

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Medicina Veterinaria

Weterynaria

7(2) 2008



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Rada Programowa *Acta Scientiarum Polonorum*

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

Rada Naukowa serii *Medicina Veterinaria*

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

Korekta:

Ewa Jaworska
Elżbieta Winiarska-Grabosz
Janina Szydłowska

Łamanie

Teresa Alicja Chmura

Projekt okładki
Daniel Morzyński

ISSN 1644-0676

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,
Wrocław 2008

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

Nakład 220 + 16 egz. Ark. druk. 4,0
Druk i oprawa: Wydawnictwo Tekst Sp. z o.o.
ul. Kossaka 72, 85-307 Bydgoszcz

WYSTĘPOWANIE GENÓW OPORNOŚCI NA METYCYLINĘ W SZCZEPACH *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Jarosław Bystron, Elżbieta Lis, Jacek Bania, Jerzy Molenda

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Obecność szczepów *S. aureus* opornych na metycylinę (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA) stanowi poważny problem w ochronie zdrowia publicznego. Celem pracy było określenie obecności genu *mecA* wśród szczepów *S. aureus* wyizolowanych z kału ludzkiego oraz mleka krowiego. Materiał do badań stanowiło łącznie 160 szczepów *S. aureus*, w tym 68 wyosobnionych z surowego mleka krowiego oraz 92 szczepy pochodzące z kału. Obecność MRSA badano techniką PCR, poprzez oznaczanie genu *mecA* kodującego białko PBP2a o niskim powinowactwie do antybiotyków β -laktamowych. Spośród 92 szczepów *S. aureus* wyizolowanych z kału w 17 (18,5%) stwierdzono obecność genu *mecA*. Obecności genu *mecA* nie stwierdzono w żadnym ze szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka. Uzyskane wyniki wskazują, że ludzie są głównym źródłem szczepów MRSA.

Słowa kluczowe: *S. aureus*, MRSA, SCC*mec*

WSTĘP

Spośród wielu gatunków gronkowców *Staphylococcus aureus* uważany jest za najbardziej chorobotwórczy dla ludzi, będąc odpowiedzialnym za szereg szpitalnych i pozaszpitalnych zakażeń. *S. aureus* może być przyczyną chorób skóry (ropnie, trądzik), układu oddechowego (zapalenie gardła, oskrzeli, płuc), układu moczowego (zapalenie cewki moczowej, pęcherza), zapalenia szpiku i kości oraz posocznicy. Ponadto często występuje w produktach żywnościowych i jest główną przyczyną gronkowcowych zatruc pokarmowych. Wzrastająca antybiotykooporność szczepów *S. aureus* stanowi istotny problem w ochronie zdrowia publicznego. Obecność szczepów opornych na metycylinę (methicillin-resistant *S. aureus* – MRSA) stwierdzono już w 1961 r. i od tego czasu ich udział w ogólnej puli szpitalnych zakażeń gronkowcowych wciąż wzrasta [Jevons 1961, Normano i in. 2007]. We Włoszech, wśród wszystkich infekcji

gronkowcowych, przyczyną ponad 30% z nich są szczepy MRSA. W pozostałych krajach europejskich odsetek szczepów MRSA waha się od 10 do 60% i uzależniony jest od regionu, szpitala i oddziału szpitalnego [Voss i in. 1994]. Wewnątrzszpitalna transmisja szczepów MRSA, z człowieka na człowieka, uważana jest za główne źródło rozprzestrzeniania się patogenu [Corrente i in. 2005, Lowy 1998]. Transmisja MRSA poprzez żywność nie została dotychczas dokładnie przebadana, jednakże wielu badaczy potwierdza taką możliwość, ze względu na częste izolacje *S. aureus* z żywności [Normanno i in. 2005].

Celem pracy było określenie udziału MRSA wśród szczepów *S. aureus* wyizolowanych z kału ludzkiego oraz mleka krowiego. Obecność MRSA badano techniką PCR, poprzez oznaczenie genu *mecA* kodującego białko PBP2a o niskim powinowactwie do antybiotyków β -laktamowych. Szczepy *S. aureus* produkujące białko PBP2a są odporne na wszystkie antybiotyki β -laktamowe.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło łącznie 160 szczepów *S. aureus*, w tym 68 wyosobnionych z surowego mleka krowiego oraz 92 szczepy – z kału ludzi badanych w Laboratorium Bakteriologii i Immunologii Dolnośląskiego Centrum Pediatrii we Wrocławiu. Bakterie wyosobnione z kału pochodziły od osób z objawami dysfunkcji układu pokarmowego (biegunka, bóle brzucha). Szczepy wyizolowane z mleka surowego pochodziły od krów nie wykazujących klinicznych objawów mastitis. Mleko do badań pobierano przez okres 1 roku, z 6 obór zlokalizowanych w okolicy Wrocławia.

Przynależność gatunkową określano na podstawie zdolności produkcji przez badane szczepy koagulazy wolnej i związanej (clumping factor), a następnie, w celu potwierdzenia wyniku, oznaczano w nich obecność genu termonukleazy (*nuc*). Szczepy *S. aureus* badano metodą multiplex-PCR, wykorzystując technikę opracowaną przez Boye i wsp. [2007], w celu wykazania u nich obecności pięciu głównych typów SCC*mec* (Staphylococcal Cassete Chromosome *mec*).

Całkowity DNA izolowano z 1 ml kultury bakteryjnej prowadzonej w płynnej pożywce. Bakterie po odwirowaniu zawieszano w 100 μ l wody, po czym dodawano 100 μ l 2% roztworu Tritonu X-100. Mieszaninę inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej, a przez kolejne 10 min we wrzącej łaźni wodnej. Następnie wirowano przy 13 000 \times g przez 5 min. Płyn nad osadu zawierał roztwór DNA.

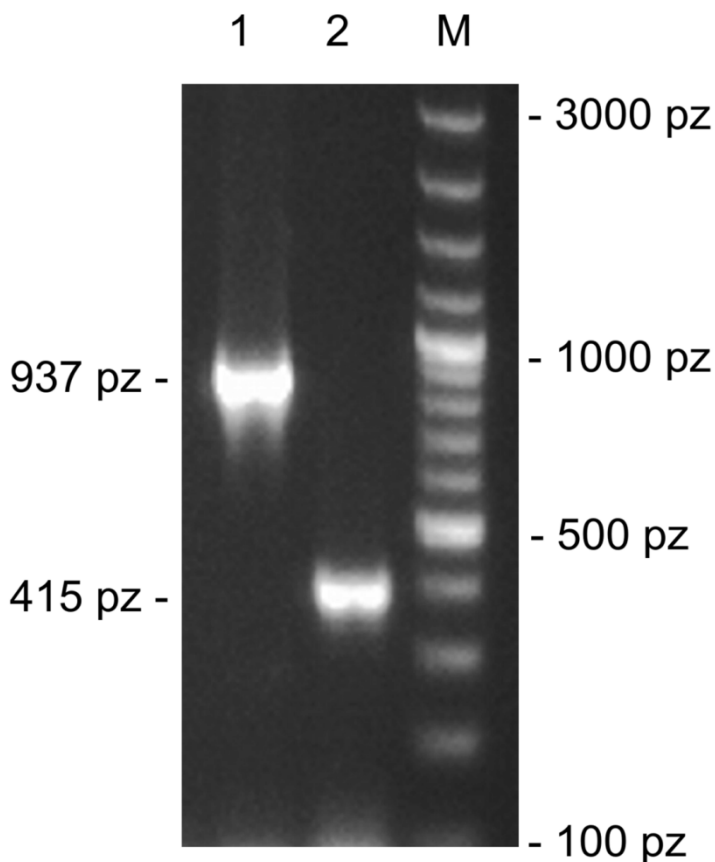
Detekcję genów SCC*mec* prowadzono w 25 μ l mieszaniny zawierającej: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 4 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, startery β i α 3 w stężeniach 0,2 μ M, startery ccrCF i ccrCR w stężeniach 0,25 μ M, startery 1272F1 i 1272R1 w stężeniach 0,08 μ M, startery 5R*mecA* i 5R431 w stężeniach 0,1 μ M, 1 μ l DNA oraz 1 jednostkę polimerazy DNA. Przeprowadzono 30 cykli PCR: w 94°C przez 30 s, w 55°C przez 30 s oraz w 68°C przez 60 s. Produkty PCR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym.

WYNIKI

Spośród 92 szczepów *S. aureus* wyizolowanych z kału w 17 (18,5%) stwierdzono obecność genu *mecA*. Natomiast w żadnym spośród 68 badanych szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka nie stwierdzono obecności genu *mecA*.

Obecnie wyróżnia się 5 głównych typów SCCmec. W zastosowanej w badaniach własnych, opracowanej przez Boye i wsp. [2007], metodzie – podziału typów *mecA* dokonuje się na podstawie analizy wielkości produktów PCR. Typy I, II i III zawierają po jednym produkcie PCR o masie odpowiednio: 415 pz, 937 pz oraz 518 pz. SCCmec typu IV i V zawierają po dwa produkty PCR o masach odpowiednio: 937 pz i 415 pz oraz 518 pz i 359 pz.

W tej pracy wszystkie MRSA zaklasyfikowane zostały do typu I lub II SCCmec (rys. 1). Wśród nich 11 szczepów (65%) należało do typu I SCCmec, a pozostałych 6 szczepów (35%) zakwalifikowano do typu II.



Rys. 1. Elektroforetyczny obraz rozdzielenia produktów PCR ze szczepów *S. aureus* pochodzących z kału. W ścieżce 1 widoczny jest produkt o wielkości 937 pz, świadczący o obecności kasety SCCmec typu II w genomie badanego szczepu *S. aureus*. W ścieżce 2 widoczny jest produkt o wielkości 415 pz, świadczący o obecności kasety SCCmec typu I w genomie badanego szczepu *S. aureus*. M – drabinka wielkości DNA 100 bp plus (Fermentas).

Fig. 1. Electrophoretic resolution of PCR products from fecal *S. aureus* strains. Lane 1 show a 937-bp product, illustrating the presence of SCCmec type II cassette in genome of investigated *S. aureus* strain. Lane 2 show a 415-bp product, illustrating the presence of SCCmec type I cassette in genome of investigated *S. aureus* strain. M – DNA ladder 100 bp plus (Fermentas).

DYSKUSJA

Wewnątrzszpitalna transmisja szczepów MRSA, z człowieka do człowieka, uważana jest za główne źródło ich rozprzestrzeniania [Bhalla i in. 2007, Lowy 1998]. Możliwość przenoszenia się MRSA poprzez żywność nie została dotychczas rzetelnie udokumentowana, jednakże coraz większa liczba doniesień potwierdza taką ewentualność, ze względu na stwierdzane izolacje patogenu z żywności [Kwon i in. 2005, Moon i in. 2007, Normanno i in. 2007, Van Loo i in. 2007]. W badaniach przeprowadzonych w Korei Płd. szczepy MRSA stanowiły 0,18% wśród *S. aureus* wyizolowanych z surowego mleka krowiego i wszystkie należały do typu IV SCCmec [Kwon i in. 2005]. Z kolei Moon i in. [2007], przeprowadzając podobne doświadczenia także w Korei Płd., stwierdzili, że 2,5% szczepów *S. aureus* z mleka było opornych na metycylinę. Obecność *S. aureus* posiadających gen *mecA* wykazano również u 3,75% izolatów pochodzących z mleka krowiego i produktów mlecznych badanych we Włoszech [Normanno i in. 2007]. Szczepy *S. aureus* odporne na metycylinę izolowano nie tylko z surowego mleka, ale także z innych surowych produktów żywnościowych. Kitai i in. [2005] wśród 444 próbek mięsa drobiowego badanego w Japonii w 2 (0,45%) stwierdzili obecność szczepów MRSA. Z kolei badania przeprowadzone w Holandii wykazały obecność MRSA w 2,5% badanych próbek surowego mięsa wieprzowego i wołowego [Van Loo i in. 2007]. Ponadto udowodniono, że przyczyną gronkowcowego zatrucia pokarmowego niewielkiej grupy osób w stanie Tennessee, USA, były szczepy MRSA pochodzące z grilowanego mięsa wieprzowego [Jones i in. 2002].

W badaniach własnych, przeprowadzonych na puli 68 szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka, nie stwierdzono obecności ani jednego szczepu posiadającego gen *mecA*. Natomiast aż 18,5% *S. aureus* pochodzenia kałowego posiadało ten gen, co potwierdza tezę, że głównym źródłem MRSA są ludzie.

PODSUMOWANIE

Z przytoczonych danych oraz badań własnych wynika, że podstawowym rezerwuarem oraz przypuszczalnym transmitterem MRSA są ludzie.

Z kolei rozprzestrzenianie się szczepów opornych na metycylinę poprzez żywność – jak się obecnie wydaje – stanowi nieznaczne niebezpieczeństwo ze względu na niewielki odsetek ich izolacji. Z drugiej jednak strony, dopiero od niedawna zwrócono uwagę na żywność jako źródło MRSA, dlatego uzyskanie odpowiedzi o rzeczywistej roli żywności w transmisji metycylino-opornych szczepów wymaga podjęcia dalszych badań.

PIŚMIENNICTWO

- Bhalla A., Aron D.C., Donskey C.J., 2007. *Staphylococcus aureus* intestinal colonization is associated with increased frequency of *S. aureus* on skin of hospitalized patients. *Infect Dis*, 7, 1471–1478.
- Boye K., Bartels M.D., Andersen I.S., Moller J.A., Westh H., 2007. A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I–V. *Clin Microbiol Infect*, 13, 725–727.

- Corrente M., Monno R., Totano M., Martella V., Buonavoglia D., Rizzo C., Ricci D., Rizzo G., Buonavoglia C., 2005. Characterization of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated at the Policlinico Hospital of Bari (Italy). *The New Microbiologica*, 28, 57–65.
- Jevons M.P., 1961. Celbenin-resistant staphylococci. *British Medical Journal*, 1, 24–25.
- Jones T.F., Kellum M.E., Porter S.S., Bell M., Schaffner W., 2002. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*, 8 (1), 82–84.
- Kitai S., Shimizu A., Kawano J., Sato E., Nakano C., Uji T., Kitagawa H., 2005. Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. *J Vet Med Sci*, 67, 107–110.
- Kwon N.H., Park K.T., Moon J.S., Jung W.K., Kim S.H., Kim J.M., Hong S.K., Koo H.C., Joo Y.S., Park Y.H., 2005. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC*mec* subtype IVa isolated from bovine milk in Korea. *J Antimicrob Chemother*, 56, 624–632.
- Lowy F.D., 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 339, 520–531.
- Moon J.S., Lee A.R., Kang H.M., Lee E.S., Kim M.N., Paik Y.H., Park Y.H., Joo Y.S., Koo H.C., 2007. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *J Dairy Sci.*, 90 (3), 1176–1185.
- Normanno G., Corrente M., La Sandra G., Dambrosio A., Quaglia N.C., Parisi A., Greco G., Bellacicco A.L., Virgilio S., Celano G.V., 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in foods of animal origin product in Italy. *Int J Food Microbiol*, 117, 219–222.
- Normanno G., Firinu A., Virgilio S., Mula G., Dambrosio A., Poggiu A., Decastelli L., Mioni R., Scuota S., Bolzoni G., Di Giannatale E., Salinetti A.P., La Sandra G., Bartoli M., Zuccon F., Pirino T., Sias S., Parisi A., Quaglia N.C., Celano G.V., 2005. Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in foods products marketed in Italy. *Int J Food Microbiol*, 98, 73–79.
- Van Loo I., Diederer B., Savelkoul P., Woudenberg J., Roosendaal R., Van Belkum A., Den Toom N., Verhulst C., Van Keulen P., Kluytmans J., 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*, 13 (11), 1753–1755.
- Voss A., Milatovich D., Wallrauch-Szwarz C., Rosdahl V.T., Braveny I., 1994. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 13, 50–55.

OCCURENCE OF METHICILLIN-RESISTANT GENES IN STAPTYLOCOCCUS AUREUS STRAINS

Abstract. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains are a global health concern. The aim of this study was determination of the occurrence of *mecA* gene among *S. aureus* strains isolated from milk and human carriers. The investigations were carried out on a total of 68 *S. aureus* strains from milk and 92 *S. aureus* isolated from faecal swabs. PCR-detection of *mecA* gene encoding penicillin binding protein (PBP2a) with a low affinity for β -lactams allowed discrimination of MRSA. Among 92 fecal *S. aureus* strains 17 (18,5%) possessed *mecA* gene. No milk-derived strains possessed *mecA* gene. The results confirm that humans are the primary source of MRSA strains.

Key words: *Staphylococcus aureus*, MRSA, SCC*mec*

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2008

Do cytowania – For citation: Bystróż J., Lis E., Bania J., Molenda J., 2008. Występowanie genów oporności na metycylinę w szczepach *Staphylococcus aureus*. Acta Sci. Pol. Med. Vet. 7(2), 3–7.

POLYPHENOLS AND ANTIOXIDATIVE CAPACITY OF EXTRACTS FROM SELECTED SLOVAKIAN PLANTS*

Slavomír Marcinčák, Peter Popelka, Lýdia Šoltysová
University of Veterinary Medicine, Košice

Abstract. Antioxidative activity and total phenolics content in methanol extracts from 10 selected plants currently available in our region were observed in this experiment. Obtained results present antioxidative activity of majority from selected plants. The most significant antioxidative effect was determined in extracts of *Origanum vulgare* L., *Melissa officinalis* L., and *Agrimonia eupatoria* L. These three extracts have the highest content of polyphenols and plants can be used also in practice. The lowest activity and lowest content of total phenols was recorded in extract of *Crataegus oxyacantha* L., it neither means its using in industry as an antioxidant is nor recommended.

Key words: antioxidative activity, plant antioxidants, total phenols

INTRODUCTION

Oxidation is reaction with atmospheric oxygen and it is performed by chain radical mechanism. Oxidation is significantly accelerated with temperature and ultraviolet radiation at producing of hydro peroxides. Reactive oxygen-centred species are diverse compounds which are believed to play a cardinal role in aetiology and pathogenesis of various chronic diseases, premature ageing [Kosar et al. 2005] and the oxidative deterioration of foodstuffs [Fasseas et. al. 2007, Bystrický and Dičáková 1998]. Free radicals are very unstable and reactive substances, they seek for other electrons to create a new pairs which attack cells of organism. Antioxidants are substances, which suppress destructive activity of free radicals. They protect fat components against devastating effect of oxygen. Few couples of antioxidant molecules are able to neutralise lot of molecules of free radicals. Antioxidants inhibit self-acting oxidation of food whereby contribute to retention of original physical and chemical properties. From these reasons

* The study was supported by grant VEGA No. 1/0235/08

they are added to food [Karwowska and Dolatowski 2007, Sikora et al. 2008, Marcinčák et al. 2008], which are above-average damaged by oxidation (meat and meat products, vegetable oils). Consumption of these foods has positive effect on human health through inhibition of oxidation. Antioxidants can be divided for natural and synthetic. Incorporation of synthetic antioxidants such as butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) tertiary-butyl hydroquinone (TBHQ), and propyl gallate (PG) into foods can retard lipid oxidation. However, the use of synthetic antioxidants in food products is under strict regulation due the potential health hazards caused by such compounds [Juntachote et al. 2007]. Modern consumer would like to board healthy, therefore natural antioxidants are preferred over synthetic ones. Several natural antioxidants are contained in plants and spices, which are daily used in the kitchen. They have not only antioxidative effect, but they presence in food also improve organoleptic properties. In our experiment, we have focused on 10 plants normally growing in our region (agrimony, lemon balm, sage, oregano, thyme, meadow crane's-bill, knotgrass, savory, common yarrow, hawthorn). The aim of this experiment was determination of antioxidative activity and total amount of phenolic compounds in methanol extracts of plants prepared in our laboratory.

MATERIAL AND METHODS

The Folin-Ciocalteu, Gallic acid, and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinham, Germany). Methanol was from Merck (Darmstadt, Germany). All standards were prepared as stock solutions in methanol.

All plants (Table 1) were collected from East region of Slovakia at different vegetation phase during May – August 2007. Samples were air dried at 25°C in the dark. All samples were analysed within 6 months of collection.

Table 1. Plants used in experiment

Tabela 1. Rośliny wykorzystane w eksperymencie

Common name	Latin name of plant	Part examined	Recovery of extraction
Agrimony	<i>Agrimonia eupatoria</i> L.	leaves	15.8
Lemon balm	<i>Melissa officinalis</i> L.	leaves	12.0
Sage	<i>Salvia officinalis</i> L.	leaves	11.4
Oregano	<i>Origanum vulgare</i> L.	leaves and flowers	16.4
Thyme	<i>Thymus serpyllum vulgaris</i> L.	leaves and flowers	13.2
Meadow Crane's-bill	<i>Geranium pratense</i> L.	Leaves and flowers	11.2
Knotgrass	<i>Polygonum aviculare</i> L.	herb	7.8
Common yarrow	<i>Achillea millefolium</i> L.	flowers	7.4
Savory	<i>Satureja hortensis</i> L.	leaves	13.2
Hawthorn	<i>Crataegus oxyacantha</i> L.	herb	16.2

Production of methanol extracts

Extraction of plants with methanol was performed according to Miliauskas et al. [2003]. 30 g dried plants (agrimony, lemon balm, sage, oregano, thyme, meadow crane's-bill, knotgrass, savory, common yarrow, hawthorn) were ground in mixer for a powder. Extraction was carried out in two steps. Into the 250 ml flask, 10 g of plant powder and 50 ml of methanol was added and mixture was extracted for 2 hours at permanent mixing. Within 2 hours methanol extract was transferred to the next flask and other 50 ml of methanol was added to plant sample and mixture was extracted for other 2 hours. Consequently, extracts were mixed together; they were filtered and evaporated in vacuum evaporator at 40°C. Extracted part was weighted and recovery calculated and then deposit solutions of individual plant extracts at concentration 10 mg.ml⁻¹ were prepared.

Determination of antioxidative capacity

Ability of plant extracts capture free radicals against stability of DPPH· radical (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) was measured spectrophotometrically [Heilerová et al. 2003]. Change of colour was measured at 515 nm on UV-spectrophotometer (Helios γ v 4.6, Thermospectronic, Great Britain).

Individual extracts of plants were every day, before analysis, diluted with methanol in portion 1:25 from deposit solution. Solution of DPPH· in methanol (0.1 μM) was prepared every day before analysis. 3.9 ml of this solution was pipetted into 1 cm thick cuvette and extinction was measured (absorbance) at 515 nm (A₀). Consequently, 100 μl of plant extract was added, mixed and measured at 515 nm in 1 minute intervals until 10th minute of analysis (A_A). Ability of plant extracts capture free radicals was calculated according to formula:

$$\% \text{ inhibition} = [(A_0 - A_A) / A_0] \times 100$$

where: A₀ – absorbance of blank (t = 0 min.)
A_A – absorbance of tested sample (t = 10 min)

Determination of total phenolics content of plant extracts

Concentration of total phenols was determined by the Folin-Ciocalteu assay [Singleton et al. 1999]. One ml of diluted extract (1:25 or 1:50) in 25 ml flask was mixed with 5 ml FC-reagent (diluted 1:10 with distilled water) and 4 ml Na₂CO₃ (75 g.l⁻¹). Within 30 minutes of incubation at room temperature absorbance was measured on UV-spectrophotometer (Helios γ v 4.6, Thermospectronic, Great Britain) at 765 nm against blank. Results were expressed as gallic acid equivalents (GAE, mg·g⁻¹). A calibration curve of absorbance vs. concentration of gallic acid was used to derive the GAE of dried plants.

RESULTS AND DISCUSSION

Antioxidative capacity of plant extracts was evaluated using DPPH free radical method. DPPH· is a stable radical showing a maximum absorbance at 515 nm. Reaction of DPPH· radical with antioxidative substances, which are donors of hydrogen cause its reduction. Change of colour (from dark violet to light yellow) is a consequence of this reaction. Because of the ease and convenience of this reaction, it now has widespread

use in free radical-scavenging assessment [Erkan et al. 2008, Capecka et al. 2005, Proestos et al. 2008].

Results of determination of antioxidative capacity are showed in Table 2. The highest percentage of inhibition exhibit methanol extracts of oregano, lemon balm and meadow crane's-bill (95.2, 91.2, 88.30%). The really good capturing activity exhibits also agrimony and hawthorn. Thyme, savory, sage and knotgrass demonstrate lower antioxidative activity, but their values are not less than 40%. The lowest activity showed common yarrow (14.3%).

Total phenolics content in the methanol extracts of plants (Table 2) was determined spectrophotometrically applying the Folin-Ciocalteu assay and it ranged from 25.3 to 262.1 gallic acid equivalents (GAE, $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$). The highest content was recorded in extract of oregano ($262.1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$). High content of phenols was determined in extracts of lemon balm, agrimony and hawthorn (249.8, 244.3, $179.2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$). The lowest content of total phenols show extract from common yarrow ($25.3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$). Similar results were obtained also by Ivanová et al. [2005], when at evaluation of 21 plants, the highest amount of total phenols was determined in extracts of oregano. They also stated that lemon balm and agrimony are plants with high antioxidative potentiation. Heilerová et al. [2004] indicate significantly higher antioxidative activity of oregano and lemon balm in comparison with agrimony and thyme. However, not methanol, but water extracts of plants were used for determination. Lower amount of antioxidative substances can be caused, because of different extracting agent (water).

Table 2 Determination of antioxidative capacity (%) and total phenolics content ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) in methanol extracts of plants

Tabela 2. Właściwości antyoksydacyjne (%) i całkowita zawartość fenoli ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) metanolowych ekstraktów roślin

Plant extract	Antioxidative capacity (%)	Total phenolics ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
Agrimony	85.20	179.2 ± 2.4
Lemon balm	91.20	249.85 ± 5.3
Sage	52.30	79.3 ± 1.1
Oregano	95.20	262.1 ± 3.3
Thyme	56.60	115.1 ± 3.2
Meadow Crane's-bill	88.30	138.6 ± 5.4
Knotgrass	40.30	43.0 ± 0.5
Common yarrow	14.30	25.3 ± 0.2
Savory	50.30	94.7 ± 1.5
Hawthorn	78.90	244.3 ± 1.2

CONCLUSION

The result of this study shows that methanol plant extracts contain natural antioxidants, which are believed to be nutrients in the prevention of free radicals. These extracts, possibly mainly due to their phenolic content, retard oxidative degradation of lipids as it is shown in DPPH· assay. Methanol extracts of *Origanum vulgare* and *Melissa officinalis* were the strongest radical scavengers in DPPH· assay among the plants screened. High content of total phenols was determined in extracts of *Origanum vulgare*, *Melissa officinalis*, *Agrimonia eupatoria* and *Crataegus oxyacantha*. The amount of total phenolic compounds in investigated plant extracts in most cases correlated with their antiradical activity.

REFERENCES

- Bystrický P., Dičáková Z., 1998. Animal lipids in foods. Slov. Vet. J., 23, Supplementum 1, 1–45.
- Capecka E., Mareczek A., Leja M., 2005. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. Food Chem., 93, 223–226.
- Erkan N., Ayranci G., Ayranci E., 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. Food Chem., 110, 76–82.
- Fasseas M.K., Mountzouris K.C., Tarantilis P.A., Polissiou M., Zervas G., 2007. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. Food Chem., 106, 1188–1194.
- Heilerová L., Bučková M., Tarapčík P., Šilhár S., Labuda J., 2003. Comparison of antioxidative activity data for aqueous extracts of lemon balm (*Melissa officinalis* L), oregano (*Origanum vulgare* L), thyme (*Thymus vulgaris* L) and agrimony (*Agrimonia eupatoria* L) obtained by conventional methods and the DNA- based biosensor. Czech J. Food Sci., 21, 2, 78–84.
- Ivanová D., Gerova D., Chervekov T., Yankova T., 2005. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. J. Ethnopharmacol., 96, 145–150.
- Juntachote T., Berghofer E., Siebenhandl S., Bauer F., 2007. Antioxidative effect of added dried Holy basil and its ethanolic extract on susceptibility of cooked ground pork to lipid oxidation. 2007. Food Chem., 100, 129–135.
- Karwowska M., Dolatowski Z.J., 2007. The effect of natural antioxidants on the oxidative processes in beef. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment., 6, 1, 17–25.
- Kosar M., Dorman H.J.D., Hiltunen R., 2005. effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. Food Chem., 91, 525–533.
- Marcinčák S., Cabadaj R., Popelka P., Šoltýsová L., 2008. Antioxidative effect of oregano supplemented to broilers on oxidative stability of poultry meat. Slov. Vet. Res., 45, 2, 63–68.
- Milliauskas G., Venskutonis P.R., van Beek T.A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chem. 85, 231–237.
- Proestos Ch., Bozairos S.I., Kapsokefalou M., Komaitis M., 2008. Natural antioxidant constituents from selected aromatic plants and their antimicrobial activity against selected pathogenic microorganisms. Food Tech. Biotechnol., 46, 2, 151–156.
- Sikora E., Ciešlik E., Topolska K., 2008. The sources of natural antioxidants. Acta Sci Pol., Technol. Aliment., 7, 1, 5–17.
- Singleton V.I., Ortofer R., Lamuela R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substances and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent [in:] Methods in Enzymology. Ed L. Packer. Academic Press, Orlando, 152–178.

ZAWARTOŚĆ POLIFENOLI I ANTYOKSYDACYJNE WŁAŚCIWOŚCI EKSTRAKTÓW WYBRANYCH SŁOWACKICH ROŚLIN

Streszczenie. Przedmiotem badań była antyoksydacyjna aktywność i ogólna zawartość związków fenolowych w metanolowych ekstraktach 10 wybranych roślin, występujących w okolicy Koszyc. Największą antyoksydacyjną aktywność wykazywały ekstrakty *Origanum vulgare L.*, *Melissa officinalis L.* oraz *Agrimonia eupatoria L.* W tych trzech ekstraktach stwierdzono także najwyższą zawartość polifenoli, więc rośliny te mogą być stosowane w przetwórstwie żywności. Najśłabszą aktywność antyoksydacyjną i najmniejszą zawartość fenoli stwierdzono w ekstrakcie *Crataegus oxyacantha L.*, zatem nie można polecać używania go jako antyoksydanta w przemysłowej produkcji żywności.

Słowa kluczowe: aktywność antyoksydacyjna, antyoksydanty roślinne, ogólna zawartość fenoli

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.06.2008

For citation – Do cytowania: Marcinčák S., Popelka P., Šoltysová L., 2008. Polyphenols and antioxidative capacity of extracts from selected slovakian plants. *Acta Sci. Pol. Med. Vet.* 7(2), 9–14.

ZAGROŻENIA BEZPIECZEŃSTWA ŻYWNOŚCI POWODOWANE CZYNNIKAMI ZOONOTYCZNYMI

Jan Uradziński, Beata Wysok

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Streszczenie. Choroby odżywnościowe są wynikiem spożywania zanieczyszczonych pokarmów. Jest wiele możliwości prowadzących do kontaminacji żywności podczas jej wytwarzania i dystrybucji. Liczne patogeny są obecne w organizmie zdrowych zwierząt rzeźnych, a mięso zostaje zanieczyszczone podczas ich uboju i obróbki poubojowej. Ponadto drobnoustroje mogą zostać wprowadzone przez osoby zakażone (nosicieli), które przygotowują posiłki. Większość chorób odżywnościowych jest powodowana przez różne bakterie, wirusy czy pasożyty. Zatrucia/zakażenia pokarmowe mają różne objawy, przy czym bakterie czy ich toksyny wnikają przede wszystkim przez przewód pokarmowy, stąd pierwsze objawy to biegunka, nudności, wymioty i ból brzucha. Znaczącą rolę w zatruciach/zakażeniach pokarmowych u ludzi odgrywają pałeczki *Salmonella*, bakterie rodzaju *Campylobacter*, *Staphylococcus* sp. oraz *Escherichia coli*, zwłaszcza serotyp O157.

Słowa kluczowe: choroby odżywnościowe, *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli* O157

WSTĘP

Bezpieczeństwo żywności, zwłaszcza produktów pochodzenia zwierzęcego, jest coraz bardziej znaczącym zagadnieniem przy rozpatrywaniu zdrowia człowieka. Dostępność bezpiecznej żywności jest podstawowym prawem człowieka. Swobodny przepływ bezpiecznej i zdrowej żywności jest ważnym aspektem rynku wewnętrznego i przyczynia się znacząco do zdrowia i ogólnego dobra obywateli oraz do ich interesów socjalnych i gospodarczych. Jednocześnie ze wzrostem spożycia produktów pochodzenia zwierzęcego zwiększa się również potencjalne ryzyko chorób odżywnościowych u ludzi. Zatrucia/zakażenia pokarmowe są to choroby wywołane spożyciem pokarmów zawierających chorobotwórcze mikroorganizmy, toksyny, pasożyty lub zanieczyszczenia chemiczne. W znaczący sposób wpływają one nie tylko na zdrowie i życie człowieka,

Adres do korespondencji – Corresponding author: Jan Uradziński, Zespół Higieny Produktów Zwierzęcych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Ul. Oczapowskiego 14, 10-957 Olsztyn, e-mail:jan.uradzinski@uwm.edu.pl

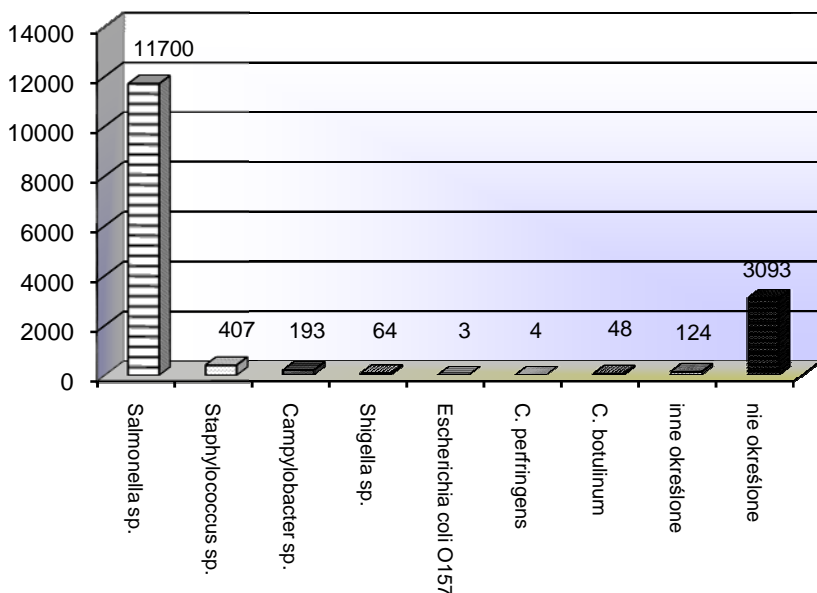
lecz mają także ekonomiczne konsekwencje dla jednostki, rodziny, społeczeństwa i państwa. Schorzenia te stanowią poważny ciężar dla systemu opieki zdrowotnej i znacznie obniżają jej ekonomiczne możliwości. Choroby odżywczościowe uważane są obecnie za jeden z najważniejszych problemów zdrowotnych w świecie.

W swojej opinii na temat chorób odzwierzęcych, przyjętej dnia 12 kwietnia 2000 r., Komitet Naukowy ds. Środków Weterynaryjnych dotyczących Zdrowia Publicznego uznał, że stosowane dotychczas środki zwalczania chorób odzwierzęcych, przenoszonych przez żywność, są niewystarczające. Stwierdził również, że dane epidemiologiczne, zbierane przez Państwa Członkowskie, nie były kompletne i w pełni porównywalne.

Zgodnie z Dyrektywą Nr 2003/99/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 17 listopada 2003 r. do chorób odzwierzęcych i odzwierzęcych czynników chorobotwórczych, które mają być objęte monitorowaniem, należą:

- brucelozę i jej czynniki chorobotwórcze,
- kamylobakteriozę i jej czynniki chorobotwórcze,
- bąblowicę i jej czynniki chorobotwórcze,
- listeriozę i jej czynniki chorobotwórcze,
- salmonellozę i jej czynniki chorobotwórcze,
- włośnicę i jej czynniki chorobotwórcze,
- gruźlicę wywołaną *Mycobacterium bovis*,
- werocytotoksyczne *Escherichia coli*.

Częstotliwość wywoływania zatruc/zakażeń pokarmowych, zarejestrowanych w naszym kraju w minionym roku, przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Zatrucia i zakażenia pokarmowe zarejestrowane w Polsce w 2007 roku (PZH, Meldunek roczny 2007)

Fig. 1. Foodborne diseases in Poland in 2007

Zakażenia pokarmowe wywołane przez pałeczki *Salmonella*

Wśród wymienionych wyżej czynników bakteryjnych najczęstszą przyczyną zachorowań są pałeczki *Salmonella*. Pod nazwą rodzajową *Salmonella* kryją się dziesiątki odmian bakterii, których klasyfikacja nieustannie się zmienia. Systematyka zaproponowana przez Michela-Yvana Popoff'a i L. Le Minor'a [1987] rozróżnia dwa gatunki: *Salmonella bongori*, który jest rzadko spotykany, i o wiele powszechniejszy, *Salmonella enterica*. Ten ostatni podzielony został na sześć podgatunków. Niektóre serowary *Salmonella enterica* (*Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi) są przyczyną groźnych chorób ludzi zwanych durami (dur brzuszny, dur rzekomy). Na szczęście, rosnący poziom higieny znacznie ograniczył zakażenia tymi drobnoustrojami [Molenda 1999]. W żywności natomiast spotyka się coraz częściej serowary – *Salmonella* Enteritidis oraz *Salmonella* Typhimurium. Bakterie te są szeroko rozpowszechnione w środowisku, a ich głównym miejscem występowania jest przewód pokarmowy zwierząt domowych i dzikich. Pojawiają się w mięsie wieprzowym i wołowym, drobiu, mleku i produktach nabiałowych czy jajach. Objawy zakażenia występują najczęściej po 7–72 godz. i należą do nich: bóle głowy, dreszcze, gorączka, kurczowe bóle brzucha, biegunka i niekiedy wymioty. Przy umiarkowanym przebiegu choroba trwa od 5 do 7 dni, kiedy to następuje stopniowe zanikanie objawów. Po przebyciu choroby pałeczki *Salmonella* mogą być wydalane z kałem przez kilka tygodni lub miesięcy i mogą zakażać otoczenie. W ciężkiej postaci może dojść do uogólnienia się procesu chorobowego, pojawia się niepokój, zawroty głowy, skurcze mięśni, śpiączka i śmierć – ponad 4% przypadków zakażeń [Molenda 1999].

Zakażenia pokarmowe wywołane przez bakterie rodzaju *Campylobacter*

W ostatnich latach nastąpił ogromny wzrost liczby zakażeń pokarmowych, których przyczyną są bakterie rodzaju *Campylobacter*, głównie gatunki *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli*. Liczba zarejestrowanych na całym świecie zachorowań wywołanych tym patogenem – to prawie pół miliarda rocznie. Wywołuje schorzenia układu pokarmowego (zwłaszcza w krajach uprzemysłowionych) częściej niż pałeczki *Salmonella* i *Shigella*, które dotąd przodowały w statystykach epidemiologicznych.

Źródłem zakażenia szczepami *Campylobacter* sp. dla człowieka mogą być głównie zwierzęta, żywność, a także środowisko (gleba i woda). Szerokie występowanie *Campylobacter* sp. w populacji zwierzęcej niesie ze sobą ryzyko zanieczyszczenia produktów żywnościowych, takich jak surowe mięso i mleko oraz woda [Wieczorek i in. 2005]. Badania przeprowadzone przez Wysok [2008] wskazują, że ok. 55% tuszek i narządów wewnętrznych drobiu rzeźnego przekazywanych do handlu czy przetwórstwa jest zanieczyszczona bakteriami rodzaju *Campylobacter*. Tak wysoki stopień kontaminacji mięsa drobiu wynika z częstego nosicielstwa tego patogenu. *Campylobacter* sp. w badaniach własnych wykazano w 100% próbek jelit ślepych brojlerów kurzych, 84% gęsi i 60% indyków. Do infekcji u ludzi dochodzi w wyniku pobrania wraz z pokarmem żywych bakterii. Dawka infekcyjna dla człowieka jest stosunkowo niska, wynosi 5–500 komórek, dlatego do zakażenia ludzi dochodzi stosunkowo łatwo i często [Hu i in. 1999]. Okres inkubacji może wahać się od 1 do 7 dni, zależnie od liczby spożytych komórek bakteryjnych i wrażliwości osobniczej. Najczęściej wynosi on 24–48 godz., jednakże okres inkubacji może ulec wydłużeniu, gdy infekcja spowodowana jest stosunkowo niską liczbą bakterii, ponieważ wcześniej muszą one namnożyć się w organizmie gospodarza, by następnie wywołać objawy kliniczne. Z tego powodu nie

wszystkie zakażenia pokarmowe przebiegają z wyraźnymi objawami klinicznymi [Taylor i in. 1988].

W większości przypadków choroba ma łagodny przebieg, a całkowite wyzdrowienie następuje w przeciągu 3–10 dni, jednak komórki *Campylobacter* sp. wydalone są jeszcze z kałem przez okres 7–21 dni, a czasami nawet dłużej. Charakterystyczne objawy zakażenia to biegunka, podwyższona temperatura wewnętrzna ciała oraz bóle brzucha. W ostrych stanach choroba jest zwykle błędnie diagnozowana jako ostre zapalenie wyrostka robaczkowego. W takich przypadkach konieczna jest hospitalizacja [Dzierżanowska i in. 1988, Philips 1995]. W przebiegu infekcji wywoływanych przez *Campylobacter* sp. obserwuje się dwa rodzaje biegunki: zapalną biegunkę śluzową przebiegającą z gorączką, a stolce często zawierają krew i leukocyty oraz biegunkę niezapalną z wodnistymi stolcami bez obecności krwi i leukocytów [Wassenaar 1997]. Bóle brzucha są wynikiem przenikania komórek *Campylobacter* sp. przez błonę śluzową jelit i ich proliferacji w warstwie podśluzowej właściwej oraz węzłach chłonnych krezkowych. Opisane objawy rzadko występują łącznie w obrazie klinicznym choroby.

W krajach rozwijających się infekcje *Campylobacter* sp. są niezwykle powszechne, szczególnie we wczesnym dzieciństwie; pięć do dziesięciu przypadków nawrotu choroby może pojawić się w ciągu pierwszych dwóch lat życia [Calva i in. 1988, Taylor i in. 1993].

Sporadycznie, szczególnie w grupach podwyższonego ryzyka (YOPI tj.: young, old, pregnant, immunocompromised – tzn. dzieci, osoby starsze, kobiety w ciąży i osoby z obniżoną odpornością), może dojść do groźnych w skutkach powikłań. Należą do nich: bakteriemia, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zaburzenia neurologiczne (Guillain-Barré Syndrom, Miller-Fisher Syndrome), odczynowe zapalenie stawów itp. [Ang i in. 2000].

Zatrucia pokarmowe wywołane przez bakterie rodzaju *Staphylococcus*

Kolejnym patogenem związanym z zatruciami odżywnościowymi jest *Staphylococcus* species. Gronkowce to gram-dodatnie ziarenkowce, występujące w nieregularnych groniastych skupiskach w skutek wielokrotnych podziałów bez oddzielania się potomnych komórek. Do najczęściej spotykanych gatunków rodzaju *Staphylococcus* należą: *Staphylococcus aureus* odpowiedzialny za zatrucia pokarmowe u ludzi, *Staphylococcus epidermidis*, wywołujący zakażenia u osób z obniżoną odpornością oraz *Staphylococcus saprophyticus*, powodujący zakażenia układu moczowego kobiet. Gronkowce są bakteriami bardzo rozpowszechnionymi w przyrodzie, na przykład *Staphylococcus aureus* u ok. 60% populacji ludzkiej występuje regularnie, jakkolwiek w niewielkich ilościach, w przedsionku nosowym i na błonach śluzowych górnych dróg oddechowych. Zwykle do zatruc gronkowcami dochodzi w skutek spożycia różnych kremów, mleka i produktów mlecznych, mięsa i sałatek z majonezem, które stanowią dla tych drobnoustrojów doskonałą pożywkę [Tranter 1990]. Gronkowce stają się szczególnie niebezpieczne dla zdrowia, gdy intensywnie namnażają się w wymienionych wyżej pokarmach i produkują w nich wysoce toksyczną enterotoksynę. O ile odpowiednia obróbka cieplna zazwyczaj wystarcza do inaktywacji gronkowców w żywności, to problemem jest silnie toksyczna enterotoksyna produkowana przez te bakterie. Enterotoksyna gronkowcowa jest klasyczną egzotoksyną, która trudno ulega inaktywacji podczas ogrzewania; w 100°C ginie po 106 min, a w 121°C – po 18 min. Minimalna dawka toksyczna wynosi 10–15 µg enterotoksyny w 1 ml lub 1 g produktu. Taką ilość jest

w stanie wytworzyć populacja wynosząca $7,5 \times 10^5$ do 9×10^8 komórek gronkowców w 1 g produktu. Po spożyciu żywności skażonej tą toksyną dochodzi stosunkowo szybko do wystąpienia objawów, bo już po 0,5 – 2 godzinach. Pojawiają się: bóle głowy i brzucha, ślinotok, mdłości, gwałtowne wymioty oraz biegunka. Objawy te powodują niebezpieczną utratę wody i elektrolitów, a co za tym idzie – spadek ciśnienia tętniczego krwi, upośledzenie przesączania nerkowego i szybko narastającą kwasicę [Niścigorska 1999]. Przy zatruciach enterotoksyną gronkowcową charakterystyczne są wymioty, podczas gdy w obrazie innych zakażeń pokarmowych dominuje biegunka. W ciężiej przebiegających zatruciach może dojść nawet do wstrząsu. Objawy zatrucia gronkowcami mijają równie szybko, jak się pojawiają: po kilku – kilkunastu godzinach. Nasilenie opisanych objawów zależy od ilości wchłoniętej enterotoksyny, a wymioty prowadzące do opróżnienia przewodu pokarmowego są w przebiegu zakażenia zjawiskiem pożądanym.

Aby zabezpieczyć żywność przed wytwarzaniem enterotoksyn przez gronkowce, należy przechowywać ją w temp. poniżej 10°C . Optymalna temperatura produkcji enterotoksyny to 37°C , natomiast jej zahamowanie ma miejsce w temp. niższej niż 10°C i wyższej niż 46°C [Notermans i in. 1983]. Z tego właśnie powodu wszystkie pokarmy, które nie są przeznaczone do szybkiego spożycia, należy jak najszybciej umieszczać w lodówce. Najlepszym sposobem zapobiegania skażeniu żywności przez gronkowce chorobotwórcze w czasie jej produkcji jest przestrzeganie zasad higieny i zachowanie właściwych warunków sanitarnych i epidemiologicznych.

Narastające zagrożenie stanowią wielooporne gronkowce pochodzące ze środowiska szpitalnego (tzw. MRSA, MRSE), które są często wrażliwe tylko na jedną grupę leków. To niebezpieczne bakterie powstałe w wyniku reakcji drobnoustrojów na nadużywanie antybiotyków w medycynie, weterynarii i rolnictwie.

Zakażenia pokarmowe wywołane przez *Escherichia coli* O157

Odkryta i opisana przed ponad 120 laty *Escherichia coli* należy do jednego z najdokładniej scharakteryzowanych drobnoustrojów na świecie. Jej głównym miejscem bytowania jest przewód pokarmowy ludzi i zwierząt [Larski i in. 1997, Uradziński i in. 2000]. Odgrywa tam rolę symbionta, ponieważ syntetyzuje niektóre, ważne dla życia organizmu gospodarza, związki egzogenne. Lekarze, kilka lat po odkryciu *E. coli* przez Theodora Eschericha, zwrócili uwagę na właściwości chorobotwórcze tych bakterii i możliwość wywoływania stanów chorobowych u ludzi [Osek 1999]. Szczepy chorobotwórcze zaliczane są obecnie do następujących grup:

- 1) enteropatogenne *E. coli* (EPEC),
- 2) enterotoksyczne *E. coli* (ETEC),
- 3) enteroinwazyjne *E. coli* (EIEC),
- 4) enterokrwotoczne *E. coli* (EHEC),
- 5) enteroagregacyjne *E. coli* (EAEC),
- 6) adherencyjne *E. coli* (DAEC).

W ostatnim czasie w dostępnym piśmiennictwie wiele uwagi poświęca się enterokrwotocznym szczepom *E. coli*, a szczególnie serotypowi O157:H7, który zidentyfikowano w 1982 r. na terenie Stanów Zjednoczonych, gdzie doprowadził do masowych zakażeń pokarmowych u ludzi po spożyciu niedopieczonych hamburgerów [Cassin i in. 1998]. Serotyp ten wytwarza verocytotoksynę (VT), nazywaną również toksyną Shiga (Stx), ze względu na podobieństwo do toksyny wytwarzanej przez *Shigella dysenteriae*

typ 1. Wśród toksyn Shiga wyróżnia się Stx 1 i Stx 2. Pojedynczy szczep EHEC może wytwarzać toksynę Stx 1, Stx 2 lub obie [Paton i in. 1998]. Źródłem EHEC mogą być: bydło, owce, kozy, świnie, drób, mowy itp. [De Zutter i in. 1999]. *Escherichia coli* O157 jest czynnikiem etiologicznym trzech jednostek chorobowych o poważnym przebiegu:

- krwotocznego zapalenia jelita grubego (HC, haemorrhagic colitis);
- zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS, haemolytic uremic syndrome);
- małopłytkowej plamicy zakrzepowej (TTP, thrombotic thrombocytopenic purpura).

W przebiegu krwotocznego zapalenia jelita grubego (HC), po 1–7 dniach inkubacji, pojawiają się bóle brzucha przechodzące w ciągu 24 godz. w wodnistą biegunkę, która następnie staje się szczególnie krwotoczna. Choroba ustępuje zwykle po 2–9 dniach; niekiedy jednak występują komplikacje w postaci krwawienia z żołądka lub niedokrwienia mózgu. Może rozwinąć się także zespół hemolityczno-mocznicowy albo małopłytkowa plamica zakrzepowa.

Zespół hemolityczno-mocznicowy (HUS) powstaje zwykle jako powikłanie krwotocznego zapalenia okrężnicy i dotyczy najczęściej dzieci i osób starszych. Zmiany chorobowe występują w naczyniach krwionośnych nerek, w których pod wpływem produkowanych przez EHEC toksyn powstają mikrozakrzepy prowadzące do ostrej niewydolności nerek. Dochodzi również do niewydolności serca, omdleń i w 3–10% przypadkach następuje śmierć.

Z kolei małopłytkowa plamica zakrzepowa (TTP) powstaje w następstwie działania toksyn Shiga i zwykle jest powikłaniem trwającego zespołu hemolityczno-mocznicowego. Do objawów charakterystycznych dla tego ostatniego dołączają się zmiany zakrzepowe w jelicie grubym, sercu, trzustce, nadnerczach i mózgu. W mózgu zakrzepy tworzą się u znacznego odsetka chorych (30%) i w krótkim czasie, zwłaszcza u osób starszych, prowadzą do śmierci [Uradziński 2001].

Jak unikać zatruć i zakażeń pokarmowych?

Aby uniknąć większości zatruć i zakażeń pokarmowych, zwłaszcza tych powodowanych przez termolabilne drobnoustroje, należy przestrzegać kilku zasad:

- dokładnie podgrzewać potrawy;
- przechowywać żywność w niskiej temperaturze, zapobiegając rozmrażaniu i ponownemu zamrażaniu żywności, a całkowite rozmrażanie mięsa drobiu, ryb i ich przetworów stosować tylko przed przystąpieniem do smażenia, pieczenia, gotowania itp.;
- wydzielić miejsce w lodówce na surowy drób, mięso i jaja tak, aby nie stykały się z innymi produktami;
- skorupki jaj należy myć ciepłą wodą tuż przed użyciem, a następnie zanurzać je przynajmniej na 12 sek. we wrzątku;
- należy pamiętać, że dłuższe przetrzymywanie produktów, w których łatwo mnożą się bakterie (wyroby garmażeryjne, tatar, pasty rybne, jajeczne, mięsne itp.) w temperaturze pokojowej, znacznie zwiększa ryzyko zatrucia/zakażenia pokarmowego;
- po użyciu desek do krojenia i noży do obróbki mięsa czy drobiu należy je dokładnie umyć w wodzie z detergentem, a następnie wyparzyć.

PIŚMIENNICTWO

- Ang C.W., van Doorn P.A., Enoltz H.P., Merkies I.S., Jacobs B.C., de Klerk M.A., van Koningsreld R., van der Meche F.G., 2000: A case of Guillain – Barre syndrome following a family outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis. *J. Neuroimmunol.*, 111, 229–233.
- Calva J.J., Ruiz – Palacios G.M., Lopez – Vidal A.B., Ramos A., Bojalil R., 1988: Cohort study of intestinal infection with *Campylobacter* in Mexican children. *Lancet* 1, 503–506.
- Cassin M.H., 1998. Risk assessment for *E.coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. Materiały III konferencji *Food Microbiology* Liege, Belgium.
- De Zutter L., Uradziński J., Pierard D., 1999. Prevalence of enterohaemorrhagic *E. coli* O157 in Belgium slaughter cattle. *Acta Clinica Belgica*, 54, 1, 48.
- Dzierżanowska D., Rozynek E., 1988: Rola mikroaerofilnych pałeczek *Campylobacter jejuni* / *coli* w zakażeniach przewodu pokarmowego. *Post. Mikrobiol.*, 27, 137–155.
- Dyrektywa 2003/99/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 17 listopada 2003 r. w sprawie monitorowania chorób odzwierzęcych i odzwierzęcych czynników chorobotwórczych, zmieniająca decyzję Rady 90/424/EWG i uchylająca dyrektywę Rady 92/117/EWG.
- Hu L., Kopecko D.J., 1999: *Campylobacter jejuni* 81–176 associates with microtubulea and dynein during invasion of human intestinal cells. *Infect. Immun.*, 67, 4171–4282.
- Larski Z., 1997. Niektóre nowsze dane dotyczące mikrobiologii i chorób zakaźnych. *Med. Wet.*, 53, 7.
- Le Minor L., Popoff M.Y., 1987. Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp., nov., nom. rev., as a type and only species of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 465–468.
- Molenda J., 1999. *Salmonellozy* u ludzi i zwierząt [w:] Choroby odzwierzęce przenoszone drogą pokarmową. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 115–132.
- Niścigorska J., 1999. Zatrucie enterotoksyną gronkowcową [w:] Choroby odzwierzęce przenoszone drogą pokarmową. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 63–65.
- Notermans S., Heuvelman C.J., 1983. Combined effect of water activity, pH and sub-optimal temperature on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Sci.*, 48, 1832–1835.
- Opinia Komitetu Naukowego Zdrowia Publicznego ds. Środków Weterynaryjnych WE dotycząca chorób odzwierzęcych z dnia 12 kwietnia 2000 roku
http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out32_en.pdf
- Osek J., 1999. *Escherichia coli* O157 – groźny patogen o szerokiej chorobotwórczości. *Med. Wet.*, 55, 4, 215–221.
- Paton J.C., Paton A., W., 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin – producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11, 450–479.
- Philips C.A., 1995: Incidence, epidemiology and prevention of foodborne *Campylobacter* species. *Trends Food Sci. Tech.*, 6, 81–86.
- Taylor D.N., Echeverria P., Pitarangsi C., Seriwatana J., Bodhidatta L., Blaser M.J., 1988: Influence of strain characteristics and immunity on the epidemiology of *Campylobacter* infections in Thailand. *J. Clin. Microbiol.*, 26, 863–868.
- Taylor D.N., Perlman D., Echeverria P.D., Lexomboon U., Blaser M.J., 1993: *Campylobacter* immunity and quantitative excretion rates in Thai children. *J. Infect. Dis.*, 168, 754–758.
- Thorns C.J., 2000. Bacterial food – borne zoonoses. *Rev. Sci. Tech.* 19, 1, 226–239.
- Tranter H.S., 1990. Foodborne illness. Foodborne staphylococcal illness. *Lancet*, 336, 1044–1048.
- Uradziński J., Pastuszcak M., Józwik E., De Zutter L., Pierard D., 2000. Występowanie *Escherichia coli* O157 u bydła rzeźnego na terenie województwa warmińsko-mazurskiego. Materiały XI Kongresu PTNW – Annales UMCS sec. DD, Lublin, 21–23 września, 259.

- Uradziński J., 2001. *Escherichia coli* O157 – nowe zagrożenie odżywnościowe. Biul. Nauk. UWM, 13, 33–41.
- Wassenaar T.M., 1997: Toxin production by *Campylobacter* spp. Clin. Microbiol. Rev., 10, 466–476.
- Wieczorek K., Osek J., 2005b: *Campylobacter* – przyczyna zakażeń pokarmowych. Med. Wet., 61, 847–851.
- Wysok B., 2008. Stopień zanieczyszczenia mięsa bakteriami rodzaju *Campylobacter* podczas obróbki poubojowej drobiu rzeźnego. Praca doktorska, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn.

HEALTH RISKS AND CONSEQUENCES OF ZOO NOTIC AGENTS IN FOOD

Abstract. Foodborne diseases are caused by consuming contaminated foods. There are many opportunities for food to become contaminated as it is produced and distributed. Many foodborne pathogens are present in healthy slaughter animals. Meat can become contaminated during slaughter by contact with small amounts of intestinal contents. Later in food processing microbes can be introduced from infected humans who handled the food. Most of foodborne infections are caused by a variety of bacteria, viruses, and parasites. Foodborne diseases have many different symptoms, however bacteria or toxin enters the body through the gastrointestinal tract, and often causes the first symptoms there, so diarrhea, nausea, vomiting, and abdominal pain. The most commonly recognized foodborne infections are those caused by bacteria *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Staphylococcus* spp. and *E. coli* O157.

Key words: foodborne diseases, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* O157

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2008

Do cytowania – For citation: Uradziński J., Wysok B., 2008. Zagrożenia bezpieczeństwa żywności powodowane czynnikami zoonotycznymi. Acta Sci. Pol. Med. Vet. 7(2), 15–22.

EFFECT OF GLAZING ON OXIDATIVE CHANGES OF FISH STORED AT STABLE AND UNSTABLE FREEZING CONDITIONS*

Peter Popelka¹, Slavomír Marcinčák¹, Jozef Nagy¹, Peter Žoldoš²,
Lýdia Šoltýsová¹

¹ University of Veterinary Medicine, Košice

² Mraziarne Poprad

Abstract. Glazing is used to protect deep frozen fish fillets from the effect of fat oxidation during freezing storage. Effect of glazing on oxidation changes of fats in fish fillets during freezing storage at stable and unstable temperature conditions was estimated. Obviously, glazing and stable freezing conditions of storage had positive impact on range of oxidative changes of fats expressed as an amount of malondialdehyde.

Key words: glazing, fish fillets, oxidative changes, freezing temperature

INTRODUCTION

The application of a layer of ice to the surface of a frozen products by spraying, brushing on water or by dipping, is widely used to protect the product from the effects of dehydration and oxidation during cold storage [IIR 1996]. The ice layer sublimates rather in the fish below and it also excludes air from the surface of the fish and thereby reduces the rate of oxidation. Heat added by the glazing process is often considerable and the fish may require to be re-cooled in a freezer before being transferred to the cold store [Bogh-Sorensen 2006].

In order to form a complete and uniform glaze on the surface of the fish, the glazing process requires to be closely controlled. The amount of glaze applied depends on the following factors:

* This study was supported by a project AV 4/0010/07

- Glazing time
- Fish temperature
- Water temperature
- Product size
- Product shape

Glazing by dipping requires relatively high initial temperature of the water; this is reduced as glazing proceeds and the thickness of glaze will therefore vary. In practice, the time will not be constant and this will give rise to even greater inconsistency. If a dipping method is used to apply a glaze, the container should be continuously supplied with chilled water and fitted with an overflow. Good glazing practice can be beneficial, particularly when other aspects of storage and transport are far from ideal, but poor glazing involving partial thawing of the fish and slow refreezing in cold storage may do more harm than good [Johnston et al. 1994].

In fatty species such as herring, the most serious cause of deterioration is oxidation. Fish lipids are characterized by a high degree of unsaturation in the form of multiple double bonds in the fatty acids. These are susceptible to attack by molecular oxygen. Oxidation proceeds by a free radical mechanism involving chain reactions. An induction phase is followed by accelerating rates of oxygen absorption, with the formation of hydroperoxides, odorous compounds of low molecular weight and polymerized products. Many heavy metals accelerate oxidation so that the possible role of haem pigments in dark muscle, which is particularly susceptible to oxidation, has been of considerable interest. At the present time, the question does not appear to have been resolved conclusively. Oxidation may be inhibited or delayed in practice by applying a surface 'glaze' of ice to limit access of air to the tissue. This also limits 'freezer burn', a discoloration associated with surface desiccation. The use of antioxidants and chelating agents has not been so successful under practical conditions.

Changes taking place in the lipids of the frozen fish will also slow down when the temperature is reduced. The oxidation of the fat leads to objectionable flavours and odours. This can be particularly serious in fish of high fat content and probably also contributes for most of the flavour changes in lean fish. The rate of oxidation can be reduced by reducing the exposure to oxygen. This can be achieved by introducing a barrier at the surface of the fish. Thus fish in a block keep better than fish frozen individually, and the addition of an ice glaze is beneficial.

In this study effect of glazing on oxidation changes of fats in fish fillets during freezing storage at stable and unstable temperature conditions was estimated.

MATERIAL AND METHODS

Fillets of Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*) were used to estimate effect of glazing on oxidative changes in lipids. Fillets were divided into 4 groups: control group (unglazed), group 1 glazed by dipping in our department, group 2 and 3 industrially glazed (10% of glaze). Control group, group 1 and 2 were stored at stable freezing conditions (-18°C) and group 3 at unstable conditions which vary from -5 to -18°C during 4 months.

Filletts from group 1 were primarily frozen at -18°C and then glazed by dipping in container with fresh cold potable water (4°C). Container was continuously supplied and fitted with overflow.

Glaze was determined by method according to Codex Standard 190–1995. As soon as the package was removed from low temperature storage, content was placed under a gentle spray of cold water. Fillet was agitated carefully to avoid damage and sprayed until all ice glazes that can be seen or felt was removed. Adhering water was removed by the use of paper towel and weighted on a scale.

Fat content and products of lipid oxidation were analysed. Soxhlet method according to ISO 1444:1996 was used to estimate fat content in fillets. Determination of thiobarbituric amount (TBA) – as a consequence of secondary damage of lipids, contingent on oxidation of unsaturated fatty acids was performed by method according to Grau et al. (2000). Extinction (absorbance) of samples was measured on UV-spectrophotometer Helios γ v 4.6 (Thermospectronic, Great Britain) at wavelength 532 nm, and expressed as an amount of malondialdehyde (MDA) in 1 kg of sample.

RESULTS AND DISCUSSION

Amount of glaze differs according to method of glazing and it extended during a time of storage at unstable conditions (Table 1). In control group, at the beginning of experiment amount of glaze was 5.21% and it was slightly increasing within four months of storage up to 7.44%. Initial amount of glaze, before glazing by dipping, in group 1 was 6.17%. After glazing, stable glaze at the level of 13% was achieved. Industrially glazed fillets in groups 2 and 3 had initial amount of glaze 9%. Significant differences were recorded in these groups during storage. In group 3 was total amount increasing rapidly from second month of storage, when important part of glaze was constituted by transfer of internal water on the surface. Unstable temperature conditions caused changes in stability of glaze, expressed as a sublimate released into the package.

Table 1. Average values of glaze (%) in fish fillets glazed with different methods and stored at stable and unstable freezing conditions

Tabela 1. Przeciętny odsetek glazury (%) w filetach rybnych glazurowanych różnymi metodami i przechowywanych w stałych i zmiennych temperaturach zamrożenia

	Month of storage				
	0.	1.	2.	3.	4.
K	5.21	5.91	4.24	6.17	7.44
1	6.17	13.43	13.57	12.11	12.63
2	9.20	10.87	9.81	11.97	15.76*/2.88**
3	9.10	10.52	14.17*/2.10**	20.94*/11.29**	24.63*/13.40**

K – control group and stored at stable conditions

1 – glazed by dipping and stored at stable conditions

2 – industrially glazed and stored at stable conditions

3 – industrially glazed and stored at unstable conditions

* total glaze including sublimate

** sublimate expressed as a ice released into the package

Fish belong to family *Gadidae* are considered as a lean fish with fat content up to 2% [Osman et al. 2001]. In all tested groups average fat content was from 0.57 up to 0.65%.

It is well known that lipid oxidation is one of the major causes of lipid-rich food spoilage *deterioration*. The oxidative deterioration of the polyunsaturated lipids of foods leads through formation of hydroperoxides to short-chain aldehydes, ketones, and other oxygenated compounds, which are considered to be responsible for development of rancidity in stored foods [Imafidon and Spanier 1994, Korimova et al. 1998]. Thus, malondialdehyde (MDA), a major degradation product of lipid oxidation, has attracted much attention as a marker for assessing the extent of lipid oxidation [Raharjo and Sofos 1993]. The compound is of particular concern as it has been shown to be mutagenic and carcinogenic [Halliwell 1992]. Nowadays, the most frequently used method for MDA determination in foods of animal origin is thiobarbituric value estimation [TBA test; Cordis 1995].

In glazed samples (group 1 and 2), during all time of storage at freezing conditions (4 months) were determined lower amounts of products of fat oxidation (expressed as an amount of malondialdehyde) in comparison with unglazed samples (control group). Statistically significant differences among groups were recorded within two months of storage and during next time they extended. Finally, it can be stated that glazing of fish fillets had significant positive impact on decreasing of fat oxidation and producing of metabolites of fat deterioration (Table 2).

Table 2. Fat oxidation (expressed as an amount of malondialdehyde $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) in fish fillets glazed with different methods and stored at stable and unstable freezing conditions

Tabela 2. Oksydacja tłuszczu (wyrażona ilością aldehydu dwumalonowego $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) w filetach rybnych glazurowanych różnymi metodami i przechowywanych w stałych i zmiennych warunkach zamrożenia

	Month of storage				
	0.	1.	2.	3.	4.
K	0.166 ± 0.021 ^{a1}	0.172 ± 0.011 ^{a1}	0.204 ± 0.013 ^{b1}	0.328 ± 0.018 ^{a1}	0.371 ± 0.027 ^{a1}
1	0.149 ± 0.029 ^{a1}	0.144 ± 0.015 ^{a1}	0.165 ± 0.007 ^{a2}	0.163 ± 0.015 ^{c3}	0.191 ± 0.007 ^{b2}
2	0.149 ± 0.029 ^{a1}	0.150 ± 0.008 ^{a1}	0.166 ± 0.010 ^{a2}	0.181 ± 0.006 ^{c3}	0.203 ± 0.024 ^{b2}
3	0.149 ± 0.029 ^{a1}	0.196 ± 0.014 ^{a1}	0.225 ± 0.005 ^{b2}	0.376 ± 0.024 ^{b2}	0.429 ± 0.05 ^{c3}

K – control group and stored at stable conditions

1 – glazed by dipping and stored at stable conditions

2 – industrially glazed and stored at stable conditions

3 – industrially glazed and stored at unstable conditions

^{a,b,c} – values in column are statistically different

^{1,2,3} – values in row are statistically significant

Influence of temperature fluctuation (group 3) during storage on fat oxidation is showed in Table 2. It is clear that unstable freezing conditions (fluctuation of temperature ranged from -5 to -18°C) during storage had significant influence on fat oxidation and amount of malondialdehyde as a major metabolite of this process. Statistically significant differences among groups were recorded within two months of storage and during subsequent two the differences became more intensive. Massive fat oxidation

in group 3 was caused by unstable temperature conditions and amount of malondialdehyde was actually higher than in control unglazed group and in groups 1 and 2.

The mean of glazing influenced range of oxidation changes in individual samples. The lowest oxidative damage of fats and the lowest amount of malondialdehyde was in group 2. However, there is no significant difference between glazed samples stored at stable freezing conditions (group 1 and 2). The content of malondialdehyde was higher in control group than in groups 1 and 2 during all term of storage.

CONCLUSION

Water which is released during a process of thawing is oftentimes considered by consumers as a negative effect of glazing. Despite this fact, some species of fish and fish products should be glazed and stored because of preservation their quality during storage and distribution. Quality of frozen fish and fish products decreased during storage if they are not adequately protected against effects of dehydration and oxidation, and also physical damage and environmental contamination. The keeping of rules and conditions of glazing of observed fish can be profitable also in case of unstable conditions of storage and transportation. On the other hand, if the rules are not, partial thawing of fish and repeated freezing, respectively observed too slow thawing after glazing can have negative impact on properties of products.

REFERENCES

- Bogh-Sorensen L., 2006. Recommendations for the Processing and Handling of Frozen Foods. Paris, International Institute of Refrigeration, 4th ed.
- Codex General Standard for Quick frozen fish fillets, Codex Standard, 190–1995.
- Cordis A.D., Maulik N., Das D.K., 1995. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 21, 1645–1653.
- Grau A., Guardiola F., Boatella A., Codony R., 1992. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1155–1159.
- Halliwell B., 1992. *J. Neurochem.* 59, 1609–1623.
- IIR, Refrigeration and Aquaculture, Refrigeration Science and Technology Proceedings, 1996, International Institute of Refrigeration, Paris, 533.
- Imafidon G.F., Spanier A.M., 1994. *Trends Food Sci. Technol.* 46, 1994, 315–321.
- ISO 1444, 1996. Determination of free lipids.
- Johnston W.A., Nicholson F.J., Roger A., Stroud G.D., 1994. Freezing and refrigerated storage in fisheries. FAO Fisheries Technical Paper. No. 340. Rome, 143.
- Korimová L., Máté D., Turek P., 1998. *Folia Vet.* 42, 179–181.
- Osman H., Suriah A.R., Law E.C., 2001. *Food Chem.*, 73, 55–60.
- Raharjo S., Sofos J.N., 1993. *Meat Sci.* 35, 1993, 145–169.

**WPLYW GLAZUROWANIA
NA ZMIANY OKSYDACYJNE
W TKANKACH RYB PRZECHOWYWANYCH
W STAŁYCH I ZMIENNYCH TEMPERATURACH ZAMROŻENIA**

Streszczenie. Glazurowanie jest stosowane dla ochrony filetów ryb przechowywanych w stanie głębokiego zamrożenia przed utlenianiem ich tłuszczu. Jakość tej ochrony oceniano w warunkach przechowywania filetów w stałej i zmiennej temperaturze zamrożenia. Stwierdzono że glazurowane filety przechowywane w stałej temperaturze zamrożenia zawierały najmniej utlenionych tłuszczów, co wykazano, oceniając zawartość w nich aldehydu malonowego.

Słowa kluczowe: glazurowanie, filety rybne, zmiany oksydacyjne, temperatury mrożenia

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.06.2008

For citation – Do cytowania: Popelka P., Marcinčák S., Nagy J., Žoldoš P., Šoltýsová L., 2008. Effect of glazing on oxidative changes of fish stored at stable and unstable freezing conditions. *Acta Sci. Pol. Med. Vet.* 7(2), 23–28.

TYPOWANIE MOLEKULARNE SZCZEPÓW *CAMPYLOBACTER* PRZY UŻYCIU TECHNIK OPARTYCH NA REAKCJI ŁAŃCUCHOWEJ POLIMERAZY

Kinga Wieczorek, Jacek Osek

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy

Streszczenie. Termotolerancyjne bakterie należące do rodzaju *Campylobacter* są jedną z najczęstszych przyczyn zakażeń pokarmowych ludzi, spowodowanych spożyciem żywności, zwłaszcza pochodzenia zwierzęcego. Chorobę (kamylobakterioza) w 90% przypadków wywołuje *C. jejuni*, ale w patogenezie schorzenia mogą brać też udział inne gatunki, zwłaszcza *C. coli*, *C. lari* i *C. upsaliensis*. Źródłem drobnoustrojów dla człowieka jest najczęściej drób, będący bezobjawowym nosicielem *Campylobacter*.

Do oceny zdolności różnicujących izolatów *C. jejuni* i *C. coli* wybrano dwie techniki, oparte na amplifikacji fragmentów DNA metodą PCR (ERIC-PCR, RAPD-PCR) oraz analizę restrykcyjną produktu amplifikacji – PCR/RFLP. Wykazano, że wszystkie z nich umożliwiły zakwalifikowanie badanej grupy izolatów do poszczególnych typów, a więc cechowały się 100% typowością. Ocenę poszczególnych technik wykonano, określając indeks różnicowania Simpsona (D). Stwierdzono, że technika ERIC-PCR charakteryzowała się wysoką zdolnością różnicującą ($D = 0,95$), była też łatwa i szybka do wykonania oraz cechowała się niskim kosztem. Podobne zalety obserwowano w przypadku metody RAPD-PCR i w pewnym stopniu PCR/RFLP (*flaA* typowanie). Z drugiej strony jednak, techniki te nie były zbyt użyteczne do różnicowania izolatów *C. coli* pochodzących z tuszek (indeks D odpowiednio 0 i 0,41).

Słowa kluczowe: *Campylobacter*, różnicowanie, *flaA* typowanie, ERIC-PCR, RAPD-PCR

WSTĘP

Najnowszy raport Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority, EFSA) podaje, że liczba laboratoryjnie potwierdzonych przypadków zachorowań ludzi wywołanych przez bakterie z rodzaju *Campylobacter*,

Adres do korespondencji – Corresponding author: Kinga Wieczorek, Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Aleja Partyzantów 57, 24-100 PUŁAWY, e-mail: kinga.wieczorek@piwet.pulawy.pl

wyniosła w krajach Unii Europejskiej (UE) w 2006 r. 178 806, co odpowiadało wskaźnikowi 46,1 na 100 000 mieszkańców [EFSA 2006]. W Polsce stwierdzono jedynie 157 przypadków, co stanowi 0,4 na 100 000. W rzeczywistości wielkości te mogą być nawet kilkakrotnie większe, ponieważ choroba (kamylobakterioza) ma zwykle przebieg łagodny i w związku z tym jej czynnik etiologiczny może nie być właściwie rozpoznawany.

W związku ze wzrastającą liczbą zachorowań spowodowanych przez bakterie należące do rodzaju *Campylobacter* konieczne staje się śledzenie dróg szerzenia się infekcji i wektorów odpowiedzialnych za przenoszenie patogenu, co umożliwia prawidłowe zidentyfikowanie źródła zakażenia. W przypadku schorzenia odzwierzcącego, jakim jest kamylobakterioza, niezbędne jest także stwierdzenie związku pomiędzy przypadkami zachorowań u ludzi a występowaniem *Campylobacter* u zwierząt lub w żywności pochodzenia zwierzcącego. Badania z użyciem takich technik, jak serotypowanie, flora typowanie czy analiza makrorestrikccyjna pozwoliły na wykazanie, że oprócz mięsa drobiowego także inne produkty żywnościowe skażone *Campylobacter* mogą być przyczyną zachorowań ludzi.

Zaletą technik molekularnych jest różnicowanie bakterii przy analizie ich kwasów nukleinowych, których obecność nie jest, w przeciwieństwie do metod fenotypowych, warunkowana przez czynniki środowiskowe. Analiza DNA *Campylobacter* jest szczególnie interesująca ze względu na dużą, w porównaniu z innymi rodzajami, zmienność genetyczną [Parkhil i in. 2000]. Bardzo często bakterie te tracą lub nabywają fragmenty kwasów nukleinowych, co może być przyczyną błędnej interpretacji uzyskanych rezultatów. Z tego też względu postuluje się równoczesne stosowanie więcej niż jednej molekularnej techniki różnicującej, dzięki czemu wyniki mogą się wzajemnie uzupełniać.

Jedną z technik opartych na reakcji łańcuchowej polimerazy jest analiza polimorfizmu przypadkowo amplifikowanego DNA (Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD), która polega na użyciu jednego lub dwóch krótkich starterów (ok. 10 nukleotydowych) o dowolnej sekwencji, które są komplementarne do losowych fragmentów DNA badanych bakterii. Technika ta jest przydatna do analizy szczepów o niskim stopniu różnicowania genetycznego, a wysoka zdolność różnicująca pozwala na zastosowanie jej do typowania *C. jejuni* i *C. coli* pochodzących z różnych źródeł [Mazurier i in. 1992, Madden i in. 1998, Misawa i in. 2000, Miwa i in. 2003].

Z powielenia powtórzonych fragmentów DNA obecnych w chromosomie bakteryjnym korzysta technika ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus, ERIC). Polega ona na zastosowaniu w reakcji PCR długich starterów, komplementarnych do konserwatywnych sekwencji w genomie rodziny *Enterobacteriaceae*, jednak różnie w nim rozmieszczonych w zależności od gatunku lub szczepu [Hulton i in. 1991]. Użycie niższej temperatury przyłączania starterów umożliwia uzyskanie większej liczby produktów amplifikacji, a tym samym łatwiejsze różnicowanie otrzymanych obrazów elektroforetycznych. Technikę ERIC-PCR wykorzystywano do typowania szczepów *C. jejuni* i *C. upsaliensis* [Shi i in. 1996]. Ograniczeniem tej metody, podobnie jak w przypadku RAPD-PCR, jest duży wpływ warunków amplifikacji na końcowy rezultat, co często prowadzi do niskiej powtarzalności wyników.

Połączenie amplifikacji określonej sekwencji genomu bakterii z analizą polimorfizmu długości fragmentów restrikcyjnych stanowi trzecia z wybranych metod (Restriction Fragments Length Polymorphism, RFLP). Uzyskiwany produkt PCR jest poddawany działaniu odpowiednio dobranej endonukleazy, a powstające w efekcie jej działa-

nia fragmenty DNA stanowią specyficzny dla danego szczepu wzór restrykcyjny. Fla typowanie charakteryzuje się wysoką zdolnością różnicowania oraz jest stosunkowo łatwe i szybkie do wykonania [Fitzgerald i in. 2001, Harrington i in. 2003, Akçik i Cetinkaya 2005, Ishihara i in. 2006].

MATERIAŁ I METODY

Izolaty *Campylobacter*. W badaniach wykorzystano łącznie 48 izolatów *Campylobacter* wyisobnionych ze schłodzonych tuszek drobiowych (24 izolaty) i kału kur (24).

Wykonanie testów ERIC-PCR i RAPD-PCR. Do badań wykorzystano DNA w koncentracji 10 ng/μl (dodawane w ilości 5 μl). Testy przeprowadzono ze starterami i w warunkach amplifikacji podanych w tabeli 1. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 1. Charakterystyka metod molekularnych zastosowanych do różnicowania *Campylobacter* spp.
Table 1. Characteristics of molecular methods used for differentiation of *Campylobacter* spp.

Metoda	Nazwa startera	Sekwencja startera (5'→3')	Parametry amplifikacji	Piśmiennictwo
ERIC-PCR	ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGATCAC	94°C/4 min, 40 cykli:25°C/45 s, 72°C/1min, 94°C/45 s i 72°C/5 min	Versalovic i in. 1991
	ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		
RAPD-PCR	OPA11	CAATCGCCGT	94°C/5 min, 30 cykli:48°C/1 min, 72°C/2 min, 94°C/1 min i 72°C/5 min	Hernandez i in. 1995
	1254	CCGCAGCCAA		
PCR-RFLP	flaAF	GGATTTCGTATTAACACAAATGGTGC	94°C/5 min, 40 cykli:37°C/1 min, 72°C/1 min, 94°C/1 min i 72°C/10 min	CAMPYNET
	flaAR	CTGTAGTAATCTTA AACATTTTG		

Rozdział elektroforetyczny uzyskanych amplikonów przeprowadzano w 1,7% żelu agarozowym, w buforze TAE, przy stałym napięciu 60 V przez 3 h. Żele barwiono bromkiem etydyny o stężeniu 5 μg/ml przez 2 min. Wielkości otrzymanych prążków oceniano przez porównanie z markerem molekularnym Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus.

Test PCR-RFLP. W pierwszym etapie wykonywano amplifikację genu *flaA* ze starterami i w warunkach podanych w tabeli 1. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 2. Następnie przeprowadzano trawienie powielonego genu enzymem restrykcyjnym *DdeI*, rozpoznającym sekwencję C↓TNAG, gdzie N może oznaczać A, T, G lub C.

Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej do amplifikacji DNA
 Table 2. Ingredients the PCR mixture used for DNA amplification

Składnik mieszaniny	Stężenie początkowe	Stężenie końcowe	Ilość (μl)
bufor enzymatyczny	10 x stężony	1x stężony	5
MgCl ₂	25 mM	5 mM	10
dNTP	2 mM	200 μM	5
starter	10 μM	0,2 μM (PCR-RFLP – 0,5)	1 (PCR-RFLP -2,5)
polimeraza Taq	1 U/μl	2 U	2 (PCR-RFLP -1)

Współczynnik różnicowania D (indeks Simpsona) został obliczony wg następującego wzoru:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

gdzie: N = liczba izolatów poddanych typowaniu, n_j = liczba izolatów należących do typu j, S = liczba uzyskanych typów.

WYNIKI

Do różnicowania termotolerancyjnych izolatów *C. jejuni* i *C. coli*, pochodzących z tuszek i kału drobiu, wykorzystano 3 techniki molekularne – ERIC-PCR, RAPD-PCR i PCR-RFLP (*flaA* typowanie). Uzyskane wyniki oceniano na dwóch płaszczyznach. W pierwszym wariancie, bardziej obiektywnym, brano pod uwagę zdolność testu do wyodrębnienia jak największej liczby grup klonalnych (wartość współczynnika różnicowania D) oraz oceniano liczbę generowanych produktów PCR lub trawienia enzymatycznego bakteryjnego DNA. Natomiast w drugim, klasyfikując techniki typowania, kierowano się subiektywnymi cechami danej metody, takimi jak: dostępność sprzętu i odczynników, koszt i czas wykonania badania, a także doświadczenie wymagane do prawidłowego przeprowadzenia oznaczenia. Wyżej wymienione czynniki zostały zebrane w tabelach 3 oraz 4. Stwierdzono, że najwięcej fragmentów DNA i największe współczynniki różnicowania uzyskano w metodzie ERIC-PCR i RAPD-PCR. Również biorąc pod uwagę cechy subiektywne (tab. 4), wykazano, że najbardziej przydatne okazały się metody bazujące na losowej amplifikacji DNA. Techniki te były łatwe do wykonania, charakteryzowały się także niskim kosztem, a czas potrzebny do uzyskania wyników był stosunkowo krótki.

DYSKUSJA

Pierwsza z zastosowanych metod genotypowych – ERIC-PCR – charakteryzowała się wysoką zdolnością różnicującą oznaczanych *C. jejuni* i *C. coli*, pozwalając uzyskać wartość indeksu D na poziomie 0,95 (tab. 3). Test ten, mimo tej zalety, jest jednak stosunkowo rzadko wykorzystywany do typowania tej grupy drobnoustrojów [Iriarte i Owen 1996, Shi i in. 1996]. Z danych Shi i in. [1996] wynika, że zdolności różnicujące techniki ERIC-PCR i analizy RFLP/PFGE, przeprowadzane na tych samych izolatach *C. jejuni*, były zbliżone. Wskazuje to, że ERIC-PCR, uwzględniając łatwość jego wykonania, może być dobrym narzędziem w typowaniu molekularnym izolatów *Campylobacter*. Zastosowano go m.in. do różnicowania *C. jejuni* pochodzących od pacjentów z zespołem GBS oraz syndromem Miller-Fischera [Endtz i in. 2000] i również w tym przypadku wyniki były porównywalne z uzyskanymi metodą RFLP/PFGE. Potwierdza to więc duży potencjał różnicujący i użyteczność metody opartej na losowej amplifikacji fragmentów DNA, której istotną zaletą jest też łatwość interpretacji otrzymanych obrazów elektroforetycznych.

Kolejną wybraną techniką molekularną, użytą do oceny zdolności różnicujących, był RAPD-PCR. W teście tym do typowania *Campylobacter* stosuje się różne oligonukleotydy, najczęściej określane nazwami OPA11, 7718 lub 1290. Wykorzystywane są także różne parametry amplifikacji, w których cechą wspólną jest niska temperatura przyłączania starterów, zwykle 36–37°C. Niektórzy autorzy oraz niepublikowane wyniki badań własnych wskazują, że zastosowanie więcej niż jednego oligonukleotydu pozwala na otrzymanie większej liczby amplikonów, a przez to lepsze różnicowanie blisko spokrewnionych ze sobą izolatów *Campylobacter* [Misawa i in. 2000]. W obecnych badaniach przeprowadzono test RAPD-PCR, stosując dwie sekwencje oligonukleotydowe – 1254 i OPA11, uzyskując wartość współczynnika Simpsona wynoszącą $D=0,94$ (tab. 3). Wyniki te, wskazujące na wysoką zdolność różnicowania tej techniki w odniesieniu do szczepów *C. jejuni* i *C. coli*, są zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy potwierdzają jej przydatność w badaniach epidemiologicznych [Madden i in. 1998, Nielsen i in. 2000]. Zastosowanie testu RAPD-PCR dowiodło m.in., że skażenie tuszek pochodzących od drobiu wolnego od *Campylobacter* nastąpiło już na terenie rzeźni [Miwa i in. 2003]. Ono i in. [2003] porównali zdolność różnicującą testu RAPD-PCR z szeroko stosowaną w typowaniu *Campylobacter* spp. analizą RFLP/PFGE, wykorzystując do tego 168 izolatów *C. jejuni* i *C. coli*. W przypadku RAPD-PCR zastosowano starter, podobnie jak w badaniach własnych, OPA11, natomiast analiza restrykcyjna została wykonana z użyciem enzymu *SacII*. Obie metody umożliwiły otrzymanie porównywalnej liczby profili a więc cechowały się zbliżonymi właściwościami różnicującymi. Zaletą testu opartego na amplifikacji DNA jest jednak szybkość i łatwość wykonania [Madden i in. 1996, Ono i in. 1998, Scates i in. 2003]. Potwierdzają to badana Hernandez i in. [1995] oraz Hiltona i in. [1997], którzy różnicując izolaty *C. jejuni* i *C. coli* techniką RAPD-PCR, z wykorzystaniem oligonukleotydu OPA11, uzyskali wysoki indeks Simpsona ($D=0,99$) oraz ścisłą korelację pomiędzy analizą numeryczną grup RAPD a gatunkami *Campylobacter*. Z drugiej strony, wyniki uzyskane przez Ertasa i in. [2004], dotyczące typowania szczepów *C. jejuni* i *C. coli*, wskazują na lepszą zdolność różnicującą techniki fla typowania niż RAPD-PCR ale istnieją też przeciwstawne doniesienia. W obecnej pracy własnej otrzymano identyczne wartości indeksu różnicowania ($D=0,94$) w stosunku do obu metod tzn. RAPD-PCR i fla typowania (tab. 3).

Tabela 3. Wyniki różnicowania *Campylobacter* spp. przy zastosowaniu wybranych technik molekularnych
 Table 3. Results of differentiation of *Campylobacter* spp. by selected molecular methods

Lp.	Metoda	<i>C. jejuni</i>						<i>C. coli</i>						Razem		
		Tuszki		Kał		Tuszki		Kał		Tuszki		Kał				
		Zakres*	Liczba profili	Zakres	Liczba profili	D	Zakres	Liczba profili	D	Zakres	Liczba profili	D	Zakres		Liczba profili	
1	ERIC-PCR	3-7	6	0,85	4-7	10	0,97	4-7	3	0,43	5-6	7	0,77	3-7	28	0,95
2	RAPD-PCR	3-6	5	0,83	4-7	11	0,98	8-10	1	0	8-9	10	0,97	3-9	29	0,94
3	RFLP - <i>flaA</i> typowanie	3-4	4	0,74	2-4	11	0,98	2-3	2	0,41	2-3	6	0,68	2-4	25	0,94

Objasnienia: *zakres – najmniejsza i największa liczba prążków widoczna w żelu agarozowym, ** D – współczynnik różnicowania

Należy zwrócić również uwagę na ograniczenia testów różnicujących opartych na technice PCR, tzn. RAPD-PCR oraz ERIC-PCR, spowodowane występującą niekiedy niską powtarzalnością uzyskiwanych wzorów molekularnych, będącą wynikiem odmiennych sekwencji stosowanych starterów oligonukleotydowych, różnej koncentracji użytego DNA, a także warunków amplifikacji. Z tych też względów, przy wykonywaniu tych oznaczeń i interpretacji uzyskanych wyników badań epidemiologicznych, należy mieć na względzie szczególnie ujednolicony sposób prowadzenia doświadczeń, warunkujący odtwarzalność i powtarzalność rezultatów

Jedną z częściej stosowanych technik typowania molekularnego *Campylobacter* jest analiza restrykcyjna PCR/RFLP (*flaA* typowanie). Stwierdzono, że najlepszą zdolność różnicującą posiadała w przypadku trawienia produktu amplifikacji enzymem *DdeI*, zwłaszcza w odniesieniu do izolatów pochodzących od zwierząt [Ayling i in. 1996]. Dodatkowo, restryktaza ta nie powoduje powstawania zbyt dużej liczby fragmentów DNA, co może utrudniać interpretację wyników [Harrington i in. 1997]. W obecnych badaniach wykonano *flaA* typowanie w oparciu o ujednoliconą procedurę zalecaną przez CAMPYNET, stosując tylko niewielkie modyfikacje. Metoda ta została opracowana i zwalidowana na podstawie szeregu, także międzynarodowych, międzylaboratoryjnych badań porównawczych [Harrington i in. 2003]. Potwierdzono w nich wysoką użyteczność genu *flaA* jako markera w typowaniu *Campylobacter* oraz wysoką zdolność różnicującą enzymu restrykcyjnego *DdeI*. W testach tych uzyskano 100% typowalność badanych izolatów oraz wskaźnik różnicowania Simpsona $>0,95$, co stanowi wartość porównywalną ze współczynnikiem otrzymany w analizie RFLP/PFGE. W obecnych badaniach własnych, w wyniku różnicowania 48 izolatów *C. jejuni* i *C. coli* przy użyciu *flaA* typowania, otrzymano indeks D wynoszący 0,94. Potwierdza to wcześniejsze doniesienia innych autorów o wysokiej przydatności tej metody w odniesieniu do szczepów *Campylobacter*, zwłaszcza *C. jejuni* i *C. coli*. Analiza PCR-RFLP jest obecnie szeroko rozpowszechniona w typowaniu tych drobnoustrojów pochodzących z różnych źródeł, co wynika z jej wysokiej zdolności różnicującej i powtarzalności uzyskiwanych rezultatów. W połączeniu z szybkością i łatwością wykonania oraz stosunkowo niskimi kosztami technika *flaA* typowania jest obecnie jedną z najszybszych stosowanych metod molekularnych, służących do różnicowania bakterii należących do rodzaju *Campylobacter* [Fitzgerald i in. 2001, Harrington i in. 2003, Ertas i in. 2004, Açı̇k i Centikaza 2005, Ishihara i in. 2006]. Według badań Nayaka i in. [2006], którzy zastosowali *flaA* typowanie oraz RFLP/PFGE (*SmaI*) do różnicowania *C. jejuni* ($n=44$) i *C. coli* ($n=50$) wyosobnionych z kału indyków, w przypadku izolatów tego drugiego gatunku bardziej użyteczną techniką była analiza restrykcyjna genu *flaA* ($D=0,89$) niż RFLP/PFGE ($D=0,81$). W odniesieniu do izolatów *C. jejuni* obie techniki pozwalały na uzyskanie jednakowego, wysokiego współczynnika różnicowania ($D=0,94$). Należy dodać, że ze względu na małą liczbę uzyskiwanych produktów restrykcyjnych w technice *flaA* typowania oraz zaobserwowane w niektórych przypadkach słabo widoczne w żelu agarozowym prążki utrudniona była interpretacja wzorów molekularnych. Niektóre źródła wskazują na większą zdolność różnicującą techniki RFLP/PFGE w porównaniu do *flaA* typowania [Fitzgerald i in. 2001]. Jednak ze względu na czas- i pracochłonność analizy makrorestrykcyjnej oraz dość wysokie koszty zastosowanie jej na szerszą skalę w badaniach epidemiologicznych może być ograniczone. Z tego powodu, pomimo nieco mniejszej zdolności różnicującej, metoda *flaA* typowania, z uwagi na szybkość i łatwość wykonania, jest dość często wykorzystywana w podobnych

analizach. Niektórzy autorzy wskazują ponadto, że typowanie restrykcyjne jednego genu jest mniej wrażliwe na ewentualne rekombinacje genomowe niż w przypadku RFLP/PFGE. Jednak również i wtedy należy brać pod uwagę możliwość wystąpienia tzw. rearanzacji genowej pomiędzy blisko siebie położonymi genami *flaA* i *flaB* [Nuijten i in. 2000]. Harrington i in. [1997] sugerują nawet, że z tych powodów *flaA* typowanie nie powinno być stosowane w długoterminowych badaniach epidemiologicznych izolatów *Campylobacter*.

Pomimo szeroko prowadzonych prac nad różnicowaniem *Campylobacter* spp. nie ma idealnej metody typowania określanej jako „złoty standard”. Wynika to m.in. z dużej zmienności i niestabilności genomu w obrębie rodzaju *Campylobacter*, co stwarza trudności właściwej interpretacji wyników typowania molekularnego. Różnice w otrzymywanych profilach i występujące w nich zmiany mogą być efektem mutacji punktowych, transformacji lub też wynikiem wielu różnych rekombinacji czy rearanzacji genów, zwłaszcza *flaA*, zachodzących *in vivo* i *in vitro* [Harrington i in. 1997, de Boer i in. 2002, Hook i in. 2005]. Zarówno *C. jejuni*, jak i *C. coli* mają zdolność naturalnej kompetencji i proces ten może również częściowo wyjaśniać istniejące różnice we wzorach molekularnych otrzymywanych w jednym laboratorium, jak też w różnych laboratoriach stosujących te techniki genotypowe. Spontaniczne zmiany w DNA *Campylobacter*, spowodowane rekombinacjami genetycznymi o różnym charakterze, wykazano m.in. u kurcząt, od których izolowano te same szczepy, którymi były zakażane, jednak posiadające odmienne profile molekularne [Hanninen i in. 1998, On 1998, Fitzgerald i in. 2001]. Z drugiej strony, wskazano też na możliwość izolacji stabilnych genotypów *C. jejuni* i *C. coli* pochodzących z różnych źródeł [On 1998]. Aspekty te należy brać pod uwagę przy określaniu korelacji molekularnych między izolatami *Campylobacter*, stosując omówione wyżej techniki genotypowe [de Boer i in. 2002].

WNIOSKI

Podsumowując wyniki przeprowadzonych analiz, dotyczących typowania molekularnego izolatów *Campylobacter*, należy stwierdzić, że wszystkie zastosowane w obecnych badaniach własnych techniki pozwoliły na zaklasyfikowanie oznaczanych drobnoustrojów do poszczególnych typów. W grupie *C. jejuni* wyosobnionych z tuszek dobrą zdolnością różnicującą odznaczała się też technika ERIC-PCR, która nie była natomiast przydatna w odniesieniu do *C. coli* izolowanych z tego samego źródła. W przypadku *C. jejuni* pochodzących z kału wszystkie metody charakteryzowały się wysoką zdolnością różnicującą ($D > 0,95$). Nieco gorsze wyniki uzyskano w odniesieniu do *C. coli*, szczególnie wyosobnionych z tuszek drobiowych, gdzie brak lub niskie zdolności różnicujące wykazywały zastosowane techniki RAPD- i ERIC-PCR oraz *flaA* typowanie. Uzyskane rezultaty, dotyczące zwłaszcza *C. coli* pochodzących z tuszek, mogą potwierdzać, że badana grupa izolatów była stosunkowo jednorodna i nie wykazywała większych różnic na poziomie genotypowym.

Biorąc pod uwagę subiektywne elementy oceny zastosowanych różnicujących technik genotypowych, można stwierdzić że metody oparte na amplifikacji techniką PCR (ERIC-PCR i RAPD-PCR) cechowały się szybkością i łatwością wykonania oraz niskimi kosztami w porównaniu do pozostałych ocenianych testów (tab. 4).

Tabela 4. Porównanie wybranych technik molekularnych
Table 4. Comparison of selected molecular methods

Lp.	Metoda	Łatwość wykonania	Dostępność	Czas wykonania	Koszt	Ocena ogólna
1	ERIC-PCR	+++	++	5 h	+++	+++
2	RAPD-PCR	+++	++	5 h	+++	+++
3	RFLP – <i>flaA</i> typowanie	++	++	8 h	++	++

Objaśnienia: +++ – dobra, ++ – średnia, + – niska

PIŚMIENNICTWO

- Açik M.N., Cetinkaya B., 2005. The heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from healthy cattle. *Lett. Appl. Microbiol.*, 41, 397–403.
- Akopayanz N., Bukanov N.O., Westblom T.U., Kresovich S., Berg D.E., 1992. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 20, 5137–5142.
- Ayling R.D., Woodward M.J., Evans S., Newell D.G., 1996. Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products applied to the differentiation of poultry campylobacters for epidemiological investigations. *Res. Vet. Sci.*, 60, 168–172.
- CAMPYNET: <http://campynet.vetinst.dk/Fla.htm>
- de Boer P., Wagenaar J.A., Achterberg R.P., van Putten J.P., Schouls L.M., Duim B., 2002. Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity *in vivo*. *Mol. Microbiol.*, 44, 351–359.
- Endtz H.P., Ang C.W., van Den Braak N., Duim B., Rigter A., Price L.J., Woodward D.L., Rodgers F.G., Johnson W.M., Wagenaar J.A., Jacobs B.C., Verbrugh H.A., van Belkum A., 2000. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* from patients with Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 2297–2301.
- Ertas H.B., Cetinkaya B., Muz A., Ongor H., 2004. Genotyping of broiler-originated *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates using *fla* typing and random amplified polymorphic DNA methods. *Int. J. Food Microbiol.*, 94, 203–209.
- European Food Safety Authority: Third Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial resistance in the European Union in 2006.
- Fitzgerald C., Stanley K., Andrew S., Jones K., 2001. Use of pulsed-field gel electrophoresis and flagellin gene typing in identifying clonal groups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in farm and clinical environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1429–1436.
- Hanninen M.L., Pajarre S., Klossner M.L., Rautelin H., 1998. Typing of human *Campylobacter jejuni* isolates in Finland by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 1787–1789.
- Harrington C.S., Moran L., Ridley A.M., Newell D.G., Madden R.H., 2003. Inter-laboratory evaluation of three flagellin PCR/RFLP methods for typing *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: the CAMPYNET experience. *J. Appl. Microbiol.*, 95, 1321–1333.

- Harrington C.S., Thomson-Carter F.M., Carter P.E., 1997. Evidence for recombination in the flagellin locus of *Campylobacter jejuni*: implications for the flagellin gene typing scheme. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 2386–2392.
- Hernandez J., Fayos A., Ferrus M.A., Owen R.J., 1995. Random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from human faeces, seawater and poultry products. *Res. Microbiol.*, 146, 685–696.
- Hilton A.C., Mortiboy D., Banks J.G., Penn C.W., 1997. RAPD analysis of environmental, food and clinical isolates of *Campylobacter* spp. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 18, 119–124.
- Hook H., Fattah M.A., Ericsson H., Vagsholm I., Danielsson-Tham M.L., 2005. Genotype dynamics of *Campylobacter jejuni* in a broiler flock. *Vet. Microbiol.*, 106, 109–117.
- Hulton C.S., Higgins C.F., Sharp P.M., 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.*, 5, 825–834.
- Iriarte P., Owen R.J., 1996. Repetitive and arbitrary primer DNA sequences in PCR-mediated fingerprinting of outbreak and sporadic isolates of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 15, 17–22.
- Ishihara K., Yamamoto T., Satake S., Takayama S., Kubota S., Negishi H., Kojima A., Asai T., Sawada T., Takahashi T., Tamura Y., 2006. Comparison of *Campylobacter* isolated from humans and food-producing animals in Japan. *J. Appl. Microbiol.*, 153–160.
- Madden R.H., Moran L., Scates P., 1998. Frequency of occurrence of *Campylobacter* spp. in red meats and poultry in Northern Ireland and their subsequent subtyping using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and the random amplified polymorphic DNA method. *J. Appl. Microbiol.*, 84, 703–708.
- Mazurier S., van de Giessen A., Heuvelman K., Wernars K., 1992. RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. *Lett. Appl. Microbiol.*, 14, 260–262.
- Misawa N., Shinohara S., Satoh H., Itoh H., Shinohara K., Shimomura K., Kondo F., Itoh K., 2000. Isolation of *Campylobacter* species from zoo animals and polymerase chain reaction-based random amplified polymorphism DNA analysis. *Vet. Microbiol.*, 71, 59–68.
- Miwa N., Takegahara Y., Terai K., Kato H., Takeuchi T., 2003. *Campylobacter jejuni* contamination on broiler carcasses of *C. jejuni*-negative flocks during processing in a Japanese slaughterhouse. *Int. J. Food Microbiol.*, 84, 105–109.
- Nayak R., Stewart T., Nawaz M., Cerniglia C., 2006. In vitro antimicrobial susceptibility, genetic diversity and prevalence of UDP-glucose 4-epimerase (*galE*) gene in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from Turkey production facilities. *Food Microbiol.*, 23, 379–392.
- Nielsen E.M., Engberg J., Fussing V., Petersen L., Brogren C.H., On S. L., 2000. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 3800–3810.
- Nuijten P. J., van den Berg A. J., Formentini I., van der Zeijst B. A., Jacobs A. A., 2000. DNA rearrangements in the flagellin locus of an *flaA* mutant of *Campylobacter jejuni* during colonization of chicken ceca. *Infect Immun.*, 68, 7137–7140.
- On S.L., Nielsen E.M., Engberg J., Madsen M., 1998. Validity of *SmaI*-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *SalI*, *KpnI*, and *BamHI* polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *Epidemiol. Infect.*, 120, 231–237.
- Ono K., Kurazono T., Niwa H., Itoh K., 2003. Comparison of three methods for epidemiological typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Curr. Microbiol.*, 47, 364–371.
- Parkhill J., Wren B.W., Mungall K., Ketley J.M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R.M., Feltwell T., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Moule S., Pallen M.J., Penn C.W., Quail M.A., Rajandream M.A., Rutherford K.M., van Vliet A.H., Whitehead S., Barrell

- B.G., 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 6770, 665–668.
- Scates P., Moran L., Madden R.H., 2003. Effect of incubation temperature on isolation of *Campylobacter jejuni* genotypes from foodstuffs enriched in Preston broth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 4658–4661.
- Shi Z. Y., Liu P.Y., Lau Y. J., Lin Y.H., Hu B.S., Tsai H.N., 1996. Comparison of polymerase chain reaction and pulsed-field gel electrophoresis for the epidemiological typing of *Campylobacter jejuni*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 26, 103–108.
- Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 19, 6823–6831.

MOLECULAR TYPING CAMPYLOBACTER STRAINS BY METHODS BASED ON POLYMERASE CHAIN REACTION

Abstract. Thermotolerant bacteria belonging to the *Campylobacter* genus are one of the most common causes of human food infections due to ingestion of food, especially of animal origin. The disease (campylobacteriosis) in 90% of cases is the effect of *C. jejuni* but in its pathogenesis may also participate other genera such as *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. The main source of microorganisms for humans is poultry which is a non-symptoms carrier of *Campylobacter*.

For the evaluation of the discriminatory power of *C. jejuni* and *C. coli* isolates three techniques have then been selected which based on amplification of the DNA fragments with the PCR method (ERIC-PCR, RAPD-PCR) or on the restriction analysis with different endonucleases (PCR/RFLP). It was shown that all of them allowed classification of the group of the isolates tested into respective types thus they were in 100% typable. The classification of the individual techniques was done by the determination of the Simpson's differentiation index (D) and subjective method traits such as easiness and time for performance of the test accessibility and cost of the analysis. It was found that the ERIC-PCR technique characterized with a high discriminatory power ($D = 0.95$) and it was also easy and rapid to perform as well as had a low cost. Similar advantages for the RAPD-PCR and, in some extend, for PCR/RFLP (*flaA* typing) methods have been observed. On the other hand, these techniques were not very much useful for differentiation of the *C. coli* isolates recovered from poultry carcasses (D index 0 and 0.41, respectively).

Key words: *Campylobacter*, differentiation, *flaA* typing, ERIC-PCR, RAPD-PCR

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2008

Do cytowania – For citation: Wieczorek K., Osek J., 2008. Typowanie molekularne szczepów *Campylobacter* przy użyciu technik opartych na reakcji łańcuchowej polimerazy. *Acta Sci. Pol. Med. Vet.* 7(2), 29–39.

HYGIENIC PROBLEMS IN A SAUSAGE PRODUCING PLANT IN SPECIAL REGARD TO TECHNICAL EQUIPMENT

Cordula Schwarzmüller, Andreas Stolle

Institut für Lebensmittelhygiene und -technologie, Ludwig-Maximilians-Universität

Abstract. The process-, handling- and staffhygiene in a meat products plant in south germany was controlled. The material for examination were boiled sausages and machines that were tested for the indicator germs bioburden and *Enterobacteriaceae*. Because of an existent problem with *Lactobacillaceae*, these bacterial family was also included in the analysis. The abundance and achievement of quality objectives was verified with observations within the factory during the sampling. As a source of contamination the sausage-separator was detected. Through observations within the factory during the sampling, it stood out that especially the cleaning-management was suboptimal. As an example before production start, thus on freshly cleaned equipment, still clearly sausage residues were recognizable beneath the knifebar of the sausage-separator. Therefore the hygiene- and cleaning management should be changed in matters of frequency and thoroughness. The main focus should rely on the education of the employees.

Key words: processhygiene, handlinghygiene, staffhygiene

INTRODUCTION

According to regulation (EG) 852/2004 the responsibility for the safety of food is at the food contractor. These should be boosted by using the HACCP principles in combination with a good hygiene practice.

In this study we wanted to control the process- and product hygiene by testing for total viable count, *Enterobacteriaceae* and *Lactobacillaceae*.

The cause of *Enterobacteriaceae* in food is want of hygiene in handling the product. Because of this the adherence of basic hygiene regulations is very important [Stiles and

Lai-King 1981, Dykes et al. 1991, Borch et al. 1996, Huis In't Veld 1996, Chabela et al. 1999, Lues and Tonder 2005, Bonfoh et al. 2006].

Lactobacillaceae breed, because of their microbiological attributes (Table 1), to fast spoilage of boiled sausages. Reason for contamination of sausages with *Lactobacillaceae* are machines and staff. But also in the air and in the cold storage room *Lactobacillaceae* were found [Mäkelä and Korkeala 1987, Dykes et al. 1991, Nerbrink and Borch 1993].

MATERIAL AND METHOD

The food- and environmental samples for this research derive from a sausage producing plant in south Germany, which uses only poultry meat for their products. The assortment of products included pickled wares and wares without nitrite curing salt. The cleaning and disinfection occur by the staff of the plant alternatively by a cleaning company.

The test specimens were sausages, contact plates or swabs. The sausages were taken out of the producing process after boiling, cooling, storing and packaging. The contact plates/swabs were taken after cleaning and disinfection and during production from the sausage separator, the red Euro-boxes and the packaging machine.

Another very important part of the study were audits before production and during the staffs working.

RESULTS

As a source of contamination the sausage-separator was detected. 28,9 % of the **sausage** samples which were taken of the sausage separator showed a concentration on *Lactobacillaceae* between 10^1 and 10^5 ofu/g. In comparison, after the boiling only 2,2 % and after the cooling down 6,5 % of the samples were affected.

Also by the means of surrounding environmental samples of this machine a clear contamination was detected.

Around of the results of the **audits** in the following areas of the plant big problems could be decided.

Hygienic sluice

- Technical defects (empty soap/disinfectant)
- Bad hygiene behaviour of the staff (especially of the maintenance staff)

Boiling area

- Non-compliance of default times

Cold storage room

- Ventilating system very dirty

Sausage separator

- Ineffective cleaning (Figure 1)
- Disposition of pressure washer during product was in the room

Packaging

- Also ineffective cleaning
- Packaging of food which fell on floor

Crate washer

- Altogether a bad state of cleaning

Aground the achievements following arrangements can be given:

- Regular hygienic instruction with efficiency test at the end
- Compliance of default times during the complete production process
- Special schooling of the maintenance staff
- Intermediate cleaning of the sausage separator just after clearance the machine
- Continuous changing of the knifebar of the sausage separator
- Pasteurization after packaging the sausages

References can be requested by author.

List of Attachments



Fig. 1. Situation of the sausage-separator before starting production but after cleaning. Inside the circle product residues are demonstrated

Rys. 1. Wygląd wilka poddanego oczyszczaniu przed rozpoczęciem produkcji. W kółku widoczne zanieczyszczenia

Table 1. Indication and cause for the spoilage of boiled sausages
 Tabela 1. Oznaki i przyczyna zepsucia kielbas gotowanych

Appearance of spoilage	Biochemic activity	Microorganisms	References
Fumigation of the package	Formation of CO ₂ during reduction of glucose	<i>Leuconostoc</i>	Niven et al. 1949, von Holy 1991, Borch et al. 1996, Weber 2003
Virescence	Formation during Oxidation of matters from the meat so that hydrogen peroxide can be formed. Hydrogen peroxide is reacting with Hämochromogen or Nitrosomyoglobin to a green Porphyrin.	<i>Lactobacillus viridescens</i>	Niven et al. 1949, Niven / Evans 1956, von Holy et al. 1991, Egan 1983, Borch et al. 1996, Weber 2003
Acidic odor an flavor	Fermentation from glucose to lactate.	mostly <i>Lactobacillus</i> and <i>Leuconostoc</i>	Niven et al. 1949, Sharpe 1963, Reuter 1970b, Egan 1983, Korkeala et al. 1985, von Holy 1991, Borch et al. 1996
Slime formation	Formation of Polysaccharids from Saccharose	<i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> and <i>Streptococcus</i>	Niven et al. 1949, Sharpe 1963, Egan 1983, Korkeala et al. 1988, Mäkelä et al. 1992b, von Holy 1991, Borch et al. 1996, Weber 2003

PROBLEMY HIGIENICZNE PRODUCENTÓW KIEŁBAS ZWIĄZANE Z WYPOSAŻENIEM TECHNICZNYM

Streszczenie. Kontrolowano stan higieny załogi i linii produkcyjnych w zakładach przetwórstwa mięsnego w południowych Niemczech. Materiałem do badań były próbki kiełbasy gotowanej oraz wymazy z powierzchni maszyn, które badano w kierunku zagrożeń biologicznych i *Enterobacteriaceae*. Ze względu na istniejący problem z *Lactobacillaceae* również przedstawiciele tej rodziny włączono do badań. Status sanitarny zakładów był oceniany na podstawie obserwacji dokonywanych podczas pobierania próbek. Źródłem zanieczyszczenia kiełbas były powierzchnie wilka. W czasie obserwacji przy próbobraniu wyróżniał się niedokładnym wykonaniem procedur oczyszczania. Z tych powodów postępowanie to powinno ulec poprawie co do częstości i dokładności wykonania. Główny nacisk trzeba położyć na szkolenie pracowników.

Słowa kluczowe: higiena przetwórstwa, higiena produkcji, higiena pracowników

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.06.2008

For citation – Do cytowania: Schwarzmüller C., Stolle A., 2008. Hygienic problems in a sausage producing plant in special regard to technical equipment. Acta Sci. Pol. Med. Vet. 7(2), 41–45.

REALISATION OF THE „HYGIENE PACKAGE” HACCP AND THE NEW EU-REGULATIONS - FOCUSING CATERING CANTEENS AND RESTAURANTS

Andreas Stolle, Susanne Kaufmann

Institut für Lebensmittelhygiene und -technologie, Ludwig-Maximilians-Universität

Abstract. Since a couple of years the so called hygiene package is in use and the most important regulations are shown in the flow chart (1).

It includes specific hygienic descriptions for food of animal origin (Reg. 854) and special prescriptions for the official safety for products of animal origin for human consumers. In connection with additional European regulations specially (Reg. 178) for prescription of all fundamentals of food and additional ways like the founding the European Food Safety Authority (EFSA). These prescriptions were the basis of a totally new organisation of the new food hygiene legislation. By setting up directly working regulations for the memberstates it was the direct way for EU - States to work on the same basis.

But there were special problems and not clarified processes in the use of the new hygiene regulation laws. The following article shall show some of these problems in the special fields of canteen catering and restaurants. In this way it is given special regard to the HACCP-concept.

Key words: EU-Regulation, Canteencatering

1. EUROPEAN FOOD HYGIENE PACKAGE:

Reg. (EG) 178/2002

Reg. (EG) 882/2004

Reg. (EG) 852/2004

Reg. (EG) 853/2004

Reg. (EG) 854/2004

HACCP is the abbreviation for „HAZARD ANALYSIS CRITICAL CONTROL POINT”. This concept exists in the food industry since a long time, but still it is heavily discussed on international levels. Some official authorities see the implementation

Corresponding author – Adres do korespondencji: Andreas Stolle, Institut für Lebensmittelhygiene und -technologie der Veterinärmedizinischen Fakultät Ludwig-Maximilians-Universität München, Schönleutnerstraße 8, 85764 Oberschleißheim, e-mail: Sekretariat@lmhyg.vetmed.uni-muenchen.de

of this system in connection with a regulation in order to find in the above system an overall solution of all food safety problems of their country. But in reality the use of this working plan is of course a practical and important step forward. But only if the humans being that are responsible for the practical work have enough knowledge and experience the concept works in an efficient manner. That means HACCP is just a technique and must be established and run by well trained people.

Especially in the field of **canteen catering** and **gastronomy** it is very often, that untrained people are working as in this field. Therefore is necessary to show once more the special problems connected in this field with the regulations and in this system.

2. DEFINITIONS

The regulation 178/2002 gives very clearly the idea, that canteens are included. It is necessary to emphasize this once more because very often people in this field there are not part of this system.

From: Reg. (EG) 178/2002

Art. 1 Aim and Scope

Art. 2 Definition of Food

Art. 3 Other Definition's (including retail trade)

Def.: „Retail Trade“ Art. 3, § 1 Nr. 7.....The use and handling of food and its storage at sales points and issue to the consumer. This includes.....**company canteens, catering canteens** and similar places,.....e.g. shops, supermarkets.....

Food hygiene is to prevent especially microbial contaminations. Therefore it is necessary to have a close look at the situation outside. Looking at the epidemical Bulletin of the FAO/WHO [2003] for different countries, it is pretty easy to be seen, that the food borne infections in Germany are still at large. In this year 2003 roughly 70.000 people were affected with Salmonella and by Campylobacter nearly 50.000. These figures are not very correct, because it has to be estimated at much much higher number. Next position Yersinia, viruses run and time again (Clostridium botulinum, Shigella and other important microbes.

From Germany in a statistical model a calculation was made up for the affected people that means, what it is costs for the social system in this country.

3. STATISTICAL MODELL

Sum 120.000 persons per year

Study case 1 % hospitalized

Stay in hospital ~ 300 €

→ $1200 \times 300 \text{ €} \times 3 \text{ d} = 1,1 \text{ Mio. €}$

In this field canteens have a sensitive position, because on more days, more and more people are heaving the meals in this system and of course the risk of an infection

that is a really big one. A higher risk can derive in this field from a primary or secondary contamination and in work by human infections or by poisonous substances.

According to Literature the microbiological reasons in the development of food-born diseases have a much higher number than those by chemical sources.

A large field of possible kitchen abuses are possible are resulting in Enteritis infectiosa. Regarding all fields of handling, during the preparing processes, the following short statistics according to WHO in the years 1993–1998 was set up. This is still in order; in spite of that there are many technical changes. In the lead is still heating, respectively re-heating followed by cooling and storage. This makes it perfectly clear that they are certain fields in the preparing of food in canteens, to which it needs special regard to avoid sources of Enteritis infectiosa.

4. ENTERITIS INFECTIOSA BY KITCHEN ABUSE; D, 1993–1998

Other	1 %	Storage	10 %,
Ingredients	3 %	Cooling	12 %,
Kitchenutensils	3 %	Heating	17 %
Staff	4 %	Re-heating	18 %
Thawing	6 %	Unknown	25 %

The following list (5) gives a summary of the main topics and problems of food prepared in catering systems. Additionally dangerous food in the canteen systems are listed in the next paragraph (6).

5. COMMUNITY CATERING: PROCESS STEPS / PROBLEMS

Process steps

- Multiple fixed/variable offer of dishes
- Price favourable dishes, main corners, resp. soups, salads, desserts
- Use of industrial precooked - and finished products, tinned food
- Except preworked starch- products, no hygienic delicate products are used
- Variety and storage

Problems

- easily perishable food, not totally done
- easily perishable food, totally done/well done
- cold buffet kitchen

6. POSSIBLY DANGEROUS FOOD

- | | |
|-------------------------|----------------------------------|
| – Meat | – Cutted melons |
| – Poultry | – Tofu, sojaproducts |
| – Egg/products with egg | – Garlic and oil marinated stuff |
| – Seafood | – Raw sprouts, germs etc. |
| – Milk, | – Products |

This Modell of the suppliance of food with a security risk concept is not really new. It's based on a traditional way of working, but since sometime and especially now regarding the new hygiene package kitchen staff and consumer are more and more confronted with higher hygienic levels. Additionally the consumers taking part in this way of nutrition have higher quality claim to these systems.

Additionally it is necessary, that the management and the employees must get in the heads that the consumer is in the focus of all these handlings. These procedures should be used as a potential claim in the sense of „change management“. That means, the existing process organisation can be critically checked and it is possible to start quality securing, quality improving projects like e.g. on the basis of DIN/EN ISO 9001: 2000. The development and the use of technological new production and catering systems may additionally improve the quality for the participants of canteen catering services on the following bases (7).

7. SAFETY, STRATEGIES REGULATION (EG) 852/2005, ART. 5

- Basic hygiene
- Self controlsystem incl. dokumentation
- Sample-took and analysis

REFERENCES

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 EU L 139/1, 30.04.2004)

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 EU L 139/55, 30.04.2004)

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 EU L 155/206, 30.04.2004)

Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules(Official Journal of the EU L 191/1, 28.05.2004)

REALIZACJA „HYGIENE PACKAGE“ HACCP ORAZ NOWE REGULACJE UE DOTYCZĄCE NADZORU NAD STOŁÓWKAMI I RESTAURACJAMI

Streszczenie. Higieniczny pakiet (Hygiene Package) zawiera specyficzne higieniczne wymagania dla żywności zwierzęcego pochodzenia (Rozporządzenie WE 854/2004) oraz specjalne przepisy w celu zapewnienia bezpieczeństwa żywności zwierzęcego pochodzenia, przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Rozporządzenie WE 178/2002). Te dokumenty stały się podstawą całkowicie nowej organizacji nadzoru i nowego prawa żywnościowego. Brak jednak w nim odniesień do problematyki higieny w stołówkach i restauracjach. Te zagadnienia są omawiane w referacie.

Słowa kluczowe: przepisy UE, stołówki, catering

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.06.2008

For citation – Do cytowania: Stolle A., Kaufmann S., 2008. Realisation of the „Hygiene Package” HACCP and the new EU-regulations - focussing catering canteens and restaurants. *Acta Sci. Pol. Med. Vet.* 7(2), 47–51.

RYZIKO TRANSMISJI ZANIECZYSZCZEŃ Z PASZY DO ŻYWNOSCI

Łukasz Zielonka, Magdalena Gajęcka, Ewa Jakimiuk,
Maciej Gajęcki

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Streszczenie. Toksyczne substancje, takie jak chlorowane pestycydy, mikotoksyny, metale ciężkie i leki weterynaryjne, są prawie wszechobecne w środowisku. W związku z tym są one również w środkach żywienia zwierząt. Prawidłowe zarządzanie ryzykiem zależy od znajomości przebiegu procesów adsorpcji, biotransformacji i wydalania tych substancji oraz praktycznych metod obniżenia ich wartości w materiałach paszowych. Substancje toksyczne są metabolizowane przed lub po adsorpcji przez błonę śluzową jelit. Zależnie od cech fizykochemicznych niektóre z nich są metabolizowane do produktów nietoksycznych. Większość leków weterynaryjnych i dodatków paszowych należy do tej grupy. Inne substancje odkładają się w tkankach zwierzęcych, jak np. dioksyny. Celem pracy było przedstawienie zbioru informacji na temat konsekwencji obecności różnego rodzaju związków chemicznych (pozostałości) zanieczyszczających materiał roślinny.

Słowa kluczowe: pozostałości, pasze, środki spożywcze

WSTĘP

Obecność substancji niepożądanych w materiale roślinnym powoduje zaburzenia homeostazy zarówno u człowieka, jak i zwierząt. Dostają się one najczęściej do organizmów zwierząt i ludzi przez przewód pokarmowy, powodując określone efekty [Shephard 2008]. Wśród tych substancji mogą być: (i) środki ochrony roślin, (ii) emitowane do środowiska zanieczyszczenia przemysłowe, (iii) pozostałości stosowanych w terapii leków weterynaryjnych, (iv) naturalnie produkowane przez rośliny substancje czynne, np. mikotoksyny [Elferink i in. 2008, Gajęcka i in. 2008].

Żywienie zwierząt skoncentrowane jest na stosowaniu składników, które mają dla nich istotne znaczenie odżywcze. Procesy trawienia i wchłaniania są obecnie dokładnie badane. Jak do tej pory bardzo słabo poznany jest problem trawienia i wchłaniania w organizmie zwierzęcym substancji toksycznych lub niepożądanych, chociaż efekty

ich obecności w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego są często poddawane dokładnej analizie [Brambilla i in. 2008]. Niektórzy naukowcy zakładają całkowitą absorpcję tych szkodliwych substancji, by móc przewidzieć, jak ich ilość pozostaje w produktach. Przyjmując taki sposób myślenia, ignoruje się podstawowe zasady fizjologiczne obowiązujące podczas procesów trawienia, wchłaniania i biotransformacji w organizmach ludzkim i zwierzęcym substancji toksycznych czy niepożądanych [Liska i in. 2006]. Tego rodzaju postępowanie nie pozwala na korzystanie z ostatnich zdobyczy wiedzy, jak również uniemożliwia wprowadzenie punktów krytycznych zakładających obniżenie poziomów pozostałości substancji toksycznych czy niepożądanych w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego [Heberer i in. 2007].

Przedłożona praca przedstawia aktualny stan wiedzy o obecności substancji toksycznych pochodzenia paszowego w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego. Tego rodzaju uaktualnienia są potrzebne z tego względu, że niektóre informacje wskazują na spadek znaczenia niektórych wartości analitycznych, zaś techniki toksykologiczne stały się bardziej wyrafinowane. Ponadto poprawienie procesów zarządzania ryzykiem w obrębie żywienia człowieka oraz pozyskiwanie danych na temat zarządzania i kontroli substancji toksycznych w produkcji zwierzęcej są działalnością podstawową.

CHLOROWCOPOCHODNE

Większość związków chlorowcopochodnych można podzielić na trzy grupy: (i) to związki szybko metabolizowane i wydalane z organizmu, do których możemy zaliczyć chlorpyrifos; (ii) to związki, z wykrywalną akumulacją, np. lindane; (iii) to związki, które bardzo łatwo odkładają się w tkankach, jak np. DDT. Stopień narażenia na czynniki skażające jest trudny do określenia i nie zawsze stwierdzenie wartości średnich oraz ustalenie stosunków między ilością odnotowaną w organizmie a wartością pobraną lub stwierdzaną np. w paszy będzie możliwe. W związku z tym skomplikowane jest opracowanie modelu kinetycznego dla wszystkich, przy tym tak różnych związków. Szczegółowa informacja o indywidualnych związkach chemicznych jest jednak niedozowna, by móc opracować indywidualny model kinetyczny, który pozwala na określenie dopuszczalnych wartości pozostałości w tkankach czy produktach zwierzęcych [Kan i Mejer 2007, Kulkarni i in. 2008].

Obecność szybko metabolizowanych związków chemicznych można stwierdzić podczas działania tych substancji chemicznych na organizm zwierzęcy. Ryzyko wystąpienia w tkankach zwierzęcych pozostałości musi być zawsze brane pod uwagę, lecz dla tych szybko metabolizujących się związków nie musi być opracowywany specjalny program zarządzania ryzykiem. Można natomiast brać pod uwagę ewentualne ryzyko zdrowia zwierząt zależne od profilu toksykologicznego mieszaniny związków chemicznych i stopnia narażenia organizmów [Brambilla i in. 2008].

Obecność związków z wykrywalną akumulacją jest stwierdzana w organizmie zwierząt jeszcze w ciągu kilku tygodni po skończonej ekspozycji. Stopień zanieczyszczenia związkami chemicznymi powinien być ograniczany, choć – należy dodać – tego rodzaju zanieczyszczenia nie zawsze przekraczają poziomy MRL (najwyższy dopuszczalny poziom pozostałości – zanieczyszczeń chemicznych, biologicznych, produktów leczniczych i skażeń promieniotwórczych w roślinach, u zwierząt, w tkankach lub narządach zwierząt po uboju i w środkach spożywczych pochodzenia roślinnego

lub zwierzęcego). To jest spowodowane stosowaniem odpowiednich restrykcji prawnych i ekonomicznych. W obawie przed konsekwencjami obecności tych związków są opracowywane programy zarządzania ryzykiem, które współgrają z programami stałej kontroli składników żywnościowych z danego regionu. Tego rodzaju restrykcje stosowane są głównie w krajach rozwiniętych oraz w krajach, gdzie tego rodzaju problemy zdrowotne u zwierząt mają miejsce [Kan 2004, Polder i in. 2008].

Obecność związków łatwo odkładających się w tkankach wykazuje się w organizmie zwierząt po kilku tygodniach lub nawet miesiącach po ich narażeniu [Polder i in. 2008]. Ryzyko zawsze jest rozważane w celu jego ograniczenia. Pozostałości, stwierdzone podczas różnego rodzaju prac monitoringowych, w zasadzie nie przewyższają poziomów MRL, przy czym większość z tych związków jest zabroniona w świecie. Zarządzanie ryzykiem powinno polegać na regularnych kontrolach materiałów paszowych, pochodzących szczególnie z krajów, w których tego rodzaju związki chemiczne są nadal używane lub gdzie uzyskane wyniki wskazują, że omawiane zanieczyszczenia mają miejsce. Oczekuje się, że egzekwowanie zakazów ograniczy możliwość pogorszenia stanu zdrowia zwierząt i ludzi [Heberer i in. 2007].

Postępowanie prewencyjne, związane z obecnością pozostałości związków chlorowcopochodnych w produktach pochodzenia zwierzęcego, powinno polegać na wykorzystaniu punktów kontrolnych w programie HACCP, co można osiągnąć w szczególności przez kontrolę materiałów paszowych zawierających różnego rodzaju tłuszcze. Dzięki temu można nawet znacznie ograniczyć obecność niepożądanych związków chemicznych. Z racji tej, że pozostałości chlorowcopochodnych zanieczyszczające środowisko mogą skażać produkty pochodzenia zwierzęcego, powinny być skrupulatnie kontrolowane. W wielu przypadkach jeszcze nie są dopracowane wartości dopuszczalne dla zanieczyszczeń, o których tu mowa. Określenie wartości dopuszczalnych jest jedyną przeszkodą pozwalającą na skuteczne usunięcie zanieczyszczonych składników z łańcucha żywnościowego [Kan i Mejer 2007].

MIKOTOKSYNY

Występowanie mikotoksyn niekorzystnie oddziałujące na zdrowie ludzi lub zwierząt stwierdza się głównie w ziarnie zbóż po zbiorach, a co się z tym wiąże, w wyprodukowanych z nich środkach spożywczych czy paszach. Toksyny są wynikiem obecności grzybów saprofitycznych i endofitycznych występujących podczas wzrostu roślin albo grzybów saprofitycznych pojawiających się podczas przechowywania ziarna. Mikotoksyny, ogólnie rzecz biorąc, są lipofilne (z wyjątkiem fumonizyn typu B) i dlatego mają skłonność do odkładania się we frakcjach tłuszczowych roślin i zwierząt [Hussein i Brasel 2001].

Czynniki decydujące o stopniu zatrucia mikotoksynami u ludzi czy zwierząt pobierających je z zanieczyszczonymi środkami spożywczymi czy paszami to: gatunek, forma działania związku, ich biotransformacja w organizmie i mechanizmy obronne. Poznawane w chwili obecnej mechanizmy i formy działania mikotoksyn pozwalają dopiero na częściowe zrozumienie różnic w reakcji międzygatunkowej oraz różnic indywidualnego obrazu klinicznego w narządach docelowych. I tak na przykład aflatoksyny są znane z możliwości łączenia się z DNA i wywoływania mutagennych i rakotwórczych zmian u szczurów [Fernandez i in. 2000].

Poznanie metabolizmu i mechanizmów obronnych pozwala zrozumieć, jak dalece niebezpieczne są mikotoksyny dla określonych gatunków albo poszczególnych zwierząt, ale także pomaga w likwidowaniu zatuć. Wiedza o przebiegu procesów biotransformacji mikotoksyn w organizmie poszczególnych gatunków zwierząt umożliwiłaby naukowcom i osobom odpowiedzialnym za społeczny stan zdrowia ocenić stopień ryzyka i narażenia na mikotoksyny u różnych gatunków zwierząt czy ludzi [Binder 2007].

Ostre efekty toksyczne są obserwowane tylko wyjątkowo, jednak długotrwałe narażenie na niskie stężenia poszczególnych mikotoksyn mają najczęściej miejsce i mogą powodować różne przewlekłe choroby, jak np. nowotwory wątroby, nerek, układu rozrodczego ludzi i zwierząt przy dawkach progowych [Gajęcki i in. 2004] lub np. alergie [Bush i in. 2006, Gajęcki i in. 2006].

Ze względu na występowanie mikotoksyn zasadniczo w niskich stężeniach [Sapsford 2006] są one trudne do wykrycia, a analiza środków żywienia zwierząt nie zawsze daje dokładną ocenę występujących w niej metabolitów grzybów pleśniowych, między innymi z powodu niedoskonałych i zbyt skomplikowanych procedur analitycznych lub obecności nowych, nieznanymi jeszcze tego typu związków. Brak umiejętności rozpoznawania objawów w wyniku obecności mikotoksyn w środkach żywienia zwierząt nie pozwala na wykonanie odpowiednich analiz.

W wielu opracowaniach znajdują się opisy wyników badań interakcji deoksyniwalenolu, fumonizyn czy ochratoksyny A z czynnikami zakaźnymi [Kuhn i Ghannoum 2003]. W praktyce lekarskiej jest ogólnie znany fakt interakcji aflatoksyny B₁ z wirusem zapalenia wątroby typu B. Prawdopodobnie działanie fumonizyn lub kwasu cyklopiazonowego na ten czynnik chorobowy jest podobny, ale do końca niezbadany. Coraz więcej pojawia się doniesień przedstawiających interakcję pomiędzy ochratoksyną A a niektórymi wirusami, jak np. hantane wirus, który występuje endemicznie na Bałkanach, lecz nie jest dokładnie poznany. Oba wspomniane wirusy i mikotoksyny z grupy ochratoksyn są odpowiedzialne za występowanie jednostki chorobowej określanej jako chroniczne uszkodzenie nerek (chronic kidney damage) [Gajęcki i in. 2007, Pfohl-Leskowicz i in. 2002].

W wielu pracach zostały udokumentowane właściwości immunosupresyjne trichotecenów wobec patogenów zwierzęcych [Zielonka i in. 2003]. Z przedstawionych przykładów można wnioskować, że przy mieszanych zatruciach i podczas podawania różnych dawek mikotoksyn obraz kliniczny również będzie mieszany, natomiast narządami, które podlegają najsilniejszemu działaniu mikotoksyn, były nerki lub wątroba. Narządy rozrodcze reagują obrzękami bądź stanami alergicznymi. [Fischer i Dott 2003].

Teoretycznie rozważając problem interakcji pomiędzy mikotoksynami na poziomie komórki, można śmiało stwierdzić, że jest coraz więcej pytań, na które brak jest jednoznacznej odpowiedzi. W chwili obecnej wiadomo, że interakcja toksokinetyczna, (czyli interakcja pomiędzy mikotoksynami lub mikotoksynami a środkami żywienia zwierząt, której efektem może być zgodne jednokierunkowe działanie prowadzące do wzmożenia działania toksykologicznego – *działanie synergiczne* – lub przeciwnie, różnokierunkowe oddziaływanie powodujące osłabienie albo całkowite zahamowanie działania mikotoksyn – *działanie antagonistyczne*), przebieg procesów metabolicznych i aspekty interakcji toksodynamicznej (czyli działanie toksykologiczne kilku mikotoksyn na poziomie

receptora i efektora) u ludzi i u zwierząt są wynikiem udziału ilościowego i jakościowego mikotoksyn [Tritscher i Page 2004].

Nasuują się zatem pytania [Krska i Molinelli 2007], np.: Co jest wynikiem interakcji mikotoksynowej w poszczególnych tkankach czy komórkach?; Jaki jest efekt końcowy mającej miejsce mikotoksykozy mieszanej dla całego organizmu zwierzęcego czy ludzkiego?

Organizmy monogastryczne, począwszy od ptaków poprzez zwierzęta gospodarskie i towarzyszące do człowieka, są wrażliwe na obecność kilku czy nawet kilkunastu mikotoksyn tak w paszach, jak i w środkach spożywczych. Niezależnie od wielkości najczęściej występujących wartości określonych mikotoksyn w środowisku podczas różnego rodzaju badań testuje się w zasadzie tylko bardzo wysokie dawki poszczególnych mikotoksyn w celu uzyskania jednoznacznych objawów. W efekcie, uzyskane wyniki oprócz zademonstrowania skutków stanów określanych jako mikotoksykozy u ludzi czy zwierząt, z punktu widzenia toksykologicznego, niczego więcej nie wnoszą. Przykładem może być brak uaktualnień w klasyfikacji niektórych mikotoksyn do grupy czynników rakotwórczych przez IARC, oprócz oczywiście ochratoksyny A i fumonizyny B₁ oraz brak satysfakcjonujących hipotez o ich biotransformacji. Tylko w wyniku nieustannego badania skutków i sposobów działania mikotoksyn, przy stosowaniu niskich okołoprogowych dawek u różnych gatunków, można będzie skorygować w najbliższej przyszłości nasz sposób widzenia tego problemu. W podsumowaniu należałoby stwierdzić, że w przyszłości powinno się prowadzić badania naukowe mogące przedstawić wyniki interakcji mikotoksyn (chemicznych mieszanin np. trichotecenów) i jak najszybciej wdrażać odpowiednie zalecenia. Nie mniej ważne jest również ustalenie gatunku zwierząt, który byłby użyty do doświadczeń oraz wyznaczenie konkretnego celu, do którego powinno się zmierzać, np. opracowanie dopuszczalnych (progowych) dawek (stężeń) poszczególnych mikotoksyn w materiale roślinnym dla człowieka i określonych gatunków zwierząt [Gajęcka i in. 2008].

Wprowadzając podstawowe założenia systemu HACCP w program zwalczania mikotoksyn, kładziono główny nacisk na stosowanie programów prewencyjnych już podczas fazy wzrostu roślin. Skupiały się one na usunięciu lub unieczynnianiu mikotoksyn z organizmu roślinnego. Szybko jednak stwierdzono, że jest to skomplikowane i ekonomicznie nieuzasadnione. Kontrola obecności mikotoksyn w polu jest również trudna do przeprowadzenia, gdyż pogoda pełni decydującą rolę w namnożeniu grzybów pleśniowych i tworzeniu mikotoksyn. Niektórzy próbują wprowadzać specjalne strategie dietetyczne chroniące przed szkodliwym działaniem mikotoksyn [Galvano i in. 2001]. Jednakże powstające warunki ekonomiczne i problemy techniczne powodują, że dotychczasowe propozycje są bardzo trudne do spełnienia. Wielu koncentruje się na opracowywaniu preparatów zmniejszających skuteczność mikotoksyn, z różnym skutkiem [Polak i in. 2008]. Przedstawione propozycje sprawdzają się z dość dobrym wynikiem *in vitro*, gorsze natomiast efekty uzyskuje się *in vivo*. W chwili obecnej sugeruje się raczej prowadzenie różnych programów prewencyjnych mających nie dopuścić do przekroczenia 12% udziału wody w ziarnie zbóż [Binder 2007].

METALE CIĘŻKIE

Ważną cechą metali ciężkich jest to, że chemiczna forma, jaką się stwierdza, może ulec zmianie w trakcie przechodzenia przez ścianę jelit lub podczas magazynowania

metali w tkankach zwierząt, choć jednocześnie one jako takie nie są metabolizowane. Wcześniejsze badania już udokumentowały, że obecność metali ciężkich w paszy lub materiałach paszowych jest wynikiem działalności rolniczej, przemysłowej albo przypadkowego lub rozmyślnie niewłaściwego użycia różnych preparatów potrzebnych w życiu codziennym albo w produkcji [Al-Faqih i in. 2008, Elferink i in. 2008]. W różnych badaniach potwierdzono, że w tkance mięśniowej i mleku nie odnotowuje się wysokich wartości metali ciężkich, gdy zwierzęta są narażone na ich pozyskiwanie. Głównymi organami, w których pojawiają się te pierwiastki, są wątroba i nerki [Inadera 2006].

Stosując system HACCP w działaniach prewencyjnych wobec metali ciężkich, należałoby: zredukować poziom pozostałości w paszach poprzez lepszą kontrolę i unikanie stosowania materiałów paszowych zanieczyszczonych tego rodzaju pozostałościami. Oczywiście środowisko i przypadkowe narażenia jest bardzo trudno kontrolować. Badania kontrolne na obecność metali ciężkich w produktach pochodzenia zwierzęcego polegają na przeglądach i prewencyjnym niedopuszczeniu do naruszenia ustalonych poziomów metali ciężkich w określonym materiale [Kosobucki i in. 2008].

LEKI WETERYNARYJNE I DODATKI PASZOWE

Leki weterynaryjne i dodatki paszowe w zasadzie są kontrolowane przed podaniem zwierzętom i każdy z nich ma określony okres karencji i datę ważności. Z punktu widzenia systemu HACCP są – w pierwszej kolejności – rolnik, a następnie lekarz weterynarii, odpowiedzialni za prawidłowe podawanie zwierzętom leków lub dodatków paszowych.

Należy wyczulić się na moment, w którym może mieć miejsce przechodzenie pozostałości leków lub dodatków paszowych z wsadu paszy leczniczej do wsadu paszy zwykłej zarówno podczas produkcji tej ostatniej, jak i w czasie transportu, i u odbiorcy [McEvoy 2002].

Stosowane leki, jak i dodatki paszowe dają gwarancję, że procesy ich biodegradacji (biotransformacji) w organizmie zwierząt gospodarskich przebiegają prawidłowo, tak jak podczas degradacji różnego rodzaju toksyn. Przy czym należy pamiętać, że zawsze znikomy procent używanych leków i dodatków zostaje wydany w produktach pochodzenia zwierzęcego. Wiedza o tym wynika z faktu posiadania coraz lepszego sprzętu i dokładniejszych metod analitycznych, przy czym stwierdza się, że przebieg procesów metabolicznych jest silniej wyrażony niż ilościowe przenoszenie pozostałości [Reig i Toldrá 2008]. Warto podkreślić fakt, że oznaczane pozostałości są poniżej wartości MRL oraz są niegroźne dla zdrowia konsumenta. Przykładem tego jest częsta obecność w produktach pochodzenia zwierzęcego clenbuterolu lub innych beta-agonistów, które podaje się zwierzętom, mimo że są zakazane, a zwierzęta zostają poddane ubojowi po upływie okresu karencji [Barbosa i in. 2005, Heberer i in. 2007]. Uwaga jest jednak skupiona na jajach i mleku z racji, że produkty te są produkowane codziennie i okresu karencji nie można wyegzekwować.

Podczas przygotowywania programu zarządzającego ryzykiem a dotyczące leków weterynaryjnych i dodatków paszowych powinny być brane pod uwagę jedynie dwa aspekty: po pierwsze przestrzeganie odpowiedniego stosowania leków ze znajomością okresu karencji i po drugie – w momencie produkcji lub stosowania pasz leczniczych należy mieć na uwadze możliwość przenoszenia się pozostałości leków do otrzymanego produktu.

PODSUMOWANIE

Na szybkość i efektywność przenoszenia pozostałości toksycznych substancji z pasz do środków spożywczych mają wpływ procesy adsorpcji i biotransformacji tych związków chemicznych. Procesy te przebiegają głównie w enterocytach i w komórkach innych tkanek.

Samo stwierdzanie obecności niepożądanych związków w paszy zamazuje obraz rzeczywistego ich udziału w różnych procesach i z reguły jest zbyt późno na jakąkolwiek interwencję. Można wykonywać pewne działania prewencyjne polegające na: ochronie produkowanej paszy przed materiałami lub dodatkami o niskiej jakości zdrowotnej i przed czynnikami środowiskowymi; wprowadzeniu okresu karencji; czy na stosowaniu adsorbentów wyłapujących substancje toksyczne w paszy [Kosobucki i in. 2008].

Zapobieganie sytuacjom, w których występuje narażenie się na substancje toksyczne, jest jednym ze znaczących narzędzi w procesie zarządzania ryzykiem. Z czynnikami zanieczyszczającymi znanego pochodzenia można łatwo sobie poradzić, na co jest wiele dowodów (postępowanie z aflatoksyną czy metalami ciężkimi). Brak jednak prostych metod oznaczania na potrzeby kontroli, obecności tego rodzaju zanieczyszczeń we wszystkich materiałach paszowych

Okres karencji powinien być określony odpowiednimi regulacjami prawnymi. Szczególnie w przypadku jajek i mleka, które są produkowane w systemie dziennym łatwo wzrasta ich poziom zanieczyszczeń podczas dłuższego czasu narażenia. Przerwanie procesu narażenia, ogólnie rzecz biorąc, nie jest bezpośrednim rozwiązaniem w celu zmniejszenia poziomu zanieczyszczeń, które w większości przypadków nie spadają do wartości dozwolonych w ciągu jednego dnia. Z racji tej na przykład krowy i kury noski jeszcze przez wiele dni lub tygodni będą dostarczały produkty nie nadające się do spożycia. W takiej sytuacji okres karencji pozwoliłby rozwiązać tego rodzaju problemy.

W odniesieniu do zwierząt rosnących, które nie dostarczają swych produktów (mięso) codziennie, możemy uzyskać zmniejszenie poziomu zanieczyszczeń – przez „rozcieńczenie” jako wynik wzrostu organizmu zwierząt (tuczniaki, wolce), co pozwala na uzyskanie produktu, który będzie spełniał wymogi prawne, jeśli chodzi o wielkość zanieczyszczenia [Elferink i in. 2008]. Ten sposób postępowania wykorzystano podczas awarii dioksynowej wobec tuczniaków, u których masa ciała w okresie stwierdzenia obecność dioksyn w paszy była poniżej 50 kg.

Stosowanie adsorbentów jest intensywnie sprawdzane pod kątem występowania organicznych związków chloru i mikotoksyn. Wyniki badań organicznych związków chloru nie są obiecujące. Innego rodzaju wyniki są uzyskiwane podczas badań z mikotoksynami.

Uogólniając problem, można stwierdzić, że organiczne związki chloru generalnie są adsorbowane i przenoszone do organizmu, lecz nie są zbyt szybko metabolizowane. Tak więc zapobieganie ich obecności w paszy dla zwierząt jest najlepszym sposobem kontroli obecności zanieczyszczeń. Mniej trwałe składniki są rzadko zauważane w produktach pochodzenia zwierzęcego jako wynik zanieczyszczenia paszy [Brambilla i in. 2008].

Zanieczyszczenia metalami ciężkimi i lekami powinny być kontrolowane począwszy od mieszadeł, poprzez selekcję materiałów paszowych i żywnościowych oraz przez właściwe praktyki produkcyjne [Heberer i in. 2007].

Zanieczyszczenia środowiskowe są nadal problemem dla czynników kontrolujących i opracowujących system zarządzania ryzykiem.

Ocena ryzyka jest czymś, co dla konsumentów ma istotną wartość informacyjną, wiąże się z warunkami ekonomicznymi i produkcyjnymi. Brak prostych i tanich metod analitycznych wykrywających obecność większości zanieczyszczeń wyklucza wprowadzenie ekstensywnych badań skringingowych jako narzędzia w zarządzaniu ryzykiem.

Mimo olbrzymiej liczby opracowań dotyczących obecności pozostałości w produktach pochodzenia zwierzęcego i sposobu przenoszenia tych toksycznych substancji – wiedza o dynamice ich obrotu metabolicznego u zwierząt gospodarskich jest znikoma. Zatem wskazując badania priorytetowe, w tym ogromnym zadaniu badań toksykologicznych, należy patrzeć na nie przez pryzmat zdrowia człowieka i zwierząt. Czynnikiem selekcyjującym wszystkie zadania badawcze powinna być toksyczność poszczególnych składników chemicznych w ekosystemie. Towarzyszące temu przypadki zatruc substancjami chemicznymi obecnymi w paszy lub środkach spożywczych będą też wpływać na tok badań (mikotoksyny, dioksyny, DDT czy nitrofen) [Kulkarni i in. 2008]. Brakuje również informacji o możliwości działań strategicznych jako narzędzia w zarządzaniu ryzykiem. Rozwój systemów jakości wymaga tego rodzaju wiedzy, która może stać się impulsem w opracowaniu chronologii badań.

PIŚMIENNICTWO

- Al-Faqih L., Johnson P.D., Allen S.J., 2008. Evaluation of a new peat-based sorbent for metals capture. *Bioresource Technol.*, 99, 1394–1402.
- Barbosa J., Cruz C., Martins J., Silva J.M., Neves C., Alves C., Ramos F., Noronha de Silveira M.I., 2005. Food poisoning by clenbuterol in Portugal. *Food Addit. Contam.*, 22 (6), 563–566.
- Binder E.M., 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 133, 149–166.
- Brambilla G., Iamiceli A.L., Ferri F., di Domenico A., 2008. Normative and pre-normative aspects for the management of actual and perspective POPs in meat and meat products. *Meat Sci.*, 78, 25–33.
- Bush R.K., Portnoy J.M., Saxon A., Terr A.I., Wood R.A., 2006. The medical effects of mold exposure. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 117, 326–333.
- Elferink E.V., Nonhebel S., Moll H.C., 2008. Feeding livestock food residue and the consequences for the environmental impact of meat. *J. Clean. Prod.*, 16, 1227–233.
- Fernandez A., Hernandez M., Verde M.T., Sanz M., 2000. Effect of aflatoxin on performance, hematology, and clinical immunology in lambs. *Can. J. Vet. Res.*, 64, 53–58.
- Fischer G., Dott W., 2003. Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. *Arch. Microbiol.*, 179, 75–82.
- Gajęcka M., Zielonka Ł., Obremski K., Gajęcki M., 2008. Prawdopodobne konsekwencje występowania mikotoksyn w materiałach paszowych. *Post. Nauk Rol.*, 2, 75–84.
- Gajęcki M., Gajęcka M., Zielonka Ł., Jakimiuk E., Obremski K., 2006. Zearalenone as a potential allergen in the alimentary tract – a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 15/56(3), 263–268.

- Gajęcki M., Przybyłowicz M., Obremski K., Zielonka Ł., Zwierzchowski W., Skorska-Wyszyńska E., Gajęcka M., Polak M., Jakimiuk E., 2004. Preliminary results of monitoring research on zearalenone presence in blood of women with neoplastic lesions in reproductive system. *Pol. J. Vet. Sci.*, 7, 153–156.
- Gajęcki M., Zielonka Ł., Obremski K., Jakimiuk E., Gajęcka M., 2007. Multi-mycotoxicosis. *Environ. Biotach.*, 1(3), 25–29.
- Galvano F., Piva A., Ritieni A., Galvano G., 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *J. Food Protect.*, 64 (1), 120–131.
- Heberer T., Lahrssen-Wiederholt M., Schafft H., Abraham K., Pzyrembel H., Henning K.J., Schauzu M., Braeunig J., Goetz M., Niemann L., Gundert-Remy U., Luch A., Appel B., Banasiak U., Böl G.F., Lampen A., Wittkowski R., Hensel A., 2007. Zero tolerances in food and animal feed—Are there any scientific alternatives? A European point of view on an international controversy. *Toxicol. Lett.*, 175, 118–135.
- Hussein H.S., Brasel J.M., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of micotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101–134.
- Inadera H., 2006. The immune system as a target for environmental chemicals: Xenoestrogens and other compounds. *Toxicol. Lett.*, 164, 191–206.
- Kan C.A., 2004. Chemical residues. In: Mead, G.C (Ed.), *Poultry Meat Processing and Quality*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, 258–282.
- Kan C.A., Meijer G.A.L., 2007. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 133, 84–108.
- Kosobucki P., Kruk M., Buszewski B., 2008. Immobilization of selected heavy metals in sewage sludge by natural zeolites. *Bioresource Technol.*, 99, 5972–5976.
- Krska R., Molinelli A., 2007. Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387, 145–148.
- Kuhn D.M., Ghannoum M.A., 2003. Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16, 144–172.
- Kulkarni P.S., Crespo J.G., Afonso C.A.M., 2008. Dioxins sources and current remediation technologies – A review. *Environ. Int.*, 34, 139–153.
- Liska D.A., Lyon M., Jones D.S., 2006. Detoxification and biotransformational imbalances. *Explorer*, 2, 122–140.
- McEvoy J.D.G., 2002. Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. *Anal. Chim. Acta*, 473, 3–26.
- Polak M., Gajęcka M., Jakimiuk E., Gajęcki M., 2008. Możliwość ograniczenia toksyczności mikotoksyn w paszach dla świń. *Mag. Wet.*, monografia, 576–580.
- Polder A., Gabrielsen G.W., Odland J.Ø., Savinova T.N., Tkachev A., Løken K.B., Skaare J.U., 2008. Spatial and temporal changes of chlorinated pesticides, PCBs, dioxins (PCDDs/PCDFs) and brominated flame retardants in human breast milk from Northern Russia. *Sci. Total Environ.*, 391, 41–54.
- Pfohl-Leskowicz A., Petk-Bocharova T., Cherozemsky I.N., Castegnaro M., 2002. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumors: a review on etiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Addit. Contam.*, 19, 282–302.
- Reig M., Toldrá F., 2008. Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Meat Sci.*, 78, 60–67.
- Sapsford K.E., Ngundi M.M., Moore M.H., Lassman M.E., Shriver-Lake L.C., Taitt C.R., Ligler F.S., 2006. Rapid detection of foodborne contaminants using an Array Biosensor. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 113, 599–607.
- Shephard G.S., 2008. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Addit. Contam.*, 25(2), 146–151.

- Tritscher A.M., Page S.W., 2004. The risk assessment paradigm and its application for trichothecenes. *Toxicol. Lett.*, 153, 155–163.
- Zielonka Ł., Gajęcki M., Obremski K., Zwierzchowski W., 2003. Influence of low doses of deoxynivalenol applied *per os* on chosen indexes of immune response in swine. *Pol. J. Vet. Sci.*, 6, 74–77.

RISK OF TRANSMISSION CONTAMINANTS FROM FEEDSTUFFS TO FOOD

Abstract. A toxic substance like chlorinated pesticides, micotoxin, heavy metals and veterinary medicines are almost omnipresent in environment. Thus, they are also in the resources for animals. Correct management depends on acquaintance of course of process adsorption, risk biotransformation and expelling of this substance and in provender materials practical methods of drops of values of these substances. Toxic substances are metabolized before or after adsorption by mucous membrane intestines. According from physico-chemical some of them are metabolized into nontoxic products. Generality most of the veterinary medicine and provender additions belongs to this group. Other substances are put inside in animal tissues as e.g. dioxins. The point of research was purpose of work about consequence of different presence of kind of chemical compounds (residues) contaminating plant material.

Key words: residues, feed, food stuffs

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2008

Do cytowania – For citation: Zielonka Ł., Gajęcka M., Jakimiuk E., Gajęcki M., 2008. Ryzyko transmisji zanieczyszczeń z paszy do żywności. *Acta Sci. Pol. Med. Vet.* 7(2), 53–62.

SPIS TREŚCI CONTENTS

Jarosław Bystroń, Elżbieta Lis, Jacek Bania, Jerzy Molenda

- Występowanie genów oporności na metycylinę
w szczepach *Staphylococcus aureus* 3
Occurrence of methicillin-resistant genes
in *staphylococcus aureus* strains

Slavomír Marcinčák, Peter Popelka, Lýdia Šoltýsová

- Polyphenols and Antioxidative capacity
of extracts from selected Slovakian plants 9
Zawartość polifenoli i antyoksydacyjne właściwości ekstraktów
wybranych słowackich roślin

Jan Uradziński, Beata Wysok

- Zagrożenia bezpieczeństwa żywności
powodowane czynnikami zoonotycznymi 15
Health risks and consequences
of zoonotic agents in food

Peter Popelka, Slavomír Marcinčák, Jozef Nagy, Peter Žoldoš, Lýdia Šoltýsová

- Effect of glazing on oxidative changes
of fish stored at stable and unstable freezing conditions 23
Wpływ glazurowania na zmiany oksydacyjne
w tkankach ryb przechowywanych w stałych i zmiennych
temperaturach zamrożenia

Kinga Wieczorek, Jacek Osek

- Typowanie molekularne szczepów *Campylobacter*
przy użyciu technik opartych na reakcji łańcuchowej polimerazy 29
Molecular typing *Campylobacter* strains by methods based
on polymerase chain reaction

Cordula Schwarzmüller, Andreas Stolle

- Hygienic problems in a sausage producing plant
in special regard to technical equipment 41
Problemy higieniczne producentów kiełbas związane
z wyposażeniem technicznym

Andreas Stolle, Susanne Kaufmann

Realisation of the „Hygiene Package” HACCP and the new EU-Regulations - Focussing catering canteens and restaurants.....	47
Realizacja „Hygiene Package“ HACCP oraz nowe regulacje UE dotyczące nadzoru nad stołówkami i restauracjami	

Łukasz Zielonka, Magdalena Gajęcka, Ewa Jakimiuk, Maciej Gajęcki

Ryzyko transmisji zanieczyszczeń z paszy do żywności	53
Risk of transmission contaminants from feedstuffs to food	