



**UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
Departman za veterinarsku medicinu**

Mr sci. vet. med. Dragan Antić

**ANTIMIKROBNI TRETMAN KOŽE GOVEDA U CILJU
UNAPREĐENJA MIKROBIOLOŠKE BEZBEDNOSTI
GOVEĐEG MESA**

Doktorska disertacija

Novi Sad, 2011.

KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Dr Sava Bunčić, redovni profesor, mentor,
za užu naučnu oblast bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad
Departman za veterinarsku medicinu

Dr Stanko Boboš, redovni profesor, predsednik,
za užu naučnu oblast bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad
Departman za veterinarsku medicinu

Dr Vlado Teodorović, redovni profesor, član,
za užu naučnu oblast Higijena mesa
Fakultet veterinarske medicine, Beograd
Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica

UNIVERZITET U NOVOM SADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija

VR

Ime i prezime autora: Mr Dragan Antić

AU

Mentor: Dr Sava Bunčić, redovni profesor

MN

Naslov rada: Antimikrobni tretman kože goveda u cilju unapređenja mikrobiološke bezbednosti goveđeg mesa

NR

Jezik publikacije: Srpski

JP

Jezik izvoda: Srpski / Engleski

JI

Zemlja publikovanja: Srbija

ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina

UGP

Godina: 2011.

GO

Izdavač: Autorski reprint

IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8

MA

Fizički opis rada: 8 poglavlja / 178 strana / 172 reference / 21 tabela /

FO 8 grafikona / 25 slika

Naučna oblast: Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda

NO

Naučna disciplina: Higijena mesa

ND

Ključne reči: koža goveda; mikroflora kože; šelak; mikrobna

imobilizacija; dekontaminacija kože; kontaminacija trupova goveda; *Escherichia coli* O157; higijena mesa

UDK: 636.09:637.5'62 (043.3)

Čuva se (ČU): Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta, Novi Sad

Važna napomena (VN): Nema

Izvod (IZ):

U radu je испитан и развијен нови приступ треману коже говеда природном смолом шелак, која је дозвољена за коришћење у храни, у циљу редукције унакрсне микробиолошке контаминације са коже на говеде месо. Механизам овог тремана је базиран на имобилизацији микроорганизама на длачи тремирале коже и превенцији њиховог физичког преноса са длаке на месо трупова током процеса обраде закланих говеда.

У *in vitro* условима, треман узорака визуелно чисте и суве коже 23% раствором шелака у етанолу је редуковао пренос са коже на сунђере којима је кожа узоркована бриставима: укупне микрофлоре (TVC) за 6,6 лог (>1000 пута више у односу на 2,9 лог редукције код тремана само етанолом), генеричке *Escherichia coli* за најмање 2,9 и *Enterobacteriaceae* за најмање 4,8 лог. Ове редукције све три групе микроорганизама су биле значајно више у односу на редукције постигнуте треманом коже комбинацијом испирања санитажером и вакумирања. Значајно више редукције преноса TVC са коже на сунђерске бризе су постигнуте коришћењем виших концентрација шелака (23% и 30%) у односу на ниže (4,8-16,7%) и у случајевима када је температура раствора шелака била 20, 30 или 40°C у односу на 50°C и 60°C. Такође, треман коже шелаком је значајно (3,7 пута) редуковао преваленцу *E. coli* O157 на природно контаминираној, неинокулисаној кожи, као и број *E. coli* O157 на вештачки инокулисаним кожама (редукција од 2,1 лог), у односу на одговарајуће нетретиране контроле.

У условима лабораторијског модела директног контакта кожи и меса, треман коже (различитих категорија чистоće) 23% раствором шелака је значајно смањио пренос микроорганизама са тремирале коже на стерилен говеде месо: до 3,6 лог cfu/cm² редукције укупног броја бактерија (TVC), до 2,5 лог cfu/cm² *Enterobacteriaceae* (EC) и до 1,7 лог cfu/cm² генеричке *E. coli* (GEC). Редукција преноса TVC је била значајно виша, а редукције EC и GEC сличне, у односу на редукције након тремирања коже комбинацијом испирања-вакумирања санитажером.

У условима мале комерцијалне кланице са незадовољавајућом процесном праксом (кланje прљавих говеда и неадекватна хигијена процеса кланja и обраде), треман кожа закланих говеда 23% раствором шелака је резултирало значајном микробном редукцијом на месу трупова говеда након скidanja коже: 1,7 лог cfu/cm² TVC, 1,4 лог cfu/cm² EC и 1,3 лог cfu/cm² GEC. Редукција TVC на месу трупова је била значајно виша, а редукције EC и GEC сличне, у односу на редукције након тремирања коже испирањем-вакумирањем санитажером.

Ова истраживања су по први пут пружила naučne dokaze da se treman kože goveda u cilju imobilizacije mikroflore na daci može uspešno koristiti u cilju smanjenja kontaminacije mesa trupova tokom procesa skidanja kože, unapređenja finalnog mikrobiološkog statusa mesa i bezbednosti goveđeg mesa uopšte. Da bi se ostvario puni potencijal ovog novog tremana u praksi, neophodna su dalja istraživanja u cilju njegove tehničke optimizacije u условима industrije mesa.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća:

DP 24. 04. 2009. godine

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije: dr Sava Bunčić, redovni profesor, (mentor)

KO Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Naučna oblast: Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda

dr Stanko Boboš, redovni profesor, (predsednik)

Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Naučna oblast: Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda

dr Vlado Teodorović, redovni profesor, (član)

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Naučna oblast: Higijena mesa

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type: Monograph documentation

DT

Type of record: Textual printed material

TR

Contents code: Doctoral dissertation

CC

Author: Dragan Antić, MSc

AU

Mentor: Sava Bunčić, PhD, full professor

MN

Title: Antimicrobial treatment of cattle hides to improve microbial safety of beef meat

TI

Language of text: Serbian

LT

Language of abstract: Serbian / English

LA

Country of publication: Serbia

CP

Locality of publication: Vojvodina

LP

Publication year: 2011.

PY

Publisher: Author's reprint

PU

Publication place: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8

PP

Physical description: 8 chapters / 178 pages / 172 references / 21 tables / 8 graphs / 25 images

PD

Scientific field: Animal diseases and hygiene of animal production

SF

Scientific discipline: Meat hygiene

SD

Keywords: cattle hides; hide microflora; Shellac; microbial immobilisation; hide decontamination; beef carcass contamination; *Escherichia coli* O157; meat hygiene

KW

UDC:

636.09:637.5'62 (043.3)

Holding data (HD):

Library, Faculty of Agriculture, Novi Sad

Note (N):

Abstract (AB):

In this research, a new approach to cattle hide treatments, based on using a natural, food-grade resin, Shellac, to reduce microbial cross-contamination from the hides onto carcass meat, was developed and evaluated. The basis of this treatment is immobilisation of microorganisms on cattle hide's hair and subsequent reduction of their transmissibility from the hair onto carcass meat during dressing of slaughtered cattle.

Under *in vitro* conditions, treatment of samples of visually clean and dry hides with 23% Shellac-in-ethanol solution reduced sponge-swabbing recoveries of general microflora (TVC) by a factor of 6.6 logs (>1000-fold greater than the 2.9 log reduction observed by ethanol alone), and of generic *E. coli* (GEC) and *Enterobacteriaceae* (EC) by factors of at least 2.9 and 4.8 logs, respectively. The reductions of these three groups of microorganisms were superior to those achieved by a sanitizer rinse-vacuum hide treatment. Significantly greater reductions of TVC recoveries from hides were achieved when using higher Shellac concentrations (23.0% and 30.0% rather than 4.8-16.7%) and when Shellac solution temperatures were 20-40°C rather than 50-60°C. Furthermore, the Shellac-based treatment also markedly reduced the *E. coli* O157 prevalence (3.7-fold reduction) on natural, uninoculated hides, as well as the counts of *E. coli* O157 on artificially inoculated hides (2.1 log reduction) when compared to corresponding untreated controls.

Under the conditions of a hide-to-meat direct contact laboratory-based model, treatment of hides (of varying visual cleanliness) with the 23% Shellac solution produced significant reductions of microbial transfer from treated hide onto sterile beef: up to $3.6 \log_{10}$ CFU/cm² of TVC, up to $2.5 \log_{10}$ CFU/cm² of EC and up to $1.7 \log_{10}$ CFU/cm² of GEC. TVC reductions of microbial transfer from treated hide onto beef achieved by the Shellac hide treatment were superior to those achieved by the comparative sanitizer rinse-vacuum hide treatment, but reductions of EC and GEC did not differ between the two hide treatments.

In a small commercial abattoir with unsatisfactory process practices (slaughtering dirty cattle, inadequate process hygiene), treatment of hides with Shellac produced significant microbial reductions on skinned beef carcasses: $1.7 \log_{10}$ CFU/cm², $1.4 \log_{10}$ CFU/cm² and $1.3 \log_{10}$ CFU/cm² of TVC, EC and GEC, respectively. TVC reductions on skinned beef carcasses achieved by the Shellac hide treatment were superior to those achieved by the comparative sanitizer rinse-vacuum hide treatment, but reductions of EC and GEC did not differ significantly between the two hide treatments.

These investigations produced the first scientific evidence that treatment of cattle hides with aim of immobilising microflora on the hair can be very successfully used to reduce carcass meat contamination during the skinning operation, thus improving the microbiological status of the final beef carcasses as well as the beef safety in general. To achieve the full potential of this new treatment in practice, further research aimed at its further technical optimization under real-life meat industry conditions is necessary.

Accepted by the Scientific Board on:

AS 24. 04. 2009.

Defended:

(DE)

Thesis Defense dr Sava Bunčić, Full Professor, (Mentor)

Board: (DB) Faculty of Agriculture, University of Novi Sad

Scientific discipline: Animal diseases and hygiene of animal production

dr Stanko Boboš, Full Professor, (President)

Faculty of Agriculture, University of Novi Sad

Scientific discipline: Animal diseases and hygiene of animal production

dr Vlado Teodorović, Full Professor, (Member)

Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade

Scientific discipline: Meat hygiene

**ANTIMIKROBNI TRETMAN KOŽE GOVEDA U CILJU UNAPREĐENJA
MIKROBIOLOŠKE BEZBEDNOSTI GOVEĐEG MESA**

Kratak sadržaj

U radu je ispitana i razvijena nova metoda tretmana kože goveda prirodnim smolom šelakom, koja je dozvoljena za korišćenje u hrani, u cilju redukcije unakrsne mikrobiološke kontaminacije sa kože na goveđem mesu. Mehanizam ovog tretmana je baziran na imobilizaciji mikroorganizama na dlaci tretirane kože i prevenciji njihovog fizičkog prenosa sa dlake na meso trupova tokom procesa obrade zaklanih goveda.

U *in vitro* uslovima, tretman uzoraka vizuelno čiste i suve kože 23% rastvorom šelaka u etanolu je redukovao prenos sa kože na sundere kojima je koža uzorkovana brisevima: ukupne mikroflore (TVC) za 6,6 log (>1000 puta više u odnosu na 2,9 log redukcije kod tretmana samo etanolom), generičke *Escherichia coli* za najmanje 2,9 i *Enterobacteriaceae* za najmanje 4,8 log. Ove redukcije sve tri grupe mikroorganizama su bile značajno više u odnosu na redukcije postignute tretmanom kože kombinacijom ispiranja sanitajzerom i vakumiranja. Značajno više redukcije prenosa TVC sa kože na sunderske briseve su postignute korišćenjem viših koncentracija šelaka (23% i 30%) u odnosu na niže (4,8-16,7%) i u slučajevima kada je temperatura rastvora šelaka bila 20, 30 ili 40°C u odnosu na 50°C i 60°C. Takođe, tretman kože šelakom je značajno (3,7 puta) redukovao prevalencu *E. coli* O157 na prirodno kontaminiranoj, neinokulisanoj koži, kao i broj *E. coli* O157 na veštački inokulisanim kožama (redukcija od 2,1 log), u odnosu na odgovarajuće netretirane kontrole.

U uslovima laboratorijskog modela direktnog kontakta kože i mesa, tretman kože (različitih kategorija čistoće) 23% rastvorom šelaka je značajno smanjio prenos mikroorganizama sa tretirane kože na sterilno goveđe meso: do 3,6 log cfu/cm² redukcije ukupnog broja bakterija (TVC), do 2,5 log cfu/cm² *Enterobacteriaceae* (EC) i do 1,7 log cfu/cm² generičke *E. coli* (GEC). Redukcija prenosa TVC je bila značajno viša, a redukcije EC i GEC slične, u odnosu na redukcije nakon tretiranja kože kombinacijom ispiranja-vakumiranja sanitajzerom.

U uslovima male komercijalne klanice sa nezadovoljavajućom procesnom praksom (klanje prljavih goveda i neadekvatna higijena procesa klanja i obrade), tretman kože zaklanih goveda 23% rastvorom šelaka je rezultirao značajnom mikrobnom redukcijom na mesu trupova goveda nakon skidanja kože: 1,7 log cfu/cm² TVC, 1,4 log cfu/cm² EC i 1,3 log cfu/cm² GEC. Redukcija TVC na mesu trupova je bila značajno viša, a redukcije EC i GEC slične, u odnosu na redukcije nakon tretiranja kože ispiranjem-vakumiranjem sanitajzerom.

Ova istraživanja su po prvi put pružila naučne dokaze da se tretman kože goveda u cilju imobilizacije mikroflore na dlaci može uspešno koristiti u cilju smanjenja kontaminacije mesa trupova tokom procesa skidanja kože, unapređenja finalnog mikrobiološkog statusa mesa i bezbednosti goveđeg mesa uopšte. Da bi se ostvario puni potencijal ovog novog tretmana u praksi, neophodna su dalja istraživanja u cilju njegove tehničke optimizacije u uslovima industrije mesa.

Ključne reči: koža goveda; mikroflora kože; šelak; mikrobna imobilizacija; dekontaminacija kože; kontaminacija trupova goveda; *Escherichia coli* O157; higijena mesa.

Doktorska disertacija je odložena u biblioteci Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Disertacija sadrži: 178 strana, 21 tabele, 8 grafikona, 25 slika, original na srpskom jeziku i kratak sadržaj na engleskom jeziku.

ANTIMICROBIAL TREATMENT OF CATTLE HIDES TO IMPROVE MICROBIAL SAFETY OF BEEF MEAT

Abstract

In this research, a new approach to cattle hide treatments, based on using a natural, food-grade resin, Shellac, to reduce microbial cross-contamination from the hides onto carcass meat, was developed and evaluated. The basis of this treatment is immobilisation of microorganisms on cattle hide's hair and subsequent reduction of their transmissibility from the hair onto carcass meat during dressing of slaughtered cattle.

Under *in vitro* conditions, treatment of samples of visually clean and dry hides with 23% Shellac-in-ethanol solution reduced sponge-swabbing recoveries of general microflora (TVC) by a factor of 6.6 logs (>1000-fold greater than the 2.9 log reduction observed by ethanol alone), and of generic *E. coli* (GEC) and *Enterobacteriaceae* (EC) by factors of at least 2.9 and 4.8 logs, respectively. The reductions of these three groups of microorganisms were superior to those achieved by a sanitizer rinse-vacuum hide treatment. Significantly greater reductions of TVC recoveries from hides were achieved when using higher Shellac concentrations (23.0% and 30.0% rather than 4.8-16.7%) and when Shellac solution temperatures were 20-40°C rather than 50-60°C. Furthermore, the Shellac-based treatment also markedly reduced the *E. coli* O157 prevalence (3.7-fold reduction) on natural, uninoculated hides, as well as the counts of *E. coli* O157 on artificially inoculated hides (2.1 log reduction) when compared to corresponding untreated controls.

Under the conditions of a hide-to-meat direct contact laboratory-based model, treatment of hides (of varying visual cleanliness) with the 23% Shellac solution produced significant reductions of microbial transfer from treated hide onto sterile beef: up to $3.6 \log_{10}$ CFU/cm² of TVC, up to $2.5 \log_{10}$ CFU/cm² of EC and up to $1.7 \log_{10}$ CFU/cm² of GEC. TVC reductions of microbial transfer from treated hide onto beef achieved by the Shellac hide treatment were superior to those achieved by the comparative sanitizer rinse-vacuum hide treatment, but reductions of EC and GEC did not differ between the two hide treatments.

In a small commercial abattoir with unsatisfactory process practices (slaughtering dirty cattle, inadequate process hygiene), treatment of hides with Shellac produced significant microbial reductions on skinned beef carcasses: $1.7 \log_{10}$ CFU/cm², $1.4 \log_{10}$ CFU/cm² and $1.3 \log_{10}$ CFU/cm² of TVC, EC and GEC, respectively. TVC reductions on skinned beef carcasses achieved by the Shellac hide treatment were superior to those achieved by the comparative sanitizer rinse-vacuum hide treatment, but reductions of EC and GEC did not differ significantly between the two hide treatments.

These investigations produced the first scientific evidence that treatment of cattle hides with aim of immobilising microflora on the hair can be very successfully used to reduce carcass meat contamination during the skinning operation, thus improving the microbiological status of the final beef carcasses as well as the beef safety in general. To achieve the full potential of this new treatment in practice, further research aimed at its further technical optimization under real-life meat industry conditions is necessary.

Keywords: cattle hides; hide microflora; Shellac; microbial immobilisation; hide decontamination; beef carcass contamination; *Escherichia coli* O157; meat hygiene.

Zahvalnost

Želeo bih na ovom mestu da izrazim najveću zahvalnost svom mentoru i učitelju prof. dr Savi Bunčiću, za njegovu podršku, poverenje, entuzijazam, prijateljstvo i neprocenjive profesionalne i životne savete.

Ovo istraživanje je bilo deo međunarodnog istraživačkog EU FP6 projekta „ProSafeBeef“ (FOOD-CT-2006-36241), pa se ovom prilikom zahvaljujem i svim kolegama istraživačima na ovom projektu od kojih sam dobio korisne savete i sugestije tokom naših sastanaka i diskusija u ove četiri godine rada na projektu.

Moja zahvalnost ide i članovima komisije za ocenu i odbranu ove doktorske disertacije, prof. dr Stanku Bobošu i prof. dr Vladi Teodoroviću, za pomoć i korisne sugestije.

Hvala mom dragom kolegi i prijatelju Bojanu Blagojeviću, za neprocenjivu pomoć u eksperimentalnom delu istraživanja, kao i za korisne savete.

Takođe bih želeo da se zahvalim i menadžmentu klanica „Neoplanta“ i „Kolbis“ iz Novog Sada, za svu pomoć u organizaciji istraživanja u njihovim objektima.

Mojoj suprudi Olji i deci Ilijи i Tijani, kao i mojoj dragoj majci, za neprocenjivu moralnu podršku, pomoć, brigu, strpljenje i razumevanje, dugujem najtopliju zahvalnost. Njima posvećujem ovu tezu...

Sadržaj

Sadržaj	X
Lista tabela	XV
Lista grafikona	XVII
Lista slika.....	XVIII
Lista skraćenica	XIX
Opšti uvod	1
Pregled literature.....	6
1. Značaj bezbednosti goveđeg mesa.....	7
1.1. Uvod	7
1.2. Alimentarni patogeni u lancu goveđeg mesa	9
1.2.1. Verocitotoksične <i>Escherichia coli</i> (VTEC).....	9
1.2.2. <i>Salmonella</i> spp.	10
1.2.3. <i>Campylobacter</i> spp.	11
1.2.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	11
1.3. Prevalenca i koncentracija alimentarnih patogena u lancu goveđeg mesa.....	12
1.3.1. „Pre-harvest“ faza	13
1.3.2. „Harvest“ faza	14
1.3.3. „Post-harvest“ faza	16
1.3.4. Distribucija alimentarnih patogena u lancu goveđeg mesa.....	17
1.4. Značaj kože goveda u bezbednosti goveđeg mesa	20
1.4.1. Sastav i distribucija mikroflore kože goveda	20
1.4.2. Faktori koji utiču na mikrobiološku kontaminaciju kože	21
1.4.3. Značaj kože u kontaminaciji mesa trupova goveda	23
1.5. Koža goveda kao sporedni proizvod u industriji mesa.....	30
1.6. Zaključni komentar	31
2. Kontrolne mere za mikrobiološke alimentarne patogene u lancu goveđeg mesa	33
2.1. Uvod	33
2.2. Kontrolne mere u „pre-harvest“ fazi	34
2.2.1. Sprečavanje recirkulacije patogena u životnoj sredini	34
2.2.2. Sprečavanje unošenja i širenja patogena na farmi	34

2.2.3. Sprečavanje ingestije patogena od strane goveda	35
2.2.4. Sprečavanje razmnožavanja patogena u digestivnom traktu goveda	35
2.2.5. Stimulisanje imunološkog odgovora goveda	36
2.3. Kontrolne mere u „harvest“ fazi	38
2.3.1. Sprečavanje/smanjenje širenja patogena tokom transporta i u depou.....	38
2.3.2. Sprečavanje/smanjenje ukupne unakrsne kontaminacije u klanici	39
2.3.3. Sprečavanje/smanjenje kontaminacije trupova na liniji klanja.....	40
2.3.4. Eliminacija ili sprečavanje razmnožavanja patogena na obrađenim trupovima	40
2.3.5. Sprečavanje/smanjenje kontaminacije kod otkoštavanja i rasecanja mesa.....	42
2.4. Kontrolne mere u „post-harvest“ fazi	43
2.4.1. Antimikrobni aspekti tehnologija prerađe mesa.....	43
2.4.2. Kontrolne mere na nivou keteringa i potrošača	43
2.5. Opšti principi upravljanja bezbednošću mesa u pogledu mikrobioloških rizika	44
2.6. Zaključni komentar	46
3. Implementacija antimikrobnih tretmana na klanici.....	48
3.1. Uvod	48
3.2. Regulatorni status antimikrobnih tretmana	49
3.2.1. Regulatorni status u EU	49
3.2.2. Regulatorni status u SAD	51
3.2.3. Regulatorni status u drugim zemljama.....	53
3.3. Antimikrobna efikasnost i bezbednost tretmana	54
3.4. Ostali aspekti implementacije antimikrobnih tretmana	57
3.4.1. Fizički antimikrobni tretmani	57
3.4.2. Hemijski antimikrobni tretmani	58
3.4.3. Kombinacije fizičkih i/ili hemijskih tretmana („koncept višestrukih prepreka“)	60
3.4.4. Biološki antimikrobni tretmani	63
3.5. Analiza koristi i troškova implementacije antimikrobnih tretmana	64
3.6. Antimikrobni tretmani i HACCP	65
3.7. Zaključni komentar	68
4. Pregled antimikrobnih tretmana kože goveda	69
4.1. Uvod	69
4.2. Čišćenje i pranje goveda pre klanja	70
4.2.1. Pranje vodom	70
4.2.2. Pranje vodom uz dodatak antimikrobnih sredstava	72
4.2.3. Šišanje	75
4.3. Pranje i dekontaminacija kože goveda nakon klanja	78
4.3.1. Hemijska depilacija	78
4.3.2. Opaljivanje kože	81
4.3.3. Tretman vodenom parom	82
4.3.4. Pranje ozoniranom i elektrolizirano-oksidirajućom (EO) vodom	83
4.3.5. Pranje i dekontaminacija hemijskim antimikrobnim sredstvima...	85

4.3.6. Komercijalni kabineti za pranje i dekontaminaciju kože na liniji klanja	90
4.3.7. Ostali antimikrobni tretmani kože goveda.....	94
4.4. Zaključni komentar	95
Ciljevi istraživanja	99
1. Ocena sadašnjeg stanja nauke i prakse u oblasti strategija antimikrobnih tretmana kože goveda.....	100
2. Radna hipoteza	102
3. Zadaci rada	102
Nalazi disertacije po zadacima	103
Poglavlje 1	104
Optimizacija antimikrobnog tretmana imobilizacije mikroflore na dlaci kože goveda	104
1. Kratak sadržaj	105
2. Uvod	106
3. Materijal i metode.....	108
3.1. Efekti koncentracije i temperature rastvora šelaka na prenos mikroflore sa tretiranih koža na briseve za uzorkovanje.....	108
3.1.1. Priprema uzoraka kože.....	108
3.1.2. Priprema rastvora šelaka	109
3.1.3. Tretman uzoraka kože rastvorom šelaka.....	109
3.1.4. Mikrobiološko uzorkovanje kože	111
3.1.5. Homogenizacija uzoraka.....	111
3.1.6. Utvrđivanje ukupnog broja bakterija (TVC), broja <i>Enterobacteriaceae</i> (EC) i generičke <i>E. coli</i> (GEC) iz uzoraka.....	113
3.2. Upoređivanje tretmana imobilizacije mikroflore na koži rastvorom šelaka sa tretmanom dekontaminacije kože.....	115
3.2.1. Priprema uzoraka kože.....	115
3.2.2. Tretman uzoraka kože rastvorom šelaka	115
3.2.3. Tretman uzoraka kože ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem	116
3.2.4. Mikrobiološko uzorkovanje kože	116
3.2.5. Utvrđivanje ukupnog broja bakterija (TVC), broja <i>Enterobacteriaceae</i> (EC) i generičke <i>E. coli</i> (GEC) iz uzoraka.....	116
3.3. Efekat tretmana kože rastvorom šelaka u redukciji prenosa <i>E. coli</i> O157 na briseve za uzorkovanje	118
3.3.1. Efekat tretmana kože rastvorom šelaka na <i>E. coli</i> O157 prirodno prisutnu na koži	118
3.3.2. Efekat tretmana kože rastvorom šelaka na veštački inokulisano <i>E. coli</i> O157	118
3.3.3. Mikrobiološko uzorkovanje kože	119
3.3.4. Utvrđivanje broja <i>E. coli</i> O157	120

3.3.5. Utvrđivanje prisustva <i>E. coli</i> O157	120
3.4. Analiza rezultata.....	122
4. Rezultati i diskusija.....	122
4.1. Efekti koncentracije i temperature rastvora šelaka na prenos mikroflore sa tretiranih koža na briseve za uzorkovanje.....	122
4.2. Upoređivanje tretmana imobilizacije mikroflore na koži rastvorom šelaka sa tretmanom dekontaminacije kože.....	124
4.3. Efekat tretmana kože rastvorom šelaka u redukciji prenosa <i>E. coli</i> O157 na briseve za uzorkovanje	126
5. Zaključni komentar	127
Poglavlje 2	128
Validacija efikasnosti antimikrobnog tretmana imobilizacije mikroflore na koži goveda u redukciji njenog prenosa na meso	128
1. Kratak sadržaj	129
2. Uvod	130
3. Materijal i metode.....	131
3.1. Ocena efekata antimikrobnog tretmana kože rastvorom šelaka u prenosu mikroflore sa kože na meso na laboratorijskom modelu	131
3.1.1. Priprema uzoraka kože.....	131
3.1.2. Tretman uzoraka kože rastvorom šelaka („tretman“) na laboratorijskom modelu	132
3.1.3. Tretman uzoraka kože ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem („komparativni tretman“) na laboratorijskom modelu	133
3.1.4. Laboratorijski model za prenos mikroflore sa kože na meso	133
3.1.5. Homogenizacija uzoraka mesa.....	134
3.1.6. Utvrđivanje ukupnog broja bakterija (TVC), broja <i>Enterobacteriaceae</i> (EC) i generičke <i>E. coli</i> (GEC) iz uzoraka mesa	134
3.2. Ocena efekata antimikrobnog tretmana kože rastvorom šelaka na mikrobiološki status trupova goveda na klanici	135
3.2.1. Odabir životinja za antimikrobnii tretman na klanici	135
3.2.2. Tretman koža goveda rastvorom šelaka („tretman“) na klanici ..	136
3.2.3. Tretman koža goveda ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem („komparativni tretman“) na klanici.....	138
3.2.4. Mikrobiološko uzorkovanje mesa trupova goveda na klanici	140
3.2.5. Mikrobiološko ispitivanje uzoraka brisa trupova u laboratoriji ...	141
3.3. Analiza rezultata.....	141
4. Rezultati i diskusija.....	142
4.1. Ocena efekata antimikrobnog tretmana kože rastvorom šelaka u prenosu mikroflore sa kože na meso na laboratorijskom modelu	142
4.2. Ocena efekata antimikrobnog tretmana kože rastvorom šelaka na mikrobiološki status trupova goveda na klanici	144
5. Zaključni komentar	148

Ukupna diskusija.....	149
1. Razvoj antimikrobnog tretmana imobilizacije mikroflore na koži goveda	150
2. Značaj rezultata.....	155
2.1. Značaj rezultata za industriju mesa.....	155
2.2. Značaj rezultata za regulatorna tela	156
2.3. Značaj rezultata za potrošače	157
3. Potreba za daljim istraživanjima.....	157
Ukupni zaključak	158
Literatura.....	162
Biografija	179

Lista tabela

Tabela 1.1. Incidenca najvažnijih alimentarnih patogena kod ljudi, na 100.000 stanovnika (prilagođeno od Buncic, 2006; i EFSA, 2010a)	8
Tabela 1.2. Učestalost glavnih alimentarnih patogena u lancu goveđeg mesa.....	18
Tabela 1.3. Mikrobiološki status trupa goveda na liniji klanja u pojedinim istraživanjima	24
Tabela 3.1. Regulatorni status antimikrobnih tretmana na klanici (prilagođeno od Midgley i Small, 2006)	54
Tabela 3.2. Formule za izračunavanje efikasnosti antimikrobnih tretmana.....	57
Tabela 3.3. Pregled mogućih kritičnih kontrolnih tačaka u HACCP planu klanja goveda (prilagođeno od Bolton <i>i sar.</i> , 2001).....	67
Tabela 4.1. Tretmani šišanja dlake i nečistoće sa kože goveda i postignuti antimikrobni efekti u redukciji bakterijske kontaminacije kože i trupova	77
Tabela 4.2. Tretmani hemijske depilacije kože goveda i postignuti antimikrobni efekti u redukciji bakterijske kontaminacije kože i trupova	81
Tabela 4.3. Tretmani kože vodenom parom, vrućom vodom, ozoniranom i EO vodom i postignuti antimikrobni efekti na koži	85
Tabela 4.4. Efekti različitih kombinacija pranja, ispiranja i vakumiranja u redukciji ukupnog broja koliforma (TCC) na koži (Bosilevac <i>i sar.</i> , 2005a).....	88
Tabela 4.5. Tretmani pranja kože goveda hemijskim sredstvima u laboratorijskim i praktičnim uslovima na klanici i postignuti antimikrobni efekti na koži.....	89
Tabela 4.6. Tretmani pranja kože goveda hemijskim sredstvima primjenjeni u komercijalnim uslovima na liniji klanja i postignuti antimikrobni efekti u redukciji bakterijske kontaminacije kože i trupova	92
Tabela 4.7. Distribucija pozitivnih uzoraka sa utvrđenim nivoima <i>E. coli</i> O157:H7 i <i>Salmonella</i> spp. metodom direktnog zasejavanja, pre i posle tretmana u kabinetu za pranje kože goveda (Arthur <i>i sar.</i> , 2007)	93
Tabela 4.8. Tretmani pranja kože goveda vodom u laboratorijskim i praktičnim uslovima na klanici i postignuti antimikrobni efekti na koži	94
Tabela 4.9. Zbirni prikaz svih ispitivanih antimikrobnih tretmana kože goveda i postignuti antimikrobni efekti u redukciji bakterijske kontaminacije kože i trupova ...	98
Tabela 5.1. Efekti koncentracije i temperature rastvora šelaka na prenos mikroflore sa tretiranih koža na briseve za uzorkovanje	124
Tabela 5.2. Upoređivanje efikasnosti tretmana kože rastvorom šelaka i tretmana dekontaminacije kože sanitajzerom u redukciji prenosa bakterija sa kože na briseve	125
Tabela 5.3. Efekat tretmana kože rastvorom šelaka u redukciji prenosa <i>E. coli</i> O157 na briseve.....	127
Tabela 6.1. Efekat antimikrobnih tretmana kože šelakom i sanitajzerom u redukciji prenosa bakterija sa kože na meso na laboratorijskom modelu.....	144

Tabela 6.2. Efekat antimikrobnih tretmana kože šelakom i sanitajzerom u redukciji nivoa bakterija na mesu trupova nakon skidanja kože u maloj komercijalnoj klanici	145
Tabela 6.3. Efekat antimikrobnih tretmana kože (različitih kategorija čistoće) šelakom i sanitajzerom u redukciji nivoa bakterija na mesu trupova nakon skidanja kože u maloj komercijalnoj klanici	146

Lista grafikona

Grafikon 1. Ukupni trendovi učestalosti alimentarnih patogena (%) u lancu goveđeg mesa (na osnovu proseka objavljenih podataka)	19
Grafikon 2. Ukupni trendovi učestalosti <i>E. coli</i> O157 (%) u lancu goveđeg mesa u Srbiji (Nastasijevic <i>i sar.</i> , 2008, 2009; Blagojevic <i>i sar.</i> , 2011)	19
Grafikon 3. Glavni principi i mere za kontrolu mikrobioloških alimentarnih patogena u „pre-harvest“ fazi (prilagođeno od Nørrung <i>i sar.</i> , 2009)	37
Grafikon 4. Glavni principi i mere za kontrolu mikrobioloških alimentarnih patogena u „harvest“ fazi (prilagođeno od Nørrung <i>i sar.</i> , 2009).....	42
Grafikon 5. Glavni principi i mere za kontrolu mikrobioloških alimentarnih patogena u „post-harvest“ fazi.....	44
Grafikon 6. Antimikrobni tretmani u upotrebi u goveđim klanicama u SAD (prilagođeno od Skandamis <i>i sar.</i> , 2010).....	62
Grafikon 7. Poređenje prosečne utvrđene efikasnosti antimikrobnih tretmana kože goveda u redukciji njene prirodne i inokulisane mikroflore	154
Grafikon 8. Poređenje efikasnosti antimikrobnih tretmana kože goveda primenjenih na klanici, u redukciji bakterijske kontaminacije trupova sa kože	154

Lista slika

Slika 1. Model sistem za pranje kože goveda ozoniranim i EO vodom.....	84
Slika 2. Kabineti za pranje i dekontaminaciju kože u klanicama kompanije Cargill Meat Solutions u SAD	91
Slika 3. Šelak, prirodna smola poreklom od insekata	110
Slika 4. Ručne prskalice korišćene za tretiranje koža rastvorom šelaka.....	110
Slika 5. Tretman koža prskanjem rastvorom šelaka u etanolu.....	110
Slika 6. Parni komadi vizuelno čiste i suve kože.....	112
Slika 7. Uzorkovanje koža metodom vlažnog brisa sunđerom.....	112
Slika 8. Aseptični celulozni sunđeri korišćeni za uzorkovanje kože	112
Slika 9. Petrifilmovi za utvrđivanje ukupnog broja bakterija (TVC).....	114
Slika 10. Petrifilmovi za utvrđivanje broja <i>Enterobacteriaceae</i> (EC)	114
Slika 11. Petrifilmovi za utvrđivanje broja generičke <i>E. coli</i> (GEC)	114
Slika 12. Usisivač za čišćenje dubinskom ekstrakcijom (Puzzi 200, Karcher), korišćen za tretiranje koža ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem	117
Slika 13. Tretman koža ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem	117
Slika 14. Parni komadi vizuelno čiste i suve kože i inokulacija <i>E. coli</i> O157	119
Slika 15. Komad kože nakon tretmana šelakom (levo) i uzorkovanje brisom (desno)	119
Slika 16. Izgled tipičnih kolonija <i>E. coli</i> O157 na CT-SMAC agaru	121
Slika 17. Prikaz pozitivne imunoaglutinacije za potvrđivanje <i>E. coli</i> O157 (DrySpot O157 latex agglutinacioni test)	121
Slika 18. Brzi imunohromatografski test za utvrđivanje prisustva <i>E. coli</i> O157 (Singlepath® <i>E. coli</i> O157)	121
Slika 19. Kože goveda različite kategorije čistoće	132
Slika 20. Goveda nakon klanja i iskrvarenja, a pre primene tretmana kože.....	136
Slika 21. Tretman koža goveda prskanjem rastvorom šelaka u etanolu, nakon omamljivanja i klanja, a pre skidanja kože na klanici.....	137
Slika 22. Kože goveda nakon tretmana šelakom na klanici	137
Slika 23. Tretman koža goveda ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem, nakon omamljivanja i klanja, a pre skidanja kože na klanici.....	139
Slika 24. Kože goveda pre (levo) i nakon tretmana ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem (desno) na klanici	139
Slika 25. Uzorkovanje površine trupa metodom vlažnog brisa sunđerom (spoljašnja strana buta-perianalna regija-unutrašnja strana buta-potrbušina-grudi)	140

Lista skraćenica

ASC	Acidifikovani natrijum hlorit (Acidified sodium chlorite)
CCP	Kritična kontrolna tačka (Critical Control Point)
cfu	Broj kolonija bakterija (colony forming unit)
CPC	Cetilpiridin hlorid (Cetylpiridinium chloride)
EFSA	Evropska agencija za bezbednost hrane (European Food Safety Authority)
EBC, EC	Ukupan broj <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Enterobacteriaceae</i> Count)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GEC	Generička <i>Escherichia coli</i>
GHP	Dobra higijenska praksa (Good Hygienic Practice)
GMP	Dobra proizvodna praksa (Good Manufacturing Practice)
HACCP	Analiza hazarda i kritične kontrolne tačke (Hazard Analysis and Critical Control Point System)
ISO	Međunarodna organizacija za standardizaciju (International Organization for Standardization)
log	Logaritam
TCC	Ukupan broj koliformnih bakterija (Total Coliform Count)
TSP	Trinatrijum fosfat (Trisodium phosphate)
TVC	Ukupan broj bakterija (Total Viable Count)
USDA/FSIS	Ministarstvo poljoprivrede i Agencija za bezbednost i inspekciju hrane SAD (United States Department of Agriculture and Food Safety and Inspection Service)
VTEC	Verocitotoksične <i>Escherichia coli</i> (Verotoxigenic <i>E. coli</i>)

Opšti uvod

Bezbednost hrane, uključujući meso, je oblast od naročitog interesa za industriju, vlade i javnost, jer je očekivanje potrošača da hrana bude higijenski ispravna i zdravstveno bezbedna. Glavni problemi bezbednosti mesa, koji utiču na zdravlje potrošača kao i velike gubitke industrije mesa zbog povlačenja proizvoda sa tržišta, tiču se mikrobioloških, a naročito bakterijskih alimentarnih patogena (Sofos, 2008). S obzirom na to da ovi patogeni u lanac mesa mogu ući na različitim, nekada i višestrukim, tačkama, njihova kontrola je neophodna duž celog lanca mesa („od farme do trpeze“) da bi se smanjio rizik od pojave alimentarnih bolesti u ljudi (Nørrung i Buncic, 2008). Glavni izvor uzročnika najvažnijih alimentarnih oboljenja su farmske životinje koje ih izlučuju fecesom. Poznato je da su goveda glavni rezervoar alimentarnog patogena *E. coli* O157, ali i jedan od rezervoara *Salmonella* spp., i *Campylobacter* spp. (Nørrung i sar., 2009). Životinje fekalni izlučivači kontaminiraju svoju kožu, okolinu u kojoj se nalaze, a time omogućuju širenje kontaminacije i na druge životinje (Small i sar., 2002).

Osnovu modernog sistema bezbednosti mesa (i druge hrane) čini proaktivni i preventativni pristup, u kome se problemi i pitanja od značaja za bezbednost mesa prepoznaju i rešavaju pre nego što se uopšte i dogode, najčešće u tačkama lanca mesa gde je najveći rizik od njihove pojave (Buncic, 2006). Mere koje se primenjuju u kontroli glavnih bakterijskih patogena poreklom od farmskih životinja (npr. *E. coli* O157 i *Salmonella* spp.) uključuju: mere na farmi sa ciljem sprečavanja izlučivanja patogena putem fecesa, optimizaciju procesne higijene kroz implementaciju HACCP sistema u klanicama i preradi mesa, pravilno rukovanje mesom tokom transporta i u prodaji, kao i pravilno rukovanje od strane potrošača (Sofos, 2005). Međutim, ove kontrolne mere nisu uvek dovoljne da potpuno spreče ulazak patogena u lanac mesa. Naročito važna i kritična tačka je klanica, u kojoj značajna mikrobiološka kontaminacija poreklom sa životinja dolazi u kontakt sa prethodno sterilnim mesom. Poznato je da govedi trupovi tokom klanja i obrade bivaju ponekad kontaminirani fekalnim materijalom, sadržajem predželudaca i creva, a redovno sa kože (Bell, 1997; Hudson i sar., 1998), što uključuje i bakterijske patogene kao što su *Salmonella* spp. i *E. coli* O157 (Elder i sar. 2000; Avery i sar., 2002; Small i sar., 2006). Čak i primenom najbolje higijenske prakse tokom klanja i obrade goveda, nemoguće je izbeći izvesnu mikrobiološku kontaminaciju trupova u komercijalnim uslovima (Sofos, 2005).

U naporima da ispune regulatorne i tržišne zahteve, kao i da meso i proizvodi od mesa budu bezbedni za potrošače, industrija mesa u nekim zemljama sve više primenjuje različite dodatne mere (tretmane) sa ciljem da redukuje kontaminaciju mesa trupova i proizvoda od mesa. Dekontaminacioni tretmani su u SAD integrисани u sisteme bezbednosti mesa, kao što je HACCP, čija je implementacija obavezna u industriji hrane ([Sofos, 2005](#)). Primena ovakvih tretmana ima za cilj ispunjavanje regulativama zadatih kriterijuma performanse i mikrobioloških kriterijuma i ukupno poboljšanje bezbednosti proizvoda, uz preduslov da su prethodno primenjene primarne, fundamentalne higijenske mere (dobra proizvodna i dobra higijenska praksa) ([Sofos i sar., 1999a](#)). Dekontaminacioni tretmani se, stoga, smatraju kao dodatak preduslovnim higijenskim merama, a ne njihova zamena, i treba da se primenjuju u okviru definisanog sistema za bezbednost mesa (HACCP) ([Smulders i Greer, 1998](#)).

Međutim, u pogledu antimikrobnih (dekontaminacionih) tretmana postoje veoma bitne razlike u pristupu između SAD i EU. Regulatorna tela u EU su doskora smatrala da striktna higijenska praksa kroz implementaciju HACCP sistema treba da bude jedini pristup osiguranju bezbednosti mesa. Razlog tome je bila zabrinutost da bi uvođenje tretmana dekontaminacije mesa - od kojih ni jedan ne može da potpuno eliminiše patogene ako su prisutni u većem broju - dovelo do pridavanja manje važnosti higijenskoj praksi od strane klanica i na kraju rezultiralo smanjivanjem bezbednosti proizvoda ([Buncic, 2006](#)). Međutim, pošto ni najbolja higijena ne može uvek da spreči prisustvo patogena na mesu, novom Evropskom regulativom (EU Regulation 853/2004) se, u principu, dozvoljava upotreba tretmana dekontaminacije u klanicama, ukoliko se za takve tretmane dobije pozitivno naučno mišljenje panela EFSA i dozvola regulatornih tela ([EC, 2004a](#)).

Dekontaminacioni tretmani u cilju redukcije bakterijskih patogena na mesu se mogu primeniti u različitim fazama proizvodnje mesa, uključujući i dekontaminaciju trupa nakon završene obrade, a pre hlađenja ([Buncic, 2006](#)). Međutim, iako je ovakav pristup doveo do značajnog poboljšavanja mikrobiološkog statusa govedih trupova i ukupne bezbednosti mesa, on se može smatrati kao „reaktivan“, jer probleme (mikrobiološku kontaminaciju) rešava nakon što se oni dogode. U skorije vreme, dosta pažnje je usmereno ka više proaktivnom i preventivnom pristupu, redukciji bakterijske mikroflore (mikrobiote) i patogena na glavnom izvoru kontaminacije trupova, odnosno koži goveda ([Kooohmaraie i sar., 2005; Small i sar.,](#)

2005), pre nego što se kontaminacija trupova uopšte i dogodi. Inače, stariji termin „mikroflora“ nije terminološki adekvatan, jer pogrešno označava mikrobe-bakterije kao biljni svet („flora“), već je noviji termin „mikrobiota“ naučno korektniji, ali će - zbog njegovog decenijskog širokog korišćenja i u cilju izbegavanja nerazumevanja - u ovom radu ipak biti korišćen stariji termin. Tretmani kože se mogu koristiti bilo kao primarna (jedina) mera za smanjivanje kontaminacije mesa trupova, ili u kombinaciji sa naknadnom dekontaminacijom mesa finalnih, obrađenih trupova, što bi moglo da ima sinergijski efekat i ukupno unapredi mikrobiološki status mesa više nego ovi tretmani pojedinačno.

Danas raspoložive informacije o antimikrobnoj efikasnosti i mogućnostima praktične primene dekontaminacionih tretmana kože goveda su ograničene i nedovoljne. Neki istraživači veruju da su dekontaminacioni tretmani kože goveda najefikasniji način da se redukuje bakterijska kontaminacija mesa goveđih trupova (Koohmaraie *i sar.*, 2005; Small *i sar.*, 2005; Antic *i sar.*, 2010a). U dosad objavljenim istraživanjima, ispitivani su različiti fizički i hemijski antimikrobni tretmani kože goveda, sa ciljem da se patogeni ubiju i/ili uklone sa kože. Postignute redukcije bakterijske mikroflore i alimentarnih patogena na koži se veoma razlikuju u različitim studijama, u zavisnosti od brojnih faktora, a naročito usled razlika u: higijenskom i mikrobiološkom status kože, efikasnosti samog dekontaminacionog tretmana i da li je istraživanje sprovedeno u laboratorijskim ili praktičnim uslovima na klanici. Do danas, generalno, postignute mikrobne redukcije na koži goveda u eksperimentalnim uslovima su iznosile oko 3-4 log cfu/cm², a u praktičnim uslovima na klanici oko 2-3 log cfu/cm². Međutim, koža goveda je redovno kontaminirana sa ukupnom mikroflorom uključujući i fekalne mikroorganizme na nivou koji može biti i preko 10 log cfu/cm² (Bacon *i sar.*, 2000; Antic *i sar.*, 2010a; Blagojevic *i sar.*, 2011), a vrlo često i sa bakterijskim alimentarnim patogenima kao što su *E. coli* O157 i *Salmonella* spp. (Avery *i sar.*, 2002; Small *i sar.*, 2006; Nastasijevic *i sar.*, 2008). Zbog toga je neophodno da se efikasnost antimikrobnih tretmana kože goveda značajno poboljša. Da bi se to postiglo, moraju se razmotriti i alternativni pristupi u tretmanima kože.

Jedan od alternativnih pristupa je baziran na principu mikrobne imobilizacije (fiksacije) mikroorganizama na dlaci i površini kože. Sa ovim novim pristupom, eliminacija ukupne mikroflore sa kože nije neophodna (to je verovatno nedostižan cilj), već je dovoljno da se bakterije na neki način „zalepe“ za dlaku i tako spreči njihovo odvajanje sa kože i prenos na meso trupova tokom operacije skidanja kože.

U ovom radu, glavni cilj je bio da se istraže potencijal i efikasnost tog novog pristupa - imobilizacija mikroorganizama na koži u cilju sprečavanja kontaminacije mesa goveđih trupova. U tom cilju, preliminarno je ispitano korišćenje različitih materija. Prirodna smola poreklom od insekata, šelak, se preliminarno pokazala da ima posebno dobar potencijal i stoga je njena primena dalje detaljno ispitana. Kao komparativna kontrola, u radu je paralelno korišćen i tretman kože baktericidnim sanitajzerom, za koji su ranije objavljena istraživanja pokazala da je jedan od najuspešnijih do sada.

Pregled literature

1. Značaj bezbednosti goveđeg mesa

1.1. Uvod

Bezbednost mesa je postala jedna od glavnih društvenih tema i izazova u novije vreme, nakon više ozbiljnih (i medijski praćenih) epidemija alimentarnih oboljenja, naročito onih uzrokovanih sa *E. coli* O157 i *Listeria monocytogenes* koje mogu da imaju letalne ishode. Najvažnija pitanja i interesovanja u oblasti mikrobiološke bezbednosti proizvoda od mesa tiču se okolnosti nastajanja epidemija alimentarnih oboljenja, posledičnog povlačenja proizvoda sa tržišta, ispunjavanja regulatornih zahteva i strategija za prevenciju i kontrolu bakterijskih patogena ([Sofos i Geornaras, 2010](#)). Iako mnoge vrste hrane mogu biti izvor alimentarnih oboljenja, meso i proizvodi od mesa imaju veoma značajan udio u infekcijama ljudi sa *Salmonella* spp., verocitotoksičnim *E. coli* (VTEC), *Campylobacter jejuni/coli* i do izvesnog stepena, sa *Listeria monocytogenes* ([Nørrung i sar., 2009](#)). Najčešći sled događaja koji prethodi alimentarnim oboljenjima uključuje postojanje primarnog izvora, zdravih životinja za proizvodnju mesa koje fekalno izlučuju patogene i koji se dalje šire kroz proces proizvodnje, prerade, rukovanja i konzumiranja mesa i proizvoda od mesa do potrošača ([Nørrung i Buncic, 2008](#)).

U ukupnom broju slučajeva alimentarnih oboljenja izazvanih konzumiranjem mesa i proizvoda od mesa, udio goveđeg mesa je veoma značajan, a najčešće odmah iza živinskog koje je na prvom mestu. To je slučaj u UK ([Smerdon i sar., 2001](#)), a takođe i u SAD ([Lynch i sar., 2006](#)), sa *E. coli* O157 kao najčešćim uzročnikom poreklom iz goveđeg mesa. Međutim, od zemlje do zemlje postoje varijacije u značaju goveđeg mesa kao izvora alimentarnih oboljenja i epidemija i one uglavnom zavise od tri faktora:

- a) prevalence i koncentracije patogena u goveđem mesu i proizvodima od njega;
- b) količine konzumiranog goveđeg mesa po glavi stanovnika u nekoj zemlji; na primer, u okviru EU je najmanja u Češkoj, <10 gr po osobi dnevno, a najveća u Italiji i Irskoj, >60 gr po osobi dnevno ([FAOSTAT, http://faostat.fao.org](#)); i

c) načina pripremanja mesa i navika potrošača; na primer, meso se duže termički tretira u nekim zemljama, kao što je Grčka ili UK, dok se u drugim, kao SAD, Francuska i Holandija, češće konzumira blaže termički tretirano meso ([Rhoades i sar., 2009](#)).

Odabrani podaci o incidenci najvažnijih alimentarnih patogena u oboljenjima ljudi u različitim zemljama dati su u [tabeli 1.1.](#)

Tabela 1.1. Incidenca najvažnijih alimentarnih patogena kod ljudi, na 100.000 stanovnika (prilagođeno od [Buncic, 2006](#); i [EFSA, 2010a](#))

Zemlja, godina izveštaja	Campylobacter	Salmonella	E. coli O157 i VTEC	L. monocytogenes
Australija, 2003	113	40,3	0,1	0,3
Kanada, 2000	40,1	18,4	8,8	/
Novi Zeland, 1998-2000	320	49,6	1,3	0,5
SAD, 2003	12,6	14,5	1,1	0,3
Švajcarska, 2003	77,8	30,5	0,8	0,6
UK, 2002	88,7	27,6	1,4	0,3
EU, 2004	47,6	42,2	1,3	0,3
EU, 2008	40,7	26,4	0,7	0,3

Na osnovu izveštaja koje objavljuje Ministarstvo poljoprivrede i Agencija za bezbednost i inspekciju hrane SAD (USDA/FSIS), industrija mesa svake godine trpi velike gubitke zbog povlačenja više hiljada tona proizvoda sa tržišta, gotovih jela od mesa i živine kontaminiranih sa *L. monocytogenes*, ili usitnjeno goveđeg mesa kontaminiranog sa *E. coli* O157 ([Sofos, 2008](#)). Ekonomski gubici uključuju i troškove lečenja obolelih, gubitak produktivnosti, kazne i sudske procese, kao i gubitke položaja na tržištu, pa je grubo procenjeno da iznose i do 12 milijardi američkih dolara godišnje ([Skandamis i sar., 2010](#)). Kontaminacija sirovog mesa patogenima kao što su *Salmonella*, *E. coli* O157 i *Campylobacter*, najčešće nastaje tokom klanja i obrade životinja u klanicama, dok je za neke druge patogene (na primer, *L. monocytogenes*) ključna kontaminacija tokom prerade, pripremanja i čuvanja hrane ([Nørrung i sar., 2009](#)).

U brojnim istraživanjima je utvrđeno da koža goveda predstavlja najznačajniji izvor mikrobiološke kontaminacije trupova goveda ([Elder i sar., 2000](#); [Avery i sar., 2002](#); [Arthur i sar., 2004](#)). Značaj kože goveda kao ključnog faktora za ulazak mikrobiološke kontaminacije (uključujući i patogene) u lanac goveđeg mesa i kasniju izloženost potrošača potvrđen je i kvantitativnom ocenom rizika od *E. coli* O157:H7 u

goveđim hamburgerima (Duffy i sar., 2006). Utvrđeno je da inicijalna prevalenca i broj *E. coli* O157:H7 na koži goveda imaju najveći uticaj na rizik od tog alimentarnog oboljenja nakon konzumiranja hamburgera od strane potrošača (Duffy i sar., 2006). Stoga je izvesno da će sve preventivne i interventne strategije usmerene na redukciju patogena na koži goveda (i posledično sprečavanje njihovog ulaska u lanac mesa u toj fazi) imati veliki uticaj na ukupno smanjenje rizika od pojave alimentarnih oboljenja poreklom od goveđeg mesa.

1.2. Alimentarni patogeni u lancu goveđeg mesa

Bazirano na učestalosti i posledicama, generalno se smatra da su najvažniji bakterijski patogeni prisutni u lancu goveđeg mesa verocitotoksične *Escherichia coli* (VTEC), *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni/coli* i *Listeria monocytogenes* (Rhoades i sar., 2009).

1.2.1. Verocitotoksične *Escherichia coli* (VTEC)

VTEC su sojevi *E. coli* sposobni za produkciju verocitotoksina, ali sama sposobnost produkcije toksina ne znači da taj soj može da izazove i alimentarno oboljenje. Neki od VTEC sojeva poseduju dodatne patogene faktore koji su neophodni za izazivanje enterohemoragičnog kolitisa i stoga se svrstavaju u grupu enterohemoragičnih *Escherichia coli* (EHEC) (Nørrung i sar., 2009). Međutim, enterohemoragični kolitis nije jedina forma oboljenja koje izaziva ovaj patogen. Stoga, niti termin VTEC ni termin EHEC ne karakterišu u potpunosti ovog patogena, a dodatna komplikacija je da se ovi termini ponekad u literaturi koriste i kao sinonimi. U novije vreme, predložen je od strane EFSA, kao tačniji, termin „human-pathogenic VTEC“ (Hp-VTEC) (EFSA, 2007). U okviru VTEC grupe, najčešće serogrupe koje dovode do alimentarnih bolesti ljudi su određene somatskim O antigenom i to su O157, O26, O111, O103, O91 i O145 (SCVPH, 2003a). Jedan od serotipova koji je najviše proučavan i koji uzrokuje veliki procenat enterohemoragičnog kolitisa je *E. coli* O157:H7, pa će o njemu biti najviše reči u narednim poglavljima. VTEC infekcije ljudi predstavljaju alimentarna oboljenja sa najozbiljnijim kliničkim simptomima i ponekad imaju i fatalne komplikacije. Akutni simptomi su najčešće prolazni i uključuju bolove u trbuhi, profuznu dijareju koja prelazi u krvavu usled

razvoja hemoragičnog kolitisa i ponekad povraćanje. U manjem broju slučajeva (oko 10%) se mogu razviti dodatne komplikacije na bubrežima i mozgu, kao što su hemolitični uremični sindrom (HUS, najčešće kod dece) i trombotična trombocitopenična purpura (TTP; najčešće kod odraslih); mortalitet u slučaju komplikacija je visok i iznosi oko 10% ([Rhoades i sar., 2009](#)).

Glavni rezervoari za VTEC su preživari, prvenstveno goveda, a potom ovce, koze, bufalo i divlji preživari, dok je prevalenca u svinja veoma niska ([EFSA, 2007](#)). Pod uobičajenim uslovima, VTEC kod tih životinja ne izazivaju manifestacije bolesti. Ljudi se najčešće inficiraju konzumiranjem sirovog ili nepotpuno pasterizovanog mleka ili nekih sireva proizvedenih od njih, nedovoljno termički obrađenih goveđih mlevenih mesa (hamburgera) i sirovih proizvoda od goveđeg mesa (fermentisane kobasice), ali i sirovim povrćem ili kontaktom sa životnjama ili njihovom okolinom.

1.2.2. *Salmonella* spp.

U okviru vrste *Salmonella enterica*, postoji veliki broj patogenih serotipova, ali je 60-90% slučajeva alimentarne salmoneloze izazvano sa dva najčešća serotipa, *Salmonella Typhimurium* i *S. Enteritidis* ([SCVPH, 2003b](#)). Ovi serotipovi uzrokuju prolazni gastroenteritis koji se manifestuje dijarejom, bolovima u trbuhu, povraćanjem i visokom temperaturom. U oko 5% slučajeva simptomi su ozbiljniji, praćeni jakom dehidratacijom, a moguć je i smrtni ishod kod imunokompromitovanih osoba (u oko 2% ovih slučajeva), posebno nakon infekcije antibiotski rezistentnim serotipovima *Salmonella*.

Salmonele se nalaze u crevima ljudi i životinja, a u životnu sredinu dospevaju preko feca. Najčešći primarni rezervoar za *S. Typhimurium* su svinje, goveda i živilina, a za *S. Enteritidis* brojeri i koke nosilje ([Nørrung i sar., 2009](#)). Životinje kliconoše mogu imati salmonele u crevima i bez ispoljavanja kliničkih simptoma, a u slučaju klanja tih kliconoša ili unakrsne kontaminacije od njih verovatnoća kontaminacije trupova salmonelama na liniji klanja je velika - posebno tokom operacija skidanja kože i evisceracije. Međutim, salmonele mogu ući u lanac hrane i na bilo kojoj drugoj tački, iz hrane za životinje, farmske sredine, kao i iz sredine i/ili ljudi kliconoša tokom prerade i distribucije hrane i njenog pripremanja u ugostiteljstvu ili domaćinstvima ([SCVPH, 2000](#)). Loše navike lične higijene i higijene rada mogu dovesti do kontaminacije ruku ljudi salmonelama, posle čega oni kontaminiraju hranu

kojom rukuju. Ljudi mogu da se inficiraju salmonelama iz različitih vrsta hrane, ali daleko najčešće preko jaja i živinskog mesa, potom svinjskog mesa, ali nekad i mleka i proizvoda od mleka i goveđeg mesa ([Nørrung i Buncic, 2008](#)).

1.2.3. *Campylobacter* spp.

Najvažnije vrste roda *Campylobacter* su termofilne vrste: *C. jejuni*, *C. coli* i *C. lari*, s tim što prve dve vrste uzrokuju skoro sva (*C. jejuni* oko 90%, a *C. coli* oko 7%) alimentarna oboljenja ljudi ([Nørrung i sar., 2009](#)). *Campylobacter* spp. u ljudi uzrokuje akutni enterokolitis koji se po kliničkim manifestacijama ne može razlikovati od trovanja drugim enteričnim patogenima ([SCVPH, 2000](#)). Bolest se najčešće javlja u blagom obliku, sa bolovima u trbuhu, mučninom, prolivom (ponekad krvavim), povišenom temperaturom i glavoboljom, brzo završava ozdravljenjem, a veoma retko nastaju komplikacije u vidu artritisa i neuroloških poremaćaja.

Campylobacter spp. je veoma raširen u prirodi. Najčešći primarni rezervoar za *C. jejuni* je živila, ali i goveda, ovce, koze, svinje, psi i mačke, dok su za *C. coli* to svinje, ređe živila, goveda i ovce ([SCVPH, 2000; Nørrung i sar., 2009](#)). Životinje uglavnom ne oboljevaju od termofilnih kampilobaktera, ali su rezervoar i primarni izvor kontaminacije vode, mleka i mesa. Generalno, smatra se da su glavni izvori infekcije za ljudi nedovoljno termički obrađeno meso, posebno meso živiline, nepasterizovano mleko i kontaminirana voda; međutim, u značajnom procentu slučajeva izvor se ne utvrđuje. Široka rasprostranjenost ovog patogena i velika mogućnost unakrsne kontaminacije hrane u svim tačkama proizvodnje čine identifikaciju izvora infekcije ljudi veoma komplikovanom. Za razliku od živinskog, goveđe (i svinjsko) meso je retko izvor infekcije ljudi sa *Campylobacter* spp. Razlozi za to uključuju komparativno nižu kontaminaciju trupova goveda i svinja kampilobakterima tokom klanja i obrade u klanicama, kao i činjenicu da *Campylobacter* slabo preživljava sušenje tokom dugotrajnijeg vazdušnog hlađenja tih trupova ([Nørrung i sar., 2009](#)).

1.2.4. *Listeria monocytogenes*

Najvažnija vrsta roda *Listeria* koja je i jedina patogena za ljudi je *Listeria monocytogenes*. U manjem broju slučajeva listerioze, naročito u zdravih,

imunokompetentnih osoba, listerioza se manifestuje kao gastrointestinalno oboljenje (dijareja i povišena temperatura), u slučaju da je infektivna doza veoma visoka - preko 10^7 bakterija po gramu (Buncic i Avery, 2004). Međutim, u većini slučajeva, listerioza počinje sa simptomima sličnim gripu: visokom temperaturom, bolovima u mišićima i glavoboljom. Kod imunokompromitovanih osoba dolazi do septikemije, meningitisa i fatalnog ishoda, a kod trudnica je pobačaj čest simptom. Listeriozu odlikuje nizak morbiditet, ali veoma visok mortalitet, u imunokompromitovanih osoba čak i do 40% (SCVPH, 1999).

Listeria monocytogenes je ubikvitarna bakterija, veoma raširena u prirodi, posebno zemljištu, vodi, stočnoj hrani i fecusu ljudi i životinja (SCVPH, 1999). Farmske životinje, a posebno preživari, mogu biti zdravi nosioci i izlučivači ovog patogena, pa je to jedan od načina njenog ulaska u lanac mesa (Nørrung i sar., 2009). Poseban problem je što se ova bakterija normalno nalazi i u objektima gde se proizvodi, priprema i skladišti hrana. Ima osobinu da na površinama gde se nalazi formira biofilmove, pa je tako izolovana i sa metalnih površina opreme za rukovanje hranom, iz frižidera, hladnjaka i sa podova. Zato je mogućnost za kontaminaciju hrane veoma velika, pa i za naknadnu kontaminaciju termički pripremljene hrane. *Listeria* je psihrotrofna i razmnožava se na temperaturama hlađenja, što je veliki problem za bezbednost duže uskladištene hrane. Glavni izvor infekcije za ljudе su kontaminirane namirnice spremne za konzumiranje: gotova jela, narezani vakum-pakovani mesni proizvodi, mleko, mladi sirevi, salate i riba (SCVPH, 1999).

1.3. Prevalenca i koncentracija alimentarnih patogena u lancu goveđeg mesa

Lanac goveđeg mesa obuhvata tri glavne faze (Nørrung i sar., 2009):

a) „Pre-harvest“ - životinje namenjene za proizvodnju hrane animalnog porekla na farmi, odnosno deo lanca mesa koji obuhvata uzgoj tih životinja;

b) „Harvest“ - deo lanca mesa koji počinje sa transportom životinja od farme do stočnih pijaca ili klanice (najčešće pod menadžmentom same klanice), uključuje smeštaj životinja u stočnom depou, klanje životinja i obradu trupova, i završava sa dobijanjem sirovog mesa nakon hlađenja, otkoštavanja i rasecanja mesa u klanici. Ukoliko se trupovi ili meso u velikim komadima transportuju do posebnog pogona za

preradu mesa gde se vrši i njihovo rasecanje, onda se smatra da je to „post-harvest“ faza.

c) „Post-harvest“ - deo lanca koji obuhvata preradu mesa, distribuciju i maloprodaju proizvoda od mesa i jela spremnih za konzumiranje, kao i pripremu mesa u domaćinstvima.

U ovom poglavlju dat je pregled učestalosti (prevalence) i nivoa (koncentracije) glavnih alimentarnih patogena poreklom iz goveđeg mesa (*E. coli* O157, *Salmonella*, *Campylobacter* i *L. monocytogenes*) na ključnim tačkama lanca goveđeg mesa, gde je potrebno primeniti određene mere u cilju njihove kontrole. Podaci o prevalenci patogena u lancu goveđeg mesa dati su u [tabeli 1.2](#), ukupni trendovi njihove prevalence i distribucija u lancu goveđeg mesa u [grafikonu 1](#), a u [grafikonu 2](#) prikaz distribucije *E. coli* O157 u lancu goveđeg mesa u Srbiji.

1.3.1. „Pre-harvest“ faza

Prevalanca alimentarnih patogena u proizvodnih životinja na farmi se može značajno razlikovati u zavisnosti od njihove starosne kategorije (telad, tovna junad ili krave izlučene iz proizvodnje), ishrane i načina držanja (slobodno na paši ili u zatvorenim objektima), godišnjeg doba i drugih faktora. Primarni izvor svih važnijih alimentarnih patogena poreklom iz goveđeg mesa je digestivni trakt goveda iz koga se putem fecesa povremeno ili stalno ovi patogeni izlučuju u spoljnu sredinu. Zbog toga se za utvrđivanje prevalence patogena u živih životinja uzorkuje njihov feses, na nekoliko načina: sa tla nakon defekacije, uzimanjem izvesne količine iz rektuma eksploracijom ili uzimanjem brisa iz rektuma. Postoji veliki broj objavljenih istraživanja u pogledu ekologije i prisustva *E. coli* O157, *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp. u farmskom okruženju i u životinja, dok su takvi podaci o *Listeria monocytogenes* veoma ograničeni. Utvrđena prevalence *E. coli* O157 u fesesu goveda na farmi varirala je 0,0-27% u objavljenim istraživanjima, odnosno prosečno 5,5% goveda na farmi fekalno izlučuje *E. coli* O157 ([Buncic i sar., 2004](#)). Kvantitativni podaci su retki, ali je utvrđeno da broj ćelija *E. coli* O157 u goveđem fesesu može iznositi i do 10^6 /gr ([Rhoades i sar., 2009](#)). U slučaju *Salmonella* spp., utvrđena prevalence u fesesu varirala je 0,2-5,5%, u proseku 2,4%, dok je u slučaju *Listeria monocytogenes* prevalence u objavljenim istraživanjima varirala 4,6-29%, u proseku 19% ([Rhoades i sar., 2009](#)). Podaci o *Campylobacter* spp. govore o

značajno višoj prevalenci u fecesu goveda na farmi, 54-64% (u proseku 59%) u odnosu na prethodne patogene (Minihan i sar., 2004; Beach i sar., 2002).

1.3.2. „Harvest“ faza

Poznato je da postupci i rukovanje sa životinjama u periodu od farme do klanja (utovar, transport, istovar životinja i njihov boravak u stočnom depou) značajno povećavaju fekalnu ekskreciju alimentarnih patogena (Small i sar., 2002; Barham i sar., 2002; Collis i sar., 2004) i njihovu prevalencu u fecesu i na koži zaklanih goveda. U objavljenim istraživanjima utvrđena prevalenca *E. coli* O157 u fecesu na klanici u drugim zemljama je iznosila 0,0-27,8%, u proseku 7,5% (Buncic i sar., 2004), a u jednom istraživanju sprovedenom u Srbiji utvrđena je prevalenca od 2,6% (Nastasijevic i sar., 2009). U fecesu zaklanih goveda objavljene prevalence *Salmonella* spp. su varirale 0,0-4,3%, u proseku 2,4% (Rhoades i sar., 2009), *Campylobacter* spp. 24,8-68%, u proseku 41,3% (Madden i sar., 2006; Hakkinen i sar., 2007; Beach i sar., 2002), a *L. monocytogenes* 4,8% prema samo jednom izveštaju (Madden i sar., 2006).

Međutim, na koži goveda je utvrđena značajno veća prevalenca alimentarnih patogena nego u fecesu na farmi ili klanici, što ukazuje da se redovno dešava obimna unakrsna kontaminacija između samih životinja kao i preko površina sa kojima one dolaze u kontakt. Prevalenca *E. coli* O157 na koži goveda pre skidanja iznosila je od 4,5% (Barham i sar., 2002) do čak 97,6% (Arthur i sar., 2007), u proseku 45,8% (Antić, 2009). U novijim istraživanjima sprovedenim u Srbiji, utvrđena je 28,2% prevalenca *E. coli* O157 na koži zaklanih goveda prema jednom izveštaju (Nastasijevic i sar., 2008) i 52-64% prema drugom (Blagojevic i sar., 2011). Koncentracija ovog patogena na koži goveda je najčešće (i do 90%) niža od jedne ćelije po cm², ali može biti i 2,2-3,0 log cfu/cm² (O'Brien i sar., 2005; Arthur i sar., 2004; Bosilevac i sar., 2009). Prevalenca *Salmonella* spp. na koži goveda iznosila je od 10% (Reid i sar., 2002) do čak 94,8% (Arthur i sar., 2007), u proseku 50,3% (Antić, 2009), dok u jednom istraživanju sprovedenom u Srbiji nije utvrđeno prisustvo ovog patogena na koži goveda (Antic i sar., 2010a). Broj ćelija *Salmonella* spp. na koži je najčešće manji od jedne ćelije po cm², ali može biti i do 1,0 log cfu/cm² (Arthur i sar., 2007; Bosilevac i sar., 2009). Prevalenca *Campylobacter* spp. na koži goveda iznosila je od 0,0% (Reid i sar., 2002) do 13% (Beach i sar., 2002), što je bilo

značajno niže u odnosu na prevalencu od preko 60% u fecesu uzorkovanom na farmi i na klanici u ovom drugom istraživanju. Mogući razlog toj razlici je da, čak i kada dolazi do izvesne kontaminacije kože fecesom, *Campylobacter* spp. značajno odumire na koži - odnosno kada se nađe van organizma domaćina. Prevalenca *L. monocytogenes* na koži goveda u objavljenim istraživanjima iznosila je od 9,9% (Rivera-Betancourt i sar., 2004) do 36,5% (Guerini i sar., 2007a; 2007b), u proseku 19,9%.

Tokom operacije skidanja kože goveda na komercijalnim klanicama, neminovna je izvesna mikrobiološka kontaminacija mesa trupova čak i kada se primenjuje najbolja higijenska praksa. Proces dalje obrade zaklanih goveda - nakon skidanja kože - se sastoji od više faza, a u objavljenim istraživanjima se mikrobiološki status mesa trupova najčešće ispitivao na sledećim ključnim tačkama:

- a) odmah nakon skidanja kože, a pre evisceracije (ukazuje na kontaminaciju poreklom sa kože);
- b) nakon evisceracije, a pre rasecanja trupova (ukazuje na kontaminaciju nastalu tokom skidanja kože i/ili tokom evisceracije);
- c) nakon završene obrade, pranja ili dekontaminacije (na kraju linije klanja), a pre hlađenja (ukazuje na nivo higijene celokupnog procesa klanja i obrade trupova); i
- d) nakon završenog hlađenja, obično 24 h nakon klanja (ukazuje na mikrobiološki status mesa koje ulazi u dalje faze lanca goveđeg mesa).

U fazi odmah nakon skidanja kože, utvrđena prevalenca *E. coli* O157 na trupovima kretala se od 3,2% (McEvoy i sar., 2003a) do čak 43,4% (Elder i sar. 2000), u proseku 18,5% (Antić, 2009). Broj ćelija *E. coli* O157 na pozitivnim trupovima je najčešće veoma nizak; na 89% i 69% pozitivnih trupova u dva istraživanja broj je bio <1,5 ćelija/100 cm² (Arthur i sar., 2004; Barkocy-Gallagher i sar., 2003). Međutim, na pojedinim trupovima on može biti i do 550/100 cm² (Arthur i sar., 2004). Prevalenca *Salmonella* spp. na trupovima odmah nakon skidanja kože iznosila je od 1,9% (Kain i sar., 2001) do čak 45,2% (Ruby i sar., 2007), u proseku 15,8%, a *L. monocytogenes* od 1,1% (Rivera-Betancourt i sar., 2004) do 4,8% (Guerini i sar., 2007a), u proseku 3%. O prevalenci *Campylobacter* na trupovima u ovoj fazi nema dostupnih podataka.

U fazi nakon završene obrade trupova, a pre njihovog hlađenja, prevalenca alimentarnih patogena je očekivano niža. Prevalenca *E. coli* O157 kretala se od 0,3% (Arthur i sar., 2004) do 3,2% (McEvoy i sar., 2003a), u proseku 1,1% (Rhoades

(*i sar.*, 2009), dok je u istraživanjima sprovedenim u Srbiji u ovoj fazi na trupovima utvrđena prevalenca od 2,8% (*Nastasijevic i sar.*, 2009), do čak 12% i 14% u dve klanice (*Blagojevic i sar.*, 2011). Prevalenca *Salmonella* spp. na trupovima u ovoj fazi kretala se od 0,1% (*Barkocy-Gallagher i sar.*, 2003) do 7,6% (*McEvoy i sar.*, 2003b), u proseku 2,1% (*Rhoades i sar.*, 2009), mada postoje i podaci o znatno većoj prevalenci od 12,7% (*Small i sar.*, 2006). Prevalenca *L. monocytogenes* iznosila je u proseku 12,4%, od 2,8% (*Guerini i sar.*, 2007a), do čak 22% (*Korsak i sar.*, 1998), a *Campylobacter* spp. u proseku 7,8%, od 2,0-10,0% (*Beach i sar.*, 2002; *Hakkinen i sar.*, 2007; *Korsak i sar.*, 1998).

Nakon završenog hlađenja trupova, prevalenca *E. coli* O157 se dodatno redukuje i u objavljenim istraživanjima iznosi u proseku 0,3% (0,0-1,0%), a u slučaju *Salmonella* spp. 1,3% (0,2-6%) (*Rhoades i sar.*, 2009). Značajno više prevalence u odnosu na prethodne patogene su utvrđene u slučaju *L. monocytogenes* nakon hlađenja, u proseku 12,1%, od 4,1% (*Rhoades i sar.*, 2009) do čak 26% u Brazilu (*Barros i sar.*, 2007), što se može objasniti činjenicom da je ovaj patogen psihrotrofan i da može rasti i razmnožavati se i na temperaturama hlađenja. U slučaju *Campylobacter*, nakon hlađenja i sušenja površine goveđeg trupa najveći procenat ovog patogena odumire, pa je utvrđena prosečna prevalenca bila 1,2%, (0,0-3,3%) (*Minihan i sar.*, 2004; *Ghafir i sar.*, 2007).

Na kraju „harvest“ faze lanca goveđeg mesa, dobija se sirovo ohlađeno meso, koje može biti u vidu velikih komada (polutke ili četvrti), manjih komada, mesnih obrezaka ili mlevenog mesa. Na nivou proizvođača mesa, utvrđena prevalenca *E. coli* O157 (ne svih VTEC) u sirovom goveđem mesu (obrescima i mlevenom mesu) iznosila je u proseku 0,3% (0,0-2,4%), *Salmonella* spp. 2,6% (0,1-7,5%), *L. monocytogenes* 10% (1,6-24%) (*Rhoades i sar.*, 2009) i *Campylobacter* spp. 2,5% (*Ghafir i sar.*, 2007). U Srbiji nije utvrđeno prisustvo *E. coli* O157 u mesnim obrescima, dok je prevalenca u usitnjrenom mesu (bez aditiva i začina) namenjenom za nadev fermentisanih kobasica iznosila 6,2% (*Nastasijevic i sar.*, 2009).

1.3.3. „Post-harvest“ faza

U sirovom goveđem mesu u prometu (uglavnom u mlevenom mesu), utvrđena prevalenca *E. coli* O157 (ne svih VTEC) iznosila je u proseku 1,4% (0,0-5,2%), *Salmonella* 2,6% (0,4-3,8%) (*Rhoades i sar.*, 2009), i *Campylobacter* 0,5% (0,0-

1,8%) ([EFSA, 2010a](#)). Koncentracija *E. coli* O157 i *Salmonella* u sirovom mesu u prometu je uglavnom niska i ispod nivoa koji se može kvantifikovati, dok u slučaju *L. monocytogenes* može biti nešto viša, i do 3-4 log cfu/gr ([Rhoades i sar., 2009](#)).

Istraživanja o prevalenci glavnih alimentarnih patogena u hrani spremnoj za konzumiranje su relativno malobrojna; o *E. coli* O157 postoje samo podaci o prisustvu u fermentisanim kobasicama, 0,0-3,3%, u proseku 1,2% ([Levine i sar., 2001](#); [Heuvelink i sar., 1999](#); [Chinen i sar., 2001](#)), dok je u drugim tipovima hrane spremne za konzumiranje i proizvodima od mesa prevalenca *Salmonella* iznosila 1,9% (0,0-5,5%), *L. monocytogenes* 2,6% (0-10,2%) i *Campylobacter* 0,3% (0,0-1,6%) ([EFSA, 2010a](#)). U Srbiji je utvrđena prevalenca *E. coli* O157 u nadevu za fermentisane kobasice (sa aditivima i začinima), ali pre fermentacije, od 2,1% ([Nastasijevic i sar., 2009](#)).

1.3.4. Distribucija alimentarnih patogena u lancu goveđeg mesa

Iz velikog broja objavljenih istraživanja, jasno se vidi da je najveća prevalenca *E. coli* O157, *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes* u lancu goveđeg mesa utvrđena na koži goveda, pre same operacije njenog skidanja na klanici, dok je u slučaju *Campylobacter* spp. u fecesu životinja na farmi ili na klanici ([grafikon 1](#)). Postoje sugestije da se viša prevalenca *Salmonella* spp. u odnosu na *E. coli* O157 u finalnim proizvodima od goveđeg mesa može pripisati ukupno njenoj nešto višoj prevalenci na koži goveda i ohlađenim trupovima ([Rhoades i sar., 2009](#)). Međutim, odnos između prevalenci ta dva patogena zavisi od epidemiološke situacije svakog patogena individualno u određenoj geografskoj oblasti, a te dve situacije se često ponašaju nezavisno jedna od druge. Pored toga, postoje velike razlike između istraživanja, u pogledu njihovog dizajna, rizičnih faktora koji su uzeti ili nisu uzeti u obzir i primenjene metodologije - što čini ozbiljnije statističko upoređivanje nemogućim. Takođe, skoro dvostruko viša prevalenca *E. coli* O157 u fecesu na farmi u odnosu na *Salmonella* spp., i obrnuto kada je u pitanju nalaz na trupovima nakon obrade i/ili hlađenja i u svežem mesu, može ukazivati na to da *Salmonella* bolje preživljava van digestivnog trakta goveda u odnosu na *E. coli* O157 kao i tokom procesa proizvodnje mesa na klanici ([Rhoades i sar., 2009](#)). Oba patogena su veoma retko izolovana iz termički tretiranog mesa. Podataka o *L. monocytogenes*, posebno u „pre-harvest“ i „harvest“ fazi ima značajno manje, ali se primećuje da je

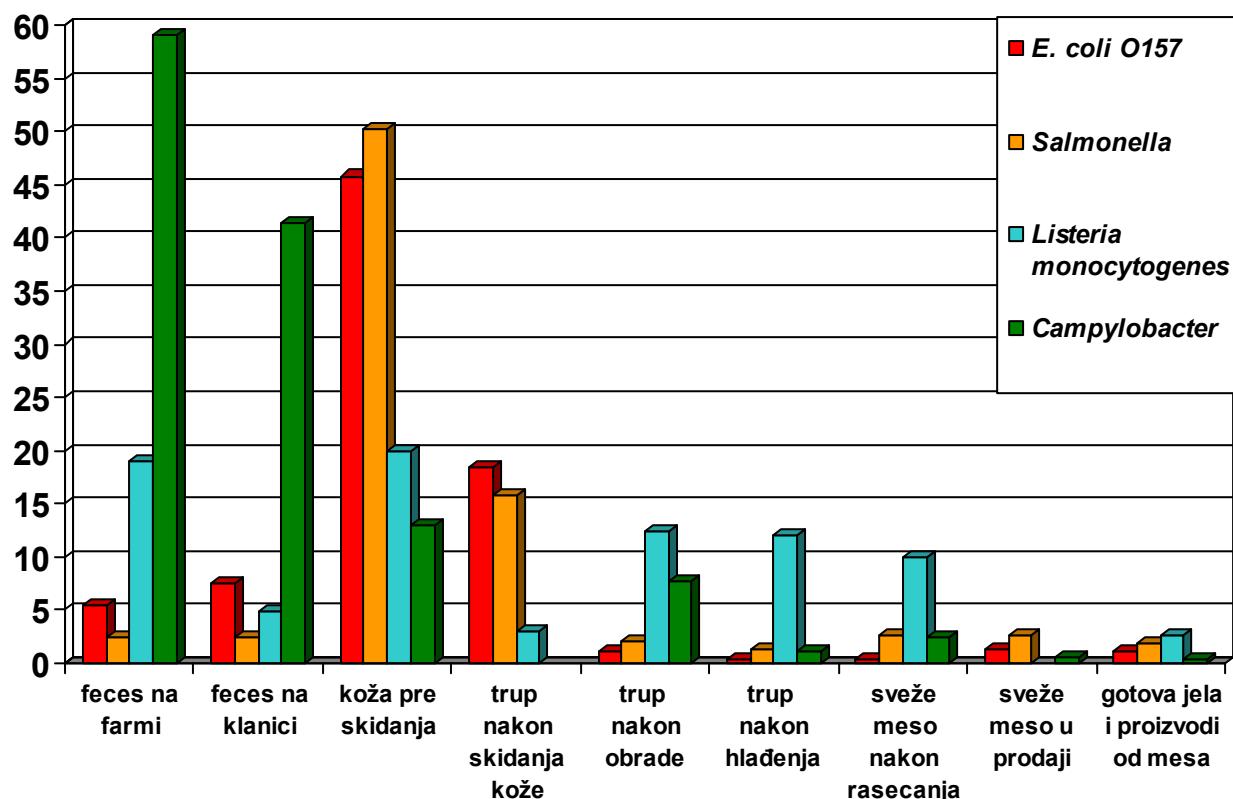
njena prevalenca u sirovom mesu nakon hlađenja i/ili rasecanja značajno veća od *E. coli* O157 i *Salmonella*, što je i za očekivanje jer je ovaj patogen ubikvitan, raste i razmnožava se i na temperaturama hlađenja. Sa druge strane, prevalenca *Campylobacter* spp. je značajno manja na svežem mesu nakon hlađenja jer je ovaj patogen veoma neotporan na hlađenje i sušenje ([tabela 1.2](#) i [grafikon 1](#)).

Za razliku od prevalence, podataka o koncentraciji pomenutih bakterijskih patogena u lancu goveđeg mesa ima značajno manje, što predstavlja problem i veliki nedostatak za kvantitativnu ocenu rizika od ovih patogena. Najveći broj goveda na farmi fekalno izlučuje patogene u niskoj koncentraciji. Međutim, u slučaju *E. coli* O157, mali broj životinja fekalno izlučuje visoki broj ćelija patogena („super izlučivači“). U mesu tokom „harvest“ faze, kao i u sirovom mesu u prometu i hrani spremnoj za konzumiranje, takođe se najčešće utvrđi veoma mali broj ćelija ovih patogena ([Rhoades i sar., 2009](#)).

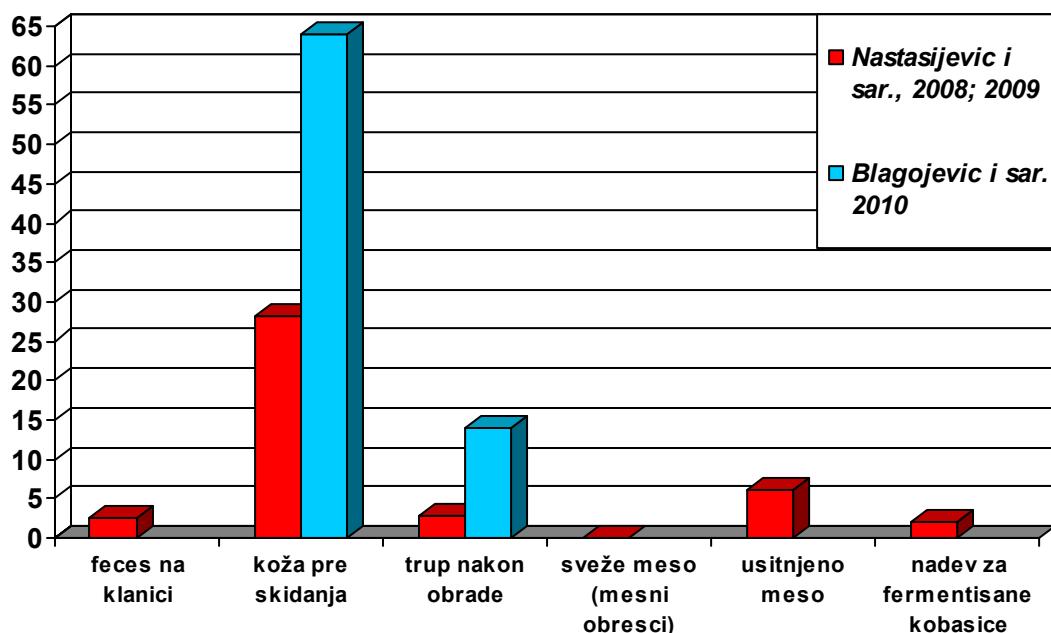
Tabela 1.2. Učestalost glavnih alimentarnih patogena u lancu goveđeg mesa

Mesto uzorkovanja	Utvrđena prevalenca (%)			
	<i>E. coli</i> O157	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Campylobacter</i>
Feces na farmi	0-27 (5,5)	0,2-5,5 (2,4)	4,6-29 (19)	54-64 (59)
Feces na klanici	0-27,8 (7,5)	0-4,3 (2,4)	4,8	24,8-68 (41,3)
Koža pre skidanja	4,5-97,6 (45,8)	10-94,8 (50,3)	9,9-36,5 (19,9)	13
Trup nakon skidanja kože, pre evisceracije	3,2-43,4 (18,5)	1,9-45,2 (15,8)	1,1-4,8 (3)	NP
Trup na kraju linije klanja, pre hlađenja	0,3-3,2 (1,1)	0,1-7,6 (2,1)	2,8-22 (12,4)	2-10 (7,8)
Trup nakon hlađenja	0-1 (0,3)	0,2-6 (1,3)	4,1-26 (12,1)	0-3,3 (1,2)
Sveže meso nakon rasecanja (na klanici)	0-2,4 (0,3)	0,1-7,5 (2,6)	1,6-24 (10)	2,5
Sveže meso u prodaji	0-5,2 (1,4)	0,4-3,8 (2,6)	NP	0-1,8 (0,5)
Gotova jela i proizvodi od mesa	0-3,3 (1,2)	0-5,5 (1,9)	0-10,2 (2,6)	0-1,6 (0,3)

NP - nema podataka



Grafikon 1. Ukupni trendovi učestalosti alimentarnih patogena (%) u lancu goveđeg mesa (na osnovu proseka objavljenih podataka)



Grafikon 2. Ukupni trendovi učestalosti *E. coli* O157 (%) u lancu goveđeg mesa u Srbiji ([Nastasijevic i sar., 2008, 2009](#); [Blagojevic i sar., 2011](#))

1.4. Značaj kože goveda u bezbednosti goveđeg mesa

U brojnim istraživanjima u poslednjih desetak godina, primenom različitih mikrobioloških, molekularnih i statističkih metoda, utvrđeno je da je koža goveda najznačajniji izvor mikrobiološke kontaminacije mesa trupova na liniji klanja uključujući i sa bakterijskim alimentarnim patogenima (Elder i sar., 2000; Avery i sar., 2004; Collis i sar., 2004; Arthur i sar., 2004; Jacob i sar., 2010). Primenom kvantitativne ocene mikrobiološkog rizika, potvrđen je značaj kože goveda kao ključnog izvora jednog od glavnih patogena (*E. coli* O157:H7) za lanac goveđeg mesa i kao glavnog rizičnog faktora koji utiče na nivo rizika za potrošače od tog alimentarnog oboljenja preko goveđih hamburgera (Duffy i sar., 2006). Nivo mikrobiološke kontaminacije trupova poreklom sa kože goveda može da zavisi od brojnih faktora uključujući vizuelnu čistoću kože (Ridell i Korkeala, 1993; McEvoy i sar., 2000); njen status u pogledu nivoa generalne i fekalne mikroflore, kao i od prevalence i koncentracije bakterijskih patogena (Arthur i sar., 2004; Jacob i sar., 2010); nivoa procesne higijene na liniji klanja uključujući higijenu postupaka tokom skidanja kože (Gill i sar., 1996; Vivas Alegre i Buncic, 2004; Blagojevic i sar., 2011).

1.4.1. Sastav i distribucija mikroflore kože goveda

Koža goveda predstavlja sredinu veoma pogodnu za preživljavanje, a moguće i razmnožavanje bakterija (Small i sar., 2003) i zbog toga je redovno mikrobiološki visoko kontaminirana (Antić, 2009). Utvrđeno je da se na površini i dlaci kože redovno nalazi više od 6 log cfu/cm² aerobnih bakterija (Bacon i sar., 2000; Arthur i sar., 2004; Antic i sar., 2010a; Blagojevic i sar., 2011), a u pojedinim slučajevima nivo ove kontaminacije dostiže i 11 log cfu/cm² (Antić, 2009). U pogledu nivoa bakterija indikatora fekalne kontaminacije, utvrđeno je da se na pojedinim delovima kože goveda, naročito onim koji su u kontaktu sa fecesom i kontaminiranim površinama na kojima životinja leži, redovno nalazi više od 4 log cfu/cm² *Enterobacteriaceae* i ukupnih koliformnih bakterija; ponekad i više od 6 log cfu/cm² (Bacon i sar., 2000; Arthur i sar., 2004; Bosilevac i sar., 2005a; Antic i sar., 2010a; Blagojevic i sar., 2011), a generičke *E. coli* redovno više od 3 log cfu/cm², ponekad do 5 log cfu/cm² (Bacon i sar., 2000; Antić, 2009). Kao što je ranije ukazano, u

pogledu najvažnijih bakterijskih alimentarnih patogena, prosečna prevalenca na koži iz objavljenih istraživanja iznosila je oko 46% za *E. coli* O157, oko 50% za *Salmonella* spp., oko 20% za *Listeria monocytogenes* i 13% za *Campylobacter* spp. ([tabela 1.2](#)), dok je njihova koncentracija u najvećem procentu slučajeva ispod praga detekcije primenjenih metoda za enumeraciju, ali može biti i 1,0-3,0 log cfu/cm² u pogledu *E. coli* O157 i *Salmonella* spp. ([O'Brien i sar., 2005](#); [Arthur i sar., 2004](#)).

Distribucija mikroorganizama na koži goveda nikada nije ravnomerna ([Antic i sar., 2010a](#)). Na pojedinim mestima na koži se nalazi značajno veći nivo bakterijske kontaminacije, uključujući *E. coli* O157, *Salmonella* i *Campylobacter* ([Reid i sar., 2002](#)), što je povezano sa navikama i ponašanjem životinja. Ta mesta su najčešće grudi, deo zadnjih nogu oko skočnog zgloba, deo prednjih nogu oko karpalnog zgloba, slabina i but ([Bell, 1997](#); [Reid i sar., 2002](#); [Stephens i sar., 2007](#); [Nastasijevic i sar., 2008](#); [Antic i sar., 2010a](#)). Ova mesta su od izuzetnog značaja za prenos bakterija sa kože na meso trupova jer se na njima vrši zasecanje tokom operacije skidanja kože. U pogledu vertikalne distribucije mikroflore na dlaci kože goveda, utvrđeno je da je ona uniformna, odnosno da nema razlike u nivoima ukupne i fekalne mikroflore (TVC, *Enterobacteriaceae* i generičke *E. coli*) između gornjeg i donjeg sloja dlake ([Antic i sar., 2010a](#)), što je značajno sa aspekta aplikacije antimikrobnih tretmana na koži goveda.

1.4.2. Faktori koji utiču na mikrobiološku kontaminaciju kože

Mikrobiološka kontaminacija kože goveda je najčešće poreklom iz feca i sredine u kojoj životinja boravi. Goveda su tokom svog života stalno izložena riziku od infekcije/kolonizacije patogenim bakterijama koje kod njih mogu izazvati bolest, ili ne izazivaju bolest ali su od značaja u lancu goveđeg mesa kao alimentarni patogeni za ljudе ([Buncic, 2006](#)). Faktori koji utiču na fekalnu ekskreciju alimentarnih patogena i posledičnu vizuelnu i mikrobiološku kontaminaciju kože u goveda su brojni i nisu dobro poznati svi mehanizmi koji do toga dovode. Najčešće se u tom kontekstu pominju ishrana i starost životinja, kao i sezonske varijacije. Dodatno veliki uticaj imaju i rasa goveda (naročito u smislu debljine dlačnog pokrivača), način držanja (u zatvorenim objektima ili slobodno na paši) i primenjene mere na farmi ([Davies i sar., 2000](#); [Adam i Brülisauer, 2010](#)). Nijedan od ovih faktora ne utiče izolovano na mikrobiološki status kože, već oni uglavnom deluju istovremeno, a

između nekih od njih postoji i međuzavisnost. U okviru ovih faktora, za širenje patogena je veoma bitan i kontakt između životinja (posebno kod držanja u zatvorenim objektima), kao i između životinja i njihove životne sredine, uključujući tu i vektore zaraznih bolesti kao što su glodari i ptice (Nørrung i Buncic, 2008). Kontakt je naročito bitan u fazi transporta životinja i njihovog boravka u stočnom depou klanice, sve do faze omamljivanja. Tada je usled stresa povećano izlučivanje fecesa (posledično i bakterijskih patogena), a životinje su usled navikavanja na novi prostor ili rukovanja sa njima od strane radnika veoma aktivne pa postoje neograničene mogućnosti za unakrsnu kontaminaciju njihove kože: između životinja, kao i životinja-površine-životinja (Small i Buncic, 2009). Transport i stočni depo (uključujući i koridore do boksa za omamljivanje i sam boks) služe kao direktni izvor bakterijskih patogena i odlična su sredina za unakrsnu kontaminaciju kože životinja i posledičnu kontaminaciju trupova, što je utvrđeno u više objavljenih istraživanja (Small i sar., 2002; Avery i sar., 2002; Barham i sar., 2002; Tutenel i sar., 2003; Collis i sar., 2004; Woerner i sar., 2006; Dewell i sar., 2008; Arthur i sar., 2008).

Istraživanja o ekologiji *E. coli* O157 u goveda i njenoj transmisiji u okolnu sredinu i posledično na kožu, ukazala su na jedan poseban problem u kontaminaciji sa ovim patogenom - postojanje određenog broja životinja „super izlučivača“ (Arthur i sar., 2010). Ova goveda povremeno ili stalno izlučuju fecesom veliki broj ćelija *E. coli* O157 ($>10^4$ cfu/gr fecesa) i u prediktivnim studijama je utvrđeno da su ovakve životinje odgovorne za povećanu transmisiju ovog patogena na farmi (Matthews i sar., 2006), a verovatno i tokom transporta i u stočnom depou (Jacob i sar., 2010). Ovi istraživači su izračunali da, kada bi se sprecila kolonizacija 5% goveda potencijalnih „super izlučivača“ sa *E. coli* O157, širenje infekcije među životnjama bi se moglo efikasno kontrolisati. Uticaj „super izlučivača“ na povećanu kontaminaciju kože drugih životinja u grupi jasno je dokazan u studijama u kojima su neinficirane životinje bile izlagane visokim nivoima marker organizama inokulisanim na površinama (Collis i sar., 2004; Stephens i sar., 2008) ili kontaktu sa drugim životnjama - prirodnim „super izlučivačima“ (McGee i sar., 2004; Arthur i sar., 2009). U longitudinalnoj studiji Arthur i sar. (2009), vršena je analiza prevalence i nivoa *E. coli* O157:H7 na koži kao funkcije prevalence i nivoa u fecesu i utvrđen je prag ovog odnosa. U slučajevima kada je u grupi postojala jedna ili više životinja „super izlučivača“, prevalenca u fecesu na nivou grupe je prelazila 20%, a na koži je obično iznosila $>80\%$. Takođe, utvrđena je pozitivna korelacija između prevalence i broja

E. coli O157:H7 na koži: u grupama životinja sa prevalencom na koži >80%, značajno je bila povećana i prevalenca koža sa visokim nivoima ovog patogena (>40 cfu/100 cm²). U odnosu na kontaminaciju kože, autori su zaključili da bi fekalnu prevalencu *E. coli* O157:H7 trebalo kontrolisati i održavati ispod 20%, a nivo ovog patogena koji se izlučuje fecesom ispod 200 cfu/gr u cilju redukcije kontaminacije kože.

1.4.3. Značaj kože u kontaminaciji mesa trupova goveda

Glavni izvori mikrobiološke kontaminacije mesa trupova na liniji klanja su same životinje za klanje i okolna sredina (Bell, 1997). Primarni izvori mikrobiološke kontaminacije trupova i same sredine u klanici su spoljašna površina životinje (koža, dlaka i papci), alimentarni trakt, nazofaringealne duplje i spoljašnji deo urogenitalnog trakta (Buncic, 2006). Jednom kada dođe do kontaminacije sredine u klanici i „naseljavanja“ bakterija u toj sredini, sekundarni izvori kontaminacije mesa trupova uključuju aerosole, kontaminirane površine i uređaje i opremu za klanje i obradu. Takođe, značajan vektor unakrsne kontaminacije, a nekad i izvor kontaminacije, su i ljudi koji rade sa mesom: radnici, mesari, čak i veterinarski inspektori (Buncic, 2006). Većinu drugih izvora kontaminacije trupova je moguće kontrolisati. Na primer, podvezivanjem rektuma i jednjaka može se izbeći curenje sadržaja alimentarnog trakta na meso. Ruptura zida predželudaca i creva i posledična kontaminacija mesu se dešava veoma retko, jer se tokom evisceracije oprezno radi sa nožem zaobljenog vrha. Međutim, tokom operacije skidanja kože u industrijskim uslovima je nemoguće potpuno izbeći prenos mikroorganizama sa kože na meso trupova (Gill i sar., 1996; Elder i sar., 2000). Ova činjenica je dokazana i primenom bakterijskih marker organizama, veštački inokulisanih na kožu goveda, koje su nakon operacije skidanja kože u visokom procentu utvrđene na rukama radnika, noževima i na površini trupova (Byrne i sar., 2000; Collis i sar., 2004). Objavljena istraživanja jasno ukazuju na glavne puteve kontaminacije trupa sa kože:

- a) direktni - slučajni kontakt spoljašne površine kože sa mesom („uvrtanjem“ oslobođenih delova kože); i
- b) indirektni - preko noževa kojima se zarezuje koža, ruku radnika i kontaminirane opreme, kao i putem aerosola koji se stvaraju tokom manipulacije sa kožom, a naročito prilikom mašinskog skidanja kože.

Tabela 1.3. Mikrobiološki status trupa goveda na liniji klanja u pojedinim istraživanjima

Mikroorganizmi	Mesto uzorkovanja				Reference
	Trup nakon skidanja kože, pre evisceracije	Trup nakon evisceracije	Trup nakon intervencija, pre hlađenja	Trup nakon završenog hlađenja	
<i>Nivo indikatora opšte i fekalne kontaminacije (log cfu/100cm²)</i>					
Ukupan broj bakterija (TVC)	3,5	3,7	1,3	1,4	Arthur i sar., 2004
	7,6	/	5,4	3,3	Bacon i sar., 2000
	5,3*	5,5*	5,3*	4,8*	McEvoy i sar., 2004
Enterobacteriaceae	1,4	1,7	0,2	0,4	Arthur i sar., 2004
	5,1*	5,0*	4,9*	3,9*	McEvoy i sar., 2004
Ukupan broj koliforma (TCC)	4,6	/	2,3	1,0	Bacon i sar., 2000
	5,1*	5,7*	5,1*	4,8*	McEvoy i sar., 2004
Generička	4,1	/	1,6	0,9	Bacon i sar., 2000
E. coli	4,8*	4,6*	4,2*	3,5*	McEvoy i sar., 2004
<i>Prevalenca bakterijskih alimentarnih patogena (%)</i>					
E. coli O157	14,7	3,8	0,3	0,0	Arthur i sar., 2004
	43,4	17,8	1,8	/	Elder i sar., 2000
	10,1	1,4	0,3	/	Woerner i sar., 2006
Salmonella spp.	1,9	/	1,0	1,0	Kain i sar., 2001
	5	/	1,6	1,3	Sofos i sar., 1999b
Listeria monocytogenes	0,9	/	0,4	/	Rivera-B. i sar., 2004
	5,5	/	2,8	/	Guerini i sar., 2007b

* zbog upoređivanja, rezultat preračunat sa log cfu/cm² i izražen na log cfu/100cm²

1.4.3.1. Odnos vizuelne kontaminacije i mikrobiološkog statusa mesa trupova

Prilikom inicijalnog zasecanja kože, kontaminacija se neizbežno prenosi na primarno sterilnu površinu mesa; najčešće na delovima nogu oko skočnog zgloba, perianalnoj regiji, butu, slabini i grudima (Gill i sar., 1996). Često su ova mesta na trupu vidljivo kontaminirana dlakama i mrljama fecesa sa kože i mogu imati nivo mikrobiološke kontaminacije i do 2-3 log cfu/cm² više u odnosu na mesta kod kojih se koža ne proseca nožem (Gill i sar., 1996, 1998; Bell, 1997; McEvoy i sar., 2004). Kasnije, tokom postupaka dalje obrade trupa, ova kontaminacija se odatle lako redistribuirala po čitavoj površini trupa, u zavisnosti od primenjene prakse (McEvoy i sar., 2004). Međutim, u više istraživanja je utvrđeno da se na osnovu vidljive

kontaminacije trupa ne može oceniti i njegov mikrobiološki status, odnosno da ne postoji jasna korelacija između bakterija i vidljive nečistoće deponovane na trupu, odnosno i vizuelno čista mesta mogu biti visoko kontaminirana bakterijama (Gill, 2004). U prethodnom poglavlju je prikazano da je, u lancu goveđeg mesa, najviša učestalost alimentarnih patogena utvrđena upravo na koži goveda (grafikon 1). Logično, u više objavljenih istraživanja u kojima je vršeno ispitivanje mikrobiološkog statusa trupova na više tačaka duž linije klanja, najviši nivoi opšte i fekalne mikroflore i prevalenca bakterijskih patogena su utvrđeni najčešće na trupovima odmah nakon operacije skidanja kože (tabela 1.3).

1.4.3.2. Odnos mikrobiološkog statusa kože i mikrobiološke kontaminacije trupova

Pozitivna korelacija između vizuelnog i/ili mikrobiološkog statusa kože sa jedne strane, i mikrobiološkog statusa trupova odmah nakon skidanja kože sa druge strane, jasno je dokazana u više objavljenih istraživanja. Arthur i sar. (2004) su utvrdili jaku pozitivnu korelaciju između nivoa TVC i *Enterobacteriaceae* na trupovima goveda odmah nakon skidanja kože i nivoa ovih grupa bakterija na korespondentnim kožama (0,99 i 0,91). Takođe, utvrdili su i nešto slabiju korelaciju kada je u pitanju prevalenca *E. coli* O157:H7 na trupovima i kožama (0,68), odnosno trupovi goveda na čijim se kožama nalazio visok nivo ovih bakterija bili su posledično kontaminirani višim nivoima bakterija. Sličan odnos je u pogledu individualnih životinja utvrđen i kod nivoa *Salmonella* spp. na kožama i korespondentnim trupovima (Brichta-Harhay i sar., 2008). Međutim, kada se posmatraju podaci na nivou grupe životinja i klanica, ovo često zavisi i od same higijene procesa klanja i veštine radnika tokom skidanja kože. Tako je u studiji istih autora utvrđeno da se nivo TVC na trupovima odmah nakon skidanja kože razlikovao više od 1 log cfu/cm² u četiri klanice iako je nivo TVC na kožama bio skoro isti, dok je u slučaju prevalence *Salmonella* spp. i *E. coli* O157:H7 ta razlika na trupovima između dve ispitivane klanice iznosila 40% i 35% iako je prevalenca na koži u tim klanicama bila skoro ista. Procentualni prenos TVC koža-meso u ove četiri ispitivane klanice, iznosio je 0,5%, 1,9%, 3,3% i 5,8% TVC na trupovima u odnosu na broj na koži, što ukazuje da neke klanice imaju bolju higijensku praksu od drugih u pogledu redukcije prenosa bakterija sa kože na meso trupova. Sličan trend prenosa sa kože je utvrđen i u slučaju *Salmonella* spp. i *E. coli* O157:H7 u pogledu prevalence i broja ovih patogena,

odnosno u klanicama koje su bile manje higijenske, više je trupova bilo kontaminirano ovim patogenima sa kože (Brichta-Harhay i sar., 2008). Ovi rezultati ukazuju da na kontaminaciju trupova sa patogenima (njihovo prisustvo, kao i broj ćelija na njima) veliki uticaj ima prevalenca i njihov broj na korespondentnim kožama, kao i higijenska praksa radnika i veština tokom skidanja kože (Bosilevac i sar., 2009; Brichta-Harhay i sar., 2008). Međutim, u dve studije je značajnija korelacija kontaminacije koža-trup sa *E. coli* O157:H7 utvrđena na nivou grupe, a manje na nivou individualnih životinja, odnosno grupna prevalenca na koži je imala značajniji efekat na kontaminaciju trupa nego prisustvo ovog patogena na pojedinačnim kožama (Fegan i sar., 2005; Jacob i sar., 2010). Takođe, utvrđeno je i da je grupna prevalenca *E. coli* O157:H7 u fesesu, a naročito prisustvo životinja „super izlučivača“ u grupi, veoma značajan faktor kontaminacije finalnih trupova sa ovim patogenom (Fox i sar., 2008), verovatno zbog posredne kontaminacije kože koja služi kao direktni izvor kontaminacije trupa (Arthur i sar., 2009). To znači da kontaminacija trupa sa *E. coli* O157 ne mora da bude poreklom sa korespondentne kože, već je često prisutna unakrsna kontaminacija iz drugih izvora, najčešće indirektno putem ruku radnika, noževa i opreme kontaminiranih kontaktom sa prethodno obrađenim zaklanim životinjama (Tutenel i sar., 2003; Fox i sar., 2008).

1.4.3.3. Odnos vizuelne čistoće kože i njenog mikrobiološkog statusa

U pogledu odnosa vizuelne čistoće kože i njenog mikrobiološkog statusa, u literaturi nema jasnih dokaza da takva korelacija postoji. Može se prepostaviti da se na kožama sa obimnim naslagama organskog materijala (suvog ili mokrog fecesa i/ili slame) nalazi više aerobnih bakterija jer im ovakva sredina pogoduje razmnožavanju i preživljavanju, a svakako i bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* i enteričnih patogena za koje je feses primarni izvor (Small i sar., 2003). Međutim, dokazano je da je i čista koža/dlaka odlična sredina za preživljavanje bakterija, zbog veće gustine dlake, vlažnosti i više temperature površine kože koje ih štite od sušenja (Small i sar., 2003). Takođe, treba imati u vidu i činjenicu da se kod koža sa obimnom nečistoćom povećava i zapremina materijala po jedinici površine kože (što može biti ekvivalentno i situaciji kada životinje imaju vizuelno čisti i duboki dlačni pokrivač), a to doprinosi većoj količini uzorka koji se uzima za mikrobiološko ispitivanje i posledično utvrđenom većem broju bakterija. To znači da u odnosu čista ili prljava

koža, više uticaja na mikrobiološki status ima količina materijala koji se na njoj nalazi, bilo da je to nečistoća ili čiste, duge i guste dlake (na kojima se uvek nalaze bakterije), nego sam vizuelni status, tako da i čista koža može imati nivo bakterija i preko $11 \log \text{cfu/cm}^2$ ([Antic i sar., 2010b](#)). Takođe, na mikrobiološki rezultat će uticati i činjenica da se nečistoća lakše „pokupi“ sa kože uzorkovanjem metodom brisa pomoću sunđera, dok je u slučaju čiste kože/dlake jačina pričvršćivanja bakterija za dlaku verovatno veća. U nekim studijama je utvrđeno povećavanje prevalence *E. coli* O157 ([Nastasijevic i sar., 2008](#)) i *Salmonella* spp. ([Sofos i sar., 1999c](#)) na kožama sa povećanjem vizuelne nečistoće. Nedavno istraživanje u dve klanice u Srbiji je potvrdilo ove rezultate kada su u pitanju nivoi TVC i *Enterobacteriaceae* na koži (povećanje za $1 \log \text{cfu/cm}^2$ i $0,5 \log \text{cfu/cm}^2$) ([Blagojevic i sar., neobjavljeni podaci](#)), ali to ne mora uvek da bude slučaj ([Antic i sar., 2010a](#)). Međutim, treba imati u vidu da će prisustvo patogena na koži goveda velikim delom zavisiti i od statusa farme sa koje goveda dolaze u pogledu patogena, kao i naknadne kontaminacije kože u stočnom depou, sve do boksa za omamljivanje. Ovo ukazuje da se na osnovu vizuelne čistoće kože goveda ne može proceniti i njen mikrobiološki status u pogledu patogena.

1.4.3.4. Odnos vizuelne čistoće kože i mikrobiološkog statusa trupova

Vizuelna čistoća kože takođe može imati uticaja na nivo mikrobiološke kontaminacije trupova. Sastav nečistoće na koži može biti veoma različit; uglavnom su to veće ili manje naslage feca, blata i ostaci prostirke koji mogu biti suvi ili vlažni, jače ili slabije pričvršćeni za dlaku i pokrivati samo neke delove kože ili potpuno kožu na nogama, stomaku, grudima i na slabinama ([Biss i Hathaway, 1995](#)). Ove naslage nečistoće, naročito ako su većim delom sastavljene od feca, mogu biti značajan izvor enteričnih bakterijskih patogena (*E. coli* O157, *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp.) i njihovog prenosa na meso trupova ([Sofos i sar., 1999a, c](#)). Nečistoća na koži može uticati na povećanu kontaminaciju trupa na dva različita načina ([Gill, 2004](#)). Ukoliko je nečistoća slabije pričvršćena za dlaku kože, lako se odvaja sa nje i prenosi na meso trupova putem noževa, opreme, ruku radnika ili vazduhom; naročito u slučaju kada je koža vlažna ili mokra, voda može biti vektor bakterijama ([Hadley i sar., 1997](#)). U drugom slučaju, kada je nečistoća čvrsto pričvršćena za dlaku i površinu kože, ona fizički otežava pravilan proces skidanja

kože. Ovo je često slučaj sa tovnim junadima i bikovima koji se drže zajedno u slobodnom tovu i u nehigijenskim uslovima, tako da vremenom na koži akumuliraju ogromnu količinu fecesa i prljavštine što neminovno vodi i povećanoj prevalenci enteričnih patogena (posebno u „feedlot“ sistemima gajenja kakvi postoje u SAD). U oba slučaja, bez obzira na veštinu radnika i poštovanje higijenskih principa tokom skidanja kože, neminovno će doći do povećane vizuelne i/ili bakterijske kontaminacije trupa (Gill, 2004). Međutim, i u slučaju vizuelno čiste kože, ali sa debelim dlačnim pokrivačem koji je u stadijumu linjanja, takođe će biti olakšan prenos dlaka (a sa njima i bakterija) na meso trupova. Na takvoj koži nivo TVC na njima može iznositi i preko 11 log cfu/cm² (Antic i sar., 2010b). U pogledu stepena prenosa opšte i fekalne mikroflore sa kože na meso trupova, utvrđeno je da je u realnoj situaciji na liniji klanja ovaj prenos uglavnom relativno nizak i broj na mesu najčešće iznosi ukupno između 0,003% i 1,6% od broja na koži (Bacon i sar., 2000; Arthur i sar., 2004; Vivas Alegre i Buncic, 2004). Međutim, može biti i viši, od 0,5% do 5,8% (u proseku 1%) u zavisnosti od nivoa higijenske prakse na klanici (Brichta-Harhay i sar., 2008). U uslovima simuliranog direktnog kontakta koža-meso taj prenos iznosi do 0,5% TVC i 2% *Enterobacteriaceae* od broja na koži (Antic i sar., 2010a). Međutim, i pored ovako niskih procenata prenosa, visok nivo bakterijske kontaminacije kože, kao i njena redovnost prenosa na trup tokom skidanja kože, dovode da je rizik od bakterijske kontaminacije trupa sa kože veoma značajan.

U suštini, pitanje vizuelnog statusa kože goveda za klanje je od značaja samo sa aspekta mogućnosti povećanog prenosa mikroorganizama koji se nalaze u nečistoći i/ili na dlakama, na meso trupova tokom skidanja kože, što je i potvrđeno u nekoliko istraživanja kada su trupovi poreklom od životinja sa prljavom kožom imali veći nivo mikrobiološke kontaminacije (opšte i fekalne mikroflore), kako kod goveda (Ridell i Korkeala, 1993; McEvoy i sar., 2000; Kain i sar., 2001; Kiermeier i sar., 2006), tako i u slučaju ovaca (Hadley i sar., 1997; Byrne i sar., 2007). U nedavnom istraživanju u dve klanice u Srbiji, takođe je utvrđeno značajno povećanje kontaminacije mesa trupova sa TVC i *Enterobacteriaceae* (za 1 log cfu/cm² i 0,5 log cfu/cm²) na onim trupovima čija je koža bila zaprljana obimnim naslagama suve ili vlažne nečistoće u odnosu na druge trupove čija je koža bila čista i suva, ali se ovakav zaključak nije mogao izvesti i u pogledu prevalence *E. coli* O157 na koži i korespondentnim trupovima (Blagojevic i sar., neobjavljeni podaci). Ovo ukazuje da pitanje uticaja vizuelne čistoće kože na mikrobiološki status kože ili trupa može biti

od značaja samo kada se posmatra ukupna kontaminacija kože/trupa sa određenim nivoima opšte ili fekalne mikroflore. U pogledu prisustva bakterijskih patogena na koži, situacija je drugačija - dokazano da kontaminacija kože sa njima često nastaje u kratkom vremenskom periodu pre klanja (tokom transporta, u stočnom depou, koridorima i boksu za omamljivanje). Zbog toga je učešće tog izvora kontaminacije kože znatno veće u odnosu na inicijalnu kontaminaciju koja vodi poreklo sa farme, na kojoj najčešće i dolazi do vidljivog zaprljavanja kože ([Avery i sar., 2002; Arthur i sar., 2008](#)). Iz tog razloga se ne može povući paralela između vizuelne čistoće kože i njene kontaminacije (ili kontaminacije mesa trupa) sa bakterijskim patogenima u momentu njenog skidanja.

Direktni dokazi intenzivne unakrsne kontaminacije koja se redovno dešava između površina/opreme/radnika u klanici, kože goveda i mesa trupova goveda sa bakterijskim patogenima, dobijeni su primenom molekularne epidemiologije, odnosno genotipskim poklapanjem izolata iz svih ovih izvora ([Barkocy-Gallagher i sar., 2001; Tutenel i sar., 2003; Avery i sar., 2004; Arthur i sar., 2008](#)). Za većinu tih izolata glavni izvor je bila sama sredina klanice (transport, depo i boks za omamljivanje), a zatim, direktno ili indirektno (uključujući i preko kože), ovi izolati dospevaju i na meso trupova goveda. Ovo jasno ukazuje da vizuelni i mikrobiološki status kože koji životinja stiče na farmi porekla ne mora da bude od primarnog značaja za kontaminaciju finalnih trupova sa patogenima. [Arthur i sar. \(2008\)](#) su u sveobuhvatnom istraživanju u kome su ispitali skoro sve ključne izvore i tačke u kojima se događa kontaminacija sa *E. coli* O157 i *Salmonella* spp. (feces na farmama; površine u transportnim vozilima i stočnim depoima; kožu goveda na farmi, u transportu i depou; i trupove nakon skidanja kože) primenom molekularnih metoda praćenja definisali i kvantifikovali uticaj svakog od ovih faktora u kontaminaciji kože i trupova sa ova dva patogena. Utvrđeno je da je za 47% i 67% izolata *E. coli* O157, kao i za 65% i 84% izolata *Salmonella* spp. sa kože i trupova, izvor bio samo stočni depo klanica u kojima je vršeno istraživanje.

1.5. Koža goveda kao sporedni proizvod u industriji mesa

Koža goveda je veoma važan i ekonomski najvredniji sporedni proizvod u klaničnoj industriji. Kod goveda ona iznosi od 5,1% do 8,5%, u proseku 7% klanične mase životinja ([Liu i Ockerman, 2001](#)). Koža goveda se kao sirovina koristi u kožarskoj industriji za izradu kožne galerije, garderobe i cipela, a takođe se zbog velike količine kolagena upotrebljava za proizvodnju veštačkih kolagenskih creva za kobasice. Iz kolagena se hidrolizom dobija želatin koji se upotrebljava u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

Koža goveda, kao i svi ostali sporedni proizvodi klanja životinja, podležu Evropskoj Regulativi 1774/2002 koja propisuje njihovo sakupljanje, transport, čuvanje, rukovanje sa njima, preradu i upotrebu ili odbacivanje ([EC, 2002](#)). Prema ovoj regulativi, koža je svrstana u grupu sporednih proizvoda kategorije 3 (najnižeg rizika), osim ukoliko potiče od životinja sumnjivih ili inficiranih sa TSE bolestima kada potпадa pod sporedne proizvode kategorije 1 (najvišeg rizika) koji se tretiraju u kafilerijama (133°C, 3 bara, 20 minuta) i/ili spaljuju.

Proces prerade kože u kožarskoj industriji se sastoji iz više faza ([Liu i Ockerman, 2001](#)). Nakon skidanja sa trupa koža se hlađi i pere, a zatim se sa njene unutrašnje strane odstranjuju subkutis, masno i mišićno tkivo. S obzirom da je sirova koža veoma kontaminirana mikroorganizmima, radi zaustavljanja bakterijskih i enzimskih procesa degradacije i kvara kože, brzo se pristupa njenom konzervisanju. Kože se najčešće konzervišu soljenjem sa kuhinjskom soli, a zatim slažu jedna na drugu sa subkutisom prema gore (slaganje dlaka na dlaku). Nakon konzervisanja, pristupa se štavljenju kože. Prvi korak u štavljenju je potapanje koža u ovalnim bazenima koji su napunjeni vodom i dezinficijensima, pri čemu se kože stalno pokreću, a ceo postupak traje 8-20 sati da se omogući da koža apsorbuje dovoljno vode. Nakon toga se kože ispiraju i uklanja se prljavština, naslage fecesa, so i krv, a zatim se odstranjuje dlačni pokrivač. Najčešća se za hemijsku depilaciju koriste natrijum sulfid i kalcijum hidroksid, a u novije vreme i kalijum cijanat i magnezijum peroksid. Nakon depilacije i uklanjanja ovih alkalnih sredstava, kože se potapaju u rastvore kiselina radi snižavanja pH, a u cilju boljeg prihvatanja hroma koji je glavno sredstvo za štavljenje koža. Glavni cilj ovih operacija je pretvaranje kolagenih

vlakana kože u stabilna i čvrsta vlakna koja kasnije neće biti podložna procesima degradacije. Nakon štavljenja sledi još nekoliko fizičkih i hemijskih procesa u obradi kože posle čega ona dobija konačan izgled. Ceo proces prerade kože u kožarskoj industriji, od sirove kože u klanici do finalnog proizvoda, u proseku traje oko četiri sedmice (Liu i Ockerman, 2001).

Kožu izgrađuju tri sloja: *epidermis*, *corium* i *subcutis*. U kožarstvu se pri obradi kože odstranjuju deo epidermisa i subkutis, a koriste se korijum i zrnasti sloj epidermisa uz korijum (McEvoy i sar. 2003c). Struktura i jačina kože veoma zavise od korijuma, dok površinski zrnasti sloj obezbeđuje dobar estetski izgled koži. Zbog toga će svako oštećenje korijuma imati za rezultat da koža nakon obrade bude slaba i krta, a usled oštećenja ili odsustva zrnastog sloja koža najčešće ima čupav izgled (McEvoy i sar. 2003c). Ovo se mora imati u vidu prilikom izbora antimikrobnog tretmana kože na liniji klanja, koji ne sme imati negativnog uticaja na komercijalnu vrednost i kasniju upotrebu kože u kožarskoj industriji.

1.6. Zaključni komentar

Neophodnost da se osigura mikrobiološka bezbednost mesa neizbežno vodi ka intenzivnim istraživanjima u cilju utvrđivanja načina i mera za unapređenje mikrobiološkog statusa obrađenih trupova na liniji klanja. Razumevanje izvora, puteva i rizičnih faktora kontaminacije mesa trupova mikroorganizmima tokom procesa klanja i obrade značajno se menjalo tokom proteklih desetak godina. Korišćenje savremenih metoda molekularne epidemiologije i kvantitativne ocene mikrobioloških rizika, omogućilo je do izvesne mere rizično rangiranje izvora i puteva kontaminacije i identifikaciju - a ponekad i kvantifikaciju - ključnih među njima. Pri tome, najveća pažnja je obraćana na bakterijske patogene od najvećeg značaja u lancu goveđeg mesa, VTEC (uglavnom *E. coli* O157) i *Salmonella*.

Opšti model kontaminacije mesa goveđih trupova počinje sa životinjama koje putem fecesa izlučuju enterične patogene, ponekad i sa nivoima preko 10^6 /gr. Zatim se fekalno kontaminira koža tih goveda, materijali/površine u okruženju životinja, kao i unakrsno koža ostalih životinja u toj grupi ili drugim grupama koje kasnije borave u istom prostoru. Objavljeni podaci ukazuju na veoma varijabilnu učestalost *E. coli* O157 i *Salmonella* spp. na koži goveda u momentu njenog skidanja na liniji klanja,

sa prosekom na osnovu raznih studija od oko 50% . Mikroflora kože goveda redovno uključuje preko 6 log cfu/cm² TVC, 4 log cfu/cm² *Enterobacteriaceae* i 3 log cfu/cm² generičke *E. coli*. Tokom klanja, prva tačka u kojoj nastaje površinska mikrobiološka kontaminacija mesa goveđih trupova, uključujući i sa bakterijskim patogenima, je inicijalno zarezivanje i skidanje kože, kada se direktno i/ili indirektno mikroorganizmi sa kože prenose na meso. Nivo kontaminacije mesa goveđih trupova iznosi u proseku oko 3 log cfu/cm² ukupne i oko 2 log cfu/cm² fekalne mikroflore, a u pogledu patogena oko 15-20% *E. coli* O157 i *Salmonella* spp. Od nivoa početne kontaminacije trupova alimentarnim patogenima značajno zavise nivo kontaminacije proizvoda na kraju lanca goveđeg mesa i izloženost potrošača tim patogenima. Zbog toga je značaj kože goveda, kao glavnog faktora mikrobiološkog statusa mesa trupova, u ukupnoj bezbednosti goveđeg mesa veoma veliki. Stoga je razumljivo da se može očekivati da će svaka mera koja doprinosi smanjenju mikrobiološke kontaminacije kože i/ili smanjenju prenosa mikroflore sa kože na meso trupa značajno smanjiti rizik od alimentarnih oboljenja u potrošača.

2. Kontrolne mere za mikrobiološke alimentarne patogene u lancu goveđeg mesa

2.1. Uvod

Složenost lanca goveđeg mesa onemogućuje efikasnu kontrolu mikrobiološke kontaminacije mesa primenom kontrolnih mera samo na jednoj tački tog lanca. Zbog toga je nephodno koordinisano primeniti višestruke kontrolne mere na multiplim tačkama duž celog lanca goveđeg mesa, da bi se osigurala njegova maksimalna bezbednost. Ovaj longitudinalni i integrисani pristup u bezbednosti hrane je danas je dobro prepoznat i široko prihvaćen ([Buncic, 2006](#)). U lancu goveđeg mesa, ovaj pristup obuhvata specifične kontrolne mere primenljive u svim glavnim fazama lanca: životnoj sredini i kod životinja na farmi, u fazi između farme i klanice (transport i boravak u stočnom depou), operaciji klanja životinja i obrade trupova, preradi mesa u finalne proizvode, distribuciji i rukovanju mesom u maloprodaji, kao i rukovanju i pripremi proizvoda od mesa kod potrošača. Globalni principi za kontrolu mikrobioloških alimentarnih patogena u lancu mesa uključuju sledeće ([Koutsoumanis i sar., 2006](#)):

- a) kontrola izvora kontaminacije mesa i primena mera za smanjenje verovatnoće da se kontaminacija dogodi (sanitacija, higijenska praksa i pakovanje proizvoda);
- b) primena tretmana koji redukuju inicijalnu kontaminaciju mesa trupova (mere dekontaminacije);
- c) primena tretmana za eliminaciju ili inaktivaciju mikroorganizama u proizvodima od mesa (termički tretmani, itd.); i
- d) primena tehnologija koje sprečavaju ili usporavaju razmnožavanje mikroorganizama prisutnih u proizvodima od mesa (kontrolom faktora potrebnih za njihovo razmnožavanje).

Prilikom odabira koje će se mere zaista primenjivati u praksi, moraju se uzeti u obzir i tehničke mogućnosti, efektivnost kontrolnih mera za unapređenje bezbednosti i uticaj na kvalitet proizvoda, kao i bezbednost radnika, ekološka pitanja, stav i ponašanje potrošača i analiza koristi i troškova u vezi svake mere. Takođe,

neki aspekti ovih kontrolnih mera su patogen-specifični. Patogeni kao što su *E. coli* O157, *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp. se najefikasnije kontrolišu primenom kontrolnih mera u „pre-harvest“ i „harvest“ fazi (naročito na klanici), dok su za *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp. i *Staphylococcus aureus* glavne mere kontrole fokusirane na kasnije faze lanca mesa ([Nørrung i sar., 2009](#)).

2.2. Kontrolne mere u „pre-harvest“ fazi

Primarni izvor alimentarnih patogena u lancu goveđeg mesa su zdrava goveda fekalni izlučivači ovih patogena. Glavni principi kontrole patogena u „pre-harvest“ fazi mogu imati različite ciljeve: redukciju patogena u sredini, sprečavanje kontakta životinja sa njima, a ako je već došlo do kolonizacije životinja, efikasnu inhibiciju razmnožavanja patogena u životnjama, ili eliminaciju iz njih ([Nørrung i sar., 2009](#)). U cilju kontrole patogena u goveda na farmi, ne postoji jedna univerzalna i pouzdana mera, već se mora kombinovati više njih. Glavni principi i kontrolne mere za alimentarne patogene u „pre-harvest“ fazi, ukratko su prikazani na [grafikonu 3](#).

2.2.1. Sprečavanje recirkulacije patogena u životnoj sredini

Goveda mogu biti izložena mikrobiološkim patogenima putem kontaminirane paše, iz druge hrane za životinje i kontaminirane vode. Svim ovim izvorima doprinosi prethodno korišćenje netretiranih farmskih i/ili klaničnih animalnih otpadnih materijala, koji sadrže enterične patogene, kao đubriva na poljoprivrednom zemljištu. Stoga je glavna kontrolna mera za prekidanje širenja patogena u ciklusu životinje-sredina-životinje, pravilno skladištenje stajnjaka i njegovo kompostiranje, čime se u njemu postiže temperatura od 55-60°C koja uništava većinu vegetativnih formi bakterijskih patogena („autosterilizacija“ stajnjaka), kao i poštovanje preporuka za dinamiku i načine iznošenja stajnjaka sa farme ([Nørrung i sar., 2009](#)).

2.2.2. Sprečavanje unošenja i širenja patogena na farmi

Goveda fekalni izlučivači su jedan od glavnih izvora alimentarnih patogena na farmi. Stoga životinje treba da se nabavljuju samo iz poznatih i kontrolisanih izvora. Takođe, savetuje se korišćenje sistema „sve životinje unutra, sve napolje“ sa

primenom efikasne sanitacije između grupa životinja. Životinje koje se gaje na otvorenom ne treba da imaju pristup kontaminiranoj vodi, paši, stajnjaku ili otpadnim vodama sa farme. Mora postojati i efikasna kontrola štetočina (posebno glodara i ptica) koji su prirodni rezervoari i/ili vektori za neke patogene (sistem biosigurnosti) ([Nørrung i sar., 2009](#)). Takođe, moraju se obezbediti optimalni zoohigijenski uslovi: čisti, dobro provetreni objekti izgrađeni na takav način da se svede na minimum unakrsna kontaminacija između životinja, suva prostirka koja se što češće menja, kao i stalno i efikasno čišćenje i sanitacija ([Adam i Brülisauer, 2010](#)). Ove mere, zajedno sa podešavanjem ishrane pre klanja, smanjuju rizik od nagomilavanja nečistoće i enteričnih patogena (ako ih ima na farmi) na koži goveda. Dalje, ne sme biti mešanja životinja, naročito starijih i mlađih (zbog stresa), kao i novonabavljenih sa starim (zbog unakrsne kontaminacije potencijalno patogen-pozitivnih sa govedima koja nisu kolonizirana patogenima). Treba sprečavati i kontakt između životinja (povećanjem prostora u kome borave), jer je poznato da bliski kontakt između njih u ograničenom prostoru, na primer u „feedlot“ sistemima držanja u SAD, doprinosi širenju patogena u grupi u odnosu na slobodni pašni način držanja.

2.2.3. Sprečavanje ingestije patogena od strane goveda

Nabavka hrane za životinje iz kontrolisanih izvora, njeno pravilno čuvanje i zaštita od kontaminacije i štetočina do upotrebe, kao i kontrola pijače vode, su važni elementi osiguranja bezbednosti mesa na farmi. Takođe, hrana se može podvrgnuti izvesnim antimikrobnim tretmanima kao što su fermentacija (silaža), acidifikacija i termički tretmani, a pijača voda se može hlorisati ([Nørrung i sar., 2009](#)).

2.2.4. Sprečavanje razmnožavanja patogena u digestivnom traktu goveda

Objavljene su sugestije da se prisustvo i/ili nivo izlučivanja patogena fecesom u goveda može donekle kontrolisati ishranom. Međutim, stvarna važnost određenih hraniva za nivo fekalnog izlučivanja patogena (na primer, da li je izlučivanje *E. coli* O157 veće nakon ishrane zrnastim hranivima, silažom ili senom), još uvek nije jasno utvrđena ([Nørrung i sar., 2009](#)). Takođe, nagle promene režima ishrane i gladovanje doprinose razmnožavanju patogena u digestivnom traktu, najverovatnije zbog poremećaja ravnoteže u crevnoj mikroflori ([Adam i Brülisauer, 2010](#)).

Upotreba živih korisnih bakterija („probiotika“) u ishrani životinja ima za cilj da promoviše njihov rast i razmnožavanje u digestivnom traktu, a one svojim antagonističkim delovanjem kroz princip „konkurentnog isključivanja“ dovode do redukcije broja ćelija patogena. Probiotici modifikuju uslove sredine u digestivnom traktu, konkurišu za mesta pričvršćivanja za sluzokožu creva i takmiče se za hranljive materije, a neki takođe i direktno deluju inhibitorno na patogene proizvodnjom bakteriocina, antibiotika i isparljivih nižih masnih kiselina ([Callaway i sar., 2003](#)). S druge strane, „prebiotici“ (na primer, inulin i različiti oligosaharidi) su hranljive materije koje, kada se dodaju u hranu za životinje, stimulišu rast i razmnožavanje normalne i korisne mikroflore i time sprečavaju kolonizaciju patogena ([Callaway i sar., 2003](#)).

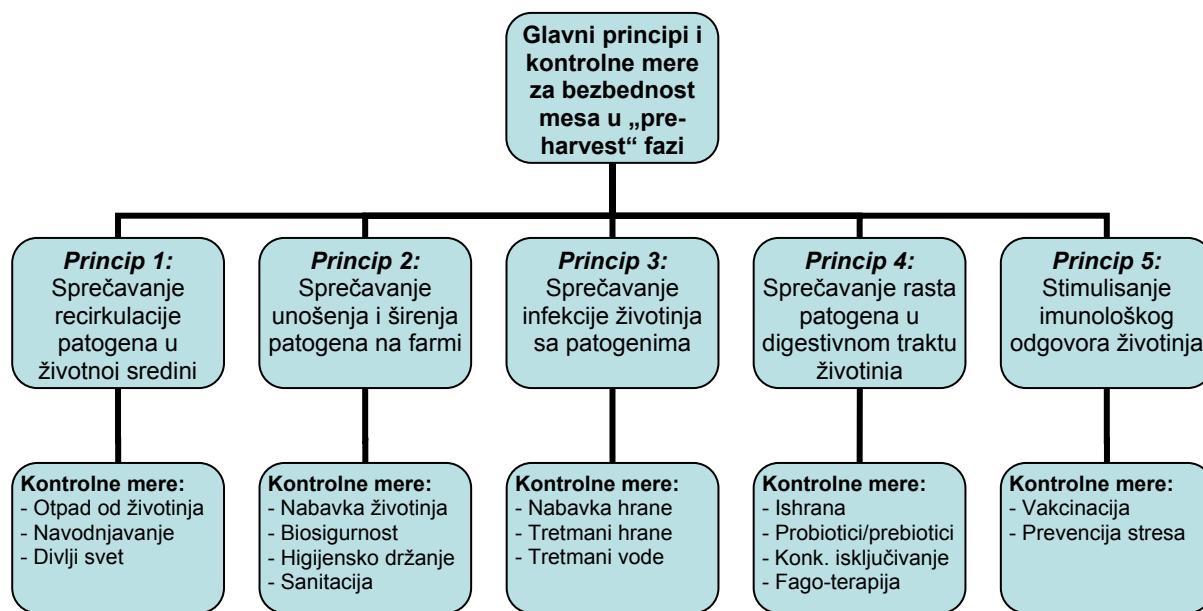
Bakteriofagi su virusi koji napadaju i uništavaju specifične bakterije i normalno se nalaze u crevnoj mikroflori životinja. Terapija bakteriofagima je pokazala određenu efikasnost u kontroli nekih alimentarnih patogena u farmskih životinja (na primer *E. coli* O157), ali su istraživanja u ovom pravcu još uvek na početku ([Nørrung i sar., 2009](#)). Moguća je i upotreba antimikrobnih sredstava (antibiotika) u cilju kontrole patogena i povećanja produktivnosti životinja. Međutim, iako se dodavanje antibiotika u hranu za životinje preporučuje i koristi u nekim zemljama (na primer u SAD) ([Callaway i sar., 2003](#)), ovaj pristup ima negativan efekat na zdravlje životinja i može dovesti do razvoja i širenja rezistencije kod patogena, pa je stoga zabranjen u EU i nekim drugim zemljama ([Nørrung i sar., 2009](#)).

S obzirom da je poznato da je glavno mesto kolonizacije *E. coli* O157 u digestivnom traktu goveda rekto-analni spoj, i da je kolonizacija ove regije direktno povezana sa statusom „super izlučivača“ u goveda ([Naylor i sar., 2003; Low i sar., 2005](#)), mogući antimikrobni tretman (na primer, ispiranje rektuma hlorheksidinom) lokalno u toj regiji bi mogao biti efikasan za sprečavanje kolonizacije i izlučivanje ovog patogena putem fecesa ([Naylor i sar., 2007](#)).

2.2.5. Stimulisanje imunološkog odgovora goveda

Specifična imunizacija protiv alimentarnih patogena koji ne izazivaju oboljevanje životinja je problematična. Poznato je da *E. coli* O157 u digestivnom traktu prirodno ne izaziva imuni odgovor u goveda, dok *Salmonella* spp. može preživeti u organizmu i pored postojećeg imunog odgovora ([Callaway i sar., 2003](#)).

Međutim, vakcine protiv nekih sojeva *Salmonella* spp. koje izazivaju oboljevanje goveda efikasno se primenjuju ([Nørrung i sar., 2009](#)), a vakcina zasnovana na tipu 3 sekretornog proteina *E. coli* O157 neophodnom za pričvršćivanje bakterije za zid creva, pokazala je izvesnu efikasnost i koristi se u Kanadi, ali ne u SAD i Evropi ([Rogan i sar., 2009](#)). Dodatno, poznato je da stres u životinja uzrokuje pad imuniteta, poremećaj ravnoteže normalne crevne mikroflore i posledično umnožavanje i izlučivanje patogena, tako da je prevencija stresa važan elemenat farmskog sistema bezbednosti mesa.



Grafikon 3. Glavni principi i mere za kontrolu mikrobioloških alimentarnih patogena u „pre-harvest“ fazi (prilagođeno od [Nørrung i sar., 2009](#))

2.3. Kontrolne mere u „harvest“ fazi

„Harvest“ faza predstavlja verovatno ključni proces u pogledu kontrole mikrobiološke kontaminacije goveđeg mesa bakterijskim alimentarnim patogenima koja doprinosi sprečavanju/redukciji njihovog daljeg prenosa do potrošača. Kontrolne mere u ovoj fazi moraju biti tako koncipirane da se smanji mogućnost kontaminacije trupova i sirovog mesa; da se smanji ili eliminiše kontaminacija kada se dogodi (dekontaminacija, sanitacija); i da se inhibiše razmnožavanje bakterija u mesu putem održavanja „hladnog lanca“ ([Sofos i Geornaras, 2010](#)). Glavni principi i kontrolne mere za alimentarne patogene u „harvest“ fazi su zbirno prikazani na [grafikonu 4](#).

2.3.1. Sprečavanje/smanjenje širenja patogena tokom transporta i u depou

Utovar životinja u transportna vozila, transport do klanice ili stočne pijace i boravak životinja na stočnoj pijaci i u stočnom depou klanice značajno utiču na povećanje fekalne ekskrecije i prevalence patogenih bakterija u fecesu i na koži ([Small i sar., 2002](#); [Barham i sar., 2002](#)). Ovo najčešće nastaje usled stresa, tako da rukovanje životnjama u ovoj fazi mora da se obavlja poštujući principe dobroti životinja, da se spriči ili smanji njihov stres. Takođe, u ovoj fazi su životinje često u bliskom međusobnom kontaktu, kao i sa površinama u objektima u kojima su smeštene, pa redovno dolazi do unakrsne kontaminacije životinja-životinja i životinja-površine-životinja ([Collis i sar., 2004](#)). U cilju smanjenja verovatnoće kontakata i unakrsne kontaminacije, preporučuje se nemešanje životinja iz različitih grupa i kategorija, izbegavanje pretrpavanja u objektima, izbegavanje prodaje na stočnim pijacama, što kraći transport do stočnog depoa, kao i što kraći boravak u njemu pre klanja ([Nørrung i sar., 2009](#)). Pravilna konstrukcija objekata sa materijalima koji se lako čiste i dezinfikuju, kao i njihova što češća i efikasna sanitacija su neophodne mere, premda je utvrđeno da *E. coli* O157 i *Salmonella* preživljavaju na površinama depoa i nakon rutinske sanitacije ([Small i sar., 2003](#); [Tutenel i sar., 2003](#)). Takođe, jedna od mera koja se koristi u cilju smanjenja kontaminacije fecesom je hranjenje suvim hranivima nekoliko dana pre klanja ([Davies i sar., 2000](#)) i uskraćivanje hrane tokom transporta i 12 h pre klanja ([Codex Alimentarius, 2005](#)). Ove mere utiču na smanjenje količine fecesa i njegovu čvršću konzistenciju, čime se spričava vizuelno

zaprljavanje kože, a takođe se smanjuje i količina sadržaja u digestivnom traktu i posledično rizik od probijanja njegovog zida tokom evisceracije. Međutim, gladovanje može povećati izlučivanja patogena putem fecesa kod goveda (Adam i Brülisauer, 2010).

2.3.2. Sprečavanje/smanjenje ukupne unakrsne kontaminacije u klanici

Životinje za klanje su primarni izvor mikrobiološke kontaminacije klanice, a naročito linije klanja. Kada se jednom kontaminira, sredina u klanici služi kao sekundarni izvor mikrobiološke kontaminacije trupova (Buncic, 2006). Kroz analizu informacija o životinjama pre klanja („Informacije iz lanca hrane“), grupe životinja se mogu rangirati na osnovu rizika koji predstavljaju u pogledu zoonotskih patogena, uključujući i alimentarne (*E. coli* O157, *Salmonella* spp. i drugi). Bitne informacije iz lanca hrane uključuju podatke o kretanju životinja od rođenja (prodaje, preseljenja), epidemiološke podatke (zdravstveni status stada; alimentarni patogeni na farmi); kao i podatke o sistemima kvaliteta i bezbednosti na farmi porekla (kontrola zemljišta, biosigurnost, ishrana i zoohigijenski uslovi) (Nørrung i sar., 2009). Na osnovu ovih informacija, grupe životinja se rizično rangiraju: kategorija niskog rizika u pogledu patogena mogu se klati u posebnim klanicama ili u istoj klanici, ali odvojeno (pre) grupa životinja visokog rizika. Ovaj pristup se naziva „logističko klanje“ (Swanenburg i sar., 2001).

Takođe, potpuno fizičko odvajanje prljavih (depo) i čistih zona (linija klanja) u klanici, uključujući sprečavanje kretanje osoblja, opreme i vazdušnih struja između tih zona, je veoma važna mera smanjivanja ukupne unakrsne kontaminacije (Nørrung i sar., 2009).

Klanje samo vizuelno čistih životinja je neophodan preduslov za smanjenje ukupne kontaminacije na klanici (Davies i sar., 2000), što je i preporuka Komisije Codex Alimentarius (2005), ali i regulatorna obaveza za farme i klanice (EC, 2004a, b). Prljave životinje se pre klanja moraju očistiti, ali je dokazano da pranje i šišanje životinja pre klanja nisu efikasni u redukciji mikrobiološke (već samo vizuelne) kontaminacije kože, uzrokuju stres kod životinja i nisu bezbedni za radnike (Buncic, 2006). Međutim, pošto su prljave životinje ozbiljan izvor prljanja klanice i potencijalno mikrobiološke kontaminacije mesa trupova, izvesno čišćenje takvih životinja pre klanja je neophodno (Gill, 2004). U nekim velikim klanicama se čak primenjuje

kvašenje prljave kože goveda vodom u kabinetima sa tuševima (nakon omamljivanja), u cilju sprečavanja stvaranja praštine sa kože i njenog aerogenog širenja na liniji klanja ([Byelashov i Sofos, 2009](#)), ali voda može olakšati prenos kontaminacije na trupove.

2.3.3. Sprečavanje/smanjenje kontaminacije trupova na liniji klanja

S obzirom da je koža goveda najznačajniji izvor mikrobiološke kontaminacije mesa trupova, neki istraživači veruju da su antimikrobni tretmani kože (nakon klanja, a pre skidanja) najefikasniji način da se spreči ili značajno smanji ova kontaminacija i ukupno poboljša mikrobiološki status trupova ([Koohmaraie i sar., 2005](#); [Small i sar., 2005](#); [Antic i sar., 2010a](#)). Takođe, prevencija ili redukcija mikrobiološke kontaminacije mesa trupova direktno zavisi od procesne higijene na liniji klanja uključujući higijenske postupke tokom svih operacija klanja i obrade ([Gill i sar., 1996](#); [Blagojevic i sar., 2011](#)). Najčešće kritične tačke u pogledu mikrobiološke kontaminacije trupova na liniji klanja goveda su skidanje kože, evisceracija i hlađenje, pa stoga i glavne kontrolne mere za sprečavanje ili smanjenje ove kontaminacije uključuju:

- a) sprečavanje direktnog i/ili indirektnog kontakta kože sa mesom;
- b) sprečavanje izlaska sadržaja iz digestivnog trakta (podvezivanje rektuma i jednjaka i pravilna evisceracija); i
- c) sprečavanje kontaminacije putem „fizičkih“ vektora, kao što su vazduh, alati, oprema, radnici, a takođe i kontakt između trupova ([Nørrung i sar., 2009](#)).

Primena dobre higijenske prakse uključuje i redovnu i efikasnu sanitaciju i sterilizaciju noževa, alata i opreme između trupova, u cilju sprečavanja unakrsne kontaminacije.

2.3.4. Eliminacija ili sprečavanje razmnožavanja patogena na obrađenim trupovima

Mikrobiološka kontaminacija trupova primenom samo dobre higijenske prakse se u uslovima komercijalne klanice može svesti na minimum, ali se ne može potpuno sprečiti. Zbog želje regulatornih tela i/ili proizvođača mesa da se mikrobiološki rizici još dodatno smanje, postupci dekontaminacije mesa trupova na liniji klanja privlače

sve više pažnje ([Nørrung i sar., 2009](#)). Dekontaminacija obrađenih trupova je u SAD preporučena u propisima i rutinski se koristi ([FSIS, 2002](#)); u EU ovo nije slučaj, ali je dozvoljena propisima ([EC, 2004a](#)). Dekontaminacija mesa trupova se uglavnom primenjuje na sledećim tačkama ([Byelashov i Sofos, 2009](#)):

a) Odmah nakon skidanja kože, a pre evisceracije, da se spreči pričvršćivanje bakterija za meso trupova; - najčešće se mesta vidljive kontaminacije površinski isecaju nožem ili vakumiraju vrućom parom ([Sofos i Smith, 1998](#); [Belk, 2001](#)), a dodatno se i ceo trup može dekontaminirati ([Bosilevac i sar., 2006](#)).

b) Nakon rasecanja trupova, a pre hlađenja, polutke se mogu podvrgnuti tretmanu dekontaminacije.

c) Tokom ili nakon hlađenja trupova; opisani su postupci simultanog hlađenja i dekontaminacije ([Stopforth i sar., 2004](#)) ili dekontaminacije nakon hlađenja, a pre rasecanja ([Gill i Badoni, 2004](#)).

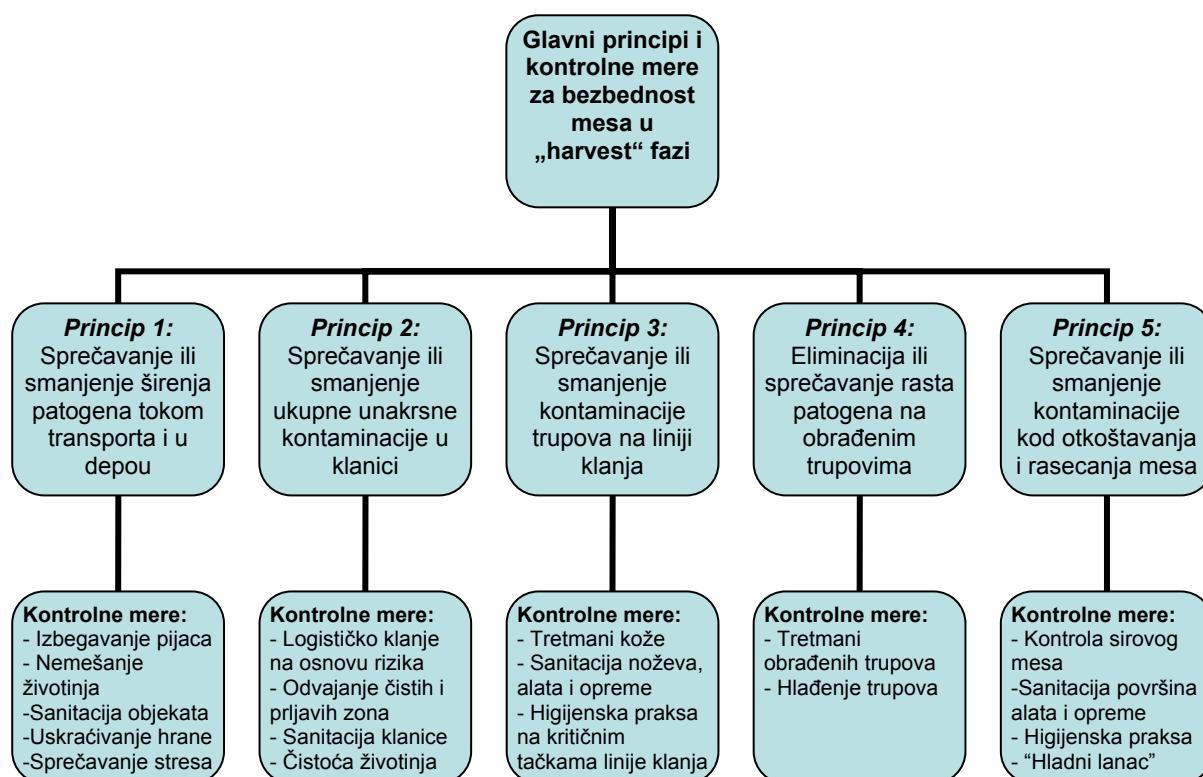
Za dekontaminaciju mesa trupova se mogu koristiti različiti metodi (fizički, hemijski), a u literaturi je opisan veliki broj tretmana. Na primer, pranjem vrućom vodom ($\geq 74^{\circ}\text{C}$) postignuta je redukcija ukupne mikroflore od 1-3 log cfu/cm² zavisno od načina primene ([Sofos i Smith, 1998](#)), dok neki drugi autori iznose da je dekontaminacija vodenom parom pod pritiskom („pasterizacija parom“) najefikasniji tretman trupova ([Retzlaff i sar., 2005](#)). Za dekontaminaciju hemijskim (antimikrobnim) sredstvima, opisani su postupci uz korišćenje hlor dioksida, organskih kiselina, trinatrijum fosfata, vodonik peroksida, CPC, ozonirane vode i drugih, a objavljene mikrobiološke redukcije su na nivou 2-3 log cfu/cm² ([Byelashov i Sofos, 2009](#)). Ima tvrdnji da neki od hemijskih tretmana, pored trenutnog antimikrobnog delovanja, ima i odloženo (konzervišuće) dejstvo tokom čuvanja trupova/mesa, ali su ti efekti nedovoljno dokazani, varijabilni i nepouzdani. Veoma važno je imati na umu da su - kod svih dekontaminacionih tretmana - uvek zabeležene znatno bolje redukcije generalne mikroflore ili mikroorganizama kvara mesa, nego redukcije alimentarnih patogena. Ova činjenica, iako nedovoljno objašnjena, ima veliki značaj kod razmatranja ukupnih benefita za bezbednost mesa koji se mogu očekivati od dekontaminacije mesa trupova.

S druge strane, bez obzira da li su trupovi bili podvrgnuti dekontaminaciji ili ne, njihovo hlađenje je neophodno u cilju sprečavanja ili inhibicije razmnožavanja patogenih mikroorganizama; treba da otpočne odmah nakon završene obrade trupa, a u SAD najduže do 1 h nakon iskrvarenja životinje ([FSIS, 2002](#)). Hlađenjem se

temperatura trupa goveda mora spustiti ispod 10°C u prva 24 h, odnosno ispod 7°C za 36 h, jer se ovom temperaturom sprečava razmnožavanje većine bakterijskih alimentarnih patogena (Buncic, 2006).

2.3.5. Sprečavanje/smanjenje kontaminacije kod otkoštavanja i rasecanja mesa

Otkoštavanje i rasecanje trupova se najčešće vrši nakon završenog hlađenja, a u okviru novijih tehnologija i pre hlađenja („toplo otkoštavanje“). Glavne kontrolne mere za sprečavanje/redukciju mikrobiološke kontaminacije u ovoj fazi obuhvataju kontrolu sirovog mesa koje se doprema na otkoštavanje/rasecanje; pravilnu i higijensku praksu radnika; što češću sanitaciju radnih površina, alata i opreme tokom radnog dana; održavanje „hladnog lanca“ tokom rasecanja, odnosno temperatura u prostoriji ne sme biti viša od 12°C, a u mesu se ne sme povisiti preko 7°C tokom rasecanja; takođe, rasečeno meso treba što pre otpremiti na dalje hlađenje (Nørrung i sar., 2009).



Grafikon 4. Glavni principi i mere za kontrolu mikrobioloških alimentarnih patogena u „harvest“ fazi (prilagođeno od Nørrung i sar., 2009)

2.4. Kontrolne mere u „post-harvest“ fazi

Glavni principi kontrolnih mera u „post-harvest“ fazi imaju za cilj sprečavanje unošenja dodatne kontaminacije u proizvod od mesa, kao i smanjenje ili eliminaciju postojeće kontaminacije primenom različitih tehnologija prerade mesa u proizvode. Za većinu proizvoda od mesa je neophodno i održavanje „hladnog lanca“ do krajne konzumacije, u cilju inhibisanja razmnožavanja bakterija u njima ([Sofos i Geornaras, 2010](#)). Glavni principi i kontrolne mere za alimentarne patogene u „post-harvest“ fazi, ukratko su prikazani na [grafikonu 5.](#)

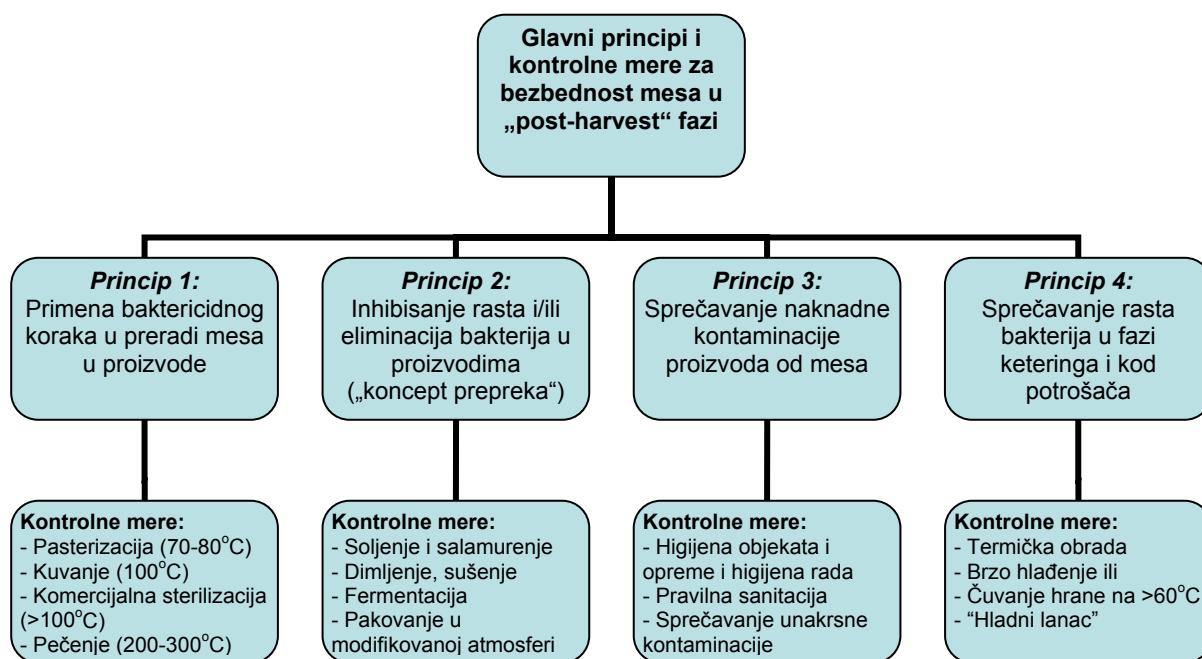
2.4.1. Antimikrobni aspekti tehnologija prerade mesa

Principi kontrolnih mera tokom prerade mesa u proizvode obuhvataju primenu baktericidnog koraka (najčešće termički tretman) tamo gde je to moguće; podešavanje nekih faktora (kiselost, aktivnost vode, prisustvo kiseonika, dodavanje antimikrobnih supstanci - soli, nitrita, bakteriocina, sastojaka dima, itd.) u cilju inhibisanja ili eliminacije patogena; sprečavanje naknadne kontaminacije gotovog proizvoda tokom narezivanja i/ili pakovanja (higijena objekata, površina, opreme i higijenska praksa tokom rada); i održavanje „hladnog lanca“ za proizvode za koje je to neophodno. Tehnologije koje se koriste u preradi mesa uključuju soljenje, salamurenje, dimljenje, sušenje, fermentaciju i/ili termički tretman, a najčešće njihove kombinacije ([Nørrung i sar., 2009](#)). U najvećem broju slučajeva, u proizvodima koji se ne podvrgavaju baktericidnom tretmanu, kontrola mikrobioloških rizika se ne može postići kroz primenu samo jednog faktora (na primer, niske temperature ili niskog pH). Međutim, bezbednost finalnog proizvoda se može postići kombinovanjem više antimikrobnih faktora, odnosno primenom „koncepta višestrukih prepreka“.

2.4.2. Kontrolne mere na nivou keteringa i potrošača

Opšti principi za kontrolu mikrobioloških alimentarnih patogena u hrani u fazi keteringa i kod potrošača su zajednički za sve vrste namirnica, uključujući i od mesa. Efektivna sanitacija, adekvatna termička obrada, sprečavanje unakrsne

kontaminacije (posebno sa sirove na hranu pripremljenu za konzumiranje i putem radnih površina, ruku, noževa i kuhinjskih krpa), pravilno rukovanje hranom nakon pripreme (brzo hlađenje u frižideru ili čuvanje na $>60^{\circ}\text{C}$ do konzumacije) i stalno održavanje „hladnog lanca“ za hranu za koju je to neophodno, su glavne kontrolne mere u ovoj fazi ([Nørrung i sar., 2009](#); [Sofos i Geornaras, 2010](#)).



Grafikon 5. Glavni principi i mere za kontrolu mikrobioloških alimentarnih patogena u „post-harvest“ fazi

2.5. Opšti principi upravljanja bezbednošću mesa u pogledu mikrobioloških rizika

Moderni sistem bezbednosti mesa uključuje longitudinalni i integrisani pristup zasnovan na oceni rizika. U njemu glavnu odgovornost za bezbednost mesa ima proizvođač, koji mora da zadovoljava odnosne regulatorne zahteve i implementira sisteme zasnovane na GMP/GHP i HACCP-u, dok je uloga Vlada više savetodavna i okrenuta zvaničnim kontrolama i audiciji ovih sistema ([Buncic, 2006](#)). U ovakovom sistemu, koji je prihvaćen u svim relevantnim naučnim, regulatornim i komercijalnim

krugovima, kontrolne mere moraju biti sprovedene u svim glavnim tačkama lanca mesa. Sa operativne tačke gledišta, ovaj sistem uključuje nekoliko glavnih aktivnosti ([Nørrung i sar., 2009](#)):

- a) Preliminarne aktivnosti za upravljanje rizikom - uključuju definisanje hazard-meso kombinacija od naročite važnosti (zasnovano na epidemiološkim podacima) i razvoj njihovih profila rizika (zasnovano na naučnim podacima).
- b) Procena opcija za upravljanje rizikom - uključuje identifikaciju dostupnih opcija (kroz naučne aktivnosti) i izbor najoptimalnijih opcija za kontrolu rizika (kroz donošenje odluka). Iako regulatorna tela organizuju ovaj proces, industrija i potrošači su takođe uključeni u izbor najoptimalnije opcije, iz razloga što je pored efikasnosti u kontroli rizika, veoma bitna i tehnička izvodljivost i prihvatljivost kontrolne opcije za potrošača.
- c) Implementacija kontrolnih mera - uključuje one mere koje su potpuno „vlasništvo“ i odgovornost proizvođača (GMP/GHP i HACCP), kao i mere koje propisuju regulatorna tela (na primer, kriterijumi procesne higijene i bezbednosti hrane; zvanične kontrole i audicija HACCP sistema). Generalno, sa gledišta lanca mesa, najvažnije i najčešće kritične kontrolne tačke (CCP) u kojima se implementiraju mere sa ciljem kontrole najviših mikrobioloških i/ili drugih rizika po bezbednost mesa uključuju:
 - Na farmi: trenutno su CCP u fazi razvoja, a HACCP planovi još uvek nisu obavezni za implementaciju na farmama.
 - U fabrikama za proizvodnju hrane za životinje: nabavka sastojaka za pripremu hrane; antimikrobni tretmani (termički, peletiranje, fermentacija).
 - U klanicama: prihvat životinja za klanje, skidanje kože, evisceracija i hlađenje; takođe i tretmani dekontaminacije (kože, mesa) u sistemima koji se zasnivaju na HACCP-u sa „intervencijama“ (na primer, u SAD).
 - U pogonima za rasecanje i pakovanje mesa: primanje mesa, inspekcija pre rasecanja, hlađenje tokom skladištenja i otpremanje-transport.
- d) Nadzor/praćenje i revizija - ove aktivnosti su odgovornost regulatornih tela i uključuju identifikovanje mogućih novih problema u bezbednosti mesa (nadzor), ocenu efikasnosti postojećih implementiranih kontrolnih mera (praćenje) i reviziju celog sistema ako očekivani rezultati nisu postignuti.

2.6. Zaključni komentar

Glavne kontrolne mere opisane u ovom poglavlju se primenjuju na jednoj ili više tačaka lanca mesa: pre klanja (tokom proizvodnje hrane za životinje i na farmi), tokom klanja i obrade trupova, tokom dalje prerade mesa, u distribuciji i prodaji mesa i kod potrošača (ketering, restorani, domaćinstva).

S obzirom da su primarni izvor bakterijskih patogena u lancu goveđeg mesa goveda koja ih fekalno izlučuju, moglo bi se pretpostaviti da bi redukcija prisustva ovih patogena u živih životinja trebala biti efikasan način za presecanje tog izvora i smanjenje verovatnoće kasnije kontaminacije mesa. Međutim, kontrola patogena u „pre-harvest“ fazi je teška iz nekoliko razloga: naučna saznanja o faktorima koji utiču na kolonizaciju patogena u životinja i njihovo posledično izlučivanje su još uvek oskudna; mnogi od patogena su ubikvitarni u životnoj sredini, a izvori i putevi infekcije životinja su brojni, kompleksni i teški za kontrolisanje; primena potencijalno efikasnih mera zahteva promenu trenutne farmske prakse što je limitirano i povećanim troškovima ([Sofos, 2005](#)). Zbog svih ovih razloga, naučno definisane i verifikovane kritične kontrolne tačke i kontrolne mere u „pre-harvest“ fazi su trenutno u fazi razvoja, a HACCP planovi još uvek nisu obavezni za implementaciju na farmama ([Nørrung i sar., 2009](#)).

Tokom farma-klanje perioda redovno se dešava značajna unakrsna kontaminacija životinja; stoga se moraju preuzimati mere za smanjivanje te kontaminacije, jer bi u suprotnom rezultati kontrolnih mera primenjenih na farmi bili poništeni. S obzirom da se glavni deo bakterijske kontaminacije uključujući i sa alimentarnim patogenima u lancu goveđeg mesa dešava u „harvest“ fazi tokom klanja i obrade životinja, može se očekivati da će i kontrolne mere primenjene na klanici imati najznačajniji efekat u smanjenju rizika od izloženosti potrošača mikrobiološkim patogenima preko goveđeg mesa.

Veliki broj kontrolnih mera u „harvest“ i „post-harvest“ fazama je danas na raspolaganju industriji mesa. Za većinu njih je zajedničko da nisu patogen-specifične. Kao dodatni korisni efekat kontrolnih mera za patogene, dolazi i do redukcije ukupne mikroflore čime se produžava i održivost mesa/proizvoda od mesa. Primarni pristup kontroli alimentarnih patogena u mesu u ovim fazama je baziran na

higijenskim merama u cilju prevencije, ili bar redukcije, kontaminacije i unakrsne kontaminacije tim agensima. Kao sekundarne, dodatne mere, mogu se koristiti i antimikrobi tretmani mesa u cilju daljeg snižavanja tih rizika ako i gde je potrebno. U prethodnim sekcijama su opisani tretmani dekontaminacije trupova i/ili iskoštenog mesa koji se i praktično koriste. Pored njih, u fazi istraživačkog razvoja su i neki drugi metodi dekontaminacije. Trenutno najefikasnije mere dekontaminacije trupova/mesa su tretmani vrućom vodom ili vodenom parom pod pritiskom („pasterizacija parom“) koji mogu da se koriste i u EU i u SAD, dok se u SAD i nekim zemljama van EU koristi i dekontaminacija organskim kiselinama i acidifikovanim natrijum hloritom ([Koochmaraie i sar., 2005](#)). Međutim, glavni nedostaci mera baziranih na dekontaminaciji su da su „reaktivne“ (bave se kontaminacijom nakon što se ona već dogodila) i da imaju ograničenu efikasnost u pogledu mikrobioloških redukcija.

Međutim, jedna mera bazirana na antimikrobnom tretmanu u harvest fazi objedinjava i proaktivni (preventivni) i reaktivni (posledični) pristup. Radi se o antimikrobnom tretmanu kože goveda, kao ključnog izvora kontaminacije mesa trupova. Naime, smanjenje alimentarnih patogena na koži antimikrobnim tretmanom je proaktivna mera jer predstavlja najbolju moguću preventivu kontaminacije trupa. Istovremeno, taj tretman je i reaktivna mera za smanjenje kontaminacije kože koja se već desila na farmi ili tokom transporta-depoa. Ova njena „dvojna priroda“ čini antimikrobi tretman kože posebno obećavajućom merom za kontrolu mikrobioloških rizika u sirovom goveđem mesu. Takođe, tretman kože može da se koristi i sam ili u kombinaciji sa kasnijim dekontaminacionim tretmanima trupova, što otvara mogućnost njihovog sinergističkog delovanja i znatno većih, kumulativnih poželjnih efekata na bezbednost goveđeg mesa.

3. Implementacija antimikrobnih tretmana na klanici

3.1. Uvod

Kao što je već istaknuto u ranijim poglavljima, antimikrobni tretmani su samo jedan deo, i to sekundarni, celine koja se naziva kontrolni sistem za redukciju mikrobioloških rizika; drugi, primarni deo te celine predstavljaju preventivne mere bazirane na higijeni. Ako i kada se koriste ti tretmani, to se mora raditi samo u okviru integrisanih kontrolnih strategija u celom lancu hrane ([SCVPH, 1998, 2003c](#)). Različite „interventne“ strategije u cilju kontrole alimentarnih patogena su razvijane i neke se koriste na više tačaka lanca goveđeg mesa. Prema nekim autorima, intervencija je procedura ili proces (mehanički ili ljudski) koji značajno redukuje broj patogenih i ostalih mikroorganizama prisutnih na površini hrane/mesa (ili kože) ([Midgley i Small, 2006](#)). Međutim, sam termin „intervencija“ i navedena definicija nisu do danas međunarodno harmonizovani ni u nauci ni u regulatornoj sferi; dok je taj termin šire u upotrebi u SAD, Kanadi i Australiji, u EU se češće koriste termini „tretman za redukciju površinske kontaminacije“, „antimikrobni tretman“ ili jednostavno „dekontaminacija“.

Fizički, hemijski i biološki antimikrobni tretmani, primjenjeni samostalno ili u kombinaciji, su u brojnim istraživanjima eksperimentalno ispitivani i jedan broj se pokazao kao koristan za redukciju broja i/ili prevalence bakterijskih patogena na koži ili mesu goveda ([Huffman, 2002](#)). Svaki od tretmana ima i prednosti i nedostatke. Regulatorno odobravanje dekontaminacionih sredstava i tretmana za hranu animalnog porekla mora biti zasnovano na oceni hemijskih i mikrobioloških rizika ([SCVPH, 1998, 2003c](#)), uzimajući u obzir različite faktore od značaja, kao što su:

- a) bezbednost i efikasnost antimikrobnih sredstava sa gledišta javnog zdravlja (ocena hemijskih i mikrobioloških rizika);
- b) ocena rizika sredstava/tretmana po bezbednost radnika;
- c) uticaj na životnu sredinu;
- d) uticaj na upotrebljivost proizvoda i njegov senzorni kvalitet;
- e) prihvatljivost antimikrobnog tretmana od strane potrošača;

f) interes industrije: (analiza koristi i troškova, tehnička izvodljivost, kao i prihvatljivost tretiranih proizvoda na tržištu .

3.2. Regulatorni status antimikrobnih tretmana

3.2.1. Regulatorni status u EU

Sve do nekoliko godina unazad, u Evropskoj legislativi nije bila dozvoljena upotreba nikakvih sredstava osim pijaće vode za uklanjanje površinske mikrobiološke kontaminacije hrane animalnog porekla, već je osiguranje bezbednosti hrane bilo bazirano samo na primeni dobre proizvodne prakse i/ili drugih sistema upravljanja bezbednošću hrane u celom lancu, kao što je HACCP ([Hugas i Tsigarida, 2008](#)). Razlog je bio taj da se pretpostavljalo da primena antimikrobnih tretmana može maskirati nehigijensku praksu tokom klanja i obrade trupova i kasnije u preradi mesa, odnosno smanjiti motivaciju industrije za dobru higijensku praksu. Posledično, nivo kontaminacije na hrani bi se vremenom povećavao, a dekontaminacioni tretmani mogu biti efikasni uglavnom samo pri nižim nivoima - a i tada bi vremenom možda moglo doći do razvoja antimikrobne rezistencije ([EFSA, 2005a](#)). Nakon donošenja Opštег zakona o hrani u EU (EC 178/2002), na osnovu njega su donete tri Regulative Evropskog Parlamenta i Komisije o bezbednosti hrane, odnosno „Higijenski paket“ - 852/2004, 853/2004 i 854/2004 ([EC, 2004a, b, c](#)). Trenutno, članom 3 (2) Regulative 853/2004, uspostavljena su specifična higijenska pravila za hranu animalnog porekla ([EC, 2004a](#)) i obezbeđena je legalna osnova za korišćenje drugih sredstava (pored upotrebe pijaće vode) za uklanjanje površinske kontaminacije proizvoda animalnog porekla - ova je regulativa u primeni od 01. januara 2006. godine. Kao prvi korak u odobravanju antimikrobnih sredstava za korišćenje u Evropi, u okviru veterinarskog Sporazuma između EU i SAD, Naučnom komitetu Evropske komisije za veterinarske mere značajne za javno zdravlje (SCVPH) podneta su četiri tehnička dosjeda od strane SAD za odobravanje upotrebe četiri antimikrobna sredstva (hlor dioksida, acidifikovanog natrijum hlorita, trinatrijum fosfata i peroksisirćetne kiseline) za dekontaminaciju trupova živine ([SCVPH, 2003c](#)). U ovom mišljenju se zaključuje da dekontaminacija može predstavljati koristan element u daljoj redukciji broja patogena kada se primenjuje u

okviru integrisanih strategija kontrole i da se može koristiti samo kao dodatna mera, a ne kao zamena za normalnu dobru higijensku praksu. Takođe se daje i pozitivno mišljenje o bezbednosti ova četiri sredstva za upotrebu i o njihovoj efikasnosti (osim peroksisirčetne kiseline).

Prema postojećim Evropskim propisima, odobravanje antimikrobnih sredstava i tretmana za uklanjanje kontaminacije proizvoda animalnog porekla je u nadležnosti Evropske komisije (EC), dok je uloga i odgovornost Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA) da, kao nezavisno naučno telo za ocenu rizika u hrani u EU (uspostavljena 2002 godine), na zvanični zahtev Komisije oceni rizike, odnosno bezbednost i efikasnost antimikrobnih sredstava ([Hugas i Tsigarida, 2008](#)). Ocena bezbednosti ovih sredstava je u nadležnosti Naučnog panela za materijale u kontaktu sa hranom, enzime, začine i pomoćna sredstva (CEF panel, bivši AFC panel), dok je ocena njihove antimikrobne efikasnosti u domenu rada Naučnog panela za biološke hazarde (BIOHAZ panel). AFC i BIOHAZ panel su ranije izdali zajednički dokument o podnošenju podataka za ocenu bezbednosti i efikasnosti antimikrobnih sredstava za dekontaminaciju hrane animalnog porekla ([EFSA, 2006a](#)). Ovaj dokument je nedavno dopunjeno sa detaljnim opisom studija (laboratorijskih i u klanicama) koje se moraju prethodno obaviti i rezultati podneti uz zahtev za utvrđivanje efikasnosti sredstava ([EFSA, 2010b](#)). Oba dokumenta predstavljaju tehničke vodiče za kompanije u pogledu glavnih faktora i podataka koje dosijei o antimikrobnim sredstvima trebaju da sadrže, kao što su tehničke informacije, toksikološki podaci, podaci o oceni izloženosti potrošača, antimikroboj efikasnosti sredstva za koje se traži ocena i eventualnom razvoju mikrobne rezistencije na ta sredstva, kao i uticaju na životnu sredinu ([EFSA, 2010b](#)). Sredstva koja se koriste u antimikrobnim tretmanima se trebaju smatrati za „pomoćna sredstva“, kako je definisano u skorijoj EC Regulativi 1333/2008 ([EC, 2008](#)), s obzirom da nisu predviđena za konzumiranje kao hrana. Zbog toga se nakon aplikacije moraju ukloniti iz proizvoda (najčešće ispiranjem), jer bi se u protivnom smatrala za aditive hrani ([EFSA, 2010b](#)). U EU, na menadžerima rizika je odgovornost (najčešće su to zainteresovane kompanije) da prethodno obezbede dokumentaciju koja će pokazati da je antimikrobo sredstvo bezbedno i efikasno u redukovanim kontaminacijama. EFSA je dosad donela i nekoliko naučnih mišljenja o bezbednosti i efikasnosti nekih antimikrobnih sredstava za dekontaminaciju mesa trupova, koja su već u upotrebi u nekim zemljama van Evrope. AFC panel je dao

pozitivno mišljenje o bezbednosti hlor dioksida, acidifikovanog natrijum hlorita, trinatrijum fosfata i peroksisirćetne kiseline za dekontaminaciju trupova živine ([EFSA, 2005b](#)), dok je BIOHAZ panel doneo nekoliko mišljenja o efikasnosti peroksisirćetne, mlečne kiseline i formule SAN-PEL®, ali za koje nije doneta konačna ocena zbog nedovoljnih informacija u podnetim dosijeima ([EFSA, 2005a, 2006b, c](#)). Nedavno je EFSA ocenila i mogućnost razvoja antimikrobne rezistencije prema pojedinim sredstvima ([EFSA, 2008](#)), kao i mogućnost ponovne primene reciklirane vruće vode za dekontaminaciju trupova ([EFSA, 2010c](#)). Sveukupno, peroksisirćetna kiselina je dosad jedino antimikrobno sredstvo za koje je data potpuna ocena o njegovoj bezbednosti i efikasnosti, tako da Evropska komisija još uvek nije dala dozvolu za upotrebu nekog tretmana dekontaminacije hemijskim sredstvima u EU. Dakle, trenutno su u Evropi autorizovani samo antimikrobni tretmani zasnovani na aplikaciji pijaće vode, uključujući i vruću vodu i/ili vodenu paru ([Skandamis i sar., 2010](#)), ali je efikasnost ovih tretmana ograničena temperaturnim maksimumom vode koji se ne sme preći, jer tada dolazi do trajnih promena senzornih (boja) svojstava mesa ([tabela 3.1](#)). Takođe, činjenica je da u svim EC regulativama i mišljenjima EFSA nije eksplicitno pomenuto uklanjanje kontaminacije sa kože životinja pre klanja ili skidanja kože, odnosno antimikrobni tretmani kože (osim pranja vodom i šišanja), već samo uklanjanje kontaminacije (dekontaminacija) hrane animalnog porekla.

3.2.2. Regulatorni status u SAD

U SAD, kao odgovor na više alimentarnih epidemija uzrokovanih sa *E. coli* O157:H7, tokom 90-tih godina prošlog veka je izvršena obimna revizija legislative u oblasti bezbednosti hrane ([Byelashov i Sofos, 2009](#)). Agencija za bezbednost i inspekciju hrane Ministarstva poljoprivrede SAD (USDA/FSIS) donela je zaključak da je prisustvo *E. coli* O157:H7 u sirovom mesu neprihvatljivo i propisala „zero tolerance“ kriterijum performanse za vidljivu kontaminaciju trupova. Takođe, izričito se zabranjuje pranje trupova pre ispunjavanja ovog kriterijuma performanse ([FSIS, 1996b](#)). U cilju daljeg unapređenja bezbednosti mesa, propisima ([FSIS, 1996b](#)) se zahteva da klanice razviju i implementiraju: Standardne radne procedure sanitacije (SSOP), HACCP sistem, redovna mikrobiološka testiranja trupova na generičku *E. coli* (verifikacija kontrole fekalne kontaminacije) i na prisustvo *Salmonella* (verifikacija performanse u redukciji patogena). Teškoće u ispunjavanju pomenutih

regulatornih zahteva dovele su do istraživačkog razvoja mnogih i komercijalne primene nekih tretmana uklanjanja površinske kontaminacije u goveđim klanicama: pre klanja, na liniji klanja (u fazama pre skidanja kože i/ili nakon skidanja kože i/ili pre hlađenja), tokom hlađenja ili nakon hlađenja ([Smulders i Greer, 1998](#); [Skandamis i sar., 2010](#)) ([grafikon 6](#)). Takođe, od strane USDA/FSIS je doneta i preporuka da bi klanice trebale da uključe neku od interventnih mera dekontaminacije u cilju redukcije patogena na trupovima pre hlađenja ([FSIS, 1996b](#)), koja bi predstavljala kritičnu kontrolnu tačku u HACCP planu klanice „za redukciju ili eliminaciju *E. coli* O157:H7“ ([FSIS, 2002](#)).

Nakon preporuke i dozvole regulatornih tela, industrija mesa u SAD je intenzivno počela da koristi različite fizičke ili hemijske tretmane dekontaminacije. Tome su doprinele neke specifičnosti u SAD: sistem gajenja životinja u kome su goveda često preterano prljava, velike klanice sa veoma brzim linijama klanja što utiče na smanjenje nivoa higijene, specifične navike potrošača i konzumiranje blago termički obrađenih proizvoda ([Byelashov i Sofos, 2009](#)). Danas se u nekim klanicama u SAD koristi i više sukcesivnih tretmana dekontaminacije mesa trupova na raznim tačkama linije klanja, po analogiji sa „konceptom prepreka“ („multiple hurdle concept“) korišćenim u preradi hrane. Sa druge strane, tretmani dekontaminacije kože se koriste samo u nekim klanicama (dobrovoljno) u cilju što veće prevencije kontaminacije trupova i želje da mikrobiološke rizike na trupovima maksimalno smanje ([Byelashov i Sofos, 2009](#)) ([grafikon 6](#)). Izgleda da u SAD sve velike klanice za goveda, svinje, ovce, koze i druge vrste životinja, kao i 98,4% živinskih klanica, koriste najmanje jedan tretman dekontaminacije trupova ([Cates i sar., 2008](#)). Kao dodatak obaveznom isecanju vidljive fekalne kontaminacije, oko 81% klanica koristi vakumiranje parom tih mesta, približno isti procenat upotrebljava dekontaminaciju celih trupova prskanjem rastvorima organskih kiselina, dok oko polovina koristi „pasterizaciju parom“ trupova goveda ([Cates i sar., 2008](#)). Tretmani dekontaminacije u klanicama u SAD se odobravaju od strane regulatornih tela ukoliko su antimikrobna sredstva koja se koriste „opšte priznata kao bezbedna“ (GRAS), ne dovode do neupotrebljivosti proizvoda, koriste se samo kao „pomoćna sredstva“ i postoje naučni dokazi da su antimikrobno efikasna ([Sofos, 2005](#)). Trenutno je odobreno više hemijskih sredstava, između ostalih i hlor (samo za trupove živine u koncentraciji od 20 ppm), organske kiseline (mlečna, sirčetna i druge), peroksisirčetna kis., trinatrijum fosfat, acidifikovani natrijum hlorit, natrijum

hidroksid, vodonik peroksid, laktoferin, itd. ([FSIS, 2008](#)) ([tabela 3.1](#)). U SAD je od 1999. god. dozvoljena i iradijacija mesa, uključujući i trupove ([Byelashov i Sofos, 2009](#)), ali se koristi u samo 0,5% malih klanica i to za meso nakon rasecanja ([Cates i sar., 2008](#)). Najveća prepreka široj upotrebi iradijacije, iako je pokazala dobru antimikrobnu efikasnost, je neprihvatanje od strane potrošača, i zahtevnost u pogledu troškova, tehničke i prostorne opremljenosti.

3.2.3. Regulatorni status u drugim zemljama

U Australiji i Kanadi je regulatorni status antimikrobnih tretmana mesa sličan kao u SAD, ali ima i razlika ([Midgley i Small, 2006](#); [Skandamis i sar., 2010](#)). Proizvođači mesa u ove dve zemlje takođe smatraju tretmane dekontaminacije samo kao dodatak GMP/GHP i u okviru HACCP sistema. U Kanadi se tretmani dekontaminacije organskim kiselinama najčešće koriste i deo su GMP/GHP, pod uslovom da postoje adekvatni tehnički uslovi i kontrola kvaliteta ([Skandamis i sar., 2010](#)). U Australiji se mera isecanja i vakumiranja parom vidljive fekalne kontaminacije redovno koristi. U klanicama koje meso izvoze u EU i SAD koriste se samo one metode koje su za te zemlje prihvatljive ([tabela 3.1](#)). Osim pranja kože vodom pre klanja, drugi tretmani kože se ne koriste u Australiji ([Midgley i Small, 2006](#)).

U Srbiji nisu propisima regulisani niti se koriste tretmani dekontaminacije, bilo kože ili mesa trupova. Verovatno će nakon revizije naše legislative u oblasti bezbednosti mesa biti prihvaćeni stavovi EC i mišljenja EFSA po ovim pitanjima. Značajan je problem što se na klanicama ne koriste ni mere čišćenja i pranja naročito prljavih životinja pre klanja, niti je ovo regulisano propisima. Nakon završenog klanja i obrade trupova, najčešće se u klanicama vrši pranje trupova hladnom vodom u cilju uklanjanja ugrušaka krvi i opiljaka kostiju nastalih nakon rasecanja trupa. Međutim, dobro je poznato da ova mera nema nikakav antimikrobnii efekat i da samo vrši redistribuciju bakterija po čitavom trupu, a naročito ukoliko prethodno nije urađeno isecanje nožem vidljive fekalne kontaminacije ([Sofos i Smith, 1998; Buncic, 2006](#)).

Tabela 3.1. Regulatorni status antimikrobnih tretmana na klanici
(prilagođeno od [Midgley i Small, 2006](#))

Deo lanca goveđeg mesa	Antimikrobni tretman	Regulatorno odobrenje			
		EU	SAD	Australija	Ostalo
Pre skidanja kože (tretmani kože)	Pranje pijaćom vodom	Da	Da	Da	Većina zemalja
	Šišanje dlaka i/ili naslaga nečistoće	Da	Da	Da	Većina zemalja
	Dekontaminacija hemijskim sredstvima	Ne	Da	Da	
	Hemijska depilacija	Ne	Da	Ne	
	Pranje pijaćom vodom	Da	Da	Da	Većina zemalja
Nakon skidanja kože (tretmani mesa trupova)	Pranje vrućom vodom / pasterizacija parom	Da*	Da	Da	Većina zemalja
	Vakumiranje parom	Da*	Da	Da	
	Pranje ozoniranom vodom	Ne	Da	Da	
	Pranje elektroliziranim vodom	Ne	Da	Ne	Japan, Koreja
	Aktivirani lakoferin	Ne	Da	Ne	
Tokom hlađenja (tretmani mesa trupova)	Iradijacija	Ne	Da	Ne	
	Dekontaminacija hemijskim antimikrobnim sredstvima				
	Organske kiseline (mlečna, sirčetna), peroksisirčetna kiselina, acidifikovani natrijum hlorit, hlor dioksid	Ne	Da	Da	
	Trinatrijum fosfat	Ne	Da	Ne	
	Cetilpiridin hlorid (CPC)	Ne	Ne	Ne	
	Prskanje organskim kis. ili acid. natrijum hloritom	Ne	Da	Da	
	Pranje ozoniranom vodom	Ne	Da	Da	

* Dozvoljeno, ali se ne preporučuje zbog senzornih promena na mesu

3.3. Antimikrobna efikasnost i bezbednost tretmana

U goveđim klanicama, glavni cilj antimikrobnih tretmana na liniji klanja je što efikasnija redukcija *E. coli* O157 i *Salmonella* spp. na trupovima, dok je u kasnijoj fazi (tokom rasecanja i prerade mesa) to najčešće usmereno na redukciju ili eliminaciju mikroflore kvara mesa i patogena kao što je *L. monocytogenes* ([Midgley i Small, 2006; Nørrung i sar., 2009](#)). Mora se imati u vidu da primena postojećih

antimikrobnih tretmana uglavnom za krajnji rezultat ima smanjivanje nivoa mikrobiološke kontaminacije, dok je potpuna eliminacija patogena teško ostvarljiva ([Hugas i Tsigarida, 2008](#)). Antimikrobna efikasnost je dakle, najznačajniji faktor u izboru adekvatnog tretmana i ona zavisi od velikog broja faktora ([Midgley i Small, 2006; Hugas i Tsigarida, 2008; EFSA, 2010b](#)):

- a) ekologija mikroorganizama: nivo početne kontaminacije, vrsta i diverzitet sojeva bakterija, fiziološki status bakterija, adaptacija i odgovor bakterija na uslove stresa, intenzitet pričvršćenosti za supstrat, formiranje biofilmova i drugo;
- b) tehnički parametri primene tretmana: temperatura, pritisak, pH i koncentracija rastvora antimikrobnog sredstva, vreme delovanja, metod aplikacije - prskanjem, potapanjem ili polivanjem, konstrukcija opreme, itd.;
- c) faza primene tretmana: pre ili nakon klanja i/ili skidanja kože, pre i/ili nakon evisceracije, tokom i/ili nakon hlađenja trupova, itd.;
- d) faktori koji se odnose na supstrat koji se tretira: meso ili koža, prisustvo veće količine organskog materijala ili masti, fizičko-hemijske osobine površine, itd.

Antimikrobeno sredstvo se smatra efikasnim ukoliko nakon aplikacije dovodi do statistički značajne redukcije procenta kontaminiranih trupova/uzoraka mesa (prevalence) i nivoa ciljnih patogenih bakterija (koncentracije) kada se izvrši upoređenje sa kontrolom, odnosno vodom aplikovanom na isti način ([EFSA, 2008](#)). Utvrđena efikasnost u redukciji patogena na mesu treba da ima značajan efekat i na smanjenje incidence alimentarnih bolesti, što definišu Evropska komisija i nacionalna regulatorna tela.

U smislu bezbednosti, sredstvo je bezbedno za upotrebu ukoliko ne predstavlja rizik po javno zdravlje; ovo se ocenjuje na osnovu toksikoloških podataka i ocene izloženosti potrošača (dnevni unos, rezidue, produkti razlaganja) ([EFSA, 2010b](#)).

Ekologija mikroorganizama je veoma kompleksan faktor koji utiče na antimikrobenu efikasnost tretmana. Razmnožavanje bakterija (uključujući i u mesu) se sastoji iz četiri faze: faza adaptacije na uslove sredine (lag faza); faza eksponencijalnog razmnožavanja (logaritamska faza); stacionarna faza i faza odumiranja ([Buncic, 2006](#)). Analogno tome, nakon izloženosti nekom letalnom uticaju populacija bakterija najčešće odumire eksponencijalno, odnosno u logaritamskim intervalima, a veoma retko se ovo dešava trenutno. D-vrednost, ili „vreme decimalne redukcije“, se u mikrobiologiji hrane koristi da označi vreme koje je

potrebno da se pod određenim uslovima uništi 90% populacije bakterija (odnosno 1 log ciklus) (Buncic, 2006). Zbog toga se najčešće broj bakterija označava u logaritmima, a takođe i redukcija njihovog broja (u bujonu, na koži, mesu, itd.), pa tako efikasnost od 1 log redukcije predstavlja smanjenje broja bakterija za 90% od početnog broja, 2 log je smanjenje od 99%, itd.

Prilikom ocene efikasnosti nekog antimikrobnog tretmana, upoređuju se broj (koncentracija) i/ili prisustvo (prevalenca) patogena pre i nakon tretmana (EFSA, 2010b). Efekat u redukciji broja bakterija predstavlja razliku između njihovog broja utvrđenog pre tretmana (izraženog u logaritmima) i broja utvrđenog nakon tretmana (takođe u log), odnosno ovo je „logaritamska redukcija“ (tabela 3.2). Ovaj način izražavanja redukcije omogućava upoređivanje različitih antimikrobnih tretmana na isti način; koristi se za utvrđivanje efekta u redukciji bakterija „indikatora“ kontaminacije i procesne higijene (ukupan broj bakterija, broj *Enterobacteriaceae* i ukupnih koliforma) ili veštački inokulisanih bakterijskih patogena (u visokim nivoima). Međutim, često se efikasnost tretmana mora utvrđivati i meriti efektom u redukciji prevalence bakterija (na koži ili mesu), a naročito je to slučaj sa prirodno prisutnim alimentarnim patogenima. To je često neizbežno jer je distribucija patogena na koži veoma varijabilna (a posledično i na mesu nakon kontaminacije), njihov broj na koži i mesu najčešće je veoma nizak, a osjetljivost metoda direktnе izolacije iz uzorka (bez prethodnog obogaćenja) je niža. Ipak, pravilna procena efikasnosti primjenjenog tretmana poređenjem prevalence pre i nakon tretmana je veoma otežana (Arthur i sar., 2004). U literaturi nema objavljenog jedinstvenog načina i formule za računanje i izražavanje „redukcije prevalence“, kojom bi se efikasnost različitih tretmana mogla upoređivati na isti način. Uglavnom se prikazuje relativna efikasnost, odnosno koliko je nakon tretmana preostalo pozitivnih koža/trupova u odnosu na prevalencu patogena pre tretmana. Međutim, s obzirom na često različit broj kontrolnih i tretiranih životinja kao i različite prevalence patogena u istraživanjima, poređenjem samo ovih podataka se ne može doći do pouzdanog zaključka - koliko je neki tretman bolji/efikasniji u odnosu na neki drugi. Ovaj nedostatak bi se mogao prevazići uvođenjem termina i formula izračunavanja „efikasnosti tretmana“ („e“), koji u procentima pokazuje za koliko je neki tretman redukovao prevalencu patogena, kao i „koeficijenta efikasnosti tretmana“ („c“) koji pokazuje za koliko puta je tretman uspeo da redukuje prevalencu patogena na koži ili trupovima (tabela 3.2). Takođe, od značaja je i činjenica da, kada su u pitanju antimikrobeni tretmani kože, krajnji cilj

njihove primene predstavlja smanjenje kontaminacije korespondentnog trupa, pa se zato njihova efikasnost utvrđuje i efektom na koži (redukcija broja ili prevalence bakterija indikatora ili patogena) i na mesu trupova (redukcija prenosa bakterija sa kože na trupove).

Tabela 3.2. Formule za izračunavanje efikasnosti antimikrobnih tretmana

Redukcija broja bakterija

Logaritamska redukcija = $(\log \text{cfu/cm}^2 \text{ pre tretmana}) - (\log \text{cfu/cm}^2 \text{ nakon tretmana})$

Redukcija prevalence bakterija

Efikasnost tretmana (**e %**) = $(\% \text{ redukcije} \times 100) / \% \text{ pozitivnih kontrola}$

Koeficijent efikasnosti tretmana (**c**) = $(\% \text{ pozitivnih kontrola}) / (\% \text{ pozitivnih nakon tretmana})$

3.4. Ostali aspekti implementacije antimikrobnih tretmana

Svi antimikrobni tretmani se mogu podeliti u četiri glavne grupe, i to: a) fizički tretmani; b) hemijski tretmani; c) kombinacije fizičkih i/ili hemijskih tretmana (simultano primenjenih u okviru „koncepta prepreka“); i d) biološki tretmani. Takođe, u okviru ove podele postoje i nove, alternativne tehnologije koje su trenutno u razvoju i ne koriste se, ili se retko koriste, u komercijalnoj praksi ([Hugas i Tsigarida, 2008](#); [Skandamis i sar., 2010](#)).

3.4.1. Fizički antimikrobni tretmani

Fizički tretmani imaju dva osnovna načina delovanja. Jedan je mehaničko uklanjanje nečistoće ili mikrobiološke kontaminacije sa kože ili trupova, a drugi je baktericidni efekat u redukciji ili eliminaciji bakterija ([Skandamis i sar., 2010](#)). Najčešći fizički tretmani uključuju čišćenje i pranje vodom, kao i šišanje životinja pre klanja, pranje trupova hladnom vodom, trimovanje (isecanje) nožem i termički tretmani (pranje vrućom vodom, vakumiranje i pasterizacija parom) ([grafikon 6](#)). Fizički tretmani imaju neke prednosti u odnosu na hemijske, na primer ne postoji problem sa reziduama na mesu ili rukovanjem otpadnim vodama. Hladna pijača voda može ukloniti vidljivu kontaminaciju (sa kože ili mesa), ali nema nikakav antimikrobni efekat, već samo vrši redistribuciju bakterija po površini ([Buncic, 2006](#)).

U principu, efikasnost svih tretmana koji se aplikuju prskanjem ili tuširanjem značajno zavisi od pritiska i količine tečnosti, tipa prskalice iугла под kojim se vrši prskanje (Midgley i Small, 2006), ali je poznato da visok pritisak može imati za negativnu posledicu prodiranje bakterija u dubinu mesa (Sofos i Smith, 1998) i stvaranja aerosola. Sa druge strane, termički tretmani vrućom vodom ($\geq 74^{\circ}\text{C}$) ili vodenom parom pod pritiskom su znatno efikasniji (čak i od nekih hemikalija), ali mogu dovesti do neprihvatljivih senzornih promena na mesu (ili oštećenja kože), zavisno od vremena delovanja i temperature. Međutim, pri temperaturi koja se obično koristi i vremenu aplikacije < 15 sek., diskoloracija mesa obično nestaje nakon 24 sata hlađenja (Huffman, 2002). „Pasterizacija parom“, u odnosu na pranje vrućom vodom, pri istoj temperaturi ima veći kapacitet zagrevanja, a takođe su kapljice vodene pare znatno manje od bakterija i prodiru u svaku pukotinu na površini. Tretman parom ima velike uštede u vodi i energiji, ali zahteva i velika početna ulaganja u opremu (Skandamis i sar., 2010).

U suštini, površina kože i mesa trupova goveda je tehnički komplikovana za tretiranje zbog veoma nepravilnog oblika, sa puno pukotina i krivina u kojima su bakterije dobro zaštićene od kontakta sa antimikrobnim sredstvom. Sa praktične strane, preporučljivo je da se antimikrobni tretmani mesa trupova primene što pre nakon skidanja kože (pre evisceracije), pre pričvršćivanja bakterija (prenetih sa kože) za površinu mesa, jer je utvrđeno da su bakterije otpornije na antimikrobne tretmane ukoliko su dobro pričvršćene za neku površinu i u sesilnoj formi (a posebno u biofilmovima) nego kada se nalaze pojedinačno kao planktonske ćelije (Koutsoumanis i sar., 2006).

3.4.2. Hemijski antimikrobni tretmani

Hemijski tretmani uključuju aplikaciju hemijskih antimikrobnih sredstava na površinu mesa ili kože u cilju eliminacije bakterija ili redukcije njihovog broja (Midgley i Small, 2006). Tipično, njihov efekat se ogleda u sposobnosti da unište ćelijske strukture bakterija različitim mehanizmima (ubijajući ćeliju) ili oštećenjem mehanizma pričvršćivanja (olakšava uklanjanje bakterija ispiranjem) (Koutsoumanis i sar., 2006). Veliki broj hemijskih sredstava je ispitivan u ovu svrhu (tabela 3.1) u raznim fazama na liniji klanja (grafikon 6), a za njihovu upotrebu na hrani se mora dobiti odobrenje regulatornih tela. Organske kiseline (mlečna, sirčetna, fumarna, limunska) su

hemiska sredstva o čijoj efikasnosti i osobinama ima najviše informacija i koje se najčešće koriste u tretmanima mesa. Preko 30 godina istraživanja njihovog antimikrobnog efekta potvrđuje da je očekivana mikrobna redukcija u proseku oko 1,5 log (Hugas i Tsigarida, 2008). Iako imaju slabiji antimikrobni efekat, one se često primenjuju nakon termičkih tretmana (vrućom vodom ili vodenom parom) jer mogu da inaktiviju bakterije prethodno oštećene ovim tretmanima. Druga hemijska sredstva uključuju neorganske kiseline, alkalna sredstva, oksidirajući agensi i sanitajzeri (na primer, kvaternerna amonijumova jedinjenja). Generalno, bakterijski patogeni od najvećeg značaja za bezbednost goveđeg mesa pripadaju u mezofilne Gram negativne *Enterobacteriaceae* koje su osjetljivije na hemijska sredstva (naročito kiseline) u odnosu na druge (Gr+) patogene (Koutsoumanis i sar., 2006). Problemi sa hemijskim sredstvima uključuju moguće senzorne promene na mesu, mogući negativni uticaj na životnu sredinu putem otpadnih voda i troškovi recikliranja ili neutralizacije, povećan rizik po bezbednost radnika i drugo (Koutsoumanis i sar., 2006). Na primer, utvrđeno je da primena kiselina i hlora dovodi i do oštećenja opreme na liniji klanja (njene korozije) (Belk, 2001).

U pogledu uticaja na ekologiju mikroorganizama, kako na tretiranoj površini (kože ili mesa) tako i u samoj klanici, hemijska sredstva mogu dovesti do povećanja otpornosti bakterija nakon njihovog adaptiranja na nepovoljne uslove sredine i stresogene faktore, a to može voditi i ka antimikrobnoj rezistenciji (Koutsoumanis i sar., 2006). Međutim, skorije je ukazano da ne postoje dokazi i podaci da nakon upotrebe hlor dioksida, ASC, TSP i peroksisirčetne kiseline dolazi do stvaranja rezistencije na njih ili ukrštene rezistencije na druga sredstva, ali da to ne mora da uvek bude slučaj sa svim hemikalijama, pa se zato ovaj aspekt uvek mora uzeti u obzir prilikom davanja dozvole za upotrebu (EFSA, 2008). Kada su u pitanju oksidirajuća sredstva (na primer, ozon, vodonik peroksid ili hlor dioksid), delovanjem na masti i pigmentu mišića se mogu stvoriti štetni slobodni radikali, dok je utvrđeno da primena hemikalija koje imaju nizak pH (organske i druge kiseline, ASC, itd.) kod nekih vrsta bakterija (na primer, *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *L. monocytogenes*) može izvršiti selekciju sojeva rezistentnih na kiseline, što može biti problem u kontroli ovih sojeva u proizvodima od mesa ili njihovom lakšem prolasku kroz želudačnu barijeru u organizmu ljudi (Skandamis i sar., 2010). U nekim slučajevima, nakon izlaganja sub-leタルnim faktorima, dolazi samo do oštećenja bakterija kada one imaju produženu lag fazu, nakon koje ponovo krenu sa rastom (ponekad i znatno brže

nego u normalnoj situaciji), a moguće je stvaranje i posebne forme bakterijskih ćelija koje se označavaju kao VBNC ćelije („viable, but non-culturable“) kada su one žive, ali sa oštećenom morfologijom i poremećenim metabolizmom i ne mogu da rastu na hranljivim podlogama, čak ni sa obogaćenjem (Buncic, 2006). Ovo je opisano i za izvesne patogene (na primer, *E. coli*, *Campylobacter*, *Salmonella* i *Shigella*) i može predstavljati problem ukoliko se ovakve bakterije oporave od stresa, steknu „ukrštenu rezistenciju ili zaštitu“ i postanu otpornije, kako na faktore koji su izazvali stres, tako i na druge antimikrobne faktore u lancu mesa, ili čak usled mutacija u genetskom materijalu povećaju svoju virulenciju. Zbog toga je stresogeni odgovor bakterija na antimikrobne faktore danas značajan aspekt koji se mora imati u vidu prilikom pravilnog izbora antimikrobnog tretmana (Buncic, 2006).

3.4.3. Kombinacije fizičkih i/ili hemijskih tretmana („koncept višestrukih prepreka“)

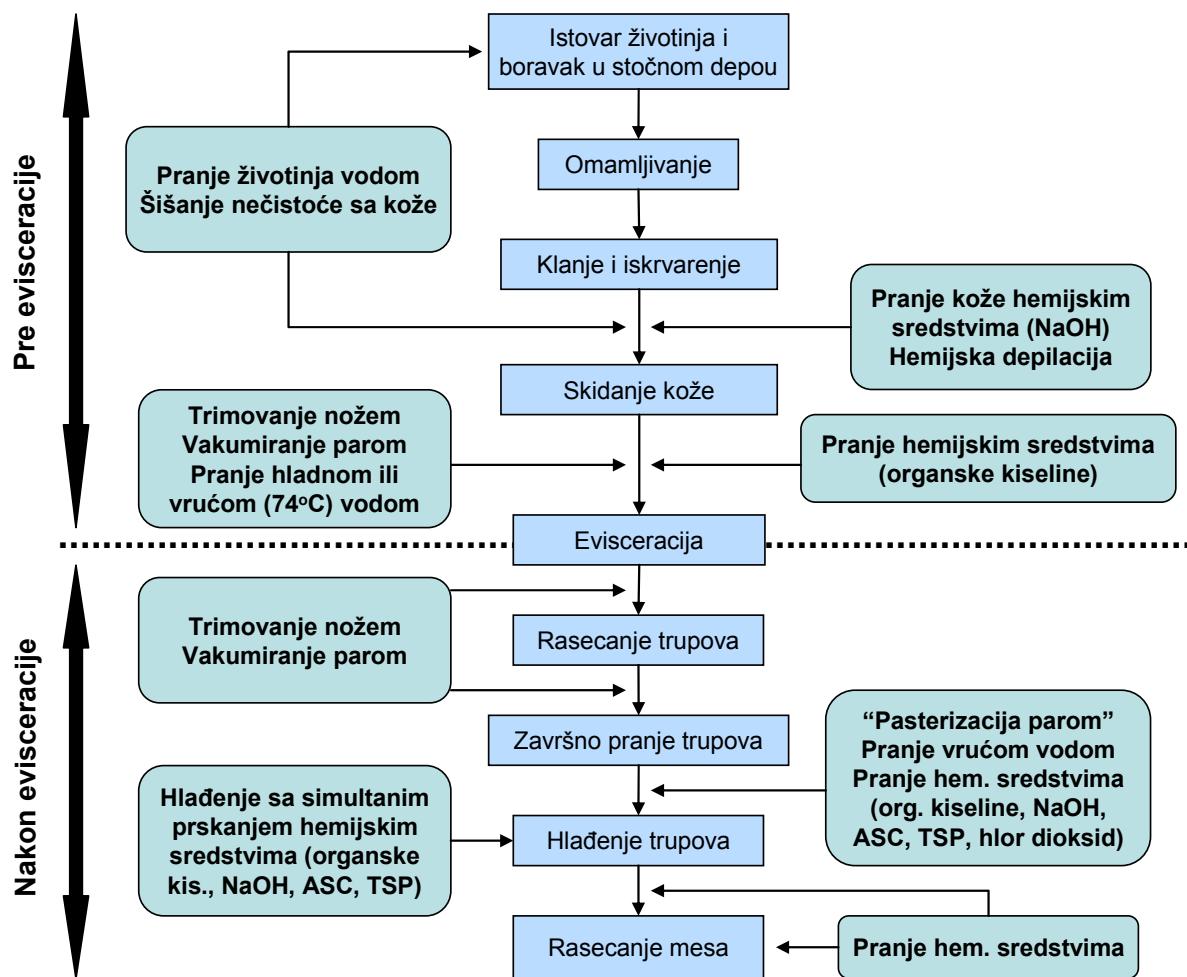
U slučajevima u kojima se potpuna inhibicija mikrobioloških patogena u hrani ne može postići efektima samo jednog faktora (na primer, niske temperature ili niskog pH), ili to nije prihvatljivo iz razloga kvaliteta tog proizvoda, u preradi/konzervaciji hrane koristi se pristup koji se zasniva na teoriji „višestrukih prepreka“ („multiple hurdle concept“) (Leistner, 2000). Pri tome se koriste simultani, sinergijski efekti više antimikrobnih faktora („prepreka“), koji inhibišu ili inaktiviraju mikroorganizme iako ni jedan od njih to ne bi postigao individualno (Koohmaraie i sar., 2005). U klanicama se „koncept višestrukih prepreka“ može primeniti simultanom aplikacijom antimikrobnih tretmana (na primer, vrući rastvor organske kiseline) ili sukcesivnom aplikacijom više tretmana u raznim fazama linije klanja (Koutsoumanis i sar., 2006). Jedan od najvažnijih aspekata u primeni „prepreka“ je redosled kojim su tretmani primjenjeni, kao i sama faza primene na liniji klanja (Geornaras i Sofos, 2005). Znatno slabiji ukupni efekat tretmana je utvrđen u slučajevima kada su trupovi prvo ispirani hladnom, a zatim vrućom vodom (moguća termalna zaštita bakterija zbog prethodnog hidriranja površine trupa), kao i u slučajevima propisima obavezognog ispiranja vodom nakon tretmana rastvorima hemikalija (zbog njihovog razblaživanja i uklanjanja). Takođe, primećeno je da su tretmani dekontaminacije mnogo efikasniji u redukciji broja bakterija ukoliko je početna kontaminacija viša, kao i kada su primjenjeni što pre nakon mikrobiološke

kontaminacije, pre pričvršćivanja bakterija za površinu mesa (Geornaras i Sofos, 2005). Najčešći redosled i faze primene antimikrobnih tretmana kože i mesa trupova goveda u klanicama u SAD prikazan je na [grafikonu 6](#). Ukratko, „koncept višestrukih prepreka“ ovde može uključivati različite kombinacije tretmana:

- a) antimikrobni tretman kože (najčešće pranje hemijskim sredstvima) - u cilju čišćenja kože, redukcije broja bakterija na koži i redukcije njihovog prenosa na trup;
- b) trimovanje (isecanje) nožem i/ili vakumiranje trupova parom - u cilju uklanjanja vidljive i mikrobiološke kontaminacije i ispunjavanja fekalnog „zero tolerance“ kriterijuma;
- c) tretiranje trupova što pre nakon skidanja kože, a pre evisceracije (najčešće vrućom vodom ili rastvorom organskih kiselina) - u cilju sprečavanja pričvršćivanja bakterija i njihove eliminacije;
- d) tretiranje trupova nakon evisceracije i/ili rasecanja (najčešće vrućom vodom ili „pasterizacija parom“, kao i hemijskim sredstvima, ili obrnutim redom) - u cilju eliminacije bakterija naknadno dospelih na trup zbog unakrsne kontaminacije;
- e) hlađenje - klasično ili simultano sa prskanjem hemijskim sredstvima.

Bolja antimikrobna efikasnost kombinovanog pristupa je proverena u nekoliko studija ([Bacon i sar., 2000](#); [Arthur i sar., 2004](#); [Brichta-Harhay i sar., 2008](#)). Ovakav sinergistički efekat može da omogući redukciju (od evisceracije do posle hlađenja) opšte mikroflore na trupovima od 3-4 log TVC i oko 1-2 log *Enterobacteriaceae*, kao i značajnom smanjenju prevalence i broja *E. coli* O157 i *Salmonella* ([tabela 1.3](#)).

Pored toga, ovaj pristup je poželjniji sa gledišta kvaliteta mesa jer korišćenje tretmana manjeg „intenziteta“ ima potencijalno manji štetni efekat na senzorne, nutritivne i komercijalne osobine proizvoda ([Geornaras i Sofos, 2005](#)). Glavni nedostatak kombinovanih tretmana je da svaki od njih donosi posebne troškove instalacije i primene, prostorne zahteve i probleme rukovanja otpadnim vodama, što sve zajedno može nadmašiti ukupnu korist od njegove primene ([Midgley i Small, 2006](#)).



Grafikon 6. Antimikrobni tretmani u upotrebi u goveđim klanicama u SAD
(prilagođeno od [Skandamis i sar.](#), 2010)

3.4.4. Biološki antimikrobnii tretmani

Biološki tretmani podrazumevaju korišćenje baktericidnih proizvoda pojedinih bakterija, kao i virusa (bakteriofaga) u antimikrobne svrhe.

Bakteriocini deluju letalno na neke bakterije. Najviše ispitivan za ovu svrhu je nizin, proizvod *Lactobacillus lactis* susp. *lactis*, koji je efikasan protiv Gr+ bakterija, ali ne i Gr- *Enterobacteriaceae*. Nizin je odobren za upotrebu u nekim vrstama hrane u EU i SAD, uglavnom u proizvodnji mlečnih proizvoda (sireva) i u nekim barenim kobasicama. Nedostaci bioloških tretmana je da su skupi, neefikasni za Gr-patogene, moguć je razvoj rezistencije na njih i brzo se inaktivisu u dodiru sa drugim komponentama hrane ([Hugas i Tsigarida, 2008](#)).

Bakteriofagi su virusi strogo specifični za bakterije kao domaćine. U pogledu mehanizma svog delovanja prema bakterijama, mogu biti virulentni i umereni ([EFSA, 2009](#)). Virulentni bakteriofagi su veoma efikasni u uništavanju bakterijskih ćelija za koje su specifični; u nekim studijama neki bakteriofagi su redukovali nivoe patogenih (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* i *Campylobacter jejuni*) i mikroorganizama kvara (*Pseudomonas* spp. i *Brochotrix thermosphacta*) u različitim vrstama hrane, uključujući i meso ([Greer, 2005](#)). Takođe, u nekim istraživanjima tretman bakteriofagima je redukovao ili skoro potpuno eliminisao *E. coli* O157:H7 sa površine goveđeg mesa ([O'Flynn i sar., 2004](#)). Nije primećeno da imaju bilo kakvu interakciju sa okolnom mikroflorom, niti dovode do senzornih promena na mesu. Međutim, ograničenja u upotrebi bakteriofaga uključuju njihovu strogu specifičnost samo na određene vrste (ili sojeve) bakterija; mogući transfer i razvoj rezistencije kod bakterija („umereni“ bakteriofagi); kao i visoku cenu koštanja ovakvih tretmana ([EFSA, 2009](#)). Upotreba bakteriofaga u cilju kontrole *E. coli* O157:H7 je u SAD dozvoljena, ali su istraživanja još uvek u toku i ovaj tretman nema komercijalnu primenu. Sa druge strane, u EU njihova upotreba nije dozvoljena, a EFSA je nedavno dala mišljenje da, ukoliko se traži dozvola za primenu tretmana bakteriofagima u cilju dekontaminacije hrane animalnog porekla, onda se preporučuje prethodno donošenje tehničkog vodiča o podnošenju podataka neophodnih za njihovu ocenu ([EFSA, 2009](#)).

3.5. Analiza koristi i troškova implementacije antimikrobnih tretmana

Industrija mesa funkcioniše na komercijalnim principima i njima je ograničena, pa se zato prilikom izbora optimalnog antimikrobnog tretmana, pored njegove efikasnosti u smanjivanju mikrobioloških rizika, analizira i odnos koristi i troškova implementacije i upotrebe ([Vosough Ahmadi, 2007](#)). Svaki tretman ima jedan ili više elemenata koji nose određene troškove i najčešće se to odnosi na osoblje, objekte, opremu, potrošni materijal (hemikalije) i ostalo (potrošnja energije, transport). Početno ulaganje u opremu i eventualnu izgradnju novih objekata može iznositi od nekoliko hiljada (na primer, vakumiranje parom) do par miliona dolara (iradijacija), dok ukupni troškovi uključuju i tekuće troškove - ljudski rad, održavanje opreme, potrošnju materijala i energije, kao i rukovanje otpadnim vodama ([Edwards i Fung, 2006](#)). Ovi se troškovi računaju na godišnjem nivou, po jednom trupu goveda. Ukupni troškovi su veoma bitni za industriju, ali prilikom analize koristi i troškova, industrijia uzima u obzir i antimikrobnu efikasnost tretmana, kao i njegov uticaj na kvalitet proizvoda. Glavna korist i ušteda zbog primene antimikrobnih tretmana na liniji klanja goveda je redukcija bakterijskih patogena (naročito *E. coli* O157:H7) i kasnije smanjenje verovatnoće za povlačenje proizvoda sa tržišta u slučaju njenog prisustva u sirovom mesu. U SAD, jedna od glavnih mera u kontroli *E. coli* O157:H7 su nasumična dnevna testiranja na njeno prisustvo u sirovom goveđem mesu i u slučaju pozitivnog rezultata povlačenje svih proizvoda sa tržišta tog proizvođača koji su proizvedeni tog dana ([Sofos, 2005](#)). Sa aspekta celog lanca goveđeg mesa u EU (na primer u Holandiji), intervencije na klanici su isplativije u odnosu na one na farmi, a u pogledu redukcije prevalence *E. coli* O157 naročito trimovanje i pasterizacija parom ([Vosough Ahmadi, 2007](#)).

3.6. Antimikrobnii tretmani i HACCP

HACCP sistem je danas u celom svetu široko prihvaćen i predstavlja najefikasniji sistem upravljanja bezbednošću hrane primenljiv u celom lancu ([Bunčić i sar., 2008](#)). Bazira se na razvijanju i implementaciji plana od strane kompanije, u kome su identifikovani svi značajni hazardi i kontrolne mere koje se moraju sprovesti u svakoj tački procesa proizvodnje u cilju redukcije ili eliminacije tih hazarda ([EC, 2004a, b; FSIS, 1996b](#)). Za svaki od identifikovanih značajnih hazarda, u svakoj procesnoj fazi koja se smatra naročito rizičnom, mora da postoji barem jedna kritična kontrolna tačka (CCP). CCP predstavlja korak u kome može da se primeni specifična kontrolna mera kojom se hazard pouzdano sprečava, eliminiše ili smanjuje na prihvatljiv nivo ([FSIS, 2002](#)). Danas postoje dva glavna, suštinski različita pristupa kontroli mikrobiološke kontaminacije mesa u okviru HACCP koncepta ([Bolton i sar., 2001; McDowell i sar., 2005](#)):

a) *HACCP bez intervencija*. Ovaj pristup se oslanja na striktnom pridržavanju GMP i GHP u cilju sprečavanja kontaminacije, inspekciji (proveri) trupova na vidljivu fekalnu kontaminaciju na kraju linije klanja (od strane radnika) i njenom uklanjanju. U osnovi ovakvog HACCP plana je stalno praćenje (monitoring) - da li je proces pod kontrolom, oslanjanje na uobičajene CCP (najčešće su to skidanje kože, evisceracija, uklanjanje kičmene moždine i hlađenje) i uklanjanje vidljive kontaminacije (najčešće trimovanjem). Ovaj sistem je obavezan u EU, jer su do skora regulatorna tela u EU smatrala da je striktna primena GMP/GHP/HACCP principa dovoljna da se osigura bezbednost mesa i da bi uvođenje tretmana dekontaminacije na klanicama dovelo do smanjivanja nivoa GMP/GHP od strane klanica i farmera i na kraju rezultiralo smanjivanjem ukupne bezbednosti proizvoda.

b) *HACCP sa intervencijom*. Osnova ovog pristupa je upotreba antimikrobnih tretmana (intervencija, dekontaminacija) na liniji klanja u cilju redukcije mikrobiološke kontaminacije, pri čemu je primena GMP/GHP neophodan preduslov HACCP-u. Koncept „intervencija“ u kontroli mikrobioloških patogena iz mesa je prvi opisao [Mossel, 1984](#) (citirali [Smulders i Greer, 1998](#)), koji je smatrao da sama higijenska praksa, primenjena u kontrolisanim uslovima proizvodnje hrane ipak nije dovoljna da kontroliše patogene i da je potrebna i primena dodatnih mera dekontaminacije.

Njihova upotreba je korisna, jer je poznato da je i pored primene najbolje higijenske prakse, mikrobiološka kontaminacija na liniji klanja neizbežna ([Sofos, 2005](#)), tako da ove mere daju dodatni nivo kontrole u odnosu na sistem bez njih. Upotreba antimikrobnih tretmana daje i dodatni nivo zaštite u slučaju nepredviđenih okolnosti, na primer, neočekivanog povećanja nivoa mikrobiološke kontaminacije (povišen nivo patogena u nekoj grupi životinja, greške tokom klanja i obrade, prisustvo biofilmova na površini opreme), ubrzanja rada linije klanja, itd. ([Midgley i Small, 2006](#)). Ovaj sistem je trenutno u upotrebi u SAD, Kanadi, Australiji i nekim drugim zemljama.

Neki od ranije opisanih antimikrobnih tretmana mogu biti CCP u HACCP planu klanice, a posebno su tu značajni antimikrobni tretmani kože, u cilju sprečavanja kontaminacije mesa trupova patogenima sa kože. Pranje trupova hladnom (10-15°C) ili topлом (15-40°C) vodom nemaju nikakav antimikrobni efekat, pa se stoga ne smatraju za tretmane dekontaminacije i nisu CCP u HACCP planu. Takođe, vakumiranje parom se retko smatra za CCP, zbog toga što se ovaj tretman ne koristi na svakom trupu, već se najčešće koristi kao GMP u različitim tačkama na liniji klanja (skidanje kože sa nogu, završno skidanje kože, pre evisceracije i/ili završno trimovanje) ([Bolton i sar., 2001](#)). U nekim klanicama u SAD i u Kanadi, pranje trupova rastvorima organskih kiselina se takođe ne smatra za CCP (već GMP), jer se neki trupovi ne tretiraju (sa ranama ili abscesima). Pregled potencijalnih CCP, kako u HACCP planu sa intervencijama, tako i bez njih, prikazan je u [tabeli 3.3](#), sa mogućim kritičnim limitima, procedurama monitoringa i korektivnim merama. Ako se nakon skidanja kože i/ili evisceracije primenjuju antimikrobni tretmani, pojedinačno ili kombinovano kao završno pranje hemikalijama i/ili termički tretmani (vrućom vodom ili vodenom parom) pre hlađenja, onda se ove dve operacije ne trebaju smatrati za CCP (već se kontrolišu kroz GMP/GHP), jer se mikrobiološka kontaminacija nastala u tim fazama redukuje kasnijom primenom tretmana.

Ukoliko se neki antimikrobni tretman koristi na klanici u cilju kontrole patogena kao CCP u HACCP planu, neophodno je izvršiti njegovu validaciju, odnosno proveru antimikrobne efikasnosti u redukciji bakterijskih patogena ili bakterija indikatora ([FSIS, 2002](#)). Metode za ispitivanje antimikrobne efikasnosti su opisane u prethodnom poglavlju.

Tabela 3.3. Pregled mogućih kritičnih kontrolnih tačaka u HACCP planu klanja goveda (prilagođeno od [Bolton i sar., 2001](#))

CCP	Kritični limiti	Monitoring	Korektivne mere
Pranje kože (sanitajzerom)	Koncentracija i temperatura rastvora sanitajzera, pritisak, vreme delovanja, rad prskalica	Definisan režim praćenja kritičnih limita za sanitajzer	Ponovno tretiranje trupova
Skidanje kože*	a) odsustvo fekalne kontaminacije; b) % kontaminiranih trupova; c) 82°C u sterilizatorima (GMP)	a) vizuelno, svaki trup; b) kompjuterizovani sistem monitoringa	Trimovanje; Obuka/zamena radnika Popravka/zamena opreme
Vakumiranje parom†	a) para: $\geq 82^{\circ}\text{C}$, 20,7-34,5 Pa; b) vakuum: -0,093 Pa; c) površina $\leq 2,5 \text{ cm}^2$	Provera parametara na aparatu, svakih sat vremena	Dodatno trimovanje; popravka aparata
Pranje org. kiselinom (pre evisceracije ili završno)†	a) kiselina: 2,5-10%, pH 2,8, 25-55°C, 13,8-27,6 Pa, 35 sek; b) rad prskalica	Praćenje limita svakih sat vremena	Ponovno tretiranje trupova
Evisceracija*	Kao kod skidanja kože	Kao kod skidanja kože	Kao kod skidanja kože
Trimovanje	Odsustvo fekalne kontaminacije	a) vizuelno, svaki trup; b) dodatno 3 trupa/h	Ponovno trimovanje i inspekcija svih trupova do poslednjeg prihvatljivog; Provera inspekcije i procesa trimovanja
Pranje vrućom vodom	a) voda: 75-85°C, 9,7-13 Pa, 9-12 sek; b) rad prskalica; c) $t^{\circ}\text{C}$ površine trupa	Kontinuirano praćenje temperature vode	Ponovno tretiranje trupova
Rasecanje trupova i uklanjanje kičmene moždine*	Nema zaostalog tkiva kičmene moždine	Vizuelno, svaki trup	Trimovanje; Obuka/zamena radnika
Pasterizacija parom	a) uklanjanje vode sa površine trupova; b) para: 82-94°C, 6-8 sek; c) hlađenje vodom: 4,4°C, 27,6 Pa, 10 sek., površina trupa 17,5-22,4°C	Kontinuirani sistem praćenja parametara	Ponovno tretiranje trupova
Hlađenje trupova*	a) $T \leq 7^{\circ}\text{C}$ u trupu; b) vlažnost i strujanje vazduha; c) veličina i odvojenost trupova	a) merenje $t^{\circ}\text{C}$ trupova svakih sat vremena; b) vizuelno	Odbacivanje trupova; Obuka/zamena radnika Popravka/zamena opreme

* CCP u HACCP planu sa/bez intervencija

† Može biti i GMP

3.7. Zaključni komentar

Dobro je poznato da ne postoji jedna univerzalna kontrolna mera koja može eliminisati alimentarne patogene iz celog lanca hrane. Striktna primena GMP/GHP i principa HACCP-a može donekle kontrolisati nivo mikrobiološke kontaminacije u mesu, ali je primena dodatnih mera intervencije/dekontaminacije neophodna za dalju redukciju nivoa patogena ([Hugas i Tsigarida, 2008](#)). Antimikrobni tretmani se dakle smatraju za jednu od mera u kontroli patogena, ali samo kao dodatak GMP/GHP, a nikako kao njihova zamena, jer je njihova efikasnost nezadovoljavajuća u uslovima nehigijenske prakse. U SAD je efikasnost koncepta HACCP sistema sa intervencijom jasno dokazana značajnim poboljšanjem mikrobiološkog statusa trupova nakon njegovog uvođenja, a posebno u smanjenju prevalence *Salmonella* ([Skandamis i sar., 2010](#)). Prednost HACCP-a bez intervencija je da je njegova implementacija relativno jednostavna, a u osnovi je više preventivan i nije skup ([Bolton i sar., 2001](#)). Prednost intervencija je da za rezultat imaju stalnu i postojanu redukciju mikrobiološke kontaminacije u uslovima postojanog nivoa inicijalne kontaminacije, dok se nedostaci odnose na zavisnost efikasnosti od nivoa inicijalne kontaminacije, mogući negativni uticaj na senzorni kvalitet mesa, ekologiju bakterija, motivisanost radnika da se pridržavaju striktne higijenske prakse, kao i visoku cenu koštanja i uticaj na životnu sredinu.

Nema sumnje da, u uslovima iste inicijalne kontaminacije, primena antimikrobnog tretmana na liniji klanja dovodi do boljeg krajnjeg mikrobiološkog statusa mesa nego u situacijama kada se taj treman ne primenjuje. Međutim, iako veoma korisni, ovi tretmani imaju jedan veliki nedostatak - primenjuju se tek nakon što se kontaminacija dogodila, odnosno deluju reaktivno i ne mogu potpuno da kontrolišu nepredvidljive faktore nakon kontaminacije mesa.

Sa druge strane, antimikrobni tretmani kože goveda primenjeni pre njenog skidanja, potencijalno mogu biti veoma važna CCP koja deluje preventivno, odnosno sprečava ili značajno smanjuje mikrobiološku kontaminaciju mesa trupova sa kože. Primjenjeni zajedno sa tretmanima mesa trupova, u okviru „koncepta višestrukih prepreka“, tretmani kože bi mogli doprineti još boljoj redukciji ukupne mikrobiološke kontaminacije. Detaljno su opisani u narednom poglavljtu.

4. Pregled antimikrobnih tretmana kože goveda

4.1. Uvod

Interventne mere sa ciljem kontrole i redukcije patogena u goveda primenjuju se u jednoj ili više tačaka lanca mesa: pre klanja (na farmi i u stočnom depou), na liniji klanja, tokom hlađenja mesa, pakovanja i prodaje (Midgley i Small, 2006). Mnoge od ovih mera se fokusiraju na klanicu jer je iz brojnih studija poznato da je klanica glavno mesto gde nastaje značajna fekalna i mikrobiološka kontaminacija mesa trupova goveda, a naročito u fazi skidanja kože (Bell, 1997; Avery i sar., 2002).

Proizvodnja trupa goveda koji bi bio sterilan i potpuno slobodan od bakterijske kontaminacije i patogena je u komercijalnim uslovima teško ostvarljiva (Gill i sar., 1996; Elder i sar., 2000). Zbog toga je industrija mesa veoma zainteresovana za razvoj i implementaciju neophodnih interventnih mera i novih operacija u klanju i obradi goveda u cilju što većeg smanjenja mikrobiološke kontaminacije trupa (Sofos, 2005). Podaci koji govore da je koža goveda najveći izvor bakterijske kontaminacije trupa jasno upućuju da je to ključna tačka u klanju goveda gde treba primeniti dekontaminacioni tretman u cilju redukcije ili potpune eliminacije mikroorganizama i/ili sprečavanja njihovog prenosa sa kože na meso trupova (Koohmaraie i sar., 2005). Ovo poglavlje opisuje strategije i mere za dekontaminaciju kože goveda, do momenta njenog skidanja, kako one koje se trenutno koriste u komercijalnim uslovima u klanicama, tako i one koje su ispitivane u eksperimentalnim uslovima, ali nisu doatile punu primenu u industriji mesa. Svaki dekontaminacioni tretman je razmatran u smislu njegove antimikrobne efikasnosti, pitanjima od značaja za bezbednost mesa, prednostima i nedostacima primenjene tehnologije, trenutnim regulatornim statusom i pitanjima od značaja za potrošača. U zaključnom komentarju ovog poglavlja je data i zbirna [tabela](#) svih antimikrobnih tretmana kože goveda, ispitivanih u dosad objavljenim istraživanjima. U tabeli su prikazane i postignute redukcije različitih mikroorganizama na koži, kao i redukcije njihovog prenosa na trupovima goveda nakon skidanja kože.

4.2. Čišćenje i pranje goveda pre klanja

Jedan od istraživanih postupaka za smanjenje mikrobiološke kontaminacije kože goveda, a samim tim i prenosa bakterijskih patogena sa kože na meso trupova, je čišćenje i pranje kože pre ulaska goveda na liniju klanja, odnosno pre omamljivanja (Geornaras i Sofos, 2005). Koža goveda je često zaprljana suvim ili vlažnim naslagama fecesa, prljavštinom i blatom, što može olakšati kontaminaciju mesa trupova (Hadley i sar., 1997; Barkocy-Gallagher i sar., 2003). Tretmani čišćenja i pranja kože pre klanja uključuju pranje vodom, sa ili bez antimikrobnih sredstava, kao i šišanje dlake i naslaga nečistoće na koži (Byelashov i Sofos, 2009).

4.2.1. Pranje vodom

Pranje životinja pre klanja je praksa koja može da se koristi kod prekomerno prljavih životinja, uz obavezno kasnije sušenje kože (Buncic, 2006). Međutim, pokazalo se da pranje ima samo kozmetički efekat na vizuelnu čistoću i skoro nikakav efekat na smanjenje mikrobiološke kontaminacije kože. Takođe, utvrđeno je da najčešće nema značajne razlike u nivou ukupne i fekalne mikroflore kože između goveda sa različitim kategorijama vizuelne čistoće kože (Antic i sar., 2010a), ali i da trupovi poreklom od životinja sa prljavom kožom imaju veći nivo mikrobiološke kontaminacije, kako kod goveda (Ridell i Korkeala, 1993; McEvoy i sar., 2000; Kain i sar., 2001; Kiermeier i sar., 2006), tako i u slučaju ovaca (Hadley i sar., 1997; Byrne i sar., 2007). Ovo ukazuje da je, u slučaju prljavih životinja, izvesno čišćenje kože pre klanja neophodno da bi se sprečio prenos bakterija na meso tokom operacije skidanja kože (Buncic, 2006).

Tretman životinja pranjem hladnom vodom pre klanja, ispitivan je u nekoliko istraživanja, ali su dobijeni rezultati bili veoma varijabilni (Geornaras i Sofos, 2005). U istraživanju Byrne i sar. (2000), koji su tretman goveda pranjem vršili u stočnom depou, utvrđeno je da efikasnost tretmana zavisi od trajanja aplikacije vode. Ovi su istraživači prethodno na kožu goveda nanosili feces ranije inokulisan sa *E. coli* O157:H7. Zatim su nakon 24 h sušenja prali kožu koristeći jak pritisak hladne vode iz gumenog creva (šmrkovima), u trajanju od 1 i 3 minuta. Nakon 1 min. pranja vodom, koža je postala vizuelno čista, ali je nivo *E. coli* O157:H7, kako na koži, tako i na trupovima u odnosu na kontrolne životinje bio veoma sličan. Sa druge strane, pranje

vodom u trajanju od 3 min. je značajno redukovalo fekalnu kontaminaciju kože sa ovim patogenom, a takođe i na trupovima. Međutim, s obzirom da je eksperiment izveden sa inokulisanom mikroflorom, čije pričvršćivanje za dlaku nije isto kao kod prirodne mikroflore, rezultati ovog eksperimenta ne mogu imati praktični značaj.

Nešto drugačiji sistem za pranje goveda vodom u stočnom depou je ispitivan u studiji [Mies i sar. \(2004\)](#). Pranje životinja je vršeno tuširanjem jakim pritiskom, sa ventralne, a zatim i sa dorzalne strane, u automatizovanom komercijalnom sistemu za pranje stoke. Međutim, ovaj tretman nije redukovao bakterijsku kontaminaciju kože, već je (u odnosu na kontrolne životinje) čak doveo do povećanja nivoa ukupne mikroflore, koliforma i generičke *E. coli* i do $0,8 \log \text{cfu/cm}^2$, a prevalence *Salmonella* spp. za 14% na koži. Moguće objašnjenje je da pranje oslobađa bakterije koje su „zatvorene“ u naslagama fecesa i blata i tako ih ravnomernije distribuira po koži, što kasnije može doprineti i njihovom lakšem prenosu na trup. Ukupni antimikrobni efekti pranja kože goveda (u fazi pre i nakon klanja), dati su u [tabeli 4.8](#).

Pranje ovaca pre klanja se redovno sprovodi na Novom Zelandu i obavezno je regulativom ([Biss i Hathaway, 1995](#)), dok se pranje goveda redovno vrši samo u nekim klanicama u Australiji i u SAD ([Geornaras i Sofos, 2005](#)). Međutim, u dve studije koje su sproveli [Biss i Hathaway \(1995, 1996\)](#), tretman ovaca pranjem vodom je doprineo samo poboljšanju vizuelnog izgleda trupova (manje fekalne i druge kontaminacije), ali je nasuprot tome došlo do povećanja mikrobiološke kontaminacije na trupovima poreklom od opranih životinja u odnosu na kontrolne. U istraživanju sprovedenom na kozama, pranje pre klanja je imalo pozitivan efekat na vizuelni izgled kože i značajno je redukovalo njenu ukupnu mikrofloru, ali nije dovelo do poboljšanja mikrobiološkog statusa trupova ([Kannan i sar., 2007](#)). Kod goveda, [Bell \(1997\)](#) je takođe utvrdio povećanje nivoa ukupne mikroflore na trupovima poreklom od opranih životinja što može ukazivati na to da je voda vektor bakterijama i da doprinosi njihovom lakšem prenosu sa kože na trup ([Hadley i sar., 1997](#)). Zato je nakon pranja obavezno osušiti životinje ([Codex Alimentarius, 2005](#)).

Neophodan preduslov za higijensko klanje životinja je prezentacija samo čistih životinja za klanje ([Davies i sar., 2000](#)), što je i preporuka Komisije [Codex Alimentarius \(2005\)](#), ali i regulatorna obaveza za subjekte u primarnoj proizvodnji mesa, odnosno farmere i klanice ([EC, 2004a, b](#)). Takođe, ocena čistoće kože je deo ante-mortem procedura koje sprovodi zvanični veterinar u stočnom depou klanice i on je u obavezi da, u slučaju neprihvatljivo prljavih životinja, naloži da se životinje

očiste pre klanja (EC, 2004c). Implementacija tretmana pranja životinja pre klanja može biti limitirana klimatskim uslovima, vrstom životinja i tehničkim uslovima u stočnom depou (Geornaras i Sofos, 2005). Međutim, daleko je značajnije pitanje dobrobiti životinja jer pranje i čišćenje živih životinja može uzrokovati njihov stres, što posledično ima negativan efekat i na kvalitet mesa (Byelashov i Sofos, 2009). Ovo je utvrđeno kod ovaca (Bray i sar., 1989), ali ne i kod koza (Kannan i sar., 2007). Ne treba zanemariti i pitanje bezbednosti radnika zbog intenzivnog rukovanja životnjama tokom čišćenja i pranja. Alternativno, prljave životinje se mogu zaklati na kraju radnog dana, uz usporavanje linije klanja, pojačanu higijenu klanja i obrade trupova, povećavanje prostora između trupova i slično (Biss i Hathaway, 1995; Byrne i sar., 2007). Neki istraživači čak preporučuju da se preterano prljave životinje vrate sa klanice na farmu porekla (što opet kompromituje dobrobit životinja) ili da se farmeru naplate troškovi čišćenja stoke, što bi farmere navelo da na klanje šalju samo čistu stoku (Van Donkersgoed i sar. 1997; Heuvelink i sar., 2001).

4.2.2. Pranje vodom uz dodatak antimikrobnih sredstava

U cilju poboljšanja antimikrobne efikasnosti tretmana pranja vodom pre klanja, pojedini istraživači su ispitivali upotrebu različitih hemijskih sredstava, kako u laboratorijskim, tako i u praktičnim uslovima u stočnom depou klanice. Tako su Mies i sar. (2004) uporedno sa ispitivanjem tretmana pranja vodom u stočnom depou pre klanja, ispitivali i antimikrobnu efikasnost 0,5% rastvora mlečne kiseline i hlora (koncentracije 50 ppm). Međutim, ovaj tretman je takođe doveo do povećanja nivoa ukupne i fekalne mikroflore na koži, a beznačajno smanjenje prevalence *Salmonella* spp. je utvrđeno samo nakon primene hlora. Nakon ispitivanja većih koncentracija hemikalija u laboratoriji, tretiranjem komada kože goveda prskanjem i ispitivanjem efikasnosti na inokulisanoj *Salmonella* Typhimurium, značajan efekat je utvrđen primenom mlečne i sirčetne kiseline (4 i 6%) i etanola (70, 80 i 90%), dok sanitajzer i hlor nisu imali skoro nikakav efekat. Takođe, istraživači su zaključili da bi se ovakav tretman ipak morao primeniti samo nakon omamljivanja i klanja, jer bi upotreba visokih koncentracija ispitivanih hemikalija (prvenstveno organskih kiselina i etanola) ugrozila dobrobit životinja uzrokujući stres i/ili iritaciju oka i disajnih puteva. Ukupni antimikrobeni efekti tretmana pranjem kože goveda sa dodatkom hemijskih sredstava (u fazi pre i nakon klanja), dati su u tabeli 4.5.

Bosilevac i sar. (2004a, b) su u nizu eksperimenata ispitivali efikasnost cetilpiridin-hlorida (CPC) u redukciji bakterijske mikroflore kože i njenog prenosa na trupove goveda. CPC je kvaternerno amonijumovo jedinjenje i koristi se kao oralni antiseptik. Optimizacija tretmana je vršena na životnjama u farmskim uslovima, kao i na model sistemima na koži goveda (*Bosilevac i sar.*, 2004a), dok je validacija tretmana vršena u praktičnim uslovima na farmi pre utovara stoke (*Bosilevac i sar.*, 2004a) i u stočnom depou klanice (*Bosilevac i sar.*, 2004b). Iako su prepostavili da je ovaj tretman najlogičnije primeniti u fazi nakon omamljivanja i klanja životinja, model je ipak razvijen u fazi pre klanja zbog toga što upotreba CPC u goveđim klanicama u to vreme nije bila dozvoljena. Tokom optimizacije tretmana, na koži goveda na farmi su ispitivani različiti parametri koncentracije i vremena delovanja CPC, a različite kombinacije pritiska sa predpranjem vodom ili CPC (nakon čega je vršen glavni tretman sa CPC), ispitivane su na model sistemima na koži, ručnim ili specijalnim prskalicama pod visokim pritiskom (*Bosilevac i sar.*, 2004a). Utvrđena redukcija TVC i EBC na koži bila je slična bez obzira na koncentraciju, ali i statistički značajnija kada je CPC bio ostavljen da duže deluje na koži (od 1,2-2,4 log cfu/cm² za TVC i od 0,8-3,4 log cfu/cm² EBC za sve ispitivane kombinacije). Zbog toga je za validaciju tretmana korišćena koncentracija CPC od 1%. Tretmani goveda su vršeni prskanjem na farmi, naročito mesta na koži sa raširenom prljavštinom (grudi, stomak i zadnje noge). Nakon utovara u kamion i transporta do klanice u trajanju od oko 5 h, goveda su zaklana i nakon toga vršeno uzorkovanje kože. U odnosu na kontrolnu grupu životinja, na koži tretiranih goveda je utvrđena redukcija TVC i EBC oko 0,5 log cfu/cm² (znatno manje nego u prethodnim eksperimentima), a prevalence *E. coli* O157 oko 2,5%, dok je na trupovima redukcija prenosa bila 0,3 i 0,1 log cfu/cm², a došlo je do povećanja prevalence *E. coli* O157 za oko 4,5%. Autori su zaključili da tretmane kože goveda rastvorom CPC treba vršiti odmah pre ili nakon omamljivanja goveda, jer u slučaju ranijeg tretiranja na farmi, tokom transporta goveda, boravka u depou i kasnije dolazi do ponovne kontaminacije kože, iako je i nakon 4 h od tretmana, CPC imao rezidualni efekat na mikrofloru. Međutim, u ovom eksperimentu su životinje bile veoma prljave, a poznato je da se CPC, kao i druga kvaternerna amonijumova jedinjenja, veoma brzo inaktivise u prisustvu organskog materijala (*McDonnell i Russell*, 1999). Zbog toga su *Bosilevac i sar.* u optimizaciju tretmana sa CPC uključili i predpranje vodom ili CPC-om, prvo na kožama kao model sistemima, jer bi aplikacija visokog pritiska na živim životnjama ugrozilo njihovu dobrobit. U više

ispitivanih kombinacija sa različitim pritiscima tečnosti, tretman samo vodom pod visokim pritiskom nije imao nikakvog efekta u redukciji TVC i EBC na koži, dok su najbolji efekat pokazali tretmani sa CPC (predpranje i pranje) pod visokim pritiskom, (redukcija TVC od $4,4 \text{ log cfu/cm}^2$ i EBC od $3,8 \text{ log cfu/cm}^2$). Međutim, zbog visokog pritiska, ovakav tretman bi se mogao sprovoditi samo nakon klanja, pa je za konačnu validaciju korišćeno predpranje i pranje sa CPC manjim pritiskom, koje je prethodno dalo redukciju od $3,5 \text{ log cfu/cm}^2$ TVC i $3,2 \text{ log cfu/cm}^2$ EBC na koži ([tabela 4.5](#)).

S obzirom da upotreba CPC na liniji klanja goveda nije bila dozvoljena, [Bosilevac i sar. \(2004b\)](#) su konačnu validaciju tretmana sa CPC uradili u uslovima koji simuliraju željeni tretman, odnosno na govedima u stočnom depou, neposredno pre klanja. Dan pre klanja vršeno je pranje kože goveda u cilju uklanjanja naslaga prljavštine i te su životinje bile smeštene u čiste boksove. Narednog dana je prvo vršeno predpranje sa 1% rastvorom CPC (3 min.) ventralnih delova kože (grudi, stomak, perineum i zadnje noge), u cilju što potpunijeg uklanjanja fecesa i nečistoće. Zatim je koža kvašena po drugi put istom koncentracijom CPC (1 min.). Nakon pola sata goveda su zaklana i ispitivan je efekat tretmana sa CPC u redukciji TVC i *Enterobacteriaceae* na trupovima goveda, prevalence *E. coli* O157 na koži i na trupovima, a dodatno i prisustvo rezidua CPC na površini mesa trupova. Dodatno je vršena ocena kvaliteta trupova i njihova kategorizacija u pogledu postojanja podliva ili pojave „tamnog, čvrstog i suvog mesa“ usled stresa kome su goveda bila izložena tokom tretmana. Na trupovima nakon skidanja kože, utvrđena je redukcija prenosa TVC od $1,5 \text{ log cfu/cm}^2$ i EBC od $1,1 \text{ log cfu/cm}^2$, u odnosu na njihov nivo na trupovima kontrolne grupe goveda. Prevalenca *E. coli* O157 na koži je bila smanjena sa 56% na 34%, odnosno efikasnost tretmana u smanjenju prevalence je iznosila 39,3% u odnosu na kontrolne životinje. Na trupovima je prevalenca ovog patogena bila smanjena sa 23% na 3%, sa efikasnošću tretmana u smanjenju prenosa *E. coli* O157 od 87% ([tabela 4.6](#)). Rezidue CPC nisu bile utvrđene na trupovima, ali je bila povećana incidencija trupova sa podlivima i pojmom „tamnog, čvrstog i suvog mesa“, što umanjuje vrednost trupova goveda. Iz rezultata svih ovih istraživanja autori su zaključili da pranje kože goveda sa 1% rastvorom CPC ima veliki potencijal za primenu u klanicama, ali samo kao antimikrobni tretman kože nakon omamljivanja i klanja, u cilju efikasne redukcije mikroflore kože i njenog prenosa na trup.

U prethodno opisanim istraživanjima, nakon tretmana pranja vodom (sa ili bez dodatka antimikrobnih sredstava) životinje nisu bili osušene, što može značajno

smanjiti ukupnu efikasnost tretmana sa aspekta redukcije prenosa bakterija sa kože na meso tokom skidanja kože (Buncic, 2006). Sušenje kože se može sprovesti na prirodan način, ostavljanjem životinja da se osuše na vazduhu ili dodavanjem suve prostirke u stočnom depou. Drugi način je vakumiranje kože usisivačima za dubinsku ekstrakciju, čime se mehanički uklanjaju prljavština i bakterije sa kože, a takođe i hemijsko sredstvo. Međutim, ovaj način sušenja je, zbog dobrobiti životinja, jedino moguć u tretmanima kože koji se sprovode nakon klanja. Drugi negativan aspekt pranja pre klanja je mogućnost ponovne kontaminacije kože kontaktom sa zidovima, podovima i drugim životnjama u stočnom depou, koridoru i boksu za omamljivanje, sve do faze kačenja i podizanja na kolosek za iskrvarenje (Bosilevac i sar., 2004a).

4.2.3. Šišanje

Mere za smanjenje ili uklanjanje vidljive kontaminacije kože goveda su i šišanje dlake i nečistoća sa kože pre klanja. Šišanje se smatra efikasnim načinom za poboljšanje vizuelnog izgleda preživara za klanje i u nekim zemljama se široko praktikuje za čišćenje prljavih životinja, a posebno kod ovaca (Hadley i sar., 1997). Naročito se preporučuje šišanje i uklanjanje naslaga fecesa i blata sa onih mesta gde se koža inicialno zarezuje tokom operacije skidanja. Međutim, šišanje je efikasno samo u uklanjanju vidljive nečistoće sa kože (Davies i sar., 2000) i nema nikakvog efekta u redukciji mikroflore kože (Small i sar., 2005). Sa druge strane, šišanje može izazvati stres kod životinja ako se vrši pre klanja, intenzivno rukovanje životnjama može predstavljati opasnost po bezbednost radnika, a takođe postoji i rizik od unakrsne kontaminacije kože goveda preko nesterilisane opreme za šišanje i preko radnika (Buncic, 2006). Takođe, utvrđeno je da na dlaci vizuelno čiste kože goveda nema razlike u nivoima ukupne i fekalne mikroflore (TVC, *Enterobacteriaceae* i generičke *E. coli*) između gornjeg i donjeg sloja dlake (Antic i sar., 2010a). Ovaj podatak ukazuje da je vertikalna distribucija mikroflore na dlaci kože goveda uniformna i da bi mere šišanja gornjeg sloja dlake, bar u slučaju vizuelno čistih životinja, bile neefikasne u uklanjanju bakterijske kontaminacije kože.

Međutim, poznato je da trupovi poreklom od goveda sa obimnim naslagama nečistoće imaju veći nivo mikrobiološke kontaminacije (Ridell i Korkeala, 1993; McEvoy i sar., 2000; Kiermeier i sar. 2006), pa bi se na osnovu toga moglo zaključiti da u slučaju prljavih životinja šišanje može imati pozitivnog efekta na higijenski

status trupova. Takođe, delovi naslaga nečistoće sa kože se lako prenose na meso trupova i pored pažljivog i higijenskog skidanja kože (Gill, 2004). Zbog toga neke klanice moraju da uspore linije klanja i za 10-12%, a imaju i gubitke u količini mesa i većoj potrebi u radu zbog intenzivnog trimovanja fekalne kontaminacije sa mesa trupova na liniji klanja (Van Donkersgoed i sar., 1997). Sastav nečistoće na koži može biti veoma različit; uglavnom su to veće ili manje naslage fecesa, blata i ostaci prostirke koji mogu biti suvi ili vlažni, jače ili slabije pričvršćeni za dlaku i pokrivati samo neke delove kože ili potpuno po nogama, stomaku, grudima i na slabinama (Biss i Hathaway, 1995). Ova nečistoća, naročito ako se većim delom sastoji iz fecesa, je značajan izvor enteričnih patogena (*E. coli* O157, *Salmonella* i *Campylobacter*) i njihovog prenosa na meso trupova (Sofos i sar., 1999a).

Van Donkersgoed i sar. (1997) su u studiji sprovedenoj u jednoj klanici koja kolje veliki broj goveda, ispitivali uticaj šišanja naslaga fecesa i nečistoće sa kože na mikrobiološki status trupova. Nakon šišanja nečistoće sa kože abdomena i zadnjih nogu, smanjenje prenosa mikroflore na trupovima nakon skidanja kože je iznosilo manje od 0,5 log cfu/cm², pa su autori zaključili da ovakva redukcija nema praktični značaj i da u kontroli kontaminacije trupova sa kože značajniju ulogu ima sam tehnološki proces klanja. Iz tog razloga su autori preporučili da ovaj procesni korak u HACCP planu klanice može biti samo kontrolna tačka, a ne i kritična kontrolna tačka.

Small i sar. (2005) su u laboratorijskim uslovima ispitivali efikasnost šišanja dlaka na čistoj koži, mašinicama za šišanje stoke. Nakon šišanja je na koži utvrđeno značajno povećanje nivoa TVC za oko 0,3 log cfu/cm². Mogući razlozi su stvaranje prašine tokom šišanja i širenje bakterija, kao i njihovo oslobođanje sa dlake i olakšan prenos na sunđer za uzorkovanje. Takođe, šišanjem na koži zaostaje velika količina kratkih odsečenih dlaka koje se kasnije lako mogu preneti na meso trupova, a sa njima i bakterije koje se tu nalaze (Midgley i Small, 2006).

Nedavno je urađena jedna studija o efektima šišanja kože goveda pre i posle klanja na mikrobiološki status trupova i njihov kvalitet (McCleery i sar., 2008). Pre klanja, vršena je ocena čistoće kože na osnovu numeričkog sistema koji se koristi u UK. Goveda kategorije 3 (suva nečistoća na koži) i kategorije 4 (vlažna nečistoća) su bila ošišana u depou ili na liniji klanja nakon omamljivanja i klanja, a goveda čiste kože (kategorije 1 i 2) nisu šišana (kontrola). Šišanje je vršeno specijalnim pneumatskim makazama, a na liniji klanja u delu nakon iskrvarenja koji je bio fizički odvojen od narednih operacija obrade trupa. Utvrđeno je zanemarljivo smanjenje

prenosa TVC na trupovima poreklom od ošišanih (prljavih) u odnosu na goveda sa čistom kožom (neošišana), od 0,1-0,3 log cfu/cm² ([tabela 4.1](#)), ali nije utvrđen pravi efekat šišanja jer nije vršeno poređenje između istih kategorija čistoće kože (sa i bez tretmana). Takođe, utvrđena je i značajna mikrobiološka kontaminacija vazduha u delu gde se vrši iskrvarenje goveda i šišanje kože, ali i njeno progresivno smanjenje prema kraju linije klanja do hladnjače. Ovo ukazuje da se tokom šišanja stvara određena količina praštine koja može biti izvor mikrobiološke kontaminacije trupova, ali i da će to zavisiti od konstrukcije linije klanja, odvojenosti prljavih i čistih operacija, kao i protoka vazduha. Nakon merenja pH vrednosti mišića, utvrđeno je malo, ali značajno povećanje pH od 5,66 u trupovima goveda ošišanih u stočnom depou, u odnosu na vrednost pH od 5,59 kod goveda ošišanih na liniji klanja, što ukazuje da šišanje živih životinja prouzrokuje stres kod njih. Ukupno, autori su zaključili da šišanje kože prljavih goveda ima kao rezultat dobijanje trupova sa mikrobiološkim statusom sličnim trupovima poreklom od goveda sa čistom kožom i da je posebno korisno kada se vrši nakon klanja. Međutim, nejasno je da li je na liniji klanja uopšte moguća primena šišanja, jer Evropska regulativa 854/2004 ([EC, 2004c](#)) jasno govori da se prljave životinje ne smeju klati dok se ne očiste pre klanja, i da je neophodan preduslov da se samo čiste životinje mogu slati na klanicu ([EC, 2004a](#)).

Iz svega navedenog, može se zaključiti da šišanje nije efikasno u redukciji mikrobiološke kontaminacije kože i njenog prenosa na trup, a može imati i neke negativne posledice (stres u životinja, povećanje kontaminacije klanice i/ili trupova, itd.). Međutim, šišanje kao predtretman, odnosno u cilju pripreme kože za aplikaciju nekog antimikrobnog sredstva, može biti korisno za ukupni efekat tog tretmana ([Baird i sar., 2006](#)), što je opisano u narednom poglavljju.

Tabela 4.1. Tretmani šišanja dlake i nečistoće sa kože goveda i postignuti antimikrobni efekti u redukciji bakterijske kontaminacije kože i trupova

Tretman	Redukcija na koži		Redukcija prenosa na trupovima			Reference
	TVC log cfu/cm ² *	TVC log cfu/cm ² *	TCC log cfu/cm ² *	E. coli log cfu/cm ² *		
Šišanje nečistoće sa kože	/	0,2	0,3	0,3	Van Donkersgoed i sar. (1997)	
Šišanje dlake	/	0,1-0,3	/	/	McCleery i sar. (2008)	
Šišanje + opaljivanje	- 0,3	/	/	/	Small i sar. (2005)	
	2,0	/	/	/		

* Logaritamska redukcija = (log cfu/cm² pre tretmana) – (log cfu/cm² nakon tretmana)

4.3. Pranje i dekontaminacija kože goveda nakon klanja

Za razliku od tretmana čišćenja i pranja kože goveda pre klanja, antimikrobnii tretmani koji se primenjuju na koži zaklanih goveda imaju višestruke prednosti. S obzirom da ne postoji pitanje dobrobiti životinja, za ovu svrhu se mogu koristiti agresivniji tretmani, antimikrobna sredstva i metode njihove aplikacije. Takođe, koža nije jestiva i, u odnosu na dekontaminaciju mesa trupova, na koži se potencijalno mogu primeniti neka sredstva u koncentraciji u kojoj ne bi mogla na mesu, ali samo pod uslovom da se obezbedi da se njihove rezidue ne prenesu na trup tokom skidanja kože. Aplikacija različitih tretmana je mnogo praktičnija na liniji klanja u specijalno napravljenim kabinetima u kojima se koža može efikasno osušiti nakon tretmana, a sterilizacijom opreme između svakog trupa se može sprečiti unakrsna kontaminacija između trupova. Dalje, tretmani se mogu primeniti na celoj površini kože goveda, što je često moguće samo u velikim klanicama ([Bosilevac i sar., 2005a](#)), ili se mogu tretirati samo pojedini ključni delovi kože (kao što su linije zasecanja), što bi uz korišćenje jednostavne priručne opreme moglo olakšati primenu u svim, pa i malim klanicama ([Small i sar., 2005](#)).

Na omamljenim i zaklanim govedima, u laboratorijskim uslovima ili na liniji klanja, ispitivana je hemijska depilacija, tretman vrućom vodom ili vodenom parom, tretmani ozoniranom i elektroliziranom vodom, kao i pranje i dekontaminacija kože različitim antimikrobnim hemijskim sredstvima. Ova hemijska sredstva uključuju razne organske i neorganske kiseline i nekiselinska jedinjenja (baze, alkohole, kvaternerna amonijumova jedinjenja i sanitajzere), koji se mogu upotrebljavati samostalno ili kao sastojci u patentiranim formulama, u kombinaciji sa ispiranjem vodom i/ili vakumiranjem i sušenjem kože ([Byelashov i Sofos, 2009](#)).

4.3.1. Hemijska depilacija

Hemijska depilacija je dekontaminacioni proces kojim se potpuno uklanja dlačni pokrivač i nečistoća sa kože goveda u nizu postupaka u zatvorenim kabinetima, koji uključuju aplikaciju natrijum sulfida, zatim njegovu neutralizaciju vodonik peroksidom i završno ispiranje vodom pre operacije skidanja kože ([Schnell i sar., 1995](#)). Ovaj metod su patentirali [Bowling i Clayton](#), 1992 god. i on se ranije koristio u nekim klanicama u SAD ([Sofos, 2005](#); [Skandamis i sar., 2010](#)) u cilju

ispunjavanja kriterijuma performanse koji se odnose na redukciju patogena, odnosno *Salmonella* spp. ([FSIS, 1996b](#)).

Efikasnost hemijske depilacije su prvi ispitivali [Schnell i sar. \(1995\)](#). Tretman kože goveda u ovoj studiji vršen je prema patentiranom metodu Bowling i Clayton, nakon omamljivanja i klanja goveda, i sastojao se iz sledećih faza:

- predpranje vodom ($40,5^{\circ}\text{C}$, 8,28 bara, 23 sek.);
- prva aplikacija 10% rastvora natrijum sulfida (25°C , 3,45 bara, 16 sek.);
- vreme potrebno za delovanje natrijum sulfida (90 sek.);
- druga aplikacija 10% rastvora natrijum sulfida (25°C , 5,52 bara, 16 sek.);
- vreme potrebno za delovanje natrijum sulfida (60 sek.);
- ispiranje recirkulisanom vodom ($40,5^{\circ}\text{C}$, 20,68 bara, 50 sek.);
- neutralizacija sa 3% rastvorom vodonik peroksida (3,45 bara, 17 sek.);
- ispiranje recirkulisanom vodom ($40,5^{\circ}\text{C}$, 8,28 bara, 23 sek.);
- neutralizacija sa 3% rastvorom vodonik peroksida (3,45 bara, 17 sek.);
- ispiranje recirkulisanom vodom ($40,5^{\circ}\text{C}$, 8,28 bara, 23 sek.);
- ispiranje svežom vodom (8,28 bara, 23 sek.).

Ceo proces hemijske depilacije traje oko 6 minuta i u komercijalnim uslovima se vrši nakon omamljivanja, ali pre klanja goveda, da ne dođe do kontaminacije ubodne rane hemikalijama. Ovom studijom je bio obuhvaćen mali broj goveda (10 tretiranih i 10 kontrolnih) i ispitana je efekat hemijske depilacije kože u smanjenju prenosa bakterija na trupove. Redukcija nivoa TVC i generičke *E. coli* u odnosu na kontrolne trupove nije bila od praktičnog značaja (oko 0,1 log cfu/cm²), a ukupan broj koliforma je bio povećan za 0,3 log cfu/cm². Međutim, nivo vidljive kontaminacije mesa trupova (feces, dlake) nakon završene obrade bio je značajno smanjen kod tretiranih trupova u odnosu na kontrolne, čime je bila smanjena potreba za kasnjim trimovanjem. Efekat ovog tretmana ogledao se samo u ispunjavanju regulatorne obaveze klanica da trupovi nakon završene obrade nemaju vizuelne kontaminacije na površini, odnosno da ispunjavaju „zero tolerance“ kriterijum performanse ([FSIS, 1996a](#)). Na krajnji beznačajan antimikrobni efekat verovatno je uticao mali broj ispitivanih goveda i unakrsna kontaminacija poreklom od drugih trupova koji nisu regularno bili podvrgnuti hemijskoj depilaciji ([Byelashov i Sofos, 2009](#)).

Isti tretman i njegov efekat u redukciji mikroflore kože, ispitivali su u laboratorijskim uslovima [Castillo i sar. \(1998\)](#). Oni su komade kože inokulisali sa *Salmonella Typhimurium* i *E. coli* O157:H7, a zatim kožu tretirali metodom opisanim

u prethodnom istraživanju, ali ručnim prskalicama. Utvrđena redukcija inokulisane mikroflore na koži iznosila je $4,6 \text{ log cfu/cm}^2$ za *S. Typhimurium* i $4,8 \text{ log cfu/cm}^2$ za *E. coli* O157:H7. Redukcija prirodne mikroflore kože iznosila je $3,4 \text{ log cfu/cm}^2$ za TVC, $3,9 \text{ log cfu/cm}^2$ za koliforme i $4,3 \text{ log cfu/cm}^2$ za generičku *E. coli* (tabela 4.2). Autori su zaključili da ovako visoka redukcija bakterija na koži, iako postignuta u laboratorijskim uslovima, ukazuje da hemijska depilacija kože može biti veoma efikasna u smanjenju kontaminacije trupova poreklom sa kože goveda.

Efikasnost hemijske depilacije kože u smanjenju prenosa mikrobiološke kontaminacije na trupove goveda ispitivali su i [Nou i sar. \(2003\)](#). Ovi istraživači su u komercijalnoj klanici koja redovno primenjuje hemijsku depilaciju ispitali 120 trupova goveda (60 tretiranih i 60 kontrolnih), uzorkovanjem kože pre tretmana i trupova neposredno nakon skidanja kože. Za razliku od studije [Schnell i sar. \(1995\)](#), ovde je utvrđena veoma visoka redukcija prenosa TVC (2 log cfu/cm^2) i *Enterobacteriaceae* ($1,8 \text{ log cfu/cm}^2$) na trupovima goveda kod kojih je koža bila podvrgnuta hemijskoj depilaciji u odnosu na kontrolne trupove. Prevalenca *E. coli* O157:H7 je takođe bila značajno smanjena, sa 50% na kontrolnim trupovima, do 1% na tretiranim (57% kontrolnih i 1,5% tretiranih trupova je bilo pozitivno na *E. coli* O157:H7 u odnosu na prevalencu na koži) (tabela 4.2). Ovo je prva značajna studija koja dokazuje da antimikrobni tretmani kože goveda, kada se uključe u proces klanja i obrade, mogu značajno redukovati bakterijsku kontaminaciju trupova goveda poreklom sa kože, a posebno sa patogenima kao što je *E. coli* O157:H7.

Međutim, uprkos efikasnosti hemijske depilacije, ovaj metod nije našao širu primenu u industriji mesa u SAD ([Kooohmaraie i sar., 2005](#); [Skandamis i sar., 2010](#)). Glavni nedostaci ovog tretmana su veliki troškovi instalacije opreme i redukovana brzina procesa klanja ([Byelashov i Sofos, 2009](#)), jer proces hemijske depilacije iziskuje dodatnih 6 minuta za obradu jednog trupa, što za klanice koje kolju veliki broj goveda predstavlja veliki trošak ([Schnell i sar., 1995](#)). Značajni troškovi ovog tretmana su i rukovanje hemikalijama pre i posle upotrebe, recikliranje hemijskog otpada koji može ozbiljno ugroziti životnu sredinu i obrada hidrolizovanih dlaka, koje se dalje mogu upotrebiti kao veštačko đubrivo ([Midgley i Small, 2006](#)). Natrijum sulfid je korozivan i toksičan za kožu i brzo se pretvara u vodonik sulfid, koji je takođe visoko toksičan. Umesto njega se za hemijsku depilaciju mogu koristiti magnezijum peroksid i druga alkalna sredstva, kao kalijum cijanat ([Gehring i sar., 2006](#)). Efikasnost 2,4% rastvora kalijum cijanata i 6,2% rastvora natrijum sulfida u

laboratorijskim uslovima ispitivali su [Carlson i sar. \(2008a\)](#). Aplikacija na kožama kao model sistemima je vršena dvostrukim prskanjem (temperatura rastvora 30°C), a vreme kontakta je iznosilo 90 i 60 sek. Zatim je vršeno ispiranje i neutralizacija alkalnih sredstava vodom (kalijum cijanata) i vodonik peroksidom i natrijum fosfatom (alkalnog natrijum sulfida). Redukcija inokulisane mikroflore na koži (*E. coli* O157:H7 i *Salmonella*) iznosila je 5,1 log cfu/cm² i 0,7 log cfu/cm² (tretman kalijum cijanatom), odnosno 4,8 log cfu/cm² i 4,2 log cfu/cm² (tretman natrijum sulfidom). Autori su pokazali da tretmani hemijske depilacije imaju visoku antimikrobnu efikasnost zbog kaustičnih osobina korišćenih alkalnih sredstava (pH oko 13), kao i zbog uklanjanja dlaka i organskog materijala za koji su bakterije pričvršćene, ali nije utvrđen razlog slabe efikasnosti kalijum cijanata u redukciji *Salmonella* ([tabela 4.2](#)).

Tabela 4.2. Tretmani hemijske depilacije kože goveda i postignuti antimikrobni efekti u redukciji bakterijske kontaminacije kože i trupova

Tretman hemijske depilacije	Redukcija na koži (log cfu/cm ²) *					Reference	
	TVC	TCC	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157 †	<i>Salmonella</i> †		
Natrijum sulfid 10% + vodonik peroksid 3%	3,4	3,9	4,3	4,8	4,6	Castillo i sar. (1998)	
Natrijum sulfid 6,2% + vodonik peroksid 1%	/	/	/	4,8	4,2	Carlson i sar. (2008a)	
Kalijum cijanat 2,4%	/	/	/	5,1	0,7		
Redukcija prenosa na trupovima							
	TVC	EBC	TCC	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157		
				log cfu/cm ² *	e (%)	c	
Natrijum sulfid 10% + vodonik peroksid 3%	0,1	/	-0,3	0,1	/	/	Schnell i sar. (1995)
	2,0	1,8	/	/	98%	50x	Nou i sar. (2003)

* Logaritamska redukcija = (log cfu/cm² pre tretmana) – (log cfu/cm² nakon tretmana)

e Efikasnost tretmana u redukciji prevalence = (% redukcije x 100) / % pozitivnih kontrola

c Koeficijent efikasnosti tretmana = (% pozitivnih kontrola) / (% pozitivnih nakon tretmana)

† Inokulisana mikroflora (direktno na kožu ili putem inokulisanog fecesa)

4.3.2. Opaljivanje kože

Opaljivanje prethodno ošišane kože je ispitivano u studiji [Small i sar. \(2005\)](#). U laboratorijskim uslovima (u prostorijama klanice), komadi čiste kože su bili prvo šišani mašinicom za šišanje stoke, a zatim je vršeno njihovo opaljivanje plamenikom u trajanju od 10 sek. Utvrđena je redukcija TVC na koži preko 2 log cfu/cm² ([tabela 4.1](#)). Iako su rezultati ukazali na antimikrobnu efikasnost ovakvog tretmana, tokom

opaljivanja se stvara veća količina pepela koji aerogeno može kontaminirati meso trupova (sa ili bez bakterija) i predstavljati zdravstveni problem za radnike u slučaju njegove primene na klanici. Takođe, izvesno je da visoka temperatura koja se stvara opaljivanjem oštećuje kožu (iako to nije ispitivano u ovoj studiji), i stoga takva koža ne bi mogla da se koristi u daljoj obradi u industriji kože.

4.3.3. Tretman vodenom parom

S obzirom da efikasnost antimikrobnog tretmana kože u redukciji njene mikroflore može zavisiti od količine nagomilane nečistoće na koži ([Castillo i sar., 1998](#); [Byrne i sar., 2000](#)), a ponekad je veoma teško ukloniti čvrste i suve naslage nečistoće, [McEvoy i sar. \(2001\)](#) su ispitivali efekat primene vodene pare sa vakumiranjem u redukciji *E. coli* O157:H7 u inokulisanom fecesu na koži. Tretman vodenom parom može imati dobar efekat u redukciji bakterija na koži, jer je vodena para efikasan prenosilac toplove i ostvaruje veliku količinu energije kada kondenzuje. Laboratorijski test sistem u ovom istraživanju se sastojao od specijalno napravljene komore koja generiše vodenu paru pod subatmosferskim pritiskom, aplikuje na komade kože na temperaturi od 80°C i nakon određenog vremena delovanja (10 i 20 sek.), dejstvom vakuma se uklanja kondenzat i koža hlađi do 60°C. Utvrđena redukcija inokulisane *E. coli* O157:H7 iznosila je od 1,9-2,5 log cfu/gr kože kod tretmana u trajanju od 10 sek., što je efekat uporediv sa onim koji je postignut pranjem kože goveda hladnom vodom u trajanju od 3 minuta ([Byrne i sar., 2000](#)). Kod duže aplikacije vodene pare na koži (20 sek.), postignuta redukcija *E. coli* O157:H7 iznosila je čak 4,2-6,0 log cfu/gr kože, što je slično tretmanu hemijske depilacije ([Castillo i sar., 1998](#)). Iako je ova studija ukazala na visoku efikasnost vodene pare, koja ima dobru moć prodiranja i u suvim naslagama fecesa, autori su izrazili sumnju u mogućnost praktične primene ovakvog sistema u klanici iz razloga teškog postizanja i održavanja odgovarajućih parametara temperature, pritiska i vakuma na površini kože. Takođe, delovanjem vodene pare se površina kože zagreva do 80°C, što može oštetiti kožu do te mere da bude neupotrebljiva u daljoj preradi u industriji kože. Ovaj prateći efekat tretmana vodenom parom ispitivan je u narednom istraživanju [McEvoy i sar. \(2003c\)](#). Primenom iste laboratorijske opreme za stvaranje i aplikaciju vodene pare kao u prethodnoj studiji, utvrđena je dobra redukcija TVC na koži, u zavisnosti od temperature vodene pare i vremena aplikacije

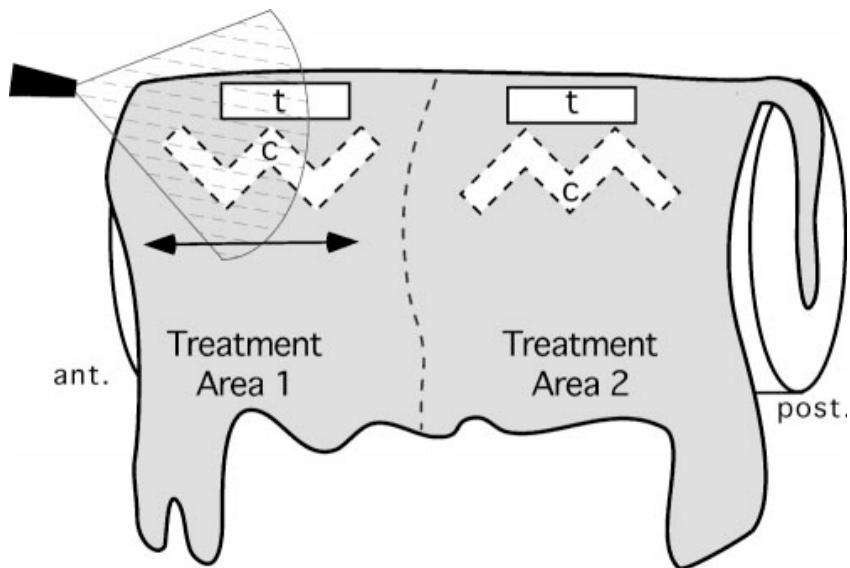
na koži. Na temperaturi od 80°C, utvrđena redukcija TVC iznosila je od 2,9-4,0 log cfu/cm² (vreme delovanja 1, 10 i 20 sek.), dok je na 75°C redukcija TVC na koži bila manja, od 1,9-2,6 log cfu/cm² za isto vreme delovanja (tabela 4.3). Vizuelnim pregledom kože nakon procesa štavljenja, utvrđeno je oštećenje zrnastog sloja na površini kože kod svih uzoraka tretiranih vodenom parom na temperaturi od 80°C, kod preko 80% uzoraka tretiranih na 75°C u trajanju od 10 i 20 sek. i u 18% uzoraka kod tretmana od 1 sek. Oštećenje površinskog zrnastog sloja je dovelo do otkrivanja sloja korijuma i do toga da koža ima „čupav“ izgled, što je defekt neprihvatljiv za industriju kože. Samim tim, iako je tretman kože vodenom parom veoma efikasan u redukciji njene mikroflore, verovatno nije praktično primenljiv u goveđim klanicama.

4.3.4. Pranje ozoniranom i elektrolizirano-oksidirajućom (EO) vodom

Pranje kože goveda pre ili nakon klanja se pokazalo kao neefikasan metod za redukciju njene mikroflore i njenog prenosa na trup (Byrne i sar., 2000; Mies i sar., 2004; Bosilevac i sar., 2004a). Takođe, pranje kože vrućom vodom temperature 50°C u istraživanju Small i sar. (2005), redukovalo je nivo TVC samo oko 0,2 log cfu/cm² (tabela 4.3). Sa druge strane, kao alternativa hemijskim antimikrobnim sredstvima, za pranje kože goveda se može koristiti voda koja je na neki način modifikovana. Elektrolizirano-oksidirajuća (EO) voda se dobija propuštanjem električne struje kroz slani rastvor vode. Jedan od proizvoda u ovoj reakciji je natrijum hidroksid (NaOH) alkalne reakcije, dok je drugi hipohlorna kiselina koja ima veoma nizak pH, sadrži aktivni hlor i ima visok oksidoredukcion potencijal (Bosilevac i sar., 2005b). Ozon je gas rastvorljiv u vodi i veoma je jak oksidirajući agens. Ozonirana voda se dugo koristi za dezinfekciju piјaće vode i, kao i EO voda, može se upotrebljavati u proizvodnji hrane kao i za njenu dekontaminaciju.

Bosilevac i sar. (2005b) su ispitivali upotrebu ozonirane i EO vode za pranje kože goveda, kao ekonomski prihvatljive opcije za većinu klanica, čak i za one najmanje. U laboratorijskim uslovima na model sistemu (u prostorijama klanice), ispitivan je tretman prskanjem velikog broja goveđih koža ozoniranom i EO vodom (slika 1). Prskalicama pod velikim pritiskom, prvo je aplikovana alkalna EO voda (NaOH, pH 11,2, 52°C, 10 sek.), a zatim acidifikovana EO voda (hipohlorna kiselina, pH 2,4, 60°C, koncentracija aktivnog hlora 70 ppm, 30 sek.). Ozonirana voda je na drugim komadima kože aplikovana prskanjem jakim pritiskom (koncentracija ozona 2

ppm, 15°C, 10 sek.), a zatim slabim pritiskom (5 sek.). Kontrolni komadi kože su prskani običnom pijaćom vodom pod istim uslovima pritiska, temperature i trajanja kao kod tretmana ozoniranom i EO vodom (voda na 15°C i 60°C).



Slika 1. Model sistem za pranje kože goveda ozoniranom i EO vodom.

c – kontrolni uzorci sa kože; t – mesta tretmana vodom ([Bosilevac i sar. 2005b](#)).

Utvrđena je visoka efikasnost ozonirane i EO vode u redukciji TVC, *Enterobacteriaceae* i prevalence *E. coli* O157 na koži goveda. U slučaju tretmana sa ozoniranom vodom, redukcija TVC i EBC iznosila je 2,1 log cfu/cm² i 3,4 log cfu/cm², a prevalenca *E. coli* O157 je bila smanjena sa 89% na 31%, (efikasnost tretmana u redukciji prevalence je iznosila 65% u odnosu na kontrolne uzorke) ([tabela 4.3](#)). U odnosu na kontrolni tretman običnom vodom (voda pod visokim pritiskom na 15°C), gde je redukcija TVC i EBC iznosila samo 0,5 log cfu/cm² i 0,9 log cfu/cm² i nije bilo smanjenja prevalence *E. coli* O157 ([tabela 4.8](#)), antimikrobni efekat samo ozona iznosio je najmanje 1,5 log cfu/cm² i 2,5 log cfu/cm² za TVC i EBC. Kod tretmana sa EO vodom, utvrđena je još veća efikasnost u redukciji nivoa TVC i EBC (3,5 log cfu/cm² i 4,3 log cfu/cm²), dok je prevalenca *E. coli* O157 bila smanjena sa 82% na 35%, sa efikasnošću tretmana u redukciji od 57% ([tabela 4.3](#)). U odnosu na kontrolni tretman vrućom vodom pod visokim pritiskom na 60°C, gde je redukcija TVC i EBC iznosila 1,0 log cfu/cm² i 0,9 log cfu/cm², antimikrobni efekat EO vode je bio veći za oko 2,5 log cfu/cm² i 3,4 log cfu/cm². Efikasnost vruće vode u redukciji prevalence *E. coli* O157 iznosila je samo oko 8%, ali je bila statistički značajna ([tabela 4.3](#)). Veća efikasnost EO vode u odnosu na ozoniranu vodu za oko 1-1,5 log cfu/cm², može se

pripisati razlikama u aplikaciji, odnosno većem pritisku i višoj temperaturi EO vode. Međutim, verovatnije objašnjenje je u antimikrobnom efektu EO vode na bakterije, gde usled ekstremnih promena pH (sa 7 na 11,2, a zatim pad na 2,4) dolazi do velikih oštećenja ćelija, dok ozonirana voda ima slabo kiseli pH 6. Dodatno EO voda sadrži i baktericidni hlor, a visok oksidoreduktioni potencijal poseduju oba tipa vode. Ovi tretmani trenutno nisu validovani za upotrebu u klanicama za pranje kože goveda. Njihova primena ima veliki potencijal i eventualno je moguća u posebnim kabinetima na liniji klanja, uz naknadno sušenje kože nakon pranja.

Tabela 4.3. Tretmani kože vodenom parom, vrućom vodom, ozoniranom i EO vodom i postignuti antimikrobni efekti na koži

Tretman	Redukcija na koži						Reference
	TVC	EBC	TCC	<i>E. coli</i> O157 [†]	e (%)	c	
	log cfu/cm ² *						
Vodena para (75°C)	1 sek.	1,9	/	/	/	/	
	10 sek.	2,5	/	/	/	/	
	20 sek.	2,6	/	/	/	/	McEvoy i sar. (2001, 2003c)
Vodena para (80°C)	1 sek.	2,9	/	/	/	/	
	10 sek.	3,3	/	/	1,9-2,5	/	
	20 sek.	4,0	/	/	4,2-6,0	/	
Vruća voda	50°C	0,2	/	/	/	/	Small i sar. (2005)
	60°C	1,0	0,9	1,6	/	8%	Bosilevac i sar. (2005a,b)
Ozonirana voda	15°C	2,1	3,4	/	/	65%	2,9x
EO voda	60°C	3,5	4,3	/	/	57%	2,3x

* Logaritamska redukcija = (log cfu/cm² pre tretmana) – (log cfu/cm² nakon tretmana)

e Efikasnost tretmana u redukciji prevalence = (% redukcije x 100) / % pozitivnih kontrola

c Koeficijent efikasnosti tretmana = (% pozitivnih kontrola) / (% pozitivnih nakon tretmana)

[†] Inokulisana mikroflora (direktno na kožu ili putem inokulisanog fecesa)

4.3.5. Pranje i dekontaminacija hemijskim antimikrobnim sredstvima

U cilju efikasnije redukcije mikroorganizama na koži goveda, u nekoliko istraživanja je ispitivan veći broj različitih hemijskih antimikrobnih sredstava, uključujući organske kiseline, neorganske kiseline i baze, alkohole, cetilpiridin hlorid, druga kvaternerna amonijumova jedinjenja i komercijalne deterdžente, dezinficijense i sanitajzere. Neka od ovih hemijskih sredstava su dozvoljena za upotrebu u klanicama i već se upotrebljavaju za dekontaminaciju trupova na liniji klanja i otkoštenog mesa (natrijum hidroksid, mlečna i sirčetna kiselina, trinatrijum fosfat,

itd). Ukoliko antimikrobnog sredstva nema neutralni pH, nakon aplikacije je potrebno njegovo ispiranje vodom, sa ili bez dodatka hlora, dok se vakumiranje i sušenje kože može uključiti u tretman u cilju poboljšanja njegove efikasnosti i ispunjavanja zahteva da koža mora biti suva pre skidanja (Byelashov i Sofos, 2009). Sa aspekta tehničke upotrebe ovih tretmana na liniji klanja, aplikaciju hemijskih sredstava je moguće izvesti pomoću priručne opreme, na određenim ključnim delovima kože, odnosno linijama zasecanja, sa ili bez prethodnog šišanja dlake (Small i sar., 2005; Baird i sar., 2006) ili tretiranjem cele kože (ili samo linija zasecanja) u komercijalnim kabinetima za pranje instaliranim na liniji klanja (Bosilevac i sar., 2005a).

U jednom od prvih istraživanja dekontaminacionih tretmana kože upotrebom hemijskih sredstava, Small i sar. (2005) su ispitivali tri patentirana antimikrobnog sredstva koja su komercijalno dostupna na tržištu i koriste se redovno u industriji hrane, različita po svom hemijskom sastavu i načinu antimikrobnog delovanja. Ispitivana je antimikrobnna efikasnost sredstva Formula 963B (deterdžent koji sadrži natrijum hidroksid i surfaktante), P3-Topaktiv DES (dezinficijens koji se sastoji od vodonik peroksida i persirćetne kiseline) i Betane Plus (sanitajzer koji spada u grupu kvaternernih amonijumovih jedinjenja i sadrži i surfaktant). Sredstva su aplikovana na većem broju čistih koža (u obliku rastvora na 50°C), pomoću vlažno-suvog usisivača za dubinsku ekstrakciju (sa vakumiranjem i fizičkim uklanjanjem hemikalije i bakterija). Najveću efikasnost u redukciji nivoa TVC na koži je pokazao sanitajzer Betane Plus (2 log cfu/cm²), zatim dezinficijens P3-Topaktiv DES (1,2 log cfu/cm²), dok je deterdžent Formula 963B imao beznačajan efekat (oko 0,3 log cfu/cm²) (tabela 4.5). Rezultati su ukazali da su sanitajzeri veoma efikasna sredstva i da bi ovakvi jednostavniji tretmani mogli biti pogodni za upotrebu i na najmanjim klanicama, pomoću priručne opreme, a posebno za tretiranje kože goveda duž linija zasecanja.

Kombinovani tretman hemijskim antimikrobnim sredstvima na prethodno ošišanoj koži ispitivan je u istraživanju Baird i sar. (2006). Optimizacija tretmana je vršena u laboratorijskim uslovima na komadima kože koji su bili inokulisani svežim fecesom (10^6 /gr TVC), a zatim je vršeno predpranje vodom. Rastvori hemikalija su na komade kože bili aplikovani pomoću natopljenih sunđera. Utvrđena je značajna redukcija TVC, koliforma i generičke *E. coli* u tretmanima sa 1% CPC, 2% mlečnom kiselinom i 3% vodonik peroksidom, do preko 4 log cfu/cm² na ošišanoj koži, što je za oko 1-3 log cfu/cm² bio bolji rezultat u odnosu na tretmane kože bez prethodnog šišanja. Validacija tretmana je vršena na klanici nakon klanja i iskrvarenja goveda.

Deo kože u regiji grudi je ošišan i koža tretirana sa istim koncentracijama rastvora mlečne kiseline, CPC i vodonik peroksida pomoću natopljenih sunđera, a zatim je vršeno uzorkovanje kože i trupa na istom mestu nakon skidanja kože. Tretman sa 1% CPC je dao najveću redukciju TVC ($3,8 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$), koliforma ($3,3 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$) i *E. coli* ($3,0 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$) na koži, a sa mlečnom kiselinom i vodonik peroksidom nešto manje (od $2-3 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$ za sve grupe bakterija) (tabela 4.5). Sa druge strane, ovi tretmani nisu pokazali nikakvu efikasnost u redukciji prenosa ispitivanih grupa bakterija na meso trupova. Metode primenjene u ovom radu i značaj ovih rezultata bi se mogli dovesti u pitanje zbog načina aplikacije hemijskih sredstava kao i upotrebe inokulisane mikroflore, koja na koži ne pokazuje iste osobine kao prirodna mikroflora. Ovo je potvrđeno i tokom optimizacije tretmana na klanici, kada su redukcije prirodne mikroflore bile i do $2 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$ manje u odnosu na prethodni eksperiment.

Druga hemijska sredstva dozvoljena za upotrebu u klanicama su ispitivana u tretmanima dekontaminacije kože (Bosilevac i sar., 2005a) u cilju nalaženja efikasne alternative tretmanima hemijske depilacije i pranju kože sa CPC čija upotreba nije dozvoljena u klanicama. Ispitivani su natrijum hidroksid, trinatrijum fosfat, hlorofoam (hlorinisani alkalni deterdžent sa pH 12) i fosforna kiselina. Tretmani na kožama kao model sistemima (u prostorijama klanice) su aplikovani prskanjem rastvora hemijskih sredstava na 60°C , nakon čega je vršeno ispiranje vodom ili acidifikovanim hlorom u koncentraciji od 200 i 500 ppm (natrijum hipohlorit podešen na pH 7 sa sirćetnom kiselinom) jer hemikalije nisu imale neutralni pH. Nakon toga je na jednoj grupi uzoraka dodatno vršeno i vakumiranje u cilju uklanjanja ostataka tečnosti, sušenja kože i fizičkog uklanjanja bakterija oslobođenih sa dlake što bi trebalo da poboljša ukupni efekat tretmana u redukciji mikroflore kože. Utvrđena je visoka efikasnost 4% fosforne kiseline, 1,6% natrijum hidroksida i 4% hlorofoama u redukciji ukupnog broja koliforma, *Enterobacteriaceae* i generičke *E. coli*, sa promenljivim efektom vakumiranja u mikrobnoj redukciji ($1-2 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$ dodatno u pojedinim tretmanima), ali i vidljivim poboljšanjem čistoće kože (tabela 4.4). Fosforna kiselina je pokazala najbolji antimikrobni efekat, dok je ispiranje sa acidifikovanim hlorom koncentracije 500 ppm dalo najbolji dodatni efekat u tretmanima. Autori su zaključili da ovakav višefazni tretman kože, sa pranjem i ispiranjem rastvorima hemijskih antimikrobnih sredstava i naknadnim vakumiranjem i sušenjem kože, ima sinergistički efekat u redukciji njene mikroflore na najmanju moguću meru.

Tabela 4.4. Efekti različitih kombinacija pranja, ispiranja i vakumiranja u redukciji ukupnog broja koliforma (TCC) na koži ([Bosilevac i sar., 2005a](#))

Pranje	Ispiranje	Redukcija TCC (log cfu/cm ²) *	
		Tretman	Tretman + vakumiranje
Voda	Voda	1,6	3,6
Hlorofoam	Voda	3,6	3,6
Fosforna kiselina	Voda	2,5	3,5
Natrijum hidroksid	Voda	1,5	3,9
Trinatrijum fosfat	Voda	1,5	2,5
Voda	Acid. hlor 200 ppm	2,9	2,9
Hlorofoam	Acid. hlor 200 ppm	2,7	3,9
Fosforna kiselina	Acid. hlor 200 ppm	3,6	4,3
Natrijum hidroksid	Acid. hlor 200 ppm	2,8	3,8
Hlorofoam	Acid. hlor 500 ppm	3,9	4,4
Fosforna kiselina	Acid. hlor 500 ppm	4,1	5,4
Natrijum hidroksid	Acid. hlor 500 ppm	3,7	3,9

* Logaritamska redukcija = (log cfu/cm² pre tretmana) – (log cfu/cm² nakon tretmana)

[Carlson i sar. \(2008b\)](#) su u laboratorijskim uslovima ispitali nekoliko hemijskih sredstava u različitim strategijama aplikacije, priručnom opremom i prskanjem niskim pritiskom, što je tretman pogodan za primenu i u manjim klanicama. Na komadima kože inokulisanim sa *E. coli* O157:H7, ispitivani su sirćetna i mlečna kiselina (10%, 23 i 55°C), NaOH (3%, 23°C) i natrijum metasilikat (4% i 5%, 23°C). Njihova antimikrobna efikasnost je ispitivana u tri kombinacije: a) bez ispiranja sredstva vodom; b) ispiranje kože vodom nakon aplikacije sredstva; i c) aplikacija sredstva nakon prethodnog ispiranja kože vodom. Primenom prve i treće strategije utvrđena je najveća redukcija *E. coli* O157:H7 (0,7 log cfu/cm² do 5,1 log cfu/cm² zavisno od hemikalije), ali je rezidualni pH izmeren na koži bio u rasponu od jako kiselog do jako alkalnog (3,9 do 10,5), što je neprihvatljivo za bezbednost radnika ako bi ovi tretmani bili primjenjeni na klanici. Druga strategija (ispiranje vodom nakon tretmana) je bila manje efikasna u redukciji *E. coli* O157:H7 (0,6-2,4 log cfu/cm²), ali je pH na koži bio prihvatljiv (6,3-9,2). Ispitujući dalje efikasnost u redukciji prirodne mikroflore kože, efekat je bio nešto niži, do 1,7 log cfu/cm² TVC i 2,9 log cfu/cm² TCC i *E. coli* kod alkalnih rastvora NaOH i natrijuma metasilikata, dok su tretmani sa sirćetnom i mlečnom kiselinom dali nešto više redukcije, do 2,6-2,8 log cfu/cm² ([tabela 4.5](#)). U narednoj studiji, [Carlson i sar., \(2008a\)](#) su ispitivali efikasnost istih sredstava u redukciji inokulisane *E. coli* O157:H7 i *Salmonella*, u istim laboratorijskim uslovima aplikacije. Postignute redukcije bile su slične kao i ranije (od 1,9-3,4 log cfu/cm²), a

značajno bolji efekat je postignut tretmanom sa 1,5% NaOH i ispiranjem visokim pritiskom ($5 \text{ log cfu/cm}^2 E. coli O157:H7$ i $4,4 \text{ log cfu/cm}^2 Salmonella$) (tabela 4.5).

Međutim, nije ispitivan i efekat vakumiranja kože u cilju uklanjanja ostataka tečnosti i bakterija oslobođenih sa dlake, što ukupno popravlja antimikrobni efekat tretmana i ispunjava regulatorni zahtev da koža mora biti suva pre operacije skidanja.

Tabela 4.5. Tretmani pranja kože goveda hemijskim sredstvima u laboratorijskim i praktičnim uslovima na klanici i postignuti antimikrobni efekti na koži

Tretman i korišćeno hemijsko antimikrobno sredstvo	Redukcija na koži ($\log \text{cfu/cm}^2$) *						Reference
	TVC	EBC	TCC	<i>E. coli</i>	<i>E. coli O157</i> †	<i>Salmonella</i> †	
Mlečna kiselina (2, 4 i 6%)	/	/	/	/	/	1,3; 3,3; 5,1	
Sirćetna kiselina (2, 4 i 6%)	/	/	/	/	/	2,4; 3,8; 4,8	
Etanol (70, 80 i 90%)	/	/	/	/	/	5,0-5,5	Mies i sar. (2004)
Hlor (100, 200 i 400 ppm)	/	/	/	/	/	0,6; 0,7; 1,3	
Sanitajzer Oxy-Sept (0,05-0,4%)	/	/	/	/	/	1,0-1,4	
Cetilpiridin hlorid (CPC) pod niskim pritiskom (0,5, 1 i 3%)	1,2; 1,8; 1,4	0,8; 1,2; 1,4	/	/	/	/	Bosilevac i sar. (2004a)
CPC 1% pod srednjim pritiskom	3,3-3,5	3,0-3,2	/	/	/	/	
CPC 1% pod visokim pritiskom	3,3-4,4	2,8-3,8	/	/	/	/	
Sanitajzer Betane Plus	2,0	/	/	/	/	/	
Vod. peroksid + persirćetna kis.	1,2	/	/	/	/	/	Small i sar. (2005)
Deterdžent (NaOH) + surfaktant	0,3	/	/	/	/	/	
Šišanje + izopropil alkohol	1,8 †	/	1,8 †	0,9 †	/	/	
Šišanje + povidon jodid 10%	1,8 †	/	2,5 †	2,4 †	/	/	
Šišanje + CPC 1%	4,6 † (3,8)	/	4,5 † (3,3)	4,5 † (3,0)	/	/	Baird i sar. (2006)
Šišanje + mlečna kiselina 2%	4,1 † (2,3)	/	4,1 † (2,6)	3,3 † (2,1)	/	/	
Šišanje + vodonik peroksid 3%	4,4 † (2,2)	/	3,9 † (2,6)	2,9 † (3,0)	/	/	
Hlorofoam 4%	/	/	2,7-3,9	/	/	/	
Hlorofoam 4% + vakumiranje	/	/	3,6-4,4	/	/	/	
Fosforna kiselina 4%	/	/	2,5-4,1	/	/	/	
Fosforna kis. 4% + vakumiranje	/	/	3,5-5,4	/	/	/	Bosilevac i sar. (2005a)
Trinatrijum fosfat 4%	/	/	1,5	/	/	/	
Trinatrijum fosfat 4%+ vakuum	/	/	2,5	/	/	/	
Natrijum hidroksid (NaOH) 1,6%	/	/	1,5-3,7	/	/	/	
NaOH 1,6% + vakumiranje	/	/	3,8-3,9	/	/	/	
Sirćetna kiselina 10%	2,4-2,6	/	2,6-2,7	2,5-2,8	2,1-2,6	2,0	
Mlečna kiselina 10%	2,1-2,3	/	2,7	2,7	1,8-3,4	2,8	
Natrijum hidroksid (NaOH) 3%	1,3-1,6	/	2,8-2,9	2,8	2,4-3,4	2,6	Carlson i sar. (2008a,b)
NaOH 3%+ mlečna kiselina 10%	2,0-2,4	/	2,1-2,9	2,3-3,9	/	/	
NaOH 1,5% + hlor 0,2%	/	/	/	/	5,0	4,4	
Natrijum metasilikat 4%	1,6-1,7	/	2,4-2,9	2,3-2,9	1,9-2,1	2,6	

* Logaritamska redukcija = ($\log \text{cfu/cm}^2$ pre tretmana) – ($\log \text{cfu/cm}^2$ nakon tretmana)

† Inokulisana mikroflora (direktno na kožu ili putem inokulisanog fecesa)

4.3.6. Komercijalni kabineti za pranje i dekontaminaciju kože na liniji klanja

Dekontaminacioni tretmani kože metodom hemijske depilacije nisu bili dugo u praktičnoj upotrebi usled brojnih problema, ali je modifikacijom koncepta ipak došlo do razvoja komercijalnih sistema za pranje i dekontaminaciju kože goveda na liniji klanja (Koochmarae i sar., 2005). Bosilevac i sar. (2005a) su demonstrirali efikasnost jednog takvog sistema u redukciji prenosa bakterijskih patogena sa kože na meso trupova, istovremeno smanjivši problem hemijskog otpada i cenu koštanja tretmana. Međutim, ovakav sistem zahteva dosta prostora za instalaciju i pogodan je samo za velike klanice, pa je zbog toga tehnologija adaptirana i prilagođena upotrebi i u malim klanicama, ne gubeći mnogo na antimikrobnoj efikasnosti (Arthur i sar., 2007).

Prethodna istraživanja Bosilevca i sar. (2004a, b; 2005a), kao i Nou i sar. (2003) bila su osnova za razvoj efikasnog sistema za pranje i dekontaminaciju kože goveda, koji je instaliran u svim klanicama kompanije Cargill Meat Solutions u SAD. Kabinet za dekontaminaciju kože (proizvođač Chad Co., Olathe, Kansas) dizajniran je za pranje i ispiranje kože goveda odmah nakon omamljivanja i klanja (slika 2). Trupovi goveda se u visećem položaju, sa obe noge zakačene za kolosek, uvode u kabinet, gde se vrši njihovo tuširanje 1,0-1,5% rastvorom natrijum hidroksida (65°C , sa dodatkom surfaktanta). Mehanizam koji rotira trupove omogućava pranje cele površine kože, a naročito delova na kojima se vrši zarezivanje tokom skidanja kože. Nakon delovanja sredstva od 10 sek., vrši se ispiranje kože u drugom delu kabineta, recirkulisanom vodom na 35°C u koju se u cilju njene dezinfekcije dodaje natrijum hipohlorit (koncentracija slobodnog hlora 1 ppm). Nakon izlaska trupa iz kabineta, radnici vrše vakumiranje kože duž linija zarezivanja (od skočnih zglobova do regije grudi), u cilju sušenja i uklanjanja oslobođene prljavštine i dlaka. Tretman pranjem iziskuje velike količine vode, pa je zato recirkulacija vode i hemikalija neophodan korak da bi sistem bio finansijski isplativ i ekološki opravdan. Natrijum hidroksid je izabran kao antimikrobrov sredstvo jer je jeftin, ne gubi aktivnost u sistemima za recirkulaciju (kao što je to slučaj sa rastvorima kiselina), pokazao je dobru efikasnost u redukciji ukupnih koliforma na koži (oko 4 log cfu/cm² u prethodnom istraživanju) i dozvoljen je za upotrebu u klanicama u SAD.

Efikasnost ovog komercijalnog sistema za pranje kože, ispitana je merenjem njegovog efekta u redukciji mikroflore kože i njenog prenosa na korespondentne

trupove nakon skidanja kože ([Bosilevac i sar., 2005a](#)). Utvrđena redukcija TVC i *Enterobacteriaceae* na koži, u odnosu na kontrolne uzorke (bez izvršenog tretmana) iznosila je 2,1 i 3,4 log cfu/cm², dok je prevalenca *E. coli* O157 bila smanjena sa 44% na 16% (efikasnost tretmana u redukciji prevalence od 64%). Redukcija nivoa TVC i EBC na trupovima bila je 0,8 log cfu/cm², dok je prevalenca *E. coli* O157 bila smanjena sa 17% na 2% (efikasnost tretmana u redukciji prenosa ovog patogena sa kože na trupove od 88%) ([tabela 4.6](#)). Takođe, tretman je značajno poboljšao i vizuelni izgled kože goveda, kao i trupova nakon njenog skidanja.



Slika 2. Kabineti za pranje i dekontaminaciju kože u klanicama kompanije Cargill Meat Solutions u SAD

U prethodno opisanim istraživanjima ove grupe istraživača ([Nou i sar., 2003](#); [Bosilevac i sar., 2004a, b, 2005a](#)) utvrđeno je da tretmani pranja i dekontaminacije kože goveda, kada se uključe u proces klanja, mogu efikasno redukovati nivo mikroflore kože (TVC i *Enterobacteriaceae*) za oko 2-3 log cfu/cm², što posledično dovodi i do smanjenog prenosa bakterija na meso trupova. Utvrđen nivo opšte mikroflore na trupovima u ovim istraživanjima bio je za 1-2 log cfu/cm² manji u odnosu na trupove obrađene bez prethodne dekontaminacije kože ([tabela 4.6](#)). Takođe, prevalenca *E. coli* O157 na koži i mesu trupova bila je značajno smanjena nakon tretmana, u pojedinim slučajevima čak i ispod praga detekcije.

Tabela 4.6. Tretmani pranja kože goveda hemijskim sredstvima primjenjeni u komercijalnim uslovima na liniji klanja i postignuti antimikrobni efekti u redukciji bakterijske kontaminacije kože i trupova

Tretman	Redukcija na koži				Redukcija prenosa na trupovima				Reference
	TVC	EBC	<i>E. coli</i> O157		TVC	EBC	<i>E. coli</i> O157		
	log cfu/cm ² *	e (%)	c		log cfu/cm ² *	e (%)	c		
Pranje 1% rastvor CPC	3,5	3,2	39%	1,6x	1,5	1,1	87%	7,7x	Bosilevac i sar. (2004a,b)
Hemijska depilacija (natrijum sulfid 10% + vodonik peroksid 3%)	/	/	/		2,0	1,8	98%	50x	Nou i sar. (2003)
Pranje 1,5% rastvorom NaOH sa vakumiranjem	2,1	3,4	64%	2,7x	0,8	0,8	88%	8,5x	Bosilevac i sar. (2005a)

* Logaritamska redukcija = (log cfu/cm² pre tretmana) – (log cfu/cm² nakon tretmana)

e Efikasnost tretmana u redukciji prevalence = (% redukcije x 100) / % pozitivnih kontrola

c Koeficijent efikasnosti tretmana = (% pozitivnih kontrola) / (% pozitivnih nakon tretmana)

Međutim, opisane strategije dekontaminacije ne mogu biti pogodne za sve klanice, zbog visokih troškova instalacije opreme i prostornih zahteva. Arthur i sar. (2007) su ispitivali efikasnost jednog jednostavnog kabineta za pranje kože goveda, u fazi nakon omamljivanja i klanja. U kabinetu se trupovi goveda tuširaju velikom količinom vode, u trajanju od 25-97 sek., a zatim se vrši ispiranje hlorisanom vodom (sadržaj aktivnog hlora 100-200 ppm). Nakon pranja, nije predviđeno sušenje ili vakumiranje kože. Efikasnost ovog tretmana kože pranjem je ispitana ocenjivanjem njegovog efekta u redukciji mikroflore kože (*E. coli* O157:H7 i *Salmonella*). S obzirom da su u ranijim istraživanjima (Byrne i sar., 2000; Mies i sar., 2004) utvrđeni antimikrobni efekti tretmana pranjem vodom na koži bili veoma slabi, a posebno u redukciji prevalence patogena (*E. coli* O157 i *Salmonella*), pored utvrđivanja efekta u redukciji prevalence dodatno je ispitivan i efekat u redukciji broja ovih patogena na koži nakon pranja. Kao mera efikasnosti tretmana dekontaminacije u redukciji bakterijskih patogena prirodno prisutnih na koži, u skoro svim objavljenim radovima utvrđivana je redukcija njihovog prisustva (prevalence), zbog malog broja na koži i komplikovanih procedura direktnе izolacije iz uzorka bez prethodnog obogaćenja. Međutim, ovaj metod ne odslikava najbolje antimikrobni efekat tretmana, jer se pozitivan nalaz dobija i u slučaju prisustva nekoliko ćelija patogena, kao i nivoa od nekoliko logaritama, i na ovaj način se ne može kvantifikovati pravi efekat u redukciji bakterijskih patogena. U ovom istraživanju, efikasnost tretmana pranjem vodom u redukciji prevalence *E. coli* O157:H7 na koži iznosila je samo 8,2% (smanjenje sa 97,6% na 89,6%), a *Salmonella* 27,4% (smanjenje sa 94,8% na 68,8%) primenom

metoda sa obogaćenjem ([tabela 4.8](#)). Nasuprot, primenom metode direktnog zasejavanja iz uzorka bez predobogaćenja, sa pragom detekcije patogena od ≥ 40 cfu/100cm², utvrđena efikasnost tretmana u redukciji prevalence *E. coli* O157:H7 na koži iznosila je 62,4% (smanjenje sa 35,1% na 13,2%), a u slučaju *Salmonella* 81,8% (smanjenje sa 40% na 7,3%). Primetno je da je u više od polovine pozitivnih kontrolnih uzoraka i u većini pozitivnih uzoraka nakon tretmana, kada se upoređuje sa metodom sa predobogaćenjem uzorka, nivo patogena ispod praga detekcije metodom direktne izolacije. Činjenica je i da mali broj patogena na koži može predstavljati rizik za kontaminaciju mesa trupova i mora se uzeti u obzir, ali se ovom metodom ne može utvrditi efikasnost tretmana na kvantitativan način. Nasuprot, iz podataka o distribuciji broja patogena pre i posle tretmana, vidi se da je i u slučaju njihovih viših nivoa na koži tretman doveo do smanjenja broja, što odslikava uspešnost ove metode u pravilnom utvrđivanju efikasnosti tretmana dekontaminacije ([tabela 4.7](#)). Autori su zaključili da se redukcijom broja ćelija ovih patogena na koži (a ne samo prevalence), značajno smanjuje rizik za unakrsnu kontaminaciju trupova, ali nažalost, efekat u smanjenju bakterijske kontaminacije trupova ovde nije ispitivan.

Tabela 4.7. Distribucija pozitivnih uzoraka sa utvrđenim nivoima *E. coli* O157:H7 i *Salmonella* spp. metodom direktnog zasejavanja, pre i posle tretmana u kabinetu za pranje kože goveda ([Arthur i sar., 2007](#))

Broj (cfu/100cm ²)	Broj pozitivnih uzoraka *	
	Pre pranja	Nakon pranja
<i>E. coli</i> O157:H7		
< 40	187	250
40-99	51	24
100-999	42	12
1000-9999	7	2
10000-99999	1	0
<i>Salmonella</i> spp.		
< 40	193	267
40-99	58	20
100-999	37	1
1000-9999	0	0
10000-99999	0	0

* Ukupan broj uzoraka sa kože bio je 288 pre i 288 nakon tretmana

Sličan rezultat u redukciji *E. coli* O157:H7 i *Salmonella* na koži (metodom utvrđivanja redukcije prevalence i broja) nakon opisanog tretmana pranja vodom u

kabinetu, ovi autori su utvrdili i u narednoj studiji ([Bosilevac i sar., 2009](#)). Pored efekta na koži, utvrđeno je i značajno smanjenje nivoa ovih patogena na korespondentnim trupovima u poređenju sa rezultatima dobijenim u drugim klanicama koje nisu koristile ovakav antimikrobni tretman kože. Ukupni podaci o antimikrobnoj efikasnosti tretmana pranjem vodom (u fazi pre i nakon klanja) dati su u [tabeli 4.8](#).

Tabela 4.8. Tretmani pranja kože goveda vodom u laboratorijskim i praktičnim uslovima na klanici i postignuti antimikrobni efekti na koži

Tretman	Redukcija na koži								Reference
	TVC	TCC	<i>E. coli</i>	O157 [†]	Salmonella	<i>E. coli</i>	O157		
	log cfu/cm ² *				e (%)	c	e (%)	c	
Pranje životinja vodom pre klanja	/	/	/	0,9-1,5	/	/	/	/	Byrne i sar. (2000)
	- 0,8	- 0,8	- 0,8	/	- 25%	-	/	/	
Pranje životinja pre klanja hlorisanom vodom (50 ppm)	- 0,8	- 0,8	- 0,8	/	7,3%	1,1x	/	/	Mies i sar. (2004)
Tretmani pranja vodom pod pritiskom na model sistemima (komadi koža)	0,9 1,0 0,5	- 0,1 0,7 0,9	0,2 1,0 /	/	/	/	/	/	Baird i sar. (2006) Carlson i sar. (2008b) Bosilevac i s. (2005b)
Pranje u kabinetu nakon klanja+hlor. voda (200 ppm)	/	/	/	/	27,4%	1,4x	8,2%	1,1x	Arthur i sar. (2007)

* Logaritamska redukcija = (log cfu/cm² pre tretmana) – (log cfu/cm² nakon tretmana)

e Efikasnost tretmana u redukciji prevalence = (% redukcije x 100) / % pozitivnih kontrola

c Koeficijent efikasnosti tretmana = (% pozitivnih kontrola) / (% pozitivnih nakon tretmana)

[†] Inokulisana mikroflora (direktno na kožu ili putem inokulisanog fecesa)

4.3.7. Ostali antimikrobni tretmani kože goveda

Pored tretmana uklanjanja mikroflore sa kože (pranjem ili šišanjem dlake) ili njene redukcije/eliminacije (dekontaminacija kože fizičkim ili hemijskim sredstvima), kao deo strategija za kontrolu bakterijske kontaminacije na liniji klanja moguće je primeniti još jedan pristup - imobilizaciju/fiksaciju bakterijske mikroflore na dlaci i površini kože. S obzirom da glavni načini prenosa bakterijske kontaminacije sa kože na meso trupova uključuju direktni (koža - meso) ili indirektni kontakt (ruke radnika/nož/oprema - meso), kao i aerogeni put prenosa (naročito kod mašinskog skidanja kože), eliminacija bakterija sa kože možda nije neophodan uslov da se spriči (unakrsna) kontaminacija trupa, već je dovoljno spričiti njihovo odvajanje sa dlake i kože i prenos na druge površine (meso, ruke, noževe, itd.). U dosad objavljenim radovima ovaj pristup u kontroli bakterijske kontaminacije nije ispitivan, osim jednog

pilot istraživanja (Purnell i sar., 2007) u kome su korišćene različite vrste voskova. Međutim, u ovoj studiji (koja nije objavljena u časopisu sa recenzijom) su upotrebljene metode koje ne odgovaraju ovakvom tipu eksperimenata, a dobijeni rezultati su pokazali veoma slabu efikasnost u redukciji prenosa mikroflore na hranljivu podlogu (koja je služila za uzorkovanje), ispod 1 log cfu/cm². Takođe, istraživači su ispitivali i mogućnost uklanjanja dlaka sa kože goveda pomoću traka za depilaciju i različitih vrsta otopljenih voskova, ali pored postignute niske antimikrobne redukcije, činjenica je i da su ovakvi tretmani nepraktični za primenu na klanici.

4.4. Zaključni komentar

Antimikrobni tretmani kože opisani u ovom poglavlju mogu se podeliti na: a) fizičke, hemijske i biološke; i b) one koji se koriste u komercijalnim klanicama i one koji su ispitivani samo u eksperimentalnim uslovima. Na osnovu mehanizma svog antimikrobnog delovanja, pojedini tretmani se mogu primenjivati u cilju:

- a) fizičkog uklanjanja bakterija i nečistoće sa kože (pranje vodom i šišanje);
- b) inaktivacije/ubijanja bakterija na koži (tretman vodenom parom, ozoniranom ili EO vodom, hemijska depilacija i dekontaminacija hemijskim sredstvima), sa ili bez njihovog fizičkog uklanjanja; kao i
- c) imobilizacije/fiksacije bakterija na dlaci i površini kože u cilju sprečavanja njihovog odvajanja sa kože i kontaminacije nekih drugih površina (aplikacija nekih lepljivih materija na kožu - voskova, smola, itd.).

Prilikom primene antimikrobnog tretmana kože goveda, efikasnost metode u postignutoj mikroboj redukciji zavisi od raznih faktora, kao što su:

- a) higijenski i mikrobiološki status kože goveda pre tretmana;
- b) tehnički parametri tretmana (pritisak i temperatura vode ili rastvora antimikrobnog sredstva, upotrebljeno hemijsko sredstvo, njegova koncentracija i pH, vreme delovanja, metod aplikacije (prskanje, polivanje ili potapanje), predpranje vodom i/ili ispiranje nakon tretmana, dodatno sušenje ili vakumiranje kože, itd.);
- c) uslovi primene tretmana (eksperimentalno ili na klanici); i
- d) sama faza primene tretmana (pre klanja ili nakon omamljivanja i klanja).

Sveukupno, do danas je objavljen veoma mali broj istraživanja o antimikrobnim tretmanima kože (u poređenju sa tretmanima mesa), a objavljene

informacije o njihovoj efikasnosti i mogućnostima praktične primene u klanici su ograničene i nedovoljne. Primetne su i velike razlike u dobijenim rezultatima između različitih istraživanja, čak i kada je ispitivan isti tretman i upotrebljeno isto antimikrobnno sredstvo, usled različitih metoda i uslova primene tretmana, uzorkovanja, ispitivane mikroflore i laboratorijskih metoda, itd.

Pojedini istraživači su u oceni efikasnosti tretmana koristili veštački inokulisano mikrofloru na koži, najčešće *E. coli* O157:H7 i *Salmonella* spp., u cilju dobijanja uniformne distribucije i poznatog broja bakterija. Ovaj eksperimentalni pristup je koristan i u nekim situacijama jedino moguć, jer je distribucija prirodno prisutnih bakterijskih patogena na koži veoma varijabilna, kako na koži jedne životinje, tako i između životinja u istoj grupi, a naročito između životinja različitog porekla. Takođe, u najvećem procentu slučajeva, broj ćelija patogena na koži je veoma nizak, što onemogućava pravilnu procenu efikasnosti tretmana i svodi se na utvrđivanje redukcije njihovog prisustva (prevalence) nakon tretmana. Međutim, poznato je da upotreba veštački inokulisane mikroflore ima velike nedostatke i da ne odsljeka realnu situaciju primene antimikrobnog tretmana. Ovo potvrđuju i rezultati raznih istraživanja antimikrobnih tretmana kože u kojima je efekat u redukciji inokulisane mikroflore bio za 0,5-2 log cfu/cm² veći u odnosu na redukciju prirodne mikroflore ([tabela 4.9](#)).

U fazi pre klanja goveda, često se koriste tretmani pranja životinja ili šišanja dlačnog pokrivača i nečistoće sa kože (obično na mestima rezova na koži). Sveukupno, čini se da pranje i šišanje životinja pre klanja nisu efikasni tretmani u redukciji mikrobiološke kontaminacije kože, a čak mogu povećati prenos bakterija sa kože na meso trupova ukoliko se koža životinja ne osuši pre skidanja. Međutim, sigurno je da su prljave životinje ozbiljan izvor kontaminacije za samu klanicu i da je zato izvesno čišćenje takvih životinja pre klanja neophodan korak u cilju ukupnog poboljšanja bezbednosti mesa. Zbirni prikaz svih dosad ispitivanih antimikrobnih tretmana kože, sa okvirnim postignutim antimikrobnim efektima u redukciji bakterijske kontaminacije kože i trupova, dat je u [tabeli 4.9](#).

Pojedine antimikrobne tretmane je moguće primeniti na koži samo nakon omamljivanja i klanja, iz razloga dobrobiti životinja, bezbednosti radnika, sprečavanja naknadne kontaminacije kože nakon tretmana, itd. Sveukupno, čini se da su najefikasniji tretmani oni čija je primena u praktičnim uslovima iz raznih razloga teško ostvarljiva - tretman kože vodenom parom i hemijska depilacija. Za odabir

odgovarajućeg antimikrobnog tretmana kože očigledno nije bitna samo njegova antimikrobna efikasnost i uticaj na bezbednost proizvoda, već se moraju uzeti u obzir i druga pitanja od značaja. To uključuje uticaj tretmana na bezbednost radnika, kvalitet proizvoda, životnu sredinu (rukovanje otpadnim vodama), kao i cenu koštanja i dobit u odnosu na novac uložen u tehnologiju. Takođe, prihvativljiv antimikrobni tretman ne sme imati štetne efekte po zdravlje radnika tokom njegove upotrebe ili posledice po zdravlje potrošača (rezidue), treba biti prihvativljiv za potrošača i ne sme izazivati odbojnost kod njega.

U pogledu hemijskih antimikrobnih sredstava, postoje velike razlike u antimikroboj efikasnosti primenjenih sredstava. Komercijalni sanitajzeri i cetilpiridin hlorid (CPC), koji spadaju u grupu kvaternernih amonijumovih jedinjenja, su pokazali najveću efikasnost u redukciji prirodne mikroflore kože. Uključivanjem vakumiranja kože nakon tretiranja sa hemijskim sredstvom, ukupni efekat se povećava za 1-2 log cfu/cm².

U suštini, krajnji cilj kontrolnih mera na klanici je sprečavanje bakterijske kontaminacije trupova ili, ako se ta kontaminacija neizbežno dogodila, njena redukcija na trupovima na najmanju moguću meru. S obzirom da je najznačajniji izvor kontaminacije trupa koža goveda, u pogledu antimikrobnih tretmana kože ovo znači sprečavanje ili smanjivanje prenosa bakterija sa kože na trup tokom operacije skidanja kože. U malom broju istraživanja u praktičnim uslovima na liniji klanja, u kojima je efikasnost tretmana kože merena efektom u redukciji bakterijske kontaminacije trupova, postignuta efikasnost u redukciji prenosa mikroflore sa kože na trup (smanjenje u odnosu na proces klanja bez tretmana kože) iznosila je od 1-2 log cfu/cm², sa najboljim efektom hemijske depilacije. Međutim, za sprečavanje prenosa bakterija sa kože na trup očigledno nije neophodno potpuno eliminisati bakterije ili redukovati njihov broj na koži. Iz dosadašnjih istraživanja je jasno da ovo nije ni moguće, s obzirom da je maksimalna postignuta redukcija iznosila oko 6 log (odnosno oko 3,5 log u realnim uslovima na klanici), a poznato je da je koža goveda kontaminirana nivoima mikroflore i preko 10 log. Očigledno je da je u strategijama dekontaminacije kože potrebno istraživati nove pristupe - uključujući imobilizaciju/fiksaciju bakterija na dlaci i površini kože - čime bi se njihov prenos na meso trupova mogao efikasnije redukovati u odnosu na dosadašnje tretmane dekontaminacije kože.

Tabela 4.9. Zbirni prikaz svih ispitivanih antimikrobnih tretmana kože goveda i postignuti antimikrobni efekti u redukciji bakterijske kontaminacije kože i trupova

Antimikrobni tretman	Redukcija na koži			Redukcija na trupovima		
	TVC, EBC, TCC i <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157 i <i>Salmonella</i> [†]	<i>E. coli</i> O157	TVC, EBC, TCC, <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157	
	log cfu/cm ² *	e (%)	c	log cfu/cm ² *	e (%)	c
Šišanje dlake ili nečistoće sa kože	0	/	/	do 0,3	/	/
Šišanje dlake + opaljivanje	2,0	/	/	/	/	/
Pranje vodom	do 1,0	do 1,5	8,2% 1,1x	/	/	/
Vruća voda (60°C)	1,0-1,6 (oko 1)	/	8% 1,1x	/	/	/
Ozonirana voda (15°C)	2,1-3,4 (oko 3)	/	65% 2,9x	/	/	/
EO voda (60°C)	3,5-4,3 (oko 4)	/	57% 2,3x	/	/	/
Vodena para	2-4 (oko 3)	2-6 (oko 4)	/ /	/	/	/
Hemiska depilacija	3,4-4,3 (3,5)	4,2-5,1 (4,5)	/ /	do 2,0	98%	50x
Dekontaminacija hemijskim sredstvima						
Organske kiseline (2-10%)	2,1-2,8 (2,5)	1,3-5,1(3,5)	/ /	/	/	/
Neorganske kiseline	2,5-4,1 (oko 3)	/	/ /	/	/	/
Nekiselinska alkalna sredstva (NaOH, trinatrijum fosfat, hlorofoam)	1,3-3,9 (oko 2,5)	1,9-5,0 (oko 3,5)	64% 2,7x	0,8	88%	8,5x
Ostala nekiselinska sredstva (hlor, povidon jodid, vodonik peroksid)	1,2-3,0 (oko 2,5)	0,6-4,4 (oko 3)	/ /	/	/	/
Alkoholi	/	5,0-5,5 (oko 5)	/ /	/	/	/
Komercijalni sanitajzeri i CPC 1% (kvaternerna amonijumova jedinjenja)	2,0-3,8 (oko 3,5)	4,5	39% 1,6x	do 1,5	87%	7,7x
Sva hemijska sredstva + vakumiranje	1-2 dodatno	/ /	/ /	/	/	/

* Logaritamska redukcija = (log cfu/cm² pre tretmana) – (log cfu/cm² nakon tretmana)

e Efikasnost tretmana u redukciji prevalence = (% redukcije x 100) / % pozitivnih kontrola

c Koeficijent efikasnosti tretmana = (% pozitivnih kontrola) / (% pozitivnih nakon tretmana)

[†] Inokulisana mikroflora (direktno na kožu ili putem inokulisanog fecesa)

Ciljevi istraživanja

1. Ocena sadašnjeg stanja nauke i prakse u oblasti strategija antimikrobnih tretmana kože goveda

Intenzivna naučna istraživanja u pravcu utvrđivanja načina i mera za unapređenje mikrobiološkog statusa trupova goveda dovela su do shvatanja da sama primena higijenskih mera tokom klanja i obrade goveda nije uvek dovoljna za postizanje mikrobiološkog statusa zahtevanog od strane regulatornih organa, trgovine mesom ili specifičnih tržišta. U takvim situacijama, primena dodatnih mera intervencije/dekontaminacije je neophodna za postizanje dalje redukcije mikrobiološke kontaminacije mesa. U tom cilju, antimikrobni tretman se može primenjivati ili na mesu trupova (reaktivno), ili na glavnom izvoru njegove mikrobiološke kontaminacije (proaktivno), ili oba tretmana u kombinaciji. Primenom mikrobioloških, molekularnih, statističkih metoda i kompjuterskog modelovanja, utvrđeno je da je koža goveda najznačajniji izvor mikrobiološke kontaminacije mesa trupova na liniji klanja, često i sa bakterijskim alimentarnim patogenima, i glavni faktor u lancu govedeg mesa koji utiče na izloženost potrošača nekim značajnim alimentarnim patogenima (npr. *E. coli* O157, *Salmonella*). Iz tog razloga, u novije vreme, inicirana su istraživanja antimikrobnih tretmana koža goveda. U dosad objavljenim istraživanjima, ispitivani su različiti fizički i hemijski antimikrobni tretmani kože goveda, sa ciljem da se patogeni ubiju ili uklone sa kože. Neki od njih zbog svojih negativnih strana ne mogu imati praktičnu primenu (tretman vodenom parom, hemijska depilacija), dok je jedini tip antimikrobnog tretmana kože koji je ušao u komercijalnu upotrebu (u SAD) baziran na pranju kože zaklanih goveda hemijskim sredstvima (NaOH ili hlorinisanom vodom) u kabinetima. Relativno mali ukupan broj objavljenih studija ukazuje da bi dosadašnji antimikrobni tretmani kože goveda mogli smanjiti mikrofloru na koži u eksperimentalnim uslovima za oko $3\text{-}4 \log \text{cfu/cm}^2$, a u praktičnim uslovima na klanici za oko $2\text{-}3 \log \text{cfu/cm}^2$. Ove redukcije na koži bi mogle rezultirati poboljšanjem mikrobiološkog statusa mesa trupova za oko $0,5\text{-}1,5 \log \text{cfu/cm}^2$. Međutim, ovaj nivo redukcija nije dovoljan, ako se ima u vidu da je koža goveda redovno kontaminirana sa nivoima ukupne i fekalne mikroflore i preko $10 \log \text{cfu/cm}^2$, kao i da se u proseku oko 1% ukupne mikroflore kože prenese na meso trupova tokom njenog skidanja u realnoj situaciji na liniji klanja.

Krajnji cilj primene antimikrobnih tretmana na koži goveda, bez obzira na kom su principu zasnovani, je sprečavanje prenosa bakterija sa visoko kontaminirane kože na primarno sterilan trup tokom operacije skidanja kože. Očigledno je da redukcija ili potpuna eliminacija mikroflore sa kože nije neophodna (ovo nije ni moguće), već je dovoljno sprečiti njeno odvajanje sa kože i prenos na meso trupova. U tom smislu potrebna su istraživanja novih pristupa u antimikrobnim tretmanima kože; a jedan od njih koji izgleda da najviše obećava je imobilizacija/fiksacija bakterija na dlaci i površini kože. Novi, efikasniji antimikrobni tretman kože bi se mogao koristiti ili kao jedini tretman na liniji klanja, ili u kombinaciji sa sukcesivnim tretmanom mesa trupova. U ovom drugom slučaju, moglo bi se očekivati i sinergističko delovanje dva tretmana, sa ukupnim kumulativnim efektima koji bi omogućili veoma značajno unapređenje mikrobiološkog statusa mesa trupova i bezbednosti goveđeg mesa uopšte.

2. Radna hipoteza

Glavni cilj istraživanja je da se potvrdi ili odbaci sledeća radna hipoteza:

Novi antimikrobni tretman kože koji će biti razvijen i ocenjen u okviru ovog istraživanja, zasnovan primarno na imobilizaciji mikroorganizama na dlaci kože pre njenog skidanja sa zaklanih goveda, omogućiće značajno veću redukciju prenosa mikroflore kože uključujući patogene na meso trupova, u odnosu na druge antimikrobne tretmane do danas opisane u literaturi.

3. Zadaci rada

U cilju potvrđivanja ili odbacivanja radne hipoteze, bilo je potrebno obaviti naučna istraživanja sa sledećim zadacima:

Zadatak 1. Optimizirati *in vitro* novi antimikrobni tretman kože goveda na bazi imobilizacije mikroflore na dlaci korišćenjem prirodne smole šelak

Podzadatak 1.1. Utvrditi optimalne, glavne parametre novog tretmana (koncentraciju i temperaturu rastvora šelaka u etanolu)

Podzadatak 1.2. Uporediti prenosivost mikroflore sa kože nakon novog tretmana njene imobilizacije sa onom nakon postojećeg tretmana dekontaminacije ili sa onom kod netretirane kože

Podzadatak 1.3. Utvrditi prenosivost *E. coli* O157 sa kože nakon novog tretmana imobilizacije sa onom kod netretirane kože

Zadatak 2. Izvršiti validaciju efikasnosti novog antimikrobnog tretmana imobilizacije mikroflore na koži goveda u redukciji njenog prenosa na meso

Podzadatak 2.1. Utvrditi efekte novog antimikrobnog tretmana kože na redukciju prenosa mikroflore sa kože na meso na laboratorijskom modelu

Podzadatak 2.2. Utvrditi efekte novog antimikrobnog tretmana kože na mikrobiološki status mesa trupova goveda u komercijalnoj klanici

***Nalazi disertacije
po zadacima***

Poglavlje 1

Optimizacija antimikrobnog tretmana imobilizacije mikroflore na dlaci kože goveda

Antic D., Blagojevic B., Ducic M., Mitrovic R., Nastasijevic I. and Buncic S. (2010).
Treatment of cattle hides with Shellac-in-ethanol solution to reduce bacterial
transferability - A preliminary study. *Meat science*, 85, 77-81.

1. Kratak sadržaj

Rastvor prirodne smole šelak u etanolu, koja je dozvoljena za korišćenje u hrani, je ispitivan za tretiranje uzoraka vizuelno čiste i suve kože goveda u cilju redukcije prenosa bakterija sa kože na briseve za uzorkovanje. Tretman kože 23% rastvorom šelaka u etanolu je redukovao prenos ukupne mikroflore (TVC) na sundere za uzorkovanje za 6,6 log (>1000 puta više u odnosu na 2,9 log redukcije postignute samo etanolom), a generičke *Escherichia coli* i *Enterobacteriaceae* za najmanje 2,9 i 4,8 log. Ove redukcije su bile značajno više u odnosu na redukcije postignute tretmanom kože ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem. Značajno više redukcije prenosa TVC sa kože na briseve su postignute korišćenjem viših koncentracija šelaka (23% i 30% u odnosu na 4,8-16,7%) i u slučajevima kada je temperatura rastvora šelaka bila od 20°C-40°C u odnosu na 50°C ili 60°C. Takođe, tretman kože šelakom je značajno redukovao prevalencu *E. coli* O157 na prirodnoj, neinokulisanoj koži (3,7 puta manje u odnosu na kontrolu), kao i broj *E. coli* O157 na veštački inokulisanim kožama (redukcija od 2,1 log). Ova preliminarna studija je pokazala da antimikrobni tretman „imobilizacije mikroflore na koži goveda“ u cilju redukcije prenosa mikroorganizama sa kože ima dobar potencijal za upotrebu i zbog toga će i dalje biti ispitivan.

2. Uvod

Meso trupova goveda može biti kontaminirano tokom operacija klanja i obrade goveda putem fecesa, sadržaja buraga/creva i sa kože (Huffman, 2002). Iz tog razloga, tretmani dekontaminacije mesa trupova su detaljno ispitivani i u širokoj su upotrebi u goveđim klanicama u nekim zemljama (na primer, u SAD), kao interventna mera za eliminaciju bakterijskih alimentarnih patogena sa mesa trupova. Iako je ovakav pristup doveo do značajnog poboljšanja mikrobiološkog statusa goveđih trupova, on se može smatrati kao „reaktivan“, jer probleme (mikrobiološku kontaminaciju) rešava nakon što se oni dogode. U skorije vreme, dosta pažnje je usmereno ka više proaktivnom i preventativnom pristupu, odnosno redukciji bakterijske mikroflore i patogena na glavnom izvoru kontaminacije trupova - koži goveda, primenom više različitih tretmana (Kooohmaraie *i sar.*, 2005; Small *i sar.*, 2005), pre nego što se kontaminacija trupova uopšte i dogodi.

Regulatorna tela u SAD smatraju da je i pored primene najbolje higijenske prakse, nemoguće izbeći izvesnu mikrobiološku kontaminaciju trupova, uključujući i sa alimentarnim patogenima. Dekontaminacioni tretmani se dakle, smatraju kao dodatak HACCP-u u cilju zadovoljavanja kriterijuma i standarda za redukciju patogena (Smulders *i Greer*, 1998). Sa druge strane, regulatorna tela u EU su doskora smatrala da su striktna higijenska praksa i implementacija HACCP sistema dovoljni da osiguraju bezbednost goveđeg mesa i da bi uvođenje tretmana dekontaminacije na klanicama dovelo do smanjivanja nivoa higijenske prakse od strane klanica i njihovog preteranog oslanjanja na ove mere intervencije, što bi na kraju rezultiralo smanjivanjem ukupne bezbednosti proizvoda. Međutim, novom Evropskom regulativom (EU Regulation 853/2004) se, u principu, dozvoljava upotreba tretmana dekontaminacije u klanicama, ukoliko se za takve tretmane dobije pozitivno naučno mišljenje panela EFSA i dozvola regulatornih tela (EC, 2004a).

Danas raspoložive informacije o antimikrobnoj efikasnosti i mogućnostima praktične primene tretmana dekontaminacije kože goveda, kako u eksperimentalnim, tako i u komercijalnim uslovima, su ograničene i nedovoljne. Neki istraživači veruju da su dekontaminacioni tretmani kože goveda najefikasniji način da se redukuje

bakterijska kontaminacija mesa goveđih trupova ([Kooohmaraie i sar., 2005](#); [Small i sar., 2005](#); [Antic i sar., 2010a](#)).

U dosad objavljenim istraživanjima, ispitivani su različiti fizički i hemijski antimikrobni tretmani kože goveda, sa ciljem da se patogeni ubiju ili uklone sa kože. Ovi tretmani su bili zasnovani na različitim pristupima, uključujući: pranje životinja pre klanja ([Byrne i sar., 2000](#); [Mies i sar., 2004](#)), tretman vodenom parom pod subatmosferskim pritiskom ([McEvoy i sar., 2001, 2003c](#)), hemijska depilacija ([Schnell i sar., 1995](#); [Castillo i sar., 1998](#); [Nou i sar., 2003](#)), uklanjanje dlaka voskom ([Purnell i sar., 2007](#)), različita hemijska anitmikrobnna sredstva uključujući organske kiseline, neorganske kiseline i baze, alkohole, cetilpiridin hlorid, komercijalne deterdžente/dezinficijense/sanitajzere ([Bosilevac i sar., 2004a, b](#); [Bosilevac i sar., 2005a, b](#); [Mies i sar., 2004](#); [Small i sar., 2005](#)), ozonirana i EO voda ([Bosilevac i sar., 2005b](#)), šišanje nečistoće sa kože ([Van Donkersgoed i sar., 1997](#)) i dlaka i/ili njihovo opaljivanje ([Small i sar., 2005](#)) i aplikacija bakteriofaga ([O'Flynn i sar., 2004](#)). Postignuta redukcija bakterijske mikroflore i alimentarnih patogena na koži se veoma razlikovala u različitim studijama, u zavisnosti od brojnih faktora, a naročito usled razlika vezanih za: a) higijenski i mikrobiološki status kože; b) efikasnost samog dekontaminacionog tretmana; i c) da li je istraživanje sprovedeno u laboratorijskim ili praktičnim uslovima na klanici.

Do danas, može se reći da je postignuta mikrobna redukcija na koži goveda u eksperimentalnim uslovima u laboratoriji iznosila oko $3\text{-}4 \log \text{cfu/cm}^2$, a u praktičnim uslovima na klanici do $2\text{-}3 \log \text{cfu/cm}^2$. Međutim, koža goveda je redovno kontaminirana sa mnogo višim nivoima ukupne i fekalne mikroflore, uključujući i alimentarne patogene. Zbog toga je neophodno da se efikasnost antimikrobnih tretmana kože goveda u redukciji prenosa mikroorganizama sa kože na meso trupova značajno poboljša. Da bi se to postiglo, može se uzeti u obzir alternativni pristup u tretmanima kože: mikrobna imobilizacija (fiksacija) na dlaci i površini kože. Sa ovim pristupom, eliminacija ukupne mikroflore sa kože nije neophodna (to nije ni moguće), već je dovoljno da se koža tretira nekim lepljivim materijama i bakterije na određeni način „zalepe“ za dlaku i tako spreči njihovo odvajanje sa kože i prenos na meso trupova tokom operacije skidanja kože. Za tu svrhu, može se upotrebiti jedna od takvih lepljivih materija, prirodna smola poreklom od insekata, šelak, koji se koristi u industriji hrane za glaziranje površine konditorskih proizvoda (slatkiša) i voća (citrusa) u cilju sprečavanja oštećenja njihove površine pri rukovanju i skladištenju.

Krajnji cilj u bezbednosti mesa primenom antimikrobnih tretmana na koži goveda, bez obzira na kom su principu zasnovani, je sprečavanje prenosa mikroorganizama sa visoko kontaminirane kože na primarno sterilan trup tokom operacije skidanja kože. Radi postizanja tog cilja, u ovoj preliminarnoj studiji je korišćen rastvor šelaka u etanolu za tretiranje uzoraka čiste i suve kože goveda u cilju redukcije prenosa bakterija sa kože metodom uzorkovanja brisem, sa pretpostavkom da bi tretman mogao da smanji i prenos bakterija sa kože na meso trupova. Takođe, vršena je i optimizacija ovog antimikrobnog tretmana u pogledu najoptimalnijih parametara rastvora šelaka, kao i njegovo upoređenje sa „klasičnim“ tretmanom dekontaminacije kože ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem, uz ispitivanje efekata i na najvažnijem alimentarnom patogenu u goveda, *E. coli* O157. U ovoj studiji, antimikrobni tretman rastvorom šelaka u etanolu nije ispitivan na prljavim i/ili mokrim kožama, jer je EU regulativom predviđeno da se mogu klati samo čista i suva goveda.

3. Materijal i metode

3.1. Efekti koncentracije i temperature rastvora šelaka na prenos mikroflore sa tretiranih koža na briseve za uzorkovanje

3.1.1. Priprema uzoraka kože

Parni komadi kože (površine 40x30 cm) su isecani sa vizuelno čistih i suvih koža odmah nakon njihovog skidanja sa zaklanih goveda, upakovani u kese i transportovani u laboratoriju u roku od 2 h. U okviru svakog para, dva komada kože su uzeta sa tačno suprotnih strana kože (sa leve i desne strane životinje), sa ciljem da njihove karakteristike budu što je sličnije moguće (osobine dlake, čistoća i nivo mikroflore). U cilju izjednačavanja nivoa mikroflore između parnih komada kože, jedan komad je postavljen preko drugog (dlaka na dlaku) i tako držan u trajanju od 30 minuta. Nakon njihovog razdvajanja, jedan od dva komada kože je podvrgnut

tretmanu rastvorom šelaka u etanolu („tretman“) različitim parametrima koncentracije i temperature rastvora (kao što je opisano kasnije), dok drugi komad kože nije bio tretiran („netretirana kontrola“) ([slika 6](#)).

3.1.2. Priprema rastvora šelaka

Šelak (Zinsser Co. Inc., USA) je prirodna smola, proizvod insekata, dozvoljen za korišćenje u industriji hrane u EU i SAD kao aditiv, gde se upotrebljava kao glazirajuće sredstvo (na primer, za konditorske proizvode i voće). Šelak je rastvorljiv prvenstveno u alkoholima, a najbolje u etanolu ([slika 3](#)). Za ocenu efekata koncentracije šelaka, odgovarajuće količine ove smole su rastvorene u apsolutnom (99,09%) etanolu na sobnoj temperaturi (oko 20°C) i pripremljeni rastvori u koncentracijama od 4,8%, 9%, 16,7%, 23% i 30%. Dodatno, pripremljena je i kontrola koja se sastojala samo od apsolutnog etanola (99,09%), bez dodatog šelaka. Za ocenu efekata temperature rastvora šelaka, 23% rastvor šelaka u apsolutnom etanolu je zagrevan i pripremljen na temperaturama od 20°C, 30°C, 40°C, 50°C i 60°C. Za svaki parametar koncentracije i temperature rastvora šelaka, 6 uzoraka kože tretirane šelakom i 6 korespondentnih (parnih) netretiranih kontrolnih uzoraka kože je ispitano u cilju utvrđivanja efekata u redukciji ukupnog broja bakterija (TVC), broja *Enterobacteriaceae* (EC) i generičke *E. coli* (opisano kasnije).

3.1.3. Tretman uzoraka kože rastvorom šelaka

Tretiranje koža različitim koncentracijama i temperaturama rastvora šelaka je vršeno ravnomernim prskanjem ručnom prskalicom (CP 450, Matrix) ([slika 4](#)) sa rastojanja od 20 cm, u trajanju od 1 minut ([slika 5](#)). Nakon tretmana, komadi kože su ostavljeni da se osuše na vazduhu, na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta, pre mikrobiološkog uzorkovanja ([slika 6](#)). Ukupno potrebno vreme za tretman i sušenje koža od oko 6 minuta je u skladu sa regulatornim zahtevom da se obrada trupa goveda mora završiti za 45 minuta nakon klanja životinje.



Slika 3. Šelak, prirodna smola poreklom od insekata
U ljuspicama (levo) i rastvoren u etanolu (desno)



Slika 4. Ručne prskalice korišćene za tretiranje koža rastvorom šelaka



Slika 5. Tretman koža prskanjem rastvorom šelaka u etanolu

3.1.4. Mikrobiološko uzorkovanje kože

Uzorkovanje tretiranih i netretiranih komada koža je vršeno tehnikom vlažnog brisa, jer ovaj metod simulira prenos bakterija sa kože na meso trupova putem direktnog kontakta i/ili putem kontakta koža-noževi/ruke radnika-meso i/ili putem aerosola. Sterilni metalni šablon (10 x 10 cm) je bio postavljen na svaki uzorak kože i unutar šablona je sa 5 uzastopnih povlačenja sunđerom uzorkovana cela površina od 100 cm² ([slika 7](#)). Korišćeni su ravni celulozni sunđeri za pranje (površine 10 x 10 cm, 2 cm debljine) koji ne sadrže antimikrobne agense i prethodno su u laboratoriji bili izloženi UV zracima u trajanju od 15 minuta, a zatim aseptično upakovani u aluminijumsku foliju ([Nastasijevic i sar., 2008; Antic i sar., 2010a](#)) ([slika 8](#)). Neposredno pre upotrebe, svaki sunđer je bio nakvašen sa 10 ml sterilnog MRD (Maximum Recovery Diluent; Oxoid, Hampshire, England, UK). Uzorci briseva su stavljeni u posebne stomaher kese (19x30 cm; Nasco, Whirl-pak, USA) ([slika 8](#)) i mikrobiološki ispitivani.

3.1.5. Homogenizacija uzoraka

U svaku stomaher kesu sa sunđerom je dodato po 90 ml sterilnog MRD, a potom su kese spolja ručno masirane u trajanju od 1 minut da se dobiju homogenati. Iz svake kese je zatim uzet po 1 ml homogenata i pripremljene su serije decimalnih razređenja u MRD (ISO metoda 6887-1:1999).



Slika 6. Parni komadi vizuelno čiste i suve kože
Netretirani (kontrolni) komad kože (levo) i nakon tretmana šelakom (desno)



Slika 7. Uzorkovanje koža metodom vlažnog brisa sunđerom



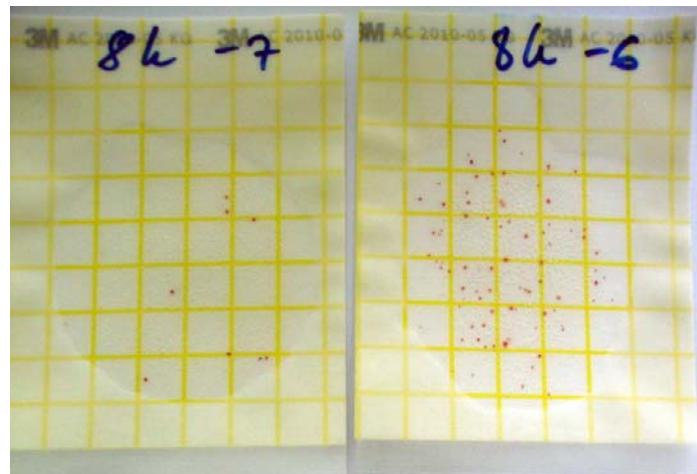
Slika 8. Aseptični celulozni sunđeri korišćeni za uzorkovanje kože
Pripremljeni za uzorkovanje (levo) i nakon obavljenog uzorkovanja kože (desno)

3.1.6. Utvrđivanje ukupnog broja bakterija (TVC), broja *Enterobacteriaceae* (EC) i generičke *E. coli* (GEC) iz uzorka

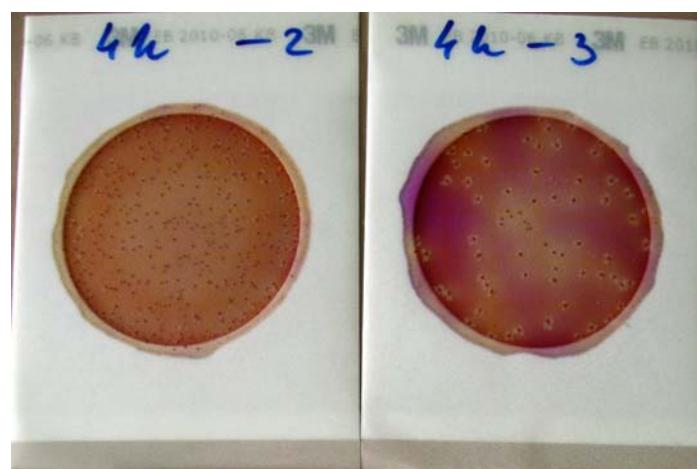
Za utvrđivanje ukupnog broja bakterija (TVC), iz odgovarajućih razređenja napravljenih od homogenata svakog uzorka mesa je uziman po 1 ml razređenja i pipetom prenet na Petrifilmove za utvrđivanje TVC (Petrifilm Aerobic Count Plate, 3M Health Care, St. Paul, USA). Nakon toga su Petrifilmovi inkubirani na 30°C u toku 72 h, a zatim su sve izrasle kolonije izbrojane (AFNOR validovana metoda 3M 01/1-09/89) ([slika 9](#)).

Za utvrđivanje broja *Enterobacteriaceae* (EC), iz odgovarajućih razređenja napravljenih od homogenata svakog uzorka mesa je uziman po 1 ml razređenja i pipetom prenet na Petrifilmove za utvrđivanje EC (Petrifilm *Enterobacteriaceae* Count Plate, 3M Health Care, St. Paul, USA). Nakon toga su Petrifilmovi inkubirani na 37°C u toku 24 h, a zatim su sve izrasle tipične kolonije izbrojane (AFNOR validovana metoda 3M 01/06 09/97) ([slika 10](#)).

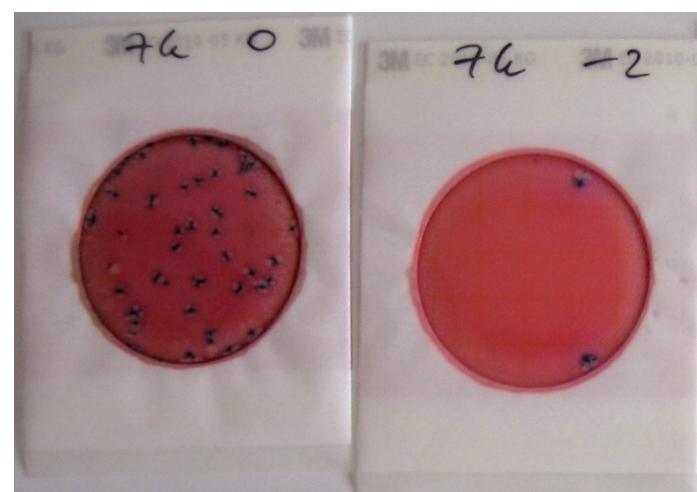
Za utvrđivanje broja generičke *E. coli* (GEC), iz odgovarajućih razređenja napravljenih od homogenata svakog uzorka mesa je uziman po 1 ml razređenja i pipetom prenet na Petrifilmove za utvrđivanje GEC (Petrifilm *E. coli/Coliform* Count Plate, 3M Health Care, St. Paul, USA). Nakon toga su Petrifilmovi inkubirani na 37°C u toku 48 h, a zatim su sve izrasle tipične kolonije izbrojane (NMKL metoda 147.1993 za *E. coli*) ([slika 11](#)).



Slika 9. Petrifilmovi za utvrđivanje ukupnog broja bakterija (TVC)



Slika 10. Petrifilmovi za utvrđivanje broja *Enterobacteriaceae* (EC)



Slika 11. Petrifilmovi za utvrđivanje broja generičke *E. coli* (GEC)

3.2. Upoređivanje tretmana imobilizacije mikroflore na koži rastvorom šelaka sa tretmanom dekontaminacije kože

3.2.1. Priprema uzoraka kože

Parni komadi kože (površine 50x40 cm) su isecani sa vizuelno čistih i suvih koža odmah nakon njihovog skidanja sa zaklanih goveda, upakovani u kese i transportovani u laboratoriju u roku od 2 h. U okviru svakog para, dva komada kože su uzeta sa tačno suprotnih strana kože (sa leve i desne strane životinje), sa ciljem da njihove karakteristike budu što je sličnije moguće (osobine dlake, čistoća i nivo mikroflore). U cilju izjednačavanja nivoa mikroflore između parnih komada kože, jedan komad je postavljen preko drugog (dlaka na dlaku) i tako držan u trajanju od 30 minuta. Nakon njihovog razdvajanja, jedan od dva komada kože je podvrgnut tretmanu rastvorom šelaka u etanolu ili tretmanu ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem („tretman“), kao što je opisano kasnije, dok drugi komad kože nije bio tretiran („netretirana kontrola“). Za svaki ispitivani tretman, bilo je ispitano 6 uzoraka tretirane kože i 6 korespondentnih (parnih) netretiranih kontrolnih uzoraka kože, u cilju utvrđivanja efekata u redukciji ukupnog broja bakterija (TVC), broja *Enterobacteriaceae* (EC) i generičke *E. coli* (opisano kasnije).

3.2.2. Tretman uzoraka kože rastvorom šelaka

Komadi kože su tretirani rastvorom šelaka u etanolu (23% u apsolutnom 99,09% etanolu), ravnomernim prskanjem ručnom prskalicom (CP 450, Matrix) sa rastojanja od 20 cm, u trajanju od 1 min. Nakon tretmana, komadi kože su ostavljeni da se osuše na vazduhu, na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta, pre mikrobiološkog uzorkovanja. Ukupno potrebno vreme za tretman i sušenje koža od oko 6 minuta je u skladu sa regulatornim zahtevom da se obrada trupa goveda mora završiti za 45 minuta nakon klanja životinje ([slike 5 i 6](#)).

3.2.3. Tretman uzoraka kože ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem

Efekti antimikrobnog tretmana sa 23% rastvorom šelaka u etanolu su upoređivani sa efikasnim tretmanom dekontaminacije kože (čija je efikasnost u redukciji TVC oko 2 log), ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem, koji je prethodno opisan (Small i sar., 2005). Sanitajzer je bio preparat na bazi kvaternarnih amonijumovih jedinjenja, površinski dezinficijens (Fink-Antisept G, FINKTEC GmbH). Na osnovu uputstva proizvođača, preparat je rastvoren u toploj vodi (50°C), a zatim njime napunjen usisivač za čišćenje dubinskom ekstrakcijom, sa ispiranjem i vakumiranjem (Puzzi 200, Karcher) (slika 12). Komadi kože su tretirani usisivačem na takav način da je rastvor sanitajzera ravnomerno aplikovan u pravcu rasta dlake i istovremeno usisavan, u trajanju od 1 minut (slika 13), a zatim su tretirani komadi kože ostavljeni da se osuše na vazduhu, na sobnoj temperaturi u trajanju od 3 minuta. Ukupno potrebno vreme za tretman i sušenje koža od oko 4 minuta je u skladu sa regulatornim zahtevom da se obrada trupa goveda mora završiti za 45 minuta nakon klanja životinje.

3.2.4. Mikrobiološko uzorkovanje kože

Uzorkovanje tretiranih i netretiranih komada kože je vršeno brisom sunđerom, na isti način kao što je opisano u potpoglavlju 3.1.4.

3.2.5. Utvrđivanje ukupnog broja bakterija (TVC), broja *Enterobacteriaceae* (EC) i generičke *E. coli* (GEC) iz uzoraka

U svaku stomaher kesu sa sunđerom kojim je uzorkovana koža tretirana šelakom, kao i u kontrolne uzorke, je dodato po 90 ml sterilnog MRD. U stomaher kese sa sunđerima kojima je uzorkovana koža tretirana ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem je dodato 90 ml Dey-Engley neutrališućeg bujona (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), u cilju neutralizacije eventualno prisutnih rezidua sanitajzera na sunđeru (Bosilevac i sar., 2004a). Nakon toga, sve stomaher kese su spolja ručno masirane u trajanju od 1 minut, da se dobiju homogenati. Iz svake kese je zatim uzet po 1 ml homogenata i pripremljene su serije decimalnih razređenja u MRD (ISO

metoda 6887-1:1999). Zatim je iz odgovarajućih razređenja napravljenih od homogenata svakog uzorka uziman po 1 ml razređenja i pipetom prenet na Petrifilmove za utvrđivanje ukupnog broja bakterija (TVC), broja *Enterobacteriaceae* (EC) i generičke *E. coli* (GEC), korišćenjem istih mikrobioloških metoda kao što je opisano u potpoglavlju 3.1.6.



Slika 12. Usisivač za čišćenje dubinskom ekstrakcijom (Puzzi 200, Karcher), korišćen za tretiranje koža ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem



Slika 13. Tretman koža ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem

3.3. Efekat tretmana kože rastvorom šelaka u redukciji prenosa *E. coli* O157 na briseve za uzorkovanje

3.3.1. Efekat tretmana kože rastvorom šelaka na *E. coli* O157 prirodno prisutnu na koži

Parni komadi kože (površine 30 x 20 cm) su uzorkovani na klanici isecanjem sa koža 30 zaklanih goveda, upakovani u posebne kese i transportovani u laboratoriju u roku od 2 h. U okviru svakog para, komadi kože su uzeti sa tačno suprotnih strana kože sa grudi (sa leve i desne strane životinje), sa ciljem da njihove karakteristike budu što je sličnije moguće (osobine dlake, čistoća i prisustvo *E. coli* O157). U cilju daljeg izjednačavanja prevalence i nivoa *E. coli* O157 između parnih komada kože, jedan komad je postavljen preko drugog (dlaka na dlaku) i tako držan u trajanju od 30 minuta. Nakon njihovog razdvajanja, jedan od dva komada kože je podvrgnut tretmanu 23% rastvorom šelaka u etanolu („tretman“), kao što je opisano u prethodnom poglavlju, dok drugi komad kože nije bio tretiran („netretirana kontrola“). Ukupno je ispitano 30 tretiranih i 30 kontrolnih komada kože, a prisustvo *E. coli* O157 je utvrđivano korišćenjem brzog testa zasnovanog na ELISA reakciji (opisano kasnije). Usled niskih nivoa ćelija prirodno prisutne *E. coli* O157 na koži (naročito nakon tretmana), njihov broj nije mogao biti utvrđen kvantitativno u ovom eksperimentu.

3.3.2. Efekat tretmana kože rastvorom šelaka na veštački inokulisaniu *E. coli* O157

Parni komadi vizuelno čiste i suve kože (površine 50x40 cm) su uzeti na klanici i pripremljeni u laboratoriji na način kako je opisano u prethodnim poglavljima ([slika 14](#)). Prethodno je u laboratoriji pripremljen inokulum 24-časovne kulture netoksigene *E. coli* O157 (ATCC 43894) razređivanjem u MRD da se postigne krajnja koncentracija od $8 \log_{10}$ cfu/ml. Za inokulaciju *E. coli* O157 na komade kože su korišćene sterilne četkice, koje su prvo nakvašene sa MRD, zatim obrisane papirnim ubrusom (da se ukloni višak tečnosti), a nakon toga njima ravnomerno

nanošeno 2 ml inokuluma na kožu, unutar sterilnog metalnog šablona (10 x 10 cm) ([slika 14](#)). Inokulisani komadi kože su ostavljeni 5 minuta da se osuše na vazduhu, na sobnoj temperaturi. Nakon toga, 6 komada kože je bilo tretirano prskanjem 23% rastvorom šelaka (na način kako je opisano u prethodnom poglavlju), dok je 6 korespondentnih (parnih) netretiranih kontrolnih uzoraka kože služilo kao kontrola. U svakom uzorku je kvantitativno utvrđivan broj *E. coli* O157 (opisano kasnije).



Slika 14. Parni komadi vizuelno čiste i suve kože i inokulacija *E. coli* O157



Slika 15. Komad kože nakon tretmana šelakom (levo) i uzorkovanje brisom (desno)

3.3.3. Mikrobiološko uzorkovanje kože

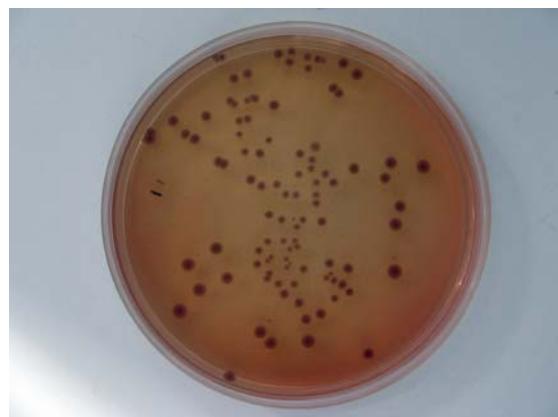
Uzorkovanje tretiranih i netretiranih komada kože je vršeno brisom sunđerom, na isti način kao što je opisano u potpoglavlju 3.1.4 ([slika 15](#)).

3.3.4. Utvrđivanje broja *E. coli* O157

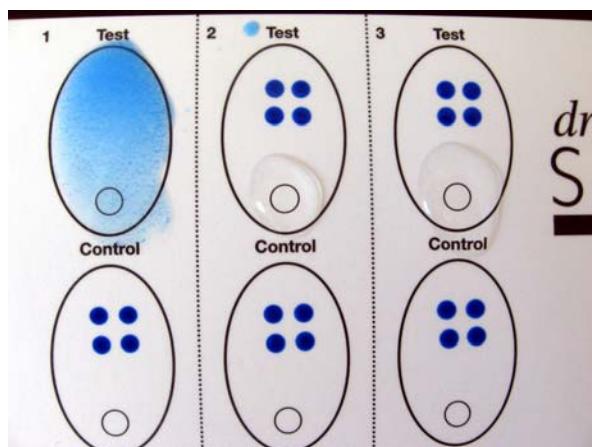
U svaku stomaher kesu sa sunđerom je dodato po 90 ml sterilnog MRD, a potom su kese spolja ručno masirane u trajanju od 1 minut da se dobiju homogenati. Iz svake kese je zatim uzet po 1 ml homogenata i pripremljene su serije decimalnih razređenja u MRD (ISO metoda 6887-1:1999). Broj ćelija *E. coli* O157 je utvrđivan nakon zasejavanja odgovarajućeg razređenja homogenata na Petri ploče sa Sorbitol MacConkey agarom koji sadrži cefiksime (25 µl/500 ml: Dynal, Oslo, Norway) i kalijum telurit (25 µl/500 ml: Dynal) [CT-SMAC ploče], koje su zatim inkubirane na 37°C, 24 h (O'Brien i sar., 2005) (slika 16). Tipične izrasle kolonije su izbrojane i potvrđene kao *E. coli* korišćenjem biohemijskog kita (API 20E, BioMerieux, France) i serološki upotrebom DrySpot O157 latex aglutinacionog testa (Oxoid, Hampshire, England, UK) (slika 17).

3.3.5. Utvrđivanje prisustva *E. coli* O157

U svaku stomaher kesu sa sunđerom je dodato po 90 ml sterilnog MRD, a potom su kese spolja ručno masirane u trajanju od 1 minut da se dobiju homogenati. Zatim je iz kese preneto 25 ml homogenata u 225 ml podloge za obogaćenje (mEC + novobiocin selektivni bujon; Merck, Darmstadt, Germany), koji je inkubiran na 37°C, 24 h. Nakon inkubacije, kultura bujona je testirana brzim imunohromatografskim testom zasnovanom na ELISA reakciji (Singlepath® *E. coli* O157; Merck) na prisustvo *E. coli* O157 (slika 18). Prema uputstvu proizvođača, ovaj brzi test je AOAC validovan, sa pragom detekcije od 1 cfu/25 g uzorka, dok mu je osetljivost i specifičnost >99%.



Slika 16. Izgled tipičnih kolonija *E. coli* O157 na CT-SMAC agaru



Slika 17. Prikaz pozitivne imunoaglutinacije za potvrđivanje *E. coli* O157 (DrySpot O157 latex agglutinacioni test)



Slika 18. Brzi imunohromatografski test za utvrđivanje prisustva *E. coli* O157 (Singlepath® *E. coli* O157)

U sredini je prikazan pozitivan uzorak

3.4. Analiza rezultata

Za svaku grupu bakterija (TVC, EC, GEC i *E. coli* O157) i za svaki uzorak brisa kože goveda, prvo je izračunavan broj izraslih kolonija, odnosno bakterija po cm^2 (cfu/cm^2), a zatim je svaka vrednost konvertovana u logaritme (\log_{10} cfu/cm^2). Nakon toga je korišćenjem statističkog programa Statgraphics 5.0 (Statistical Graphics Corporation, USA) u okviru softverskog paketa Microsoft Excel, za svaku grupu uzorka izračunata aritmetička sredina logaritama i njihova standardna devijacija, a zatim i statistička značajnost razlika između srednjih vrednosti pomoći Studentovog T-testa, za nivo značajnosti od 95% ($p<0,05$).

Efikasnost antimikrobnih tretmana rastvorom šelaka i ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem u redukciji prenosa bakterija sa kože na briseve za uzorkovanje (izražena kao postignuta mikrobna redukcija), bila je ocenjivana izračunavanjem razlike u nivoima bakterija utvrđenim između netretiranih (kontrolnih) i tretiranih komada kože.

4. Rezultati i diskusija

4.1. Efekti koncentracije i temperature rastvora šelaka na prenos mikroflore sa tretiranih koža na briseve za uzorkovanje

Nakon tretmana kože prskanjem rastvorom šelaka, utvrđena je veoma značajna redukcija prenosa mikroflore sa kože na briseve za uzorkovanje ([tabela 5.1](#)). U dostupnoj literaturi nema podataka o bilo kakvom značajnom antimikrobnom (baktericidnom) efektu samog šelaka. Sa druge strane, za rastvaranje šelaka je korišćen etanol, koji ima baktericidan efekat. Međutim, nakon tretmana kože samo etanolom, redukcija TVC je iznosila samo oko 3 log cfu/cm^2 , dok je tretman kože rastvorom šelaka u etanolu imao za rezultat značajno veću redukciju TVC, od oko 5 do 7 log cfu/cm^2 , u zavisnosti od koncentracije samog šelaka ([tabela 5.1](#)). Ovo ukazuje da su postignute redukcije prenosa bakterija, sa kože tretirane rastvorom

šelaka na briseve za uzorkovanje, verovatno posledica dva glavna faktora koji su delovali istovremeno. Sa jedne strane, očekivano je da je primarni način delovanja šelaka na koži bio imobilizacija (fiksacija/lepljenje) bakterija na dlaci kože i posledično sprečavanje ili smanjenje njihovog odvajanja sa dlake i prenos na briseve (sunđere) za uzorkovanje. Može se pretpostaviti da bi i prenos bakterija sa kože tretirane šelakom na meso trupa tokom skidanja kože (na primer, putem kontakta koža-meso ili putem aerosola), bio redukovani na sličan način i verovatno do sličnog nivoa kao što je u slučaju prenosa sa kože na briseve za uzorkovanje. Drugi faktor koji je verovatno imao udela u redukciji mikroflore je sam rastvarač šelaka, etanol, koji je inaktivisao (eliminisao) određeni deo mikroflore kože ([tabela 5.1](#)).

Sveukupno, značajno bolja redukcija prenosa TVC sa kože na briseve je postignuta korišćenjem viših koncentracija šelaka (23% i 30% u odnosu na 4,8-16,7%; [tabela 5.1](#)). Međutim, primećeno je da je tehnički teško izvodljivo pravilno rastvaranje većih količina šelaka u etanolu kako bi se dobila koncentracija od 30%. Zbog toga je za korišćenje u kasnijim ispitivanjima tretmana kože šelakom izabrana koncentracija od 23% šelaka u etanolu.

Značajno više redukcije prenosa TVC sa kože na briseve su postignute nakon tretmana kože 23% rastvorom šelaka u slučajevima kada je temperatura rastvora bila od 20°C-40°C u odnosu na 50°C ili 60°C ([tabela 5.1](#)). Ovaj rezultat je verovatno bio posledica bržeg očvršćavanja šelaka na koži (i posledično brže imobilizacije bakterija) na nižim temperaturama, ili bržeg isparavanja etanola (odnosno smanjenja njegovog baktericidnog efekta) na višim temperaturama ili oboje.

Iako je sličan trend u redukciji prenosa bakterija sa kože na briseve, u eksperimentima sa ispitivanjem koncentracije i temperature rastvora šelaka, primećen za sve tri ispitivane grupe bakterija (TVC, EC i GEC), redukcije TVC nakon tretmana sa šelakom bile su značajno veće u odnosu na one postignute sa EC i GEC u ovoj studiji ([tabela 5.1](#)), kao i u drugoj studiji ([tabela 5.2](#)). Međutim, na osnovu ovih rezultata, ne može se ponuditi jasno objašnjenje ove pojave. Do danas, nema objavljenih informacija i istraživanja o tretmanima kože šelakom.

Tabela 5.1. Efekti koncentracije i temperature rastvora šelaka na prenos mikroflore sa tretiranih koža na briseve za uzorkovanje

Tip tretmana	Uslovi tretmana ^a	Mikrobne redukcije na koži (\log_{10} cfu/cm ² ± SD) ^b		
		Ukupan broj bakterija (TVC)	Broj Enterobacteriaceae (EC)	Broj generičke <i>E. coli</i> (GEC)
Ispitivanje koncentracije šelaka u etanolu ^c	30%	-6,9 ± 0,3 ^A	-3,8 ± 0,4 ^A	-3,2 ± 0,5 ^A
	23%	-6,3 ± 0,8 ^A	-3,6 ± 0,8 ^A	-2,9 ± 0,6 ^A
	16,7%	-5,0 ± 0,9 ^B	-2,3 ± 0,0 ^B	-2,3 ± 0,4 ^B
	9%	-5,1 ± 0,7 ^B	-3,1 ± 1,2 ^B	-2,7 ± 0,9 ^B
	4,8%	-5,0 ± 1,4 ^B	-3,1 ± 1,1 ^B	-2,9 ± 0,8 ^B
	0% ^e	-2,9 ± 1,3 ^C	ND ^f	ND
Ispitivanje temperature rastvora šelaka u etanolu ^d	20°C	-6,0 ± 0,7 ^A	-2,8 ± 0,3 ^A	-2,8 ± 0,4 ^A
	30°C	-6,1 ± 0,8 ^A	-2,6 ± 0,7 ^A	-2,8 ± 0,1 ^A
	40°C	-6,3 ± 0,4 ^A	-2,4 ± 0,3 ^A	-2,0 ± 0,0 ^B
	50°C	-4,7 ± 0,9 ^B	-2,0 ± 0,0 ^B	-2,4 ± 0,5 ^B
	60°C	-5,3 ± 1,2 ^B	-2,5 ± 0,3 ^A	-2,4 ± 0,5 ^B

^a Ispitano po 6 uzoraka za svaku koncentraciju i temperaturu rastvora šelaka.

^b Razlike između srednjih vrednosti (± standardna devijacija) korespondentnih tretiranih i netretiranih uzoraka kože. U okviru svakog dela tabele i kolone, vrednosti označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju; C<B<A ($P<0,05$).

^c Rastvor na sobnoj temperaturi (20°C).

^d 23% rastvor šelaka u etanolu.

^e Samo etanol.

^f ND, nije utvrđeno.

4.2. Upoređivanje tretmana imobilizacije mikroflore na koži rastvorom šelaka sa tretmanom dekontaminacije kože

Veoma značajna redukcija prenosa TVC sa kože na briseve (od oko 6,6 log) je postignuta tretmanom kože 23% rastvorom šelaka (tabela 5.2), što je bilo značajno više (za 1,7 log cfu/cm²) od redukcije postignute tretmanom ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem (4,9 log). Ovakva redukcija TVC postignuta tretmanom sanitajzerom bila je veća za oko 2-3 log u odnosu na rezultat sličnog tretmana ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem (Small i sar., 2005) kada je korišćen drugi sanitajzer. Takođe, značajne redukcije prenosa EC i GEC na briseve su postignute tretmanom kože 23% rastvorom šelaka (tabela 5.2). Iako tačan stepen ovih redukcija

nije bilo moguće utvrditi zbog odsustva EC i GEC u uzorcima nakon tretiranja kože šelakom, one su bile najmanje $4,8 \log \text{cfu/cm}^2$ i $2,9 \log \text{cfu/cm}^2$ i značajno više nego one postignute dekontaminacionim tretmanom sanitajzerom.

Sveukupno, rezultati ove studije ukazuju da je antimikrobnii tretman kože u kome su kombinovana dva mehanizma delovanja, inaktivacija (ubijanje) i imobilizacija bakterija na dlaci (tretman rastvorom šelaka u etanolu) bolji i efikasniji u odnosu na antimikrobnii tretman dekontaminacije kože čiji je mehanizam delovanja inaktivacija bakterija i njihovo uklanjanje sa dlake (tretman ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem), u smislu redukcije prenosa ukupne mikroflore sa kože na briseve za uzorkovanje. Do danas, nema objavljenih studija u kojima se vrši poređenje efikasnosti tretmana imobilizacije mikroflore na koži sa dekontaminacijom kože.

Tabela 5.2. Upoređivanje efikasnosti tretmana kože rastvorom šelaka i tretmana dekontaminacije kože sanitajzerom u redukciji prenosa bakterija sa kože na briseve

Mikroorganizmi	Ispiranje rastvorom sanitajzera (Antisept G) i vakumiranje ^a		Prskanje 23% rastvorom šelaka u etanolu ^a			
	Netretirana koža	Tretirana koža	Mikrobnia redukcija ^b	Netretirana koža	Tretirana koža	Mikrobnia redukcija ^b
Ukupan broj bakterija ($\log_{10} \text{cfu/cm}^2$) ^c	$9,9 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,3$	$-4,9 \pm 0,4$ ^A	$10,8 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,7$	$-6,6 \pm 0,8$ ^B
Broj <i>Enterobacteriaceae</i> ($\log_{10} \text{cfu/cm}^2$) ^c	$5,9 \pm 1,2$ ^d	$2,5 \pm 0,7$ ^d	$-3,4 \pm 1,1$ ^A	$4,8 \pm 2,4$ ^d	0,0	$-4,8 \pm 2,4$ ^{Bf}
Broj generičke <i>E. coli</i> ($\log_{10} \text{cfu/cm}^2$) ^c	$3,9 \pm 0,4$ ^d	$1,2 \pm 0,4$ ^e	$-2,8 \pm 0,7$ ^B	$2,9 \pm 0,8$ ^d	0,0	$-2,9 \pm 0,8$ ^{Bf}

^a Ispitano po 6 korespondentnih tretiranih i netretiranih uzoraka kože.

^b Razlike između srednjih vrednosti (\pm standardna devijacija) korespondentnih tretiranih i netretiranih uzoraka kože. U okviru svakog reda, vrednosti označene različitim velikim slovom se statistički značajno razlikuju; B>A ($P<0,05$).

^c Srednja vrednost \pm standardna devijacija.

^d Samo 5 uzoraka (od 6) je bilo pozitivno

^e Samo 4 uzoraka (od 6) je bilo pozitivno

^f Stvarna redukcija je verovatno bila veća, ali nije mogla biti tačno utvrđena zbog odsustva izolacije bakterija nakon tretmana

4.3. Efekat tretmana kože rastvorom šelaka u redukciji prenosa *E. coli* O157 na briseve za uzorkovanje

Prenos prirodno prisutne *E. coli* O157 sa neinokulisane kože na briseve za uzorkovanje, odnosno njeno prisustvo u tretiranim uzorcima, bilo je redukovano 3,7 puta nakon tretmana kože 23% rastvorom šelaka (tabela 5.3). Međutim, iako je tretman veoma značajno redukovao prevalencu ovog patogena, nije u potpunosti eliminisao njegov prenos sa kože na briseve u svim uzorcima. U pokušaju da se kvantifikuje efekat tretmana šelakom u redukciji prenosa *E. coli* O157 sa kože na briseve, uzorci kože su inokulisani visokim nivoima ćelija ovog patogena pre tretmana. Prosečna utvrđena redukcija prenosa *E. coli* O157 sa ovih inokulisanih koža na briseve nakon tretmana sa 23% rastvorom šelaka iznosila je oko 2 log cfu/cm² (tabela 5.3).

Može se primetiti da je ova redukcija prenosa *E. coli* O157 sa veštački inokulisanih koža na briseve (tabela 5.3) bila značajno niža u odnosu na redukcije prenosa TVC, EC i GEC postignute sa prirodnih (neinokulisanih) koža (tabela 5.2) - iako su oba tipa koža tretirana istim tretmanom zasnovanom na šelaku. Moguće objašnjenje ovakvih razlika može uključivati efekte tri glavna faktora. Prvo, jačina pričvršćivanja bakterija za dlaku kože, prirodno i/ili nakon tretmana šelakom, se verovatno razlikuje između različitih grupa/vrsta bakterija - posledično i njihovo odvajanje sa kože i prenos na briseve za uzorkovanje. Drugo, ćelije inokulisane *E. coli* O157 se verovatno nisu pričvrstile za dlaku na koži istom jačinom kao prirodno prisutne bakterije, tokom perioda od 5 minuta između inokulacije i tretmana kože. Treće, tokom inokulacije kože sa inokulumom *E. coli* O157 pripremljenim u MRD-u, neminovno je došlo do kvašenja dlake i kože, što je moglo smanjiti efekat lepljenja kasnije aplikovanog šelaka i/ili olakšati odvajanje i prenos bakterija sa kože na briseve tokom uzorkovanja. U svakom slučaju, ovi rezultati ukazuju da inokulisana koža nije optimalan model za ocenjivanje tretmana kože, uključujući i sa šelakom, već je korišćenje prirodne kože i mikroflore preporučljivo.

Tabela 5.3. Efekat tretmana kože rastvorom šelaka u redukciji prenosa *E. coli* O157 na briseve

Mikroorganizmi	Tretman rastvorom šelaka (23%)		
	Netretirana koža	Tretirana koža	Mikrobna redukcija
<i>E. coli</i> O157 prisustvo ^a (broj uzoraka / procenat)	11 / 36,7%	3 / 10,0%	-8 / -72,7% ^e (3,7 x) ^c
<i>E. coli</i> O157 broj ^b (srednji log ₁₀ cfu/cm ² ± SD)	8,9 ± 0,4	6,8 ± 0,5	-2,1 ± 0,7

^a U 30 uzoraka prirodne (neinokulisane) kože.

^b U 6 uzoraka kože inokulisane sa *Escherichia coli* O157.

^e Efikasnost tretmana u redukciji prevalence = (% redukcije x 100) / % pozitivnih kontrola

^c Koeficijent efikasnosti tretmana = (% pozitivnih kontrola) / (% pozitivnih nakon tretmana)

5. Zaključni komentar

Tretman kože 23% rastvorom šelaka u etanolu redukovao je prenos ukupne mikroflore (TVC) na briseve za uzorkovanje za 6,6 log, a fekalne mikroflore (GEC i EC) za najmanje 2,9 i 4,8 log. Ove redukcije su bile značajno bolje u odnosu na one postignute standardnim tretmanom kože ispiranjem sanitajzerom (Antisept G) i vakumiranjem. Dalje, tretman rastvorom šelaka je značajno redukovao prevalencu i broj *E. coli* O157 u brisevima kože nakon tretmana. Može se pretpostaviti da bi i prenos bakterija sa kože na meso fizičkim kontaktom, bio redukovani na sličan način kao što je u slučaju prenosa sa kože tretirane šelakom na briseve za uzorkovanje. Sveukupno, rezultati ove studije ukazuju da ovaj novi pristup u redukciji prenosa bakterija sa kože goveda na meso, njihovom imobilizacijom na koži, veoma obećava i ima dobar potencijal za praktičnu primenu u industriji. Na osnovu prvih informacija iz kožarske industrije, ukazano je da tretman kože šelakom ne bi uticao na oštećenje kože i njeno kasnije korišćenje u ovoj industriji. Međutim, dalja istraživanja su neophodna kako bi se ispitali i bolje razumeli mehanizmi antimikrobnog delovanja šelaka (imobilizacije) na kožama različite vizuelne čistoće, izvršila optimizacija primene u realnim uslovima i dalje poboljšala ukupna efikasnost ovog tretmana.

Poglavlje 2

**Validacija efikasnosti antimikrobnog tretmana
imobilizacije mikroflore na koži goveda u redukciji
njenog prenosa na meso**

Antic D., Blagojevic B. and Buncic S. (2011). Treatment of cattle hides with Shellac solution to reduce hide-to-beef microbial transfer. *In press*
Prihvaćeno za objavljivanje u *Meat science*.

1. Kratak sadržaj

U ovoj studiji je ocenjivan efekat novog antimikrobnog tretmana kože goveda šelakom (zasnovanog na imobilizaciji mikroorganizama na dlaci kože) u redukciji prenosa mikroflore sa kože na meso goveda. U laboratorijskom modelu za direktni prenos mikroflore sa kože na meso, tretman kože (različitih kategorija čistoće) šelakom je imao za rezultat značajne mikrobne redukcije na mesu goveda: do 3,6 log cfu/cm² ukupnog broja bakterija (TVC), do 2,5 log cfu/cm² *Enterobacteriaceae* (EC) i do 1,7 log cfu/cm² generičke *E. coli* (GEC). U eksperimentu na maloj komercijalnoj klanici, u uslovima loše prakse (klanje prljavih goveda i neadekvatna higijena procesa klanja i obrade), tretman koža šelakom je imao za rezultat značajnu postignutu mikrobnu redukciju na trupovima goveda nakon skidanja kože: 1,7 log cfu/cm² TVC, 1,4 log cfu/cm² EC i 1,3 log cfu/cm² GEC. Kako u laboratorijskom, tako i u eksperimentu na klanici, postignuta redukcija TVC na mesu goveda tretmanom kože šelakom, bila je značajno veća nego upotrebom komparativnog tretmana ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem, dok se redukcije EC i GEC nisu značajno razlikovale između ova dva tretmana kože.

2. Uvod

Koža goveda predstavlja glavni izvor mikrobiološke unakrsne kontaminacije mesa trupova goveda, tokom operacije njenog skidanja i/ili indirektno doprinoseći ukupnoj kontaminaciji na liniji klanja (Avery *i sar.*, 2002; Arthur *i sar.*, 2004; Blagojevic *i sar.*, 2011). Iz tog razloga, objavljeno je nekoliko studija o različitim tretmanima dekontaminacije kože pre njenog skidanja, sa ciljem redukcije njene mikroflore i posledičnim poboljšanjem mikrobiološkog statusa trupova goveda (Koohmaraie *i sar.*, 2005; Small *i sar.*, 2005). Ove studije su prvenstveno bile fokusirane ka inaktivaciji mikroorganizama na koži, samostalno ili u kombinaciji sa njihovim fizičkim uklanjanjem sa kože, upotrebom različitih tehnika zasnovanih na termičkom tretmanu visokom temperaturom (do 80°C) ili hemikalijama uključujući organske kiseline, kvaternerna amonijumova jedinjenja, natrijum hidroksid, cetilpiridin hlorid, sredstva za hemijsku depilaciju, vodonik peroksid, etanol, ozoniranu vodu i acidifikovani hlor (Byrne *i sar.*, 2000; McEvoy *i sar.*, 2001; Nou *i sar.*, 2003; Bosilevac *i sar.*, 2004b; Bosilevac *i sar.*, 2005a, b; Small *i sar.*, 2005; Arthur *i sar.*, 2007; McCleery *i sar.*, 2007; Carlson *i sar.*, 2008a, b). Sveukupno, postignuta mikrobna redukcija u praktičnim uslovima na klanici bila je relativno ograničena: 2-3 log cfu/cm² na dekontaminiranoj koži goveda ili oko 1 log cfu/cm² na korespondentnim trupovima nakon obrade. Ako se ima u vidu da je koža goveda redovno kontaminirana sa nivoima ukupne mikroflore i preko 10 log cfu/cm², kao i da su bakterije ravnomerno raspoređene u svim slojevima dlake (Antic *i sar.*, 2010a), dalje poboljšanje efikasnosti baktericidnih tretmana kože je verovatno nemoguće postići.

Važno je imati u vidu da je kao osnovni princip i uslov za smanjenje kontaminacije trupa poreklom sa kože, dovoljno spriječiti odvajanje bakterija sa dlake kože i njihov prenos na meso trupova - inaktivacija (ubijanje) bakterija na koži nije neophodno. Na osnovu toga je nedavno predložen novi, alternativni pristup poboljšanju efikasnosti antimikrobnih tretmana kože u cilju redukcije mikrobnog prenosa sa kože na trupove: tretman kože šelakom, prirodnom jestivom smolom za imobilizaciju bakterija na koži (Antic *i sar.*, 2010b). U toj studiji, utvrđena je veoma značajna redukcija prenosa ukupne mikroflore (TVC, *Enterobacteriaceae*) sa čiste i

suve kože na briseve za uzorkovanje (čak do 6,6 log cfu/cm²), a prevalence *E. coli* O157 do 3,7 puta nakon tretmana kože prskanjem rastvorom šelaka u etanolu, u odnosu na netretirane kože. Utvrđeni antimikrobni efekat je primarno bio posledica imobilišućeg efekta samog šelaka, a znatno manjim delom usled baktericidnog delovanja rastvarača (etanola).

Međutim, do danas nema objavljenih studija o krajnjim efektima antimikrobnog tretmana immobilizacije mikroflore na koži (šelakom) na prenos bakterija sa kože na meso. Iz tog razloga, glavni cilj sadašnje studije bio je da se oceni efikasnost tretmana kože šelakom u redukciji prenosa bakterija sa kože na meso goveda putem direktnog kontakta (na laboratorijskom modelu) i tokom rutinske prakse klanja i obrade trupova goveda (u komercijalnoj klanici).

3. Materijal i metode

3.1. Ocena efekata antimikrobnog tretmana kože rastvorom šelaka u prenosu mikroflore sa kože na meso na laboratorijskom modelu

3.1.1. Priprema uzoraka kože

Čistoća kože goveda je u jednoj komercijalnoj klanici bila vizuelno ocenjena primenom 1-5 numeričkog bodovnog sistema koji se koristi u UK (Meat Hygiene Service's "Clean Livestock Policy" sistem). Prema ovom sistemu, kategorija 1 kože se definiše kao čista i suva koža; kategorija 2 kao neznatno prljava, suva ili vlažna, slabo kontaminirana prljavštinom ili fecesom; kategorija 3 kao prljava, suva ili vlažna, značajno kontaminirana prljavštinom ili fecesom; kategorija 4 kao jako prljava, suva ili vlažna, sa raširenom prljavštinom ili fecesom; i kategorija 5 kao najprljavija i mokra, sa veoma raširenom mokrom prljavštinom i fecesom. Za potrebe ove studije, odabrane su 1, 3 i 5 kategorija kože, u cilju što jasnije razlike između komada kože u pogledu njihove vizuelne čistoće ([slika 19](#)). Parni komadi kože (površine 40x30 cm) su isecani sa koža odmah nakon njihovog skidanja sa zaklanih goveda, upakovani u

kese i transportovani u laboratoriju u roku od 2 h. U okviru svakog para, dva komada kože su uzeta sa tačno suprotnih strana kože (sa leve i desne strane životinje), sa ciljem da njihove karakteristike budu što je sličnije moguće (osobine dlake, čistoća i nivo mikroflore). U cilju izjednačavanja nivoa mikroflore između parnih komada kože, jedan komad je postavljen preko drugog (dlaka na dlaku) i tako držan u trajanju od 30 minuta. Nakon njihovog razdvajanja, jedan od dva komada kože je podvrgnut tretmanu rastvorom šelaka u etanolu („tretman“) ili ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem („komparativni tretman“), kao što je opisano kasnije, dok drugi komad kože nije bio tretiran („netretirana kontrola“).



Slika 19. Kože goveda različite kategorije čistoće

Kategorija 1 - čista i suva koža (levo); Kategorija 3 - prljava, suva ili vlažna, značajno kontaminirana prljavštinom ili fecesom (u sredini); Kategorija 5 - veoma prljava i mokra, sa veoma raširenom mokrom prljavštinom i fecesom (desno)

3.1.2. Tretman uzoraka kože rastvorom šelaka („tretman“) na laboratorijskom modelu

Šelak (Zinsser Co. Inc., USA) je prirodna smola, proizvod insekata, dozvoljen za korišćenje u industriji hrane u EU i SAD kao aditiv, gde se upotrebljava kao glazirajuće sredstvo (na primer, za konditorske proizvode i voće). Komadi kože su tretirani rastvorom šelaka u etanolu (23% u apsolutnom 99,09% etanolu) kao u prethodnoj studiji ([Antic i sar., 2010b](#)). Tretiranje koža je vršeno ravnomernim

prskanjem ručnom prskalicom (Bosch, PFS 55) sa rastojanja od 20 cm, u trajanju od 1 minut. Nakon tretmana, komadi kože su ostavljeni da se osuše na vazduhu, na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta, pre njihove upotrebe u laboratorijskom modelu za prenos mikroflore sa kože na meso (opisano kasnije).

3.1.3. Tretman uzoraka kože ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem („komparativni tretman“) na laboratorijskom modelu

U cilju ocene ukupnog efekta tretmana kože šelakom (zasnovanog na mikrobnoj imobilizaciji), ne samo kroz poređenje sa netretiranim kontrolnim komadima kože, već i kroz poređenje sa efektima „komparativnog tretmana“ (zasnovanog na ubijanju i uklanjanju bakterija), pojedini komadi kože su podvrgnuti tretmanu dekontaminacije sanitajzerom, metodom ispiranja i vakumiranja. U ranijim istraživanjima je utvrđeno da je ovaj dekontaminacioni tretman jedan od najefikasnijih među tretmanima dekontaminacije kože ([Small i sar., 2005](#)) i zbog toga je bio deo i prethodne studije ([Antic i sar., 2010b](#)). Sanitajzer je bio preparat na bazi kvaternernih amonijumovih jedinjenja, površinski dezinficijens (Fink-Antisept G, FINKTEC GmbH). Na osnovu uputstva proizvođača, preparat je rastvoren u toploj vodi (50°C), a zatim njime napunjen usisivač za čišćenje dubinskom ekstrakcijom, sa ispiranjem i vakumiranjem (Puzzi 200, Karcher). Komadi kože su tretirani usisivačem na takav način da je rastvor sanitajzera ravnomerno aplikovan u pravcu rasta dlake i istovremeno usisavan, u trajanju od 1 minut, a zatim su tretirani komadi kože ostavljeni da se osuše na vazduhu, na sobnoj temperaturi u trajanju od 3 min., pre njihove upotrebe u laboratorijskom modelu za prenos mikroflore sa kože na meso.

3.1.4. Laboratorijski model za prenos mikroflore sa kože na meso

Laboratorijski model je bio zasnovan na kontrolisanom direktnom kontaktu između kože i mesa, kao što je opisano u našoj prethodnoj studiji ([Antic i sar., 2010a](#)). Veliki komad mesa sa plećke goveda je u laboratoriji isečen na nekoliko manjih komada mesa i površina svakog od njih sterilisana potapanjem u lonac sa ključalom vodom u trajanju od nekoliko sekundi (dok se crvena površina mesa nije promenila u sivu). Nakon toga, sa ovako sterilisanog mesa su aseptično isecani četvrtasti odresci (10 cm x 10 cm x 1 cm), a sterilnost mesa je proveravana

mikrobiološkim ispitivanjem nekoliko odrezaka mesa. Svaki sterilni odrezak mesa je aseptično stavljan na prethodno sterilisanu plastičnu radnu površinu, a preko njega komad kože sličnog oblika (netretiran ili tretiran), sa dlakom okrenutom prema mesu. Nakon kontakta u trajanju od 2-3 sekunde, komadi kože i mesa su aseptično razdvajani, a zatim su odresci mesa stavljeni u stomaher kese (19x30 cm; Nasco, Whirl-pak, USA) i mikrobiološki ispitivani (opisano kasnije). Na ovaj način su ispitane kombinacije tri različite kategorije čistoće kože (1, 3 i 5 kategorija) i dva antimikrobna tretmana kože (tretman sa šelakom i „komparativni tretman“ ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem), kao i korespondentni netretirani kontrolni komadi kože (sveukupno po šest ponavljanja za svaku kombinaciju i korespondentne kontrole).

3.1.5. Homogenizacija uzorka mesa

Svaki komad mesa je stavljen u posebnu stomaher kesu u koju je zatim dodato 100 ml sterilnog MRD (Maximum Recovery Diluent; Oxoid, Hampshire, England, UK), a potom su kese spolja ručno masirane u trajanju od 1 min. da se dobiju homogenati. Iz svake kese je zatim uzet po 1 ml homogenata i pripremljene su serije decimalnih razređenja u MRD (ISO metoda 6887-1:1999).

3.1.6. Utvrđivanje ukupnog broja bakterija (TVC), broja *Enterobacteriaceae* (EC) i generičke *E. coli* (GEC) iz uzorka mesa

Za utvrđivanje ukupnog broja bakterija (TVC), iz odgovarajućih razređenja napravljenih od homogenata svakog uzorka mesa je uziman po 1 ml razređenja i pipetom prenet na Petrifilmove za utvrđivanje TVC (Petrifilm Aerobic Count Plate, 3M Health Care, St. Paul, USA). Nakon toga su Petrifilmovi inkubirani na 30°C u toku 72 h, a zatim su sve izrasle kolonije izbrojane (AFNOR validovana metoda 3M 01/1-09/89).

Za utvrđivanje broja *Enterobacteriaceae* (EC), iz odgovarajućih razređenja napravljenih od homogenata svakog uzorka mesa je uziman po 1 ml razređenja i pipetom prenet na Petrifilmove za utvrđivanje EC (Petrifilm *Enterobacteriaceae* Count Plate, 3M Health Care, St. Paul, USA). Nakon toga su Petrifilmovi inkubirani na 37°C u toku 24 h, a zatim su sve izrasle tipične kolonije izbrojane (AFNOR validovana metoda 3M 01/06 09/97).

Za utvrđivanje broja generičke *E. coli* (GEC), iz odgovarajućih razređenja napravljenih od homogenata svakog uzorka mesa je uziman po 1 ml razređenja i pipetom prenet na Petrifilmove za utvrđivanje GEC (Petrifilm *E. coli*/Coliform Count Plate, 3M Health Care, St. Paul, USA). Nakon toga su Petrifilmovi inkubirani na 37°C u toku 48 h, a zatim su sve izrasle tipične kolonije izbrojane (NMKL metoda 147.1993 za *E. coli*).

3.2. Ocena efekata antimikrobnog tretmana kože rastvorom šelaka na mikrobiološki status trupova goveda na klanici

3.2.1. Odabir životinja za antimikrobni tretman na klanici

Ispitivanje antimikrobnog tretmana je vršeno tokom dva uzastopna dana u maloj komercijalnoj klanici na severu Srbije, sa kapacitetom klanja oko 40 goveda na dan. U to vreme, klanica nije imala propisno i potpuno razvijen, dokumentovan i implementiran sistem bezbednosti mesa (pisane radne procedure, GMP/GHP programe i HACCP plan za klanje i obradu goveda), uključujući i nepostojanje procedure klanja samo čistih životinja, tako da su vizuelno prljava goveda takođe bila redovno zaklana i obrađivana. Ova klanica je bila izabrana za istraživanje iz dva razloga: a) bilo je moguće ispitivanje antimikrobnih tretmana na životnjama sa relativno visokom kontaminacijom kože; i b) bilo je očekivano da se kontaminacija trupova sa kože redovno dešava u ovoj klanici. Oba ova aspekta su služila cilju istraživanja. Ukupno 57 goveda je nasumično izabrano za ispitivanje tretmana. Većina izabranih životinja su pre klanja ocenjene kao vizuelno prljave i svrstane ili u kategoriju 3 čistoće kože (prljave; suve ili vlažne, značajno kontaminirane prljavštinom ili fecesom) ili u kategoriju 4 (jako prljave; suva ili vlažna, sa raširenom prljavštinom ili fecesom) ([slika 20](#)). Tretmani kože šelakom ili sanitajzerom su primjenjeni u fazi nakon klanja i iskrvarenja goveda, a pre započinjanja operacije skidanja kože, na zaklanim govedima u visećem položaju zakačenim za kolosek. Zaklana goveda su tretirana naizmenično: prva životinja rastvorom šelaka, zatim sledeća ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem, dok naredna životinja nije bila tretirana (služila je kao kontrola); i tako dalje istim redosledom.



Slika 20. Goveda nakon klanja i iskrvarenja, a pre primene tretmana kože
Čistoća kože: kategorija 3 - prljava, suva ili vlažna, značajno kontaminirana
prljavštinom ili fecesom (levo); Kategorija 4 - jako prljava, suva ili vlažna, sa
raširenom prljavštinom i fecesom (desno)

3.2.2. Tretman koža goveda rastvorom šelaka („tretman“) na klanici

Kože ukupno 18 zaklanih goveda su bile ravnomerno tretirane prskanjem rastvorom šelaka u etanolu (23% u apsolutnom 99,09% etanolu), ručnom prskalicom (Bosch, PFS 55) sa rastojanja od oko 20 cm, u trajanju od 3 min. Tretman prskanjem je vršen na delovima kože duž linije gde se vrši njeni inicijalno zarezivanje tokom operacije skidanja, počev od skočnog zgloba (obe zadnje noge), preko buta - perianalne regije - potrbušine i abdomena, do grudi ([slika 21](#)). Nakon tretmana, kože tretirane šelakom su ostavljene da se osuše na vazduhu oko 5 minuta, pre započinjanja operacije skidanja sa trupa ([slika 22](#)). Ukupno potrebno vreme za tretman i sušenje koža od oko 8 minuta nije predstavljalo problem za ispunjavanje regulatornih zahteva da se obrada trupa mora završiti za 45 minuta nakon klanja.



Slika 21. Tretman koža goveda prskanjem rastvorom šelaka u etanolu, nakon omamljivanja i klanja, a pre skidanja kože na klanici



Slika 22. Kože goveda nakon tretmana šelakom na klanici

3.2.3. Tretman koža goveda ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem („komparativni tretman“) na klanici

Kože ukupno 18 zaklanih goveda su bile tretirane ispiranjem rastvorom sanitajzera, komercijalno dostupnim preparatom na bazi kvaternernih amonijumovih jedinjenja (Fink-Antisept G, FINKTEC GmbH) i istovremenim vakumiranjem. Na osnovu uputstva proizvođača, preparat je rastvoren u toploj vodi (50°C), a zatim njime napunjen usisivač za čišćenje dubinskom ekstrakcijom, sa ispiranjem i vakumiranjem (Puzzi 200, Karcher). Tretman sanitajzerom je vršen na delovima kože duž linije gde se vrši njenо inicijalno zarezivanje tokom operacije skidanja (identično kao kod tretmana šelakom), a ceo tretman ispiranjem sanitajzerom i istovremenim vakumiranjem je trajao oko 3 minuta ([slika 23](#)). Nakon tretmana, kože su ostavljene da se osuše na vazduhu dodatna 3 minuta, pre započinjanja operacije skidanja sa trupa ([slika 24](#)). Ukupno potrebno vreme za tretman i sušenje koža od oko 6 minuta nije predstavljalo problem za ispunjavanje regulatornih zahteva da se obrada trupa mora završiti za 45 minuta nakon klanja.



Slika 23. Tretman koža goveda ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem, nakon omamljivanja i klanja, a pre skidanja kože na klanici



Slika 24. Kože goveda pre (levo) i nakon tretmana ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem (desno) na klanici

3.2.4. Mikrobiološko uzorkovanje mesa trupova goveda na klanici

Odmah nakon skidanja kože, vršeno je mikrobiološko uzorkovanje brisevima površine mesa trupova čija je koža prethodno bila tretirana rastvorom šelaka ili sanitajzerom, kao i netretiranih goveda. Uzorkovanje brisevima je vršeno ravnim celuloznim sunđerima za pranje (površine 10 x 10cm, 2 cm debline) koji ne sadrže antimikrobne agense i prethodno su u laboratoriji bili izloženi UV zracima u trajanju od 15 minuta, a zatim aseptično upakovani u aluminijumsku foliju ([Antic i sar., 2010a](#)). Neposredno pre upotrebe, svaki sunđer je bio nakvašen sa 10 ml sterilnog MRD i njime uzorkovana ukupna površina svakog trupa oko 2000 cm^2 , jednim neprekidnim povlačenjem rukom od spoljašnje strane buta, preko perianalne regije - unutrašnje strane buta - potrbušine, do grudi ([slika 25](#)). U cilju sprečavanja unakrsne kontaminacije između uzoraka, za svaki uzorak su korišćene nove latex rukavice. Svaki uzorak je stavljen u posebnu stomaher kesu i transportovan u ručnom frižideru do laboratorije u roku od 2-3 h.



Slika 25. Uzorkovanje površine trupa metodom vlažnog brisa sunđerom (spoljašnja strana buta-perianalna regija-unutrašnja strana buta-potrbušina-grudi)

3.2.5. Mikrobiološko ispitivanje uzorka brisa trupova u laboratoriji

U svaku stomaher kesu sa sunđerom je dodato po 90 ml sterilnog MRD, a potom su kese spolja ručno masirane u trajanju od 1 min. da se dobiju homogenati. Iz svake kese je zatim uzet po 1 ml homogenata i pripremljene su serije decimalnih razređenja u MRD (ISO metoda 6887-1:1999). Nakon toga, iz odgovarajućih razređenja napravljenih od homogenata svakog uzorka je uziman po 1 ml razređenja i pipetom prenet na Petrifilmove za utvrđivanje ukupnog broja bakterija (TVC), broja *Enterobacteriaceae* (EC) i generičke *E. coli* (GEC), korišćenjem istih mikrobioloških metoda kao u eksperimentu na laboratorijskom modelu (u potpoglavlju 3.1.6).

3.3. Analiza rezultata

Za svaku grupu bakterija (TVC, EC i GEC) i za svaki uzorak mesa ili brisa sa trupa goveda, prvo je izračunavan broj izraslih kolonija, odnosno bakterija po cm^2 (cfu/cm^2), a zatim je svaka vrednost konvertovana u logaritme ($\log_{10} \text{cfu}/\text{cm}^2$). Nakon toga je korišćenjem statističkog programa Statgraphics 5.0 (Statistical Graphics Corporation, USA) u okviru softverskog paketa Microsoft Excel, za svaku grupu uzorka izračunata aritmetička sredina logaritama i njihova standardna devijacija, a zatim i statistička značajnost razlika između srednjih vrednosti pomoću Studentovog T-testa, za nivo značajnosti od 95% ($p<0,05$).

Efikasnost antimikrobnih tretmana rastvorom šelaka i ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem u redukciji prenosa bakterija sa kože na meso (izražena kao postignuta mikrobna redukcija), bila je ocenjivana na sledeći način:

- a) u eksperimentu zasnovanom na laboratorijskom modelu - kroz razlike u nivoima bakterija utvrđenim između sterilnih komada mesa nakon njihovog prethodnog kontakta sa tretiranim ili netretiranim komadima kože; i
- b) u eksperimentu u klanici - kroz razlike u nivoima bakterija utvrđenim na trupovima nakon skidanja kože između prethodno tretiranih i onih kojima koža nije bila tretirana.

4. Rezultati i diskusija

Novi antimikrobnii tretman kože goveda rastvorom šelaka u etanolu je opisan u našoj prethodnoj studiji kao veoma efikasan u imobilizaciji bakterija na koži, na taj način značajno redukujući prenos bakterija, što je mereno utvrđivanjem nivoa bakterija u brisevima sa tretiranih koža (Antic i sar., 2010b). U sadašnjoj studiji, tretman kože šelakom je dalje ocenjivan: a) na laboratorijskom modelu, u cilju ocene da li, i u kom stepenu tretman ima potencijal za redukciju prenosa mikroflore sa kože na meso goveda nakon njihovog direktnog međusobnog kontakta; i b) na komercijalnoj klanici, u cilju ocene njegovog potencijala da poboljša mikrobiološki status trupova u realnim uslovima. U oba slučaja, da bi se dobila neka opšta ideja komparativne vrednosti novog tretmana šelakom (zasnovanom na imobilizaciji bakterija na dlaci kože) u kontekstu drugih antimikrobnih tretmana kože, u celoj sadašnjoj studiji je vršeno upoređivanje tretmana kože šelakom sa „komparativnim“ tretmanom ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem (zasnovanom na ubijanju i/ili uklanjanju bakterija sa kože) za koji je ranije utvrđeno da je jedan od najefikasnijih antimikrobnih tretmana kože goveda (Small i sar., 2005; Antic i sar., 2010b).

4.1. Ocena efekata antimikrobnog tretmana kože rastvorom šelaka u prenosu mikroflore sa kože na meso na laboratorijskom modelu

Na laboratorijskom modelu, nakon tretmana šelakom koža različitih kategorija čistoće i njihovog naknadnog kontakta sa sterilnim mesom goveda, ukupan broj bakterija (TVC), broj *Enterobacteriaceae* (EC) i generičke *E. coli* (GEC) na mesu, bio je u svim slučajevima značajno redukovani u odnosu na nivo na mesu nakon kontakta sa netretiranom kožom - redukcije su iznosile od $2,3\text{-}3,6 \log_{10}$ cfu/cm², 1,0-2,5 log₁₀ cfu/cm² i 1,0-1,7 log₁₀ cfu/cm² za svaku grupu bakterija (tabela 6.1). Takođe, nakon tretmana koža sanitajzerom i njihovog naknadnog kontakta sa sterilnim mesom, TVC, EC i GEC na mesu bio je značajno redukovani u odnosu na nivo na mesu nakon kontakta sa netretiranom kožom - redukcije su iznosile 0,2-2,2

\log_{10} cfu/cm², 1,5-2,2 \log_{10} cfu/cm² i 1,5-1,7 \log_{10} cfu/cm², za svaku grupu bakterija ([tabela 6.1](#)).

Kada se izvrši poređenje antimikrobne efikasnosti tretmana šelakom i tretmana sanitajzerom u redukciji prenosa bakterija sa kože na meso, primećuje se da je efikasnost u redukciji TVC na mesu postignuta tretmanom šelakom bila značajno bolja (>2 log; p<0.0001) u odnosu na redukciju na mesu postignutu tretmanom sanitajzerom, u slučajevima kada je koža bila kategorije čistoće 1 (čista i suva) i 3 (prljava i suva), ali ne i u slučaju kategorije 5 (prljava i mokra). Može se pretpostaviti da je odsustvo značajno boljeg efekta tretmana šelakom u odnosu na tretman sanitajzerom u slučaju kategorije 5 kože, bilo posledica mnogo boljeg učinka tretmana ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem kože sa mokrom i raskvašenom prljavštinom u poređenju sa učinkom sanitajzera kada se na kožama nalazila čvrsta i suva prljavština. U prethodnom slučaju, fizičko uklanjanje prljavštine ispiranjem i vakumiranjem bilo je znatno efikasnije. Sa druge strane, suprotno efektu u redukciji TVC, tretman kože šelakom nije imao značajnije boljeg efekta u redukciji prenosa EC i GEC na meso goveda u odnosu na tretman kože sanitajzerom ([tabela 6.1](#)).

Nema jasnog objašnjenja ove pojave različitog efekta dva antimikrobna tretmana kože u redukciji TVC sa jedne i EC i GEC na mesu, sa druge strane. Veći broj faktora može imati uticaja, uključujući: a) nivoi TVC, kako na koži, tako i na mesu, bili su neuporedivo viši nego nivoi EC i GEC i moguće je da se stepen prenosa ovih bakterija sa kože na meso između dva tretmana više razlikovao u slučaju viših nivoa kontaminacije kože (TVC) nego kada je taj nivo bio znatno niži (EC i GEC); i/ili b) moguće je da se TVC i enterične bakterije (EC i GEC) ponašaju potpuno drugačije kada su podvrgnute potpuno različitim mehanizmima delovanja dva antimikrobna tretmana kože. U našoj prethodnoj studiji ([Antic i sar., 2010b](#)), takođe je utvrđeno da je prenos TVC sa koža tretiranih šelakom na briseve za uzorkovanje bio znatno više redukovan u odnosu na prenos EC i GEC, ali razlog za ovo takođe nije utvrđen. Sveukupno, u literaturi nema informacija koji i kakvi mehanizmi imaju uticaja na različitu efikasnost tretmana kože šelakom ili sanitajzerom u redukciji TVC u odnosu na EC i GEC, pa su stoga dalja istraživanja neophodna.

Tabela 6.1. Efekat antimikrobnih tretmana kože šelakom i sanitajzerom u redukciji prenosa bakterija sa kože na meso na laboratorijskom modelu

Kategorija čistoće kože	Tretman kože	Mikroorganizmi preneti sa kože na sterilno goveđe meso putem direktnog kontakta									
		Ukupan broj bakterija (TVC) (log ₁₀ cfu/cm ²) ^a		Broj <i>Enterobacteriaceae</i> (EC) (log ₁₀ cfu/cm ²) ^a		Broj generičke <i>E. coli</i> (GEC) (log ₁₀ cfu/cm ²) ^a					
		Na mesu nakon kontakta sa netret. kožom	Na mesu nakon kontakta sa tret. kožom	Na mesu Mikroba redukcija na mesu sa netret. kožom	Na mesu nakon kontakta sa netret. kožom	Na mesu Mikroba redukcija na mesu sa netret. kožom	Na mesu nakon kontakta sa netret. kožom	Na mesu nakon kontakta sa tret. kožom	Na mesu nakon kontakta sa netret. kožom	Na mesu nakon kontakta sa tret. kožom	Na mesu nakon kontakta sa tret. kožom
Kat. 1 (čista i suva)	Rastvor šelaka	5,3±0,6	3,0±0,4	-2,3±0,6 ^B	2,9±0,3	1,9±0,2	-1,0±0,4 ^A	2,0±0,6	1,0±0,8	-1,0±0,6 ^A	
	Sanit. AntiseptG	5,2±1,1	5,0±0,4	-0,2±0,8 ^A	3,7±0,8	1,7±0,4	-1,9±0,8 ^B	2,2±0,9	0,7±0,7	-1,5±1,0 ^A	
Kat. 3 (prljava i suva)	Rastvor šelaka	6,1±0,7	2,6±0,6	-3,6±1,1 ^B	3,9±0,9	1,4±0,5	-2,5±0,7 ^B	2,1±0,6	0,4±0,5	-1,7±0,4 ^A	
	Sanit. AntiseptG	5,9±0,2	5,2±0,3	-0,7±0,5 ^A	4,1±0,5	2,7±0,5	-1,5±0,9 ^A	2,7±0,4	1,3±0,8	-1,5±1,0 ^A	
Kat. 5 (prljava i mokra)	Rastvor šelaka	7,3±0,5	4,8±0,9	-2,6±1,2 ^A	4,8±0,2	2,3±0,7	-2,5±0,7 ^A	2,9±0,4	1,6±0,6	-1,3±0,5 ^A	
	Sanit. AntiseptG	7,4±0,3	5,1±0,7	-2,2±0,7 ^A	4,7±0,3	2,5±0,6	-2,2±0,5 ^A	2,9±0,2	1,2±1,1	-1,7±1,0 ^A	

^a Srednja vrednost ± standardna devijacija (svaka vrednost zasnovana na 6 ponavljanja).

A, B: U okviru svake kategorije kože i grupe bakterija, mikrobne redukcije označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju; A<B ($P<0,05$).

4.2. Ocena efekata antimikrobnog tretmana kože rastvorom šelaka na mikrobiološki status trupova goveda na klanici

U eksperimentima na klanici, nakon tretmana šelakom koža zaklanih goveda (pre operacije skidanja kože), ukupan broj bakterija (TVC), broj *Enterobacteriaceae* (EC) i generičke *E. coli* (GEC) na mesu korespondentnih trupova (nakon skidanja kože), bio je u svim slučajevima značajno redukovani u odnosu na nivo na mesu kontrolnih trupova goveda (čija koža nije bila tretirana) - redukcije su iznosile $1,7 \text{ log}_{10} \text{ cfu/cm}^2$, $1,4 \text{ log}_{10} \text{ cfu/cm}^2$ i $1,3 \text{ log}_{10} \text{ cfu/cm}^2$ za svaku grupu bakterija (tabela 6.2). Do danas, nisu postojale objavljene studije o tretmanu kože goveda šelakom u realnim uslovima na klanici. Takođe, nakon tretmana koža sanitajzerom, pre operacije skidanja, TVC, EC i GEC na mesu korespondentnih trupova bio je značajno redukovani u odnosu na nivo na mesu kontrolnih trupova goveda (čija koža nije bila tretirana) - redukcije su iznosile $1,0 \text{ log}_{10} \text{ cfu/cm}^2$, $1,3 \text{ log}_{10} \text{ cfu/cm}^2$ i $1,2 \text{ log}_{10} \text{ cfu/cm}^2$, za svaku grupu bakterija (tabela 6.2). U pogledu redukcije nivoa TVC na

mesu trupova, tretman kože šelakom pokazao je znatno veću efikasnost u odnosu na tretman ispiranja kože sanitajzerom i vakumiranja. Međutim, u pogledu redukcije nivoa EC i GEC na mesu trupova, tretman šelakom je pokazao izvesnu, ali ne i statistički značajno veću efikasnost u odnosu na tretman sanitajzerom.

Tabela 6.2. Efekat antimikrobnih tretmana kože šelakom i sanitajzerom u redukciji nivoa bakterija na mesu trupova nakon skidanja kože u maloj komercijalnoj klanici

Tretmani kože zaklanih goveda pre operacije skidanja kože	Parametri	Mikroorganizmi na trupovima nakon skidanja kože (\log_{10} cfu/cm ²) ^a		
		Ukupan broj bakterija (TVC)	Broj <i>Enterobacteriaceae</i> (EC)	Broj generičke <i>E. coli</i> (GEC)
Netretirane kože (kontrola; n=21)	Nivo bakterija na kontrolnim trupovima	4,9 ± 0,8 ^A	0,8 ± 0,7 ^A	0,7 ± 0,8 ^A
Kože tretirane rastvorom šelaka (n=18)	Nivo bakterija na trupovima	3,2 ± 0,7 ^C	-0,6 ± 1,1 ^B	-0,6 ± 1,0 ^B
	Redukcije ^b	-1,7 ^E	-1,4 ^D	-1,3 ^D
Kože tretirane sanitajzerom Antisept G (n=18)	Nivo bakterija na trupovima	3,9 ± 1,1 ^B	-0,5 ± 1,0 ^B	-0,5 ± 1,1 ^B
	Redukcije ^b	-1,0 ^D	-1,3 ^D	-1,2 ^D

^a Srednja vrednost ± standardna devijacija

^b Razlike u nivoima bakterija utvrđenim na trupovima nakon skidanja kože između prethodno tretiranih i onih kojima koža nije bila tretirana (kontrolnih trupova)

n Broj ispitanih životinja

A, B, C, D, E: U okviru iste kolone i mikroorganizama, vrednosti označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju; C<B<A, D<E (P<0,05)

Kože goveda ispitivanih u ovoj studiji bile su vizuelno ocenjene kao prljave, a najveći broj njih pripadao je kategoriji 3 (prljave, uglavnom suve) i kategoriji 4 (prljave i vlažne). Slično kao i u eksperimentu na modelu u laboratoriji, utvrđena je razlika u efikasnosti tretmana između prljavih koža kategorije 3 i 4 (odnosno, kategorija 3 i 5 u laboratorijskom modelu), ali ona nije bila značajna i jasno određena u svim slučajevima (tabele 6.1 i 6.3). Međutim, u našoj prethodnoj studiji (Antic i sar., 2010b), kao i u ovoj na laboratorijskom modelu (tabela 6.1), utvrđeno je da je u slučajevima čiste i suve kože (kategorija 1), tretman šelakom znatno efikasniji u redukciji prenosa bakterija sa kože u odnosu na tretman sanitajzerom, dok ta efikasnost nije bila tako velika u slučaju prljave i mokre kože (kategorije 5) u odnosu na tretman sanitajzerom (tabela 6.1). Takođe, tretman šelakom je pokazao veću efikasnost kada se izvrši poređenje postignute redukcije na suvoj (kategorija 3) i vlažnoj ili mokroj koži (kategorija 4 i 5) (tabele 6.1 i 6.3). Ovi rezultati ukazuju da je

za postizanje najveće efikasnosti tretmana šelakom, neophodno da koža bude suva (i poželjno čista) pre tretiranja. Sa druge strane, ova klanica je izabrana za ispitivanje tretmana šelakom u cilju dobijanja informacija koliko je ovaj tretman efikasan (ili nije efikasan) u lošim uslovima (prljave kože i neadekvatna procesna higijena), pa je iz tog razloga nivo mikrobiološke kontaminacije na najvećem broju kontrolnih (netretiranih) trupova nakon skidanja kože bio u neprihvatljivom opsegu ($>5 \text{ log}/\text{cm}^2$) prema trenutnim EU mikrobiološkim kriterijumima. Međutim, primena tretmana kože šelakom je imala za rezultat smanjenje mikrobiološke kontaminacije trupova sa kože na prihvatljiv do marginalni nivo, što ukazuje na njegovu praktičnu vrednost čak i u slučaju loših higijenskih uslova u klanici (tabele 6.2 i 6.3).

Tabela 6.3. Efekat antimikrobnih tretmana kože (različitih kategorija čistoće) šelakom i sanitajzerom u redukciji nivoa bakterija na mesu trupova nakon skidanja kože u maloj komercijalnoj klanici

Tretmani i kategorije kože zaklanih goveda	Parametri	Mikroorganizmi na trupovima nakon skidanja kože ($\log_{10} \text{ cfu}/\text{cm}^2$) ^a		
		Ukupan broj bakterija (TVC)	Broj <i>Enterobacteriaceae</i> (EC)	Broj generičke <i>E. coli</i> (GEC)
Netretirane kože kategorije 3 (kontrola; n=7)	Nivo bakterija na kontrolnim trupovima	$5,1 \pm 0,7^{\text{A}}$	$1,1 \pm 0,6^{\text{A}}$	$1,1 \pm 0,7^{\text{A}}$
	Redukcije ^b	-2,1 ^E	-1,7 ^D	-1,7 ^D
Kože kategorije 3 tretirane rastvorom šelaka (n=9)	Nivo bakterija na trupovima	$2,9 \pm 0,6^{\text{C}}$	$-0,5 \pm 1,2^{\text{B}}$	$-0,6 \pm 1,1^{\text{B}}$
	Redukcije ^b	-2,1 ^E	-1,7 ^D	-1,7 ^D
Kože kategorije 3 tretirane sanitajzerom Antisept G (n=9)	Nivo bakterija na trupovima	$3,8 \pm 1,0^{\text{B}}$	$-0,5 \pm 1,1^{\text{B}}$	$-0,3 \pm 1,3^{\text{B}}$
	Redukcije ^b	-1,2 ^D	-1,6 ^D	-1,4 ^D
Netretirane kože kategorije 4 (kontrola; n=9)	Nivo bakterija na kontrolnim trupovima	$5,0 \pm 1,1^{\text{B}}$	$0,7 \pm 0,8^{\text{A}}$	$0,5 \pm 0,9^{\text{A}}$
	Redukcije ^b	-1,5 ^E	-1,3 ^D	-1,1 ^D
Kože kategorije 4 tretirane rastvorom šelaka (n=8)	Nivo bakterija na trupovima	$3,5 \pm 0,7^{\text{A}}$	$-0,6 \pm 1,0^{\text{B}}$	$-0,6 \pm 0,9^{\text{B}}$
	Redukcije ^b	-1,5 ^E	-1,3 ^D	-1,1 ^D
Kože kategorije 4 tretirane sanitajzerom Antisept G (n=7)	Nivo bakterija na trupovima	$4,2 \pm 1,3^{\text{AB}}$	$-0,5 \pm 1,0^{\text{B}}$	$-0,7 \pm 0,9^{\text{B}}$
	Redukcije ^b	-0,8 ^D	-1,2 ^D	-1,2 ^D

^a Srednja vrednost \pm standardna devijacija

^b Razlike u nivoima bakterija utvrđenim na trupovima nakon skidanja kože između prethodno tretiranih i onih kojima koža nije bila tretirana (kontrolnih trupova)

n Broj ispitanih životinja

A, B, C, D, E: U okviru iste kolone i mikroorganizama, vrednosti označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju; C<B<A, D<E ($P<0,05$)

Mehanizam delovanja šelaka je zasnovan na „lepljenju“ bakterija na dlaci kože (što je mnogo efikasnije na suvoj nego na mokroj dlaci), a takođe je činjenica da za bilo koji stepen efikasnosti tretmana kože, njegov krajnji efekat (mikrobiološki status trupa) može biti bolji ukoliko je inicijalna kontaminacija kože niža. Stoga se može pretpostaviti da bi antimikrobni efekti tretmana kože šelakom u redukciji mikrobiološke kontaminacije trupa bili čak i bolji u uslovima bolje higijenske prakse i klanja čistih životinja. Zbog toga, tretman kože šelakom se ne sme i ne može smatrati zamenom za preduslovnu dobru higijensku praksu u operacijama klanja i obrade trupova na klanici, već samo njenim dodatkom. Pored toga, dalja istraživanja koja bi uključila veći broj klanica sa različitom tehnologijom i higijenskim uslovima su neophodna da bi se jasno definisala veza između efikasnosti tretmana kože šelakom i nivoa higijene operacija na klanici, uključujući i čistoću životinja.

U ovoj studiji nisu ispitivani efekti tretmana kože u redukciji bakterijskih patogena od posebne važnosti za bezbednost goveđeg mesa, kao što je *Escherichia coli* O157. Međutim, u našoj prethodnoj laboratorijskoj studiji ([Antic i sar., 2010b](#)) je utvrđeno da tretman kože šelakom može značajno redukovati prenos ovog patogena sa tretiranih koža, pa su stoga planirane dalje studije da se oceni efikasnost ovog tretmana kože i u redukciji prenosa bakterijskih patogena sa kože na meso trupova u uslovima na klanici.

5. Zaključni komentar

Sveukupno, ova studija je jasno pokazala da je antimikrobnii tretman imobilizacije mikroflore na koži primenom rastvora šelaka u etanolu veoma efikasan u redukciji prenosa bakterija sa kože na meso putem direktnog kontakta, a takođe i prenosa bakterija sa kože na meso trupova tokom operacije skidanja kože na liniji klanja. Generalno, tretmanom kože šelakom su postignute više redukcije TVC na mesu nego EC i GEC. Efikasnost novog tretmana kože šelakom u redukciji prenosa bakterija na meso (u laboratorijskim i uslovima na klanici) bila je značajno bolja od one utvrđene „komparativnim“ tretmanom dekontaminacije kože sanitajzerom u odnosu na TVC, ali ova razlika nije bila značajna u slučaju EC i GEC. Ova studija je prva i početna ocena novog antimikrobnog tretmana kože šelakom (zasnovanom na imobilizaciji mikroflore na koži), pod praktičnim uslovima u industriji mesa, odnosno ona predstavlja „dokaz koncepta“ i imala je ograničen obim i cilj. Zbog toga su za detaljniju ocenu ukupne efikasnosti strategije imobilizacije mikroflore na koži, u cilju poboljšanja mikrobiološke bezbednosti goveđeg mesa, kao i za tehničku optimizaciju i analizu koristi i troškova tretmana, neophodna dalja istraživanja.

Ukupna diskusija

1. Razvoj antimikrobnog tretmana imobilizacije mikroflore na koži goveda

Tokom razvoja novog antimikrobnog tretmana kože goveda šelakom, osnovna ideja je bila da je u ukupnoj strategiji antimikrobnih tretmana kože potreban potpuno novi pristup i ispitivanje novog načina i mehanizma njihovog antimikrobnog delovanja. U suštini, antimikrobni efekat svih tretmana kože se zasniva na jednom od tri osnovna mehanizma delovanja: a) fizičko uklanjanje bakterija sa kože (pranjem ili šišanjem); b) inaktivacija/ubijanje bakterija na koži, sa ili bez dodatnog fizičkog uklanjanja (primenom različitih ranije opisanih fizičkih i hemijskih tretmana kože); i c) imobilizacija bakterija na dlaci i površini kože. S obzirom da je u ranijim istraživanjima, u kojima su ispitivane prve dve strategije dekontaminacije kože postizan ograničen antimikrobni efekat tretmana, za koji bi se teško moglo očekivati da bude dalje unapređen, u ovom radu je po prvi put ispitana treća pomenuta strategija - mikrobna imobilizacija na dlaci i površini kože.

Osnovni cilj i rezultat mikrobne imobilizacije na dlaci kože goveda je sprečavanje odvajanja bakterija sa kože i njihov prenos na neku drugu površinu. Zbog toga je antimikrobna efikasnost ove strategije, odnosno tretmana kože rastvorom šelaka u etanolu, ispitivana na dva načina: a) kroz redukciju prenosa bakterija sa kože na briseve za uzorkovanje; i b) kroz redukciju prenosa bakterija sa kože na meso goveda (komade mesa i trupove). Takođe, tretman je ispitivan u laboratorijskim uslovima (simulacijom realnih uslova u klanici), a njegova efikasnost i praktična vrednost dokazana i u uslovima neadekvatne higijenske prakse na komercijalnoj klanici i primenom na vizuelno prljavim kožama goveda.

Kao glavno imobilišuće sredstvo, u ovom radu je ispitivan i ocenjen šelak, prirodna smola poreklom od insekata, koji je dozvoljen za upotrebu u hrani. S obzirom da se prirodni šelak najbolje rastvara u apsolutnom (99,09%) etanolu, koji je poznato baktericidno sredstvo, pored imobilišućeg mehanizma delovanja na bakterije, ovaj rastvor je jednim delom delovao i baktericidno. Međutim, utvrđeno je da je baktericidni efekat etanola u ukupnom antimikrobnom efektu rastvora šelaka bio daleko manje značajan od imobilišućeg efekta samog šelaka, u redukciji prenosa TVC sa kože na briseve - oko 3 log cfu/cm² redukcije postignute etanolom u ukupnoj

redukciji rastvora sa šelakom od preko 6 log cfu/cm². Ovo dokazuje da je primena strategije inaktivacije/ubijanja bakterija daleko manje efikasna u sprečavanju prenosa bakterija sa kože na briseve (ili na meso trupova) u odnosu na strategiju imobilizacije bakterija na koži. U suštini, jasno je da je osnovni princip i uslov za smanjenje kontaminacije trupa poreklom sa kože, sprečavanje odvajanje bakterija sa dlaka kože i njihov prenos na meso trupova - inaktivacija (ubijanje) bakterija na koži nije neophodno; takođe je nerealno očekivati eliminaciju kompletne mikroflore kože.

U cilju ocene ukupnog efekta tretmana kože šelakom i dobijanja direktnog uvida u njegovu vrednost u odnosu na baktericidne tretmane dekontaminacije kože, u većini eksperimenata je tretman šelakom upoređivan ne samo sa netretiranim kontrolnim komadima kože, već i sa tretmanom ispiranjem baktericidnim sanitajzerom i vakumiranjem (zasnovanom na ubijanju i uklanjanju bakterija). Tretman kože 23% rastvorom šelaka u etanolu redukovao je prenos ukupne mikroflore (TVC) na briseve za uzorkovanje za 6,6 log, a fekalne mikroflore (EC i GEC) za najmanje 4,8 log i 2,9 log. Ove redukcije su bile značajno bolje u odnosu na one postignute tretmanom kože ispiranjem sanitajzerom (Antisept G) i vakumiranjem (4,9 log, 3,4 log i 2,8 log za iste grupe bakterija). Ovi rezultati ukazuju da je antimikrobni tretman kože u kome su kombinovana dva mehanizma delovanja, inaktivacija (ubijanje) i imobilizacija bakterija na dlaci (tretman rastvorom šelaka u etanolu) bolji i efikasniji u odnosu na antimikrobni tretman dekontaminacije kože čiji je mehanizam delovanja inaktivacija bakterija i njihovo uklanjanje sa dlake (tretman ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem), u smislu redukcije prenosa ukupne mikroflore sa kože na briseve za uzorkovanje. Takođe, postignuta redukcija bila je ukupno bolja nego u istraživanjima drugih tretmana kože opisanih u literaturi.

Pregledan prikaz prosečne utvrđene antimikrobne efikasnosti svih dosad ispitivanih fizičkih ili hemijskih tretmana (grupisanih po tipu применjenih antimikrobnih sredstava), uključujući i tretman mikrobne imobilizacije na koži sa šelakom, prikazan je na [grafikonu 9](#). Na ovom grafikonu se može zapaziti značajno bolja efikasnost tretmana šelakom u redukciji prirodne mikroflore u odnosu na sve dosad ispitivane tretmane, čiji je mehanizam delovanja inaktivacija i/ili uklanjanje bakterija sa kože goveda. U pogledu veštački inokulisane mikroflore za potrebe pojedinih istraživanja tretmana, može se uočiti bolji efekat za 1-1,5 log u njenoj redukciji, što ukazuje da njeni korišćenje ne daje realnu ocenu antimikrobne efikasnosti tretmana. Kao što je napred navedeno, za razliku od drugih tretmana, tretman šelakom je nasuprot imao

značajno slabiji efekat u redukciji prenosa inokulisane mikroflore sa kože na briseve, što ukazuje da se njeno korišćenje u ovakvom tipu eksperimenata ne preporučuje.

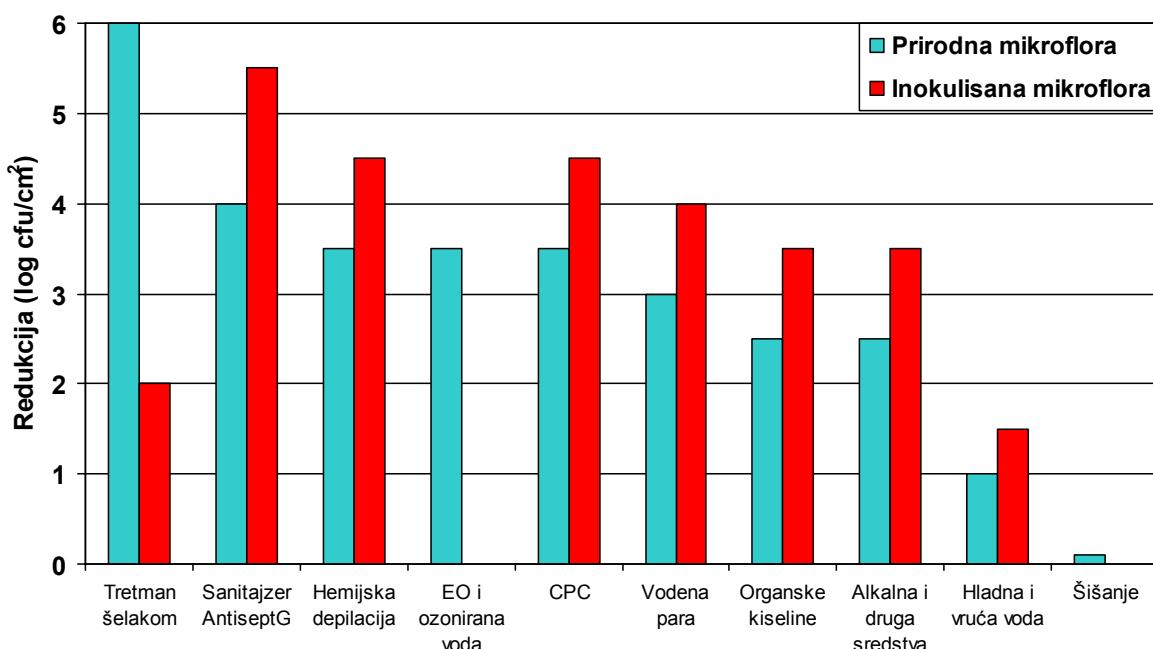
Za ispitivanje antimikrobne efikasnosti rastvora šelaka u etanolu, u ovom radu su korišćene bakterije indikatori kontaminacije, odnosno ukupna aerobna mikroflora (TVC) i indikatori fekalne kontaminacije (*Enterobacteriaceae* i generička *E. coli*) iz razloga njihovog stalnog prisustva na koži goveda, i u nivoima dovoljnim da se izvrši merenje njihove redukcije. Takođe, ispitivana je i efikasnost tretmana u redukciji alimentarnog patogena od najvećeg značaja za bezbednost goveđeg mesa - *E. coli* O157. Kao i u slučaju bakterija indikatora kontaminacije, tretman šelakom je pokazao visoku efikasnost od oko 73% redukcije *E. coli* O157 na koži od procenta prisustva u kontrolnim uzorcima (odnosno redukcija od oko 3,7 puta), što je znatno bolje nego u ostalim objavljenim istraživanjima kada je u pitanju efikasnost tretmana kože u odnosu na ovog patogena.

U laboratorijskom model sistemu, nakon tretmana šelakom koža različitih kategorija čistoće i njihovog naknadnog kontakta sa sterilnim mesom goveda, ukupan broj bakterija (TVC), broj *Enterobacteriaceae* (EC) i generičke *E. coli* (GEC) na mesu, bio je u svim slučajevima značajno redukovani u odnosu na nivoe na mesu nakon kontakta sa netretiranom kožom - redukcije su iznosile od 2,3-3,6 log cfu/cm², 1,0-2,5 log cfu/cm² i 1,0-1,7 log cfu/cm² za svaku grupu bakterija. Ovakav eksperimentalni pristup u laboratorijskom ispitivanju tretmana kože, iako najbolje simulira ono što se od tretmana očekuje i daje najrealniju ocenu njegove vrednosti i efikasnosti (na laboratorijskom nivou), dosad nije opisan u dostupnoj literaturi i po prvi put je korišćen u našem istraživanju.

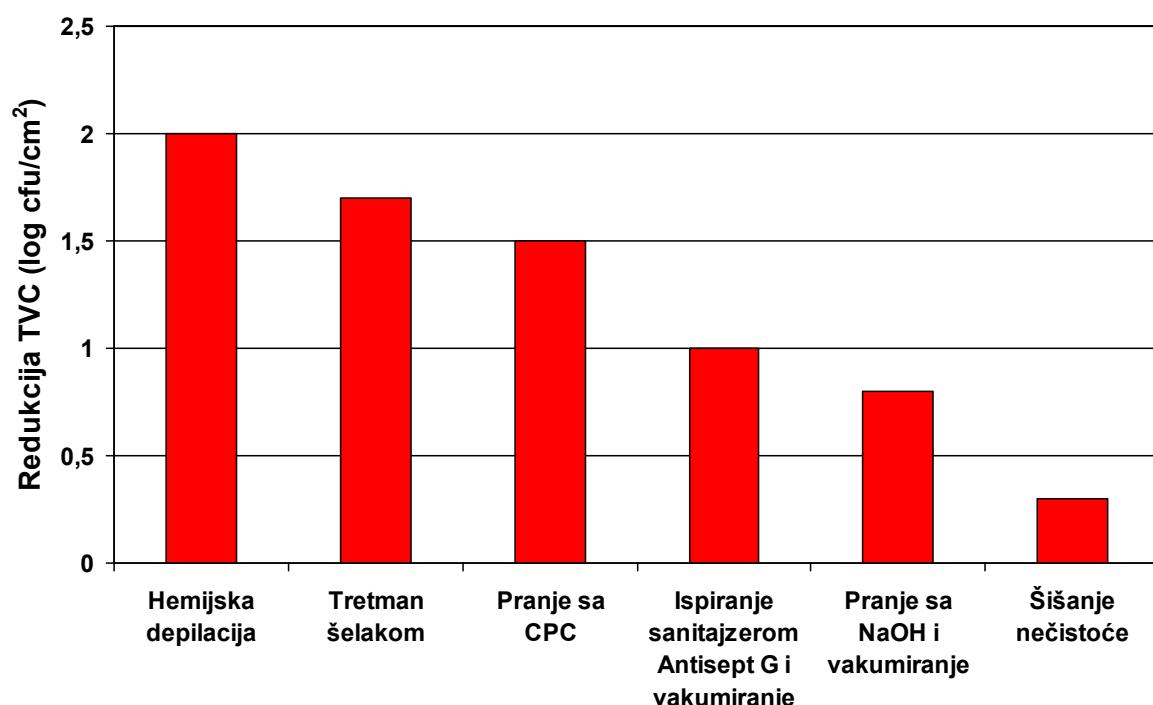
U cilju krajnje ocene tretmana kože šelakom u poboljšanju mikrobiološkog statusa trupova goveda, urađena je i njegova validacija u komercijalnoj klanici. Nakon tretmana koža goveda prskanjem rastvorom šelaka u fazi posle klanja i iskrvarenja, a pre skidanja kože, postignuta je visoka redukcija TVC, EC i GEC na trupovima nakon skidanja kože, od 1,7 log cfu/cm², 1,4 log cfu/cm² i 1,3 log cfu/cm² za svaku grupu bakterija, što je u slučaju TVC (ali ne i EC i GEC) bilo značajno bolje nego nakon tretmana koža ispiranjem sanitajzerom i vakumiranjem. S obzirom da je za potrebe ove studije izabrana klanica sa neadekvatnom higijenskom praksom i klanjem prljavih životinja, na osnovu rezultata iz laboratorijskih istraživanja se može prepostaviti da bi antimikrobni efekti tretmana kože šelakom u redukciji mikrobiološke kontaminacije trupova bili čak i bolji u uslovima bolje higijenske prakse

i klanja čistih životinja. Iako je i u ovakvim uslovima tretman kože šelakom postigao odlične rezultate, njegova upotreba se ne sme i ne može smatrati zamenom za preduslovnu dobru higijensku praksu u operacijama klanja i obrade trupova na klanici, već samo njenim dodatkom. Takođe, kada se efikasnost tretmana šelakom u redukciji mikrobiološke kontaminacije mesa trupova sa kože uporedi sa nekoliko drugih antimikrobnih tretmana kože goveda ispitivanih u realnim uslovima na klanici, primećuje se da je tretman šelakom efikasniji u redukciji ukupne mikroflore u odnosu na većinu dosad ispitivanih tretmana, od kojih su neki u redovnoj upotrebi u klanicama u SAD i drugim zemljama ([grafikon 10](#)).

Sveukupno, može se reći da je glavni rezultat i dostignuće ovog rada potpuno novi i efikasan antimikrobni tretman kože goveda zasnovan na novoj strategiji u antimikrobnim tretmanima kože, odnosno mikrobnoj imobilizaciji na koži goveda, koji značajno poboljšava mikrobiološku bezbednost goveđeg mesa.



Grafikon 7. Poređenje prosečne utvrđene efikasnosti antimikrobnih tretmana kože goveda u redukciji njene prirodne i inokulisane mikroflore



Grafikon 8. Poređenje efikasnosti antimikrobnih tretmana kože goveda primenjenih na klanici, u redukciji bakterijske kontaminacije trupova sa kože

2. Značaj rezultata

2.1. Značaj rezultata za industriju mesa

Dobro je poznato da ne postoji jedna univerzalna interventna mera koja može eliminisati alimentarne patogene iz celog lanca goveđeg mesa. Striktna primena higijenskih mera u okviru sistema baziranom na principima GMP/GHP i HACCP može donekle kontrolisati nivo mikrobiološke kontaminacije u mesu. Međutim, u situacijama kada postignuti krajnji mikrobiološki status mesa ne zadovoljava zahteve regulatornih propisa i/ili određenog tržišta, primena dodatnih mera intervencije/dekontaminacije može biti neophodna za dalju redukciju nivoa patogena. Antimikrobni tretmani se dakle smatraju da poseduju potencijal za efikasnu kontrolu patogena, ali samo kao dodatak GMP/GHP, a nikako kao njihova zamena, jer njihova efikasnost nije zadovoljavajuća u slučajevima visoke inicijalne kontaminacije zbog nehigijenske prakse. U tom smislu, proaktivni antimikrobni tretmani kože zaklanih goveda, a naročito tretman mikrobne imobilizacije na koži rastvorom šelaka u etanolu, predstavljaju prvu efikasnu i možda najznačajniju barijeru ulaska mikrobiološke kontaminacije u lanac goveđeg mesa u „harvest“ fazi.

Rezultati ovog rada daju naučnu osnovu za praktični razvoj i implementaciju od strane industrije mesa nove i efikasnije strategije za osiguranje bezbednosti goveđeg mesa kroz mikrobnu imobilizaciju na koži zaklanih goveda. Pored dokazane dobre antimikrobne efikasnosti i konzistentnog postizanja očekivanog stepena redukcije prenosa mikrobiološke kontaminacije sa kože na meso goveđih trupova u realnim uslovima na klanici, novi tretman šelakom ima i neke implementacione prednosti u odnosu na postojeće tretmane dekontaminacije kože. Iako ispitivanje implementacionih aspekata njegove praktične upotrebe u klanici nije bilo uključeno u primarne ciljeve ovog rada (već će biti deo nekih budućih istraživanja), na osnovu dosadašnjih iskustava očekuje se da je njegova praktična upotreba u klanicama svakako izvodljiva. Šelak, ili bilo koje drugo lepljivo sredstvo se u industrijskim uslovima klanja velikog broja goveda može primeniti u kabinetima u kojima bi se vršilo prskanje koža goveda nakon klanja i iskrvarenja, kao i eventualno sušenje u

cilju ubrzanja procesa. Takođe, šelak je dozvoljen i već se koristi u hrani, na primer, od strane industrija voća i konditorskih proizvoda, ali u svakom slučaju nema razloga za zabrinutost u vezi njegovih rezidua na mesu. U smislu njegove tehničke primene i uticaja na životnu sredinu, nema potrebe za ispiranjem šelaka sa kože vodom nakon tretmana, čije velike količine se inače koriste kod tretmana dekontaminacije kože hemikalijama, a aplikovani šelak se uklanja iz klanice zajedno sa kožom koja je sporedni proizvod klanja. Informacije iz kožarske industrije ukazuju da tretman šelakom ne oštećuje kožu u pogledu njene upotrebljivosti u ovoj industriji.

Antimikrobnii tretman kože šelakom bi svakako morao da predstavlja novu, dodatnu kritičnu kontrolnu tačku (CCP) u HACCP planu goveđe klanice, jer njegova priroda omogućuje zadovoljavanje svih odnosnih uslova za CCP: u značajnoj meri može da kontroliše najznačajnije mikrobiološke hazarde i mogu se adekvatno primeniti principi kritičnih limita, monitoringa, korektivnih akcija i verifikacije. Generalno, ova nova kontrolna strategija može značajno da doprinese daljem unapređenju ukupne mikrobiološke bezbednosti goveđeg mesa i zaštiti zdravlja potrošača, što je glavni zadatak industrije mesa. Ipak, dalja istraživanja su neophodna u cilju tehničke i implementacione optimizacije ove strategije.

2.2. Značaj rezultata za regulatorna tela

Za sve nove tehnologije su, nakon faze idejnog i naučnog razvoja, obično potrebna dodatna istraživanja pre komercijalnog korišćenja, iz više razloga:

a) mehanizmi i varijabilnost antimikrobnog delovanja u praktičnim uslovima se moraju jasno naučno utvrditi da bi monitoring kritičnih procesnih parametara mogao biti pouzdan; b) postojeća regulatorna pitanja moraju biti adekvatno razjašnjena u cilju olakšavanja primene tehnologije; i c) troškovi pojedinih tehnologija se moraju razmotriti u pogledu njihove prihvatljivosti od strane potrošača ([Midgley i Small, 2006](#)). Prema [FSIS \(2003\)](#), „nova tehnologija“ se definiše kao nova, ili nova primena, opreme, sredstva, metoda, procesa ili procedura koji utiču na proces klanja životinja ili prerade mesa i koji mogu imati uticaja na bezbednost proizvoda, procedure inspekcije, bezbednost radnika ili zahtevaju promenu propisa. U suštini, ne postoji specifični propisi za usvajanje novih tehnologija, kako u SAD, tako i u EU, a generalni pristup je da nova tehnologija/tretman mora da pokaže ekvivalentnost sa

nekom postojećem i tradicionalnom (na primer, pasterizacijom) u pogledu stepena zaštite javnog zdravlja. Takođe, činjenica je da u svim EC regulativama i mišljenjima EFSA nije eksplisitno pomenuto uklanjanje kontaminacije sa kože životinja pre klanja ili skidanja kože, odnosno antimikrobni tretmani kože (osim pranja vodom i šišanja), već samo uklanjanje kontaminacije (dekontaminacija) hrane animalnog porekla. Ovo ukazuje da postoji velika praznina u propisima i da je potrebno uspostaviti komunikaciju između nauke, regulatornih tela i industrije mesa u cilju razjašnjavanja i standardizacije legislative u pogledu antimikrobnih tretmana kože.

2.3. Značaj rezultata za potrošače

Potrošači mogu značajno da doprinesu nebezbednosti goveđeg mesa nehigijenskom praksom/postupcima u domaćinstvu, što je utvrđeno epidemiološkim istraživanjima alimentarnih oboljenja. Ipak, bezbednost goveđeg mesa u momentu njegove nabavke je absolutni zahtev svih potrošača. Istraživanja opisana u ovom radu omogućuju značajno dodatno smanjenje mikrobioloških rizika u goveđem mesu, što svakako pomaže zadovoljavanju tog zahteva potrošača. U pogledu opšte prihvatljivosti novog antimikrobnog tretmana kože šelakom za potrošača, može se pretpostaviti da činjenice da je šelak prirodni proizvod sa istorijom korišćenja u hrani i da ne nosi probleme u vezi zaštite životne sredine i dobrobita životinja obećavaju njegovu prihvatljivost.

3. Potreba za daljim istraživanjima

Rezultati ovog rada su dokazali naučnu zasnovanost koncepta nove kontrolne strategije za dalje poboljšanje mikrobiološke bezbednosti goveđeg mesa. Međutim, dalja istraživanja su neophodna, naročito u cilju: boljeg razumevanja mehanizama i varijabilnosti antimikrobnih efekata šelaka na kožama različite vizuelne čistoće; tehničkog razvoja i optimizacije tretmana u praktičnim uslovima na klanici; evaluacije i drugih potencijalnih supstanci sa sličnim delovanjem; i analize koristi i troškova tretmana.

Ukupni zaključak

1. Rezultati ovog rada predstavljaju prvu naučnu informaciju o antimikrobnoj efikasnosti i potencijalima novog pristupa antimikrobnim tretmanima kože goveda - mikrobne imobilizacije na koži goveda primenom rastvora šelaka u etanolu.
2. U pogledu glavnih parametara od značaja za poželjno dejstvo šelaka na koži, utvrđeno je da su 23% rastvor šelaka u apsolutnom (99,09%) etanolu na sobnoj temperaturi (20°C) dali veoma značajne redukcije prenosa ukupnog broja bakterija (TVC; preko 6 log cfu/cm²), broja *Enterobacteriaceae* (EC; 3-3,5 log cfu/cm²) i broja generičke *E. coli* (GEC; 3 log cfu/cm²) sa tretirane kože na sunđerske briseve. Ispitivanja TVC na koži su pokazala da je daleko najznačajniji razlog navedenih redukcija prenosivosti mikroflore sa kože bila imobilizacija bakterija na dlaci od strane samog šelaka, dok je udeo baktericidnog efekta etanola u tim redukcijama bio oko 1000 puta manji.
3. Kada je upoređivana antimikrobnna efikasnost novog tretmana mikrobne imobilizacije na koži sa onom koja se postiže postojećim tretmanom dekontaminacije kože (ispiranjem baktericidnim sanitajzerom Antisept G i vakumiranjem), utvrđeno je da su redukcije prenosa TVC (6,6 log), EC (4,8 log) i GEC (2,9 log) sa kože na sunđerske briseve nakon primene novog tretmana šelakom bile značajno bolje nego nakon primene postojećeg tretmana dekontaminacije sanitajzerom (4,9, 3,4 i 2,8 log odnosnih bakterija). Ovi rezultati potvrđuju da metod imobilizacije mikroorganizama na koži (šelakom) ima znatno veći potencijal za smanjenje prenosa mikrobiološke kontaminacije sa kože na druge supstrate, nego komparativni metod njihovog ubijanja i uklanjanja sa kože (dekontaminacija sanitajzerom).
4. Pored njegovih pomenutih efekata na generalnu mikrofloru kože, ispitivana je i mogućnost redukcije prenosa glavnog alimentarnog patogena povezanog sa govedima - *E. coli* O157 - sa kože na sunđerske briseve primenom novog tretmana kože šelakom. Utvrđeno je da tretman šelakom značajno smanjuje tu prenosivost *E. coli* O157 sa prirodno kontaminirane kože - za 72,7%, odnosno 3,7 puta, u odnosu na netretiranu kožu. Efikasnost tretmana šelakom u redukciji prenosa veštački inokulisane *E. coli* O157 sa kože na sunđerske briseve je bila

znatno slabija u poređenju sa onom utvrđenom u slučaju kože prirodno kontaminirane sa *E. coli* O157, što ukazuje da upotreba veštački inokulisane mikroflore nije preporučljiva za eksperimente ovog tipa.

5. Ispitivanja prenosa mikroflore kože (različitog stepena vizuelne čistoće) preko njenog direktnog kontakta sa sterilnim mesom (u laboratorijskom model sistemu) su pokazala da su nivoi TVC (2,3-3,6 log cfu/cm²), EC (1,0-2,5 log cfu/cm²) i GEC (1,0-1,7 log cfu/cm²) preneti na meso sa kože tretirane šelakom bili u svim slučajevima značajno redukovani u odnosu na one prenete na meso sa netretirane kože. Takođe, redukcije nivoa TVC prenetog na meso sa kože tretirane šelakom su bile mnogo bolje u odnosu na redukcije nivoa TVC prenetog na meso sa kože komparativno tretirane sanitajzerom i vakumiranjem; ali razlike između dva tretmana nisu bile značajne u slučaju EC i GEC. Ovaj deo ispitivanja je ukazao i da se najbolji efekat šelaka u redukciji prenosa bakterija sa kože na meso može postići u slučaju kada je koža pre tretmana čista i suva; stoga je to neophodan preduslov za efikasnu primenu tretmana kože šelakom i u praktičnim uslovima.
6. Ispitivanja u uslovima komercijalne klanice efekata tretmana kože na mikrobiološki status mesa goveđih trupova nakon skidanja kože su pokazala visoke redukcije TVC (1,7 log cfu/cm²), EC (1,4 log cfu/cm²) i GEC (1,3 log cfu/cm²) na mesu trupova u slučaju tretiranja kože šelakom u poređenju sa kontrolom (netretirane kože). Takođe, mikrobiološke redukcije na mesu trupova nakon tretiranja koža šelakom su bile superiorne u pogledu TVC (ali ne EC i GEC) u poređenju sa odnosnim redukcijama nakon komparativnog tretiranja kože sanitajzerom i vakumiranjem. U pogledu ispunjavanja EU mikrobioloških kriterijuma za goveđe trupove na liniji klanja, rezultati ovog dela istraživanja su pokazali da je tretman koža šelakom omogućio toj klanici (inače, sa neadekvatnim higijenskim uslovima) da proizvedeni trupovi promene prosečnu kategoriju - iz neprihvatljive u prihvatljivu.

7. Sveukupno, rezultati ovog rada predstavljaju naučnu bazu za novi pristup kontrolnim strategijama za antimikrobne tretmane kože goveda i globalno unapređenje mikrobiološke bezbednosti goveđeg mesa. Ovaj novi pristup omogućava značajne koristi za sve ključne učesnike u lancu goveđeg mesa: nauku, industriju, regulatorne organe i potrošače. Ipak, potrebna su dalja istraživanja u cilju maksimalnog postizanja tih korisnih efekata u praksi.

Literatura

SPISAK LITERATURE (Ukupno 172 reference)

Adam, K. & Brüllsauer, F. (2010). The application of food safety interventions in primary production of beef and lamb: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S43-S52.

Antić, D. (2009). Mikrobiološki status kože goveda u kontekstu higijene mesa. *Magistarska teza*, Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu.

Antic, D., Blagojevic, B., Ducic, M., Nastasijevic, I., Mitrovic, R. & Buncic, S. (2010a). Distribution of microflora on cattle hides and its transmission to meat via direct contact. *Food Control*, 21, 1025-1029.

Antic, D., Blagojevic, B., Ducic, M., Mitrovic, R., Nastasijevic, I. & Buncic, S. (2010b). Treatment of cattle hides with Shellac-in-ethanol solution to reduce bacterial transferability - A preliminary study. *Meat Science*, 85, 77-81.

Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Nou, X., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Kent, M. P., Jaroni, D., Pauling, B., Allen, D. M., & Koohmaraie, M. (2004). *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. *Journal of Food Protection*, 67, 658-665.

Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Brichta-Harhay, D. M., Kalchayanand, N., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L. & Koohmaraie M. (2007). Effects of a minimal hide wash cabinet on the levels and prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on the hides of beef cattle at slaughter. *Journal of Food Protection*, 70, 1076-1079.

Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Brichta-Harhay, D. M., Kalchayanand, N., King, D. A., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L. & Koohmaraie, M. (2008). Source tracking of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* contamination in the lairage environment at commercial U.S. beef processing plants and identification of an effective intervention. *Journal of Food Protection*, 71, 1752-1760.

Arthur, T.M., Keen, J. E., Bosilevac, J. M., Brichta-Harhay, D. M., Kalchayanand, N., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Nou, X. W. & Koohmaraie, M. (2009). Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 in a beef cattle feedlot and role of high-level shedders in hide contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 6515-6523.

Arthur, T. M., Brichta-Harhay, D. M., Bosilevac, J. M., Kalchayanand, N., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L. & Koohmaraie, M. (2010). Super shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle and the impact on beef carcass contamination. *Meat Science*, 86, 32-37.

Avery, S. M., Small, A., Reid, C.-A. & Buncic, S. (2002). Pulsed-field gel electrophoresis characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 from hides of cattle at slaughter. *Journal of Food Protection*, 65, 1172-1176.

Avery, S. M., Liebana, E., Hutchison, M. L. & Buncic, S. (2004). Pulsed field gel electrophoresis of related *Escherichia coli* O157 isolates associated with beef cattle and comparison with unrelated isolates from animals, meats and humans. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 161-169.

Bacon, R. T., Belk, K. E., Sofos, J. N., Clayton, R. P., Reagan, J. O. & Smith, G. C. (2000). Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plants employing multiple-sequential interventions for decontamination. *Journal of Food Protection*, 63, 1080-1086.

Baird, B. E., Lucia, L. M., Acuff, G. R., Harris, K. B., & Savell, J. W. (2006). Beef hide antimicrobial interventions as a means of reducing bacterial contamination. *Meat Science*, 73, 245–248.

Barham, A. R., Barham, B. L., Johnson, A. K., Allen, D. M., Blanton, J. R. J. & Miller, M. F. (2002). Effects of the transportation of beef cattle from the feedyard to the packing plant on prevalence levels of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. *Journal of Food Protection*, 65, 280-283.

Barkocy-Gallagher, G. A., Arthur, T. M., Siragusa, G. R., Keen, J. E., Elder, R. O., Laegreid, W. W. & Koohmariae, M. (2001). Genotypic analyses of *Escherichia coli* O157:H7 and O157 nonmotile isolates recovered from beef cattle and carcasses at processing plants in the Midwestern states of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3810–3818.

Barkocy-Gallagher, G. A., Arthur, T. M., Rivera-Betancourt, M., Nou, X., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L. & Koohmariae, M. (2003). Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. *Journal of Food Protection*, 66, 1978–1986.

Barros, M. A. F., Nero, L. A., Silva, L. C., d'Ovidio, L., Monteiro, F. A., Tamanini, R., Fagnani, R., Hofer, E. & Belotti, V. (2007). *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. *Meat Science*, 76, 591-596.

Beach, J. C., Murano, E. A. & Acuff, G. R. (2002). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in beef cattle from transport to slaughter. *Journal of Food Protection*, 65, 1687-1693.

Bell, R. G. (1997). Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 292-300.

Belk, K. E. (2001). Beef decontamination technologies. *National Cattlemen's Beef Association*. <http://www.beef.org/documents/ACFFC.pdf>. pristupljeno 10/08/2010.

- Biss, M. E. & Hathaway, S. C.** (1995). Microbiological and visible contamination of lamb carcasses according to preslaughter presentation status – Implications for HACCP. *Journal of Food Protection*, 58, 776–783.
- Biss, M. E. & Hathaway, S. C.** (1996). Effect of preslaughter washing of lambs on the microbiological and visible contamination of the carcasses. *Veterinary Record*, 138, 82-86.
- Blagojevic, B., Antic, D., Ducic, M. & Buncic, S.** (2011). Ratio between carcass- and skin-microflora as an abattoir process hygiene indicator. *Food Control*, 22, 186-190.
- Bolton, D. J., Doherty, A. M. & Sheridan, J. J.** (2001). Beef HACCP: intervention and non-intervention systems. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 119-129.
- Bosilevac, J. M., Wheeler, T. L., Rivera-Betancourt, M., Nou, X., Arthur, T. M., Shackelford, S. D., Kent, M. P., Jaroni, D., Osborn, M. S., Rossman, M., Reagan, J. O. & Koohmaraie, M.** (2004a). Protocol for evaluating the efficacy of cetylpyridinium chloride as a beef hide intervention. *Journal of Food Protection*, 67, 303–309.
- Bosilevac, J. M., Arthur, T. M., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Rossman, M., Reagan, J. O., & Koohmaraie, M.** (2004b). Prevalence of *Escherichia coli* O157 and levels of aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* are reduced when hides are washed and treated with cetylpyridinium chloride at a commercial beef processing plant. *Journal of Food Protection*, 67, 646–650.
- Bosilevac, J. M., Nou, X., Osborn, M. S., Allen, D. M. & Koohmaraie, M.** (2005a). Development and evaluation of an online hide decontamination procedure for use in a commercial beef processing plant. *Journal of Food Protection*, 68, 265-272.
- Bosilevac, J. M., Shackelford, S. D., Brichta, D. M., & Koohmaraie, M.** (2005b). Efficacy of ozonated and electrolyzed oxidative waters to decontaminate hides of cattle before slaughter. *Journal of Food Protection*, 68, 1393–1398.
- Bosilevac, J. M., Nou, X. W., Barkocy-Gallagher, G. A., Arthur, T. M. & Koohmaraie, M.** (2006). Treatments using hot water instead of lactic acid reduce levels of aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* and reduce the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on preevisceration beef carcasses. *Journal of Food Protection*, 69, 1808–1813.
- Bosilevac, J. M., Arthur, T.M., Bono, J. L., Brichta-Harhay, D. M., Kalchayanand, N., King, D. A., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L. & Koohmaraie, M.** (2009). Prevalence and enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in U.S. abattoirs that process fewer than 1,000 head of cattle per day. *Journal of Food Protection*, 72, 1272-1278.
- Bowling, R. A. & Clayton, R. P.** (1992). Method for de-hairing animals. U.S. Patent 5,149,295. Greely, CO: Monfort, Inc.

Bray, A. R., Graafhuis, A. E. & Chrystall, B. B. (1989). The cumulative effect of nutritional, shearing and preslaughter washing stresses on the quality of lamb meat. *Meat Science*, 25, 59–67.

Brichta-Harhay, D. M., Guerini, M. N., Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Kalchayanand, N., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., & Koohmaraie, M. (2008). *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 contamination on hides and carcasses of cull cattle presented for slaughter in the United States: An evaluation of prevalence and bacterial loads by immunomagnetic separation and direct plating methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 6289–6297.

Buncic S. & Avery, S. M. (2004). Microbiological Safety of Meats: *Listeria monocytogenes*. U Jensen W. K., Devine, C & Dikeman, M. (Eds.) *Encyclopaedia of Meat Sciences*, (Vol. 2, str. 804-814), Elsevier, Oxford.

Buncic, S., Avery, S. M. & De Zutter, L. (2004). Epidemiology of *Escherichia coli* O157 in cattle from farm to fork. In International EURAIN conference “Food pathogen epidemiology: Microbes, maladies and methods”, Padua, Italy, 2–3 December 2004. Proceedings, pp. 67–84.

Buncic, S. (2006). Integrated Food Safety and Veterinary Public Health. CABI International Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK. (ISBN 0-85199-908-5).

Bunčić, S., Blagojević, B., Dučić, M., i sar. (2008). Vodič za preduslovne programe (GMP/GHP) i HACCP - Tom I: Priroda i opšti principi preduslovnih programa i HACCP planova. http://www.minpolj.gov.rs/download/HACCP_vodic.pdf pristupljeno 15/02/2011.

Byelashov, O. A. & Sofos, J. N. (2009). Strategies for on-line decontamination of carcasses. U: Todra F. (Ed) *Safety of meat and processed meat* (Food microbiology and food safety). Springer, New York, USA, str. 149-182 (ISBN 978-0-387-89025-8).

Byrne, C. M., Bolton, D. J., Sheridan, J. J., McDowell, D. A. & Blair, I. S. (2000). The effects of preslaughter washing on the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 transfer from cattle hides to carcasses during slaughter. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 142–145.

Byrne, B., Dunne, G., Lyng, J. & Bolton, D. J. (2007). The development of a clean sheep policy in compliance with the new Hygiene Regulation (EC) 853/2004 (Hygiene 2). *Food Microbiology*, 24, 301–304.

Callaway, T. R., Anderson, R. C., Edrington, T. S., Elder, R. O., Genovese, K. J., Bischoff, K. M., Poole, T. L., Jung, Y. S., Harvey, R. B. & Nisbet, D. J. (2003). Preslaughter intervention strategies to reduce food-borne pathogens in food animals. *Journal of Animal Science*, 81 (E. Suppl. 2), E17–E23.

Carlson, B. A., Ruby, J., Smith, G. C., Sofos, J. N., Bellinger, G. R., Warren-Serna, W., Centrella, B., Bowling, R. A. & Belk, K. E. (2008a). Comparison of antimicrobial efficacy of multiple beef hide decontamination strategies to reduce

levels of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella*. *Journal of Food Protection*, 71, 2223-2227.

Carlson, B. A., Geornaras, I., Yohan, Y., Scanga, J. A., Sofos, J. N., Smith, G. C. & Belk, K. E. (2008b). Studies to evaluate chemicals and conditions with low-pressure applications for reducing microbial counts on cattle hides. *Journal of Food Protection*, 71, 1343-1348.

Castillo, A., Dickson, J. S., Clayton, R. P., Lucia, L. M. & Acuff, G. R. (1998). Chemical dehairing of bovine skin to reduce pathogenic bacteria and bacteria of fecal origin. *Journal of Food Protection*, 61, 623-625.

Cates, S., Viatoriatoriator, C. L., Karns, S. A. & Muth, M. K. (2008). Food safety practices of meat slaughter plants: Findings from a national survey. *Food Protection Trends*, 28, 26-36.

Chinen, I., Tanaro, J. D., Miliwebsky, E., Lound, L. H., Chillemi, G., Ledri, S., Baschkier, A., Scarpin, M., Manfredi, E. & Rivas, M. (2001). Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *Journal of Food Protection*, 64, 1346-1351.

Codex Alimentarius (2005). Code of Hygienic Practice for Meat, CAC/RCP 58-2005. Codex Alimentarius Commission, Food and Agriculture Organization, Rome, 2005.

Collis, V. J., Reid, C.-A., Hutchison, M. L., Davies, M. H., Wheeler, K. P. A., Small, A. & Buncic, S. (2004). Spread of marker bacteria from the hides of cattle in a simulated livestock market and at an abattoir. *Journal of Food Protection*, 67, 2397-2402.

Davies, M. H., Hadley, P. J., Stosic, P. J. & Webster, S. D. (2000). Production factors that influence the hygienic condition of finished beef cattle. *Veterinary Record*, 146, 179-183.

Dewell, G. A., Simpson, C. A., Dewell, R. D., Hyatt, D. R., Belk, K. E., Scanga, J. A., Morley, P. S., Grandin, T., Smith, G. C., Dargatz, D. A., Wagner, B. A. & Salman, M. D. (2008). Impact of transportation and lairage on hide contamination with *Escherichia coli* O157 in finished beef cattle. *Journal of Food Protection*, 71, 1114-1118.

Duffy, G., Cummins, E., Nally, P., O' Brien, S. & Butler, F. (2006). A review of quantitative microbial risk assessment in the management of *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Meat Science*, 74, 76-88.

Edwards, J. R. & Fung, D. Y. C. (2006). Prevention and decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 on raw beef carcasses in commercial beef abattoirs. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 14, 1-95.

Elder, R. O., Keen, J. E., Siragusa, G. R., Barkocy-Gallagher, G. A, Koohmariae, M. & Laegreid, W. W. (2000). Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli*

O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97, 2999-3003.

European Commission (2002). Regulation (EC) No 1774/2002 of the European Parliament and of the Council of 03 October 2002 laying down health rules concerning animal by-products not intended for human consumption. *Official Journal of the European Union*, L 273/1 of 10 October 2002.

European Commission (2004a). Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for on the Hygiene of Foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 139/55 of 30 April 2004.

European Commission (2004b). Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the Hygiene of Foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 139/1 of 30 April 2004.

European Commission (2004c). Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. *Official Journal of the European Union*, L 155/206 of 30 April 2004.

European Commission (2008). Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives. *Official Journal of the European Union*, L 354/16 of 31 December 2008.

European Food Safety Authority (2005a). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the evaluation of the efficacy of peroxyacids for use as an antimicrobial substance applied on poultry carcasses. *The EFSA Journal*, 306, 1-10.

European Food Safety Authority (2005b). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to Treatment of poultry carcasses with chlorine dioxide, acidified sodium chlorite, trisodium phosphate and peroxyacids. *The EFSA Journal*, 297, 1-27.

European Food Safety Authority (2006a). Joint AFC/BIOHAZ guidance document on the safety and the efficacy of substances for the removal of microbial surface contamination of foods of animal origin. *The EFSA Journal*, 388, 1-9.

European Food Safety Authority (2006b). Opinion from the Scientific Panel on Biological Hazards on the evaluation of the efficacy of L(+) Lactic acid for carcass decontamination. *The EFSA Journal*, 342, 1-6.

European Food Safety Authority (2006c). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the European Commission related to the evaluation of the efficacy of SAN-PEL® for use as an antimicrobial substance applied on carcasses of chickens, turkeys, quails, pigs, beef, sheep, goats and game and in washing the shells of eggs. *The EFSA Journal*, 352, 1-6.

European Food Safety Authority (2007). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on the Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. *The EFSA Journal*, 579, 1-61.

European Food Safety Authority (2008). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on the Assessment of the possible effect of the four antimicrobial treatment substances on the emergence of antimicrobial resistance. *The EFSA Journal*, 659, 1-26.

European Food Safety Authority (2009). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on the The use and mode of action of bacteriophages in food production. *The EFSA Journal*, 1076, 1-26.

European Food Safety Authority (2010a). The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and foodborne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal*, 1496.

European Food Safety Authority (2010b). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards Guidance on Revision of the joint AFC/BIOHAZ guidance document on the submission of data for the evaluation of the safety and efficacy of substances for the removal of microbial surface contamination of foods of animal origin intended for human consumption. *The EFSA Journal*, 8(4), 1544.

European Food Safety Authority (2010c). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on the safety and efficacy of using recycled hot water as a decontamination technique for meat carcasses. *The EFSA Journal*, 8(9), 1827.

Fegan, N., Higgs, G., Vanderlinde, P. & Desmarchelier, P. (2005) An investigation of *Escherichia coli* O157 contamination of cattle during slaughter at an abattoir. *Journal of Food Protection*, 68, 451–457.

Food Safety and Inspection Service. (1996a). Notice of policy change: Achieving the zero tolerance performance standard for beef carcasses by knife trimming and vacuuming with hot water or steam; use of acceptable carcass interventions for reducing carcass contamination without prior agency approval. *Federal Register*, 61, 15024–15027.

Food Safety and Inspection Service. (1996b). Pathogen reduction; hazard analysis and critical control point (HACCP) systems, final rule. *Federal Register*, 61, 38805- 38989.

Food Safety and Inspection Service. (2002). Guidance for minimizing the risk of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in beef slaughter operations. <http://haccpalliance.org/alliance/BeefSlauterGuide.pdf>. pristupljen 17/08/2010.

Food Safety and Inspection Service. (2003). FSIS procedures for notification of new technology. *Federal Register*, 68, 6873-6875.

Food Safety and Inspection Service. (2008). Safe and suitable ingredients used in the production of meat and poultry products. *Pristupljeno 18/08/2010, <http://www.fsis.usda.gov/oppde/rdad/FSISDirectives/7120.1Amend14.pdf>.*

Fox, J. T., Renter, D. G., Sanderson, M. W., Nutsch, A. L., Shi, X. & Nagaraja, T. G. (2008). Associations between the presence and magnitude of *Escherichia coli* O157 in feces at harvest and contamination of preintervention beef carcasses. *Journal of Food Protection*, 71, 1761–1767.

Fung, D. Y. C., Edwards, J. R. & Crozier-Dodson, B. A. (2008). At-line methods for controlling microbial growth and spoilage in meat processing abattoirs. *U: Toldra, F. (Ed.) Meat biotechnology*, Springer, New York, USA, str. 289-318 (ISBN 978-0-387-79381-8).

Gehring, A. G., Dudley, R. L., Mazenko, C. E. & Marmer, W. N. (2006). Rapid oxidative dehairing with magnesium peroxide and potassium peroxyomonosulfate. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 101, 324–329.

Geornaras, I. & Sofos, J. N. (2005). Combining physical and chemical decontamination intervention for meat. *U: Sofos, J.N. (Ed.) Improving the Safety of Fresh Meat*. Woodhead Publishing in Food Science and Technology, CRC Press, New York, str. 433-460 (ISBN 978-1-85573-955-0).

Ghafir, Y., China, B., Dierick, K., De Zutter, L. & Daube, G. (2007). A seven-year survey of *Campylobacter* contamination in meat at different production stages in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 111-120.

Gill, C. O., McGinnis, J. C. & Badoni, M. (1996). Assessment of the hygienic characteristics of a beef carcass dressing process. *Journal of Food Protection*, 59, 136-140.

Gill, C. O., McGinnis, J. C. & Bryant, J. (1998). Microbial contamination of meat during the skinning of beef carcass hindquarters at three slaughtering plants. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 175–184.

Gill, C. O. (2004). Visible contamination on animals and carcasses and the microbiological condition of meat. *Journal of Food Protection*, 67, 413-419.

Gill, C. O. & Badoni, M. (2004). Effects of peroxyacetic acid, acidified sodium chlorite or lactic acid solutions on the microflora of chilled beef carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 43–50.

Greer, G. G. (2005). Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection*, 68, 1102-1111.

Guerini, M. N., Bosilevac, J. M. & Koohmaraie, M. (2007a). Rapid enrichment strategy for isolation of *Listeria* from bovine hide, carcass and meat samples. *Journal of Food Protection*, 70, 53–57.

- Guerini, M. N., Brichta-Harhay, D. M., Shackelford, S. D., Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Kalchayanand, N., Wheeler, T. L. & Kooohmaraie, M.** (2007b). *Listeria* prevalence and *Listeria monocytogenes* serovar diversity at cull cow and bull processing plants in the United States. *Journal of Food Protection*, 70, 2578-2582.
- Hadley, P. J., Holder, J. S. & Hinton, M. H.** (1997). Effects of fleece soiling and skinning method on the microbiology of sheep carcasses. *Veterinary Record*, 140, 570-574.
- Hakkinen, M., Heiska, H. & Hanninen M-L.** (2007). Prevalence of *Campylobacter* spp. in cattle in Finland and antimicrobial susceptibilities of bovine *Campylobacter jejuni* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3232-3238.
- Heuvelink, A. E., Zwartkruis-Nahuis, J. T. M., Beumer, R. R. & de Boer, E.** (1999). Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in the Netherlands. *Journal of Food Protection*, 62, 1115-1122.
- Heuvelink, A. E., Roessink, G. L., Bosboom, K. & De Boer, E.** (2001). Zerotolerance for faecal contamination of carcasses as a tool in the control of O157 VTEC infections. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 13–20.
- Hudson, W. R., Mead, G. C. & Hinton, M.** (1998). Assessing abattoir hygiene with a marker organism. *Veterinary Record*, 142, 542-547.
- Huffman, R. D.** (2002). Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. *Meat Science*, 62, 285–294.
- Hugas, M. & Tsigarida, E.** (2008). Pros and cons of carcass decontamination: The role of the European Food Safety Authority. *Meat Science*, 78, 43-52.
- Jacob, M. E., Renter, D. G. & Nagaraja, T. G.** (2010). Animal- and truckload-level associations between *Escherichia coli* O157:H7 in feces and on hides at harvest and contamination of preevisceration beef carcasses. *Journal of Food Protection*, 73, 1030-1037.
- Kain, M. L., Kochevar, S. L. Sofos, J. N. Belk, K. E. Rossiter, C. Reagan, J. O. & Smith G. C.** (2001). Relationships of live animal scores for ambulatory status, body condition, hide cleanliness, and fecal matter consistency to microbiological contamination of dairy cow carcasses. *Dairy Food and Environmental Sanitation*, 21, 990–996.
- Kannan, G., Jenkins, A. K., Eega, K. R., Kouakou, B. & McCommon, G. W.** (2007). Preslaughter spray-washing effects on physiological stress responses and skin and carcass microbial counts in goats. *Small Ruminant Research*, 67, 14-19.
- Kiermeier, A., Bobbitt, J., Vanderlinde, P., Higgs, G., Pointon, A. & Sumner, J.** (2006). Use of routine beef carcasses *Escherichia coli* monitoring data to investigate the relationship between hygiene status of incoming stock and processing efficacy. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 263–269.

- Koohmaraie, M., Arthur, T. M. Bosilevac, J. M. Guerini, M., Shackelford, S. D. & Wheeler, T. L.** (2005). Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. *Meat Science*, 71, 79-91.
- Koohmaraie, M., Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Brichta-Harhay, D. M., Kalchayanand, N., Shackelford, S. D. & Wheeler, T. L.** (2007). Interventions to reduce/eliminate *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Meat Science*, 77, 90–96.
- Korsak, N., Daube,G., Ghafir,Y., Chahed,A., Jolly, S. & Vindevogel, H.** (1998). An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine Belgian abattoirs. *Journal of Food Protection*, 61, 535-541.
- Koutsoumanis, K. P., Geornaras, I. & Sofos, J. N.** (2006). Microbiology of land muscle foods. U: Hui, Y. H. (Ed.) *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*, vol. 1, New York: CRC Press, Taylor and Francis Group, NW, str. (52) 1-43 (ISBN 978-1-57444-551-0).
- Leistner, L.** (2000). Basic aspects of food preservation of hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 181–186.
- Levine, P., Rose, B., Green, S., Ransom, G. & Hill, W.** (2001). Pathogen testing of ready-to-eat meat and poultry products collected at federally inspected establishments in the United States, 1990–1999. *Journal of Food Protection*, 64, 1188–1193.
- Liu, D.-C. & Ockerman, H. W.** (2001). Meat co-products. U: Hui, Y. H. i sar. (Ed) *Meat science and applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel (ISBN 0-8247-0548-3).
- Low, J.C., McKendrick, I.J., McKechnie, C., Fenlon, D., Naylor, S.W., Currie, C., Smith, D.G., Allison, L. & Gally, D.L.** (2005). Rectal carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in slaughtered cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 93–97.
- Lynch, M., Painter, J., Woodruff, R. & Braden, C.** (2006) Surveillance for foodborne-disease outbreaks – USA, 1998-2002. *Surveillance summaries*, 55 (SS10); 1-34 <http://www.cdc.gov/MMWR/preview/mmwrhtml/ss5510a1.htm> pristupljeno 11/08/2010.
- Madden, R.H., Murray, K.A. & Gilmour, A.** (2006). Carriage of four bacterial pathogens by beef cattle in Northern Ireland at time of slaughter. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 115–119.
- Matthews, L., Low, J. C., Gally, D. L., Pearce, M. C., Mellor, D. J., Heesterbeek, J. A., Chase-Topping, M., Naylor, S. W., Shaw, D. J., Reid, S. W., Gunn, G. J., & Woolhouse, M. E.** (2006). Heterogeneous shedding of *Escherichia coli* O157 in cattle and its implications for control. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 547–552.

McCLEERY, D. R., STIRLING, J. M. E., McIVOR, K. & PATTERSON, M. F. (2007). Effect of ante- and postmortem hide clipping on the microbiological quality and safety and ultimate pH value of beef carcasses in an EC-approved abattoir. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1471-1479.

MCDONNELL, G. & RUSSELL, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 147-179.

MCDOWELL, D. A., SHERIDAN, J. J. & BOLTON, D. J. (2005). HACCP in slaughter operations. U: Sofos, J.N. (Ed.) *Improving the Safety of Fresh Meat*. Woodhead Publishing in Food Science and Technology, CRC Press, New York, str. 696-730 (ISBN 978-1-85573-955-0).

MCLEVY, J. M., DOHERTY, A. M., FINNERTY, M., SHERIDAN, J. J., MC GUIRE, L., BLAIR, I. S., MCDOWELL, D. A. & HARRINGTON, D. (2000). The relationship between hide cleanliness and bacterial numbers on beef carcasses at a commercial abattoir. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 390-395.

MCLEVY, J. M., DOHERTY, A. M., SHERIDAN, J. J., BLAIR, I. S. & MCDOWELL, D. A. (2001). Use of steam condensing at subatmospheric pressures to reduce *Escherichia coli* O157:H7 numbers on bovine hide. *Journal of Food Protection*, 64, 1655-1660.

MCLEVY, J. M., DOHERTY, A. M., SHERIDAN, J. J., THOMSON-CARTER, F. M., GARVEY, P. MC GUIRE, L., BLAIR, I. S. & MCDOWELL, D. A. (2003a). The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 256-266.

MCLEVY, J. M., DOHERTY, A. M., SHERIDAN, J. J., BLAIR, I. S. & MCDOWELL, D. A. (2003b). The prevalence of *Salmonella* spp. in bovine faecal, rumen and carcass samples at a commercial abattoir. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 693-700.

MCLEVY, J. M., DOHERTY, A. M., SHERIDAN, J. J., BAILEY, D. G., BLAIR, I. S. & MCDOWELL, D. A. (2003c). The effects of treating bovine hide with steam at subatmospheric pressure on bacterial numbers and leather quality. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 344-348.

MCLEVY, J. M., SHERIDAN, J. J., BLAIR, I. S. & MCDOWELL, D. A. (2004). Microbial contamination on beef in relation to hygiene assessment based on criteria used in EU Decision 2001/471/EC. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 217-225.

McGEE, P., SCOTT, L., SHERIDAN, J. J., EARLEY, B. & LEONARD, N. (2004). Horizontal transmission of *Escherichia coli* O157:H7 during cattle housing. *Journal of Food Protection*, 67, 2651-2656.

Midgley, J. & Small, A. (2006). Review of new and emerging technologies for red meat safety. Meat and Livestock Australia, Final report. *pristupljeno 30/03/2010.* <http://www.meatupdate.csiro.au/new/Introduction%20to%20Interventions.htm>

Mies, P. D., Covington, B. R., Harris, K. B., Lucia, L. M., Acuff, G. R. & Savell, J. W. (2004). Decontamination of cattle hides prior to slaughter using washes with and without antimicrobial agents. *Journal of Food Protection*, 67, 579-582.

Minihan, D., Whyte, P., O' Mahony, M., Fanning, S., McGill, K. & Collins, J. D. (2004). *Campylobacter* spp. in Irish feedlot cattle: A longitudinal study involving pre-harvest and harvest phases of the food chain. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 51, 28-33.

Mossel, D. (1984). Intervention as the rational approach to control diseases of microbial etiology transmitted by foods. *Journal of Food Safety*, 6, 89-104.

Nastasijevic, I., Mitrovic, R. & Buncic, S. (2008). Occurrence of *Escherichia coli* O157 on hides of slaughtered cattle. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 126-131.

Nastasijevic, I., Mitrovic, R. & Buncic, S. (2009). The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on faeces, carcasses and fresh meats from cattle. *Meat Science*, 82, 101-105.

Naylor, S. W., Low, J. C., Besser, T. E., Mahajan, A., Gunn, G. J., Pearce, M. C., McKendrick, I. J., Smith, D. G. E. & Gally, D. L. (2003). Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infection and Immunity*, 71, 1505-1512.

Naylor, S. W., Nart, P., Sales, J., Flockhart, A., Gally, D. L. & Low, J. C. (2007). Impact of the direct application of therapeutic agents to the terminal recta of experimentally colonized calves on *Escherichia coli* O157:H7 shedding. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1493-1500.

Nørrung, B. & Buncic, S. (2008). Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Science*, 78, 14-24.

Nørrung, B., Andersen, J. K. & Buncic, S. (2009). Main concerns of pathogenic microorganisms in meat. U: Todra F. (Ed) *Safety of meat and processed meat* (Food microbiology and food safety). Springer, New York, USA, str. 3-30 (ISBN 978-0-387-89025-8).

Nou, X. W., Rivera-Betancourt, M., Bosilevac, J. M., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Gwartney, B. L., Reagan, J. O. & Koohmariae, M. (2003). Effect of chemical dehairing on the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and the levels of aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* on carcasses in a commercial beef processing plant. *Journal of Food Protection*, 66, 2005-2009.

O'Brien, S.B., Duffy, G., Carney, E., Sheridan, J.J., McDowell, D.A. & Blair, I.S. (2005). Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157 on bovine hide at a beef slaughter plant. *Journal of Food Protection*, 68, 660-665.

- O'Flynn, G., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. & Coffey, A.** (2004). Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3417–3421.
- Purnell, G., James, S., Wilkin, C.-A., Fisher, A., Corry, J., Howell, M., Brown, T. & James, C.** (2007). Microbial studies of carcass hygiene issues. CIGR International Symposium on Food and Agricultural Products: Processing and Innovations. Naples, Italy, 24–26 September 2007.
- Reid, C.-A., Small, A., Avery, S. M., & Buncic, S.** (2002). Presence of foodborne pathogens on cattle hides. *Food Control*, 13, 411–415.
- Rees, C. E. D., Dodd, C. E. R., Gibson, P. T., Booth, I. R. & Stewart, G. S. A. B.** (1995). The significance of bacteria in stationary phase to food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 263–275.
- Retzlaff, D., Phebus, R., Kastner, C., & Marsden, J.** (2005). Establishment of minimum operational parameters for a high-volume static chamber steam pasteurization system (SPS 400-SC (TM)) for beef carcasses to support HACCP programs. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2, 146–151.
- Rhoades, J. R., Duffy, G. & Koutsoumanis, K.** (2009). Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review. *Food Microbiology*, 26, 357–376.
- Ridell, J. & Korkeala, H.** (1993). Special treatment during slaughtering in Finland of cattle carrying an excessive load of dung: meat hygiene aspects. *Meat Science*, 35, 223–228.
- Rivera-Betancourt, M., Shackelford, S. D., Arthur, T. M., Westmoreland, K. E., Bellinger, G., Rossman, M., Reagan, J. O. & Koohmaraie, M.** (2004). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. *Journal of Food Protection*, 67, 295–302.
- Rogan, D. R., Smith, D. R., Moxley, R. A., Potter, A. A. & Strauss, C. E.** (2009). Vaccination with Type III secretion proteins reduces *E. coli* O157:H7 shedding and contamination in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128, 334–334.
- Ruby, J. R., Zhu, J. & Ingham, S. C.** (2007). Using indicator bacteria and *Salmonella* test results from three large-scale beef abattoirs over an 18-month period to evaluate intervention system efficiency and plan carcass testing for *Salmonella*. *Journal of Food Protection*, 70, 2732–2740.
- Schnell, T. D., Sofos, J. N., Littlefield, V. G., Morgan, J. B., Gorman, B. M., Clayton, R. P. & Smith, G. C.** (1995). Effects of postexsanguination dehairing on the microbial load and visual cleanliness of beef carcasses. *Journal of Food Protection*, 58, 1297–1302.

SCVPH (1998). Report on the benefits and limitations of antimicrobial treatments for poultry carcasses evaluation of antimicrobial treatments for poultry carcasses. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out14_en.pdf pristupljeno 01/12/2010.

SCVPH (1999). Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on *Listeria Monocytogenes*.

http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out25_en.pdf pristupljeno 16/08/2010.

SCVPH (2000). Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on Food-borne Zoonoses.

http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out32_en.pdf pristupljeno 16/08/2010.

SCVPH (2003a). Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on Verotoxigenic *E. coli* (VTEC) in Foodstuffs. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out58_en.pdf pristupljeno 16/08/2010.

SCVPH (2003b). Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on *Salmonellae* in Foodstuffs. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out66_en.pdf pristupljeno 16/08/2010.

SCVPH (2003c). Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on the evaluation of antimicrobial treatments for poultry carcasses. http://europa.eu/food/fs/sc/scv/out63_en.pdf pristupljeno 01/12/2010.

Skandamis, P. N., Nychas, G.-J. E. & Sofos, J. N. (2010). Meat decontamination. U: Todra F. (Ed) *Handbook of meat processing*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, str. 43-85 (ISBN 978-0-8138-2182-5).

Small, A., Reid, C.-A., Avery, S., Karabasil, N., Crowley, C. & Buncic, S. (2002). Potential for the spread of *Escherichia coli* O157, *Salmonella* and *Campylobacter* in the lairage environment at abattoirs. *Journal of Food Protection*, 65, 931-936.

Small, A., Reid, C.-A. & Buncic, S. (2003). Conditions in lairages at abattoirs for ruminants in the Southwest of England and *in vitro* survival of *Escherichia coli* O157, *Salmonella* kedougou, and *Campylobacter jejuni* on lairage-related substrates. *Journal of Food Protection* 66, 1570-1575.

Small, A., Wells-Burr, B. & Buncic, S. (2005). An evaluation of selected methods for the decontamination of cattle hides prior to skinning. *Meat Science*, 69, 263-268.

Small, A., James, C., James, S., Davies, R., Liebana, E., Howell, M., Hutchison, M. & Buncic, S. (2006). Presence of *Salmonella* in the red meat abattoir lairage after routine cleansing and disinfection and on carcasses. *Journal of Food Protection*, 69, 2342-2351.

Small, A. & Buncic, S. (2009). Potential for the cross-contamination of the hides of cattle while they are held in lairage. *Veterinary Record*, 164, 260-265.

- Smerdon, W. J., Adak, G. K., O'Brien, S. J., Gillespie, I. A. & Reacher, M.** (2001) General outbreaks of infectious intestinal disease linked with red meat, England and Wales, 1992-1999. *Communicable Disease and Public Health*, 4, 259-67.
- Smulders, F. J. M., & Greer, G. G.** (1998). Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle food: prospects and controversies. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 149–169.
- Sofos, J. N. & Smith, G. C.** (1998). Nonacid meat decontamination technologies: Model studies and commercial applications. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 171–188.
- Sofos, J. N., Belk, K. E. & Smith G. C.** (1999a). Processes to reduce contamination with pathogenic microorganisms in meat. Proceed. 45th Int. Congress of Meat Science and Technology, Yokohama, Japan. 45, 596-605. *pristupljeno 29/03/2010.* http://ansci.colostate.edu/files/meat_science/processes.pdf
- Sofos, J. N., Kochevar, S. L., Reagan, J. O. & Smith, G. C.** (1999b). Incidence of *Salmonella* on beef carcasses relating to the US meat and poultry inspection regulations. *Journal of Food Protection*, 62, 467-473.
- Sofos, J. N., Kochevar, S. L., Bellinger, G. R., Buege, D. R., Hancock, D. D., Ingham, S. C., Morgan, J. B., Reagan, J. O. & Smith, G. C.** (1999c). Sources and extent of microbiological contamination of beef carcasses in seven United States slaughtering plants. *Journal of Food Protection*, 62, 140-145.
- Sofos, J. N.** (Editor) (2005). Improving the Safety of Fresh Meat. Woodhead Publishing in Food Science and Technology, CRC Press, New York. (ISBN 978-1-85573-955-0).
- Sofos, J. N.** (2008). Challenges to meat safety in the 21st century. *Meat Science*, 78, 3-13.
- Sofos, J. N. & Geornaras, I.** (2010). Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science*, 86, 2-14.
- Stephens, T. P., Loneragan, G. H., Thompson, T. W., Sridhara, A., Branham, L. A., Pitchiah, S. & Brashears, M. M.** (2007). Distribution of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* on hide surfaces, the oral cavity, and in feces of feedlot cattle. *Journal of Food Protection*, 70, 1346-1349.
- Stephens, T. P., McAllister, T. A. & Stanford, K.** (2008). Development of an experimental model to assess the ability of *Escherichia coli* O157:H7-inoculated fecal pats to mimic a super shedder within a feedlot environment. *Journal of Food Protection*, 71, 648-652.
- Stopforth, J. D., Yoon, Y., Belk, K. E., Scanga, J. A., Kendall, P. A., Smith, G. C. & Sofos, J. N.** (2004). Effect of simulated spray chilling with chemical solutions on

acid habituated and non-acid-habituated *Escherichia coli* O157:H7 cells attached to beef carcass tissue. *Journal of Food Protection*, 67, 2099–2106.

Swanenburg, M., van der Wolf, P. J., Urlings, H. A., Snijders, J. M. & van Knapen, F. (2001). *Salmonella* in slaughter pigs: The effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 231–242.

Tutenal, A. V., Pierard, D., Van Hoof, J. & de Zutter, J. (2003). Molecular characterization of *Escherichia coli* O157 contamination routes in a cattle slaughterhouse. *Journal of Food Protection*, 66, 1564–1569.

Van Donkersgoed, J., Jericho, K. W. F., Grogan, H. & Horlakson, B. (1997). Preslaughter hide status of cattle and the microbiology of carcasses. *Journal of Food Protection*, 60, 1502-1508.

Vivas Alegre, L. & Buncic, S. (2004). Potential for use of hide-carcass microbial counts relationship as an indicator of process hygiene performance of cattle abattoirs. *Food Protection Trends*, 24, 814-820.

Vosough Ahmadi, B. (2007). Cost-effectiveness of *Escherichia coli* O157:H7 control in the beef chain. PhD-thesis Business Economics Group, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

Woerner, D. R., Ransom, J. R., Sofos, J. N., Dewell, G. A., Smith, G. C., Salman, M. D. & Belk, K.E. (2006). Determining prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle and beef from the feedlot to the cooler. *Journal of Food Protection*, 69, 2824-2827.

Biografija

Mr Dragan Antić je rođen 02. 08. 1977. godine u Surdulici. Osnovnu školu je završio u Bujanovcu, a Srednju poljoprivrednu školu, smer veterinarski tehničar, u Vranju 1996. godine.

Diplomirao je 2003. godine na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu. Magistarske studije je završio 2009. godine, na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu i odbranio magistarsku tezu pod naslovom "Mikrobiološki status kože goveda u kontekstu higijene mesa".

Boravio je na studijskim usavršavanjima na Univerzitetu u Bristolu, kao i u Istraživačkom centru za hrancu "Teagasc" u Dablinu. Trenutno se nalazi na trogodišnjem programu specijalizacije Evropskog koledža za veterinarsko javno zdravlje.

Učesnik je više domaćih naučnih projekata i trenutno EU FP6 projekta "ProSafeBeef". Autor je i koautor pet radova objavljenih u vrhunskim međunarodnim časopisima sa SCI liste, kao i desetak saopštenja na međunarodnim konferencijama na kojima je bio učesnik, sa ukupnim indeksom kompetentnosti preko 50.

Zaposlen je kao asistent na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, Departman za veterinarsku medicinu, na predmetu Higijena mesa.

Oženjen je i ima dvoje dece.