

skog gnijiljenja podliježe sanitarnoj obradi, odnosno obrezivanju u dubini od 1,5-2 cm, te pranju čistom vodom i provjetravanju. Nakon takve obrade meso, u najboljem slučaju, može biti upotrebljivo samo za preradu. Meso koje je zahvaćeno procesima dubokog gnijiljenja nije upotrebljivo za prehranu ljudi pa ga treba zaplijeniti i neškodljivo ukloniti.

Osim mikroorganizama, kvarenje namirnica mogu uzrokovati i fizikalno-kemijski činitelji koji u povoljnim uvjetima (voda, kisik iz zraka, kemijski katalizatori, UV-svjetlost i sunčano svjetlo ili drugi uvjeti) aktiviraju vlastite tkivne enzime u namirnicama. Ti procesi najjače pogađaju mast i masno tkivo, a očituju se u hidrolizi i oksidaciji. Posljedica hidrolitičke razgradnje masti jest porast stupnja kiselosti, a posljedica su oksidacije porast peroksidnog broja, pojava aldehida, ketona i nižih masnih kiselina. Oba spomenuta procesa negativno utječu na senzorna svojstva masti i drugih namirnica koje sadrže mast, odnosno masno tkivo. Senzorne promjene se očituju pojavom žućkaste boje, osobito na površinskim dijelovima, te pojavom oštrog i palećeg okusa i mirisa. U sumnjivim slučajevima senzorni nalaz treba nadopuniti pretragom na fizikalno-kemijske konstante masti (peroksidni broj, stupanj kiselosti, tba-vrijednost i dr.). Ranketljivu mast i druge namirnice koje sadrže takvu mast i masno tkivo treba proglasiti neispravnim za ljudsku hranu. Posebno treba paziti

na nalaz ranketljivosti nadjeva trajnih kobasica koje se podvrgavaju dužem procesu sušenja i zrenja. U takvim se mesnim proizvodima može tolerirati umjeren paleći okus masnog tkiva u nadjevu.

Stupanj senzornih promjena najvažniji je kriterij u prosuđivanju ispravnosti za ljudsku hranu namirnica invadiranih insektima, grinjama i kornjašima, odnosno onih koje su oštetili i zagadili glodavci. U takvim slučajevima vrijedi pravilo da senzorno promijenjene dijelove treba ukloniti. Ako zbog masovnih invazija, oštećenja i zagađenja što su ih nanijeli štetnici to nije izvedivo, namirnice treba proglasiti neispravnima za ljudsku hranu. U svim slučajevima treba isključiti zagađenost namirnica mikroorganizmima uzročnicima zaraznih bolesti i trovanja hranom.

SUMMARY

EVALUATION OF DETERIORATED MEAT

In the paper are shown changes in meat deterioration which are important for the veterinarians, experts and technologist, to evaluate of meat for human consumption.

Key words: meat, deterioration

*Upotrijebljena literatura nalazi se kod prvog autora

Prispjelo / Received: 29.11.2005.

Prihvaćeno / Accepted: 10.12.2005. ■

ELISA U ANALITICI HRANE

Runje¹, M., Ž. Cvrtila²

SAŽETAK

U radu su prikazane neke od mogućnosti korištenja "screening" testa ELISA u analitici namirnica. Utvrđivanje vrsta mesa u toplinski obrađenim ili, pak, toplinski neobrađenim proizvodima jedna je od primjena ELISA testova.

Ključne riječi: analitički postupci, ELISA

UVOD

U analitici namirnica koriste se brojni analitički postupci. Dobiveni podaci mogu se koristiti u različite svrhe, od temeljnih znanstvenih istraživanja, pa do potreba monitoringa, o čemu također ovisi odabir metode analize. Svakako treba imati na umu da su

¹ Mislav Runje, dipl.inž.

² Mr.sc. Željka Cvrtila, asistentica, Veterinarski fakultet, Zavod za higijenu i tehnologiju animalnih namirnica, Heinzelova 55, Zagreb

osnovni zahtjevi za bilo koju metodu selektivnost, točnost, preciznost i ponovljivost.

METODE U ANALITICI HRANE

Izbor analitičkog postupka ovisi o mnogo različitih čimbenika. Kao najvažnije navest ćemo vrstu uzorka (fizikalna i kemijska svojstva) te prirodu informacije koja se traži kao rezultat analize.

U analitici namirnica razlikujemo "screening" metode i potvrdne službeno verificirane i propisane metode. "Screening" metode su takozvane grube metode koje ne omogućuju definitivan rezultat nego samo osiguravaju indikaciju da je analit ili više njih prisutan u uzorku iznad određene razine. Od dobrog "screening" testa očekuje se da neće davati lažno negativne rezultate. Danas se "screening" testovi često koriste u određivanju prisutnosti pojedinih mikroorganizama ili pak nekih pripravaka veterine. Najčešće su to ELISA (engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay) postupci različite izvedbe i imena.

Razvoj suvremene imunologije nezamisliv je bez seroloških postupaka s označenim antigenom ili protutijelima. Prednost je tih postupaka pred klasičnim serološkim metodama što dokazuju izravnu vezu antigen-protutijelo, neovisno o sposobnosti protutijela da antigen aglutinira, precipitira, neutralizira ili izazove neki drugi učinak. Nadalje, spomenuti su postupci vrlo osjetljivi, daju brze i pouzdane rezultate, a zahtijevaju utrošak malih količina antigena i protutijela. Svaka serološka reakcija može biti kvalitativna i kvantitativna. Pri izvođenju takvih reakcija treba imati na umu da se u uzorku nalaze tvari koje daju "lažno negativnu" ili "lažno pozitivnu" reakciju. Iz tog je razloga u istraživanje uvijek potrebno uključiti kontrolne uzorke koji daju sigurno pozitivnu (pozitivna kontrola) i sigurno negativnu (negativna kontrola) reakciju.

Uvođenju ELISA u istraživanja prethodilo je otkriće da se topljivi antigen ili protutijela mogu vezati za čvrstu podlogu tako da se ne isperu puferiranom fiziološkom otopinom. U tu se svrhu rabe polistirenske mikrotitracijske plitice četvrtastog oblika koje obično imaju 96 (12 x 8) jažica. U testu su antigen ili protutijela označeni nekim enzimom, najčešće peroksidazom. Reakcija se očitava prema promjeni boje supstrata što ga enzim razgrađuje te je moguće očitavanje golim okom ili mjerenjem apsorbancije

spektrofotometrom čime se postižu točniji rezultati. Kao i ostale slične reakcije, ELISA se može provoditi na nekoliko načina. U neizravnom postupku prilagođenom dokazivanju protutijela u serumu najprije se u jažice nakapa otopina poznatog antigena da bi on apsorbirao na stijenke jažica. Nakon inkubacije neapsorbirani antigen se ispere. Potom se u jažice nakapa ispitivani uzorak i ako ih ima u uzorku, protutijela se za vrijeme inkubacije vežu na antigen i ne isperu iz jažica puferiranom fiziološkom otopinom. U trećoj fazi reakcije u jažice se nakapaju enzimom označeni antiglobulini specifični za vrstu od koje potječe ispitivani uzorak. Ako su se neoznačena protutijela vezala za antigen, u toj fazi reakcije nastaje kompleks antigen-protutijela-označeni antiglobulini koji ostaje u jažici i nakon ispiranja puferiranom otopinom. Na koncu, u jažice se doda enzimski supstrat i očita reakcija prema boji supstrata.

MOGUĆNOST PRIMJENE ELISA POSTUPAKA

Utvrđivanje vrsta mesa u toplinski obrađenim ili, pak, toplinski neobrađenim proizvodima jedna je od primjena ELISA testova. Važno je naglasiti da testovi sačinjeni za identifikaciju vrsta mesa u toplinski netretiranim uzorcima nisu pogodni za toplinski obrađene uzorke. Struktura antigena svojstvenih za određenu vrstu, koju prepoznaje antitijelo kao vezno mjesto, podliježe takvim promjenama strukture tijekom toplinske obrade da se specifična reakcija antigen-protutijelo ne može odvijati. Međutim, ako se za pripremu antitijela koristi toplinski tretirano, a ne svježe meso, dobivena antitijela reagiraju s toplinski obrađenim uzorcima. Na toj činjenici temelje se ispitivanja za utvrđivanje vrste mesa u toplinski tretiranim uzorcima. Prema dosadašnjim literaturnim podacima učinkovitost testa vrlo je velika, a u linearnom području interpolacijom preko standardne krivulje moguće je i kvantitativno određivanje. Iznenađujuće je malo znanja o utjecaju visokih temperatura na svojstva i analitiku proteina mesa, ali poznata je činjenica da prilikom toplinske obrade prirodna struktura bjelancevina mesa biva razorena pa nije moguće provesti specifičnu reakciju antigen-protutijelo. Ako se, pak, toplinski obrađeni uzorak mesa koristi u postupku pripreme antiseruma potrebnog za imunološku reakciju, proizvedeni će antiserum reagirati s toplinski obrađenim uzorkom. Na ovom mjestu svakako valja napomenuti da su podaci o gornjem limitu toplinske

obrade za ispitivane uzorke još uvijek nedostatni, odnosno nije poznata najviša moguća temperatura toplinske obrade nakon koje bi rezultati testa bili vjerodostojni. Pa ipak, svaki pouzdani test, a posebice ako je jednostavan, brz i jeftin, dobrodošao je u postupcima utvrđivanja vrsta mesa u današnje vrijeme kada je zbog mnoštva razloga, deklariranje vrsta mesa u pojedinim namirnicama obavezno. Tako je u Velikoj Britaniji zakonodavstvo preporučilo mesnoj industriji uvođenje testa kojim se potvrđuje autentičnost deklaracije pojedinog proizvoda. Korisnost ELISA-testa istraživali su Hsieh i sur. (1995). Utvrđena je pouzdanost rezultata samo u uzorcima u kojima je količina tražene vrste mesa bila veća od 1%. Nedeklarirane vrste mesa pronađene su u najvećoj mjeri u proizvodima u kojima je govedina deklarirana kao osnovna sirovina. Čak u 16,6% uzoraka nađene su zamjenske vrste mesa, s tim da su rezultati znatno viši u uzorcima koji su toplinski obrađivani nego u sirovim proizvodima. ELISA postupak prihvatljiv je i kod određivanja sadržaja mesa piletine, konja i kлокana, također, s granicom detekcije od 1% (Bernini i Barbieri, 1999; Brehmer i sur., 1999). Prilikom utvrđivanja pojedine vrste mesa u toplinski obrađenim proizvodima od mesa, elektroforetski ili pomoću ELISA-metode, tipične promjene proteina mesa nastale zbog utjecaja visoke temperature prisutne u većini tehnologija prerade mesa u svakom se slučaju odražavaju u rezultatima analiza. Uzorci goveđeg mesa, mesa svinja, piletine i ovčetine zagrijavani na 120°C u vremenu od 20 minuta dali su pozitivne rezultate, no nakon zagrijavanja na 133°C samo je test s ovčetinom bio pozitivan, dok su ostali uzorci polučili negativne ili slabo pozitivne rezultate. S druge, pak, strane neka komercijalno proizvedena jela od mesa u pokusu s ELISA-metodom za identifikaciju svinjskog mesa dala su jaku pozitivnu reakciju najvjerojatnije kao posljedicu nedovoljnog zagrijavanja u procesu termičke obrade.

Brojni su literaturni podaci (Smajlović i sur., 2000; Brlek-Gorski i Cipriš, 2001) o provjeri efikasnosti i pouzdanosti ELISA testa u svrhu dokaza različitih količina različitih vrsta mesa u toplinski obrađenim proizvodima. Dokazano je da je donja granice detekcije za toplinski obrađene mesne proizvode za pileće i svinjsko meso 0,9%, za goveđe 1,0% i za ovčje meso 2,0%. Valja imati na umu i činjenicu da manje količine nemaju tehnološko niti ekonomsko značenje

pa se pretpostavlja da se takva krivotvorenja neće niti događati. Naglašava se da se prema trenutnim znanstvenim dostignućima minimalne količine mesa (ispod 0,1%) mogu dokazati polimeraza lančanom reakcijom (PCR; engl. Polymerase Chain Reaction). Zaključno, moguće je reći da je donja granica pouzdanosti kvalitativnog utvrđivanja ELISA metode jedan posto, a gornja 100% svinjskog mesa, pri čemu svakako treba imati na umu da je kvantitativnu analizu moguće obaviti samo za uzorke koji sadrže između jedan i pet posto svinjskog mesa.

Korisnost ELISA-metode potvrđena je od mnogih autora (Brehmer i sur.; 1999) ne samo u dokazivanju vrste mesa nego i različitih biljnih proteina koji se često koriste kao dodatni sastojci u proizvodnji mesnih proizvoda. Korištenjem primjerenih protutijela i standarda, ELISA-metodom moguće je kvantitativno utvrditi sojine proteine, proteine graška i gluten u toplinski obrađenim proizvodima. ELISA-metoda je u nekoliko navrata provjeravana u cilju kvalitativnog i kvantitativnog određivanja denaturiranih sojinih proteina.

Prema podacima u literaturi (Chen i sur., 1998; Sapunar-Postružnik i sur., 2000) metoda za dokazivanje vrste mesa u toplinski obrađenim proizvodima ima praktičnu prednost pred metodom za uzorke od sirovih mesnih proizvoda utoliko što omogućuje ispitivanje i sirovog mesa koje je moguće prije samog pokusa termički obraditi u autoklavu kao što smo učinili i mi prilikom izrade standardne krivulje i prilikom izrade "model" uzoraka.

UMJESTO ZAKLJUČKA

Da identifikacija za vrstu specifičnih proteina ima svoju važnost s pojavom goveđe spongiformne encefalopatije nije potrebno posebno naglašavati. ELISA-testovi za identifikaciju vrste mesa u proizvodima u tom je smislu metoda visoke osjetljivosti i specifičnosti te vrlo jednostavna za interpretaciju. Indikacija za izvođenje testa bila bi provjera ispravnost deklaracije proizvoda, kako bi se u slučaju pozitivnog nalaza na goveđe proteine mogao zaustaviti uvoz namirnica podrijetlom iz zemalja u kojima je dijagnosticirana GSE.

SUMMARY ELISA METHOD IN FOOD ANALYSIS

In this paper possible application of the "screening"

ELISA method are shown. Determining type of meat in heat processed or non-processed meat products is one common ELISA method screening test.

Key words: *analytical methods, ELISA*

LITERATURA

Bernini, R., G. Barbieri (1999): Identification of meat species in cooked meat food: Comparison among electroforetic and immuno-assay techniques. *Industrie Alimentari* 38(382):675-682, 1999. Jun.

Brehmer, H., S. Schleicher, U. Borowski (1999): Determination of soya protein, pea proteins and gluten in franfurter-type sausages by means of an Enzyme-Linked-immunosorbent-Assay (ELISA).

Fleischwirtschaft. 79 (8): 74-78.

Brek-Gorski Diana i J. Cipriš (2001): Određivanje species specifičnih proteina. XXVIII Stručni skup "Izazovi u ekologiji". Plitvice 7.-9. studenog 2001. godine.

Chen, F.C., Y.H.P. Hsieh, R.C. Bridgman (1998): Monoclonal

Antibodies to Porcine Thermal-Stable Muscle Protein for Detection of Pork in Raw and Cooked Meats. *Journal of Food Science*, 63 (2): 201-205.

Hsieh, Y.H.P., B.B. Woodward, S.H. Ho (1995): Detection of species substitution in raw and cooked meats using immunoassays. *Journal of Food Protection*, 58 (5): 555-559.

Sapunar-Postružnik, J., D. Bažulić, D. Majnarić, T. Petrak, V. Logomerac (2000): Dokazivanje svinjskog mesa metodom ELISA u toplinski obrađenim uzorcima. Drugi hrvatski veterinarski kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Cavtat, 10-13. listopada, 2000. Zbornik radova, 141-146.

Smajlović, M., F. Čaklavica, D. Alagić, A. Smajlović, B. Alić (2000): Pouzdanost ELISA metoda za identifikaciju vrsta mesa u termički tretiranim proizvodima od mesa. Drugi hrvatski veterinarski kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Cavtat, 10-13. listopada, 2000. Zbornik radova, 207-211.

Prispjelo / Received: 22.11.2005.

Prihvaćeno / Accepted: 06.12.2005. ■

VAŽNOST ČIŠĆENJA I DEZINFEKCIJE U PERADARSTVU

Matković¹ K., S. Matković²

SAŽETAK

U radu se opisuje nužnost provođenja mjera čišćenja i dezinfekcije u peradarstvu s ciljem sprječavanja izbijanja bolesti i posljedično nastanka velikih šteta te širenja uzročnika u okoliš. Također opisuju se metode čišćenja kao i najčešće vrste dezinficijensa u peradarstvu, način njihova djelovanja, fizikalne karakteristike i područja primjene.

Ključne riječi: *čišćenje, dezinfekcija, higijena, preventiva, peradarstvo*

UVOD

Priroda posla u intenzivnom peradarstvu (brzina turnusa, manipulacije s peradi, jajima, hranom) te kontakti ljudi (servisiranje opreme, posjetioci, radni-

ci) čine ovu proizvodnju vrlo ranjivu na širenje bolesti peradi sa farme na farmu, sa područja na područje. Svaki segment peradarske industrije (komercijalna proizvodnja jaja i brojlera, mali proizvođači, prijevoznici jaja i hrane i mnogi drugi) predstavlja potencijalnu kariku u širenju bolesti peradi, stoga treba redovito provoditi preventivne mjere (Shema 1). Dezinfekcija nastambi jedna je od njih i uvijek obuhvaća kombinaciju čišćenja i same dezinfekcije zbog toga što će velika količina organskih tvari prisutnih u takvom okružju brzo neutralizirati svaki dezinficijens ukoliko prije nije provedeno temeljito čišćenje. Ovisno o vrsti materijala čišćenje smanjuje ukupni broj bakterija za 3 log na površinama, sama dezinfekcija za naredna

¹ Mr. sc. Kristina Matković dr. vet. med., asistentica - znanstvena novakinja, Zavod za animalnu higijenu, okoliš i etologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu Heinzelova 55, 10000 Zagreb; E-mail: kmatkov@vef.hr

² Srećko Matković dr. vet. med. Zvonimira Rogoza 8/1 10000 Zagreb