrolne točke in nekaj novih predvidoma kritičnih točk. Vzorce površin (pred in po čiščenju) smo vzorčili z metodo brisov, kot vzorec izdelka oz. polizdelka pa smo aseptično odvzeli vzorec kože, saj je to del piščanca, ki je v neposrednem stiku z okolico.

S pomočjo mikrobioloških analiz smo z uporabo že pripravljenih gojišč (compact Dry TC in Compact Dry EC) določili skupno število mikroorganizmov, koliformne mikroorganizme in *E. coli*. Z izolacijo teh mikroorganizmov na nekaterih površinah klavnice po čiščenju smo dokazali pomanjkljivost sanitacijskih postopkov v opazovanih klavnicah.

Analizirali smo tudi prisotnost patogenih bakterij v vzorcih. Osredotočili smo se na detekcijo in izolacijo bakterij rodov *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* in *Salmonella*. Za analizo na kampilobakte smo izbrali le devet vzorcev, ki smo jih izolirali po standardu ISO 10272-1. Izolacija *L. monocytogenes* v klavnicah je potekala po standardni metodi ISO 11290-1. Po standardni metodi ISO 19250 smo poskusili izolirati salmonele. Za vsakega od teh mikroorganizmov smo izvedli tudi molekularno identifikacijo na osnovi PCR v realnem času in tako potrdili rezultat. Ugotovili smo, da so kampilobakterji zagotovo prisotni v obeh klavnicah, *L. monocytogenes* v klavnici F1, ki ima novejšo aparature, sumljiva pa so tudi nekatera mesta v klavnici F2, in da prisotnost bakterije *Salmonella* nismo potrdili z obema metodama.

Dobljene rezultate analiz na patogene mikroorganizme smo nato obdelali z računalniškim programom Hygram®, ki nam je podal mikrobiološko tveganje za patogene bakterije *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* in *Salmonella*. Resnost in verjetnost mikrobiološkega tveganja je bila različna. V obeh klavnicah je bila najbolj resna mikrobiološka kontaminacija na tekočem traku v hladilnem tunelu, verjetnost kontaminacije v tej točki pa je bila v klavnici F1 višja kot v klavnici F2. S pomočjo programa smo preverili nekatere obstoječe KKT v obeh klavnicah - proces skubljenja in hlajenja trupov. Program Hygram® je potrdil obe točki kot KKT. Glede na podane rezultate, pa bi lahko dodali še 2 vzorčni mesti pod KT in sicer umivalnik in stikalo.

Nadzor s sistemom HACCP in njegovo nenehno izboljševanje ter uvedba nekaterih pomožnih orodij za oceno tveganja v perutninski klavnici, lahko le zmanjšajo število patogenih m.o. in nekaterih parazitov, ne morejo pa jih popolnoma eliminirati. Torej je glede varnosti hrane še vedno zelo pomembna zadnja faza, to je faza potrošnika in njegovo ravnanje: pravilna priprava in zadostna toplotna obdelava piščančjih proizvodov (Tsola in sod, 2008).

## 8 VIRI

- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-42
- ANI Biotech. 2008. ANI™ *Salmonella* test (Kat št. 1-008-000). Helsinki, ANI Biotech: 1 str.
- Arnold J.W. 2007. Bacterial contamination on rubber picker fingers before, during and after processing. *Poultry Science*, 86: 2671-2675
- Arnold J.W., Silvers S. 2000. Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation. *Poultry Science*, 79: 1215-1221
- Arvanitoyannis I.S., Kassaveti A. 2009. HACCP and ISO 22000: A comparison of the two systems V: HACCP and ISO22000: Application to foods of animal origin. Arvanitoyannis I.S. (ed.). West Sussex, Wiley-Blackwell: 3-45
- Arvanitoyannis I.S., Varzakas H.T. 2009. Poultry. V: HACCP and ISO 22000: Application to foods of animal origin. Arvanitoyannis I.S. (ed.). West Sussex, Wiley-Blackwell: 177-308.
- Batič M. 2006. Indikatorski mikroorganizmi. Predavanja pri predmetu Voda, odplake, odpadki. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: Oddelek za živilstvo: 1-19
- BioMérieux® 2003. API® *Listeria*. Marcy-l'Etoile, BioMérieux®: 1 str.
- Bio-Rad Laboratories. 2006. Applications Guide: Real-Time PCR. München, Bio-Rad Laboratories: 105 str.  
<http://www.bio-rad.com> (23. maj. 2010)
- Chiarini E., Tyler K., Farber J.M., Pagoto F., Destro M.T. 2009. *Listeria monocytogenes* in two different poultry facilities: Manual and automatic evisceration. *Poultry Science*, 88: 791-797
- Codex Alimentarius. 1997. Food hygiene: Basic texts. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization: 58 str.  
<http://www.haccphelp.com/documents/Codex.pdf> (06.09.2010)
- Codex Alimentarius Commission. 2010. Report of the forty-second session of the Codex Committee on Food Hygiene. Rome, Joint FAO/WHO Food Standards Programme: 116 str.  
[http://www.ift.org/public-policy-and-regulations/advocacy/~media/Public%20Policy/International%20Advocacy/Codex\\_CCFH.pdf](http://www.ift.org/public-policy-and-regulations/advocacy/~media/Public%20Policy/International%20Advocacy/Codex_CCFH.pdf) (25. feb. 2011)

Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5. December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union, 50, L322: 12-29

Corrigendum to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs. 2004. Official Journal of the European Union, 47, L139: 22-82

Curtis L. 2007. Campylobacter. London, Food safety watch, The science of safe food: 1 str.  
<http://www.foodsafetywatch.com/public/498.cfm> (20. feb. 2011)

Debevere J., Uyttendaele M., Devlieghere F. and Jacxsens L. 2006. Microbiological guide values and legal microbiological criteria. Gent, Laboratory of Food Microbiology and Food Preservation (LFMFP-UGent), Ghent University: 66 str.

Eschrich I., Domenech E., Baert K. 2006. Design of implementation of on HACCP system. V: Safety in the agri-food chain. Luning P.A., Devlieghere F., Verhe R. (eds.). Wageningen, Wageningen Academic Publishers: 303-354

FDA. 1997. Hazard Analysis and Critical Control Point: Principles and application guidelines. Silver Spring, FDA-U.S. Food and Drug Administration: 1 str.  
<http://www.fda.gov/food/foodsafety/HazardAnalysisCriticalControlPointsHACCP/ucm114868.htm> (12. jan. 2010)

Fernandes R. 2009. Meat products: Microbiology handbook. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge, Royal Society of Chemistry: 30-30

Gašperlin L., Bem Z. 2003. Perutninsko meso. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 427- 442

Goodrich R.M., Schneider K.R., Smidt R.H. 2005. HACCP: An overview. Gainesville, University of Florida, IFAS Extension: 1-3  
<http://edis.ifas.ufl.edu/FS122> (3. sept. 2010)

Holt J.G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. Baltimore, Williams & Wilkins: 787 str.

HPA. 2010a. National standard method, BSOP TP 8 Issue 2.1: Catalase test. London, HPA- Health protection agency. Standards Unit, Department for evaluations, standards and training: 9 str.  
<http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/bsopTP/pdf/bsoptp8.pdf> (18. maj. 2010)

HPA standart methods. 2010b. National standard method, BSOP TP 26 Issue 2.1: Oxidase test. London, HPA- Health protection agency, Standards Unit, Department for evaluations, standards and training: 10 str.  
<http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/bsopTP/pdf/bsoptp26.pdf> (18. maj. 2010)

- HyServe. 2005a. Compact Dry: Easy test method for counting micro-organisms. Uffing, HyServe GmbH & Co. KG.: 4 str.  
[http://www.hyserve.com/docs/Compact-Dry\\_72dpi\\_engl.pdf](http://www.hyserve.com/docs/Compact-Dry_72dpi_engl.pdf) (12. okt. 2010):
- HyServe. 2005b. Compact Dry TC Test. Uffing, HyServe GmbH & Co. KG.: 8 str.  
[http://www.hyserve.com/docs/Compact\\_TC-Article040511-AOAC.pdf](http://www.hyserve.com/docs/Compact_TC-Article040511-AOAC.pdf) (12. okt. 2010)
- ICMR Bulletin. 2000. Application of Hazard Analysis and Critical Control Point for improvement of quality of processed foods. ICMR Bulletin, 30, 5: 1-6  
<http://icmr.nic.in/bumay2000.pdf> (8. sept. 2010)
- ISO 10272-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp. – Part 1: Detection method. 2006: 16 str.
- ISO 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. 1996: 16 str.
- ISO 19250. Water quality - Detection of *Salmonella* spp. 2010: 23 str.
- IVZ. 2010. Epidemiološko spremljanje prijavljenih nalezljivih bolezni v Sloveniji 2009. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 98 str.  
[http://www.ivz.si/nalezljive\\_bolezni\\_aktualno?pi=5&\\_5\\_Filename=2491.pdf&\\_5\\_MediaId=2491&\\_5\\_AutoResize=false&pl=29-5.3](http://www.ivz.si/nalezljive_bolezni_aktualno?pi=5&_5_Filename=2491.pdf&_5_MediaId=2491&_5_AutoResize=false&pl=29-5.3). (14. marec. 2011)
- Jeršek B. 2005. Osnovni principi identifikacije bakterij in kvasovk v živilih (skripta in delovni zvezek). Ljubljana, Univerza v Ljubljani Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 44 str.
- Jeršek B. 2009. Higiena živil: Laboratorijske vaje za študente živilstva in prehrane. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 79 str.  
[http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2752/Higiena\\_zivil.pdf](http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2752/Higiena_zivil.pdf) (10. okt. 2010)
- Lopez R.S. 2004. Critical control point identification: Ensuring the correct controls are in place for identified hazards is essential to a successful HACCP program. Manhattan, AIB Services: 6-8  
<https://www.aibonline.org/newsletter/Magazine/Fall2004/CCP.pdf>
- Marčič N. V., Vidovič R. 2002. HACCP v predelavi perutnine. V: Priročnik za postavljanje in vodenje sistema HACCP. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 329-341
- Martimore S., Wallace C. 1998. An introduction to HACCP. V: HACCP: A practical approach. Martimore S., Wallace C. (eds.). Aspen, An Aspen Publication: 1-11

- NACMCF. 1992. Hazard analysis critical control points. FDA, NACMCF - National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. International Journal of Food Microbiology, 16: 1–23
- NACMCF. 1997. Hazard Analysis and Critical Control Point Principles and Application Guidelines. FDA, NAMCF - National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods: 1 str.  
<http://www.fda.gov/food/foodsafety/HazardAnalysisCriticalControlPointsHACCP/ucm114868.htm> (6. sept. 2010)
- NGWA. 2009. Informing consumer about water wells. Westerville, NWGA - National Ground Water Association: 1 str.  
[http://wellowner2.org/2009/index.php/awaterquality/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=29&Itemid=30](http://wellowner2.org/2009/index.php/awaterquality/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=29&Itemid=30) (12. okt. 2010)
- Nørrung B., Buncic S. 2008. Microbial safety of meat in the European Union. Meat Science, 78: 14-24
- Pravilnik o veterinarsko-sanitarnih pogojih za proizvodnjo živil živalskega izvora ter oddajo v promet za javno potrošnjo. 1999. Uradni list Republike Slovenije, 9, 91: 13537-13576  
<http://www.uradni-list.si/1/content?id=20816> (12. sept. 2010)
- Raspor P. 2003. Kritične točke v proizvodnji in predelavi živil (HACCP). V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 209 -218
- Roberts T.A., Baird-Parker A. C., Tompkin R.B. 1996. Microorganisms in foods: 5, Characteristics of microbial pathogens. London, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 524 str.
- Rushing J.E., Ward D.R. 1995. HACCP principles. Raleigh, North Carolina State University: 21-22  
<http://www.ces.ncsu.edu/depts/foodsci/ext/pubs/haccpprinciples.html> (21. avg. 2010)
- Silverside D., Jones M. 1992. Small-scale poultry processing. Rome, Food and Agricultural Organization of the United Nations: 1 str.  
<http://www.fao.org/docrep/003/t0561e/t0561e00.htm> (30. avg. 2010)
- Smith H., Willshaw G., Cheasty T. 2004. *E. coli* as a cause of outbreaks of diarrhoeal disease in the UK. Microbiology Today, 31: 117-118  
[http://www.sgm.ac.uk/pubs/micro\\_today/pdf/080403.pdf](http://www.sgm.ac.uk/pubs/micro_today/pdf/080403.pdf) (12. okt. 2010): 2 str.
- Speidel S. 2005. Compact Dry TC Test (AOAC Certificate No. 010404). Uffing, HyServe: 8 str.  
[http://www.hyserve.com/docs/Compact\\_TC-Article040511-AOAC.pdf](http://www.hyserve.com/docs/Compact_TC-Article040511-AOAC.pdf) (12. okt. 2010)



- SSKJ-Slovar slovenskega knjižnega jezika. 2000. Ljubljana, DZS: 398-398
- Sutton S. 2006. The Gram Stain. PMF- Pharmaceutical microbiology forum, PMF Newsletter: 12, 2: 4-5  
<http://www.microbiologyforum.org/PMFNews/PMFNews.12.02.0602.pdf> (18.maj.2010)
- Thomas C.J., McMeekin T.A. 1980. Contamination of broiler carcass skin during commercial processing procedures: an electron microscopic study. Applied and Environmental Microbiology, 40: 133-144
- Todar K. 2008a. Todar's online textbook of bacteriology: *Listeria monocytogenes*. Madison, University of Wisconsin: 3 str.  
<http://www.textbookofbacteriology.net/Listeria.html> (5. okt. 2010)
- Todar K. 2008b. Todar's online textbook of bacteriology: Pathogenic *E. coli*. Madison, University of Wisconsin: 4 str.  
<http://textbookofbacteriology.net/salmonella.html> (5. okt. 2010)
- Todar K. 2008c. Todar's online textbook of bacteriology: *Salmonella* and Salmonellosis Madison, University of Wisconsin: 5 str.  
<http://textbookofbacteriology.net/salmonella.html> (5. okt. 2010)
- Treyens C. 2009. Bacteria and private wells. Information every well owner should know. Morgantown, NESC - National environmental services center. On Tap: Winter 2009, 8, 4: 19-22  
[http://www.nesc.wvu.edu/pdf/dw/publications/ontap/magazine/OTWI09\\_features/BacteriaAndPrivateWells.pdf](http://www.nesc.wvu.edu/pdf/dw/publications/ontap/magazine/OTWI09_features/BacteriaAndPrivateWells.pdf) (12. okt. 2010)
- Tsola E., Drosinos E.H., Zoiopoulos P. 2008. Impact of poultry slaughter house modernisation and updating of food safety management systems on the microbiological quality and safety of products. Food Control, 19: 423-431
- Tuominen P. 2008. Developing risk-based food safety management. PhD Thesis. Helsinki, Helsinki University Press: 132 str.
- Tuominen P., Hielm S., Aarnisalo K., Raaska L., Maijala R. 2003. Trapping the food safety performance of a small or medium-sized food company using a risk-based model. The HYGRAM® system. Food Control, 14: 573-578
- USDA. 1997. Guidebook for the preparation of HACCP plan. Washington, USDA – United States Department of Agriculture: 67 str.  
<http://haccpalliance.org/alliance/haccpmodels/guidebook.pdf> (12. okt. 2010)
- VTT. 2007a. HYGRAM - semiquantitative model for assessment of most important hygienic and microbiological hazards in companies. Espoo, VTT Technical Research Centre of Finland: 1 str.  
<http://www.evira.fi/> (20. avg. 2010)

VTT. 2007b. Hygram® 2.0 User manual. Espoo, VTT Technical Research Centre of Finland: 1 str.

<http://www.vtt.fi/proj/hygram/?lang=en> (20. avg. 2010)

VTT-4377-91. 1991. Detection of *Campylobacter jejuni*, *C.coli* in food and feed. Espoo, VTT Technical Research Centre of Finland

VURS. 2010a. Letno poročilo 2009. Ljubljana, VURS – Veterinarska uprava Republike Slovenije: 38-82

[http://www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/Matjaz/Letna\\_porocila\\_VURS/VURS\\_LP09\\_WEB.pdf](http://www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/Matjaz/Letna_porocila_VURS/VURS_LP09_WEB.pdf) (20.feb. 2011)

VURS. 2010b. Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2010.

Ljubljana, Veterinarska uprava Republike Slovenije, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije: 142 str.

[http://www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/zoonoze/Program\\_monitoringa\\_zoonoz\\_za\\_leto\\_2010.pdf](http://www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/zoonoze/Program_monitoringa_zoonoz_za_leto_2010.pdf) (15. marec. 2011)

Yang H., Li Y., Johnson M.G. 2001. Survival and death of *Salmonella typhimurium* and *Campylobacter jejuni* in processing water and on chicken skin during poultry scalding and chilling. *Jurnal of Food Protection*, 64, 6: 770-776

Weise E. 1996. *Microbiologie des Geflügels*. V: *Microbiologie der Lebensmittel. Fleisch und Fleischerzeugnisse*. Weber H. (ed.). Hamburg, Behr's Verlag: 563-618

ZIRS. 2008. Smernice za izvajanje uredbe komisije (ES) št. 2073/2005 o mikrobioloških merilih za živila. Ljubljana, Zdravstveni inšpektorat Republike Slovenije: 50 str.

[www.zi.gov.si/.../SMERNICE\\_ZA\\_IZVAJANJE\\_UREDBE\\_KOMISIJE\\_O\\_MIKROBIOLOSKIH\\_MERILIH\\_ZA\\_ZIVILA.doc](http://www.zi.gov.si/.../SMERNICE_ZA_IZVAJANJE_UREDBE_KOMISIJE_O_MIKROBIOLOSKIH_MERILIH_ZA_ZIVILA.doc) (11. dec. 2010)

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici diplomske naloge prof. dr. Sonji Smole Možina za vso strokovno podporo, prijaznost in potrpežljivost.

Zahvaljujem se tudi recenzentu prof. dr. Janezu Marinšku za hiter in strokoven pregled diplomske naloge.

VTT Tehničnemu inštitutu na Finskem, za medsebojno sodelovanje preko projekta Safoodnet.

Posebna zahvala gre dr. Satu Salo za vodenje eksperimentalnega dela ter vso pomoč in podporo med bivanjem na finskem.

Za tehnični pregled diplomske naloge se zahvaljujem Lini Barkan.

Prijatelju Marku Mesojedcu za lektoriranje diplomskega dela.

Sošolki Tini Tušar za super medsebojno sodelovanje pri eksperimentalnem delu in nepozabne trenutke, ki sva jih preživele na finskem.

Za vso podporo, potrpežljivost in spodbudo skozi ves čas študija se zahvaljujem svojim staršem in starim staršem ter Toniju, Tjaši, še posebej pa Andreju.

Andreji, Niki, Poloni, Tini in vsem ostalim sošolkam in sošolcem s katerimi smo si delili najlepša leta naše mladosti.