

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Medicina Veterinaria

Weterynaria

7(3) 2008



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Rada Programowa *Acta Scientiarum Polonorum*

Kazimierz Banasik (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn),
Florian Gambuś (Kraków), Franciszek Kluza (Lublin), Edward Niedźwiecki (Szczecin),
Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Jerzy Sobota (Wrocław) – przewodniczący,
Stanisław Socha (Siedlce), Waldemar Uchman (Poznań)

Rada Naukowa serii *Medicina Veterinaria*

Miroslav Baran (Koszyce, Słowacja), Ryszard Bobowiec (Lublin),
Carlos Castrillo (Saragossa, Hiszpania), Andrzej Depta (Olsztyn),
Øystein Sjaastad (Oslo, Norwegia), Jacek Szczawiński (Warszawa),
Wojciech Zawadzki (Wrocław) – przewodniczący,
Bożena Króliczewska (Wrocław) – sekretarz

Korekta:

Ewa Jaworska
Elżbieta Winiarska-Grabosz

Łamanie

Teresa Alicja Chmura

Projekt okładki
Daniel Morzyński

ISSN 1644-0676

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,
Wrocław 2008

Redaktor Naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki
ul. Sopocka 23, 50–344 Wrocław, tel./fax 071 328–12–77
e-mail: wyd@up.wroc.pl <http://www.up.wroc.pl>

Nakład 220 + 16 egz. Ark. druk. 5,5
Druk i oprawa: Wydawnictwo Tekst Sp. z o.o.
ul. Kossaka 72, 85–307 Bydgoszcz

IMPORTANCE OF FEED HYGIENE TO ANIMAL AND HUMAN HEALTH

Josef Leibetseder

University of Veterinary Medicine, Vienna

Abstract. The principles of food safety according the European Food Safety Authority (EFSA) are described. In order to ensure the safety of food, it is necessary to consider all aspects of the food production chain as a continuum from and including primary production and the production of animal feed up to and including sale or supply of food to the consumer because each element may have a potential impact on food safety. Food and feed safety requirements are defined and consequences are indicated if food or feed does not meet these requirements. Public consultation and information should take place in regard to food and feed law. Maximum levels for certain contaminants in foodstuffs and for undesirable substances in animal feed are discussed and recommendations for guidance levels of certain mycotoxins are given.

Key words: food safety, foodstuff contaminants, undesirable substances in feedingstuffs, guidance levels of mycotoxins

INTRODUCTION

The free movement of safe and wholesome food and feed is an essential aspect of the internal market and contributes significantly to the health and well-being of citizens and animals, respectively. There are important differences regarding concepts, principles and procedures between the food and feed laws of the EU Member States which may impede the free movement of food and feed, create unequal conditions of competition, and may thereby directly affect the functioning of the internal market. Accordingly, it is necessary to harmonize the concepts, principles and procedures so as to form a common basis for measures governing food and feed. It is however necessary too provide sufficient time for the adaptation of any conflicting provision in existing legislation, both at national and Community level. Within the context of food law it is appropriate to include requirements for feed, including its production and use where that feed is intended for food-producing animals. This is without prejudice to the

similar requirements which have been applied so far and which will be applied in the future in feed legislation applicable to all animals, including pets.

In order to ensure the safety of food, it is necessary to consider all aspects of the food production chain as a continuum from and including primary production and the production of animal feed up to and including sale or supply of food to the consumer because each element may have a potential impact on food safety. Experience has shown that for this reason it is necessary to consider the production, manufacture, transport and distribution of feed given to food-producing animals, including the production of animals which may be used as feed on fish farms, since the inadvertent or deliberate contamination of feed, and adulteration or fraudulent or other bad practices in relation to it, may give rise to a direct or indirect impact on food safety.

Measures adopted by the Member States and the Community governing food and feed should generally be based on risk analysis except where this is not appropriate to the circumstances or the nature of the measure. Risk assessment shall be based on the available scientific evidence and undertaken in an independent, objective and transparent manner. Risk management shall take into account the results of risk assessment, and in particular, the opinions of the Authority, other factors legitimate to the matter under consideration and the precautionary principle.

The precautionary principle has been invoked to ensure health protection in the Community, thereby giving rise to barriers to the free movement of food and feed. Therefore it is necessary to adopt a uniform basis throughout the Community for the use of this principle.

Experience has shown that the functioning of the internal market in food or feed can be jeopardized where it is impossible to trace food and feed. It is therefore necessary to establish a comprehensive system of traceability within food and feed business so that targeted and accurate withdrawals can be undertaken or information given to consumers or control officials, thereby avoiding the potential for unnecessary wider disruption in the event of food safety problems. The traceability of food, feed, food-producing animals, and any other substance intended to be, or expected to be, incorporated into a food or feed shall be established at all stages of production, processing and distribution. Food and feed business operators shall be able to identify any person from whom they have been supplied and shall have in place systems and procedures which allow for this information to be made available to the competent authorities on demand. They also shall have in place systems to identify the other business to which their products have been supplied. Food or feed, therefore, shall be adequately labeled or identified

A food or feed business operator is best placed to devise a safe system for supplying safe food and feed, respectively; thus they should have primary legal responsibility for ensuring food or feed safety. The operators at all stages of production, processing and distribution within the business under their control shall ensure that foods or feeds satisfy the requirements of food and feed law which are relevant to their activities and shall verify that such requirements are met. If a food or feed business operator considers or has reason to believe that a food or feed which is imported, produced, processed, manufactured or distributed is not in compliance with the safety requirements, it shall immediately initiate procedures to withdraw the food or feed in question from the market where the food or feed has left the immediate control of that initial business operator and inform the competent authorities thereof. Where the product may have reached the consumer, the operator shall effectively and accurately inform the consumers

of the reason for the withdrawal, and if necessary, recall from consumers products already supplied to them when other measures are not sufficient to achieve a high level of health protection.

Since some products authorized under food law such as pesticides or additives in animal feed may involve risks to the environment or to the safety of workers, some environmental and worker protection aspects should also be assessed by the Authority in accordance with the relevant legislation.

Recent food crises have demonstrated the need to set up an improved and broadened rapid alert system covering food and feed. This system should be managed by the Commission and include as members of the network the Member States, the Community and the Authority. It also is needed to establish appropriate measures in emergency situations ensuring that all foods, whatever their type and origin, and all fed should be subject to common measures in the event of a serious risk to human health, animal health or the environment. Such a comprehensive approach to emergency food or feed safety measures should allow effective action to be taken and avoid artificial disparities in the treatment of a serious risk in relation to food or feed. As an example the Council Decision of 4 December 2000 concerning certain protection measures with regard to transmissible spongiform encephalopathies and the feeding of animal protein is mentioned: Member States shall prohibit the feeding of processed animal proteins to farmed animals which are kept, fattened or bred for the production of food. The prohibition shall not apply to the feeding of fishmeal and gelatine to animals other than ruminants, of dicalcium phosphate und milk and milk products.

FOOD AND FEED SAFETY REQUIREMENTS

Food shall not be placed on the market if it is unsafe. Food shall be deemed to be unsafe if it is considered to be injurious to health or unfit for human consumption.

Feed shall not be placed on the market or fed to any food-producing animal if it is unsafe. Feed shall be deemed to be unsafe for its intended use if it is considered to have an adverse effect on human or animal health or make the food derived from food-producing animals unsafe for human consumption. Where a feed which has been identified as not satisfying the feed safety requirement is part of a batch, lot or consignment of feed of the same class or description, it shall be presumed that all of the feed in that batch, lot or consignment is so affected, unless following a detailed assessment there is no evidence that the rest of the batch, lot or consignment fails to satisfy the feed safety requirement.

Feed that complies with specific Community provisions governing feed safety shall be deemed to be safe insofar as the aspects covered by the specific Community provisions are concerned. Nevertheless conformity of a feed with specific provisions applicable to that feed shall not bar the competent authorities from taking appropriate measures to impose restrictions on it being placed on the market or to require its withdrawal from the market where there are reasons to suspect that, despite such conformity, the feed is unsafe. Where there are no specific Community provisions, feed shall be deemed to be safe when it conforms to the specific provisions of national law governing feed safety of the Member State in whose territory the feed is in circulation, such provisions being drawn up and applied without prejudice to the Treaty.

PUBLIC CONSULTATION AND INFORMATION

There shall be open and transparent public consultation directly or through representative bodies during the preparation, evaluation and revision of food or feed law.

Without prejudice to the applicable provisions of Community and national law on access to documents, where there are reasonable grounds to suspect that a food or feed may present a risk for human or animal health, then, depending on the nature, seriousness and extent of that risk, public authorities shall take appropriate steps to inform the general public of the nature of the risk to health, identifying to the fullest extent possible the food or feed, or type of food or feed, the risk that it may present, and the measures which are taken or about to be taken to prevent, reduce or eliminate that risk.

MAXIMUM LEVELS FOR CERTAIN CONTAMINANTS IN FOODSTUFFS

The Commission set maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. It is essential, in order to protect public health, to keep contaminants at levels which are toxicologically acceptable. It is prohibited to use products as food ingredients for the production of compound foodstuffs which do not comply with the maximum levels set. The presence of contaminants must be reduced more thoroughly wherever possible by means of good manufacturing or agricultural practices, in order to achieve a higher level of health protection, especially for sensitive groups of the population. The maximum levels specified shall apply to the edible part of the foodstuffs mentioned. The sampling and analysis methods applied are also specified.

In Annex 1 of the specific Commission Regulation four sections of undesirable substances in foodstuffs are listed. These are:

Section 1: Nitrates in spinach and fresh lettuce

Section 2: Mycotoxins: Aflatoxins (B_1 and $B_1+B_2+G_1+G_2$) in groundnuts, nuts, dried fruit, cereals and Aflatoxin M_1 in milk

Section 3: Heavy metals: Lead in many kinds of foodstuffs as well as in fruit juices and wines Cadmium in meat, liver, kidney, crustaceans, mollusks, cephalopods, cereals, soybeans, vegetables and fruits Mercury in fishery products

Section 4: 3-monochloropropane-1,2-diol (3-M;CPD) in hydrolyzed vegetable protein and soy sauce

UNDESIRABLE SUBSTANCES IN ANIMAL FEED

Livestock production occupies a very important place in farming in the Community and satisfactory results in terms of public and animal health, animal welfare, the environment and the livestock producers' finances depend to a large extent on the use of appropriate good quality feedingstuffs. Therefore, rules on feedingstuffs are needed to ensure agricultural productivity and sustainability and to make it possible to ensure public and animal health, animal welfare and the environment. In addition, there is a need for comprehensive regulation on hygiene in order to guarantee good quality feedingstuffs on individual farms even when they are not commercially produced. The same rules concerning the quality and safety of products intended for animal feed have

to apply to the quality and safety of water consumed by the animals. It has been established that additives can contain undesirable substances. The scope of the Directive on undesirable substances should therefore be extended to cover additives.

Products intended for animal feed may contain undesirable substances which can endanger animal health or, because of their presence in livestock products, human health or the environment. It is impossible to eliminate fully the presence of undesirable substances but it is important that their content in products intended for animal feed should be reduced, with due regard to substances' acute toxicity, bioaccumulation and degradability, in order to prevent undesirable and harmful effects. It is at present inappropriate to fix this content below the levels detectable by methods of analysis to be defined for the Community. On the other hand, the methods for determining residues of undesirable substances are becoming increasingly sophisticated, so that even quantities of residues which are negligible for animal and human health can be detected.

Undesirable substances may be present in products intended for animal feed only in accordance with the conditions laid down in the Directive and may not be used in any other way for the purpose of animal feed. In general, products intended for animal feed must be sound, genuine and of merchantable quality and therefore when correctly used must not represent any danger to human health, animal health or to the environment or adversely affect livestock production. Using or putting into circulation products intended for animal feed which contain levels of undesirable substances that exceed the maximum levels laid down in the Annex of the Directive must be prohibited. Those products may not be mixed for dilution purposes with the same, or other, products intended for animal feed.

While in certain cases a maximum level is fixed, taking account of background levels, continued effort is still needed to restrict the presence of some specific undesirable substances to the lowest possible levels in products intended for animal feed so as to reduce their presence in the feed and food chain. It should therefore be permitted to lay down action thresholds well below the maximum levels fixed. Where such action thresholds are exceeded, investigations must be carried out to identify the sources of the undesirable substances and steps taken to reduce or eliminate such sources.

Where animal or human health or the environment is endangered, Member States should be allowed temporarily to reduce the fixed maximum permissible levels, to fix maximum levels for other substances or to prohibit the presence of such substances in products intended for animal feed. Member States must make appropriate monitoring arrangements to ensure that the requirements regarding undesirable substances are met when products intended for animal feed are used or circulated.

In Annex 1 of the Directive maximum contents of undesirable substances are given for specific feedingstuffs in mg/kg (ppm) relative to a feedingstuff with a moisture content of 12%. These substances belong to different categories:

Ions or elements: arsenic, lead, mercury, nitrites, cadmium

Products: aflatoxin B₁, hydroxycyanic acid, free gossypol, theobromine, volatile mustard oil, vinyl thiooxazolidone, rye ergot, weed seeds and unground and uncrushed fruits containing alkaloids, glucosides or other toxic substances separately or in combination including *Lolium temulentum*, *Lolium remotum* and *Datura stramonium*, Castor oil plant, *Crotalaria*, aldrin, dieldren, camphechlor (toxaphene), chlordane, DDT, endosulfan, endrin,

heptachlor, hexachlorobenzene (HCB), hexachlorocyclohexane (HCH) (alpha, beta, gamma isomers), dioxins

Botanical impurities: apricots (*Prunus armaniaca*), bitter almond (*Prunus dulcis* var. *amara* = *Prunus amygdalus* var. *amara*), unhusked beech mast (*Fagus silvatica*), camelina (*Camelina sativa*), mourah, bassia, madhura, purghera (*Jatropha curcas*), croton (*Croton tiglium*), Indian mustard (*Brassica juncea* ssp. *integrifolia*), Sareptian mustard (*Brassica juncea* ssp. *juncea*), Chinese mustard (*Brassica juncea* ssp. *Juncea* var. *lutea*), black mustard (*Brassica nigra*), Ethiopian mustard (*Brassica carinata*)

COMMISSION RECOMMENDATION

The European Food Safety Authority (EFSA) adopted opinions on the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A and fumonisins. Those opinions conclude that all four mycotoxins exhibit toxic effects in several animal species. Deoxynivalenol, zearalenone and fumonisin B₁ and B₂ are only to a very limited extent transferred from feed into meat, milk and eggs and therefore food of animal origin only contributes marginally to the total human exposure to these toxins. Ochratoxin A can be transferred from feed into food of animal origin but exposure assessments indicate that food of animal origin makes only a small contribution to the total human dietary exposure to this mycotoxin.

Data on the presence of T-2 and HT-3 toxins in products intended for animal feeding are at present very limited. There is also an urgent need for the development and validation of a sensitive method of analysis. However there are indications that the presence of T-2 and HT-2 in products intended for animal feeding could be a reason for concern. Therefore it is necessary to develop a sensitive method of analysis, collect more occurrence data, and carry out further investigations and research into the factors involved in the presence of these toxins in cereal and cereal products, in particular in oats and oat products.

To provide orientation to the Member States on the acceptability of cereals and cereal products and compound feed for animal feeding and to avoid disparities in the values accepted by the different Member States and the consequent risk of distortion of competition, it is appropriate to recommend guidance values (mg/kg (ppm) relative to a feedingstuff with a moisture content of 12 %). In applying these guidance values, Member States should take into account the fact that the guidance values for cereals and cereal products have been determined for the most tolerant animal species and are therefore to be considered as upper guidance values. For feed for more sensitive animals, Member States should ensure that lower guidance values are applied.

An assessment of the approach provided for by this Recommendation should be undertaken by 2009 in particular to assess its contribution towards protecting animal health. The monitoring data will also enable a better understanding of the year-to-year variance.

The Commission recommends:

- member States should ensure that with the active involvement of feed business operators, monitoring for the presence of the mycotoxins mentioned above is increased,

- samples are simultaneously analyzed for the presence of those mycotoxins,
- particular attention is paid to the presence of those mycotoxins in by- or co-products from the production of food intended for animal feeding,
- the analytical results are provided on a regular basis to the Commission for compilation into a single database,
- the guidance values are applied for judging the acceptability of compound feed and cereal and cereal products for animal feeding,
- feed business operators use in their Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) system the guidance values to determine the critical limits at critical control points which separate acceptability from unacceptability, for the prevention, elimination or reduction of identified hazards.

REFERENCES

- Council Decision of 4 December 2000 concerning certain protection measures with regard to transmissible spongiform encephalopathies and the feeding of animal protein.
- Commission Regulation (Ec) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
- Regulation (Ec) No 178/2002 Of The European Parliament And Of The Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety.
- Directive 2002/32/Ec Of The European Parliament And Of Th Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed.
- Commission Directive 2005/87/Ec of 5 December 2005 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed as regards lead, fluorine and cadmium.
- Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding
- Commission Directive 2006/77/EC of 29 September 2006 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for organochlorine compounds in animal feed.

ZNACZENIE HIGIENY PASZY DLA ZDROWIA ZWIERZĄT I LUDZI

Streszczenie. Przepisy dotyczące bezpieczeństwa żywności są ustalane zgodnie z wytycznymi Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności. Aby zapewnić bezpieczeństwo żywności, należy uwzględnić wszystkie aspekty w łańcuchu jej wytwarzania. W system nadzoru należy włączyć etap produkcji pierwotnej, produkcję pasz dla zwierząt rzeźnych aż po dystrybucję i przekazanie żywności konsumentom, ponieważ na każdym z tych etapów może powstać potencjalne zagrożenie dla jej bezpieczeństwa.

Sprecyzowane w regulacjach prawnych są zarówno wymagania bezpieczeństwa żywności oraz pasz dla zwierząt, jak i skutki ich nieprzestrzegania. W procesie stanowienia prawa żywnościowego i paszowego powinny być przeprowadzane społeczne konsultacje oraz akcja informacyjna. Maksymalne poziomy pewnych zanieczyszczeń w produktach żywności oraz niepożądanych substancji w paszach dla zwierząt są dyskutowane, wydaje się zalecenia dotyczące dopuszczalnych zawartości pewnych mykotoksyn.

Słowa kluczowe: bezpieczeństwo żywności, zanieczyszczenia pasz, niepożądane substancje w paszy, dopuszczalne zawartości mykotoksyn

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 25.09.2008

For citation – Do cytowania: Leibetseder J., 2008. Importance of feed hygiene to animal and human health. *Acta Sci. Pol. Med. Vet.* 7(3), 3–10.

DIOXIN IN THE FOOD CHAIN

Josef Leibetseder

University of Veterinary Medicine, Vienna

Abstract. The aim of the study was investigation of the dioxin presence in feed compounds of plant and animal origin. Occurrence of dioxins was revealed in different ingredients of feedstuffs and values of tolerable daily intakes /TDI/, obligatory in several countries were demonstrated.

Key words: dioxins, contaminants in feed, TDI

OBJECTIVES

Due to several incidents public interest was directed towards polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD) and -furans (PCDF) within the past twenty years. For safety and precaution reasons the PCDD/Fs maybe considered carcinogenic for man. It may be assumed that generally the soil (of pastureland in Europe <1 – 43 ng International Toxinequivalents [I-TEq]/kg dry matter) and therefore the plants and feedstuffs of animal origin contain a certain basic contamination. Besides that a significant contamination of feedstuff exists due to special conditions (Table 1). In several countries different values of Tolerable Daily Intake (TDI) (Table 2) and Action Levels (Table 3) were set.

Table 1. Dioxin content of feedstuffs (ng I-Teq/kg dry matter; BC = basic contamination; C = contaminated; SCAN, 2000)

Tabela 1. Zawartość dioksyn w paszy (ng I-Teq/kg suchej masy, BC = podstawowe zanieczyszczenie, C = zanieczyszczenie, SCAN 2000)

<i>Feedstuff</i>		<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
Forages and Conservates	BC	67	0.173	0.030	0.500
	C	6	5.900	0.832	20.155
Cereals and Seeds	BC	8	0.035	0.005	0.182
By-products of plant origin	BC	19	0.064	0.012	0.122
	C	18	7.317	4.635	10.145
Fish meal Europe		39	11.5	1.00	47.00
Meat and bone meal		?		0.10	0.75
Animal fat		?		0.06	30.80
Fish oil Europe		57	6.0	0.70	20.10

Table 2. Tolerable Daily Intake (TDI) values of PCCD/F Equivalents (1994/95)

Tabela 2. Tolerowane dzienne spożycie (TDI) zawartość PCCD/F ekwiwalentu (1994/95)

Country/Institution	TDI in pg/kg BW/day
USA/New York State	1
Canada	10
Netherlands	10
Scandinavian countries	5
Germany	1
WHO -Europe	10
Japan	100

Table 3. Action Levels for PCCD/F in Food (pg TEQ (WHO) /g Fat)

Tabela 3. Poziomy aktywności dla PCCD/F w paszy (pg TEQ (WHO) /g Fat)

Foodstuff	Action Level
Pork	2
Poultry meat	5
Beef	6
Milk	3
Eggs	5

METHODS

For the assessment of contamination of feedstuff it is important to know the carry-over ratios, that means the percentage of the portion of harmful substances taken up which will merge into the respective food under steady state condition. Calculations using this value make the estimation of the residues in foodstuffs possible with a sufficient accuracy. This method had been verified on cow's milk (Table 4). However, there

are only few investigations concerning meat. This situation not sufficiently scientifically investigated yet makes it difficult – in case of increased contamination of feedingstuffs – to define limits and take measures for the protection of the consumer.

Table 4. Formula for calculation of transfer from feed to cow's milk
Tabela 4. Wzór dla obliczenia transferu z paszy do krowiego mleka

$$\text{Carry-over ratio} = \frac{c_{mf}}{c_f} \cdot \frac{p_{mf}}{f} \cdot 100$$

c_{mf} = concentration in milk fat (pg/g)

c_f = concentration in feed (pg/g)

p_{mf} = daily production of milk fat (g)

f = daily amount of feed intake (g)

PROBLEM

In different feedingstuffs for pigs and poultry from a certain producer concentrations of residues of 4.8 – 6.2 ng I-TEq/kg dry matter significantly above the basic contamination were found in Austria in 1999. A crisis committee initiated by the Federal Minister for Agriculture and Forestry and the Federal Minister for Social Security and Generations had to recommend measures to prevent any health risks caused by consuming dioxin contaminated food.

RESULTS

After having examined the content of various compound feeds with regard to equal components it was evident that Kaolinite clay, the base material used in premixes, must be the source of contamination. A positive correlation between the content of this clay in the compound feeds and the concentration of I-TEq as well as the pattern of congeners prove evidence of this assumption. The incriminated Kaolinite clay was taken out of the production immediately and the contaminated feedingstuffs were confiscated.

CONCLUSION

As a consequence prevention action limits had to be defined (2000 pg I-TEq/kg for pigs and poultry diets as well as cattle concentrates, 4000 pg/kg for fish diets) and special measures (time of slaughtering, examinations of test animals before slaughtering) had to be decreed. These measures confirmed the adequacy of the above mentioned limits.

DIOKSYNY W ŁAŃCUCHU ŻYWNOŚCIOWYM

Streszczenie. Celem pracy były badania obecności dioksyn w różnych produktach roślinnych i zwierzęcych, uważanych za czynniki rakotwórcze. Wykazano obecność dioksyn w różnych składnikach pasz dla zwierząt i przedstawiono tolerowane dawki dzienne (TDI) obowiązujące w różnych krajach.

Słowa kluczowe: dioksyne, obecność w paszy, tolerowane dawki dzienne

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 25.09.2008

For citation – Do cytowania: Leibetseder J., 2008. Dioxin in the Food Chain. Acta Sci. Pol. Med. Vet. 7(3), 11–14.

WYSOKIE CIŚNIENIA HYDROSTATYCZNE JAKO METODA INAKTYWACJI CAMPYLOBACTER JEJUNI W ŻYWNOSCI POCHODZENIA ZWIERZĘCEGO

Agnieszka Jackowska-Tracz, Michał Tracz

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. Określono wpływ różnych parametrów wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na przeżywalność *Campylobacter jejuni* w mięsie wieprzowym. Sterylne 10 g próbek zmielonego mięsa wieprzowego (karkówka) umieszczano w torebkach poliamidowo-polietylenowych (PA/PE) i zaszczepiano mieszaniną trzech szczepów *Campylobacter jejuni* w stacjonarnej fazie wzrostu (inoculum 5.36×10^6 jtk \times g⁻¹). Następnie próbki zamykano szczelnie przy użyciu zamykarki próżniowej i poddawano obróbce wysokociśnieniowej (UHP) o następujących parametrach: 200, 300 i 400 MPa przez okres 5, 10 i 15 minut w temperaturze 4°C. Bezpośrednio po ciśnieniuowaniu wykonywano kolejne, 10-krotne rozcieńczenia i posiewy na podłoże Karmali agar, które inkubowano w temp. 42°C przez 48±3h w atmosferze mikroaerofinej (85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂). Określono zakres redukcji liczby *Campylobacter jejuni* w mięsie wieprzowym poprzez wyliczenie dawek D₁₀ metodą regresji liniowej. Wykazano, że do dziesięciokrotnej redukcji *C. jejuni* w pakowanym próżniowo mięsie wieprzowym niezbędne jest zastosowanie ciśnienia o wartości 200 MPa przez 46.15 min lub 300 MPa przez 4.27 min.

Słowa kluczowe: *Campylobacter*, obróbka wysokociśnieniowa (UHP), bezpieczeństwo żywności, inaktywacja drobnoustrojów

WSTĘP

Zapewnienie bezpiecznej żywności jest strategicznym celem działań podejmowanych przez organizacje handlowe, rządy i organizacje pozarządowe. Jednym z zagrożeń, jakie może stanowić żywność zwierzęcego pochodzenia, jest obecność w niej patogenów. Są to głównie takie drobnoustroje, jak *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* sp., *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp., *Plesiomonas* sp., *Clostridium botulinum* i *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* oraz *Staphylococcus aureus*.

Adres do korespondencji – Corresponding author: Agnieszka Jackowska-Tracz, Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa.

Jednak, w stosunku do patogenów związanych z produkcją żywności pochodzenia zwierzęcego, w literaturze światowej pojawia się określenie „new emerging pathogens” – jest to grupa „nowych” czynników etiologicznych zakażeń pokarmowych u ludzi, wśród których najczęściej wymienia się *Campylobacter* sp., *Listeria monocytogenes* oraz *Escherichia coli* O157: H7. Właśnie te drobnoustroje są obecnie jednym z najnowszych wyzwań dla Inspekcji Weterynaryjnej oraz Państwowej Inspekcji Sanitarnej.

W odniesieniu do światowych danych epidemiologicznych najczęstszą przyczyną zatruc pokarmowych w większości krajów zachodnioeuropejskich są obecnie pałeczki z rodzaju *Campylobacter*, w tym gatunek *Campylobacter jejuni*. W wielu krajach, gdzie prowadzone są regularne badania epidemiologiczne, częstość izolacji pałeczek *Campylobacter* znacznie przewyższa częstość izolacji pałeczek *Salmonella*. Według raportów Europejskiego Urzędu do spraw Bezpieczeństwa Żywności – EFSA, dotyczących występowania chorób odzwierzęcych u ludzi, liczba przypadków kamylobakteriozy, wynosząca ok. 150 tys. w 2002 r., wzrastała z roku na rok, osiągając w krajach Unii Europejskiej ponad 200 tys. przypadków zachorowań w roku 2005 [Osek 2008].

Nazwa rodzajowa *Campylobacter* wywodzi się z języka greckiego, **campylo** oznacza zakrzywiony, a **bacter** – pałka lub pręt. I faktycznie, *Campylobacter jejuni* to stosunkowo mała (0,5–5 μm x 0,2–0,8 μm) Gram-ujemna pałeczka wykazująca, dzięki polarnie umiejscowionej rzęście lub rzęskom, charakterystyczny korkociągowy ruch [Snelling i in 2005]. Kształt jej opisywany jest jako skrzydło mowy, przecinek, spirala czy litera S. *Campylobacter* sp. to bakteria mikroaerofilna, niezdolna do wzrostu w atmosferze o normalnym 21% stężeniu tlenu, które działa na nią bakteriostatycznie. Do wzrostu wymaga modyfikowanej atmosfery z obniżoną zawartością tlenu [Altekruse i in. 1999]. *Campylobacter* sp. jest bakterią termofilną, najlepszy wzrost wykazuje w temperaturze około 37–42°C [Doyle 2001]. Głównym rezerwuarem zarazka są ptaki, w tym drób, których temperatura ciała wynosi 41–42°C. Bakterie kolonizują głównie jelito ślepe, jelito grube i kloakę [Berry i in. 1988]. Pałeczki *Campylobacter* są częścią mikroflory przewodu pokarmowego wielu gatunków zwierząt. Izolowano je z przewodu pokarmowego zwierząt towarzyszących (psy, koty), od zwierząt egzotycznych w ogrodach zoologicznych, a także od zwierząt rzeźnych, takich jak bydło, kozy, owce oraz trzoda chlewna.

Wśród zwierząt rzeźnych drób jest głównym źródłem *Campylobacter* w środowisku – zdrowe ptaki mogą wydalać ok. 10^2 – 10^7 komórek na 1 g kału. Zdaniem Daczkowskiej-Kozon [2004] bardzo duża ilość odchodów, uzyskiwanych przy obecnej skali hodowli trzody chlewnej, sprawia, że trzoda chlewna również stanowi istotne źródło występowania *Campylobacter* w środowisku. Najczęstszą przyczyną zatruc pokarmowych u ludzi wywołanych przez pałeczki *Campylobacter* jest spożycie nieodpowiednio przygotowanego drobiu. Jednak odnotowywano także przypadki zatruc po spożyciu wieprzowiny, wołowiny i jagnięciny [Wilson i Moore 1996].

Minimalna dawka wywołująca ostre zapalenie jelit u ludzi to 500 komórek *Campylobacter* [Black i in. 1988, Popowski 1994, Nachamkin i in. 2000]. Zwierzęta, które są najczęściej nosicielami *Campylobacter*, zwykle nie wykazują żadnych objawów chorobowych, w związku z tym nie są eliminowane podczas rutynowych badań przed- i poubojowych przeprowadzanych w rzeźni przez lekarza weterynarii. W zakładach przetwórstwa spożywczego podczas zabiegów technologicznych często dochodzi do skażenia powierzchni tusz pałeczkami *Campylobacter* bytującymi w jelitach zwierząt, a także w powłoce zewnętrznej, np. na szczecinie trzody chlewnej. Sytuacja ta wymusza

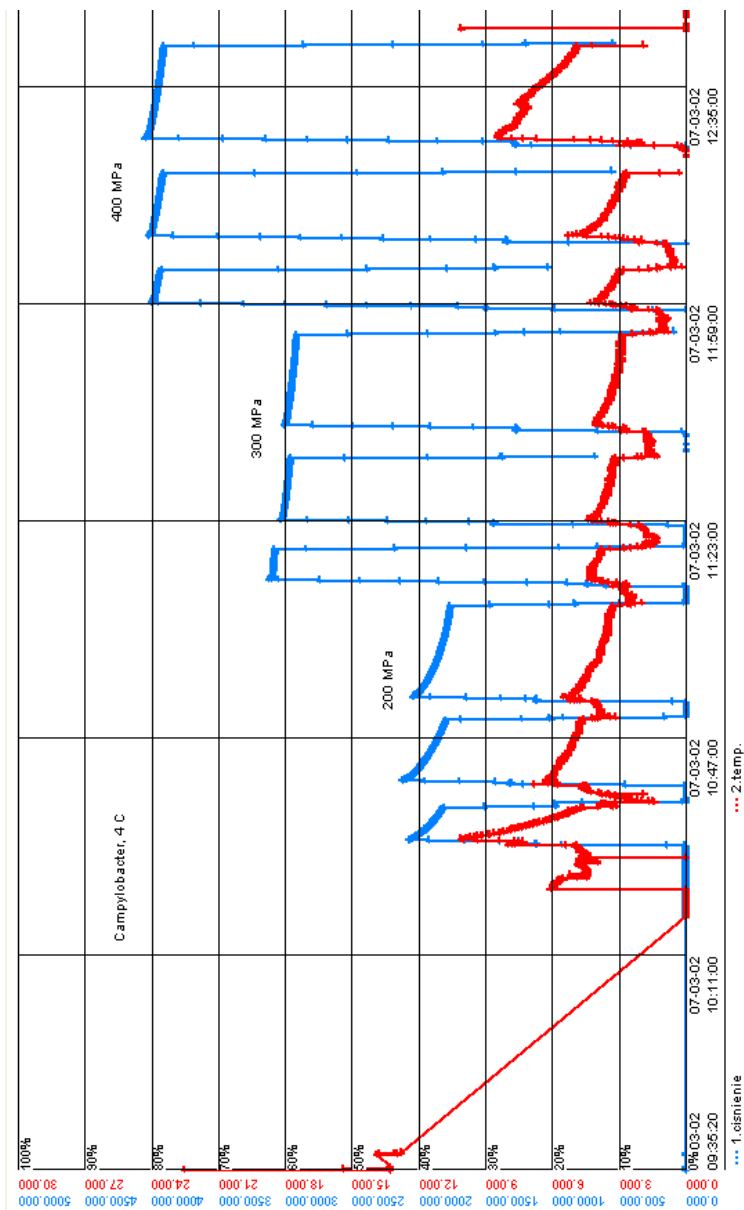
na producentach żywności pochodzenia zwierzęcego konieczność stosowania zabiegów technologicznych zapewniających inaktywację drobnoustrojów chorobotwórczych obecnych w surowcach i gotowych produktach.

Podstawowym sposobem inaktywacji szkodliwych czynników mikrobiologicznych w żywności, w tym również pałeczek *Campylobacter*, jest obróbka termiczna, której efekty zależą głównie od wysokości temperatury i czasu ogrzewania. Do „nowych” alternatywnych metod inaktywacji drobnoustrojów zaliczyć można promieniowanie jonizujące, mikrofalowe i UV, oraz wysokie ciśnienie hydrostatyczne (ang. Ultra High Pressure – UHP lub High Pressure Processing – HHP). Szczególnie duży potencjał posiada pasteryzacja wysokociśnieniowa, która może być wykorzystana zarówno do bezpośredniej inaktywacji patogenów w surowcach zwierzęcych, jak i do niszczenia patogenów w gotowych produktach, które w procesie przetwarzania poddane były obróbce termicznej, a następnie doszło do wtórnego skażenia produktu podczas procesu plasterkowania i pakowania.

MATERIAŁ I METODY

Podczas badania oceniono wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na przeżywalność *Campylobacter jejuni* w mięsie wieprzowym zamykanym próżniowo. Badanie obejmowało trzy doświadczenia, podczas których próbki mięsa wieprzowego, sztucznie zakażone *Campylobacter jejuni*, poddawano działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego o wartości 200, 300 i 400 MPa.

Inoculum stanowiła mieszanina trzech szczepów *Campylobacter jejuni*. Szczepy *Campylobacter jejuni* 34 i *Campylobacter jejuni* 6, otrzymane z laboratorium Katedry Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olszynie, zostały wyizolowane z kloaki kurcząt. Szczep *Campylobacter jejuni* 10/06, otrzymany z laboratorium Instytutu Naukowo-Badawczego Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie, został wyizolowany z materiałów klinicznych od hospitalizowanego dziecka z biegunką. Wszystkie szczepy przechowywane były w temperaturze -80°C na podłożu z wyciągiem mózgowo-sercowym BHI (Oxoid®, CM 0225) z 20% dodatkiem glicerolu. Przed przystąpieniem do doświadczenia szczepy zostały przepasażowane na podłożu Karmali Agar Base (Oxoid®, CM 0935) z suplementem Modified Karmali Selective Supp. (Oxoid®, SR 0205E). Inkubacja trwała $48\text{h}\pm 3\text{h}$ w temperaturze 42°C w atmosferze mikroaerofilnej przy użyciu komercyjnych systemów do inkubacji BD GasPak™ EZ. Po trzech pozytywnych pasażach szczepy zostały przesiane na podłoże płynne Nutrient Broth (Oxoid®, CM 0067) z dodatkiem suplementu Preston *Campylobacter* Selective Supplement (Oxoid®, SR 0117), z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi końskiej (Oxoid®, SR 0048) i inkubowane $48\text{h}\pm 3\text{h}$ w temperaturze 42°C w atmosferze mikroaerofilnej. Następnie 48-godzinne hodowle *C. jejuni* zmieszano w równych proporcjach, co dało mieszaninę trzech szczepów.



Rys. 1. Zależność czasu i temperatury mierzonej w komorze roboczej aparatury wysokociśnieniowej podczas doświadczenia
 Fig. 1. Pressure and temperature time dependence measured in high pressure vessel during pressurisation of pork samples

Mięso wieprzowe zostało zakupione w komercyjnych punktach handlowych. Dziesięciogramowe porcje zmielonego mięsa zapakowano w torebki z folii PA/PE i poddano dekontaminacji za pomocą promieniowania jonizującego o mocy 2 kGy w celu inaktywacji *Campylobacter jejuni* powszechnie występującego w mięsie. Następnie do próbek mięsa dodawano 0,2 ml mieszaniny z hodowli *Campylobacter jejuni*. Po próżniowym zamknięciu próbek i transporcie w warunkach chłodniczych – próbki poddawano działaniu wysokiego ciśnienia, stosując następujące parametry obróbki: 200 MPa przez 5, 10 i 15 min, 300 MPa przez 5, 10 i 15 min oraz 400 MPa przez 5, 10 i 15 min. Kontrolę stanowiły próbki mięsa wieprzowego zakażone *C. jejuni* ale nie poddane obróbce wysokociśnieniowej. Pasteryzacja wysokociśnieniowa została przeprowadzona przy współpracy z Polskim Centrum Badań Wysokociśnieniowych PAN w Warszawie. Objętość komory roboczej aparatury wysokociśnieniowej wynosiła 1,5 l, medium stanowiła mieszanina wody destylowanej i glikolu propylenowego w proporcjach 1:1. Czas potrzebny do wygenerowania ciśnienia niezbędnego do doświadczenia wynosił ok. 15–20 s. Czas potrzebny do powrotu ciśnienia do początkowej wartości był dwukrotnie dłuższy. Wahania temperatury w komorze roboczej podczas pasteryzacji wysokociśnieniowej wynosiły ok. 3°C (rys. 1). W celu określenia liczby przetrwałych komórek *C. jejuni* – z poszczególnych próbek przygotowano szeregi dziesięciokrotnych rozcieńczeń. Z każdego rozcieńczenia wysiewano po 0,5 ml na podłoże Karmali agar. Posiewy inkubowano w warunkach mikroaerofilnych w temp. 42°C przez 48±3 h.

Doświadczenie zostało powtórzone trzykrotnie, a posiewy prowadzone były w duplikacie.

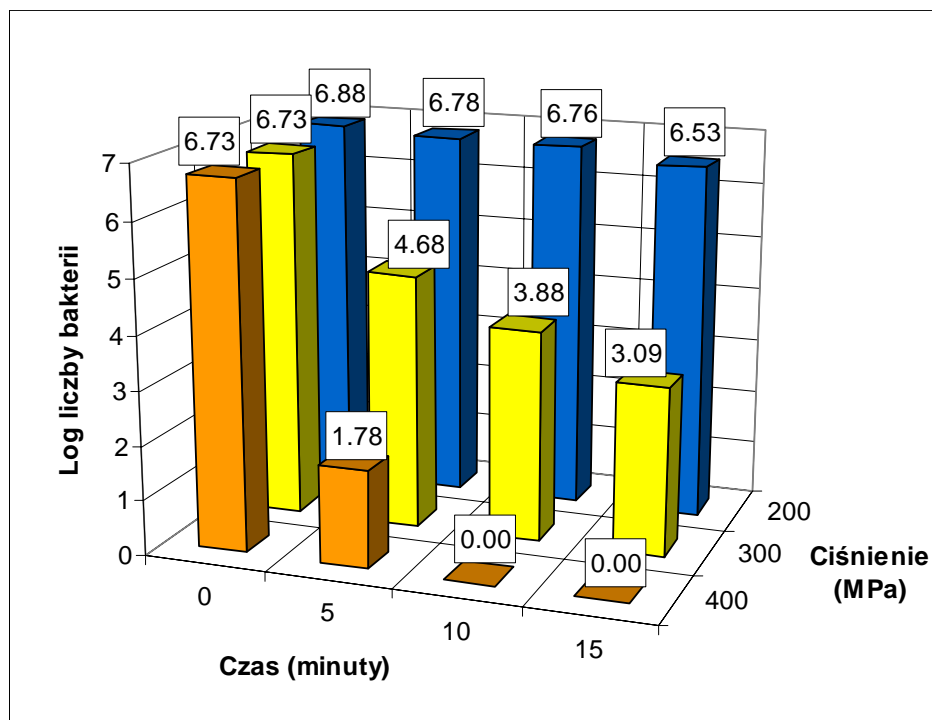
WYNIKI

Powstałe kolonie *Campylobacter jejuni* liczono, a końcowy wynik przedstawiono jako liczbę j.t.k. *C. jejuni* w przeliczeniu na 1 g mięsa. Obliczenia statystyczne przeprowadzono na wartościach zlogarytmowanych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu SPSS® 14.0 dla Windows®, stosując jednoczynnikową ANOVA oraz test Tukey'a. Analiza wariancji wykazała, że zarówno ciśnienie, jak i czas obróbki mają statystycznie istotny wpływ na stopień redukcji *C. jejuni* w mięsie wieprzowym ($p < 0,01$) przy zastosowaniu dawek ciśnienia o wartości 200 i 300 MPa.

Stopień redukcji *Campylobacter jejuni* w mięsie wieprzowym został przedstawiony na rysunku 2. W przypadku zastosowania ciśnienia o wartości 200 MPa obserwowano bardzo małą redukcję *C. jejuni*. Poddanie próbek działaniu ciśnienia o wartości 300 MPa przez 5 min spowodowało redukcję *C. jejuni* o około 2 cykle logarytmiczne, a wydłużanie czasu działania UHP o kolejne 5 min dawało dalsze redukcje o około 0,8 cyklu logarytmicznego. Dużą redukcję zaobserwowano przy zastosowaniu ciśnienia o wartości 400 MPa przez 5 min – redukcja o prawie 5 cykli logarytmicznych – a wydłużenie czasu o kolejne 5 min dawało redukcję liczby *C. jejuni* do poziomu poniżej wykrywalności.

Wyniki badań przedstawione w tabeli 1 pozwoliły na wyliczenie dawek D_{10} metodą regresji liniowej. I tak, do redukcji *C. jejuni* w mięsie wieprzowym o 6 cykli logarytmicznych, a więc do poziomu uznawanego za wystarczający do ochrony zdrowia konsumenta, konieczne jest zastosowanie ciśnienia o wartości 200 MPa przez 276,9 min lub 300 MPa przez 25,62 min. Wyliczenie dawek D_{10} metodą regresji liniowej dla

C. jejuni poddanego działaniu UHP o wartości 400 MPa nie było możliwe, ponieważ przy zastosowaniu kolejnych dłuższych czasów nie wykryto żadnej żywej komórki *C. jejuni* w badanych próbkach.



Rys. 2. Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na przeżywalność *Campylobacter jejuni* w mięsie wieprzowym pakowanym próżniowo

Fig. 2. Effect of high pressure treatment on survival of *C. jejuni* in vacuum-packed pork

Tabela 1. Wartości D_{10} – czas potrzebny do dziesięciokrotnej redukcji liczby *C. jejuni* w próbkach mięsa wieprzowego pakowanego próżniowo

Table 1. D-value – time required for decimal reduction of *C. jejuni* in the samples of vacuum-packed pork

Ciśnienie	Niestandaryzowany współczynnik regresji (b)	Dawka D_{10} (-1/b)	Standaryzowany współczynnik regresji (Beta)
200 MPa	-0.02167	46.15 min	-0.81064
300 MPa	-0.2344	4.27 min	-0.96418
400 MPa	*	*	*

Uwaga: * Obliczeń nie przeprowadzono, ponieważ nie zaobserwowano wzrostu *C. jejuni* w próbkach poddanych obróbce wysokociśnieniowej o parametrach 400 MPa przez 10 i 15 min.

Note: * Calculations were not conducted, because no viable cells of *C. jejuni* were found in samples subjected to 400 MPa for 10 and 15 min.

DYSKUSJA

Komitet Kodeksu Higieny FAO/WHO zwraca uwagę, że zabiegi eliminujące drobnoustroje powinny podlegać walidacji, tj. sprawdzeniu skuteczności działania dla planowanego zastosowania. Co znaczy, że dla każdego rodzaju i charakteru produktu powinny być ustalane indywidualnie. Celem niniejszej pracy było zbadanie możliwości inaktywacji *Campylobacter jejuni* w mięsie wieprzowym pakowanym próżniowo, przy zastosowaniu ciśnień o wartościach 200, 300 i 400 MPa.

Jak wykazały liczne badania [Pietrzak 2007, Grochalska 2001, Matser 2000, Pierpaolo 2000] obróbka wysokociśnieniowa jest bardzo atrakcyjną, alternatywną metodą konserwacji żywności. Według Pietrzak [2007] obróbka wysokociśnieniowa (600 MPa, 10 min, 20°C) spowodowała istotne przedłużenie czasu przechowywania (shelf life) peklowanej szynki wieprzowej zapakowanej próżniowo. Nawet próbki o zredukowanej ilości substancji peklujących w solance, przechowywane w warunkach chłodniczych, zachowywały pożądane parametry organoleptyczne aż do 8 tygodni. Według Cheftel i Culioli [1997] technologia UHP w połączeniu z innymi zabiegami, takimi jak: wcześniejsze pakowanie próżniowe, obróbka termiczna oraz niska temperatura przechowywania znajduje uzasadnienie dla szerokiej gamy produktów spożywczych, w tym mięsa i produktów z niego wytworzonych oraz mięsa odkostnionego mechanicznie. Jednocześnie zastosowanie pasteryzacji wysokociśnieniowej jako metody konserwacji żywności pozwala na znaczące obniżenie parametrów obróbki termicznej, która – jak powszechnie wiadomo – może powodować straty odżywcze i organoleptyczne mięsa i jego produktów. Wielokrotnie udowodniono, że technologia UHP (300–800 MPa) zapewnia redukcję Gram-ujemnych drobnoustrojów chorobotwórczych występujących w żywności do poziomu poniżej wykrywalności, w różnych środkach spożywczych. Solomon i Hoover [2004] badali wpływ pasteryzacji wysokociśnieniowej na przeżywalność *Campylobacter jejuni* w bulionie Bolton, buforze fosforanowym, mleku UHT – pełnym i odtłuszczonym, mleku sojowym oraz w mięsie drobiowym. Wykazali, że wysokie ciśnienie hydrostatyczne o wartości ≤ 400 MPa zapewnia znaczącą inaktywację *C. jejuni* zarówno w badaniach modelowych, jak i w środkach spożywczych. Podobne wyniki otrzymano w badaniach własnych. Największą redukcję *C. jejuni* w mięsie wieprzowym otrzymano przy zastosowaniu ciśnienia o wartości 400 MPa przez 5 min – redukcja o ok. 5 cykli logarytmicznych. Zastosowanie ciśnienia o niższej wartości przez dłuższy czas, tj. 300 MPa przez 15 min, dało redukcję *C. jejuni* o jedynie ok. 3,6 cykle logarytmiczne.

W tabeli 2 przedstawiono dawki D_{10} dla wybranych drobnoustrojów występujących w żywności. Jak widać, *C. jejuni* jest stosunkowo wrażliwy na działanie UHP. Dawka D_{10} dla *Salmonella Enteritidis* w szynce wieprzowej wynosi 7.10 min, podczas gdy dawka D_{10} dla *Campylobacter jejuni* w surowym mięsie wieprzowym liczy 4.27 min, gdy poddano działaniu UHP o wartości 300 MPa.

Tabela 2. Dawki D_{10} – czas (w minutach) niezbędny do dziesięciokrotnej redukcji *C. jejuni* (dane oryginalne), *A. hydrophila* [Fonberg-Broczek 2005], *E. hirae* [Szczawiński 2003], *L. monocytogenes* [Fonberg-Broczek 2005] i *S. Enteritidis* [Szczawińska 2000] w danym produkcie spożywcym przy zastosowaniu technologii UHP

Table 2. D-values – time required for decimal reduction (minutes) of *C. jejuni* (original data), *A. hydrophila* [Fonberg-Broczek 2005], *E. hirae* [Szczawiński 2003], *L. monocytogenes* [Fonberg-Broczek 2005] and *S. Enteritidis* [Szczawińska 2000] at given pressure

UHP (MPa)	<i>C. jejuni</i> (wieprzowina)	<i>A. hydrophila</i> (ser)	<i>E. hirae</i> (ser typu Gouda)	<i>L. monocytogenes</i> (sok jabłkowy)	<i>S. Enteritidis</i> (szynka wieprzowa)
200	46.15 min	12.97	nie badano	6.37	nie badano
300	4.27 min	2.43	33.67	2.60	7.10
400	*	*	17.83	1.56	3.81

Uwaga: * Obliczeń nie przeprowadzono, ponieważ nie zaobserwowano wzrostu badanych drobnoustrojów w próbkach poddanych wysokociśnieniowej obróbce.

Note: * Calculations were not conducted, because no viable cells of *C. jejuni* were found in samples subjected to 400 MPa for 10 and 15 min.

WNIOSKI

Obecność *Campylobacter* w produktach spożywczych często wynika z zanieczyszczeń krzyżowych, najczęściej w związku z nieodpowiednim, niehigienicznym obchodzeniem się z surowym mięsem. *Campylobacter* może pojawiać się na rękach pracowników rzeźni, na sprzętach i powierzchniach produkcyjnych. Dochodzi do skażenia gotowych produktów na etapie plasterkowania i pakowania. W hamburgerach przechowywanych w minus 18°C *C. jejuni* może przetrwać nawet do 90 dni [Grigoriadis i in. 1997]. Technologia wysokociśnieniowa znajduje szerokie zastosowanie wśród różnych produktów spożywczych. W praktyce najczęściej używa się wysokich ciśnień hydrostatycznych z zakresu 400 – 600 MPa przez okres poniżej 10 min [Farkas 2000]. Odnosząc to do otrzymanych wyników w badaniach własnych oraz innych autorów, można stwierdzić, że technologia wysokociśnieniowa o parametrach obecnie stosowanych zapewnia istotną redukcję pałeczek *Campylobacter*.

Zabiegi pasteryzacji wysokociśnieniowej, przewidziane w celu inaktywacji pałeczek *Salmonella* lub *Listeria spp.* w produktach pakowanych próżniowo, powinny być wystarczające do jednoczesnej redukcji *Campylobacter* do poziomu gwarantującego bezpieczeństwo konsumenta.

PIŚMIENNICTWO

- Altekruse S.F., Stern N.J., Fields P.I., Swerdlow D.L., 1999. *Campylobacter jejuni* – An Emerging Foodborne Pathogen. *Emerg. Infect. Dis.*, 1 (5), 28–33.
- Black R.E., Levine M.M., Clements M.L., Hughs T.P., Blaser M.J. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J. Infect. Dis.*, 157, 472–479.
- Cheftel J.C., Culioli J., 1997. Effects of high pressure on meat: a review. *Meat Sci.*, 46, 211–236.
- Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J., 2001. *Food microbiology. Fundamentals and Frontiers*. 2nd ed. Washington, D.C. American Society for Microbiology Press, 179–192.

- Farkas D., Hoover D., 2000. High pressure processing. Kinetics of microbial inactivation for alternative processing technologies. *J. Food Sci. Supp.*, 47–64.
- Fonberg-Broczek M., Windyga B., Szczawiński J., Szczawińska M., Pietrzak D., Prestamo G., 2005. High Pressure Processing for Food Safety. *Acta Biochim. Pol.*, 52, 721–724.
- Food and Agriculture Organization, 1999. Report of the FAO expert consultation on the trade impact of *Listeria* in fish products. FAO Fisheries Report, 604, 34.
- Grigoriadis S.G., Koidis P.A., Varelzis K.P., Batzios C.A., 1997. Survival of *Campylobacter jejuni* inoculated in fresh and frozen beef hamburgers stored under various temperatures and atmospheres. *J. Food Prot.*, 60, 903–907.
- Grochalska D., Gajos K., Windyga B., Fonberg-Broczek M., Ścieżyńska H., Mroczek J., 2001. Wpływ wysokich ciśnień na właściwości i trwałość surowej polędwicy wędzonej. *Mięso i wędliny*, 6, 24–26.
- Matser A.M., Stegeman D., Kals J., Bartels P.V., 2000. Effects of high pressure on colour and texture of fish. *High Pressure Res.*, 19, 109–115.
- Nachamkin I., Blaser M.J. 2000. *Campylobacter*. 2nd ed. Washington, D.C. American Society for Microbiology Press, 121–138.
- Osek J., 2008. Występowanie chorób odzwierzęcych i ich czynników etiologicznych w 2006 r. w świetle raportu Europejskiego Urzędu do spraw Bezpieczeństwa Żywności. *Życie Wet.*, 3, 192–201.
- Pierpaolo R., Squarcina N., Gola S., Sandei L., Iametti S., Carpi G., 2000. Effect of thermal treatment under high pressure on the quality of a meat sauce. *High Pressure Res.*, 19, 99–107.
- Pietrzak D., Fonberg-Broczek M., Mucka A., Windyga B., 2007. Effect of high pressure treatment on the quality of cooked pork ham prepared with different levels of curing ingredient. *High Pressure Res.*, 1(27), 27–31.
- Popowski J., 1994. Wybrane zagadnienia biologii i patogenyzy *Campylobacter jejuni*. *Post. Mikrobiol.* 2 (33), 201–212.
- Snelling W.J., Matsuda M., Moore J.E., Dooley J.S.G., 2005. *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 41 (4), 297–302.
- Solomon E.B., Hoover D.G., 2004. Inactivation of *Campylobacter jejuni* by high hydrostatic pressure. *Lett. Appl. Microbiol.*, 38 (6), 505–509.
- Szczawińska M.E., Szczawiński J., 2000. Effect of ultra high pressure on survival of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in sliced, cured ham. *Mat. Konf. ESNA XXX Annual Meeting and International Union of Radioecology (IUR)*. Keszthely, Hungary.
- Szczawiński J., Stańczak B., Pęcunek J., 2003. Survival of *Enterococcus hirae* in ripened cheese subjected to ultra high pressure. *Pol. J. Vet. Sci.*, 6, 267–269.
- Wilson I.G., Moore J.E., 1996. Presence of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in shellfish. *Epidemiol. Infect.*, 116, 147–153.

HIGH PRESSURE TREATMENT AS A METHOD OF *CAMPYLOBACTER JEJUNI* INACTIVATION IN FOOD OF ANIMAL-ORIGIN

Abstract. The sterile samples of pork were placed in polyamide-polyethylene pouches and inoculated with three-strain composite of *C. jejuni* (inoculum ca 10^6 CFU x g⁻¹). The inoculated samples were sealed under vacuum and subjected to 200, 300 and 400 MPa of hydrostatic pressure for 5, 10 and 15 min. The number of surviving *C. jejuni* per gram was determined by the ten-fold dilution method followed by plating on Karmali agar. D₁₀ values were calculated. This work has shown that for reduction *C. jejuni* in vacuum-packed pork by 6 log units the application of 200 MPa for 46.15 min or 300 MPa for 4.27 min or 400 MPa is needed.

Key words: *Campylobacter*, high-pressure processing, food safety, microbial inactivation

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 25.09.2008

Do cytowania – For citation: Jackowska-Tracz A., Tracz M., 2008. Wysokie ciśnienia hydrostatyczne jako metoda inaktywacji *Campylobacter jejuni* w żywności pochodzenia zwierzęcego. Acta Sci. Pol. Med. Vet. 7(3), 15–24.

ZNACZENIE REGULACJI PRAWNYCH W ZAPEWNIENIU BEZPIECZEŃSTWA GENETYCZNIE ZMODYFIKOWANYCH ORGANIZMÓW DO UŻYTKU PASZOWEGO

Michał Tracz, Agnieszka Jackowska-Tracz

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. W artykule przedstawiono wybrane regulacje prawne Unii Europejskiej i prawa polskiego służące do zapewnienia bezpieczeństwa GMO do użytku paszowego. To samo zadanie, jakim jest zapewnienie bezpieczeństwa konsumentom żywności pochodzenia zwierzęcego, realizowane jest przez oba systemy prawne za pomocą różnych przepisów. Niektóre przyjęte rozwiązania prawne prowadzą do sprzeczności pomiędzy prawem polskimi i europejskim. Stosowane w prawie polskim środki podnoszą tylko pozornie bezpieczeństwo konsumentów. W pracy zaproponowano wprowadzenie zmian w polskim systemie prawnym.

Słowa kluczowe: GMO do użytku paszowego, pasza genetycznie zmodyfikowana, bezpieczeństwo żywności, bezpieczeństwo żywnościowe

WSTĘP

Genetycznie zmodyfikowane organizmy do użytku paszowego i wytworzone z nich pasze wprowadzone do łańcucha paszowego są źródłem szeregu zagrożeń. Negatywne efekty dotyczyć mogą nie tylko zwierząt karmionych takimi GMO, ale również ludzi spożywających produkty pochodzenia zwierzęcego, które zostały pozyskane od zwierząt karmionych GMO. Zwierzęta narażone są na negatywne działanie nowych białek powstałych w wyniku ekspresji nowo wprowadzonych genów do organizmu rośliny. Ryzyko polega na toksycznym działaniu nowych białek, potencjalnej ich alergenicności i zmianie składu jakościowego nowej paszy. Zwraca się uwagę na możliwość włączenia obcych genów do komórek karmionych zwierząt i interakcji obcych genów z materiałem genetycznym zwierzęcia. Bierze się pod uwagę zagrożenia dla ludzi wynikające z ewentualnej obecności w produktach pochodzenia zwierzęcego DNA pochodzącego

z genetycznie zmodyfikowanych materiałów paszowych, konsekwencją tego może być oddziaływanie „nowego” DNA na DNA człowieka.

Polska, jako członek Unii Europejskiej, zobowiązana jest realizować Wspólną Politykę Rolną Unii Europejskiej, której elementem jest zapewnienie bezpieczeństwa żywności oraz pasz. Stosuje się przepisy prawa żywnościowego, które mają na celu zapewnienie wysokiego poziomu ochrony zdrowia i życia ludzi, jak również ochronę interesów konsumentów i uczciwych praktyk w handlu. Oprócz wymienionych wyżej celów należy uwzględnić ochronę zdrowia i dobrostanu zwierząt, zdrowia roślin i ochronę środowiska naturalnego. Zapewnienie bezpieczeństwa konsumentom żywności jest obowiązkiem władzy publicznej, którego źródło znajduje się również w Konstytucji RP. Zarówno obowiązki nałożone na władze publiczne przez Konstytucję RP, jak i przez prawo żywnościowe Wspólnoty Europejskiej nie ograniczają się do zapewnienia bezpieczeństwa żywności, ale rozciągają się również na zapewnienie bezpieczeństwa żywnościowego, które w kontekście obecności genetycznie zmodyfikowanych organizmów w łańcuchu żywnościowym bywa pomijane.

Pojawienie się genetycznie zmodyfikowanych organizmów w łańcuchu żywnościowym i paszowym stworzyło nowe, wcześniej nie występujące zagrożenia, które utrudniają realizację ogólnych celów prawa żywnościowego. Tradycyjne środki prawne i procedury okazały się niewystarczające. Z tego powodu Wspólnota Europejska i Polska wprowadziły szereg przepisów sektorowych, zawierających nowe rozwiązania administracyjno-prawne, zapewniające osiągnięcie ogólnych celów prawa żywnościowego w zakresie stosowania genetycznie zmodyfikowanych organizmów w żywieniu ludzi i zwierząt. Celem prawodawstwa wspólnotowego w odniesieniu do GMO stosowanych w żywieniu ludzi i zwierząt jest:

- ustanowienie podstawy zapewniania wysokiego poziomu ochrony życia i zdrowia ludzkiego, zdrowia i dobrostanu zwierząt, środowiska naturalnego i interesów konsumenta w związku z genetycznie zmodyfikowaną żywnością i paszą, przy jednoczesnym zapewnieniu skutecznego funkcjonowania rynku wewnętrznego;
- ustanowienie wspólnotowych procedur zatwierdzania i nadzoru genetycznie zmodyfikowanej żywności i pasz;
- ustanowienie przepisów dotyczących etykietowania genetycznie zmodyfikowanej żywności i pasz.

W kształtowaniu polityki dotyczącej GMO Wspólnota Europejska i poszczególne kraje członkowskie, a w tym i Polska, powinny uwzględniać wszelkie zagrożenia dla zdrowia obywateli. Jednakże przyjęte rozwiązania prawne muszą być proporcjonalne do zagrożenia i nie mogą w nadmierny sposób ograniczać innego podstawowego celu, jakim jest zapewnienie swobodnego przepływu bezpiecznej żywności i pasz. Należy również zwrócić uwagę na wpływ czynników społecznych i ekonomicznych na zastosowane środki prawne.

System przepisów regulujących postępowanie z genetycznie zmodyfikowanymi organizmami tworzy mechanizmy, które ograniczają swobodne wprowadzanie, obrót oraz stosowanie genetycznie zmodyfikowanych organizmów przeznaczonych do użytku paszowego. Rodzą się pytania, czy zastosowane środki prawne nie naruszają bezpieczeństwa żywnościowego, oraz czy wspólnotowe środki prawne związane z genetycznie zmodyfikowanymi organizmami przeznaczonymi do użytku paszowego są adekwatne do zagrożeń, jakie te materiały mogą powodować.

Przedmiotem analizy były teksty prawa materialnego i formalnego, wydawane przez uprawnione do tego organy Wspólnoty Europejskiej i Polski. Metody badawcze dobrano tak, aby przedstawić dwa wzajemnie powiązane ze sobą systemy prawne – prawa Wspólnoty Europejskiej i Polski, uwidocznić różnice pomiędzy nimi, a także ocenić środki prawne, którymi się posługują. W tym celu przeprowadzono analizę tekstów prawnych w oparciu o metody wykładni prawa.

WYBRANE ŚRODKI PRAWNE PRAWA UNII EUROPEJSKIEJ

Obowiązujący na terenie Polski system prawny, regulujący postępowanie z GMO do użytku paszowego, powstał w wyniku nałożenia się dwóch systemów prawnych, tj. polskiego i unijnego. Główny fundament tego systemu stanowią akty normatywne Wspólnoty Europejskiej, które uzupełniane są przez akty prawne prawa polskiego. Przepisy krajowe w głównej części regulują kwestie formalne, tj. organizację i podział zadań, kompetencji oraz obowiązków wypływających z prawa wspólnotowego pomiędzy organy administracji rządowej. Przepisy prawa materialnego dotyczącego GMO do użytku paszowego w polskich aktach normatywnych nie są rozbudowane, aczkolwiek nie znaczy to, że nie mają wpływu na kształt systemu prawnego, który zapewnił ma bezpieczeństwo GMO do użytku paszowego.

Środki prawne składające się na stworzony system prawny podzielić można na trzy rodzaje. Pierwszy rodzaj są to środki prawne znajdujące zastosowanie przy wstępnej kontroli bezpieczeństwa GMO. Drugi – to środki prawne zapewniające konsumentom pełną informację na temat GMO do użytku paszowego lub produktów, w składzie których GMO może występować. Natomiast trzeci – to środki prawne umożliwiające kontrolę i nadzór nad GMO znajdującymi się w obrocie.

Podstawowym środkiem prawnym pierwszej grupy jest obowiązek zawarty w przepisie ustępu drugiego art. 16 rozporządzenia (WE) nr 1829/2003, zgodnie z którym żadna osoba nie może wprowadzić do obrotu, używać lub przetwarzać pasz genetycznie zmodyfikowanych i GMO do użytku paszowego, o ile nie jest on objęty zezwoleniem wydanym na podstawie tego rozporządzenia. Procedura wydawania zezwolenia obejmuje działania organów Wspólnoty Europejskiej oraz krajów członkowskich. Na wydanie zezwolenia składa się szereg czynności o charakterze naukowo-badawczym oraz administracyjno-politycznym. Podstawowym wyjściowym elementem procedury zatwierdzania GMO do użytku paszowego jest naukowa ocena każdego ryzyka, które może wpływać na zdrowie ludzi i zwierząt, oraz – gdy to stosowne – ocena ryzyka dla środowiska naturalnego, jakie wiąże się z GMO. Ten etap postępowania prowadzony jest przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) na podstawie przedstawionych przez wnioskodawcę wyczerpujących danych zawartych we wniosku. EFSA przy sporządzaniu oceny wspierana jest przez instytucje naukowe państw członkowskich.

Wynikiem działań EFSA jest opinia, która formułuje odpowiedź na pytanie, czy GMO do użytku paszowego spełnia wymagania rozporządzenia (WE) nr 1829/2003, tj.:

- nie wywiera szkodliwych skutków dla zdrowia ludzi, zwierząt lub środowiska naturalnego;
- nie wprowadza użytkownika w błąd;

- nie szkodzi, ani nie wprowadza konsumenta w błąd z powodu pogorszenia szczególnych cech produktów zwierzęcych;
- nie odbiega od paszy przeznaczonej do zastąpienia w takim stopniu, że jej tradycyjne spożycie nie powoduje szkodliwych skutków odżywczych dla zwierząt lub ludzi.

Dodatkowo ocenie poddaje się skutki, jakie GMO może wywierać na środowisko naturalne i zdrowie ludzi. EFSA w opinii na temat GMO musi ustosunkować się do wszelkich zastrzeżeń formułowanych przez państwa członkowskie. Jednym z celów oceny powinno być rozpoznanie, czy istnieje konieczność zastosowania zarządzania zagrożeniami, a jeśli tak, określenie najważniejszych metod. Oceniając ryzyko, przyjmuje się podejście porównawcze. Polega ono na porównaniu GMO i produktów wytworzonych z GMO z ich tradycyjnymi odpowiednikami, które posiadają długą historię bezpiecznego stosowania w żywieniu ludzi i zwierząt oraz obecności w środowisku. Tradycyjne odpowiedniki stanowią punkt odniesienia do oceny bezpieczeństwa GMO.

Sporządzona zgodnie z tymi zasadami opinia stanowi podstawę do podjęcia decyzji przez organ odpowiedzialny za zarządzanie ryzykiem. Organem tym jest Komisja Europejska, wydaje decyzję pozytywną lub negatywną dotyczącą dopuszczenia GMO do użytku paszowego. Komisję wspomaga Komitet ds. Łańcucha Pokarmowego i Zdrowia Zwierząt, w skład którego wchodzi przedstawiciele wszystkich państw członkowskich. W przypadku gdy Komisja podejmuje decyzję odbiegającą od opinii EFSA, zobowiązana jest przedłożyć Komitetowi wyjaśnienie zaistniałych rozbieżności. W decyzji określa się warunki wprowadzenia do obrotu oraz dalszego postępowania z GMO do użytku paszowego, np.: propozycję etykietowania, wszelkie warunki lub ograniczenia nakładane na wprowadzanie do obrotu, używania i manipulowania, w tym wymagania monitorowania po wprowadzeniu do obrotu oparte na wyniku oceny ryzyka, oraz warunki dotyczące ochrony poszczególnych ekosystemów czy obszarów geograficznych. Inne ważne dane to informacja na temat uwierzytelnionej metody wykrywania, pobierania próbek, wykrywania i identyfikacji zdarzenia transformującego w GMO, a także – jeśli to konieczne – plan monitorowania skutków dla środowiska.

Do drugiej kategorii środków prawnych, zapewniających możliwość dokonania przez konsumenta świadomego wyboru między produktem tradycyjnym a genetycznie zmodyfikowanym, zaliczany jest obowiązek etykietowania GMO do użytku paszowego i pasz genetycznie zmodyfikowanych. Szczegółowe wymogi i zasady odnoszące się do możliwości etykietowania ustalone zostały w dwóch rozporządzeniach, tj. rozporządzeniu (WE) nr 1829/2003 i rozporządzeniu (WE) nr 1830/2003. Odpowiedni zbiór informacji zamieszczony w sposób wyraźnie widoczny, czytelny i nieusuwalny musi być dostępny dla konsumenta. Informacje te towarzyszą produktowi na każdym etapie obrotu pod postacią załączonego dokumentu albo na opakowaniu, pojemniku lub na załączonej do niego etykiecie. I tak, w myśl przepisów rozp. 1829/2003 w przypadku GMO do użytku paszowego oraz pasz zawierających lub składających się z GMO zamieszcza się obok nazwy paszy określenie „genetycznie zmodyfikowany [nazwa organizmu]”. Informacja ta znajduje się ma tuż obok określonej nazwy paszy. Ewentualnie określenie to może pojawić się w przypisie do wykazu pasz, wydrukowane czcionką o przynajmniej tej samej wielkości. Rozporządzenie 1830/2003 nakłada dodatkowe obowiązki w odniesieniu do produktów wstępnie opakowanych. Na opakowaniu należy umieścić informację: „Ten produkt zawiera organizmy zmodyfikowane genetycznie” lub „Ten produkt zawiera zmodyfikowany(-e/-a) genetycznie [nazwa

organizmu(-ów)]”. Dodatkowo wymagania odnoszące się do etykietowania mogą zostać określone w decyzji dopuszczającej GMO do obrotu. W zezwoleniu określa się sposób znakowania pasz, które pod jakimś względem odbiegają od swoich tradycyjnych odpowiedników. Pasza taka musi być oznaczona pod względem rozbieżności występujących pomiędzy paszą genetycznie zmodyfikowaną a jej tradycyjnym odpowiednikiem, takich jak: skład, właściwości odżywcze, skutki dla zdrowia określonych gatunków czy sposób użycia. Dodatkowo w zezwoleniu określa się sposób i zakres informacji umieszczanych na etykiecie GMO lub paszy, w przypadku gdy w związku z GMO bądź paszą podnoszone są kwestie etyczne. Jeśli brak tradycyjnego odpowiednika, podaje się dodatkowe informacje dotyczące charakteru oraz właściwości tego GMO.

Trzecia grupa środków prawnych, stosowanych przez organy państw członkowskich i organy Wspólnoty Europejskiej, to przepisy umożliwiające nadzór, a także kontrolę GMO oraz pasz genetycznie zmodyfikowanych znajdujących się w obrocie. W ramach nadzoru zbierane są informacje związane z obecnością GMO w środowisku i w sprzedaży. Podmiot, któremu przyznano zezwolenie, oraz inne zainteresowane strony są odpowiedzialne za prowadzenie obrotu zgodnie z zasadami określonymi w zezwoleniu. Jeśli zostały w decyzji nałożone ograniczenia i warunki dotyczące stosowania, przetwarzania lub obrotu, podmioty, w których posiadaniu znajduje się GMO do użytku paszowego, zobowiązane są do przestrzegania tych ograniczeń oraz ponoszą odpowiedzialność za ich naruszenie. Podstawowym obowiązkiem posiadacza zezwolenia jest zapewnienie, że produkty, które nie są objęte zezwoleniem nie będą wprowadzane do obrotu. Komisja, wydając decyzję dopuszczającą GMO do obrotu, może nałożyć na posiadacza zezwolenia obowiązek monitorowania skutków wprowadzeniu GMO do obrotu. Monitorowaniem można objąć używanie paszy przeznaczonej do spożycia przez zwierzęta po wprowadzeniu jej od obrotu oraz skutki dla środowiska naturalnego. Plan monitorowania dotyczący używania paszy (post market monitoring PMM) ma na celu potwierdzenie i uzupełnienie wstępnej oceny toksykologicznej paszy oraz potwierdzenie wstępnej oceny ryzyka dla zdrowia zwierząt. Pozwala to na przepływ informacji pomiędzy zainteresowanymi stronami na temat wpływu stosowania pasz na zdrowie zwierząt i ludzi. Uzyskane dane powinny pozwolić na stwierdzenie, czy założenia przyjęte podczas wstępnej oceny ryzyka dla zdrowia są prawidłowe, oraz dać odpowiedź na pytania: czy produkt jest używany zgodnie z zaleceniami, czy zaistniały przewidywane skutki używania paszy, w tym skutki niepożądane, oraz czy wystąpiły nieprzewidziane skutki uboczne [Wal J.-M. i in. 2003]. Posiadacz zezwolenia ponosi odpowiedzialność za dostarczanie informacji gromadzonych i przetwarzanych w ramach planu monitorowania. Informacje przekazywane są odpowiedniemu organowi państwa członkowskiego oraz do EFSA. W przypadku pojawienia się informacji o nowych, stwarzających zagrożenie dla zdrowia zwierząt i ludzi, a także dla środowiska naturalnego niepożądanych efektów obecności GMO, mogą być podjęte kroki w celu przeciwdziałania zagrożeniom. Kolejnym środkiem prawnym jest kompetencja EFSA do przeprowadzania oceny zezwoleń wydanych na podstawie rozporządzenia (WE) nr 1829/2003. Procedura zostaje uruchomiona na wniosek państwa członkowskiego lub Komisji, oraz z inicjatywy EFSA i jej zadaniem jest wykazać, czy zezwolenie dotyczące GMO spełnia warunki rozporządzenia. EFSA po sporządzeniu opinii przekazuje ją niezwłocznie państwom członkowskim, Komisji i posiadaczowi zezwolenia, oraz dodatkowo upublicznia opinię z pominięciem danych poufnych. Komisja, biorąc pod uwagę sporządzoną opinię, ma obowiązek niezwłocznie podjąć niezbędne działania, gdy istnieją okoliczności tego

wymagające. Komisja, przy zachowaniu trybu przewidzianego dla wydawania zgody, może odpowiednio zmienić, zawiesić lub cofnąć zezwolenie. Jest również uprawniona do zastosowania procedur nadzwyczajnych. Przesłanki do ich zastosowania są następujące: jeżeli jest oczywiste, że produkty najprawdopodobniej niosą ze sobą istotne ryzyko dla zdrowia ludzi, zwierząt lub środowiska naturalnego, lub jeżeli w świetle opinii EFSA pojawia się pilna potrzeba zawieszenia albo zmiany zezwolenia, to wtedy podejmuje się środki na podstawie procedur przewidzianych w art. 53 i 54 rozporządzenia (WE) nr 178/2002. Komisja w drodze decyzji może zastosować środki polegające na zawieszeniu wprowadzania, przywozu na rynek lub spożywania danej paszy, ustanowieniu specjalnych warunków dla danej paszy lub każdy inny stosowny środek tymczasowy. Tymczasowe zastosowanie powyższych środków z pominięciem procedury komitologii, po konsultacji z państwem członkowskim składającym wniosek i po poinformowaniu pozostałych Państw członkowskich, pozwala na szybką i proporcjonalną reakcję na zaistniałe zagrożenia. Kolejny środek prawny to obowiązek odnawiania zezwolenia. Zezwolenie wydawane jest na okres 10 lat, czas ten może zostać wydłużony o kolejne 10 lat. Ponowna ocena dokonywana jest na podstawie sprawozdania z wyników monitorowania, jeżeli takie przewidziane było w zezwoleniu, a także wszelkich nowych informacji, które stały się dostępne w odniesieniu do oceny bezpieczeństwa używania GMO do użytku paszowego i pasz. Na podstawie tych danych oraz pierwszego zezwolenia, EFSA sporządza nową opinię. Tryb podejmowania decyzji przez Komisję jest identyczny jak w przypadku wydawania pierwszego zezwolenia.

GMO DO UŻYTKU PASZOWEGO W USTAWIE O PASZACH

Środki prawne prawa krajowego odnoszące się do GMO do użytku paszowego zawarte są w ustawie o paszach. W swojej treści zawiera ona niewiele przepisów materialnych regulujących postępowanie z GMO do użytku paszowego i pasz genetycznie zmodyfikowanych. Jest to spowodowane faktem istnienia rozporządzeń (WE) nr 1829/2003 i 1830/2003 unifikujących prawo na poziomie wspólnotowym. Przepisem materialnym, który dotyczy pasz genetycznie zmodyfikowanych, jest art. 15 ustawy o paszach. Przepis ten formułuje zakaz wytwarzania, wprowadzania do obrotu i stosowania w żywieniu zwierząt pasz genetycznie zmodyfikowanych oraz GMO przeznaczonych do użytku paszowego. Zakazem objęte są wszystkie GMO do użytku paszowego, w tym te dopuszczone na podstawie decyzji Komisji wydanej w oparciu o przepisy prawa europejskiego. Taka sytuacja prowadzi do powstania rozbieżności pomiędzy prawem polskim a prawem Wspólnoty Europejskiej. Zawarty w polskiej ustawie środek prawny nie przystaje do współobowiązującego na terenie Polski systemu prawa unijnego. Dodatkowo, obok wątpliwości prawnych, dotyczących kolizji norm prawa polskiego i wspólnotowego, pojawiają się wątpliwości co do celowości istnienia zakazu. Konstytucja Rzeczypospolitej Polskiej w art. 5 zobowiązuje RP do zapewnienia bezpieczeństwa obywateli oraz w art. 68 przyznaje każdemu z obywateli prawo do ochrony zdrowia. Obrót i stosowanie GMO do użytku paszowego w żywieniu zwierząt niesie ze sobą potencjalne zagrożenia dla zdrowia ludzi i zwierząt, a co za tym idzie, może zagrażać bezpieczeństwu publicznemu. Tak więc, zapewnienie bezpieczeństwa jest podstawowym celem, jaki realizują organy władzy publicznej. Zasadniczymi elementami bezpieczeństwa publicznego w odniesieniu do GMO będą bezpieczeństwo żywno-

ściowe i bezpieczeństwo żywności. Dostęp do bezpiecznej żywności jest komponentem bezpieczeństwa żywnościowego. Organizacja ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) definiuje bezpieczeństwo żywnościowe jako sytuację, w której wszyscy ludzie w każdym czasie posiadają fizyczny i ekonomiczny dostęp do wystarczającej ilości bezpiecznej żywności, która zaspokoi ich potrzeby dietetyczne oraz preferencje żywieniowe w celu zapewnienia aktywnego i zdrowego życia. Jak wynika z definicji, niezbędnym elementem bezpieczeństwa żywnościowego jest zapewnienie bezpieczeństwa żywności. Działania na tych dwu płaszczyznach, bezpieczeństwa żywnościowego i bezpieczeństwa żywności, gdy nie są wzajemnie odpowiednio powiązane, lub gdy są dokonywane rozdzielnie, mogą oddziaływać na siebie negatywnie. Taka sytuacja ma miejsce w odniesieniu do zakazu dotyczącego GMO do użytku paszowego. Przepis ten i norma prawna w nim zakodowana może być zinterpretowana jako element polityki zapewnienia bezpieczeństwa żywności. Zakaz opiera się na podejściu „zero-risk”, co z pewnością ogranicza, a nawet uniemożliwia występowanie zagrożeń związanych z obecnością GMO do użytku paszowego w łańcuchu żywnościowym. Z drugiej strony, podejście to prowadzi do naruszenia bezpieczeństwa żywnościowego. Zakaz stosowania GMO do użytku paszowego oraz pasz genetycznie zmodyfikowanych spowoduje wzrost kosztów produkcji żywności ze względu na wyższe koszty zakupów pasz niezawierających GMO i wzrost kosztów produkcji zwierzęcej [Komisja Europejska, DG Research 2005]. Przekłada się to w prosty sposób na wzrost cen żywności oferowanej konsumentowi. Zastosowanie takiego środka prawnego jest wynikiem przyjętego przez Rząd RP ramowego stanowiska Polski dotyczącego GMO. W stanowisku tym Rząd opowiada się przeciwko uwalnianiu do środowiska GMO w celach doświadczalnych i komercyjnych oraz przeciwko obrotowi paszami genetycznie zmodyfikowanymi [Kancelaria Prezesa Rady Ministrów 2006]. W powołanym stanowisku Rząd dopuszcza możliwość importu żywności genetycznie zmodyfikowanej. Uniemożliwiając stosowanie GMO do użytku paszowego, ograniczono niebezpieczeństwo wystąpienia ewentualnych negatywnych skutków ich obecności w łańcuchu żywnościowym, a z drugiej strony, dopuszcza się na rynek krajowy importowaną żywność genetycznie zmodyfikowaną. Taki brak konsekwencji nie daje się wyjaśnić z przyjętego przez rząd punktu widzenia bezpieczeństwa żywności i jest zaprzeczeniem zasady „zero-risk”, która wydaje się być podstawą polityki rządu w odniesieniu do GMO. Podejście takie może być podyktowane wyraźnie negatywnym stosunkiem społeczeństwa do stosowania inżynierii genetycznej w sektorze spożywczym [Twarowski 2007].

PODSUMOWANIE

Wdrażane środki prawne powinny zapewnić możliwość realizacji założonego celu, tj. bezpieczeństwa konsumentów. Jednak cel ten nie może być postrzegany jedynie w aspekcie bezpieczeństwa żywności. Przy tworzeniu systemu prawnego i składających się nań środków prawnych należy brać pod uwagę wszystkie aspekty bezpieczeństwa związanego z żywnością. Należy raczej zapobiegać występowaniu ewentualnych zagrożeń oraz umożliwić reagowanie na zagrożenia, przy jednoczesnym zapewnieniu konsumentom i producentom żywności swobodnego wyboru. Zastosowany w polskim prawie zakaz eliminuje zagrożenia bezpieczeństwa żywności i pasz poprzez wykluczenie z łańcucha paszowego GMO do użytku paszowego. Restrykcyjność zakazu prowadzi

w konsekwencji do obniżenia szeroko pojętego bezpieczeństwa konsumenta żywności, poprzez uniemożliwienie dostępu do najnowszych osiągnięć współczesnego rolnictwa. Pociąga to za sobą wzrost kosztów produkcji i zakupu żywności pochodzenia zwierzęcego, a to prowadzi do zmniejszenia ekonomicznej dostępności żywności. Władze UE oraz państw członkowskich dysponują licznymi środkami prawnymi, w ramach wspólnotowego systemu prawnego, pozwalającymi na zapewnienie bezpieczeństwa konsumentom bez naruszania równowagi pomiędzy bezpieczeństwem żywności i bezpieczeństwem żywnościowym. Tak więc celowe jest zniesienie krajowego zakazu obrotu, stosowania i przetwarzania GMO do użytku paszowego i pasz genetycznie zmodyfikowanych, co doprowadzi do unifikacji polskiego systemu prawnego ze wspólnotowym systemem prawnym i w konsekwencji pozwoli na podniesienie poziomu bezpieczeństwa polskich konsumentów.

PIŚMIENNICTWO

- Kancelaria Prezesa Rady Ministrów 2006. Ramowe stanowisko Polski dotyczące organizmów genetycznie zmodyfikowanych, przedłożone przez ministra środowiska.
- Komisja Europejska, DG Research 2005. Transforming life science knowledge into new, sustainable eco-efficient and competitive products. Materiały z konferencji „New perspectives on the knowledge-based bio-economy”. Bruksela.
- Konstytucja Rzeczypospolitej Polskiej. Dz. U. nr 78 z 2 kwietnia 1997 poz. 483 z późn. zm.
- Rozporządzenie (WE) nr 1829/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. w sprawie genetycznie zmodyfikowanej żywności i paszy Dz. U. UE seria L. z dnia 18 sierpnia 2003 r. nr 268 str. 1 z późn. zm.
- Rozporządzenie (WE) nr 1830/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. dotyczące możliwości śledzenia i etykietowania organizmów zmodyfikowanych genetycznie oraz możliwości śledzenia żywności i produktów paszowych wyprodukowanych z organizmów zmodyfikowanych genetycznie i zmieniające dyrektywę 2001/18/WE Dz.U.UE seria L z dnia 18 października 2003 r. nr 268 str. 24.
- Twarowski T., 2007. Opinia publiczna a GMO. *Biotechnologia* 3(78), 45–46.
- Ustawa z dnia 22 lipca 2006 r. o paszach. Dz. U. nr 144 z 11 sierpnia 2006 r. poz. 1045.
- Wal J.-M., Hepburn P.A., Lea L.J., Crevel R.W.R., 2003. Post-market surveillance of GM foods: Applicability and limitations of schemes used with pharmaceuticals and some non GM Novel Foods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38, 98–104.

IMPORTANCE OF LEGAL MEASURES IN SAFETY ASSURANCE OF GMO FOR FEED USE

Abstract. The paper describe selected legal measures of European and Polish law system which provide safety of GMO for feed use. Safety provision of consumers of animal origin food is accomplish by two legal systems which use different legislative measures. Some of established legal measures create inconsistency between Polish and European legal system. Legislative measures of Polish legal system formally straighten the safety of consumers. The authors concludes that Polish legislative measures are needed to be changed and unified with European legal system.

Key words: GMO for feed use, genetically modified feed, food safety, food security

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 25.09.2008

Do cytowania – For citation: Jackowska-Tracz A., Tracz M., 2008. Znaczenie regulacji prawnych w zapewnieniu bezpieczeństwa genetycznie zmodyfikowanych organizmów do użytku paszowego. *Acta Sci. Pol. Med. Vet.* 7(3), 25–33.

REGULACJE PRAWNE W ZAKRESIE BEZPIECZEŃSTWA ŻYWNOSCI DLA MAŁYCH ZAKŁADÓW UBOJOWYCH I PRZETWÓRCZYCH

Lech Rak

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego 178/2002 oraz następne, tj. 852/2004, 853/2004, i 854/2004 ustanowiły nowe standardy higieny produkcji i bezpieczeństwa żywności. Dla zapewnienia bezpieczeństwa i jakości żywności zastosowano system HACCP oraz normy serii ISO 9000. Wymagania zawarte w rozporządzeniach zostały szybko wdrożone w dużych i średnich zakładach spożywczych. Dla małych zakładów system HACCP stał się wyzwaniem ze względu na konieczność poniesienia znacznych nakładów na modernizację infrastruktury i wdrożenie. Analiza treści dokumentów prawa żywnościowego Unii Europejskiej wskazuje na możliwość przygotowania krajowych regulacji prawnych zawierających odstępstwa od wymagań sanitarnych. Sprzyjać to może rozwojowi produkcji żywności tradycyjnej i regionalnej chronionej w Unii Europejskiej na mocy rozporządzeń 509/2006 i 510/2006. Krajowe przepisy, pomimo możliwości zastosowania ułatwień w produkcji żywności pochodzenia zwierzęcego, nie zezwalają na rozwój zakładów nie zatwierdzonych do handlu. Brak perspektywicznych rozwiązań hamuje także rozwój produkcji lokalnej mogącej stać się żywnością tradycyjną lub regionalną. Analiza krajowego rozporządzenia w sprawie wymagań weterynaryjnych przy produkcji mięsa przeznaczonego na użytek własny nie wspiera rozwoju higieny i nie w pełni reguluje nadzór nad materiałem szczególnego ryzyka powstałym w czasie domowego uboju cieląt, kóz i owiec. Omawiana sfera produkcji żywności zwierzęcego pochodzenia wymaga opracowania nowych regulacji prawnych.

Słowa kluczowe: prawo żywnościowe, produkty tradycyjne, higiena żywności pochodzenia zwierzęcego

WSTĘP

Wdrożenie regulacji prawnych dotyczących bezpieczeństwa żywności, zapoczątkowane rozporządzeniem 178/2002 oraz uszczegółowionych kolejnymi z tzw. „pakietu sanitarnego”, tj. 852/2004, 853/2004, i 854/2004, wpisuje się w strategię funkcjonowania jednolitego rynku europejskiego, zwanego też wielkim rynkiem wewnętrznym powołanym do życia na mocy Jednolitego Aktu Europejskiego. Wymienione rozporządzenia nie tylko unifikują wymagania sanitarne w zakładach przemysłu spożywczego, lecz także umożliwiają lepszą ochronę konsumentów przed zagrożeniami oraz upraszczają procedury handlu środkami żywienia zwierząt i produktami żywnościowymi na rynku europejskim.

Opracowanie nowego podejścia do higieny produkcji i bezpieczeństwa żywności było podyktowane koniecznością zwiększenia konkurencyjności rynków krajów Wspólnoty Europejskiej oraz likwidowaniem utrudnień w wymianie towarowej między nimi. Zastosowanie jednolitych wymagań sanitarnych na mocy wymienionych rozporządzeń wiązało się z nowymi formami nadzoru na produkowaną żywnością oraz wdrożeniem nowoczesnych narzędzi chroniących zdrowotne interesy konsumentów. Podstawowym narzędziem zapewnienia bezpieczeństwa żywności stały się systemy zarządzania jakością, a w szczególności HACCP. Konieczność zapewnienia wysokiej jakości produkowanej żywności przyczyniła się do wdrażania także innych systemów, jak np. norm ISO serii 9000. Potrzeba równoległego utrzymywania systemu HACCP oraz modernizowanych norm ISO stała się podstawą opracowania normy ISO 25000 łączącej wymagania obu systemów.

Wdrażanie nowoczesnych wymagań sanitarnych w zakładach spożywczych

Podmioty sektora spożywczego, a w szczególności branży żywności pochodzenia zwierzęcego wdrożyły z powodzeniem systemy zapewnienia jakości i bezpieczeństwa żywności: powołano zespoły do spraw jakości, opracowano niezbędną dokumentację, przeszkolono pracowników w kwestiach nowych zasad i wymagań sanitarnych produkcji. Adaptacja tych systemów realizowana była najpierw w dużych i średnich zakładach produkujących żywność pochodzenia zwierzęcego. Producenci musieli sprostać wymaganiom sanitarnym warunkującym sprzedaż wyrobów na rynki krajów Unii Europejskiej. W małych zakładach wdrożenia przebiegały znacznie wolniej. Jedną z przyczyn tego spowolnienia była konieczność dokonania niezbędnych adaptacji w infrastrukturze działów produkcyjnych, poniesienia nakładów finansowych na szkolenia specjalistów oraz opracowania i wdrożenia systemów zapewnienia bezpieczeństwa. Dla małych zakładów relatywne obciążenia finansowe były większe niż dla dużych firm.

Istniejące regulacje w zakresie wymagań sanitarnych spowodowały podział zakładów spożywczych na dwie zasadnicze grupy: dostosowane do współczesnych rozwiązań i zatwierdzone do handlu oraz te, które nie wdrożyły niezbędnych rozwiązań i w związku z tym produkują tylko na rynek krajowy. Zakłady pierwszej grupy z powodzeniem wykorzystują wdrożone systemy zarządzania bezpieczeństwem i jakością żywności do promocji żywności i zwiększania swej konkurencyjności na rynkach. Dla małych i średnich zakładów realizacja wymagań sanitarnych zawartych we wspólnotowych rozporządzeniach jest wciąż barierą trudną do pokonania.

Celem artykułu jest analiza przepisów prawa żywnościowego z zakresu wymagań sanitarnych regulujących funkcjonowanie małych i średnich firm działających w zakre-

sie produkcji i przetwórstwa żywności pochodzenia zwierzęcego. Praktyka gospodarcza krajów rozwiniętych ujawnia bowiem, że obok wielkich i dużych firm dobrze funkcjonują małe zakłady dostarczające żywność dla lokalnych konsumentów.

Wymagania sanitarne dla małych zakładów spożywczych

Funkcjonowanie małych zakładów wytwarzających żywność pochodzenia zwierzęcego regulowane jest przez różnorodne akty prawne. Rozporządzenia 852/2004 i 853/2004 zawierają wytyczne do opracowania krajowych przepisów regulujących funkcjonowanie zakładów spożywczych, które działają na innych zasadach niż duże – zatwierdzone do handlu. Elastyczność konstruowania wymagań sanitarnych jest zalecana dla umożliwienia np. funkcjonowania zakładów korzystających z tradycyjnych technologii, na każdym etapie produkcji, przetwarzania i dystrybucji żywności lub przedsiębiorstw zlokalizowanych w regionach o szczególnych ograniczeniach geograficznych.

Wymagania sanitarne dla zakładów produkujących żywność tradycyjną

Zezwolenie na opracowanie krajowych regulacji w zakresie wymagań sanitarnych umożliwia zastosowanie ułatwień w organizacji produkcji żywności małym podmiotom gospodarczym. Jest to wyraz respektowania lokalnych uwarunkowań kulturowych i daje możliwość funkcjonowania podmiotom gospodarczym, które nie są w stanie zapewnić standardów sanitarnych produkcji. Podstawowym warunkiem zgody na odstępstwa od wymagań zawartych w rozporządzeniach pakietu sanitarnego jest zapewnienie odpowiednio wysokiego poziomu bezpieczeństwa zdrowotnego wytwarzanej żywności.

Celem tego rozwiązania jest umożliwienie kontynuowania i rozwoju produkcji żywności o tradycyjnym charakterze stanowiącej dorobek kulturowy lokalnych społeczności. Obecnie prawo europejskie definiuje i chroni tradycyjne oraz regionalne produkty żywnościowe według następującego schematu:

- produkty regionalne – wyroby wytwarzane na określonym obszarze Unii Europejskiej, których technologia produkcji oraz nazwa wskazująca geograficzne ich pochodzenie są chronione prawem wspólnotowym i obejmują „chronione oznaczenie geograficzne” oraz „chronioną nazwę pochodzenia”;
- produkty tradycyjne – wyroby, których cechy wynikające z tradycji regionu odróżniają je od innych wyrobów określane są „gwarantowaną tradycyjną specjalnością”. Produktom tym wydawane są świadectwa szczególnego charakteru, które potwierdzają ich unikatowy i wyjątkowy charakter.

Szczegółowa klasyfikacja wyrobów, ich charakter, surowce użyte do produkcji, zasady wydawania świadectw, wzory znaków graficznych oraz inne regulacje zawierają akty wykonawcze, tj. Rozporządzenia Komisji nr 1898/2006 i 1216/2007. Rozporządzenia te zawierają także zalecenia do opracowania krajowych przepisów dla produktów regionalnych w państwach członkowskich.

Na podstawie wspomnianego wyżej rozporządzenia unijnego 853/2004 wydane zostało krajowe – w sprawie ogólnych odstępstw od wymagań higienicznych w zakładach produkujących żywność tradycyjną pochodzenia zwierzęcego, które w zamierzeniu ma określać uproszczone standardy higieniczne produkcji wyrobów tradycyjnych i regionalnych.

Omawiany dokument zawiera dwa istotne ograniczenia dla rozwoju produkcji żywności tradycyjnej i regionalnej pochodzenia zwierzęcego, a dotyczące:

- Zdefiniowania sanitarnych warunków produkcji. Omawiane rozporządzenie zezwala na ogólne odstępstwa od wymagań sanitarnych określonych w rozdziale II pkt. 1. i w rozdziale V pkt. 1. załącznika II do Rozporządzenia Rady nr 852/2004, a dotyczących pomieszczeń produkcyjnych oraz sprzętów i urządzeń w nich wykorzystywanych. Również rozporządzenie 882/2004, ze względu na szczególny charakter rozporządzeń nr 2092/91, 2081/1992 i 2082/1992, zezwala na ogólne odstępstwa od przyjętych procedur kontroli sanitarnej producentów żywności tradycyjnej i regionalnej. Także w art. 7. rozporządzenia 2074/2005 stwierdza się, że zakres odstępstw od warunków sanitarnych winien być sprecyzowany przez regulacje krajowe i zaakceptowany przez Komisję Europejską. Niestety, krajowa regulacja prawna poza wskazaniem obszaru odstępstw nie precyzuje ani ich rodzaju, ani zakresu. Brak szczegółowych sanitarnych warunków produkcji i zasad ich kontroli przyczynia się do odmowy wydawania małym podmiotom gospodarczym zezwoleń na podejmowanie produkcji przetworów mięsnych.
- Obszaru sprzedaży produkowanej żywności. Odstępstwa od wymagań sanitarnych, zgodnie z przepisami rozporządzenia, dotyczyć mogą tylko tych zakładów, w których prowadzona jest produkcja żywności pochodzenia zwierzęcego spełniająca warunki wpisu na listę produktów tradycyjnych prowadzoną przez ministra właściwego do spraw rynków rolnych lub wniosku rejestracji produktu wysłanego do Komisji Europejskiej. Tak więc, produkty te muszą spełniać warunki zawarte w Ustawie z dnia 17 grudnia 2004 r. o rejestracji i ochronie nazw i oznaczeń produktów rolnych i środków spożywczych oraz o produktach tradycyjnych lub w rozporządzeniach 509/2006 i 510/2006. Dotyczą one tylko produktów, które zgodnie z powyższymi regulacjami można uznać za tradycyjne i regionalne.

Pozytywnym przykładem opracowania krajowych przepisów precyzujących warunki sanitarne produkcji w małych zakładach spożywczych jest rozporządzenie ustanawiające minimalne warunki sanitarne produkcji 5 wyrobów mleczarskich, tj. redykołki, bryndzy, oscypka, buncu i żentycy. Niestety, przepisy zawarte w rozporządzeniu zawiązują swój zasięg do wybranych produktów, a w ten sposób także do określonego terenu, jakim jest Podhale. Na mocy tego rozporządzenia nie można podjąć produkcji innych produktów tradycyjnych lub regionalnych według uproszczonych wymagań sanitarnych.

Wymagania sanitarne dla zakładów produkujących żywność lokalną

W literaturze przedmiotu pojawia się pojęcie produktu lokalnego, które jest postrzegane jako synonim produktu regionalnego. Zgodnie z regulacjami rozporządzeń 509/2006 i 510/2006 produkty tradycyjne to takie, które są wytwarzane przez długość życia przynajmniej jednego pokolenia, czyli nie krócej niż 25 lat. Produkty te, po zarejestrowaniu, mogą być objęte ochroną prawną. Natomiast produkty lokalne to wyroby, które pomimo swych indywidualnych i niepowtarzalnych cech są wytwarzane na danym terenie krócej niż 25 lat i dlatego nie mogą być objęte ochroną prawną. Jednak kontynuowanie ich produkowania przez odpowiednio długi czas umożliwia zmianę tej kwalifikacji, a w konsekwencji ich rejestrację i objęcie ochroną prawną. Sytuacja ta powinna stanowić przesłankę opracowania przepisów stymulujących opracowywanie

technologii lokalnych produktów spożywczych, które w przyszłości mogą być zakwalifikowane jako produkty tradycyjne i objęte ochroną prawną.

Brak jednolitych krajowych regulacji definiujących warunki produkcji lokalnej nie sprzyja rozwojowi małych zakładów zajmujących się wytwarzaniem przetworów spożywczych pochodzenia zwierzęcego.

Problem likwidowania barier dla lokalnej produkcji żywności mają rozwiązywać dwa krajowe rozporządzenia wydane w 2006 r. Analiza treści tych rozporządzeń wskazuje, że zasięgiem regulacji objęta jest żywność pochodzenia zwierzęcego i roślinnego. Obie grupy żywności traktowane są jednorodnie, co powoduje, że przepisy mają zastosowanie tylko do nie przetworzonych produktów pochodzenia zwierzęcego, tj. mleka, śmietany, tuszek drobiowych i zajęczych, ślimaków, dziczyzny, ryb, jaj oraz produktów pszczelich. Takie rozwiązanie uniemożliwia rozwój produkcji lokalnej żywności przetworzonej. Także zasięg sprzedaży żywności został ograniczony do powierzchni województwa, na którym funkcjonuje producent. Przyjęcie takich rozwiązań wskazuje na wypełnienie zapisów rozporządzenia 853/2004, które nie obejmuje swym zasięgiem:

- bezpośrednich dostaw, dokonywanych przez producenta, małych ilości surowców do konsumenta końcowego lub lokalnego zakładu detalicznego bezpośrednio zaopatrującego konsumenta końcowego;
- bezpośrednich dostaw, dokonywanych przez producenta, małych ilości mięsa z drobiu lub zajęczaków poddanych ubojowi w gospodarstwie rolnym, do konsumenta końcowego lub lokalnego zakładu detalicznego, bezpośrednio dostarczającego przedmiotowe mięso w formie mięsa świeżego konsumentowi końcowemu.

Przedstawione krajowe regulacje nie stymulują rozwoju lokalnego przetwórstwa żywności pochodzenia zwierzęcego. Jednak zapisy unijnego rozporządzenia 853/2004 pozwalają na opracowanie krajowych przepisów zawierających odstępstwa od standardowych wymagań, które mogą mieć zastosowanie dla małych podmiotów gospodarczych podejmujących lokalną produkcję przetworzonej żywności pochodzenia zwierzęcego bez uszczerbku dla jej bezpieczeństwa. Odstępstwa te mogą mieć zastosowanie tylko do konstrukcji, organizacji i wyposażenia zakładów. Założyć można, że opracowanie i zastosowanie odstępstw od wymagań w tym zakresie umożliwi wielu małym zakładom prowadzenie produkcji lokalnej.

Wymagania sanitarne produkcji mięsa przeznaczonego na użytek własny

Rozporządzenia pakietu sanitarnego wyłączają spod regulacji warunki uboju na potrzeby własne, tj. takiego, z którego pozyskane mięso będzie spożyte wyłącznie w gospodarstwie właściciela zwierzęcia. Zapisy tych dokumentów zabraniają wprowadzanie do obrotu mięsa pozyskanego w tym trybie. Liczba ubijanych zwierząt na potrzeby własne oraz zagrożenia, jakie niosą uboczne produkty uzyskane w ten sposób, stanowiły przesłankę opracowania krajowych regulacji prawnych, np. rozporządzenia w sprawie wymagań weterynaryjnych przy produkcji mięsa przeznaczonego na użytek własny.

Rozwiązania przyjęte w omawianym rozporządzeniu regulują problematykę m.in. identyfikacji i rejestracji ubijanych zwierząt, badania poubojowego mięsa oraz utylizacji materiałów szczególnego ryzyka powstających w wyniku uboju cieląt w wieku do 6 miesięcy życia oraz kóz i owiec. Rozporządzenie nakłada obowiązek badania mięsa świń i dzików w kierunku na włośnię, lecz zezwala na odstąpienie od kompleksowego

badania poubojowego mięsa. Rozporządzenie to nie wskazuje wymagań sanitarnych uboju zwierząt i przetwórstwa pozyskanego w tym trybie mięsa. Zastosowanie przepisów nie promuje zasad higieny postępowania z mięsem ani nie rozwiązuje problemów nadzoru nad znakowaniem, transportem i utylizacją materiałów szczególnego ryzyka wynikających z postanowień rozporządzenia 1774/2002. W świetle regulacji zawartych w rozporządzeniach pakietu sanitarnego oraz wysokich wymagań stawianych w zakresie bezpieczeństwa żywności zasadnym jest opracowanie przepisów rozwiązujących takie problemy jak:

- promocja higieny uboju zwierząt na użytek własny,
- edukacja hodowców w zakresie zagrożeń mających swe źródło w żywności i konieczności badania mięsa po uboju,
- kreowanie rozwiązań strukturalnych zapewniających ubój zwierząt i przetwórstwo pozyskanego mięsa w higienicznych warunkach.

Przepisy powinny stymulować hodowców do prowadzenia ubojów zwierząt w celu pozyskania mięsa na użytek własny oraz produkcji przetworów mięsnych w niewielkich lokalnych rzeźniach – masarniach. Podniesienie higieny uboju i produkcji przetworów mięsnych powinno pozwolić na ich wprowadzanie do obrotu. Rozwiązanie to umożliwi rozwój prywatnych zajazdów oferujących przetwory mięsne własnej produkcji.

Organizacją małych rzeźni prowadzących lokalny ubój usługowy zainteresowani są także lekarze weterynarii odpowiedzialni za badanie mięsa. Taka organizacja uboju pozwoli bowiem poddawać badaniu poubojowemu mięsa wszystkich ubijanych zwierząt rzeźnych oraz nadzór nad postępowaniem z odpadami i mięsem niezdatnym do spożycia.

WNIOSKI

Regulacje prawne zawarte w unijnych dokumentach prawa żywnościowego umożliwiają opracowanie krajowych minimalnych wymagań sanitarnych sprzyjających rozwojowi małych podmiotów gospodarczych produkujących przetworzoną żywność pochodzenia zwierzęcego.

Wymagania sanitarne produkcji mięsa przeznaczonego na użytek własny powinny promować wzrost higieny poprzez opracowanie rozwiązań umożliwiających ubój zwierząt w specjalnie do tego celu przygotowanych rzeźniach usługowych.

PIŚMIENNICTWO

- Jednolity Akt Europejski. Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich, 29/06/1987, L 169.
- Rozporządzenie Rady (EWG) 2092/91 z dnia 24 czerwca 1991 r. w sprawie produkcji ekologicznej produktów rolnych oraz znakowania produktów rolnych i środków spożywczych Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich L 22.7.1991 198/1.
- Rozporządzenie Rady (EWG) nr 2081/92 z dnia 14 lipca 1992 r. w sprawie ochrony oznaczeń geograficznych i oznaczeń pochodzenia produktów rolnych i artykułów żywnościowych. Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich 24.7.1992, L 208.
- Rozporządzenie Rady (EWG) nr 2082/92 z dnia 14 lipca 1992 r. w sprawie świadectw o szczególnym charakterze dla produktów rolnych i środków spożywczych. Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich 24.7.1992, L 208.

- Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności. Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich 1.2.2002, L 31.
- Rozporządzenie (WE) nr 1774/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 3 października 2002 r. ustanawiające przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi. Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich 10.10.2002, L 273.
- Rozporządzenie (WE) nr 852/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie higieny środków spożywczych. Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich Unii Europejskiej 30.4.2004, L 139.
- Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego. Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich Unii Europejskiej 30.4.2004 L 139,
- Rozporządzenie (WE) nr 854/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące organizacji urzędowych kontroli w odniesieniu do produktów pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do spożycia przez ludzi. Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich Unii Europejskiej 30.4.2004, L 155.
- Rozporządzenie (WE) nr 882/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie kontroli urzędowych przeprowadzanych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regułami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt. Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich 30/04/2004, L 165.
- Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 12 października 2004 r. w sprawie wymagań weterynaryjnych przy produkcji i dla produktów mlecznych o tradycyjnym charakterze. Dz. U. 2004 nr 236, poz. 2368.
- Ustawa z dnia 17 grudnia 2004 r. o rejestracji i ochronie nazw i oznaczeń produktów rolnych i środków spożywczych oraz o produktach tradycyjnych. Dz. U. 2005, nr 10, poz. 68.
- Rozporządzenie Komisji WE nr 2074/2005 z dnia 5 grudnia 2005 r. ustanawiające środki wykonawcze w odniesieniu do niektórych produktów objętych rozporządzeniem (WE) nr 853/2004 i do organizacji urzędowych kontroli na mocy rozporządzeń (WE) nr 854/2004 oraz (WE) nr 882/2004, ustanawiające odstępstwa od rozporządzenia (WE) nr 852/2004 i zmieniające rozporządzenia (WE) nr 853/2004 oraz (WE) nr 854/2004. Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich 22.12.2005 L 338.
- Rozporządzenie Rady (WE) nr 509/2006 z dnia 20 marca 2006 r. w sprawie produktów rolnych i środków spożywczych będących gwarantowanymi tradycyjnymi specjalnościami. Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich 31.3.2006, L 93.
- Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1898/2006 z dnia 14 grudnia 2006 r. określające szczegółowe zasady stosowania rozporządzenia Rady (WE) nr 510/2006 w sprawie ochrony oznaczeń geograficznych i nazw pochodzenia produktów rolnych i środków spożywczych Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich 23.12.2006, L 369.
- Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 15 grudnia 2006 r. w sprawie szczególnych warunków uznania działalności marginalnej, lokalnej i ograniczonej Dz. U. 2007, nr 5, poz. 36, Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 grudnia 2006 r. w sprawie wymagań weterynaryjnych przy produkcji produktów pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do sprzedaży bezpośredniej. Dz. U. 2007, nr 5 poz. 38.
- Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 9 lipca 2007 r. w sprawie wymagań weterynaryjnych przy produkcji mięsa przeznaczonego na użytek własny Dz. U. z 2007 r. nr 132 poz. 919.

Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 27 lipca 2007 r. w sprawie ogólnych odstępstw od wymagań higienicznych w zakładach produkujących żywność tradycyjną pochodzenia zwierzęcego. Dz. U. 2007 poz. 146 nr 1024.

Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1216/2007 z dnia 18 października 2007 r. ustanawiające szczegółowe zasady wykonania rozporządzenia Rady (WE) nr 509/2006 w sprawie produktów rolnych i środków spożywczych będących gwarantowanymi tradycyjnymi specjalnościami Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich 19.10. 2007, L 275.

LAW REGULATION OF FOOD SAFETY FOR SMALL ABATTOIRS AND MEAT PROCESSORS

Abstract. European Parliament Regulation No 178/2002 and subsequent i.e. 852/2004, 853/2004, and 854/2004 have established new standards for food hygiene and safety. The HACCP system and norms series 9000 were adopted to ensure food safety and quality. Requirements covered by regulations were at first implemented in big and medium food plants. The HACCP become challenge for small businesses because of high costs should spend on infrastructure modernization, staff training and system implementation.

Content analysis of food law documents indicates possibilities of establishing national regulations with restrained hygiene requirements. It could promote development of traditional and regional food production based on regulations No. 509/2006 i 510/2006. National law regulations, despite possibilities of adoption facilitation in production food of animal origin, do not allow developing plants not approved for trade. Lack of perspective solutions also delimits development of local food production which could in the future become traditional or regional. Analysis of national regulation on veterinary requirement for meat production for own needs also reveals that it does not promote hygiene development and only in part establishes control on special risk material gained during local slaughter of calves, goats and sheep. Presented area of food production of animal origin requires elaboration of a new law regulation.

Key words: food law, traditional products, food hygiene of animal origin

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 25.09.2008

Do cytowania – For citation: Rak L., 2008. Regulacje prawne w zakresie bezpieczeństwa żywności dla małych zakładów ubojowych i przetwórczych. *Acta Sci. Pol. Med. Vet.* 7(3), 35–42.

TYPING OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* FROM READY-TO-EAT FOODS AND HUMANS*

Renata Karpíšková^{1,2}, T Gelbíčová,¹ Zora Štástková¹

¹ University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno

² Centre of Hygiene of Food Chains, National Institute of Public Health, Prague

Abstract. The aim of this study was to characterise the *L. monocytogenes* isolates originating from humans and foodstuffs using selected typing methods (serotyping and macrorestriction analysis). In total 267 *L. monocytogenes* strains, 75 of human and 192 strains of RTE food origin were analysed. Serotype 1/2a was the predominant one in both groups of strains, it was confirmed in 67 human isolates (89.3%), followed by serotype 1/2b and group 4 serotypes (3 and 5 cases respectively). Also in food isolates, the serotype 1/2a was the most detected one (64.1%), followed by serotype 1/2b (17.2%), group 4 serotypes (14.1%) and serotype 1/2c (4.7%). Some serotypes have always been foodstuff specific, e.g. serotype 1/2c was detected only in meat products, while group 4 serotypes were not found in any isolate coming from a dairy product. Using macrorestriction analysis, the tested strains in this study displayed a high heterogeneity, especially in the dominant 1/2a serotype. Studying genetic characteristics of strains analysed in our study made it possible to discover or hint at the pathways of listeria spread.

Key words: serotyping, PFGE, bacteria tracing, foodstuff

INTRODUCTION

Listeria monocytogenes is a ubiquitously appearing pathogenic bacterium capable of inducing diseases in humans and animals alike (Farber and Peterkin 1991, Vázquez-Boland et al. 2001). *Listeria* prevalence in humans is relatively low but the severity of the disease is high, with mortality ranging from 20 to 30%. This disease affects especially risk groups of the population: seniors or persons with decreased immunity,

* Project received financial support from the Research Plan entitled as Veterinary Aspects of Food Safety and Quality ref. No. MSM6215712402, from the project ref. No. MŠMT NPV 2B08050 and the BIOTRACER project No. 36272 within the EU 6th Framework Programme.

pregnant women and newborns [Vázquez-Boland et al. 2001]. Listerioses usually appear as sporadic cases, more rarely as cases with epidemic impact. Within the outbreaks, it is usually possible to track down the common source of infection, while it is not the case in sporadic cases and their source remains usually undetected. Investigation of listeriosis is difficult compared to other diseases of the GIT, namely due to long incubation period (starting with a few days to several months), low incidence of the disease (in EU, there were 0.3 cases per 100,000 inhabitants in 2006) [EFSA Zoonosis Report 2007] and low incidence of geographically separate cases.

Up to 1980's, listeriosis had been considered to be a disease spread by contact with infected animals or contaminated raw foodstuffs of animal origin. Only after the outbreaks in the USA and Canada, *L. monocytogenes* was recognized also as a significant GIT pathogen [Farber and Peterkin 1991]. The disease incidence is thought to be related to the consumption of a wide spectrum of foodstuffs including meat, dairy, fish, deli and pastry products, sea food and raw vegetables [Farber and Peterkin 1991, Karpíšková and Koláčková 2004]. Potentially hazardous foodstuffs include those ready made for consumption, which are stored at cooling temperatures.

L. monocytogenes can be isolated both from farm environment and food processing plants and outlets. The question remains whether listeria contaminates foodstuffs in the primary production, in food processing plants or as late as the retail market segment. *L. monocytogenes* is also marked with a capability of creating biofilms, which enables it to persist in the environment and resist drying out and sanitizing treatment. Thus, they represent a potential source of repeated food stuff contamination [Borucki et al. 2003].

When performing epidemiological investigations, various molecular methods have been employed lately. They make it possible to detect clonal relatedness of the individual isolates. This has impact not only on the follow up of epidemiological links in the human population but also the monitoring of sources and pathways of listeria spread in the farm environment, food processing businesses and the marketplace.

First step in classifying *L. monocytogenes* is usually serotyping [Thévenot et al. 2006, López et al. 2008]. At present, there are thirteen serotypes of *L. monocytogenes* defined. However, serotypes 1/2a, 1/2b and 4b above all take part in human listeriosis [Farber and Peterkin 1991]. With respect to the dominant incidence of these three serotypes, the practical use of this method is limited [Thévenot et al. 2006]. Of the molecular methods, the typing is done using the macrorestriction analysis by PFGE (pulsed-field gel electrophoresis), based on the use of rarely cleaving endonuclease to analyse restrictively the bacterial genome and following separation of fragments in the pulse field [Thévenot et al. 2006, López et al. 2008].

The objective of this project was to compare the characteristics of isolates of *L. monocytogenes* originating from humans and foodstuffs using selected typing methods (serotyping and macrorestriction analysis).

MATERIAL AND METHODS

Analysed isolates

L. monocytogenes isolates came from the NRL collection for listeriae (SZÚ – CHPŘ), they were stored in the glycerine medium at -80 °C. In total 267 strains of *L. monocytogenes* were analysed, 75 of human and 192 strains of food origin isolated

in the period of years 2006 and 2008. Foodstuff isolates were acquired by testing samples collected directly from the producer or on the market. Before performing typing, the strains were livened up by inoculation on top of the ALOA agar and blood agar (Bio-Rad, USA) and incubated at 37°C over a period of 24 hours under aerobic conditions.

Serotyping

In all isolates, serotypes were determined by slide agglutination test using the listeria antisera set (DENKA SEIKEN, Japan) and subsequently confirmed using multiplex PCR [Doumith et al. 2004] with the use of PPP polymerase (Top-Bio, Czech Republic) and primers synthesized by the GENERI BIOTECH Company (Czech Republic).

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Macrorestriction analysis using *AscI* endonuclease (BioLabs, UK) was carried out and assessed based on the PulseNet Europe protocol [2002] and Swaminathan and Gerner-Smidt [2007].

RESULTS AND DISCUSSION

Serotyping results are presented in Table No. 1. Human strains came from patients considered as sporadic cases of listeriosis (22 cases) as well as cases of epidemiologic impact (53 cases, one outbreak). Serotype 1/2a was confirmed in 67 cases (89.3%). If epidemic cases are taken out of the statistics, it would be 14 cases (63.6%). This serotype was thus dominant in human strains acquired in the given period in the Czech Republic. Serotype 1/2b and group 4 serotypes were detected only rarely (3 and 5 cases respectively).

Table 1. Origin, number and serotype of tested isolates used in present study
Tabela 1. Źródło, liczba, serotypy testowanych izolatów użytych w badaniach

Origin	Number of strains	Serotype 1/2a	Serotype 1/2b	Serotype 1/2c	Serotypes gr. 4
Human	75	67	3	0	5
Food	192	123	33	9	27
Meat products	91	50	14	9	18
Deli products	39	14	16	0	9
Dairy products	62	59	3	0	0

Also in food isolates, the serotype 1/2a was detected in most cases (64.1%), followed by serotype 1/2b (17.2%), group 4 serotypes (14.1%) and serotype 1/2c (4.7%). The dominance of the 1/2a serotype in isolates of *L. monocytogenes* originating from food stuffs was reported in a series of other studies [Pak et al. 2002, Thévenot et al. 2006, López et al. 2008]. The interesting finding is that some serotypes have always been foodstuff specific, e.g. serotype 1/2c was detected only in meat products, while group 4 serotypes were not found in any isolate coming from a dairy product.

Using macrorestriction analysis, the tested strains in this study displayed a high heterogeneity, especially in the dominant 1/2a serotype. The detailed results of the macrorestriction analysis of the *L. monocytogenes* isolates are presented in Table No. 2.

Studying genetic characteristics of strains analysed in our study made it possible to discover or hint at the pathways of listeria spread. At the turn of the years of 2006 and 2007, an outbreak caused by *L. monocytogenes* serotype 1/2a, pulsotype L700 took place in the Czech Republic. Identical clone was detected also in smeared ripening cheese of the producer A. The link between consumption of these cheese brands and the incidence of the disease was confirmed epidemiologically, too.

Table 2. Origin, number and spectrum of detected pulsotypes within the strains of 1/2a serotype
Tabela 2. Źródło, liczba i spectrum wykrytych pulsotypów wśród szczepów 1/2a

Origin							
Meat products		Deli products		Dairy products		Human	
Pulsotype	Number of strains	Pulsotype	Number of strains	Pulsotype	Number of strains	Pulsotype	Number of strains
L701	3	L704	1	L700	8	L700	53
L703	1	L708	2	L713	13	L702	1
L 706	1	L716	3	L717	2	L711	1
L 708	1	L717	3	L719	31	L712	1
L 709	4	L719	2	L722	1	L713	1
L 710	1	L725	1	L723	3	L716	1
L713	3	L729	1	L724	1	L717	5
L715	10	L730	1			L719	1
L716	3					L721	1
L717	4					L731	2
L718	5						
L720	10						
L722	1						
L726	1						
L728	1						
L731	1						

With the producer B, the monitored period displayed repeatedly *L. monocytogenes* of the identical L713 clone, both in the production space and in the ripening cheese samples collected from the outlet segment. It is then a persistent strain which is adapted for the given environment and it is capable of surviving in it for a long period of time. This clone was identified also in one separate listeriosis case and also in sliced meat products from the market. Each of these meat products came from a different producer, contamination thus had to take place in the market outlet part, most probably while slicing the salami on a meat slicer.

L. monocytogenes pulsotype L719 clone is typical for the mould cheese brand from the producer C (a persistent strain). This clone was isolated repeatedly both in cheese from the production space and from the market outlets and also in deli products (spreads made from this cheese by various producers). An identical clone induced the development of this listeriosis in one patient during the monitored period.

In the years 2007 to 2008, 5 sporadic cases of listeriosis in humans induced by *L. monocytogenes* of the 1/2a serotype with the identical pulsotype L717. While investigating the common source of infection, no clear evidence was achieved. An identical clone was isolated from various product types – red meat (3), fish (1), dairy (2), deli salads (3) and frozen vegetables (1). It is apparently a clone which has been on the spread in the Czech Republic recently. In this case, it is not possible to pinpoint the infection source, not even when using the above mentioned typing methods.

CONCLUSIONS

Typing methods contribute to the discovery of *L. monocytogenes* sources and pathways of their spread in the primary production, the food processing environment and the market segment. The study discovers the incidence of specific clones adapted for the conditions of the individual production spaces, being present in the given space repeatedly over a period of several years. Continuous analysis of foodstuff and human isolates of *L. monocytogenes* makes it possible to monitor the recent situation in the given location and discover possible epidemiologic links.

REFERENCES

- Anonymus, 2007. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial resistance and Foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA Journal*, 130.
- Borucki M.K., Peppin J.D., White D., Loge F., Call D.R., 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 69, 7336–7342.
- Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P., 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 42, 3819–3822.
- Farber J.M., Peterkin P.I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Reviews*, 55, 476–511.
- Karpíšková R., Koláčková I., 2004. *Listeria monocytogenes* a nálezy tohoto patogena v potravinách v tržní síti. *Maso*, 6, 4–6.
- López V., Villatoro D., Ortiz S., López P., Navas J., Dávila J.C., Martín-Suárez J.V., 2008. Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. *Meat Sci*, 78, 130–134.
- Pak S.I., Spahr U., Jemmi T., Salman M.D., 2002. Risk factors for *Listeria monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland, 1990-1999. *Prev Vet Med*, 53, 55–65.
- PulseNet Europe, 2002. Standardized protocol for molecular subtyping of *Listeria monocytogenes* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). <http://www.pulsenet-europe.org/>
- Swaminathan B., Gerner-Smidt P., 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Mic Inf*, 9, 1236–1243.
- Thévenot D., Delignette-Muller M.L., Christieans S., Leroy S., Kodjo A., Vernozzy-Rozand C., 2006. Serological and molecular ecology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from 13 French pork meat salting-curing plants and their products. *Int J Food Microbiol*, 112, 153–161.
- Vázquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J., 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Reviews*, 14, 584–640.

WYKRYWANIE *LISTERIA MONOCYTOGENES* W PRODUKTACH RTE (REDY-TO-EAT) I U LUDZI

Streszczenie. Celem pracy była charakterystyka szczepów *L. monocytogenes* wyosobnionych od ludzi oraz z żywności przy użyciu wybranych metod diagnostycznych (serotypizacja, analiza fragmentów restrykcyjnych). Zbadano ogółem 267 szczepów, 75 wyosobnionych od ludzi oraz 192 z RTE. Serotyp 1/2a dominował w obu grupach szczepów. Stwierdzono go w 67 (89,3%) izolatach od ludzi, podczas gdy serotypy 1/2b i grupa 4 odnotowano u pozostałych odpowiednio 3 i 5 szczepów. Wśród izolatów z żywności również serotyp 1/2a był najliczniej reprezentowany (64.1%), a w dalszej kolejności 1/2b (17.2%), grupa 4 (14.1%) oraz serotyp 1/2c (4.7%). Pewne serotypy, np. 1/2c stwierdzono wyłącznie w produktach mięsnych, podczas gdy grupę 4 – tylko w produktach mlecznych. Analiza makrorestrykcyjna wykazała dużą heterogenność badanych szczepów, szczególnie dominującego serotypu 1/2a. Badania ich genetycznego zróżnicowania umożliwiły wykrycie albo domniemanie dróg ich dystrybucji.

Słowa kluczowe: PFGE, dystrybucja zarazka, produkty żywności

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 25.09.2008

For citation – Do cytowania: Karpíšková R., Gelbíčová T., Šťástková Z., 2008. Typing of *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat foods and humans. Acta Sci. Pol. Med. Vet. 7(3), 43–48.

ZARAZKI ZOONOTYCZNE – POTENCJALNE ZAGROŻENIE BEZPIECZEŃSTWA ŻYWNOŚCI

Jerzy Molenda, Jarosław Bystróż, Jacek Bania

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Czynniki etiologiczne zoonoz mogą wnikać do organizmu człowieka poprzez kontakt bezpośredni, za pośrednictwem żywności i wody, przenoszone przez owady lub gryzonie itp. Kryzysy wywołane przez BSE czy ptasią gripę zwróciły uwagę społeczeństw na sprawy bezpieczeństwa żywności zwierzęcego pochodzenia. Często zoonotyczne patogeny nie powodują zachorowań u zwierząt lub są to bezobjawowe infekcje (nosicielstwo), trudno wykrywane zarówno w stadach hodowlanych, jak i w badaniu poubojowym. Wiele z tych patogenów bytuje w przewodzie pokarmowym zdrowych zwierząt i przedostaje się za pośrednictwem kału do środowiska, może wówczas zanieczyszczać takie produkty, jak mięso, mleko czy jaja. Ich obecność w żywności stanowi potencjalne ryzyko infekcji pokarmowych. Ryzyko to może być minimalizowane, jeśli zasady higieny stosowane są w całym łańcuchu żywnościowym od produkcji żywności przez jej dystrybucję do konsumpcji.

Słowa kluczowe: zarazki zoonotyczne, zanieczyszczenie żywności, choroby przenoszone drogą pokarmową

WSTĘP

Wiedza o tym, że zachorowania wśród ludzi może powodować nie tylko żywność, do której świadomie dodano rozmaite trucizny, znana była ludzkości na długo, zanim wykryto i zdefiniowano rolę patogennych drobnoustrojów, określanych dzisiaj mianem patogenów pokarmowych. Od czasów Pasteura, który pierwszy zwrócił uwagę na związek między obecnością drobnoustrojów w żywności a różnymi jej właściwościami, stwierdzono, że liczne gatunki patogennych bakterii, wirusów i toksynotwórczych grzybów oraz pierwotniaków mogą być przyczyną infekcji pokarmowych (foodborne diseases). W ostatnim trzydziestoleciu zostały ujawnione nowe patogeny (emerging pathogens), których obecność w żywności stała się powodem zachorowań ludzi. Obserwacje historyczne sugerują jednak, że zarazki te prawdopodobnie były w niej obecne także

Adres do korespondencji – Corresponding author: Jerzy Molenda, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta, 50–375 Wrocław, ul. C.K. Norwida 31, e-mail: ford-hyg@up.wroc.pl

w przeszłości, natomiast rozwój metod badawczych umożliwił ich wykrycie i poznanie mechanizmów patogennego działania. Słuszność tej tezy znajduje potwierdzenie przy porównaniu gatunków bakterii i wirusów uważanych w przeszłości za patogeny pokarmowe z aktualną ich listą. Przed rokiem 1959 tylko pałeczki *Salmonella* łącznie z czynnikami gorączek rzekomodurowych, pałeczki *Shigella*, gronkowce enterotoksyczne oraz *Clostridium botulinum typ A i B* uważane były za sprawców pokarmowych infekcji. W latach sześćdziesiątych ub. wieku dołączono do tej listy *Vibrio cholerae*, *Cl. botulinum typ E*, *Bacillus cereus* oraz wirus *hepatitis typu A*. Jako kolejne patogeny zaklasyfikowano do tej grupy w dekadzie lat 1970–1980 następujących sprawców zachorowań, zarówno sporadycznych, jak i o charakterze epidemicznym: *Vibrio parahaemolyticus*, enteropatogenne szczepy *Escherichia coli* O124:B17, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae O1*, *Vibrio vulnificus* i *Campylobacter jejuni*. Po roku 1980 do patogenów jelitowych włączono następne drobnoustroje, a mianowicie enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* O157:H7, enteropatogenne *E. coli* O127:H20, *Listeria monocytogenes* i norowirusy (grupa Norwalk). Ponadto, patogenami wnikającymi do organizmu z żywnością, sporadycznie wywołującymi zachorowania są oportunistyczne drobnoustroje, takie jak *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides* czy psychrotroficzne gatunki *Bacillus*.

Z powyższego wykazu wynika że produkty żywności stają się przekaźnikiem patogennych drobnoustrojów. Rezultatem ich aktywności w organizmie mogą być infekcje jelitowe oraz systemowe. Rozwijają się wtedy, gdy zarazki zdołają przeżyć w środowisku żołądka, a następnie skolonizować błonę śluzową jelit i za pośrednictwem posiadanych czynników wirulencji wywołać miejscowy proces chorobowy albo po pokonaniu bariery jelitowej, przenikając do krwi, doprowadzić do jego uogólnienia.

Istotnym czynnikiem w rozwoju infekcji jest dawka drobnoustrojów wprowadzanych do organizmu. Teoretycznie jedna żywa komórka zarazka może być potencjalną przyczyną choroby. Eksperci oceniają, że dawkę infekcyjną może stanowić od około 10 komórek w przypadku bardzo zjadliwych gatunków lub szczepów, np. *Escherichia coli* O157:H7, do 10^5 lub więcej, gdy dotyczy to zarazków o mniejszej patogenności, np. *Yersinia enterocolitica*.

Objawy chorobowe pojawiają się zwykle po 24 godzinach od spożycia zanieczyszczonego patogenami pokarmu i mogą dotyczyć zarówno przewodu pokarmowego, jak i innych narządów wewnętrznych. Objawiają się bólem brzucha, nudnościami, wymiotami, biegunką (niekiedy z domieszką krwi) i gorączką. Obserwuje się je w przypadkach infekcji powodowanych przez *Salmonella*, *Shigella*, enteroinwazyjne szczepy *E. coli*, *Vibrio parahaemolyticus* czy *Campylobacter jejuni*. Zachorowania powodowane przez zarazki lub toksyny pokonujące barierę jelitową (*Listeria monocytogenes*, enterokrwotoczne *E. coli*, *Vibrio vulnificus*, wirusy *hepatitis*, toksyna botulinowa, enterotoksyny gronkowców) atakują inne organy wewnętrzne, wywołując symptomy charakterystyczne dla ich dysfunkcji.

Drobnoustrojami, których aktywność jako patogenów pokarmowych ujawniła się w ostatnim dwudziestolecu, są: *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, patogenne *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica* i różne typy wirusów zapalenia wątroby, norowirusy (Norwalk), priony BSE oraz *Giardia lamblia*. To one zwykle są wykrywane w pokarmach uznawanych za przyczyny zachorowań ludzi. Potwierdzają to wyniki badań epidemiologicznych, w których

wykazano tożsamość genotypową zarazków wyosobnionych od chorych i z podejrzanych produktów żywności.

KAMPYLOBAKTERIOZA

C. jejuni od wczesnych lat osiemdziesiątych ub. wieku uznawany jest za istotny patogen jelitowy człowieka [Altekruse i in. 1999]. Inne gatunki, np. *C. coli* czy *C. lari*, znacznie rzadziej są przyczynami zachorowań. Zarazek bytuje w przewodzie pokarmowym wielu gatunków stałocieplnych zwierząt, w tym bydła, owiec, a szczególnie drobiu, rzadko jednak powodując ich zachorowania. Zakażone stada zawierają jednak znaczny odsetek bezobjawowych nosicieli [Allos 2002, Bednarski i Wieliczko 2006].

Pierwszym etapem inwazji zarazka jest pokonanie warstwy śluzu wyścielającego nabłonek jelitowy i adhezycja do enterocytów. Zwykle w procesie tym pośredniczą takie organella komórkowe, jak fimbrie, białka *Omp* oraz różnego rodzaju receptory, np. dla fibronektyny [Allos 2002, Altekruse i in. 1999, WHO 2001]. W przypadku *C. jejuni* ruchliwość szczepów jest istotnym czynnikiem umożliwiającym kolonizację i internalizację zarazka. Nie wiadomo jednak, gdzie zlokalizowane są jego receptory adhezyjne. Niektórzy badacze sądzą, że rolę tę pełnią białka osłonowe włókna osiowego rzęsek [Bednarski i Wieliczko 2006]. Badania wykonane na małpach i prosiętach, uznanych za bardzo dobre modele biologiczne procesu chorobowego u człowieka, wykazały, że główne zmiany chorobowe rozwijają się w jelicie grubym, gdzie erozja nabłonka jelitowego dotyczy głównie krypt. Jej objawem jest zastępowanie nabłonka cylindrycznego przez płaski i utrata komórek kubkowych. Istnienie stanu zapalnego potwierdza infiltracja ściany jelita neutrofilami. Obecność bakterii stwierdzono zarówno w enterocytach, jak i w blaszce właściwej błony śluzowej. W miejscach inwazji zarazka w nabłonku zanikały kosmki jelitowe [Altekruse i in. 1999, Wssenar 1997]. W badaniach na królikach (pętla jelitowa) wykazano jego wybiórczą adhezję do komórek M (mikrofold – membranaceae) na kępkach Peyera, które pośredniczą w transmisji zarazków do głębszych warstw błony śluzowej. W następstwie endocytozy wnikają one do znajdujących się głębiej komórek dendrytycznych, makrofagów, a także do międzykomórkowych przestrzeni limfatycznych, skąd w sprzyjających warunkach przenikają do krwiobiegu. Kontakt z tymi komórkami inicjuje szereg reakcji immunologicznych (prezentacja antygeny, jego fragmentacja itp.) [van Vliet i Ketley 2001].

Istotną rolę w przebiegu infekcji u człowieka przypisuje się enterotoksynom i cytotoksynom produkowanym przez *C. jejuni* [Wassenar 1997]. Istnieją kontrowersje dotyczące mechanizmów wyzwalających główne objawy choroby, a mianowicie wodnistą (enterotoksyna) lub – rzadziej obserwowaną – krwawą biegunkę ze zmianami nekrotycznymi w jelitach, przypominającymi dezynterię (cytotoksyna), ponieważ w szeregu dobrze udokumentowanych prac (PCR) nie udało się wykazać zdolności wytwarzania takiej enterotoksyny przez liczne szczepy *C. jejuni* [Altekruse i in. 1999, Klipstein i in. 1986]. Zaproponowano więc inny mechanizm zwiększonej sekrecji elektrolitów do światła jelita. Jej przyczyną mają być mediatory stanu zapalnego leukotrien B₄ i prostaglandyna E₂ wydzielane przez aktywowane zarazkami leukocyty. Leukotrien oddziałuje chemotaktycznie na neutrofile, powodując ich gromadzenie się i infiltrację błony śluzowej jelit, natomiast prostaglandyna E₂ zwiększa wydzielanie płynów zarówno w jelicie cienkim, jak i w grubym. Badacze tego problemu [Figura i Guglielmetti 1998] uważają więc, że zwiększona zawartość cyklazy adenylowej w jelicie jest powodowana nie przez enterotoksynę, ale aktywną prostaglandynę E₂. Nie wiadomo jednak, w jaki

sposób w warunkach *in vivo* zarazek prowokuje te reakcje leukocytów obojętno-chłonnych.

Okres inkubacji choroby wynosi zwykle 3 – 6 dni, niekiedy wydłuża się do 10, a sama choroba trwa od dwu dni do dwóch tygodni. U większości pacjentów obserwuje się samoograniczający i kończący się samowyleczeniem proces infekcji. Cięższe zachorowania występują u dzieci i osób starszych, a w przypadku osób z niedoborami immunologicznymi mogą nawet prowadzić do śmierci [Wallis 1994, Blaser 1997]. Komplikacje dotyczą niewielkiej liczby przypadków (2–10%) i objawiają się zapaleniem stawów lub bardzo rzadko – formą paraliżu określanego jako syndrom Guillaina-Barra [McCarthy, Giesecke 2001].

Do zakażenia ludzi dochodzi zwykle za pośrednictwem zanieczyszczonego zarzaki mięsa drobiu, wieprzowiny, wody lub niepasteryzowanego mleka. Stosunkowo niewielka liczba komórek bakterii może spowodować zachorowanie [WHO 2001, EU Report 2006]. Drobnoustrój wymaga do wzrostu podwyższonej temperatury (40–42°C) i szybko ginie podczas ogrzewania posiłków.

LISTERIOZA

Listeria monocytogenes, czynnik etiologiczny listeriozy, należy do bakterii oportunistycznych, dysponujących szeregiem specyficznych właściwości, takich jak zdolność wzrostu w środowiskach o pH od 4,0 do 9,0 czy w przedziale temperatur od 0–42°C. Cechy te umożliwiają mu przeżywanie, a nawet rozwój w środowisku poza organizmem człowieka czy zwierząt. Listerioza jest zoonozą, którą coraz częściej stwierdza się w społeczeństwach industrialnych [Faber i Peterkin 1991, Rocout i in. 2000, EU Report 2006]. Wynika to nie tylko z postępu w metodach rozpoznawczych, ale także ze zmiany sposobu odżywiania się obywateli krajów uprzemysłowionych. Powodem tych zmian są m.in. nowe technologie wytwarzania żywności, takie jak gotowe posiłki, wymagające jedynie ogrzania bezpośrednio przed spożyciem. Produkty te, przechowywane w warunkach chłodniczych, są środowiskiem sprzyjającym dla rozwoju pałeczek *Listeria monocytogenes*. Źródłem zarazka mogą być także miękkie sery, sery pleśniowe, niepasteryzowane mleko, mrożonki oraz komercyjne zestawy gotowych dań, tzw. „fast food”, a także różne delikatesowe produkty mięsne [WHO 2001, Szymańska i Mędrala 2003, Gombas i wsp 2003, EUROPA 2006].

Drobnoustrój wykształcił specyficzne mechanizmy pokonywania barier obronnych organizmu gospodarza, a więc błony śluzowej jelit, którą forsuje w drodze do krwiobiegu, a następnie także bariery krew–mózg [Rocout i in. 2000, Chodorowska i Kuklińska 2002, Cichocka i Skotarczak 2003]. Umożliwiają mu to takie czynniki wirulencji, jak białko o^B, internaliny A i B, listeriozyna O czy fosfolipazą C. Drobnoustrój jest pasożytem wewnątrzkomórkowym, zdolnym do wnikania do różnych komórek organizmu gospodarza, takich jak fibroblasty, enterocyty, komórki śródbłonna naczyń, hepatocyty i makrofagi [Faber i Perkin 1991, Chodorowska i Kuklińska 2002, Cichocka i Skotarczak 2003, King 2004]. W mechanizmie patogenyzy decydujące znaczenie dla rozwoju infekcji ma przede wszystkim zdolność inwazji i przeżywania zarazka zarówno w środowisku żołądka, jak i w wyspecjalizowanych komórkach fagocytarnych, enterocytach czy fibroblastach. Znaczącą rolę w rozwoju tego procesu odgrywa listeriozyna O, która w interakcji z fosfolipazą C powoduje rozpad błony fagolizosomu, co umożliwia zarazkom przedostanie się do cytoplazmy fagocyta, w której znajdują warunki do nieskrępowanego rozwoju. Na syntezę i ekspresję wymienionych czynników wirulencji

wywierają wpływ warunki środowiska, w którym zarazek bytuje. Dotyczy to nie tylko tkanek gospodarza, ale także warunków panujących w środowisku zewnętrznym, np. w żywności.

U dorosłych ludzi infekcje mają przebieg łagodny, nierzadko bezobjawowy. Okres wylegania choroby jest zmienny i zależnie od jej formy klinicznej może trwać od 3 do 21 dni. Objawy chorobowe różnią się nasileniem, od umiarkowanych symptomów grypopodobnych do zagrażającego życiu zapalenia mózgu czy posocznicy. Te ciężkie przypadki dotyczą głównie płodów i noworodków oraz ludzi z niedoborami immunologicznymi. Stan ciąży szczególnie preferuje infekcje, które prowadzą do ronień lub wczesnych porodów z ciężkimi uszkodzeniami organizmu urodzonych dzieci [Rocout i in. 2000].

KOLIBAKTERIOZA

Escherichia coli jest składnikiem fizjologicznej mikroflory przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt, dlatego pałeczki te wybrano jako kryterium oceny stanu sanitarnego żywności. Liczne serotypy tego rodzaju nie są chorobotwórcze. Patogenne szczepy natomiast są u ludzi przyczyną różnych postaci zapalenia żołądka i jelit lub infekcji o ciężkim przebiegu klinicznym. Z tych powodów pogrupowano je w patowary, zgodnie z formami klinicznymi wywoływanych przez nie chorób. Wśród pięciu wyodrębnionych grup szczepy enterotoksyczne (ETEC) są najczęściej przyczyną bakteryjnych biegunek w krajach rozwijających się oraz tzw. biegunek „wakacyjnych” w krajach rozwiniętych. Objawy chorobowe są następstwem aktywności produkowanych przez nie enterotoksyn, stymulujących sekrecję płynów w świetle jelit [Kręgiel i Drewicz 2000].

Przyczyną zachorowań o ciężkim przebiegu są enterokrwotoczne szczepy pałeczek okrężnicy (EHEC), które pojawiły się w ostatnim dwudziestolecu. Infekcje te najczęściej przebiegają wśród objawów od umiarkowanej biegunki do ciężkich stanów z bólami brzucha i krwawymi stolcami (haemorrhagic colitis). W części przypadków dochodzi do pogarszających stan komplikacji powodowanych rozwojem hemolitycznego syndromu uremicznego (HUS). Uszkodzeniu ulega śródbłonek naczyń krwionośnych i następuje szybki rozpad erytrocytów prowadzący do anemii i spontanicznych krwawień oraz do niewydolności nerek. Niekiedy tym zmianom klinicznym towarzyszą objawy nerwowe. Obserwowane symptomy są w głównej mierze wynikiem cytopatycznego działania toksyn (verotoksyn, Shiga like toxin) produkowanych przez patogenne szczepy [Kręgiel i Drewicz 2000, King 2004, Chart 2000].

Do zakażenia dochodzi najczęściej za pośrednictwem zanieczyszczonego zarazkami mielonego mięsa wołowego (hamburgery), surowego mleka, a także produktów roślinnych, takich jak kielki zbożowe czy sałata. Infekcje może także inicjować kontakt z zakażonymi ludźmi lub zwierzętami, które zwykle są bezobjawowymi nosicielami zarazków. Jest to tym bardziej istotne, że dawka zakaźna zarazka jest niska i wynosi od kilku do kilkudziesięciu komórek [King 2004, EU Report 2006].

W zapobieganiu infekcjom istotne jest, aby produkty uznawane za potencjalne wektory zarazków były przed spożyciem ogrzewane do temperatury co najmniej 70°C w ich centrum termicznym.

JERSINIOZA

Przyczyną zachorowań u ludzi najczęściej jest *Yersinia enterocolitica*, jakkolwiek *Y. pseudotuberculosis* także może je powodować [Nesbaken 2000, Bleul i in. 2002,

Tennant 2003]. Drobnoustroj bytuje w przewodzie pokarmowym zwierząt (świnie, gryznie, zwierzęta towarzyszące) oraz w środowisku. Jednak nie wszystkie szczepy są chorobotwórcze. W żywności zarazki najczęściej występują w mleku i jego przetworach, rzadziej w mięsie wieprzowym, mięsie drobiu i warzywach.

Y. enterocolitica może wyrastać w szerokim zakresie temperatur od -2 do 45°C , a optymalne temperatury wynoszą od 30 do 37° . W mięsie przechowywanym 14 dni w temperaturze 5°C liczba zarazków wzrasta o 5–6 cykli logarytmicznych, natomiast zamrażanie mięsa powoduje ich stosunkowo szybkie wymieranie. Drobnoustroj nie wykazuje znaczniejszej termooporności i ginie po kilkuminutowym ogrzewaniu w temperaturze 60°C . Jest również bardzo wrażliwy na działanie promieni jonizujących i stężenia NaCl wyższe niż 5% [Nesbaken 2000, Tennant 2003].

Do zakażenia dochodzi zwykle przez kontakt z nosicielem lub przez zanieczyszczoną żywność. Często jednak drobnoustroje wyosabniane z produktów żywności są niechorobotwórcze dla człowieka. Okres wylegania choroby wynosi od 5 do 10 dni. Zachorowania przebiegają przede wszystkim wśród objawów zapalenia żołądka i jelit. Niekiedy dołącza się zapalenie stawów. Nie jest znana dawka infekcyjna. W Europie szczyt zachorowań przypada na miesiące jesieni i zimy [King 2004, EU Report 2006].

Przy ostrym przebiegu występują bóle w prawym dole biodrowym spowodowane zapaleniem węzłów chłonnych kręzkowych, podobne do objawów przy zapaleniu wyrostka robaczkowego. Mogą też pojawić się ropnie w narządach wewnętrznych. Najczęściej jednak nie dochodzi do przełamania bariery jelitowej i choroba przebiega pod postacią samoograniczającej się biegunki z umiarkowaną gorączką i bólami brzucha. Powodem zespołu typowych objawów jelitowych jest kolonizacja nabłonka jelitowego przez inwazyjne szczepy i ciepłooporna enterotoksyna. Toksyna ta produkowana jest także przez szczepy niepatogenne, uważa się więc, że o rozwoju infekcji decydują właściwości inwazyjne zarazka [King 2004].

ZAPALENIE ŻOŁĄDKA I JELIT POWODOWANE PRZEZ *VIBRIO* SP.

Vibrio parahaemolyticus jest drobnoustrojem halofilnym, bytującym w środowisku morskim, wyrastającym w temperaturach od 5 do 45°C i $\text{pH} > 5,0$. Przeciwnie do *Vibrio cholerae* posiada właściwości inwazyjne, ale nie produkuje enterotoksyny. Wyodrębniono w nim dwa biotypy: biotyp 1 – *V. parahaemolyticus*, produkujący termostabilną hemolizynę (Vp-TDH – *V. parahaemolyticus* *thermostable direct haemolysin*) i biotyp 2 – *V. alginoliticus*, syntetyzujący hemolizynę odrębną od Vp-TDH, jakkolwiek antygenowo pokrewną. Wytwarzanie Vp-TDH jest zależne od pH środowiska ($5,5$ – $6,5$). Toksyna wykazuje właściwości cytotoksyczne i hemolityczne, ale nie ma dowodów na jej uczestnictwo w wywoływaniu biegunki. Poza Vp-TDH *V. parahaemolyticus* syntetyzuje cztery inne hemolityczne czynniki. Mimo licznych prób nie udało się dotąd wyosobnić pozakomórkowego czynnika o właściwościach enterotoksyny [Anonymus 2004].

V. parahaemolyticus jest chorobotwórczy dla ryb, ale powoduje również zachorowania u ludzi. Jest przyczyną zatruc pokarmowych. Po 12–24 godzinach inkubacji dominującym objawem jest wodnista biegunka, której towarzyszą nudności i bóle brzucha. Wymioty, gorączka, bóle głowy i dreszcze pojawiają się zdecydowanie rzadziej. Drugą, dyfterytyczną formę choroby, występującą na Półwyspie Indyjskim, charakteryzuje ostry przebieg, nierzadko z krwotocznym zapaleniem jelit.

Źródłem zarazka są ryby i owoce morza. W Japonii zatrucia najczęściej powodowane są spożyciem pokarmów przygotowanych z surowych ryb, natomiast w USA ostryg, u których wykazano sezonowe związki z infekcyjnością [King 2004].

Vibrio vulnificus bytuje w morskich wodach przybrzeżnych w okolicach ujść rzek. Jest dość zjadliwym zarazkiem, zdolnym do penetracji ściany jelita i wnikania do krwi. Może więc być przyczyną zagrażającej życiu posocznicy. Jego źródłem są owoce morza. Do zachorowań dochodzi zwykle po spożyciu zanieczyszczonych zarazkami surowych ostryg. Objawy posocznicy: gorączka, dreszcze, ogólne wyczerpanie oraz niekiedy wymioty i biegunka pojawiają się nagle w 20 do 40 godzin po wniknięciu zarazków do organizmu. U ludzi z chorobami żołądka i wątroby oraz z niedoborami immunologicznymi choroba często kończy się śmiercią [Oliver 1989].

INFEKCJE POWODOWANE PRZEZ WIRUSY

Inną grupą drobnoustrojów, ze strony których znacznie wzrosło w ostatnich latach potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi, są wirusy. Przyczynę infekcji jelitowych stanowią patogenne dla ludzi enterowirusy. W przeciwieństwie do bakterii wirusy nie mogą namnażać się w żywności a niektóre z nich szybko giną pod wpływem zmieniających się warunków podczas procesu jej wytwarzania. Przed rokiem 1940 za patogenne uważano tylko przenoszone przez surowe mleko wirusy polio. W ostatnich latach, dzięki rozwojowi metod diagnostycznych, wykazano wzrost zachorowań o wirusowej etiologii w różnych częściach świata. Ich sprawcami są głównie wirusy zapalenia wątroby oraz *norowirusy*, wcześniej nazywane grupą *Norwalk (NLV)*. Poza tymi ostatnimi powodem sporadycznych infekcji są również inni przedstawiciele rodziny *Caliciviridae*, np. *Sapovirus* czy *Vesivirus*, a także wirusy *Coxsackie* oraz przenoszony z mlekiem kozim wirus kleszczowego zapalenia mózgu [CDC, MMWR 2001, Bigoraj i in. 2006]. Przyczyną biegunek u dzieci są rotawirusy z rodziny *Reoviridae*, ale jak wynika z badań, tylko wyjątkowo do zakażenia dochodzi za pośrednictwem żywności. Bardziej prawdopodobnym wektorem wydaje się być woda. Dominujące czynniki tych infekcji wirusy *HAV* i *norowirusy* należą do małych [27–30 nm] wirusów RNA. Wirus *HAV* udaje się hodować na liniach komórkowych, co jak dotąd jest nieosiągalne w odniesieniu do *norowirusów*. Ich obecność w kale chorych a także w próbkach żywności można wykrywać metodami immunoenzymatycznymi i sekwencjonowaniem RNA oraz powszechnie obecnie stosowaną metodą odwrotnej transkrypcji PCR. Zachorowania mogą powodować bardzo małe koncentracje *HAV* w żywności, Produkty takie mogą, ale nie muszą być przyczyną wystąpienia, zwykle po czterotygodniowej inkubacji, symptomów takich jak gorączka, złe samopoczucie, mdłości, wymioty, bóle brzucha, zapalenie wątroby, któremu towarzyszy żółtaczka. Choroba zwykle trwa od 1 do 2 tygodni i w tym czasie następuje rozsiewanie zarazków.

Podobnym zagrożeniem jest ostatnio odkryty wirus zapalenia wątroby typu E (*HEV*), hepatotropowy wirus RNA, wielkości około 32 nm, przenoszony drogą fekalno-oralną [King 2004]. Wywołuje wirusowe zapalenie wątroby w krajach południowo-wschodniej Azji. Nie opracowano jeszcze szczepionki przeciwko temu wirusowi, więc bronić się przed nim można, przestrzegając takich samych zasad jak w przypadku *HAV*. Kobiety w ciąży zakażone *HEV* narażone są na poronienie, przedwczesny poród, a nawet śmierć, wśród objawów śpiączki (ok. 15%). Okres wylegania choroby wynosi

5–65 dni. W Polsce zdarzają się przypadki „przywleczenia” choroby z wycieczek zagranicznych.

Infekcje *norowirusów* objawiają się w 12–24 godziny po spożyciu zanieczyszczonych produktów silnymi wymiotami i biegunką jako rezultat zapalenia żołądka i jelit. Bezpośrednia kontaminacja żywności enterowirusami dokonuje się zwykle poprzez nosicieli uczestniczących w procesie jej produkcji lub dystrybucji albo pośrednio – przez wody ściekowe zanieczyszczające wody morskie, skąd zarazki wnikają do bytujących tam owoców morza, głównych wektorów tych infekcji. Stosowane w otwieraniu skorup techniki termiczne mogą nie być wystarczające dla zabicia wirusów. Znacznie bardziej efektywne są stosowane w tym celu wysokie ciśnienia hydrostatyczne (300Mpa). Skutecznym środkiem inaktywacji wirusów są też promienie γ zastosowane w dawce około 4 kGy [EUROPA 2006].

INFEKCJE POWODOWANE PRZEZ PIERWOTNIAKI

Dysfunkcje jelitowe mogą powodować także pierwotniaki. Stosunkowo częstą ich przyczyną jest *Giardia (Lambia) intestinalis*, zaliczana do *Archezoa*, jednokomórkowców przypominających pierwsze eukarioty. Powoduje u ludzi lambiozę, chorobę biegunkową o przebiegu od łagodnego do uporczywej, tłuszczowej i wyniszczającej biegunki. Zagrożeniem dla życia (ludzie starsi, dzieci) jest w tych przypadkach odwodnienie organizmu.

Giardia intestinalis występuje w dwóch postaciach: trofozoitu, formy replikacyjnej oraz cysty, która jest formą trwałą. Inwazyjne cysty w przewodzie pokarmowym przekształcają się w rozmnażające się przez podział trofozoity, które dzięki posiadanej na brzusznej powierzchni przysawce kotwiczą się w błonie śluzowej jelita cienkiego. Rezultatem inwazji jest uszkodzenie komórek nabłonka, co upośledza jego zdolność absorpcji płynów i prowadzi do biegunki. *Giardia* jest pasożytem ludzi i zwierząt. Źródłem infekcji najczęściej jest woda zanieczyszczana odchodami zwierząt. Pasożyt może też pojawić się w wodzie pitnej, jeśli popełniane są błędy w jej chlorowaniu [Salysers i Whitt 2003].

Choć drobnoustroje te obecnie określane są jako nowe pojawiające się patogeny pokarmowe, jest faktem, że zanieczyszczały żywność od dawna, a ich obecność nie była wykrywana z braku odpowiednich metod badawczych. O ich ujawnieniu zdecydowały też zmiany socjoekonomiczne oraz zmieniające się preferencje konsumentów. Do „nowych” patogenów można zapewne zaliczyć enterokrotoczne szczepy *E. coli*, u których nowe czynniki wirulencji pojawiły się najprawdopodobniej w wyniku horyzontalnego przekazu genów. Tego rodzaju przekazy determinant genetycznych czynników wirulencji, np. wysp patogenności będą się zapewne dokonywały także w przyszłości. „Nowymi” patogenami są także priony BSE oraz wirus wysoce zakaźnej grypy ptaków [HPAI]. Pojawienie się tych epizoocji spowodowało znaczne zaniepokojenie społeczne, wywołane skalą przewidywanych zagrożeń dla ludzi. Jak dotąd jednak obawy te nie znajdują potwierdzenia. W odniesieniu do BSE ryzyko zakażenia się chorobą jest obecnie uważane za bardzo niskie, natomiast WHO aktualnie nie uważa, aby grypa ptaków mogła zagrażać bezpieczeństwu żywności [Capua i Alexander 2004, EUROPA 2006, WHO 2006].

Głównym źródłem zagrożeń dla człowieka są jednak zoonotyczne patogeny przenikające do produktów żywności nie tylko zwierzęcego pochodzenia. Są wśród nich takie, które mogą nie powodować zachorowań zwierząt albo są przyczyną infekcji

bezoobjawowych. Stąd są trudne do wykrycia w warunkach fermowych, a także w badaniach poubojowych [Allos 2002, Bigoraj i Mizak 2006, EU Report 2006]. Liczni przedstawiciele tej grupy bytują w przewodzie pokarmowym zdrowych zwierząt, skąd za pośrednictwem kału zanieczyszczają środowisko i produkty takie jak mięso, mleko czy jaja. W procesie kontaminacji żywności swój udział mają też ludzie, szczególnie zatrudnieni przy jej produkcji. Źródłem zarazków poza kałem mogą być skałeczenia skóry, śluz i ślina. Ograniczenie ryzyka związanego z tego rodzaju kontaminacją możliwe jest przy zachowaniu właściwych standardów higienicznych podczas całego procesu produkcji i dystrybucji żywności a także, co jest szczególnie istotne w gospodarstwach domowych, przy jej przygotowywaniu do konsumpcji.

PIŚMIENNICTWO

- Allos B.M., 2002. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends, Clin. Infect. Dis. 32, 1201–1206.
- Altekruse S.F., Stern N.J., Fields P.I., Swerdlow D.L., 1999. *Campylobacter jejuni* – an emerging foodborne pathogen, Emerg. Infect. Dis. 5, 28–35.
- Anonymus, 2004. *Vibrio parahaemolyticus* – US Food and Drug Administration and the Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- Bednarski M., Wieliczko A., 2006. Kamylobakteriozy zwierząt – aspekty epidemiologiczne, Med. Wet. 62, 1211–1214.
- Bigoraj E., Mizak B., Król J., 2006. Struktura rotawirusów – czynnika etiologicznego infekcji pokarmowych u człowieka, Med. Wet. 62, 1215–1218.
- Blaser M.J., 1997. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections, J. Infect. Dis. 176, 103–105.
- Bleul U., Bühler K., Stephan R., Pospischil A., Braun U., 2002. Mastitis caused by *Yersinia pseudotuberculosis*, Vet. Rec. 151, 767–769.
- Capua J., Alexander D., 2004. Avian influenza: recent developments, Avian Pathol. 33, 393–404.
- CDC, MMWR 2001. „Norwalk-Like viruses” public health consequences and outbreak Management 50, 1–13.
- Chart H., 2000. Clinical significance of verocytotoxin – producing *Escherichia coli* 0157, Word J. Microbiol. Biotech. 16, 719–724.
- Chodorowska M., Kuklińska D., 2002. Czynniki wirulencji *Listeria monocytogenes* oraz patogenesa, obraz kliniczny i antybiotykoterapia listeriozy, Post. Mikrobiol. 41, 37–49.
- Cichocka A., Skotarczak B., 2003. Molekularne podstawy chorobotwórczości *Listeria monocytogenes*, Med. Wet. 59, 15–17.
- EU Report. 2006, The community summary report on: Trends and sources of zoonoses, Zoonotic agents and antimicrobial resistance in EU in 2005., EFSA Journal 94.
- EUROPA /updated 2006/European Commission – Food and Veterinary Office. http://europa.eu.int/comm/food/fvo/index_en.htm
- Farber J.M., Peterkin P.I., 1991. *Listeria monocytogenes* a food-borne pathogen, Microbiol. Rev. 55, 476–511.
- Figura N., Guglielmetti N., 1998. Clinical characteristics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, Lancet I, 942–943.
- Gombas D.E., Chen Y., Clavero R.S., Scott V.N., 2003. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready to-eat foods, J. Food Prot. 66, 559–567.
- King L.J., 2004. Emerging zoonoses and pathogens of public health concern. OIE Publish. 2004.
- Klipstein F.A., Eagert R.F., Shat A., Schenk E.A., 1986. Pathogenic properties of *Campylobacter jejuni*: assay and correlation with clinical manifestations. Infect. Immunity 54, 43–49.

- Kręgiel D., Drewicz E., 2000. Enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* (EHEC), Post. Mikrobiol. 39, 177–187.
- McCarthy N., Giesecke J., 2001. Incidence of Guillain-Barre syndrome following infection with *Campylobacter jejuni*, Am. J. Epidemiol. 153, 610–614.
- Nesbakken T., 2000. Yersinia species w Lund B.M., Baird-Parker A.C., Holt J.G. The Microbiological Safety and Quality of Food, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 1365–1393.
- Oliver J.D., 1989. Vibrio vulnificus w Foodborne Bacterial Pathogens, Doyel M.P., Ed. Marcel Dekker, New York, 569–571.
- Rocout J., Jaquet C., Reilly A., 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods, Int. J. Food Microbiol. 20, 62, 197–209.
- Salyers A.A., Whitt D.D., 2003. Pierwotniaki powodujące biegunki w Mikrobiologia, PWN, Warszawa, 369–371.
- Szymańska L., Mędrala D., 2003. *Listeria monocytogenes* w mięsie i produktach mięsnych w środowisku przetwórstwa mięsnego, Med. Wet., 59, 18–22.
- Tennant S.M., Grant T.H., Robins-Browne R.M., 2003. Pathogenicity of Yersinia enterocolitica biotype 1A, FEMS Immun. Med. Microbiol. 38, 127–137.
- Vliet van A.H.M, Ketley J.M., 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection, J. Appl. Microbiol. 90, 45S–56S.
- Wallis M.R., 1994. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*, Brit. J. Biomed. Sci. 51, 57–64.
- Wassenaar T.M., 1997. Toxin production by *Campylobacter*, Clin. Microbiol. Rev. 10, 466–476.
- WHO, 2006. Avian Influenza www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/
- WHO, 2001. Surveillance Programme for Control of Food-borne infections and intoxications in Europe. VII Report 1993–1998, Berlin.

ZOONOTIC PATHOGENS AND THEIR POSSIBLE IMPACT ON FOOD SAFETY

Abstract. Causative agents of zoonoses can be transmitted to humans through a numbers of routes, including direct contact, food, water, insects, rodents etc. The BSE crisis and recent the avian influenza crisis heightened public concern over the safety of foods of animal origin. Often some zoonotic pathogens may cause asymptomatic or no diseases (carrier states), difficult to detect, either on farm or at slaughterhouse examination. Many of these pathogens reside in the intestinal tract of healthy animals and may spread through faecal contamination of the environment and products such as meat, milk or eggs. Their presence in food products is a potential of food-borne diseases. This risk can be minimised if food hygiene principles are applied throughout the entire food chain from production, through processing to preparation at home. These pathogens and diseases which may affect man are discussed.

Key words: zoonotic pathogens, food contaminations, food-borne diseases

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 25.09.2008

Do cytowania – For citation: Molenda J., Bystroń J., Bania J., 2008. Zarazki zoonotyczne – potencjalne zagrożenie bezpieczeństwa żywności. Acta Sci. Pol. Med. Vet. 7(3), 49–58.

OCCURRENCE OF MRSA IN LIVE-STOCK FARMS*

Zora Štásková¹, Lubica Mišurová¹, Renata Karpíšková^{1,2}

¹ University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno

² Centre of Hygiene of Food Chains Brno, National Institute of Public Health
Prague

Abstract. The aim of our study was to find out the prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the live-stock farms in the Czech Republic. 444 samples, obtained from 12 live-stock farms were examined. Samples consisted of animal swabs, milk, feed, feces, swabs from environment and staff. Nine MRSA isolates were found, 8 isolates were obtained from goat's farm (farm A): 5 isolates from goat's milk and 3 from staff (nasal swabs). One isolate was obtained from cow's milk on farm B. All obtained MRSA isolates were genetically characterized. The results from this study revealed that the animals can be an important source of methicillin resistant staphylococci and represent potential hazard for further spread to farmers, staff, their families, other animals and foodstuffs of animal origin.

Key words: MRSA, PCR, PFGE Pantón-Valentine leukocidin, toxic-shock syndrome toxin-1, staphylococcal enterotoxins, exfoliative toxins

INTRODUCTION

The incidence of pathogenic microorganisms which gained resistance to commonly used antibiotics becomes the 21st century global issue. In this aspect, the microorganisms of key import are, above all, those of the *Staphylococcus aureus* species, especially methicillin resistant strains – MRSA. These strains were isolated in 1961 for the first time in hospital patients in the United Kingdom [Barber 1961]. Since then, the global incidence monitoring of MRSA has been ongoing and in the last decade, an increasing trend in their incidence has been detected. MRSA is met with mostly in human medicine in connection with nosocomial infections [Carbon 2000].

* The project received financial support from VZ MŠMT MSM 6215712402 and from the MZe-NAZVA No. QH81111 project.

At the start of 1990's, the incidence of MRSA was detected in the common population [Naimi et al. 2001] and later on in animals [Voss et al. 2005]. Based on epidemiological and molecular characteristics, MRSA strains are divided into „hospital-acquired” and „community-associated”. Representatives of both groups differ from each other especially with their pathogenicity and resistance to antimicrobial agents [Hososaka et al. 2007].

In the Czech Republic, records of hospital acquired methicillin resistant *S. aureus* have been kept since 2001 when 6% were reported. In 2005, the numbers doubled (13%). In some European countries, the prevalence of this pathogen is even higher (e.g. up to 40% in Ireland and Italy) [EARSS 2006].

Recently, these strains have been monitored also in the area of veterinary medicine, especially in food production animals. Infected or colonized animals can easily become the carriers of these strains, spreading it not only to the tending staff but also to raw materials planned for further processing [Lee 2003].

The aim of our study was to determine the prevalence of MRSA in farm animal herds in the Czech Republic.

MATERIAL AND METHODS

Samples were collected from 12 farms in 9 regions of the Czech Republic. They were farms housing various farm animal species. Common farms were involved, such as cow farms, goat farms and some ecological farms.

On the whole, 444 samples were collected, including swabs of the stables, milking room, animals (nasal cavity, rectum, conjunctiva, udder), staff swabs (nasal cavity, tonsils, skin of the abdomen) and in persons collecting the samples at beginning and end of sample takings (nasal cavity). Also, milk samples were collected (basin as well as individual samples), feed and animal excrements.

For detection of MRSA, the following procedure was used: primary enrichment was done in Mueller-Hinton broth (BioRad, USA) with 6.5% NaCl, secondary enrichment in a broth with antibiotics (TSB + 3.5 mg/l of cefoxitin + 75 mg/l of aztreonam) (Lab-MediaServis, CZ). Simultaneous inoculation onto the Baird-Parker agar (Oxoid, Basingstoke, UK) and onto selective chromogenic medium MRSAselect (BioRad, USA) followed. Suspect colonies from both media types were then inoculated onto blood agar and assessed morphologically. In colonies that corresponded morphologically to *S. aureus*, resistance to antimicrobial agents was monitored using disk diffusion method (disks and MH agar by Oxoid, Basingstoke, UK). The antibiotics tested were as follows: oxacillin, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol, co-trimoxazol, amoxicillin/clavulanic acid, clindamycin, gentamicin, ciprofloxacin, vancomycin, teicoplanin, rifampin, cefoxitin and cefotaxim.

S. aureus isolates were confirmed by the multiplex PCR method for detection of the specific fragment SA 442 and *mecA* gene which encodes the resistance to methicillin [Martineau et al. 1998, Boşgelmez-Tmaz et al. 2006]. In *mecA* positive isolates of *S. aureus*, PCR was then carried out to detect the presence of genes encoding enterotoxins (*ses*) [Monday and Bohach 1999], toxic shock syndrome toxin (*tst*), Panton-Valentine leukocidin (*pvl*) [Hososaka et al. 2007] and exfoliatins A and B (*exA*, *exB*) [Hososaka et al. 2007]. Also, their macrorestrictive profiles using pulse field gel electrophoresis (protocol by CDC PulseNet, USA) were established in isolates. Assessment

of pulse types was carried out based on the Tenover criteria [Tenover et al. 1995] and according to McDougal et al. [2003].

RESULTS AND DISCUSSION

In total, 111 *S. aureus* isolates were detected, out of which 9 (8.1%) were MRSA. Eight MRSA isolates were collected at a goat farm (farm A), namely 3 MRSA isolates (SA 5–7) from the staff (nasal cavity swabs), 4 isolates came from goat milk basin samples (SA 1–4) and one isolate (SA 8) came directly from an individual milk sample. One MRSA isolate (SA 9) was acquired from a cow milk basin sample from farm B.

In Table 1, the results of the detected resistance of MRSA isolates using disk diffusion detection are presented. Almost all isolates displayed multiple resistances to 3 to 9 tested antimicrobial agents. In Table 2, the genotypic characterization of the acquired isolates is presented.

Table 1. Resistance to antimicrobial agents of MRSA isolates

Tabela 1. Oporność czynników antymikrobiologicznych izolatów MRSA

	OX ^b	TE	E	C	SXT	AMC	DA	CN	CIP	VA	TEC	FOX	RD	CTX
SA1	R ^a	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R
SA2	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R
SA3	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R
SA4	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S	S	R	R	R
SA5	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R
SA6	R	R	I	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R
SA7	R	R	I	I	R	R	I	R	I	S	I	R	R	R
SA8	R	R	I	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R
SA9	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I

^aR – resistant, S – sensitive, I – intermedium

^bOX-oxacillin (disk amount – 1 µg), TE-tetracycline (30 µg), E-erythromycin (15 µg), C-chloramphenicol (30 µg), SXT-co-trimoxazol (25 µg), AMC-amoxicillin/clavulanic acid (20/10 µg), DA-clindamycin (2 µg), CN-gentamicin (10 µg), CIP-ciprofloxacin (15 µg), VA-vancomycin (30 µg), TEC-teicoplanin (30 µg), FOX-cefoxitin (30 µg), RD-rifampin (5 µg), CTX-cefotaxim (30 µg)

All MRSA isolates acquired from farm A (SA 1-SA 8) were classified as CA-MRSA based on their pulse types (USA 300). This pulse type was identified as the primary type, participating on the rise of community infections. MRSA originating from farm B was classified as pulse type USA 800. This type is described more often in relation to hospital (HA-MRSA) infections [McDougal et al. 2003]. None of the strains was capable of producing PVL, TSST-1 nor exfoliatins. Some authors describe the more frequent production of PVL and exfoliatins in CA-MRSA. On the contrary, rather the production of enterotoxins and TSST-1 has been reported in HA-MRSA [Hososaka et al. 2007]. In our study, the isolated strains from farm A were classified based on pulse types as CA-MRSA despite the fact that in most of them, enterotoxin production was detected. The production of the mentioned toxin types does not take place as a rule.

Table 2. Genotypic characterization of MRSA isolates
Tabela 2. Charakterystyka genotypów izolatów MRSA

	<i>ses</i>	<i>tst</i>	<i>pvl</i>	<i>exA, B</i>	PFGE type
SA1	<i>seb, seg, sei</i>	-	-	-	USA 300
SA2	-	-	-	-	USA 300
SA3	<i>seb</i>	-	-	-	USA 300
SA4	<i>seb, seg, sei</i>	-	-	-	USA 300
SA5	<i>seb</i>	-	-	-	USA 300
SA6	<i>seb</i>	-	-	-	USA 300
SA7	<i>seb</i>	-	-	-	USA 300
SA8	<i>seb</i>	-	-	-	USA 300
SA9	<i>sed, seg, sei, sej</i>	-	-	-	USA 800

At present, Czech Republic has no available overall information on incidence of MRSA or other methicillin resistant staphylococci in animals (including food production ones), nor in food raw stuffs and food stuffs. Some information from abroad indicates, however, that both animal and food can partake on the spread of these dangerous bacteria. For instance, Lee et al. [2003, 2004] report MRSA incidence in cattle, pigs and chickens in Asian countries and detect a relationship between animal MRSA and human infections. Voss et al. [2005] has shown MRSA-colonized pigs to be the source of infection for farmers and their families. The role that animals have as a potential reservoir of MRSA that causes infection in human population is the subject matter of a series of recent research projects. The first incidence of MRSA in Czech piglets was reported by Bardoň et al. [2006] which just like isolates acquired in our study displayed resistance to oxacillin, erythromycin, clindamycin and gentamicin.

CONCLUSIONS

Nowadays, a globally unfavourable trend of methicillin resistant staphylococci strains prevalence is being detected. They are not only hospital strains but also community strains whose impact should not be underrated. MRSA incidence in the initial stages of food production environment presents a threat in the form of their potential spread to other animal species, their tending staff, food material processing staff and subsequently also to the human population.

REFERENCES

- Barber M., 1961. Methicillin-resistant staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 14, 385–393.
- Bardoň J., Kolář M., Vágnerová I., Koukalová D., Čekanová L., 2006. Záchyt methicilin-rezistentního kmene *Staphylococcus aureus* u selat. *Veterinářství*, 56.
- Boşgelmez-Tmaz G., Ulusoy S., Aridogan B., Coşkun-Ari F., 2006. Evaluation of different methods to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* and their clinical labo-

- ratory utility. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 25(6), 410–412.
- Carbon C., 2000. MRSA and MRSE: is there an answer. *Clinical Microbiology and Infection*, 6, 17–22.
- EARSS – The European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Annual Reports 2006. http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202006%20Def_tcm61-44176.pdf
- Gentilini E., Denamiel G., Winkler M. et al., 2002. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal of Dairy Science*, 85, 1913–1917.
- Hososaka Y., Hanaki H., Endo H. et al., 2007. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 13, 79–86.
- Lee J.H., 2003. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to human. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6489–6494.
- Lee J.H. Jeong J.M., Park Y.H. et al., 2004. Evaluation of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2780–2782.
- Martineau F., Picard F.J., Roy P.H., Ouellette M., Bergeron M.G., 1998. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (3), 618–623.
- Mcdougal L., Steward Ch.D., Killgore G.E. et al., 2003. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 5113–5120.
- Monday S.R., Bohach G.A., 1999. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10), 3411–3414.
- naimi T.S., Ledell K.H., Boxrud D.J. et al., 2001. Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996–1998. *Clinical Infectious Diseases*, 33(7), 990–996.
- Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering V.R. et al., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233–2239.
- Voss A., Loeffen F., Bakker J., Klaassen C., Wulf M., 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1965–1966.

WYSTĘPOWANIE GRONKOWCÓW MRSA W FERMACH ZWIERZĄT

Streszczenia. Celem pracy było stwierdzenie występowania gronkowców metycylinoopornych u zwierząt fermowych w Czechach. Zbadano 444 próbki pobrane w 12 fermach hodowlanych. Były to próbki mleka, paszy, kału, wymazy od zwierząt, środowiska oraz od obsługi. Stwierdzono 9 szczepów MRSA (8 szczepów wyosobniono w fermie kóz, 5 szczepów wyosobniono z mleka koziego) i 3 z wymazów z nosa ludzi obsługi. Jeden szczep pochodził z mleka krowy. Wszystkie szczepy były badane genetycznie. Uzyskane wyniki wskazują, że zwierzęta mogą być istotnym źródłem metycylinoopornych

gronkowców i stanowić potencjalne ryzyko dalszej dystrybucji do farmerów, pracowników ferm, ich rodzin, innych zwierząt oraz produktów żywności zwierzęcego pochodzenia.

Słowa kluczowe: MRSA, PCR, PFGE, enterotoksyny gronkowców

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 25.09.2008

For citation – Do cytowania: Štásková Z., Mišurová L., Karpíšková R., 2008. Occurrence of MRSA in live-stock farms, *Acta. Sci. Pol. Med. Vet.* 7(3), 59–64.

WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWBAKTERYJNE HEKSANOWEGO I WODNEGO EKSTRAKTU CHRZANU W STOSUNKU DO PAŁECZEK *SALMONELLA**

Małgorzata Ewa Szczawińska, Agnieszka Czapska,
Jacek Szczawiński, Agnieszka Jackowska-Tracz
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. Celem badań było określenie właściwości przeciwbakteryjnych heksanowego i wodnego ekstraktu chrzanu w stosunku do *Salmonella* Enteritidis w bulionie, wybranie ekstraktu posiadającego silniejsze właściwości przeciwbakteryjne oraz zbadanie jego wpływu na *S. Enteritidis* w modelowym produkcie mięsnym. Stwierdzono, że w próbkach bulionu przechowywanych w temp. 10 i 20°C heksanowy ekstrakt chrzanu tylko w niewielkim stopniu spowalniał rozwój salmonelli, natomiast ekstrakt wodny chrzanu wykazywał bardzo silne oddziaływanie na bakterie testowe. W modelowym produkcie mięsnym przechowywanym w temp. 15°C wodny ekstrakt chrzanu w stężeniu 0,2 i 0,5% wywierał silne działanie przeciwbakteryjne w stosunku do *S. Enteritidis*. W próbkach produktu mięsnego przechowywanych w temp. 20°C działanie przeciwbakteryjne tego ekstraktu było znacznie słabsze.

Słowa kluczowe: właściwości przeciwbakteryjne, ekstrakty chrzanu, *Salmonella*

WSTĘP

W ostatnich latach w najbardziej rozwiniętych ekonomicznie krajach świata, takich jak USA i kraje Unii Europejskiej, bardzo dużo uwagi poświęca się problemowi bezpieczeństwa żywności. Nasilające się dyskusje i krytyka dotyczące nadmiernej chemizacji żywności powodują, że w przemyśle spożywczym dąży się do uzyskania

*Praca wykonana w ramach Projektu Badawczego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr 3 PO6K 02225.

produktów bezpiecznych i trwałych, a równocześnie smacznych i posiadających wysokie wartości odżywcze. Pociąga to za sobą konieczność poszukiwania nowych substancji przede wszystkim pochodzenia naturalnego, zwłaszcza roślinnego, wykazujących działanie hamujące rozwój drobnoustrojów w żywności.

Badania dotyczące tej grupy związków koncentrują się nie tylko na sprawdzeniu ich działania przeciwdrobnoustrojowego, ale również na poszukiwaniu optymalnej metody ich izolacji z materiału roślinnego, co wynika z różnorodności związków biologicznie aktywnych zawartych w roślinach [Kalemba 1999]. Najbardziej rozpowszechnioną i najczęściej badaną grupą związków są polifenole, ale również i związki siarkowe, takie jak np. izotiocyjaniiny, obecne w roślinach kapustnych, chrzanie i gorczycy [Czapska i in. 2006, Delaquis 1999]. Ponieważ związki przeciwbakteryjne występujące w roślinach różnią się od siebie budową chemiczną, lotnością i stabilnością, stosuje się różne techniki ich izolacji. Najczęściej używaną techniką jest ekstrakcja z użyciem wody, alkoholu i heksanu jako rozpuszczalnika. Do ekstraktów przechodzi znaczna część związków biologicznie aktywnych obecnych w roślinach, a ich zastosowanie w produkcji przetworów mięsnych pozwala wyeliminować lub ograniczyć skażenia mikrobiologiczne związane z tradycyjnym stosowaniem rozdrobnionych przypraw roślinnych [Czapska i in. 2006, Czapska i Szczawiński 2006]. Ponieważ w zależności od użytego rozpuszczalnika do ekstraktu mogą przedostawać się różne związki, ekstrakty uzyskane różnymi metodami mogą wykazywać znaczne różnice pod względem właściwości przeciwbakteryjnych [Czapska 2006, Kalemba 1999].

W większości krajów świata, w tym również w Polsce największa udokumentowana liczba zatruc pokarmowych wywołana jest pałeczkami *Salmonella* [Czarkowski i in. 2007]. Szczególną rolę w tym względzie odgrywa *Salmonella* Enteritidis, która jest najczęściej izolowanym serotypem z drobiu i powoduje najwięcej zachorowań ludzi [Binek i Szczawiński 2008]. Z tego względu poszukiwanie możliwości ograniczenia rozwoju tych bakterii w produktach pochodzenia zwierzęcego wydaje się uzasadnione.

Celem pracy było określenie i porównanie właściwości przeciwbakteryjnych dostępnych w handlu ekstraktów chrzanu (heksanowego i wodnego) w stosunku do *Salmonella* Enteritidis w podłożu bakteriologicznym (bulionie), a następnie sprawdzenie, czy ekstrakt o silniejszym działaniu przeciwbakteryjnym może zostać wykorzystany w praktyce do ograniczenia namnażania się salmonelli w przetworach mięsnych, w przypadku ich skażenia po obróbce termicznej.

MATERIAŁ I METODY

W ramach realizacji badań przeprowadzono dwa eksperymenty.

W pierwszym z nich ekstrakty chrzanu heksanowy – nazwa preparatu: Ekstrakt gorczycy; producent – All Spice Sp. z o.o. – Sieraków Wlkp., Polska) oraz wodny (nazwa preparatu: Krenaroma; producent – Almi Gewürzindustrie – Wien, Austria), dodawano do bulionu (bulion wzbogacony o pH 6,8, stężeniu chlorku sodu 3,5%, producent – BTL Sp. z o.o., Zakład Enzymów i Peptonów, Łódź), w ilości umożliwiającej uzyskanie koncentracji ekstraktów 0, 0,2, 1,0 i 2,0%. Następnie do bulionu dodawano zawiesinę bakterii *Salmonella* enterica subsp. Enterica serovar Enteritidis 1651/02, wyizolowanych z farszu wieprzowego (inoculum $5,45 \times 10^8$ jtk/ml). Uzyskane w ten sposób próbki przechowywano w temp. 10°C przez 35 dni oraz w 20°C przez 2 dni, wykonując w określonych odstępach czasu ilościowe badania bakteriologiczne. Z każdej próbki

sporządzano szereg dziesięciokrotnych rozcieńczeń. Z wybranych rozcieńczeń wysiewano po 0,5 ml badanego materiału na 2 płytki Petriego z agarem odżywczym, które inkubowano w temp. 37°C przez 24 godziny. Liczbę drobnoustrojów zawartą w 1 ml pożywki wyliczano ze średniej liczby bakterii wyrosłych na 2 płytkach [PN-EN ISO 6887-1:2000, PN-ISO 7218:1998/A1:2004].

W drugim eksperymencie określono właściwości przeciwbakteryjne wodnego ekstraktu chrzanu w modelowym produkcie mięsny. Do próbek mielonego mięsa wieprzowego dodawano NaCl (3%), NaNO₂ (150 mg/kg) oraz 0, 0,2 i 0,5% wodnego ekstraktu chrzanu. Po umieszczeniu mięsa w torebkach z tworzywa sztucznego (PE) próbki ogrzewano do temp. 70°C, a następnie, po oziębieniu, skażano mieszaniną 3 szczepów *S. Enteritidis*. Po skażeniu próbki przechowywano w temp. 15°C przez 9 dni oraz w temp. 20°C przez 3 dni. Oznaczenia liczby drobnoustrojów w próbkach przechowywanych w temp. 15°C wykonywano w dniu 0 oraz po 3, 6 i 9 dniach doświadczenia. Próbki przechowywane w temp. 20°C badano w dniu 0 oraz po 1, 2 i 3 dniach przechowywania. Liczby salmonelli w poszczególnych próbkach określano identycznie jak w pierwszym eksperymencie.

Wszystkie doświadczenia wykonano w trzech powtórzeniach, badając po 2 równoległe próbki w każdej serii doświadczalnej.

Do obliczeń statystycznych wykorzystano analizę wariancji (ANOVA) przeprowadzoną w oparciu o ogólny model liniowy programu matematyczno-statystycznego SPSS 14.0 for Windows. Wartości średnie porównano testem Tukeya.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Wyniki badań pierwszego eksperymentu dotyczącego wpływu heksanowego i wodnego ekstraktu chrzanu na liczbę pałeczek *Salmonella* w bulionie przedstawiono na rysunkach 1–4.

W próbkach przechowywanych w temp. 10°C heksanowy ekstrakt chrzanu w tylko w niewielkim stopniu spowalniał rozwój salmonelli. Statystycznie istotne różnice w stosunku do kontroli obserwowano jedynie w przypadku najwyższego stężenia ekstraktu, tj. 2% pod koniec okresu przechowywania próbek (rys. 1). W tej samej temperaturze ekstrakt wodny chrzanu wykazywał bardzo silne oddziaływanie na bakterie testowe, które nie tylko nie mogły się namnażać, ale nawet ulegały wyraźnej redukcji (rys. 2).

W próbkach bulionu przechowywanych w temperaturze 20°C obserwowano takie same prawidłowości, tj. bardzo słabe oddziaływanie na salmonelle ekstraktu heksanowego chrzanu (rys. 3) i bardzo silne ekstraktu wodnego (rys. 4).

Na podstawie wyników uzyskanych w pierwszym doświadczeniu podjęto decyzję o zaniechaniu dalszych eksperymentów z heksanowym ekstraktem chrzanu, ponieważ uznano, że jego właściwości przeciwbakteryjne są zbyt słabe, aby mogły mieć praktyczne znaczenie w hamowaniu salmonelli w produktach mięsnych.

Wyniki drugiego eksperymentu, w którym obserwowano wzrost pałeczek *Salmonella* w modelowym produkcie mięsny, którego skład chemiczny przypominał peklowaną kiełbasę, przedstawiono na rysunkach 5 i 6.

Ogólnie można stwierdzić, że hamujące oddziaływanie ekstraktu wodnego chrzanu na bakterie testowe było znacznie bardziej widoczne w próbkach przechowywanych w temp. 15°C (rys. 5) w porównaniu z próbkami przechowywanymi w 20°C (rys. 6).

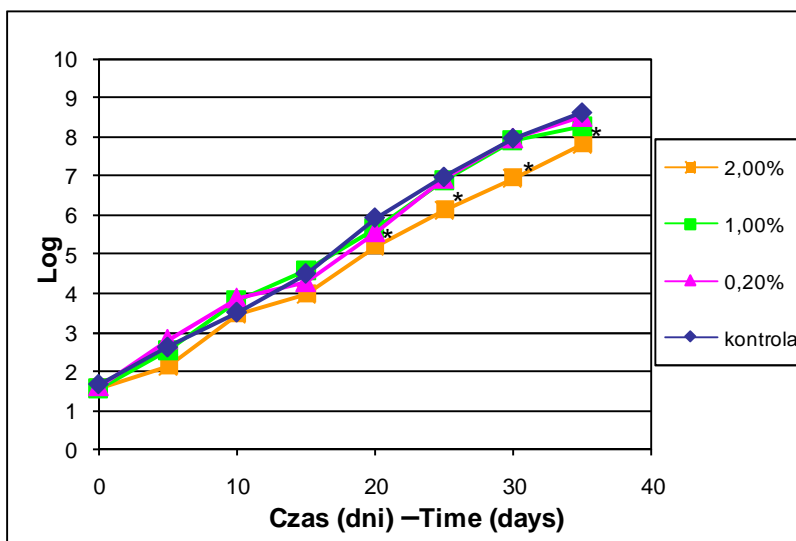
W wyższej temperaturze przechowywania wzrost salmonelli był o wiele bardziej dynamiczny, co zapewne spowodowało zmniejszenie się różnic pomiędzy próbkami kontrolnymi i zawierającymi badany ekstrakt w stężeniach 0,2 i 0,5% (rys. 6).

Należy zaznaczyć, że na podstawie analizy wariancji stwierdzono statystycznie istotne oddziaływanie czasu przechowywania oraz stężenia koncentratu wodnego chrzanu na liczbę pałeczek *Salmonella* zarówno w próbkach przechowywanych w temp. 15°C, jak i 20°C. Wydaje się jednak, że hamujące oddziaływanie badanego ekstraktu w modelowym produkcie mięsny w temp. 20°C jest zbyt słabe, aby mogło mieć większe znaczenie praktyczne.

Pomimo ogromnej liczby publikacji związanych z tematem niniejszej pracy bezpośrednie porównanie uzyskanych wyników z badaniami innych autorów jest trudne. Autorzy większości opracowań z tej dziedziny przy określaniu właściwości przeciwbakteryjnych ekstraktów posługują się metodą agarową dyfuzyjną, której ogromną zaletą jest możliwość szybkiego uzyskania wyników, a wadą – bardzo mała czułość i dokładność [Szczawiński i in. 2006]. Na możliwość wykorzystania ekstraktów chrzanu do ograniczenia wzrostu bakterii wskazują badania wielu autorów [np. Delaquis i in. 1999, Ward i in. 1998]

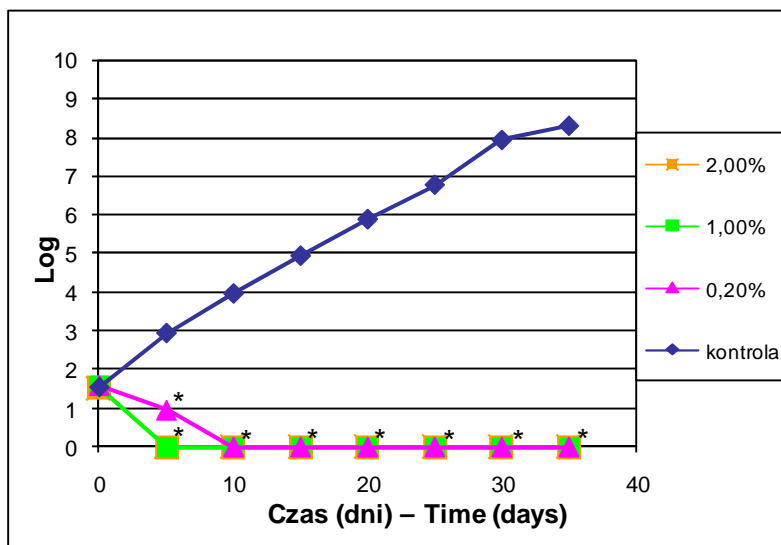
Obszerny przegląd piśmiennictwa na temat przeciwbakteryjnego oddziaływania ekstraktów roślinnych, w tym również ekstraktów chrzanu, zawiera praca doktorska Czapskiej [2006], która jest dostępna u autorów artykułu.

Należy podkreślić, że producenci żywności posługują się zwykle ekstraktami roślinnymi w celu otrzymania określonego smaku, zapachu czy też barwy danego produktu. Wyniki niniejszej pracy wskazują, że ekstrakty roślinne posiadają duży potencjał w zakresie możliwości podniesienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktów spożywczych przechowywanych przez stosunkowo długi czas w temperaturach umożliwiających namnażanie się bakterii chorobotwórczych.



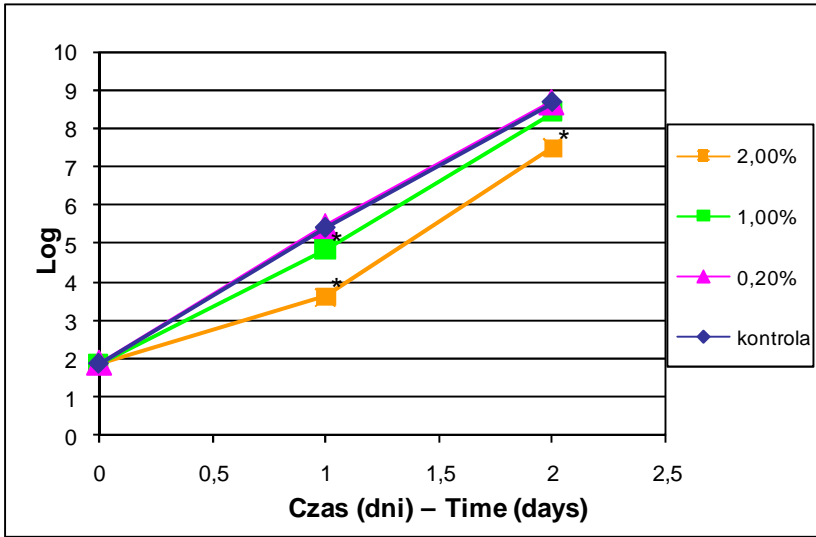
Rys. 1. Wpływ ekstraktu heksanowego chrzanu na wzrost *S. Enteritidis* w bulionie w temp. 10°C
* średnia różni się istotnie od średniej w grupie kontrolnej ($P \leq 0,05$)

Fig. 1. Effect of hexanic horseradish extract on growth of *S. Enteritidis* in broth at 10°C
* mean value is significantly different form mean value for control group ($P \leq 0,05$)



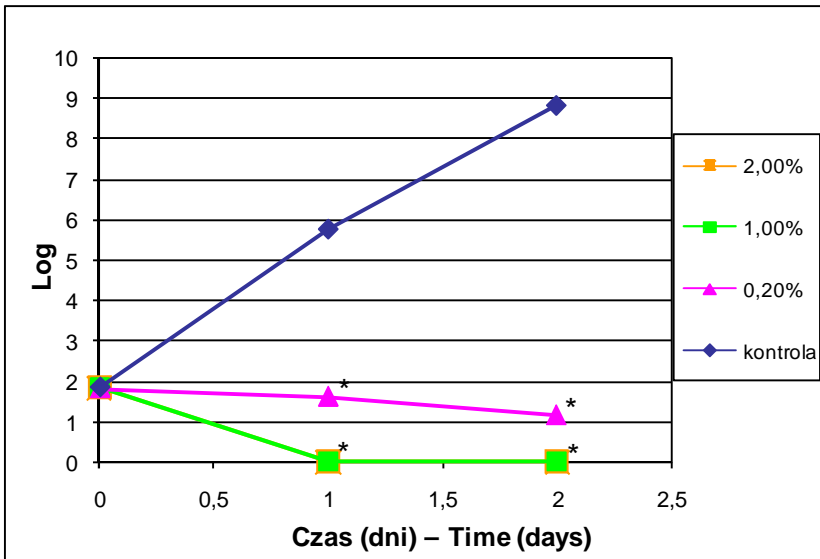
Rys. 2. Wpływ ekstraktu wodnego chrzanu na wzrost *S. Enteritidis* w bulionie w temp. 10°C
* średnia różni się istotnie od średniej w grupie kontrolnej w tym samym czasie ($P \leq 0,05$)

Fig. 2. Effect of aqueous horseradish extract on growth of *S. Enteritidis* in broth at 10°C
* mean value is significantly different form mean value for control group ($P \leq 0,05$)



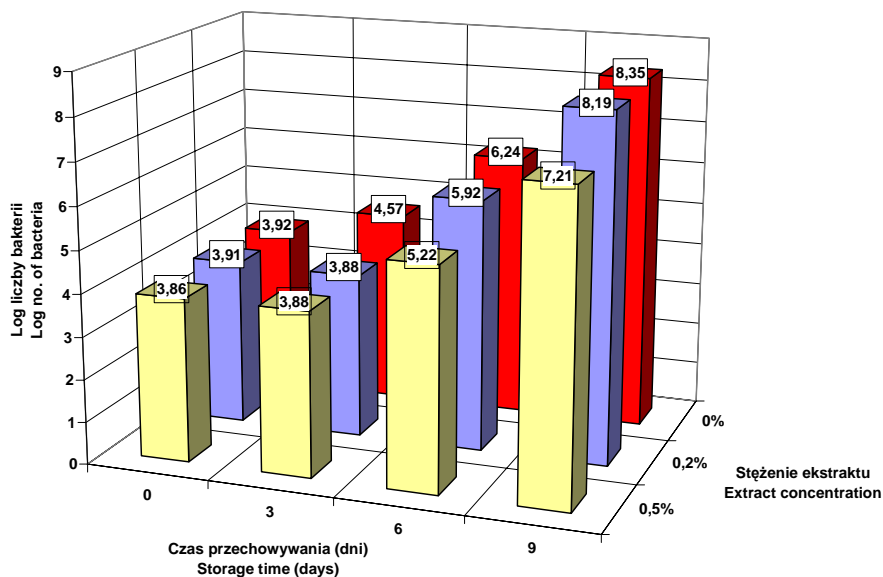
Rys. 3. Wpływ ekstraktu heksanowego chrznanu na wzrost *S. Enteritidis* w bulionie w temp. 20°C
* średnia różni się istotnie od średniej w grupie kontrolnej ($P \leq 0,05$)

Fig. 3. Effect of hexanic horseradish extract on growth of *S. Enteritidis* in broth at 20°C
* mean value is significantly different from mean value for control group ($P \leq 0,05$)



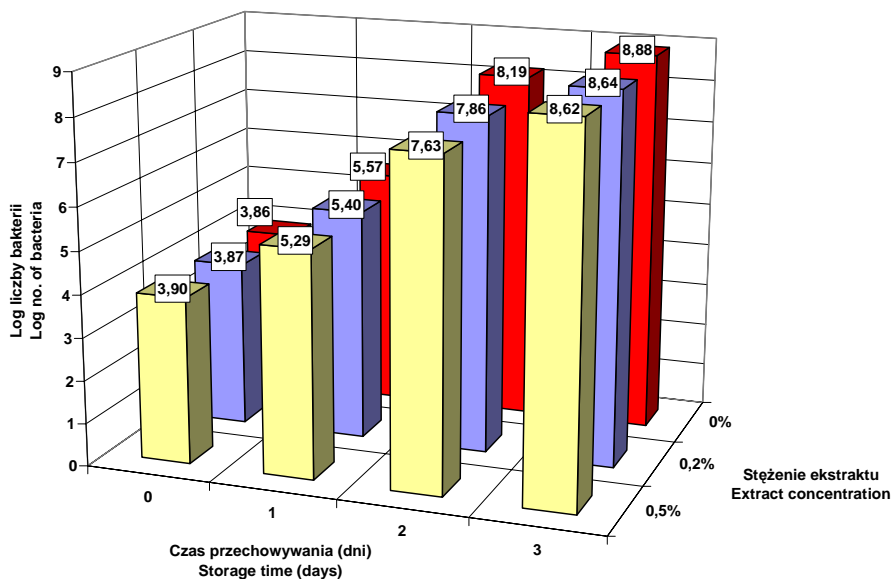
Rys. 4. Wpływ ekstraktu wodnego chrznanu na wzrost *Salmonella* Enteritidis w bulionie w temp. 20°C
* średnia różni się istotnie od średniej w grupie kontrolnej ($P \leq 0,05$)

Fig. 4. Effect of aqueous horseradish extract on growth of *S. Enteritidis* in broth at 20°C
* mean value is significantly different from mean value for control group ($P \leq 0,05$)



Rys. 5. Wpływ wodnego ekstraktu chrznanu na wzrost *S. Enteritidis* w modelowym produkcie mięsnym w temp. 15°C

Fig. 5. Effect of aqueous horseradish extract on growth of *S. Enteritidis* in model meat product at 15°C



Rys. 6. Wpływ wodnego ekstraktu chrznanu na wzrost *S. Enteritidis* w modelowym produkcie mięsnym w temp. 20°C

Fig. 6. Effect of aqueous horseradish extract on growth of *S. Enteritidis* in model meat product at 20°C

PODSUMOWANIE

Na właściwości przeciwbakteryjne ekstraktów z roślin przyprawowych duży wpływ wywiera rodzaj rozpuszczalnika ekstrakcyjnego. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono znacznie silniejsze przeciwbakteryjne działanie ekstraktu wodnego chrzanu w porównaniu z ekstraktem heksanowym.

Działanie przeciwbakteryjne ekstraktów chrzanu w stosunku do salmonelli jest silniejsze przy niższych temperaturach przechowywania próbek.

Wydaje się, że zastosowanie handlowych postaci ekstraktów roślinnych używanych w przemyśle spożywczym, zgodnie z rekomendacją producentów w charakterze dodatków aromatycznych, daje szansę wyeliminowania lub ograniczenia namnażania się drobnoustrojów chorobotwórczych w przetworach mięsnych, a tym samym ograniczenia liczby zatruc pokarmowych bez konieczności użycia chemicznych, syntetycznych konserwantów.

Istnieje potrzeba dalszego kontynuowania badań nad właściwościami przeciwbakteryjnymi ekstraktów roślinnych w przetworach mięsnych produkowanych w praktyce, ponieważ na podstawie uzyskanych wyników trudno przewidzieć, jaki wpływ na tempo wzrostu drobnoustrojów i siłę działania przeciwbakteryjnego ekstraktów będą miały warunki środowiskowe panujące w konkretnych produktach spożywczych.

PIŚMIENNICTWO

- Binek M., Szczawiński J., 2008. Zakażenia pałeczkami *Salmonella* u niosek i brojlerów *Gallus gallus*, toksykoinfekcje pokarmowe u ludzi [w:] Konferencja – Badania nad bezpieczeństwem żywności pochodzenia zwierzęcego oraz pasz. Stan aktualny oraz perspektywy. Postępy nauk rolniczych, Polska Akademia Nauk Wydział Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych. 2/2008, 60 (333), 27–37.
- Czapska A., 2006. Możliwości wykorzystania ekstraktów z roślin przyprawowych do hamowania wzrostu bakterii chorobotwórczych istotnych w higienie żywności pochodzenia zwierzęcego. Praca doktorska. SGGW, Warszawa.
- Czapska A., Bałasińska B., Szczawiński J., 2006. Działanie przeciwbakteryjne i przeciwtleniające ekstraktów przypraw żywnościowych. Med. Wet. 62, (3), 302–305.
- Czapska A., Szczawiński J., 2006. Próby łącznego stosowania opakowań aktywnych i związków bakteryjnych izolowanych z roślin w konserwacji żywności. Higiena 1(21), 17–18.
- Czarkowski M. P., Cielebak E., Dacka P., Barbara Kondej B., 2007. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2006 roku. Biuletyn PZH (www.pzh.gov.pl).
- Delaquis P.J., Ward S.M., Holley R.A., Cliff M.C., Mazza G., 1999. Microbiological, chemical and sensory properties of pre-cooked roast beef preserved with horseradish essential oil. Journal of Food Science. 64, 3, 519–524.
- Kalemba D., 1999. Przeciwbakteryjne i przeciwwgrzybicze właściwości olejków eterycznych. Postępy Mikrobiologii 38(2), 185–203.
- PN-EN ISO 6887-1:2000. Mikrobiologia żywności i pasz – Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych – Ogólne zasady przygotowania zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych.
- PN-ISO 7218:1998/A1:2004. Mikrobiologia żywności i pasz – Ogólne zasady badań mikrobiologicznych.
- Szczawiński J., Czapska A., Pęcunek J., 2006. Porównanie metod oznaczania właściwości przeciwbakteryjnych ekstraktów czosnku. Higiena 4 (24), 37–38.

Ward S.M., Delaquis P.J., Holley R.A., Mazza G., 1998. Inhibition of pathogenic and spoilage bacteria on agar and pre-cooked roast beef by volatile horseradish distillates. *Food Research International*. 31, 19–20.

ANTIBACTERIAL EFFICACY OF HEXANIC AND AQUEOUS HORSERADISH EXTRACTS

Abstract. The aims of this study were: to compare antibacterial effects of commercially available horseradish extracts obtained by use of different extraction solvents (hexan, and water) on *S. Enteritidis* in nutrient broth, to select the extract having stronger antibacterial properties and to check its effect on *S. Enteritidis* in a model meat product. It was found that hexanic extract showed very weak inhibitory properties against salmonellae in broth. In contrast aqueous extract of horseradish exerted strong inhibitory action against *S. Enteritidis*. Growth of *S. Enteritidis* was strongly inhibited in samples of model meat product containing 0,2% and 0,5% aqueous horseradish extract and stored at 15°C. The inhibitory effect was much less visible in the samples of meat product incubated at 20°C.

Key words: antibacterial properties, horseradish extract, *Salmonella*

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 25.09.2008

Do cytowania – For citation: Szczawińska M.E., Czapska A., Szczawiński J., Jackowska-Tracz A., 2008. Właściwości przeciwbakteryjne heksanowego i wodnego ekstraktu chrzanu w stosunku do pałeczek *Salmonella*. *Acta. Sci. Pol. Med. Vet.* 7(3), 65–73.

(Komunikat)

WPŁYW RÓŻNYCH SYSTEMÓW CHŁODZENIA NA ZANIECZYSZCZENIE BAKTERYJNE TUSZEK KURCZĄT RZEŹNYCH W CZASIE PRZECHOWYWANIA W CHŁODNI

Zbigniew Bełkot

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Streszczenie. Celem badań było określenie wpływu trzech różnych systemów chłodzenia tuszek kurcząt rzeźnych na zmienność zanieczyszczenia bakteryjnego mięsa kurcząt w czasie przechowywania w chłodni.

Badania przeprowadzono na 90 kurczętach brojlerach w wieku 6–8 tyg., po 30 z każdego z trzech zakładów stosujących metody chłodzenia: owiewową, immersyjną i wodno-powietrzną. Tuszki przechowywano w temperaturze od 0 do 4°C przez siedem dni od uboju i badano bezpośrednio po chłodzeniu oraz w 3 i 6 dniu przechowywania. Jako początek okresu przechowywania (dzień 0) przyjęto 24 godziny od uboju. Oznaczenia wybranych parametrów przeprowadzono w dniu rozpoczęcia przechowywania (czas 0) oraz w 3 i 6 dniu jego trwania.

Na badanym materiale oznaczono następujące parametry: ogólną liczbę bakterii tlenowych, liczbę bakterii z grupy coli, psychrofilnych i proteolitycznych w 1 g mięsa. Badania przeprowadzono wg wskazań Polskich Norm.

Na podstawie wyników badań stwierdzono, że zanieczyszczenie bakteryjne tuszek po chłodzeniu wodą było istotnie wyższe w porównaniu do obu pozostałych systemów chłodzenia. Istotne różnice w ogólnej liczbie bakterii wystąpiły we wszystkich dniach przechowywania pomiędzy tuszkami chłodzonymi systemem immersyjnym a chłodzonymi systemem owiewowym i wodno-powietrznym. Najwyższe zanieczyszczenie w całym okresie przechowywania wykazywały tuszki chłodzone systemem immersyjnym. Zanieczyszczenie tuszek chłodzonych powietrzem było natomiast podobne do zanieczyszczenia tuszek z chłodzenia wodno-powietrznego w dwóch okresach przechowywania – na początku (dzień 0) i pod koniec (dzień 6). Istotne różnice pomiędzy tuszkami chłodzonymi obu wymienionymi systemami wystąpiły jedynie w 3 dniu przechowywania. Podobna zależność miała miejsce w przypadku bakterii z grupy coli. W przypadku zanieczyszczenia tuszek bakteriami tej grupy istotne różnice stwierdzono w pierwszym dniu

przechowywania tylko pomiędzy tuszkami chłodzonymi systemem immersyjnym a pozostałymi dwoma, między którymi brak było istotnych różnic. Natomiast w 3 i 6 dniu przechowywania istotne różnice w zanieczyszczeniu tuszek bakteriami grupy coli zaznaczyły się pomiędzy tuszkami chłodzonymi wszystkimi trzema systemami. Najwyższe zanieczyszczenie bakteriami z grupy coli w całym okresie przechowywania stwierdzono w tuszkach chłodzonych wodą. System chłodzenia różnicował istotnie liczbę bakterii psychrofilnych w pierwszym (dzień 0) i trzecim dniu przechowywania tuszek w chłodni. W wymienionych dniach istotne różnice wystąpiły pomiędzy tuszkami chłodzonymi wszystkimi trzema systemami. W 6 dniu przechowywania różnice te zaznaczyły się natomiast pomiędzy tuszkami chłodzonymi immersyjnie a tuszkami chłodzonymi systemami owiewowym i wodno-powietrznym. Tuszki chłodzone obu wymienionymi systemami nie różniły się między sobą istotnie pod względem liczby bakterii psychrofilnych. Najwyższe zanieczyszczenie wymienionymi bakteriami miało miejsce w przypadku tuszek chłodzonych immersyjnie. System chłodzenia różnicował również zanieczyszczenie tuszek bakteriami proteolitycznymi. Istotne różnice w zanieczyszczeniu tą grupą bakterii wystąpiły jedynie pomiędzy tuszkami chłodzonymi systemem immersyjnym a pozostałymi systemami. Prawdopodobnie ta zaznaczyła się we wszystkich okresach przechowywania. Liczba bakterii proteolitycznych była najwyższa w przypadku tuszek chłodzonych wodą, natomiast najniższa w przypadku chłodzonych powietrzem. Podsumowując, system chłodzenia różnicował w czasie przechowywania zanieczyszczenie bakteryjne tuszek i to każdą grupę badanych drobnoustrojów. Tuszki chłodzone systemem immersyjnym cechowało najwyższe zanieczyszczenie w porównaniu z tuszkami chłodzonymi systemem owiewowym i wodno-powietrznym.

Słowa kluczowe: brojlery kurze, chłodzenie, zanieczyszczenie bakteryjne, przechowywanie w chłodni

THE INFLUENCE OF VARIOUS CHILLING METHODS ON THE BACTERIAL CONTAMINATION OF CHICKEN CARCASSES DURING STORAGE IN A CHILLING ROOM

Abstract. The research objective was to assess the impact of three different systems of chilling chicken carcasses on the variability of bacterial contamination in chicken meat during storage in a chilling room.

The research was carried out on 90 chicken broilers aged 6–8 weeks, 30 chickens from each of three plants using different chilling methods: air chilling, immersion chilling and evaporative chilling. The carcasses were stored at the temperature of 0–4°C for seven days after slaughter and examined directly after chilling and on the 3rd and 6th days of storage. The beginning of storage (day 0) was assumed to be the 24 hours after slaughter. Chosen parameters were determined on the first day of storage (time 0) as well as on its 3rd and 6th days.

The following parameters of the examined material were determined: total count of aerobic bacteria, total number of coliforms, psychrotrophic and proteolytic bacteria per 1 g of meat. The research was conducted in accordance with Polskie Normy (Polish Standards) and literature.

The research demonstrated that the bacterial contamination after the immersion chilling was significantly higher than in the other two chilling systems. Significant differences in

the total count of bacteria between carcasses chilled by air, immersion and evaporative methods were observed on all days of storage. The highest contamination during the entire storage period was observed in the carcasses chilled by immersion. The contamination of air-chilled carcasses was similar to that of carcasses chilled in the evaporative system at the beginning (day 0) and towards the end of storage (day 6). Significant differences between the carcasses chilled in these two systems were observed only on the 3rd day of storage. A similar relation was observed in the case of coliforms. Significant differences in the contamination with coliforms were noted on the 1st day of storage only between the immersion-chilled carcasses and the other two groups, which showed no significant differences between each other. However, on the 3rd and 6th days of storage there appeared significant differences in coliform contamination between carcasses chilled in all three systems. Carcasses chilled with water were found to be the most contaminated with coliforms during the entire period of storage. The number of psychrotrophic bacteria on the 1st (day 0) and 3rd days of storage significantly depended on the chilling system. On those two days significant differences were observed between the carcasses chilled in each of the systems. On the 6th day, however, those differences were noted between the carcasses chilled in the immersion system and the ones chilled in the air and evaporative systems. The carcasses chilled in the latter two systems showed no significant differences in terms of the psychrotrophic bacteria count. The highest psychrotrophic contamination occurred in the immersion-chilled carcasses. The chilling method affected also the contamination of carcasses with proteolytic bacteria. Significant differences in the contamination with these bacteria occurred only between the immersion-chilled carcasses and the other two groups in all three periods of storage. Proteolytic bacteria count was the highest in the water-chilled carcasses and the lowest in those chilled by air.

To recapitulate, during storage the contamination of the carcasses with bacteria from each group under examination varied depending on the chilling method applied. The carcasses chilled in the immersion system were more contaminated than those chilled in the air and evaporative systems.

Key words: chicken broiler, chilling, bacterial contamination, cold storage

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 25.09.2008

Do cytowania – For citation: Bełkot Z., 2008. Wpływ różnych systemów chłodzenia na zanieczyszczenie bakteryjne tuszek kurcząt rzeźnych w czasie przechowywania w chłodni. *Acta Sci. Pol. Med. Vet.* 7(3), 75–77.

(Komunikat)

WPŁYW RÓŻNYCH SYSTEMÓW CHŁODZENIA NA CECHY JAKOŚCIOWE TUSZEK KURCZĄT RZEŹNYCH W CZASIE PRZECHOWYWANIA W CHŁODNI

Zbigniew Bełkot

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Streszczenie. Celem badań było określenie wpływu trzech różnych systemów chłodzenia tuszek kurcząt rzeźnych na cechy jakościowe mięsa kurcząt w czasie przechowywania w chłodni.

Badania przeprowadzono na 90 kurczętach brojlerach w wieku 6–8 tyg., po 30 z każdego z trzech zakładów stosujących metody chłodzenia: owiewową, immersyjną i wodno-powietrzną. Oznaczenia wybranych parametrów przeprowadzono w dniu rozpoczęcia przechowywania (czas 0) oraz w 3 i 6 dniu jego trwania. Na badanym materiale oznaczono pH mięsa oraz poziom amoniaku, dokonano także oceny organoleptycznej (wygląd i zapach) tkanki mięśniowej, stosując 5-punktową skalę ocen. Oznaczenie cech jakościowych przeprowadzono wg wskazań Polskich Norm.

Wartość pH mięsa pochodzącego z tuszek chłodzonych systemem owiewowym i immersyjnym była istotnie wyższa niż tuszek chłodzonych systemem wodno-powietrznym. W początkowym okresie przechowywania tuszek (dzień 0) nie stwierdzono istotnego wpływu systemu chłodzenia na pH mięsa kurcząt. Wpływ ten zaznaczył się natomiast w 3 i 6 dniu przechowywania tuszek.

Mięso pochodzące z tuszek chłodzonych powietrzem zawierało najmniej amoniaku, a chłodzonych systemem wodno-powietrznym – najwięcej. W pierwszych dniach przechowywania, tj. w dniu 0 i 3, nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie amoniaku w mięsie kurcząt w zależności od systemu chłodzenia. Wpływ systemu chłodzenia na poziom tego parametru zaznaczył się dopiero w 6 dniu przechowywania. Istotne różnice wystąpiły pomiędzy tuszkami chłodzonymi wszystkimi badanymi systemami.

W pierwszym dniu przechowywania (czas 0) nie stwierdzono istotnych różnic w wyglądzie tuszek w zależności od systemu chłodzenia. Istotne zmiany tej cechy nastąpiły w 3 dniu przechowywania. Wygląd tuszek chłodzonych systemem owiewowym i wodno-powietrznym oceniono istotnie niżej w porównaniu do chłodzenia systemem immersyj-

nym. Taki układ różnic utrzymał się do końca okresu przechowywania tuszek w chłodni. W pierwszych dniach przechowywania, tj. w dniu 0 i 3, tuszki chłodzone trzema badanymi systemami nie różniły się pomiędzy sobą pod względem zapachu. Wpływ systemu chłodzenia na zmienność tej cechy stwierdzono dopiero w 6 dniu przechowywania.

Przy chłodzeniu systemem owiewowym i wodno-powietrznym nie utrzymano tak pożądanego zapachu tuszek jak w przypadku chłodzonych immersyjnie. Niekorzystne zmiany wyglądu i zapachu tuszek chłodzonych wszystkimi systemami rozpoczynały się już po 3 dniach przechowywania, a nasilały się w 6 dniu przechowywania, otrzymując ocenę poniżej 2 w skali 5-punktowej.

Podsumowując, system chłodzenia nie wpływał na wartość pH mięsa w czasie przechowywania, różnicował natomiast zawartość amoniaku, choć dopiero w 6 dniu przechowywania tuszek. Była ona szczególnie wysoka w tuszkach chłodzonych systemem immersyjnym i wodno-powietrznym. Sposób chłodzenia wpływał istotnie na cechy sensoryczne tuszek podczas przechowywania. Niekorzystne zmiany wyglądu i zapachu tuszek chłodzonych wszystkimi systemami rozpoczynały się po 3 dniach przechowywania, ale w 6 dniu były najsilniej zaznaczone w tuszkach chłodzonych systemem owiewowym i wodno-powietrznym. Obie te cechy w przypadku tuszek chłodzonych systemem immersyjnym ocenione zostały wyżej niż dla tuszek chłodzonych pozostałymi systemami, mimo że ocena ta była także negatywna.

Słowa kluczowe: brojlery kurze, chłodzenie, cechy jakościowe mięsa, przechowywanie w chłodni

THE INFLUENCE OF VARIOUS CHILLING METHODS ON THE QUALITY CHARACTERISTICS OF CHICKEN CARCASSES DURING STORAGE IN A CHILLING ROOM

Abstract. The research objective was to assess the impact of three different systems of chilling chicken carcasses on their quality characteristics during storage in a chilling room.

The research was carried out on 90 chicken broilers aged 6–8 weeks, 30 chickens from each of three plants using different chilling methods: air chilling, immersion chilling and evaporative chilling. Chosen parameters were determined on the first day of storage (time 0) as well as on its 3rd and 6th days. The parameters included the pH value of meat and the ammonia content; also a sensory evaluation of the muscle tissue (appearance and odour) was performed according to a 5-point scale. The quality characteristics were evaluated in accordance with Polskie Normy (Polish Standards).

The pH value of meat was significantly higher in the carcasses chilled by means of the air and immersion systems than in those chilled in the evaporative system. The chilling system had no significant impact on the pH value of chicken meat at the beginning of storage (day 0). However, the impact became apparent on the 3rd and 6th days of storage.

The ammonia content was the lowest in the air-chilled carcasses and the highest in those chilled in the evaporative system. During the first days of storage, i.e. days 0 and 3, no significant differences in the ammonia content of meat chilled in different systems were noted. The influence of the chilling system on the value of that parameter was observed only on the 6th day of storage. Significant differences occurred between carcasses chilled in all systems examined.

On the first day of storage (time 0) no significant differences in the appearance of carcasses chilled by different methods were observed. Significant changes in appearance occurred on the 3rd day of storage. The appearance of carcasses chilled in the air and evaporative systems was evaluated significantly lower than in the case of the immersion system. Such differences persisted until the end of cold storage. During the first days of storage, i.e. days 0 and 3, the carcasses chilled in all three systems under examination did not differ in terms of odour. The impact of the chilling system on that characteristic was observed only on the 6th day of storage.

In the air and evaporative systems the odour of carcasses was evaluated significantly lower than in the immersion system. Adverse changes in the appearance and odour of carcasses chilled by all three methods began after only 3 days of storage and became more pronounced on the sixth day, when these two characteristics were rated less than 2 on a 5-point scale.

To recapitulate, the chilling system did not affect the pH value of meat during storage. It did affect the ammonia content, but only on the 6th day of storage; it was particularly high in the carcasses chilled in the immersion and evaporative systems. The chilling system had a significant impact on the sensory characteristics of carcasses during storage. Adverse changes in the appearance and odour of carcasses chilled by all three methods began after 3 days of storage, but on the 6th day they were the most noticeable in the carcasses chilled by the air and evaporative methods. In terms of both these characteristics carcasses chilled in the immersion system were rated higher than those chilled by the other two methods, though the evaluation was negative in all three cases.

Key words: chicken broiler, chilling, quality characteristics of meat, cold storage

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 25.09.2008

Do cytowania – For citation: Bełkot Z., 2008. Wpływ różnych systemów chłodzenia na cechy jakościowe tuszek kurcząt rzeźnych w czasie przechowywania w chłodni. *Acta Sci. Pol. Med. Vet.* 7(3), 79–81.

(Komunikat)

WPŁYW DODATKU ŚRODKA KONSERWUJĄCEGO NA LICZBĘ KOMÓREK SOMATYCZNYCH W CZASIE PRZECHOWYWANIA MLEKA

Waldemar Paszkiewicz

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Streszczenie. Komórki somatyczne są jednym ze wskaźników higienicznych mleka. Według aktualnie obowiązujących przepisów ich poziom w mleku zbiorczym nie powinien przekraczać 400 000 w 1 ml. W przeciwnym razie należy zastanowić się nad stanem zdrowia stada, szczególnie w aspekcie tzw. podklinicznych stanów zapalnych wymienia. Polskie Normy zalecają oznaczanie liczby komórek somatycznych w mleku metodą fluoro-opto-elektroniczną. W metodyce tego postępowania dopuszcza się konserwowanie próbek mleka i ich badanie w okresie do 36 godz., licząc od momentu pobrania. Celem badań było określenie wpływu dodatku środka konserwującego na liczbę komórek somatycznych w mleku podczas jego przechowywania.

Materiałem do badań było mleko surowe z gospodarstwa, w którym utrzymywano 8 krów mlecznych rasy HF, w wieku od 2 do 8 lat. Próbę do badań o objętości 2 l stanowiło mleko pozyskiwane w trakcie udoju od 4 krów (po 0,5 l od jednego osobnika) znajdujących się w I lub II fazie laktacji. Próbę mleka dzielono na 2 równe części, z których jedną konserwowano bronopolem (2-bromo-2nitropropan-1,3 diol; Milk-stoper) w optymalnej wg PN dawce 0,002 g/100 ml. Druga połowa stanowiła kontrolę. Mleko wprowadzano do badania w 2, 6, 10, 25, 30 i 36 godz., licząc od momentu udoju. Próbkę przechowywano w temperaturze 0–4°C. Ogółem przebadano 50 próbek mleka.

Liczbę komórek somatycznych oznaczano metodą fluoro-opto-elektroniczną za pomocą urządzenia Fossomatic 5000 firmy Foss Electric wg zaleceń PN-EN ISO 13366-3:2002 i PN-EN ISO 13366-2:2007.

Liczba komórek somatycznych w badanym mleku wahała się od 398 i 432 tys. w 1 ml (próbka kontrolna i z konserwantem w 2 godz. od udoju) do 395 i 434 tys. w 1 ml (próbka kontrolna i z konserwantem w 36 godz. od udoju). Analiza otrzymanych wyników badań wskazuje na różnice w liczbie komórek somatycznych między próbką kontrolną a konserwowaną.

Słowa kluczowe: komórki somatyczne, przechowalność mleka

Adres do korespondencji – Corresponding adres: Waldemar Paszkiewicz, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Katedra Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin, e-mail: waldemar.paszkiewicz@up.lublin.pl

THE INFLUENCE OF THE PRESERVATIVE ON THE SOMATIC CELL COUNT DURING MILK STORAGE

Abstract. The somatic cell count is one of the hygienic parameters of milk. According to current regulations it should not exceed the level of 400,000 per 1 ml of bulk tank milk. A higher level of this parameter puts in question the health status of the herd, especially as regards the so-called subclinical mastitis of the udder. According to Polskie Normy (PN, Polish Standards), the somatic cell count in milk should be established by the fluoro-opto-electronic method. The methodology of this procedure allows for preserving milk samples and examining them within 36 h after collecting.

The research objective was to determine the effect of the preservative on the somatic cell count during milk storage.

The research material consisted of raw milk from a farm with 8 Holstein-Friesian milk cows, aged 2–8 years. The sample was 2 l of milk obtained during milking 4 cows (0.5 l from each) in their 1st or 2nd lactations. The sample was divided into two equal parts, one of which was preserved with Bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1,3 diol; Milk-stoper) at the optimal dose of 0.002g/100ml (according to PN). The other half was used as a control. Throughout that period samples were stored at the temperature of 0–4°C. In total 50 milk samples were examined.

The somatic cell count was determined by the fluoro-opto-electronic method with Fosso-matic 5000, Foss Electric, in accordance with Polish standards PN-EN ISO 13366-3:2002 i PN-EN ISO 13366-2:2007

The somatic cell count in the milk ranged from 398,000 and 432,000/ml (the control and preserved samples 2 h after milking) to 395,000 and 434,000/ml (the control and preserved samples 36 h after milking). The analysis of the results suggests that the control and preserved samples differ in terms of the somatic cell count.

Key words: somatic cell, rave milk, samples conservation

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 25.09.2008

Do cytowania – For citation: Paszkiewicz W., 2008. Wpływ dodatku środka konserwującego na liczbę komórek somatycznych w czasie przechowywania mleka. *Acta Sci. Pol. Med. Vet.* 7(3), 83–84.

SPIS TREŚCI CONTENTS

Josef Leibetseder

- Importance of feed hygiene to animal
and human health 3
Znaczenie higieny paszy dla zdrowia zwierząt i ludzi

Josef Leibetseder

- Dioxin in the food chain 11
Dioksyny w łańcuchu żywnościowym

Agnieszka Jackowska-Tracz, Michał Tracz

- Wysokie ciśnienia hydrostatyczne
jako metoda inaktywacji *Campylobacter jejuni*
w żywności pochodzenia zwierzęcego 15
High pressure treatment as a method
of *Campylobacter jejuni* inactivation in food of animal-origin

Michał Tracz, Agnieszka Jackowska-Tracz

- Znaczenie regulacji prawnych
w zapewnieniu bezpieczeństwa genetycznie zmodyfikowanych
organizmów do użytku paszowego 25
Importance of legal measures in safety assurance
of gmo for feed use

Lech Rak

- Regulacje prawne w zakresie bezpieczeństwa żywności
dla małych zakładów ubojowych i przetwórczych 35
Law regulation of food safety for small abattoirs
and meat processors

Renata Karpíšková, T. Gelbíčová, Zora Šťástková

- Typing of *Listeria monocytogenes*
from ready-to-eat foods and humans 43
Wykrywanie *Listeria monocytogenes*
w produktach RTE (ready-to-eat) i u ludzi

Jerzy Molenda, Jarosław Bystron, Jacek Bania

- Zarazki zoonotyczne – potencjalne zagrożenie
bezpieczeństwa żywności 49
Zoonotic pathogens and their possible impact on food safety

Zora Šťástková, Lubica Mišurová, Renata Karpíšková

- Occurrence of MRSA in live-stock farms 59
Występowanie gronkowców MRSA w fermach zwierząt

**Małgorzata Ewa Szczawińska, Agnieszka Czapska, Jacek Szczawiński,
Agnieszka Jackowska-Tracz**

Właściwości przeciwbakteryjne heksanowego
i wodnego ekstraktu chrzanu w stosunku do pałeczek *Salmonella* 65
Antibacterial efficacy of hexanic
and aqueous horseradish extracts

Zbigniew Belkot

Wpływ różnych systemów chłodzenia
na zanieczyszczenie bakteryjne tuszek kurcząt rzeźnych
w czasie przechowywania w chłodni (komunikat) 75
The influence of various chilling methods
on the bacterial contamination of chicken carcasses during storage
in a chilling room

Zbigniew Belkot

Wpływ różnych systemów chłodzenia
na cechy jakościowe tuszek kurcząt rzeźnych
w czasie przechowywania w chłodni (komunikat) 79
The influence of various chilling methods
on the quality characteristics of chicken carcasses during storage
in a chilling room

Waldemar Paszkiewicz

Wpływ dodatku środka konserwującego
na liczbę komórek somatycznych
w czasie przechowywania mleka (komunikat) 83
The influence of the preservative
on the somatic cell count during milk storage