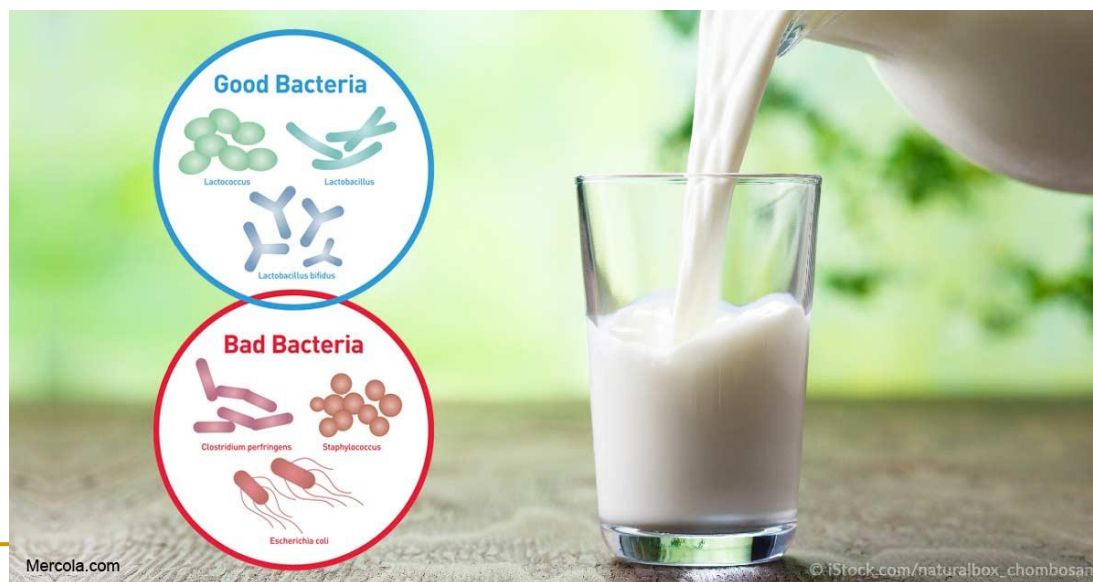


MIKROBIOLOŠKI KRITERIJUMI ZA PROIZVODE OD MLEKA



Mikrobiološki kriterijumi

- ❑ Dobro obučeni mikrobiolozi mogu da izoluju mikroorganizme iz sirovine i gotovih proizvoda.
- ❑ Da li to znači da je ta hrana štetna po zdravlje ljudi ili da će doći do njenog kvara?



Mikrobiološki kriterijumi u sistemu bezbednosti hrane

- ❑ Bezbednost hrane se pre svega postiže preventivnim prilazom (dobra proizvođačka praksa, dobra higijenska praksa i upravljanje bezbednošću hrane zasnovanom na principima HACCP).
 - ❑ Identifikacija hazarda i procena rizika u vezi sa hranom ili procesom proizvodnje i postavljanje sistema za upravljanje hazardima i rizicima.
-

Bezbednost hrane – Propisi EU

- ❑ **Uredba (EC) No 178/2002 -General food law /opšta načela i uslovi propisa o hrani, osnivanje EFSA i postupanju po pitanjima bezbednosti hrane**
 - ❑ **Uredba (EC) No 852/2004 -Hygiene of foodstuffs/ higijena hrane**
 - ❑ **Uredba (EC) No 853/2004 -Hygiene rules for food of animal origin/posebna pravila higijene hrane**
 - ❑ **Uredba (EC) No 854/2004 -Official controls/posebna pravila organizacije službenih kontrola hrane živ. porekla namenjene za ishranu ljudi**
 - ❑ **Uredba (EC) No 882/2004 -Official Feed & Food Controls/ službene kontrole koje se sprovode u cilju verifikacije sprovođenja zakona o hrani, kao i propisa o zdravlju i dobrobiti životinja**
 - ❑ **Uredba (EC) 2073/2005 (sa izmenama i dopunama: Uredba (EC) 1441/2007 ; Uredba (EC) 365/2010 - microbiological criteria for foodstuffs/mikrobiološki kriterijumi za hranu**
-

Bezbednost hrane - Propisi Republike Srbije

- ❑ **Zakon o bezbednosti hrane (Sl. glasnik RS broj 41/2009)**
 - ❑ **Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje prerade i prometa (Sl. glasnik RS broj 72/10)- sadrži samo mikrobiološke kriterijume za hranu**
 - ❑ **Pravilnik o veterinarsko-sanitarnim uslovima, odnosno opštim i posebnim uslovima za higijenu hrane životinjskog porekla, kao i o uslovima higijene hrane životinjskog porekla (Sl. glasnik RS, broj 25/11 i izmena 27/14)**
 - ❑ **Pravilnik o načinu i postupku sprovođenja službene kontrole hrane životinjskog porekla i načinu vršenja službene kontrole životinja pre i posle klanja (Sl. glasnik RS broj 99/2010)**
-

Mikrobiološki kriterijumi

- ❑ **Primena mikrobioloških kriterijuma treba da osigura:**
 - ❑ **Proizvodi su dobijeni pod dobrim higijenskim uslovima i sa mikrobiološkog stanovišta bezbedni za konzumiranje,**
 - ❑ **Razdvajanje prihvatljivih od neprihvatljivih proizvoda ili,**
 - ❑ **Odvajanje prihvatljive od neprihvatljive proizvodne prakse.**
 - ❑ **Mikrobiološki kriterijumi su namenjeni da se koriste za validaciju i verifikaciju procedura Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) i dobre higijenske prakse.**
-

Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje prerade i prometa (Sl. glasnik RS broj 72/10)

- ❑ Definicije pojedinih izraza upotrebljenih u pravilniku.

 - ❑ Opšti deo.

 - ❑ Prilog 1.
 - ❑ Kriterijumi bezbednosti hrane,
 - ❑ Kriterijumi higijene u procesu proizvodnje,
 - ❑ Pravila za uzimanje uzoraka i pripremu uzoraka za ispitivanje.
-

Mikrobiološki kriterijumi

Kriterijum bezbednosti hrane

- ❑ Kriterijum bezbednosti hrane jeste kriterijum kojim se definiše prihvatljivost nekog proizvoda ili proizvodne partije proizvoda. **Primenjuje se na proizvode u prometu.**

Kriterijum higijene u procesu proizvodnje

- ❑ Kriterijum higijene u procesu proizvodnje jeste kriterijum koji se primenjuje na proces proizvodnje i prerade hrane i ukazuje na pravilno funkcionisanje proizvodnog procesa, tako što predstavlja vrednost kontaminacije iznad koje se preduzimaju korektivne mere kako bi se održala higijena procesa. **Ne primenjuje se na proizvode stavljene na tržište.**
-

Uloga mikrobioloških kriterijuma – veza sa HACCP

- ❑ Ispitivanje nije potrebno ako su druge metode monitoringa efektivnije (npr. temperatura/vreme).
 - ❑ Ako je potrebno mikrobiološko ispitivanje subjekti u poslovanju hranom treba da u okviru njihovog HACCP plana utvrde nivo ispitivanja. Koliko često oni treba da vrše ispitivanja da bi osigurali da je njihov proizvodni proces efektivan i da je opasnost pod kontrolom?
-

Mikrobiološki kriterijumi

■ Mikrobiološki kriterijumi sadrže:

- Kategoriju hrane,
 - Spisak značajnih mikroorganizama, toksina i metabolita;
 - Plan uzorkovanja (broj jedinica uzorka (n) i broj ispitivanih jedinica uzorka (c) koje moraju da zadovolje postavljene granične vrednosti);
 - Granične vrednosti (m, M)
 - Referentne metode ispitivanja
 - Fazu u kojoj se kriterijum primenjuje.
 - Aktivnosti koje će biti preduzete ako kriterijum nije zadovoljen.
-

Kategorija hrane

- ❑ Hrana spremna za konzumiranje (koja podržava rast *L. monocytogenes*, koja ne podržava rast *L. monocytogenes*);
- ❑ Meso i proizvodi od mesa;
- ❑ Mleko i proizvodi od mleka;
- ❑ Proizvodi od jaja;
- ❑ Proizvodi ribarstva (riba, druge vodene životinje i njihovi proizvodi);
- ❑ Povrće, voće i proizvodi od voća i povrća.

Kriterijumi bezbednosti hrane-

Mikroorganizmi, toksini, metaboliti i referentne metode ispitivanja

- ❑ ***Salmonella* vrste: ISO 6579**
 - ❑ ***Listeria monocytogenes*: ISO 11290, 1 i 2**
 - ❑ **Stafilokokni enterotoksini: Evropska skrining metoda CRL**
 - ❑ ***Escherichia coli*: ISO 16649; 1, 2 i 3**
 - ❑ **Histamin: HPLC**
 - ❑ ***Cronobacter* spp.: ISO 22964**
 - ❑ ***Bacillus cereus*: EN ISO 7932**
-

Kriterijumi higijene u procesu proizvodnje- Mikroorganizmi i referentne metode ispitivanja

- ❑ *Salmonella* vrste: ISO 6579
 - ❑ Broj aerobnih kolonija, ISO 4833
 - ❑ *Enterobacteriaceae*: ISO 21528, 1 i 2
 - ❑ *Escherichia coli*: 16649; 1, 2 i 3
 - ❑ Koagulaza pozitivne stafilokoke: ISO 6888, 1 i 2
-

Tumačenje rezultata

- ❑ jedna granična vrednost /plan “dve klase”- $m=M$
 - ❑ **Zadovoljavajući ili nezadovoljavajući**
 - ❑ Ovakva granična vrednost i interpretacija rezultata-
kriterijumi bezbednosti hrane
-

Kriterijumi bezbednosti hrane

Primer: Poglavlje 1 tačka 1.11.

Kategorija hrane	Mikroorganizmi/ njihovi toksini, metaboliti	Plan uzorkovanja		Granične vrednosti		Referentna metoda ispitivanja	Faza u kojoj se kriterijum primenjuje
		n	c	m	M		
Mleko u prahu i surutka u prahu	<i>Salmonella</i>	5	0	Ne sme biti u 25g		EN/ISO 6579	Proizvod u prometu tokom njegovog roka upotrebe

Zadovoljavajući: Ako u svih 5 (n) jedinica uzorka nisu dokazane *Salmonella* vrste u 25g.

Nezadovoljavajući: Ako su dokazane *Salmonella* vrste u 25g u jednoj ili više jedinica uzorka

Tumačenje rezultata

- Dve granične vrednosti (m i M)/Plan “tri klase”/rezultati se intepretiraju kao zadovoljavajući, prihvatljivi i nezadovoljavajući
 - n -broj jedinica uzorka koje predstavljaju uzorak.
 - m -granična vrednost za broj bakterija.
 - rezultat se smatra **zadovoljavajućim** ako je broj bakterija u svim jedinicama uzorka $\leq m$
 - c -broj jedinica uzorka u kojima broj bakterija može da bude veći od granične vrednosti (m), a manji od **maksimalne vrednosti (M)**.
 - rezultat se smatra **prihvatljivim** ako je broj bakterija u maksimalno (c) jedinica između m i M , a u ostalim jedinicama uzorka $\leq m$
 - M -je maksimalna vrednost broja bakterija.
 - rezultat se smatra **nezadovoljavajućim** ako je broj bakterija u jednoj ili više jedinica uzorka isti ili veći od M vrednosti, ili ako je više c/n uzoraka vrednosti između m i M

Kriterijum higijene u procesu proizvodnje – Mleko i proizvodi od mleka (tačka 2.2.3)

Kategorija hrane	Mikroorganizmi/ njihovi toksini, metaboliti	Plan uzorkovanja		Granične vrednosti		Referent. metoda isitivanja	Faza u kojoj se kriterijum primenjuje	Mera u slučaju nezadovoljavajućih rezultata
		n	c	m	M			
Sirevi proizvedeni od sirovog mleka	Koagulaza pozitivne stafilokoke	5	2	10 ⁴ cfu/g	10 ⁵ cfu/g	ISO 6888-1 ili ISO 6888-2	Za vreme proizvodnog procesa, u vreme kada se očekuje da će broj stafilokoka biti najveći	Poboljšanje higijene proizvodnje i izbora sirovina. Ako se utvrde vrednosti >10 ⁵ cfu/g, ta proizvodna partija sira mora se ispitati na prisustvo stafilokoknih enterotoksina

Kriterijum higijene u procesu proizvodnje – Mleko i proizvodi od mleka (tačka 2.2.4)

Kategorija hrane	Mikroorganizmi/ njihovi toksini, metaboliti	Plan uzorkovanja		Granične vrednosti		Referent metoda isitivanja	Faza u kojoj se kriterijum primenjuje	Mera u slučaju nezadovoljavajućih rezultata
		n	c	m	M			
Sirevi proizvedeni od mleka koje je obrađeno toplotom na temperaturi nižoj od temperature pasterizacije, sirevi sa zrenjem proizvedeni od pasterizovanog mleka ili surutke, ili od mleka ili surutke obrađenih jačim režimom toplotne obrade	Koagulaza pozitivne stafilocoke	5	2	100 cfu/g	1000 cfu/g	ISO 6882-1 ili ISO 6882-2	Za vreme proizvodnog procesa, u vreme kada se očekuje da će broj stafilocoka biti najveći	Poboljšanje higijene proizvodnje i izbora sirovina. Ako se utvrde vrednosti $>10^5$ cfu/g, ta proizvodna partija sira mora se ispitati na prisustvo stafilokoknih enterotoksina

Primer: Kriterijum za hranu u kojoj se određuje broj koagulaza pozitivnih stafilokoka (tačka 2.2.5.)

Kategorija hrane	Mikroorganizmi/ njihovi toksini, metaboliti	Plan uzorkovanja		Granične vrednosti		Referent. metoda isitivanja	Faza u kojoj se kriterijum primenjuje	Mera u slučaju nezadovoljavajućih rezultata
		n	c	m	M			
Meki sirevi bez zrenja (sveži sirevi) proizvedeni od mleka ili surutke koji su pasterizovani ili obrađeni jačim režimom toplote	Koagulaza pozitivne stafilokoke	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g	ISO 6888-1 ili ISO 6888-2	Kraj proizvodnog procesa	Poboljšanje higijene proizvodnje. Ako se utvrde vrednosti >10⁵ cfu/g , ta proizvodna partija sira mora se ispitati na prisustvo stafilokoknih enterotoksina

Kriterijumi bezbednosti hrane- enterotoksini koagulaza pozitivnih stafilokoka

- ❑ **Proizvodna partija sira mora se ispitati na prisustvo stafilokoknih enterotoksina ako se utvrdi broj koagulaza pozitivnih stafilokoka $>10^5$ cfu/g, određen tokom proizvodnje kada se očekuje da je njihov broj najveći.**
 - ❑ **Proizvodna partija mleka u prahu ili surutke u prahu mora se ispitati na prisustvo stafilokoknih enterotoksina ako se na kraju procesa proizvodnje utvrdi broj koagulaza pozitivnih stafilokoka $>10^5$ cfu/g.**
-

U kategoriju hrane koja ne podržava rast *L. monocytogenes* svrstavaju se:

- ❑ proizvodi sa $\text{pH} \leq 4,4$ ili $a_w \leq 0,92$,
- ❑ proizvodi sa rokom upotrebe kraćim od pet dana,
- ❑ zamrznuti proizvodi
- ❑ Druge kategorije proizvoda mogu takođe da se svrstaju u tu kategoriju, predmet za naučnu opravdanost (prisustvo protektivne mikroflore ili subkultura).

Hrana spremna za konzumiranje (proizvodi od mleka)

Kriterijum broj	Mikroorganizam i kategorija hrane	Primeri (lista nije zatvorena)
1.1	<i>L. monocytogenes</i> u hrani spremnoj za konzumiranje koja podržava njen rast	Meki sir (sirevi sa sekundarnim zrenjem: bri, gorgonzola, kamambert i dr).
1.2	<i>L. monocytogenes</i> u hrani spremnoj za konzumiranje koja ne podržava njen rast	Sladoled; Fermentisani proizvodi od mleka; Tvrđi sir; Proizvodi sa rokom upotrebe kraćim od 5 dana: npr. pasterizovano mleko.

Redovno ispitivanje u odnosu na LM ne primenjuje se:

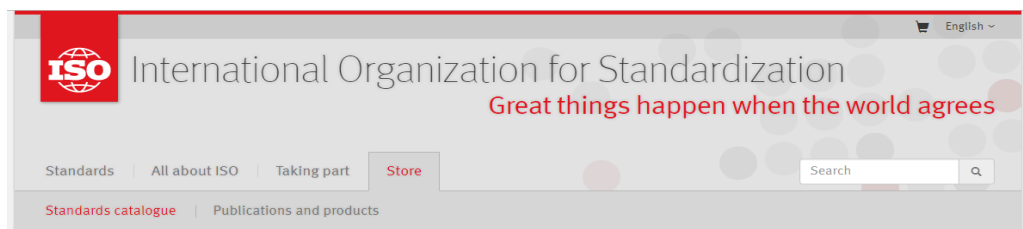
- ❑ Na one proizvode od mleka koji su obrađeni toplotom ili su obrađeni na neki drugi način koji efikasno eliminiše *L. monocytogenes* i, kada nakon takve obrade više nije moguća ponovna kontaminacija (npr. proizvodi obrađeni toplotom u ambalaži).
-

Kriterijumi bezbednosti hrane

Kategorija hrane		Mikroorganizmi/ njihovi toksini, metaboliti	Plan uzorkovanja		Granične vrednosti		Referentna metoda ispitivanja	Faza u kojoj se kriterijum primenjuje
			n	c	m	M		
1.1	Hrana spremna za konzumiranje koja podržava rast <i>L.monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g		EN ISO 11290-2	Proizvod u prometu tokom njegovog roka upotrebe.
			5	0	Ne sme biti u 25 g		EN ISO 11290-1	Pre nego što hrana prestane da bude pod neposrednom kontrolom subjekta koji je proizveo
1.2	Hrana spremna za konzumiranje koja ne podržava rast <i>L.monocytogenes</i> (4)(8)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/ g		EN ISO 11290-2	Proizvod u prometu tokom njegovog roka upotrebe.

Metode ispitivanja

- ❑ Za ispitivanje se moraju koristiti referentne metode propisane u okviru mikrobioloških kriterijuma.
- ❑ Prihvatljiva je primena alternativnih metoda ispitivanja:
 - ❑ ukoliko se validacija datog metoda vrši u odnosu na referentni metod naveden u Pravilniku (Sl. glasnik RS broj 72/10) ili
 - ❑ ukoliko subjekt u poslovanju hranom primenjuje metod koji je sertifikovan od treće strane u skladu sa protokolom utvrđenim EN/ISO standardom 16140 ili nekim drugim međunarodno priznatim protokolom, a njihovo korišćenje odobreno od strane Ministarstva nadležnog za poslove poljoprivrede.



Uzorci sa proizvodnih površina i opreme

- ❑ **Subjekt u poslovanju hranom mora obavezno da uzima uzorke s proizvodnih površina i opreme (briseve) u objektima u kojima se proizvodi gotova hrana koja pogoduje rastu i razvoju bakterija *L. monocytogenes*, u cilju provere prisustva te bakterije.**

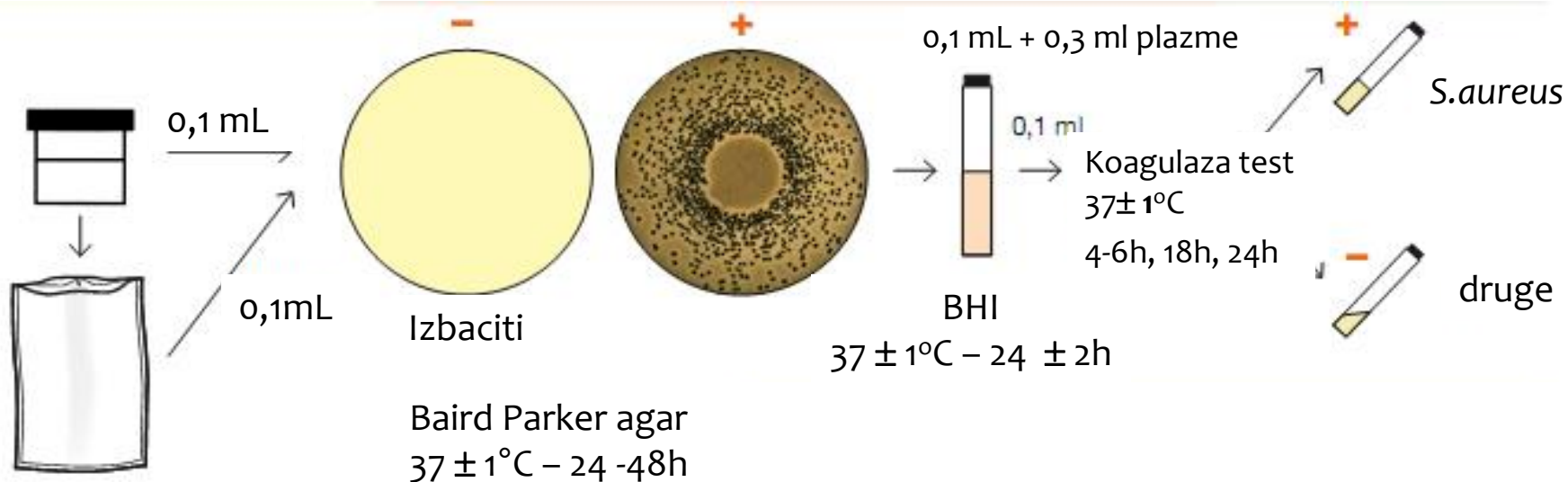
Obaveze subjekta u poslovanju hranom u slučaju nezadovoljavajućih rezultata

- Subjekti u poslovanju hranom moraju da preduzmu određene korektivne mere ako hrana ne zadovoljava relevantne kriterijume.
 - **Kriterijumi za bezbednost hrane**- proizvod se ne sme staviti na tržište ili se ako je već na tržištu mora povući ili opozvati sa tržišta.
 - **Kriterijumi za higijenu procesa**- preporučiti korektivne aktivnosti za poboljšanje proizvodnje.
-

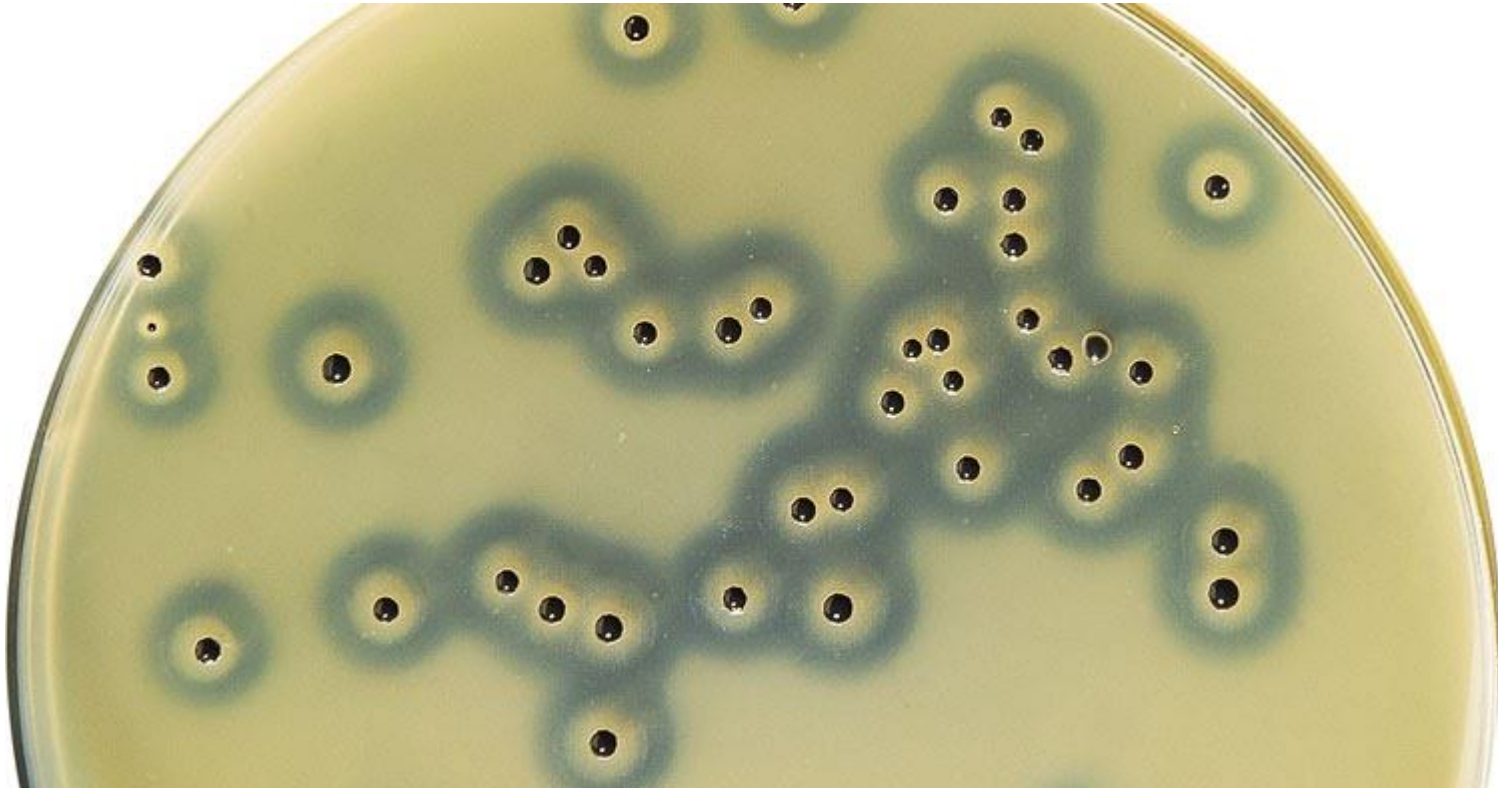
Metode za određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka u hrani

- Mikrobiologija hrane i hrane za životinje — Horizontalna metoda za određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste) — Deo 1: Tehnika agara po Berd-Parkeru (Baird-Parker) (EN ISO 6888-1:1999 + A1:2003, IDT; ISO 6888-1:1999 + Amd 1:2003).
- Mikrobiologija hrane i hrane za životinje — Horizontalna metoda za određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste) — Deo 2: Tehnika agara sa plazmom kunića i fibrinogenom (EN ISO 6888-2:1999 + A1:2003, IDT; ISO 6888-2:1999 + Amd 1:2003).

Izolovanje *Staphylococcus aureus* SRPS EN ISO 6888-1:2008



Izgled kolonija koagulaza pozitivnih stafilokoka na Baird Parker podlozi

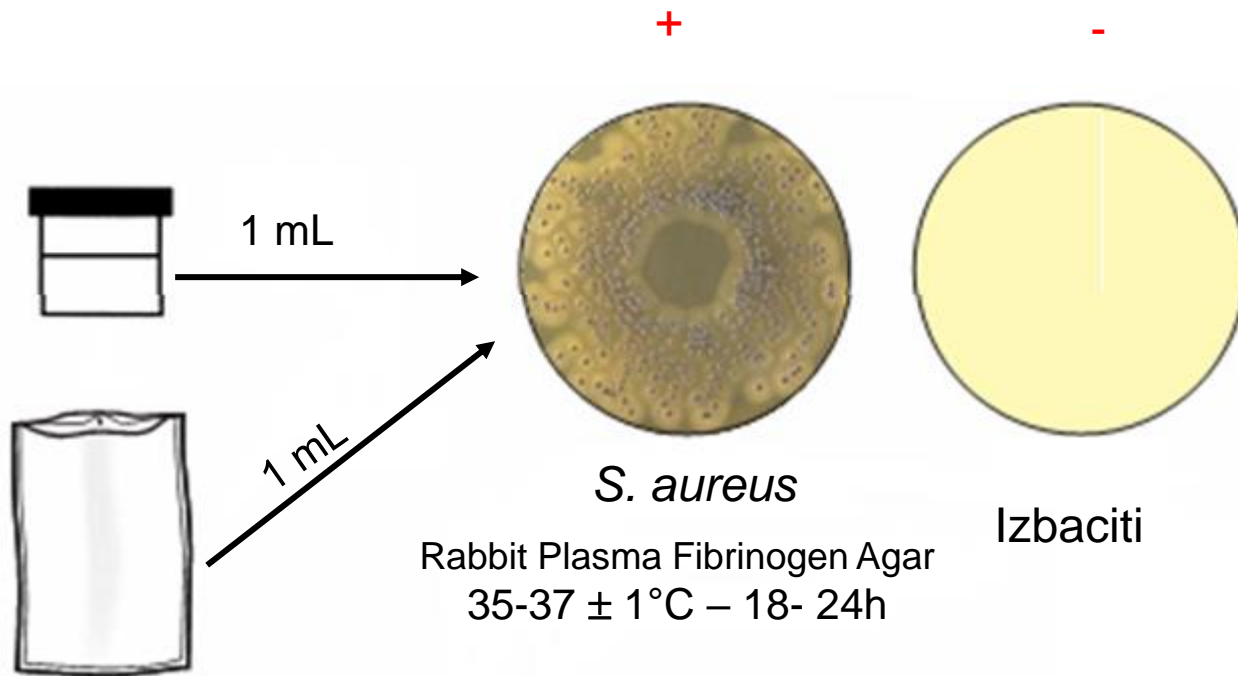


Identifikacija izolata *Staph. aureus*

■ Koagulaza test

- Preneti 5 sumnjivih kolonija u BHI- bujon
- 24 (± 2)h/ 37°C
- 0,1 ml bujonske kulture +0,3 ml plazme u sterilne epruvete
- Inkubacija pri 37°C
- Rezultati se očitavaju posle 4-6h, 18 i 24 časa.
- Zasejava se pozitivna kontrola sa referentnim sojem (sigurno koagulaza pozitivnim). Negativna kontrola je nezasejana plazma.
- Koagulacija plazme – pozitivna kontrola
- Izostanak koagulacije – negativna kontrola
- Ispitivani soj (+ ili -)

Izolovanje *Staphylococcus aureus* SRPS EN ISO 6888-2:2008



Izolovanje *Staph. aureus* iz hrane na RPF (rabbit plasma fibrinogen) podlozi

- 1 ml iz decimalnog razblaženja se prelije sa 10 ml RPF podloge.
 - Karakteristike RPF podloge
 - Ista osnova podloge kao i za BP
 - Ne sadrži žumance jajeta.
 - Rastvor kalijum telurita.
 - Bovini fibrinogen precipitacija
 - Plazma → stimuliše precipitaciju
 - Inhibitor tripsina: prevenira razlaganje precipitata dejstvom tripsina (stvara ga *S. aureus*)
 - Inkubacija 48(±4)h/ 37°C; kolonije se broje posle 24 i 48 h
 - Pozitivna reakcija: sjajne, sive, crne kolonije okružene precipitatom.

Izračunavanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka

$$a = \frac{b_c}{A_c} \times C_c + \frac{b_{nc}}{A_{nc}} \times C_{nc}$$

gde su:

- A_c** broj tipičnih kolonija koje se podvrgavaju koagulaza ispitivanju;
- A_{nc}** broj atipičnih kolonija koje se podvrgavaju koagulaza ispitivanju;
- b_c** broj tipičnih kolonija za koje je dokazano da su koagulaza pozitivne;
- b_{nc}** broj atipičnih kolonija za koje je dokazano da su koagulaza pozitivne;
- C_c** ukupan broj tipičnih kolonija viđenih na ploči;
- C_{nc}** ukupan broj atipičnih kolonija viđenih na ploči.

Izračunavanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka

$$N = \frac{\sum a}{V (n_1 + 0,1 n_2) d}$$

- $\sum a$ zbir kolonija koagulaza pozitivnih stafilokoka identifikovanih na svim odabranim pločama;
- V zapremina inokuluma na svakoj ploči, u mililitrima;
- n_1 broj ploča odabranih pri prvom razblaženju;
- n_2 broj ploča odabranih pri drugom razblaženju;
- d stepen razblaženja koji odgovara prvom odabranom razblaženju.

Ispitivanje higijenske ispravnosti površina, opreme i ambalaže za mleko

Ispiranje površina – ispitivanje higijenske ispravnost kanti i boca za mleko

Kante za mleko:

- Nakon pranja i dezinfekcije
 - 100 ml sterilne destilovane i puferisane vode ili sterilnog fiziološkog rastvora
 - Kanta se zatvori i obrće da bi se sprali svi mikroorganizmi sa unutrašnjih zidova
 - Aseptično se prenese u sterilnu bocu
 - U laboratoriji u roku od 24h određuje se ukupan broj bakterija
-

Ispiranje površina – ispitivanje higijenske ispravnost kanti i boca za mleko

Boce za mleko:

1. Ispiranje boca

20 ml sterilisane destilovane i puferisane vode ili sterilnog fiziološkog rastvora

boca se zatvori i snažno protrese

po 5ml u dve Petri ploče ako se očekuje mali broj mo

po 1ml u dve Petri ploče ako se očekuje veći broj mo

određuje se ukupan broj bakterija (30°C, 72h)

zbir kolonija sa dve Petri ploče

x 2 ako je zasejano 5ml

x20 ako je zasejano 1 ml

Ispiranje površina – ispitivanje higijenske ispravnosti kanti i boca za mleko

Boce za mleko:

2. Direktno brojanje kolonija u bocama

u bocu se sipa oko 15 ml podloge za određivanje ukupnog broja bakterija, otopljene i ohlađene na 45 °C

podloga se ravnomerno rasporedi po zidovima boce

inkubacija u horizontalnom položaju na 30°

nakon inkubacije broje se kolonije izrasle na 1cm²

broji se u 30 kvadrata i određuje srednja vrednost

Uzimanje briseva

Sterilni bris

Uroni se u epruvetu sa sterilnom destilovanom vodom ili fiziološkim rastvorom

Uzme se bris sa površine ograničene šablonom

Bris se prenese u epruvetu sa 10 ml fiziološkog rastora (ili 10 ml peptonske vode ako se ispituju koliformne bakterije)

Bris se zaseje na podlogu za određivanje ukupnog broja bakterija (inkubacija na 30°, 72 h)

$$\text{Broj bakterija po } 1 \text{ cm}^2 = 10N / 25$$

N – broj bakterija po 1ml suspenzije brisa

- ✓ Uzimanje otisaka
- ✓ Petri film metoda
- ✓ Brze metode

Dokazivanje organskih materija na površinama (ostaci proteina ili ugljenih hidrata)

ATP bioluminiscencija

