

**UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA**

Edvard Kenda

**VERJETNOST KONTAMINACIJE RDEČEGA MESA IZ
ZRAKA Z BAKTERIJAMI VRSTE *Listeria monocytogenes* V
KLAVNIČNI INDUSTRIJI**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2012

**UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA**

UDK:614.97:614.442:579.62+579.86:637.5:616-022.32(043.3)

mag. Edvard Kenda, dr.vet.med.

**VERJETNOST KONTAMINACIJE RDEČEGA MESA IZ ZRAKA Z BAKTERIJAMI
VRSTE *Listeria monocytogenes* V KLAVNIČNI INDUSTRiji**

Doktorska disertacija

**LIKELIHOOD OF CONTAMINATION OF RED MEAT FROM THE AIR BY
Listeria monocytogenes IN MEAT INDUSTRY**

Doctoral Thesis

Ljubljana, 2012

**VERJETNOST KONTAMINACIJE RDEČEGA MESA IZ ZRAKA Z BAKTERIJAMI
VRSTE *Listeria monocytogenes* V KLAVNIČNI INDUSTRIJI**

Delo je bilo opravljeno na:

Inštitutu za higieno okolja in živali z etologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani,
predstojnik prof. dr. Martin Dobeic, dr. vet. med.,

Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani,
predstojnik znan. sod. dr. Branko Krt, dr. vet. med.

Javni zagovor je bil opravljen v Ljubljani, dne _____

Mentor: prof. dr. Martin Dobeic, dr. vet. med.

Somentorica: doc. dr. Irena Zdovc, dr. vet. med.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Janez Marinšek, dr. vet. med.

Član: viš. znan. sod. dr. Matjaž Ocepek, dr. vet. med.

Članica: doc. dr. Barbara Jeršek, BF

Izjava o delu

Izjavljam, da je doktorska disetracija rezultat lastnega
raziskovalnega dela.

Edvard Kenda

VSEBINA

OKRAJŠAVE	9
IZVLEČEK	11
ABSTRACT	12
1 UVOD	14
1.1 Namen raziskave.....	16
2 PODATKI IZ LITERATURE.....	18
2.1 Zgodovina.....	18
2.2 Razvrstitev, poimenovanje in lastnosti listerij.....	18
2.3 Okužba z bakterijami vrste <i>Listeria monocytogenes</i>	21
2.3.1 <i>Listerioza pri živalih</i>	21
2.3.2 <i>Listerioza pri ljudeh</i>	22
2.3.3 <i>Patogeneza</i>	23
2.3.4 <i>Okužbe ljudi z bakterijami vrste L. monocytogenes zaradi uživanja kontaminirane hrane</i>	24
2.4 Bakterije vrste <i>Listeria monocytogenes</i> v prehrambeni industriji	27
2.4.1 <i>Pomembne lastnosti bakterij vrste L. monocytogenes za preživetje v živilih</i>	27
2.4.2 <i>Bakterije vrste Listeria monocytogenes v posameznih skupinah živil</i>	31
2.5 Kontaminacija zraka z mikroorganizmi v klavnicih in predelavah za rdeče meso.....	33
2.6 Bioaerosoli v zraku kot nosilci delcev in mikroorganizmov	35
3 MATERIAL IN METODE DELA.....	38
3.1 Načrt, izvedba raziskave in opis eksperimentalnega dela	38
3.2 Material.....	41
3.2.1 <i>Testni objekti</i>	41
3.2.1.1 Mesta odvzema vzorcev v klavnicah (K1, K2, K3) in predelavah (P1, P2, P3)	43
3.2.2 <i>Materiali za mikrobiološke preiskave</i>	50
3.2.2.1 Mikrobiološka gojišča	50
3.3 Merilna tehnika in oprema za meritve	52
3.3.1 <i>Naprava za vzorčenje zraka za mikrobiološke preiskave</i>	52
3.3.2 <i>Merilna oprema za merjenje temperature, relativne vlage in gibanja zraka</i>	52
3.3.3 <i>Bris</i>	53
3.3.4 <i>Oprema za transport vzorcev</i>	53
3.3.5 <i>Kalibracija</i>	53
3.4 Metode vzorčenja in meritve	53
3.4.1 <i>Vzorčenja zraka</i>	53
3.4.1.1 Impakcijska metoda	53
3.4.1.2 Sedimentacijska metoda	55
3.4.2 <i>Vzorčenje površin in trupov klavnih polovic z brisom</i>	56
3.4.3 <i>Ravnanje, označevanje in prevoz vzorcev v laboratorij</i>	56
3.4.4 <i>Meritve mikroklima v klavnicah in predelavah</i>	57
3.5 Mikrobiološke preiskave vzorcev.....	58
3.5.1 <i>Določanje bakterij iz rodu Listeria</i>	58

3.5.1.1	Tipične kolonije na trdnih selektivnih gojiščih	59
3.5.1.2	Kontrola postopka izolacije	60
3.6	Identifikacija bakterij iz rodu <i>Listeria</i>	60
3.6.1	Potrditev bakterij iz rodu <i>Listeria</i>	60
3.6.2	Potrditev bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	61
3.7	Identifikacija s komercialnim setom API <i>Listeria</i>	62
3.8	Statistična analiza	63
4	REZULTATI.....	64
4.1	Prisotnost bakterij iz rodu <i>Listeria</i> v zraku testnih objektov	64
4.1.1	Prisotnost bakterij iz rodu <i>Listeria</i> v zraku klavnic (K1, K2 in K3)	64
4.1.2	Prisotnost bakterij iz rodu <i>Listeria</i> v zraku predelovalnih obratov (P1, P2, P3)	65
4.2	Prisotnost bakterij iz rodu <i>Listeria</i> na površinah testnih objektov	66
4.2.1	Prisotnost bakterij iz rodu <i>Listeria</i> na površinah trupov	66
4.2.2	Prisotnost bakterij iz rodu <i>Listeria</i> na površinah objektov in opreme v klavnicih (K1 – K3)	66
4.2.3	Prisotnost bakterij iz rodu <i>Listeria</i> na površinah objektov in opreme v predelovalnih obratih (P1 – P3)	67
4.3	Skupno število mezofilnih mikroorganizmov v zraku klavnic K1 - K3	68
4.4	Meritve mikroklime v klavnicih (K1, K2, K3) in predelavah (P1, P2, P3)	72
4.5	Statistična obdelava rezultatov	76
4.5.1	Ugotovitve statističnih analiz:	76
5	RAZPRAVA.....	79
5.1	Prisotnost listerij v zraku	79
5.2	Primerjava prisotnosti listerij in aerobnih mezofilnih mikroorganizmov v zraku	81
5.3	Vpliv dejavnikov temperature, vlage in gibanja zraka na pojavnost listerij in aerobnih mezofilnih mikroorganizmov v zraku	83
5.4	Kontaminacija trupov klavnih polovic z listerijami iz zraka na liniji klanja	84
5.5	Analiza kontaminiranosti površin testnih objektov	85
5.6	Sklepne ugotovitve	88
6	ZAKLJUČKI	90
7	POVZETEK	91
8	SUMMARY	93
9	ZAHVALE	95
10	LITERATURA	96

KAZALO SLIK

Slika 1: Prenos bakterij vrste <i>Listeria monocytogenes</i> v okolju.....	21
Slika 2: Shematski prikaz okužbe z bakterijami vrste <i>L. monocytogenes</i>	24
Slika 3: Pogoji za rast mikrobov v žarišču v nesterilnem okolju.	28
Slika 4: Nastajanje biofilma v vodovodni cevi.....	29
Slika 5: Biofilm s celicami listerij na površinah materiala.....	30
Slika 6: Rekontaminacija površine preko aerosolov	36
Slika 7: Naprava za bakteriološko analizo zraka (MAS 100 Microbial Air Monitoring Systems®).	52
Slika 8: Vzorčevalnik zraka z gojiščem za štetje skupnega števila mikroorganizmov	54
Slika 9: Vzorčevalnik zraka s tkočim gojiščem za preiskavo na bakterije iz rodu <i>Listeria</i>	55
Slika 10: Rast bakterij vrste <i>Listeria monocytogenes</i> na umetnih gojiščih, ALOA in PALCAM	60
Slika 11: Kultura bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> na krvnem agarju.	61
Slika 12: Biokemijska determinacija listerij s komercialnim kompletom API Listeria.	63

KAZALO TABEL

Tabela 1: Pogostnost primerov zastrupitve s hrano v Evropi v letu 2009 z zgoraj navedenimi povzročitelji (EFSA).....	25
Tabela 2: Število obolelih za listeriozo v Evropskih državah v letih 2005 do 2009 (EFSA, 2011).....	26
Tabela 3: Kapaciteta klanja v klavnicih K1, K2, K3 in kapaciteta predelave v predelavah P1,P2,P3.	41
Tabela 4: Lokacije in vrste vzorčenja/meritev ter število odvzetih vzorcev v klavnici K1.	46
Tabela 5: Lokacije in vrste vzorčenja/meritev, ter število odvzetih vzorcev v klavnici K2.	47
Tabela 6: Lokacije in vrste vzorčenja/meritev, ter število odvzetih vzorcev v klavnici K3.	48
Tabela 7: Lokacije in vrste vzorčenja/meritev, ter število odvzetih vzorcev v predelavah (P1, P2, P3).	49
Tabela 8: Lokacije in število meritev mikroklime v klavnicah (K1, K2, K3) in predelavah (P1, P2, P3)	58
Tabela 9: Pozitivni vzorci na prisotnost bakterij iz rodu <i>Listeria</i> iz zraka klavnic K1, K2, K3.	65
Tabela 10: Prisotnost bakterij iz rodu <i>Listeria</i> na površinah in trupih v klavnicah (K1, K2, K3).....	67
Tabela 11: Prisotnost bakterij iz rodu <i>Listeria</i> v zraku in na površinah predelovalnih obratov (P1, P2, P3).....	68
Tabela 12: Povprečne vrednosti skupnega števila mezofilnih mikroorganizmov v zraku klavnice K1.....	68
Tabela 13: Povprečne vrednosti SŠM/m ³ in SŠM/ploščo v zraku klavnice K2.....	69
Tabela 14: Povprečne vrednosti SŠM/m ³ in SŠM/ploščo v zraku klavnice K3.....	69
Tabela 15: Rezultati meritve mikroklime v klavnici K1.....	72
Tabela 16: Rezultati meritve mikroklime v klavnici K2.....	72
Tabela 17: Rezultati meritve mikroklime v klavnici K3.....	73

Tabela 18: Rezultati meritve mikroklimе v predelovalnih obratih (P1, P2, P3)	73
Tabela 19: Statistična analiza povezave med prisotnostjo aerogenih listerij in višino merilnega mesta.....	76
Tabela 20: Statistična analiza povezave med prisotnostjo aerogenih listerij in merilnimi mestи.	76
Tabela 21: Statistična analiza povezave med prisotnostjo aerogenih listerij in letnim časom. 77	77
Tabela 22: Statistična analiza povezave med prisotnostjo aerogenih listerij in temperaturo... 77	77
Tabela 23: Statistična analiza povezave med prisotnostjo listerij v zraku in mestи, kjer se tvori večja količina aerosola.....	78

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Povprečne vrednosti skupnega števila aerobnih mikroorganizmov v zraku klavnic K1, K2, K3.	70
Graf 2: Pogostost izolacije bakterij iz rodu <i>Listeria</i> v primerjavi s skupnim številom aerobnih mikroorganizmov v zraku klavnic K1, K2, K3.	71
Graf 3: Rezultati meritve mikroklimе v klavnicah (K1, K2, K3) in predelavah (P1, P2, P3)..	75

OKRAJŠAVE

ANOVA	analiza variance (angl. Analysis of variance)
API	Analytical Profile Index
CFU	kolonijska enota (angl. Colony Forming Unit)
EFSA	Evropska agencija za varno hrano (angl. European Food Safety Authority)
EPS	ekstracelularni polisaharidi
HACCP	analiza tveganja in ugotavljanja kritičnih kontrolnih točk (angl. Hazard Analysis Critical Control Point)
ISO	Mednarodna organizacija za standardizacijo (angl. International Organisation for Standardisation)
KE	kolonijska enota
MAS 100	sistem za vzorčenje zraka za mikrobiološke preiskave (angl. Microbial Air Monitoring System)
MRA	mikrobiološka ocena tveganja (angl. microbiology risk assesment)
N	število vzorcev
P < 0,05	oznaka za statistično značilno
pH	kislost
PLC	selektivno gojišče Palcam agar
RH	relativna vlažnost (angl. Relative Humidity)
SEM	vrstični elektronski mikroskop (angl. Scanning Electron Microscop)
SOP 147	Standardni operativni postopek

SPSS	statistični paket za družbene vede (angl. Statistical Package for the Social Sciences)
SŠM	skupno število aerobnih mikroorganizmov (KE/m ³ ; KE/g)
TGYA	Tryptic glucose yeast agar

VERJETNOST KONTAMINACIJE RDEČEGA MESA IZ ZRAKA Z BAKTERIJAMI VRSTE *Listeria monocytogenes* V KLAVNIČNI INDUSTRIJI

IZVLEČEK

Ključne besede: hrana, onesnaženje – mikrobiologija; *Listeria monocytogenes*; mesno predelovalna industrija; klavnice.

V zraku in na površinah opreme in prostorov testnih objektov, treh klavnic in treh predelovalnih obratov za rdeče meso, smo ugotavljali prisotnost bakterij iz rodu *Listeria* v korelaciji s prisotnostjo aerobnih mezofilnih bakterij. Zaradi preverjanja aerogene rekontaminacije smo ugotavljali tudi prisotnost listerij na površini trupov govedi.

V testnih objektih smo z metodama aktivnega prečrpavanja zraka in sedimentacije odvzeli skupno 158 vzorcev zraka. Iz 8 (5,06 %) vzorcev smo izolirali aerogene bakterije vrst *L. seeligeri* in *L. innocua*, v nobenem vzorcu zraka pa niso bile ugotovljene bakterije vrste *L. monocytogenes*. V klavnici K1 smo med mestom za evisceracijo govejih trupov in vhodom v razsekovalnico iz 3 vzorcev (4,76 %) izolirali bakterije vrste *L. seeligeri* in hkrati najviše število aerogenih mezofilnih bakterij. Podobno situacijo smo ugotovili v klavnicah K2 in K3 zraven mesta za žaganje trupov in tekočega traku za transport notranjih organov, kjer so bile ugotovljene bakterije vrste *L. innocua* v 4,68 % oziroma 4,16 % vzorcev. Hkrati so bile na istih pozicijah ugotovljene visoke vrednosti aerogenih mezofilnih bakterij. Med vsemi predelovalnimi obrati smo ugotovili bakterije vrste *L. innocua* le v enem vzorcu zraka, na mestu z veliko koncentracijo aerosola. Povezave med številom ugotovljenih listerij v zraku in kontaminacijo govejih trupov z listerijami nismo ugotovili, saj smo od 163 odvzetih brisov s trupov govedi na klavni liniji samo v enem vzorcu ugotovili bakterije vrste *L. innocua*. Nasprotno smo predvsem na površinah predelovalnih obratov ugotovili več različnih vrst listerij vključno z bakterijami vrste *L. monocytogenes*. Vлага, pretok zraka in temperatura okolja, niso imeli značilnega vpliva ($P>0,05$) na pojavnost listerij v zraku in površinah. Ugotovili pa smo, da je na mestih, kjer se izloča več aerosola, prisotnih značilno višje število aerogenih listerij ($P<0,05$). Po nam znanih in dostopnih podatkih nam je uspel prvi primer izolacije listerij iz zraka v realnih pogojih klavnic in predelovalnih obratov za rdeče meso. To smo dosegli z izvirno modifikacijo metode vzorčenja zraka.

LIKELIHOOD OF CONTAMINATION OF RED MEAT FROM THE AIR BY THE BACTERIA *Listeria monocytogenes* IN MEAT

ABSTRACT

Key words: Food, contamination – microbiology; *Listeria monocytogenes*; meat processing industry; slaughterhouses.

We have been determining the presence of the *Listeria* gene bacteria in the air and on surfaces of equipment and facilities of three test slaughterhouses and three red meat processing facilities, as well as their correlation with aerobic mesophilic bacteria. In order to check for aerogenic recontamination, we were also determining the presence of listeria on cattle.

Using the methods of active air pumping and sedimentation, we have taken a total of 158 air samples at the test facilities. In 8 (5.06 %) of the samples we isolated aerogenic *L. seeligeri* and *L. innocua* specie of bacteria, but none of the air samples revealed *L. monocytogenes* species of bacteria. At slaughterhouse K1, between the spot for cattle carcass evisceration and the entrance to the cutting station, we isolated *L. seeligeri* specie of bacteria and also the highest number of aerogenic mesophilic bacteria from 3 samples (4.76 %). A similar situation has been determined at slaughterhouses K2 and K3 next to the carcass cutting station and the conveyer belt for transporting internal organs, where *L. innocua* specie of bacteria was determined in 4.68 % or 4.16 % of samples. At the same time, those positions revealed high values of aerogenic mesophilic bacteria. From all of the processing facilities, we have revealed *L. innocua* specie of bacteria in only one air sample, at a location with a high concentration of aerosol. A connection between the number of airborne listeria and contamination of cattle carcasses with listeria was not determine, since with having taken 163 samples from cattle carcasses at the slaughtering line, we have determined *L. innocua* specie of bacteria in only one sample. On the contrary, we mainly determined a number of different species of listeria, including bacteria of the *L. monocytogenes* specie, on the surfaces of the processing facilities. Ambient moisture, airflow and ambient temperature did not have a major effect ($P>0.05$) on the occurrence of listeria in air and on surfaces. But we have determined that locations, where more aerosol is being released, typically have higher numbers of aerogenic listeria ($P<0.05$). According to data known and available to us, we were the first to successfully isolate listeria from air in real conditions of slaughterhouses and red meat

processing facilities. We achieved this with an original modification of the air sampling method.

1 UVOD

Kontaminacija mesa in mesnih izdelkov je eden izmed najpomembnejših zdravstvenih in ekonomskih problemov mesne industrije. Mikrobiološka kontaminacija mesa predstavlja največje tveganje za zdravje uporabnika še posebej v primerih, ko se iz tega mesa pripravljajo izdelki, ki se uživajo brez predhodne termične obdelave, ali izdelki, ki so le delno termično obdelani.

Poti kontaminacije patogenih mikroorganizmov in kvarljivcev mesa ter mesnih izdelkov so različne. Meso in izdelki se lahko kontaminirajo na klavni liniji, pri skladiščenju v hladilnicah in pri predelavi mesa (Sofos in sod., 1999; Griffiths, 2003; Marinšek in Grebenc, 2002). Najpogostejši vzrok za kontaminacijo mesa in izdelkov so neustrezno ravnanje ob zakolu, stik s površinami obdelovalnih površin, strojev in opreme, prahom, vodo, bioaerosoli in dodatki, ter neupoštevanje dobre proizvodne prakse in načel HACCP.

Za zagotovitev varnosti mesa in izdelkov je, poleg splošne higienske ustreznosti surovin, nujno potrebno preučiti izvore kontaminacije in poti prenosa patogenih mikroorganizmov, vključno z aerogenim širjenjem mikroorganizmov (Antrekker in sod., 2003).

V procesu obdelave in predelave mesa, kljub ukrepom za preprečevanje kontaminacije površin še vedno obstaja možnost aerogene kontaminacije. Potencialni vir aerogenih mikroorganizmov so tla, kanali, kondenzirana para, osebje, zunanji zrak in klimatske ter filtrirne naprave za zrak (Kang in Frank, 1990; Holah in sod., 1995). Med najpogostejšimi verjetnimi viri listerij v klavnicah in predelavah so prostori za izkoževanje, evisceracija in mesta, kjer je zrak zasičen z aerosolom, hladilnice ter predelava izdelkov. Mikroorganizmi se v večini primerov prenašajo z bio-aerosoli in prahom (Kang in Frank, 1990; Cundith in sod., 2002) in so pomemben vir kontaminacije površin mesa in izdelkov. Za nadzor kvalitete zraka v klavnični industriji je poznavanje velikosti, tipa, vira in obstoja bio-aerosolov velikega pomena. Kang in Frank, (1990) poročata o rezultatih svojih raziskav, v katerih so ugotovljali, da je velikost premera delcev bio-aerosola v 90 % od $>7,0 \mu\text{m}$ do $4,7 \mu\text{m}$, v 10 % pa so ugotovili, da njihova velikost znaša $< 2,1 \mu\text{m}$. Premer delcev je namreč pomemben zaradi načina širjenja, prostega gibanja po prostoru in usedanja delcev na površine v odvisnosti od

gibanja in vrtinčenja zraka v prostoru (Rec in Ullum, 2002). Istočasno so lastnosti delcev, ki so potencialni nosilci mikroorganizmov in plesni, pomembni pri iskanju najustreznejše tehnologije za redukcijo in deaktivacijo mikroorganizmov v zraku. Zrak, kot potencialni vir patogenih mikroorganizmov in kvarljivcev, bi moral biti upoštevan kot kritična kontrolna točka v proizvodnji surovega mesa in mesnih izdelkov (Kang in Frank, 1990; Franco in sod., 1995).

Pogostnost aerogenih mikroorganizmov v realnih pogojih zraka klavničnih objektov in načini mikrobiološke obremenitve zraka so bili doslej zelo slabo raziskani. Prav tako so redke raziskave na področju ugotavljanja aerogenih bakterij in plesni, odgovornih za kontaminacijo ter kvarjenje mesa in mesnih izdelkov. Največ podatkov o aerogeni kontaminaciji mesa je mogoče zaslediti na področju klavne industrije goveda, le malo je podatkov o aerogeni kontaminaciji mesa in izdelkov v klavni industriji drugih vrst živali.

Med najnevarnejšimi potencialnimi patogenimi mikroorganizmi, ki se prenašajo po zraku in so potencialni kontaminanti mesa, so bakterije vrste *Listeria monocytogenes* (Nesbaken in sod., 1996). Najdemo jih lahko v zemlji, vodi, zraku, na rastlinah, gnoju in drugje v okolju, kjer predstavlja del normalne mikroflore (Sauders, 2006; Ivanek, 2006). Pogosto jo najdemo v razpadajočemu rastlinju, predvsem pa v neustrezno fermentirani silaži. Prav ta največkrat predstavlja izvor okužbe z bakterijami iz rodu *Listeria* za živali in s tem posledično za celo prehransko verigo (Ivanek, 2006). Listerije lahko preživijo v naravi bistveno daljše obdobje kot ostali nesporogeni mikroorganizmi. Poleg tega imajo odlično sposobnost kolonizacije, razmnoževanja in preživetja v različnih fazah in pogojih prehrambne industrije. Bakterije iz rodu *Listeria* povzročajo bolezen listeriozo. Za listeriozo lahko zbolijo ljudje in živali. Listeriozo pri ljudeh povzročajo bakterije vrste *Listeria monocytogenes* in izjemoma tudi bakterije vrste *L.ivanovii* (Goullet in sod., 2010). Bolezen lahko poteka v dveh oblikah, in sicer v tako imenovani akutni in asimptomatični obliki. Akutna oblika listerioze je redka in se pojavlja letno nekje pri 2-9 primerih na milijon. S približno 30 % smrtnostjo je ena izmed najnevarnejših bolezni, ki se prenaša s hrano. Najbolj rizične skupine so nosečnice in doječe matere, dojenčki, otroci, starejši od 65 let, torej skupine s slabšim imunskim odzivom (Crum, 2002).

V našem delu smo poskušali odgovoriti na vprašanje o možnosti kontaminacije mesa in mesnih izdelkov z mikroorganizmi, predvsem bakterijami vrste *Listeria monocytogenes* iz zraka. Zelo malo je raziskav na področju ugotavljanja aerogene kontaminacije izdelkov. Med temi je mogoče zaslediti predvsem spremeljanje skupnega števila mikroorganizmov. Raziskav, s katerimi bi definirali njihovo vrsto in koncentracijo v zraku, ni zaslediti. Zato smo se v našem delu odločili, da je smiselno raziskati verjetnost mikrobiološke obremenitve zraka in posledične aerogene kontaminacije mesa na liniji klanja, v hladilnicah za sveže meso in predelavah z bakterijami iz rodu *Listeria*.

1.1 Namen raziskave

Z raziskavo smo želeli:

- potrditi morebitno prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes* v zraku klavnic za rdeče meso, v prostorih s klavnimi linijami in hladilnicah;
- določiti poti širjenja bakterij vrste *L. monocytogenes* in najnevarnejša mesta za kontaminacijo mesa in izdelkov glede na tehnološki proces;
- določiti tip bakterij vrste *L. monocytogenes* zaradi spremeljanja stanja v obratu, če:
 - gre za pojav istega tipa bakterij vrste *L. monocytogenes*, ki perzistira v obratih,
 - se v obratih pojavlja vedno drugi tip bakterij vrste *L. monocytogenes*, kar pomeni, da gre za večkratni vnos bakterij;
- ugotoviti možnost kontaminacije mesa (trupov govedi) z bakterijami vrste *L. monocytogenes* iz zraka;
- določiti skupno število aerogenih mikroorganizmov (SŠM) v zraku, v prostorih s klavnimi linijami in hladilnicah;

Namen raziskave je bil preveriti naslednje hipoteze:

1. Zrak je v klavniških hlevih in prostorih s klavnimi linijami kontaminiran z bakterijami vrste *L. monocytogenes*, s čimer obstaja posledična nevarnost kontaminacije trupov klavnih živali mesa in izdelkov.

2. V zraku se nahaja sorazmerno veliko skupno število aerogenih mikroorganizmov (SŠM), zato obstaja verjetnost za aerogeno mikrobiološko kontaminacijo (SŠM) površin klavnice, opreme in mesa.
3. Število bakterij vrste *L. monocytogenes* je na površini mesa na liniji klanja nizko, število SŠM pa sorazmerno visoko in se viša z dobo skladiščenja - hlajenja.
4. Gre za pojav istega tipa bakterij vrste *L. monocytogenes*, ki se nahaja v klavničnem okolju in gre za interno kontaminacijo, ali pa gre za pojav različnih tipov bakterij vrste *L. monocytogenes*, kar kaže na vedno nov vnos listerij preko živali.
5. Turbulence in laminarni tokovi zraka v prostoru, temperatura in relativna vlažnost prostora vplivajo na gibanje bioaerosolov in prahu v zraku, s čimer pomembno vplivajo na jakost kontaminacije mesa z različnimi mikroorganizmi in še posebej z bakterijami vrste *L. monocytogenes*.

2 PODATKI IZ LITERATURE

2.1 Zgodovina

Bakterije vrste *L. monocytogenes* je prvi opisal Murray leta 1926 v povezavi z nenadnim poginom šestih mladih zajcev (Murray s sod., 1926). Murray je poimenoval povzročitelja *Bacterium monocytogenes* in ga opisal kot majhno Gram pozitivno paličico, leta 1940 pa je Pirie spremenil ime rodu v *Listeria* (Harvey, 1940).

Kljub temu, da je bila klinična slika z bakterijami vrste *L. monocytogenes* opisana pri živalih in ljudeh že leta 1920, pa so bile bakterije vrste *L. monocytogenes* šele leta 1952 v Vzhodni Nemčiji dokazana pri ljudeh kot povzročitelj sepse in meningitisa pri novorojencih. V tem primeru so bile izolirane bakterije vrste *L. monocytogenes* pri kravi z listerioznim mastitisom in pri mrtvorojenem dojenčku matere, ki je pila sveže mleko te krave (Potel, 1952).

Šele leta 1981 pa so prvič neposredno povezali okužbo ljudi s hrano, ki je bila kontaminirana z bakterijami vrste *L. monocytogenes* in sicer pri izbruhu listerioze v Halifaxu zaradi uživanja solate iz zelja, ki je bilo kontaminirano z bakterijami vrste *L. monocytogenes* (Schlech s sod., 1983). Od takrat so poročali o mnogih primerih okužb ljudi s hrano kontaminirano z bakterijami vrste *L. monocytogenes*.

Pozneje je bilo ugotovljeno, da za listeriozo zbolijo v glavnem otroci, starejše osebe, osebe po presaditvi organov in oboleni za aidsom (Schlech, 2001).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so bile do sedaj izolirane pri 42 vrstah divjih in domačih sesalcev in 17 vrstah ptic, vključno z domačo perutnino (Kenneth, 2011).

2.2 Razvrstitev, poimenovanje in lastnosti listerij

Rod *Listeria* vsebuje šest klasičnih vrst, in sicer bakterije vrste *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* (Bergy's Manual, 1986). Kasneje sta bili

opisani še *L. marthii* (Graves, 2010) in *L. rocourtiae* (Leclercq, 2009), ki nista bili uvrščeni med patogene.

Bakterije vrste *L. grayi* so nehemolitične in nepatogene, izoliramo jih zelo redko. Imajo dve podvrsti (Rocourt in sod., 1992):

- *L. grayi* subspecies *grayi*
- *L. grayi* subspecies *murray* (prej imenovana *Listeria murrayi*) (Welshimer in Meredith, 1971).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* in *L. ivanovii* so hemolitične in patogene za živali, bakterije vrste *L. monocytogenes* so patogene tudi za ljudi, bakterije vrste *L. ivanovii* pa le izjemoma (Guillet, 2010; Bakker, 2010; Low in Donachie, 1997; Cummins, 1994, Lessing, 1994). Sorodne so z bakterijami vrste *L. seeligeri* in *L. welshimeri*, ki pa jih ne uvrščamo med patogene bakterije vrste *L. seeligeri*, ki so lahko hemolitične.

Bakterije vrste *L. ivanovii* imajo dve podvrsti (Doumith s sod., 2004):

- *L. ivanovii* subspecies *ivanovii*
- *L. ivanovii* subspecies *londoniensis*

Bakterije vrste *Listeria monocytogenes* so kratke, po Gramu pozitivne paličice z zaobljenimi konci (0,4 do 0,5 µm široka in 0,5 do 2µm dolga). Celice iz tkiva ali hitro rastoče kulture so lahko tudi kokoidne oblike. Bakterije iz rodu *Listeria* so fakultativni anaerobi in bolje rastejo v prisotnosti 10 % CO₂. Vsebujejo encim katalazo, nimajo pa oksidaze, hidrolizirajo eskulin, tolerirajo 10 % NaCl v gojišču in so gibljive pri sobni temperaturi. Dobro rastejo na hranilnem in krvnem agarju, ne pa na McConkyjevem agarju. Kolonije so lahko gladke ali hrapave (Quinn, 2002).

Poznanih je vsaj 13 serotipov bakterij vrste *L. monocytogenes*, ki temeljijo na somatskih O in flagelarnih H antigenih, večino bolezni povzročajo tipi 4b, 1/2a in 1/2b (Buchholz in Macola, 2001).

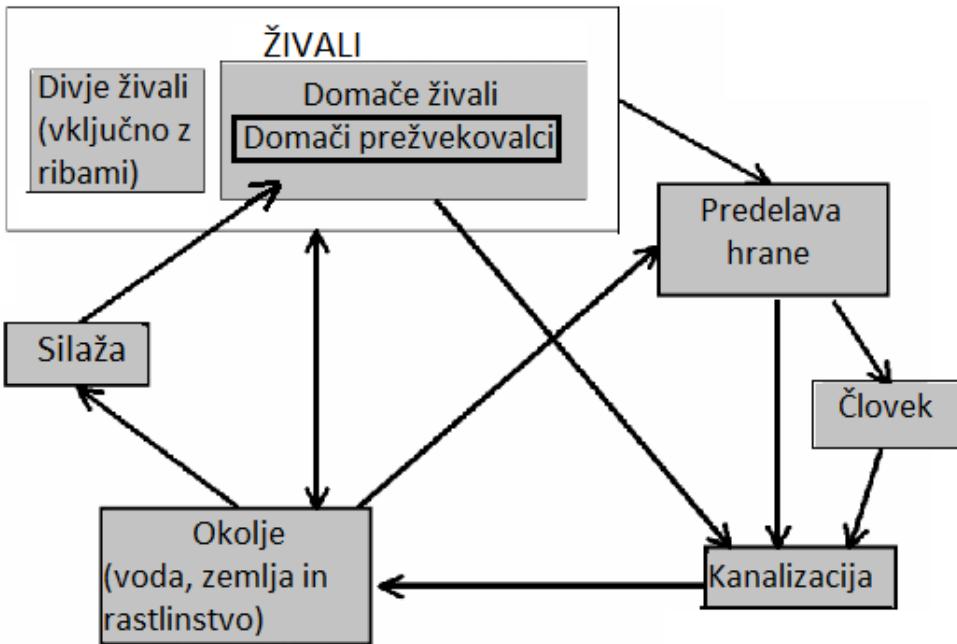
Večina avtorjev navaja, da bakterije vrste *L. monocytogenes* rastejo pri temperaturah od +1,7 do +45°C, optimum je med 30 in 37°C (Junttila in sod., 1988; Hudson in sod 1994; Bille in sod., 2003; Koutsoumanis in sod., 2004).

Bakterije iz rodu *Listeria* lahko preživijo v naravi bistveno dlje kot večina nesporogenih mikroorganizmov, saj so odporne proti vrsti zunanjih vplivov, kot je visoka slanost, kislota, nizka temperatura (Sorrells in Enigl, 1990; Tienungoon in sod., 2000; Johnson in sod., 1988; Nolan s sod., 1992; Patchett s sod., 1994). Te lastnosti jim omogočajo preživetje v naravi tudi več let, seveda odvisno od dejavnikov okolja (Ryser in Marth, 2007). V naravi jih lahko najdemo v zemlji, vodi, zraku, gnoju, na rastlinah in drugje v okolju, kjer predstavlja del normalne mikroflore (Fenlon, 1999; Saunders, 2006; Ivanek, 2006).

Mitscherlich in Marth, (1985); Fenlon (1999) so ugotovili, da bakterije vrste *L.monocytogenes* preživijo v vlažni zemlji do 497 dni, v suhi zemlji pa 730 dni. V tej študiji so ugotovili tudi, da v plasteh zemlje, ki so izpostavljene soncu, preživijo vsaj 12 dni, v tistih plasteh, ki pa niso izpostavljene soncu, pa 182 dni. Na temperaturi okolja 5°C preživijo v iztrebkih goveda od 182- 2190 dni, v suhih iztrebkih konj in ovac 730 dni, v vlažnih pa vsaj 347 dni. V rečni vodi pri temperaturi 2-5°C preživijo 750 dni. V vodovodnem omrežju od 140-300 dni, v silaži pa preživijo tudi od 180 do 2190 dni pri temperaturi 5°C. De Roin in sod. (2003) so ugotovili, da lahko bakterije vrste *L. monocytogenes* preživijo na pesku pri 10°C in 88 % vlažnosti 151 dni, pri 22°C in 0 % relativni vlažnosti pa 82 dni.

Glede na zgoraj ugotovljene velike sposobnosti prilagajanja in preživetja v okolju so bakterije iz rodu *Listeria* temu primerno razširjene v naravi (Glaser, 2001). Tako Weis in Seeliger (1975) poročata o kontaminiranosti z listerijami pri 44 % odvzetih vzorcev rastlinja z nekultiviranih površin in 20,3 % odvzetih vzorcev zemlje.

Spodaj (Slika 1.) so prikazani pregledi habitatov in gostiteljev ter glavne poti prenosa bakterij vrste *L. monocytogenes* pred pridelavo hrane (vključno z odplakami, okoljem, silažo in domačimi živalmi) (Ivanek in sod., 2006).



Slika 1: Prenos bakterij vrste *Listeria monocytogenes* v okolju (Ivanek, 2006).

2.3 Okužba z bakterijami vrste *Listeria monocytogenes*

2.3.1 Listerioza pri živalih

Za listeriozo lahko zbolijo številne vrste živali, mnoge med njimi so asimptomatski prenašalci bakterij vrste *L. monocytogenes* v fecusu (Wesly, 1993). Praviloma so vse domače živali dovezetne za to bolezen (Low in Donachie, 1997), med njimi pa po obolenosti izstopajo ovce, koze in govedo, redkeje pa piščanci, konji, prašiči in druge živali. Listerioza se pojavlja tudi med ljubiteljskimi vrstami živali, predvsem pri kuncih in glodalcih (činčile, budre, gerbili), pri katerih so bile listerije tudi prvič opisane. V kolikor listerioza ni pravočasno zdravljena, se bolezen običajno konča s poginom živali. Klinična obolenja pri živalih so redka, število obolenj je odvisno od starosti in proizvodne kategorije živali (Erdogan in sod., 2001). Večina okužb poteka v subklinični oblikih, vendar imajo lahko za posledico abortus ali mrtev plod. Sporadično živali zbolijo z izrazitimi kliničnimi znaki. Izjemoma lahko bolezen poteka v oblikah endemij, navadno z živčnimi znaki, ki se konča s poginom (Low in Donachie, 1997).

Listeriozo pri ovcah večinoma povzročajo bakterije vrste *L. monocytogenes*, najpogosteje serotip 1/2, 3 in 4, izjemoma pa lahko tudi bakterije vrste *L. ivanovii*. Koze so odporne proti

okužbi z bakterijami vrste *L. ivanovii*. Pri odraslih ovcah in kozah je najpogostejša oblika listerioze meningoencefalitis (Low in Donachie, 1997; Sclech, 2000).

Listeriozo pri govedu povzročajo predvsem bakterije vrste *L. monocytogenes* in izjemoma *L. ivanovii*. Bolezen se pri govedu kaže v različnih oblikah, najpomembnejše pa so encefalitis, abortus in septikemična oblika z miliarnimi abcesi po notranjih organih (Low in Donachie, 1997). Klinična obolenja so pri govedu nekje 4 na 1.000 živali letno. Okužene živali s septikemično obliko bolezni lahko listerije izločajo s slino, plodovnimi vodami, mlekom in blatom, kar pomeni nevarnost za zdravje ljudi in kontaminacijo okolja. Največji problem pojavljanja listerioze pri govedu je nevarnost za zdravje ljudi, saj uživanje surovega (nepasteriziranega) mleka predstavlja najbolj pogost način okužbe ljudi z listerijami (Ryser in Marth, 2007).

2.3.2 Listerioza pri ljudeh

Klinični opisi bolezni, ki ustrezajo listeriozi pri ljudeh, so bili znani že pred skoraj 100 leti. Diagnosticirana je bila leta 1929, ko je Nyifeld izoliral *L. monocytogenes* iz krvi treh pacientov, ki so zboleli za mononukleozi podobno boleznijo (Gray in Killinger, 1966). V letih 1933 in 1934 je bila *L. monocytogenes* ugotovljena kot vzrok meningitisa in perinatalne okužbe v Združenih državah. Vse do leta 1945 poročajo o manj kot 40 sporadičnih primerih listerioze pri ljudeh. Humana listerioza je v zadnjih desetih letih terjala več sto človeških žrtev, visoko pa je tudi število neonatalnih smrti zaradi listerioze. Najbolj rizične skupine so nosečnice in doječe matere, dojenčki, otroci in starejši ljudje, in kategorije s slabšim imunskim odzivom (Drevts in sod., 2004; Bucholz in Mascola, 2001; Nieman in Lorber, 2007).

Kontaminirana hrana je najpogostejši vir okužbe z bakterijami vrste *L. monocytogenes* (Jemmi, 2006; Sim in sod., 2002). Colodner in sod. (2003) navajajo, da so bili poleg okužbe s hrano dokumentirani še primeri okužbe med materjo in plodom in redki primeri navzkrižne okužbe z obleko pri dojenčkih ali med otroki v vrtcu.

Neonatalna listerioza je danes najnevarnejša listerijska okužba pri nosečnicah in je glavni vzrok odmiranja plodov in mrtvorojenih otrok (Mylonakis in Paliou, 2002). Plod se okuži transplacentarno kot posledica bakteriemije pri materi (Bakardijev s sod, 2005). Rezultati

raziskav pa tudi kažejo, da se novorojenki ne okužijo le intrauterino, ampak tudi ob samem porodu z vaginalno sluzjo (Leucit, 2005). Pri neugotovljenih ali nepotrjenih slučajih perinatalne listerioze so izgledi preživetja zelo slabi, v teh primerih je smrtnost skoraj 100 odstotna. Pravočasna diagnoza in hitro zdravljenje z antibiotiki pa izglede izboljšajo do take mere, da se lahko rodijo popolnoma zdravi otroci (Evans in sod., 1985).

Pri zdravih ljudeh lahko bakterije vrste *L. monocytogenes* povzročijo tudi lažje oblike obolenj. Najbolj pogosto poročajo o gastroenteritisu in dermatitisu (Sim in sod., 2002; Hof, 2001). Kljub temu nekateri avtorji (Schlech, 2005) poročajo, da so primeri gastroenteritisa, pri katerih so bile izolirane *L. monocytogenes* kot povzročitelj, dokaj redki. Simptomi pri gastroenteritisu so vročina, driska, glavobol, bolečine v mišicah in bruhanje, pojavijo se v 18 - 28 urah po zaužitju okužene hrane. V hrani, ki je bila vir okužbe, so nekateri avtorji ugotovili visoko število bakterij vrste *L. monocytogenes* ($5 - 1,6 \times 10^9$ SŠM/g) (Frye in sod., 2002; Aureli in sod., 2000; Sim in sod., 2002).

Kontaktni dermatitis, povzročen z bakterijami vrste *L. monocytogenes*, je opisan zelo redko, predvsem kot okužba na rokah veterinarjev in kmetov. Večina primerov je bila povezanih s kontaktnimi okužbami s kontaminiranim biološkim materialom, na primer pri abortiranih živalskih fetusih (McLauchlin in Low, 1994). Tak primer je bil opisan tudi pri veterinarju v Sloveniji, ki se je okužil ob reševanju poroda pri kravi, bolezen pa se je razvila v obliki številnih pustul na rokah (Zdovc s sod., 2008).

Ostale oblike listerioze so redke, praviloma v obliki lokalnih okužb, zato so za zdravljenje relativno nezahtevne. Še redkejši pa so primeri, ko iz teh lokalnih oblik pride do bakteriemije in ene izmed prej navedenih kliničnih oblik.

2.3.3 Patogeneza

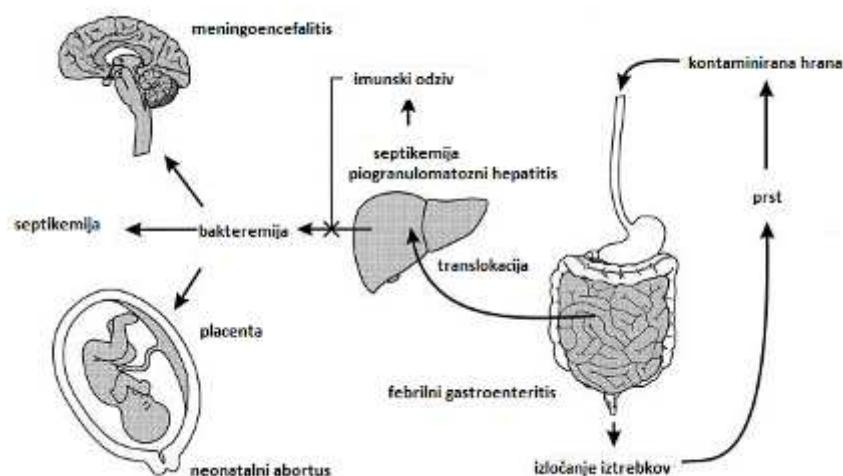
Razvoj in oblika bolezni je odvisna od načina okužbe, koncentracije oz. števila povzročitelja in imunskega statusa gostitelja. Za okužbo ljudi z listerijami so največkrat vzrok kontaminirana živila z bakterijami vrste *L. monocytogenes*, kot so surovo meso, mleko mlečni izdelki, morska hrana in zelenjava (Faber in Peterkin, 1991). Prenos je možen tudi preko domačih živali, insektov, zraka, prahu, iztrebkov in preko drugih ljudi (Colodner, 2003).

Še vedno ni znano, kakšno minimalno število bakterij vrste *L. monocytogenes* je potrebnih, da povzročijo klinično okužbo pri ljudeh (Farber in Peterkin, 1991; Sorrells, 1990). Inkubacijska doba pri alimentarni okužbi je v večini primerov okoli 35 dni, v posameznih primerih pa lahko znaša od 11 do 70 dni. V primeru dveh nosečih žensk, ki sta se okužili na neki zabavi, je bila inkubacijska doba 19 in 23 dni (Riedo in sod., 1994).

Patogene listerije se lahko prebijejo skozi epitelno bariero prebavil in se razmnožujejo v makrofagih jeter in vranice s pomočjo hemolizina listeriolizina O (Cossart in Sansonetti, 2004).

Drugi način je prehod skozi poškodovane površine sluznic, preko končičev trigeminalnega živca do centralnega živčnega sistema (Drvets in sod., 2004).

Sistemski potek bolezni je pri obeh okužbah podoben (Vazques-Boland, 2001) (Slika 2).



Slika 2: Shematski prikaz okužbe z bakterijami vrste *L. monocytogenes* (Vazques-Boland, 2001).

2.3.4 Okužbe ljudi z bakterijami vrste *L. monocytogenes* zaradi uživanja kontaminirane hrane

Raziskave kažejo, da je epidemiološka situacija glede humane listerioze v Evropi relativno ugodna. Poročila EFSA (2010) kažejo, da se je število obolelih za listeriozo v letu 2008 v

primerjavi z letom 2007 zmanjšalo za 11,1 %. V letu 2008 je bilo v Evropi zabeleženo 1.381 primerov listerioze, kar so v povprečju 0,3 primeri na 100.000 prebivalcev. Tudi v Sloveniji lahko trdimo, da imamo relativno ugodno situacijo, kar se tiče obolenosti za listeriozo. Leta 2005 je bilo v Sloveniji ugotovljenih 0,18 primerov na 100.000 prebivalcev (3 oboleni), v letu 2006 0,38 primerov na 100.000 prebivalcev (7 obolenih), v letu 2007 0,20 primerov na 100.000 prebivalcev (4 oboleni) in v letu 2008 0,18 primerov na 100.000 prebivalcev (3 oboleni). To pa ne bi mogli trditi za Nemčijo, saj je v obdobju 2001-2005 obolenost za listeriozo od leta 2001 narasla z 0,26 primera na 100.000 prebivalcev (217 obolenih) na 0,63 primerov na 100.000 prebivalcev (519 obolenih) v letu 2005. O povečanem številu obolenih za listeriozio v letu 2007 poročajo tudi z Danske in za obdobje 2006-2007 iz Belgije (EFSA, 2009; Denny in McLachlin, 2008).

Tabela 1: Pogostnost primerov zastrupitve s hrano v Evropi v letu 2009 z zgoraj navedenimi povzročitelji (EFSA 2011).

povzročitelj	število primerov v EU
<i>Campylobacter</i>	198,252
<i>Salmonella</i> ,	108,614
verotoksična <i>E. coli</i>	3,573
<i>L. monocytogenes</i>	1.645

V obdobju od leta 2005 do 2009 je bilo v EU ugotovljeno največ (1645) primerov humane listerioze, kar predstavlja 264 (19 %) več obolenih kot v letu 2008 (Tabela1). Povprečna stopnja obolenosti v EU je bila 0,4 primera na 100.000 prebivalcev. Največja stopnja obolenosti je bila ugotovljena na Danskem in v Španiji (1,8 in 1,1 primer na 100.000 prebivalcev (EFSA, 2011) (Tabela 2).

Tabela 2: Število obolelih za listeriozo v Evropskih državah v letih 2005 do 2009 (EFSA, 2011).

Država	Primeri	2009		2008	2007	2006	2005
		Potrjeni primeri	Potrjeni primeri/ 100.000	Potrjeni primeri			
Avstrija	46	46	0,55	31	20	10	9
Belgija	58	58	0,54	64	57	67	62
Bolgarija	5	5	0,07	5	11	6	-
Ciper	0	0	0,00	0	0	1	-
Češka Republika	32	32	0,31	37	51	78	15
Danska	97	97	1,76	51	58	56	46
Estonija	3	3	0,22	8	3	1	2
Finska	34	34	0,64	40	40	45	36
Francija	328	328	0,51	276	319	290	221
Nemčija	388	388	0,47	306	356	508	512
Grčija	4	4	<0,1	1	10	7	8
Madžarska	16	16	0,16	19	9	14	10
Irska	10	10	0,22	13	21	7	11
Italija	88	88	0,15	75	65	51	51
Latvija	1	1	<0,1	5	5	2	6
Litva	5	5	0,15	7	4	4	2
Luksemburg	3	3	0,61	1	3	4	0
Malta	0	0	0,00	0	0	0	0
Nizozemska	44	44	0,27	44	68	64	96
Poljska	32	32	0,08	33	43	28	22
Portugalska	-	-	-	-	-	-	-
Romunija	6	6	<0,1	-	0	-	-
Slovaška	10	10	0,18	8	9	12	5
Slovenija	6	6	0,30	3	4	7	3
Španija	121	121	1,06	88	81	78	68
Švedska	73	73	0,79	60	56	42	35
Velika Britanija	235	235	0,38	206	261	208	223
EU skupno	1.645	1.645	0,36	1.381	1.554	1.590	1.443
Islandija	-	0	-	0	4	0	0
Lihtenštajn	-	-	-	0	0	0	-
Norveška	31	31	0,65	34	49	27	14
Švica	41	41	0,53	44	59	76	71

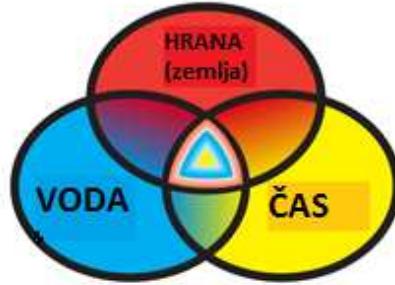
Legenda: Primer = izolacija bakterije vrste *L. monocytogenes* pri obolenih osebah za lisetriozo

2.4 Bakterije vrste *Listeria monocytogenes* v prehrambeni industriji

2.4.1 Pomembne lastnosti bakterij vrste *L. monocytogenes* za preživetje v živilih

Zaradi široke pojavnosti v okolju se lahko listerije prenesejo tudi v predelovalne obrate za živila in tam perzistirajo (Anonymus 1987; Røvik in sod., 2003; Senczek in sod., 2000). V ta okolja lahko listerije vstopijo preko živali in surovin (mleka, mesa) ali preko kontaminirane opreme, obleke, obutve in zraka (Tompkin, 2002; Gill, 2005). Ko so listerije prisotne na opremi ali na različnih površinah (hladilnih sistemih, stenah, odtokih, delovnih površinah), se lahko iz teh z neposrednim stikom, preko vodnih kapljic, aerosolov, prahu ali rok delavcev prenesejo na živilo.

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so bile ugotovljene v številnih živilskih obratih, vključno z mlekarnami, klavnicami in predelovalnimi obrati. V predelovalnih obratih so bile bakterije vrste *L. monocytogenes* pogosteje odkrite na površinah, ki ne pridejo v stik z izdelki, kot na površinah, ki v času proizvodnje zaradi proizvodnih postopkov pridejo v stik z mesom in izdelki (Pritchard in sod., 1995). Posebej obremenjene površine so tla, stene, vozički, vrata, transportni trakovi, odtoki in obutev, bakterije vrste *L. monocytogenes* so odkrili celo v razkuževalnih barierah (Pritchard in sod., 1995, Miettinen in sod. 2001). Pri površinah, ki pridejo v stik z živilom, so najpogosteje omenjeni: proizvodna oprema, orodje, rokavice in predpasniki. Proizvodna oprema je raznolika, od prešalnikov, polnilk, hladilnih komor, zamrzovalnih komor, strojev za mletje mesa, rezanje, sekanje, mehčanje, vbrizgovalnikov slanice in strojev za pakiranje (Pitchard in sod., 1995; Buttner, 2001; Lundén in sod., 2002, Chasseignaux in sod., 2002). Zelo pomembna je tudi oblika predelovalne površine, saj bakterije vrste *L. monocytogenes* na gladkih nerjavečih površinah redkeje ugotovimo kot pa na hrupavih ali pa poškodovanih površinah (Chasseignaux in sod., 2002). Nekateri deli opreme imajo težko dostopna mesta (polže, napeljave, cevi, ventilatorje, itd.), ki jih je zelo težko čistiti in razkuževati. Ravno ta mesta (žarišča) pa lahko nudijo ugodne pogoje za razmnoževanje bakterij vrste *L. monocytogenes* in ostalih bakterij. Intenzivnost razmnoževanja je odvisna od številnih dejavnikov okolja, med katerimi so najpomembnejši vлага, prisotnost organskih snovi in ustrezna temperatura (Kornacki, 2006) (Slika 3).

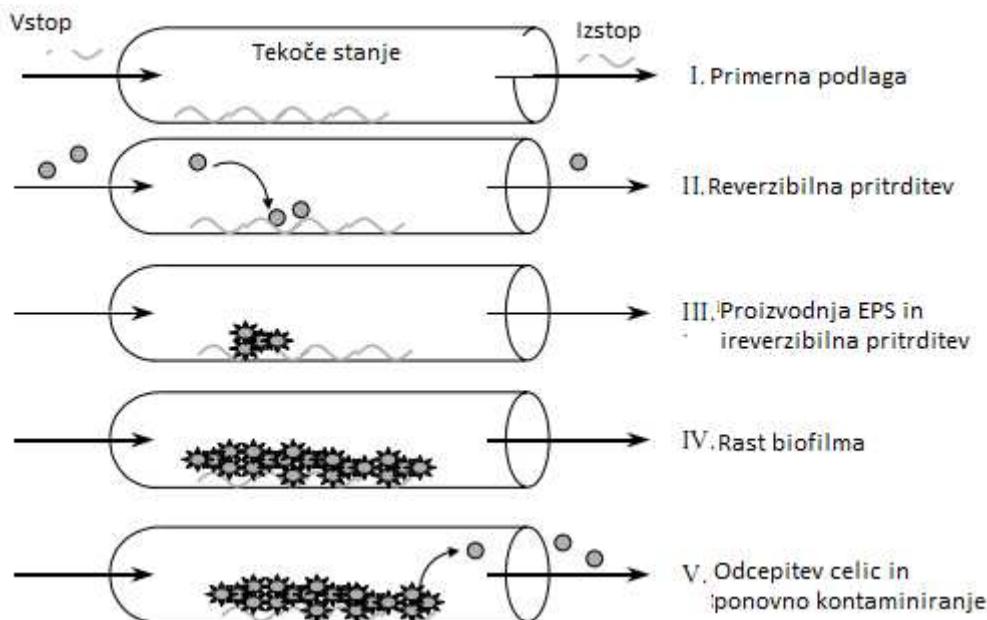


Slika 3: Pogoji za rast mikrobov v žarišču v nesterilnem okolju (Kornacki, 2006).

Možnost okužbe izdelkov z mikroorganizmi v prehrambeni industriji je odvisna tudi od števila žarišč in njihove mikrobne populacije, bližine žarišč proizvodnemu procesu in uspešnosti uničenja žarišč (Tompkin, 2002).

Živila se s patogenimi mikroorganizmi lahko kontaminirajo tudi iz okolja po že končani predelavi. Aerosol je eden izmed najnevarnejših načinov prenosa mikroorganizmov po zraku. Aerosol v okolju, kjer se pripravljam živila, nastane kot posledica delovnih postopkov in sistemov ventilacije (Zhang in sod., 2007).

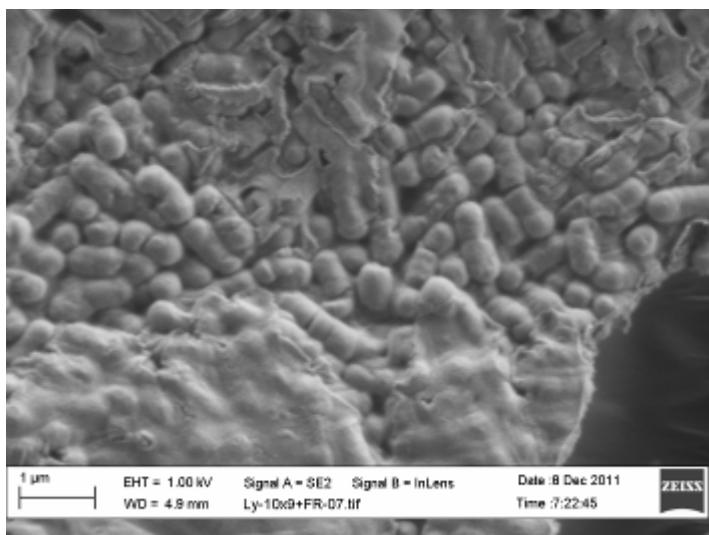
Velik problem na površinah v predelovalni industriji predstavljajo biofilmi (Berdholt in sod. 1999; Bower, 1996; Sinde in Carballo, 2000; Djordjevic in sod., 2002; Oliveira, 2010). Bakterije se lahko hitro naselijo na skoraj katerikoli material. Trdne površine spodbujajo bakterije, da izločajo eksopolisaharidne snovi, ki ščitijo bakterijske celice pred vplivi okolja. Predvsem spore bakterij iz rodu *Bacillus* se močno pritrdijo na površino in njihovo odstranjevanje predstavlja poseben problem. Razvoj in razmnoževanje celic na površini sčasoma privede do nastanka večplastnega biofilma, ki je svojevrsten ekosistem z mikroorganizmi, ujetimi v polisaharidni matriks. Mikroorganizmi v biofilmih so še posebej odporni zaradi spremenjene fiziologije po pritrditvi na podlago, po drugi strani pa tudi zaradi ekstracelularnih polisaharidov, ki ščitijo celico (Nikolaev, 2007). Med temi mikroorganizmi, ki so sposobni tvoriti biofilme, so tudi listerije.



Slika 4: Nastajanje biofilma v vodovodni cevi (Antekker, 2003).

Površina se najprej obda z minerali, ki pritečejo v cev. Na površino obdano z minerali se pritrdijo bakterije in začnejo proizvajati ekstracelularne polsaharide (EPS), kar povzroči irreverzibilno pritrditev. Biofilm se poveča in celice se ponovno odlepijo, kar povzroči ponovno kontaminacijo (Slika 4).

Sposobnost listerij, da tvorijo biofilme na predelovalnih površinah, povzroča proizvajalcem hrane velike težave, saj jih je z običajnimi metodami sanitacije in razkuževanja težje odstraniti oz. uničiti (Yay in sod., 2005, Kalmokoff in sod., 2001; Bremer in sod., 2001; Romanova, 2007). Djordevic in sod., (2002) ugotavljajo, da se ravno zaradi te sposobnosti lahko naselijo na opremo v predelovalnih obratih v predelavah in tam preživijo in se razmnožujejo tudi več let. Zaradi svoje sposobnosti preživetja in celo razmnoževanja pri nizkih temperaturah ter tvorbe biofilma lahko obstojne listerije preživijo na delovnih površinah in drugje v živilskih predelovalnih obratih od 7 do 12 let ter predstavljajo rezervoar za nadaljnjo kontaminacijo (Kathariou, 2002). Tompkin in sod., (1999) ugotavljajo, da pride do okužbe industrijsko proizvedene hrane z bakterijami vrste *L. monocytogenes* in z ostalimi listerijami naknadno po topotni obdelavi izdelkov iz okolja.



Slika 5: Biofilm s celicami listerij na površinah materiala (SEM – scanning electron microscopy, foto Polona Umek, IJS).

Za ugotavljanje izvora in prenosa bakterij v prehrambeni industriji so potrebne natančne mikrobiološke analize kontaminacije živil in okolja. To pa zahteva stalno izobraževanje in usposabljanje zaposlenih, redne kontrole prostorov, opreme in samega dela, ter pogosta mikrobiološka vzorčenja na različnih mestih proizvodnje, vključujuč sveža živila, proizvode, proizvodno opremo, okolje, zrak in delavce. Vzorčenje proizvodov v različnih fazah proizvodnje in sočasno vzorčenje površin in opreme daje dobre rezultate za ugotavljanje bakterijske kontaminacije v prehrambeni industriji (Björkroth in Korkeala, 1997).

Želja proizvajalcev živil je proizvesti varno hrano s čim daljšim rokom trajanja ter uporabnosti in sprejemljivosti za uporabnike. Da bi dosegli te cilje, se proizvajalci poslužujejo številnih postopkov, s katerimi želijo uničiti, zmanjšati ali preprečiti kontaminacijo hrane z neželenimi mikrobi. V tehnologiji izdelave, predelave, priprave in pakiranja, živilska industrija vključuje postopke ohlajevanja, zamrzovanja, segregacije, sušenja, radiacije, proizvodnjo pod visokim pritiskom, pakiranja in fermentacije. Poslužuje se tudi dodajanja nekaterih kemičnih snovi - konzervansov, kot so natrijev nitrit, natrijev klorid, sorbinska, propionska in mlečna kislina v različnih kombinacijah in koncentracijah ter dodajanja straterskih kultur za fermentiranje različnih izdelkov. Ti dodatki ustvarjajo v živilih manj ugodne pogoje za razmnoževanje ali preživetje listerij in drugih mikrobov. Najbolj

pogost postopek konzerviranja živil je toplotna obdelava, vendar ta vpliva na kvaliteto živila in znižuje količino razpoložljivih hrani v živilu.

Alternativne metode, kot so radiacija in obdelava živila z visokim pritiskom, lahko porušijo ravnotežje med varnostjo živila in njegovo kvaliteto (Ryser in Marth, 2007).

Na preživetje in rast mikrobov vpliva mnogo notranjih in zunanjih dejavnikov, ki so lahko kemijske in fizikalne narave. Notranji dejavniki v hrani so: kislota (kemijska vrednost, pH), vlaga (vodna aktivnost, a_w), oksidacijsko-reduksijski potencial ter dodane snovi (sol, nitritna sol, začimbe in druge snovi). Zaradi njune pomembnosti je pH in vlago potrebno spremljati posebno pozorno. Najpomembnejša zunanja dejavnika sta temperatura in plini (Montville in Karl, 2008).

2.4.2 Bakterije vrste *Listeria monocytogenes* v posameznih skupinah živil

Razširjenost listerij v naravi in njihova sposobnost razmnoževanja pri nizkih temperaturah je verjetno vzrok, da so pogosto prisotne v živilih tako rastlinskega kot živalskega izvora ter v že obdelanih živilih, ki so se naknadno kontaminirala.

Bakterije iz rodu *Listeria* se lahko pojavljajo v mleku, pasteriziranem mleku in mlečnih izdelkih (Fleming, 1985). Bakterije vrste *L. monocytogenes* so bile bila najpogosteje ugotovljene v sirih, predvsem mehkih sirih, ki zorijo na površini, saj relativno visoke vrednosti pH, ki so posledica zorenja, omogočajo hitro razmnoževanje te bakterije (Larson in sod., 1999; Farber in Peterkin, 1991; Di Maio, 2000; Ryser in Marth, 2007). Poleg sirov so lahko z bakterijami vrste *L. monocytogenes* kontaminirani tudi drugi mlečni izdelki, kot so smetana, sladoled, maslo, pijače in jogurti (Farber in Peterkin, 1991).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* lahko najdemo v vseh vrstah mesa, predvsem na površini. Tudi ko jih najdemo v teksturi, tja verjetno zaide med postopki klanja in predelave (Johnson in sod., 1988). Shelef (1989) je ugotovil, da se bakterije vrste *L. monocytogenes* ne morejo razmnoževati na površini mesa, če je ta skladiščen pri temperaturah od +4 do +25°C. Dickson (1990) je ugotovil, da se bakterije vrste *L. monocytogenes* lahko razmnožujejo na mesu, rast pa je odvisna od temperature, pH mesa ter vrste tkiva. Glass in Doyle (1989) sta preučevala

rast bakterij vrste *L. monocytogenes* na mesnih proizvodih in ugotovila, da dobro rastejo pri $\text{pH} \geq 6,0$, slabo ali pa pri $\text{pH} \leq 5,0$ sploh ne rastejo. Stopnja kontaminacije rdečečega mesa je nižja kot pa sirov, kontaminacija piščančjega mesa pa je pogosteša (Farber in Peterkin, 1991). Kontaminacija z bakterijami vrste *L. monocytogenes* pri rdečem in perutninskem mesu ter gotovih jedeh je različna in znaša od 0 do 24 % (Nørrung in sod, 1999). Ojeniyi in sod., (1996) so ugotovili, da se piščanče meso večinoma kontaminira iz okolja med procesom predelave ter omogoča boljše pogoje za rast listerij kot npr. rdeče meso ali različni mesni izdelki.

Grau in Vanderlinde (1990) ugotavlja, da bakterije vrste *L. monocytogenes* dobro rastejo na vakumsko pakiranem mesu pri temperaturah 5 - 10°C. Krämer in Baumgart (1992) trdita, da bakterije vrste *L. monocytogenes* pri vakumsko pakiranih klobasah, skladiščenih 3 tedne na temperaturi 7°C in 80 % CO_2 še vedno raste. Poleg tega ugotavlja tudi, da tritedensko skladiščenje izdelka na +4°C v prisotnosti 80 % CO_2 inhibira rast listerij, vendar pa taka koncentracija CO_2 povzroča organoleptične spremembe na izdelkih.

V fermentiranih izdelkih, ki jim je dodana starterska kultura, število bakterij vrste *L. monocytogenes* upade. Na preživetje v tovrstnih izdelkih vplivajo pH, aw, prisotnost NaCl, nitritne soli ter prisotnost nekaterih mikroorganizmov (Farber in Peterkin, 1991; McCormick in sod., 2005).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so bile pogosto izolirane iz jeter, srca in vranice perutnine, obolele za listeriozo (Gray 1958), iz jajc pa še niso bile izolirane (Busani in sod., 2005). Jajce ali jajčni izdelki do sedaj še niso bili povezani s pojavom listeriozie pri ljudeh.

Ribe in drugi morski sadeži so potencialni vir listerij v človeški prehrani. Autio in sod., (1999), Rørvik in sod., (2000); Vogel in sod. (2001) so v svojih raziskavah pri svežih ribah ugotovili nizko kontaminacijo z bakterijami vrste *L. monocytogenes* ter zaključili, da so primarni izvor okužbe oprema, orodje in proizvodno okolje. Poseben problem predstavljajo listerije v prekajenih ribjih proizvodih, saj se ti uživajo brez nadaljnje toplotne obdelave. Pri procesih hladnega dimljenja ribjih proizvodov se ne dosega zadostna temperatura, da bi inaktivirala listerije, ki so lahko prisotne v ribah (Eklund, 1995; Guyer, 1991).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so bile ugotovljene na sveži zelenjavi (solati, paradižniku, redkvicah) in svežem sadju (Li in sod., 2002). Willcox in sod.(1994) so v svojih študijah ugotovili, da s pakiranjem zelenjave v kontrolirani atmosferi lahko podaljšamo obstojnost zelenjave, s tem pa omogočimo listerijam, da se v tem času razvijajo, saj tovrstna atmosfera njihovega razmnoževanja ne zadrži. Nekateri avtorji trdijo, da je možnost okužbe sadja manjša, saj raste v glavnem nad zemljo in so zato manjše možnosti okužbe z listerijami iz zemlje ali fecesa. Glede na možnost okužbe ob konzumaciji uvrščajo sadje na lestvici rizičnosti rahlo višje kot zelenjavo (Anonymus, 2003).

2.5 Kontaminacija zraka z mikroorganizmi v klavnicah in predelavah za rdeče meso

Že dolgo časa je znano, da je lahko zrak vir mikrobiološkega onesnaženja različnih obratov za predelavo hrane, na primer v mlekarnah (Kang in Frank, 1989; Ren in Frank, 1992), v predelovalnih obratih za perutninsko meso (Lutgring in sod., 1997; Whyte in sod., 2001), v obratih za predelavo svinjskega mesa (Knudtson in Hartman, 1993) in obratih za predelavo govejega mesa (Rahkio in Korkeala, 1997; Sofos in sod., 1999a; Sutton, 2004). Kot prenašalec patogenov ima zrak pomembno vlogo pri proizvodnji hrane (Kang in Frank, 1989). Za določitev vira takšnih kontaminacij je zelo pomembno, da pridobimo natančne podatke o številu in vrsti bakterij v zraku predelovalnih obratov in na osnovi teh ugotovitev podamo oceno o kvaliteti zraka. Izraz kvaliteta zraka ima lahko različen pomen, odvisno od konteksta, v katerem je bil uporabljen. Za proizvajalce hrane je kvaliteta zraka pogosto sinonim za zrak, ki ne vsebuje mikrobov, ki lahko preidejo pri proizvodnji v kontakt s hrano (Hampson in Kaiser, 1995).

V zraku klavnic krožijo različni mikroorganizmi:

1. Bakterijske celice na trdih delcih prahu, kože, las, obleke, pomešane z zrakom, ki se izločajo v okolje pri fizičnih aktivnostih med klanjem in izkoževanjem.
2. Mikroorganizmi na kapljicah aerosola, nastalih zaradi brizganja s curki vode med zakolom, predelavo ali čiščenjem.

3. Posamezni mikroorganizmi ali majhne mikro-kolonije, ki so ostale po razpadu suspenzij ali izhlapevanu (Worfel in sod., 1996).

Take in podobne ugotovitve so privedle do spoznanja, da je potrebno sprejeti ukrepe za omejitev gibanja zraka v klavnicih (Worfel in sod., 1996). Predlagani način nadzora vključuje uporabo strukturnih ovir, kot so zidovi (Worfel in sod., 1996), prostorsko ločevanje dejavnosti (Rahkio in Korkeala, 1997), filtriranje zraka ter zagotovitev smeri pretoka zraka od čistega (končni izdelek) k nečistemu delu (zakol) (Lutgiring in sod., 1997).

Prendergast in sod.(2004) so v svojem eksperimentu v dveh klavnicah ugotovili v zraku čistega dela manj mikroorganizmov kot v zraku nečistega dela.

Pearce in sod., (2005) so na več lokacijah v klavniči za rdeče meso ugotavljali pojavnost in distribucijo aerobnih mezofilnih mikroorganizmov. Vzorce zraka so vzorčili z volumetrično in sedimentacijsko metodo. Na istih lokacijah so z obema metodama vzorčenja v vzorcih ugotovili tudi bakterije iz rodu *Salmonella* in *E.coli*. Na začetku procesa klanja je bilo število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov na vseh lokacijah vzorčenja podobno, po dveh urah klanja pa je bilo število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov v nečistem delu klavnice signifikantno višje ($P<0.05$) kot pa tistih v nečistem delu klavnice. Avtor ugotavlja, da pozitivna korelacija ($P<0.05$ – $P<0.001$) med vzorci zraka odvzetimi z volumetrično in sedimentacijsko metodo nakazuje na dejstvo, da je zrak važen vir kontaminacije trupov na klavni liniji.

V zraku predelovalnih obratov za rdeče meso doslej niso ugotovili listerij (Florjanc, 1996; Sutton 2004; Byrne in sod., 2008; Dobeic in sod., 2005). Kljub tem ugotovitvam so v nekaterih raziskavah izključili druge vire kontaminacije trupov govedi z listerijami (McEvoy, 1999). Listerije so v naravi pogost mikrob (Ivanek in sod., 2006) in so sposobne preživeti pri nizkih temperaturah (Tienungoon in sod., 2000), zato se lahko naselijo v hladilnih sistemih v različnih obratih. Preko aerosolov ki se izločajo ob delovanju hladilnih sistemov, klim in pri rednih postopkih čiščenja lahko bakterije preidejo v zrak ter naselijo različne površine, vključno s surovim mesom in mesnimi izdelki (Burfoot in sod., 2003). Poročajo tudi o kontaminaciji hrenovk in kuhanega prekajenega mesa. Izdelki so se naknadno kontaminirali

zaradi poprejšne demontaže hladilnih naprav, ki so bile verjetno kontaminirane z listerijami. Nastal je bioaerosol, ki je rekontaminiral površine, tako tudi izdelke. Byrne in sod. (2008) v študiji o kakovosti zraka v predelovalnem obratu za svinjsko meso niso ugotovili listerij, navajajo pa preživetje bakterij iz rodu *E. coli* in *Salmonella* v zraku in dopuščajo možnost kontaminacije mesa s temi bakterijami. Zang in sod. (2007) so izvedli laboratorijski poskus v posebni eksperimentalni komori in ugotovili, da so se listerije v zraku vezale v glavnem na zračne delce velikosti 1 - 2 µm, ti pa so se v roku 3 ur usedli na površine. Dokazali so tudi, da imajo bakterije vrste *L. innocua* v zraku enake ali podobne lastnosti kot bakterije vrste *L. monocytogenes*. McEvoy in sod. (1999), Zang in sod. (2007) so v pilotnem poskusu ugotovili, da listerije preživijo v aerosolu 2,5 ure 1 do 2,5 m od izvora kontaminacije. Mothershaw in Raisi, (2008) sta ugotovila, največ bakterij v zraku na mestih z veliko zračne vlage v času proizvodnega procesa.

2.6 Bioaerosoli v zraku kot nosilci delcev in mikroorganizmov

Zrak lahko vsebuje in prenaša trdne in žive snovi ter tekočine. V zraku lahko najdemo biološke agense, kot so celice rastlin, cvetni prah, alge, protozoje, bakterije, kvasovke, spore plesni, viruse in toxine (Parrett in Crilly, 2000; Maier in sod., 2009). Obstajajo številni vzroki, na osnovi katerih lahko biološka snov preide v zrak, predvsem veter, dež, proizvodni postopki, izločki živali in ljudi. Ponavadi so mikroorganizmi vezani na prašne ali vodne delce, prosto pa so v zraku prisotne bakterijske endospore in spore gliv (Douwnes in sod., 2003; Górný, 2004; Brown, 2003).

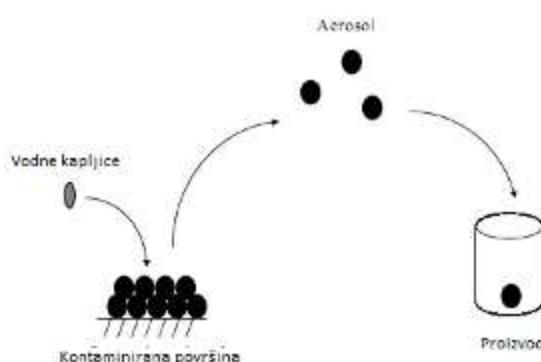
Zrak v prostorih praviloma vsebuje mikroorganizme, katerih raznolikost in koncentracija sta odvisna od mnogih parametrov, kot so: vrsta in vzdrževanje prostora, vrsta dela, ki se opravlja v prostoru, način prezračevanja prostora, relativna vlaga in temperatura v prostoru, prisotnost virov kontaminacije ter letni časi (Griffiths in DeCesmo, 1994; Green in sod., 2006).

Pri proizvodnji hrane pride pogosto do nastanka finega prahu in delcev, ki se sproščajo v okolje in so eden izmed najpomembnejših vzrokov za tvorbo večjih koncentracij bioaerosolov v obratih (Zorman in Jeršek, 2008).

Bioaerosol je definiran kot aerosol, ki vsebuje vidne in nevidne delce biološkega izvora (bakterije, virusi, spore gliv, zrnca cvetnega prahu in njihove stranske proizvode, endotoksine in mikotoksine) (Buttner in sod., 2001; Douwes in sod., 2003). Velikost delcev v bioaerosolu je zelo različna, povprečen premer je od 0,5 µm do 100 µm (Cox in Wathes, 1995; Hardy, 2006). Delci velikosti 1-5 µm v splošnem lebdijo v zraku, medtem ko se večji delci usedajo na površine. Koncentracija mikroorganizmov v zraku z oddaljenostjo od izvora pada (Green in sod., 2006).

Na preživetje mikroorganizmov v aerosolu vpliva več dejavnikov. Najpomembnejša sta temperatura in relativna vlaga. Preživetje mikroorganizmov je slabše v razmerah z nizko relativno vlogo in narašča z naraščanjem temperature (Theunissen in sod., 1993; Marthi in sod., 1990). Cox in Wathes (1995) ugotavlja, da delujeta temperatura in vlaga v aerosolih na proteine in fosfolipidne membrane mikroorganizmov in tako vplivata na njihovo preživetje. Spurlock in Zottola (1991) sta v svojih raziskavah ugotovila, da so bakterije vrste *L. monocytogenes* preživele v aerosolu 210 minut.

Bioaerosoli preidejo v okolje iz točke izvora, iz katere se širijo v obliki stožca. Točke izvora se razlikujejo med seboj glede na čas izločanja bioaerosolov (Maier, 2009). Bioaerosoli se lahko izločajo enkratno (npr. kihanje) ali stalno (npr. iz žarišča). Tukaj je potrebno poudariti, da so lahko bakterije v obratih prisotne na tleh, opremi ali odtokih. Ob sanitaciji obratov s tlačnimi čistilci zaradi razprševanja vode in pritiska pride do tvorbe aerosolov. Na tak način lahko bakterije preidejo iz površin v zrak oz. okolje. Zaradi sedimentacije po določenem času pride do usedanja teh bakterij na površine proizvodov, ki so izpostavljeni zraku v proizvodnih obratih (Antekker, 2003) (Slika 6).



Slika 6: Rekontaminacija površine preko aerosolov (Antekker, 2003).

Raina in sod. (2009) so definirali transport bioaerosolov kot razmerje med časom in razdaljo. Med najpomembnejše okoljske parametre, ki vplivajo na gibanje bioaerosolov, spadajo zračni tokovi, relativna vlaga in temperatura (Green in sod., 2003; Górný, 2004; Stezenbach in sod., 2004; Raina in sod., 2009). Ko se biaerosoli sprostijo iz izvora v okolje, lahko prepotujejo krajše ali daljše razdalje, preden se usedejo na površine. Poleg tega pa so za transport in usedanje bioaerosolov zelo pomembne še njihove fizikalne lastnosti (velikost, oblika in gostota). Usedanje bioaerosolov na površine je odvisno od več dejavnikov, med najpomembnejšimi sta gravitacija in površinski vpliv (Raina in sod., 2009).

Merjenje in ocene bioaerosolov v različnih prostorih so pomembni za določitev obsega in vsebine prisotnega biološkega materiala v zraku in za spremljanje ter nadzor učinkovitosti ukrepov, ki naj bi vodili do boljše kakovosti zraka (Witschger in sod., 2004; Cundith in sod., 2002; Grinshpun sod., 2007).

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 Načrt, izvedba raziskave in opis eksperimentalnega dela

Načrt raziskave je bil ugotoviti prisotnost bakterij rodu *Listeria* v zraku, torej v realnih pogojih testnih klavnic in mesno predelovalnih obratov za rdeče meso s poudarkom na patogenih bakterijah vrste *L. monocytogenes*. Zanimalo nas je, ali obstaja medsebojna povezava med listerijami in drugimi vrstami mikroorganizmov v zraku testiranih obratov, zato smo v zraku determinirali tudi skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov. Prav tako so nas zanimali vplivi okoljskih razmer, kot so temperatura, vlaga in pretok (gibanje) zraka na prisotnost listerij in aerobnih mezofilnih mikroorganizmov v zraku. Z odvzemom brisov s trupov govedi smo ugotavljali, kakšna je kontaminacija trupov z bakterijami vrste *L. monocytogens* v klavnicih za rdeče meso in ali obstaja povezava med kontaminacijo trupov in površin obratov z aerogeno kontaminacijo zraka.

Raziskava je bila izvedena v realnih pogojih klavnic in predelovalnih obratov, pri čemer so bili uporabljeni materiali in metode dela, ki so ustrezali usmeritvi naših raziskav. Večinoma so bili uporabljeni uveljavljeni in standardni postopki dela in oprema, nekatere metode pa smo prilagodili našim potrebam dela. Glede na pogoje, v katerih je bila raziskava izvedena, smo izkoristili vse možne danosti, da bi pridobili rezultate, s katerimi bi se približali realnim pokazateljem stanja kontaminiranosti zraka v živilski industriji. Pri izboru klavničnih objektov in obratih za predelavo rdečega mesa smo upoštevali izenačenost tehnoloških rešitev in postopkov dela, pri čemer smo izbirali mesta meritev na način, ki nam je omogočal primerjavo rezultatov.

Raziskava je potekala v zimskem in poletnem času v obdobju dveh koledarskih let. Vzorčenje smo izvajali tedensko v zaporedju kot si sledijo testni objekti (K1-K3, P1-P3) v Tabeli 3 pred pričetkom proizvodnje in med proizvodnjo. Vzorčenju je vsakokrat sledila laboratorijska diagnostika.

Z ozirom na postavljeno hipotezo, da se v zraku in na površinah nahajajo aerogene listerije, ki iz zraka sedimentirajo na površino opreme in trupov klavnih polovic, smo za mesta odvzema vzorcev izbrali kritična mesta, za katera je značilna verjetnost za nastanek aerosolov. V klavnicah so to bili: hlevi, mesta za omamitev in izkravitev, izkoževanje in evisceracija, transport prebavil, razsek in pranje klavnih polovic ter hladilnice, v predelovalnih obratih pa: hladilnice, prostori za predelavo mesnih izdelkov in pakirnice. Vzorčili smo na različnih višinah in oddaljenostih od virov nastajanja aerosola.

Za ugotavljanje prisotnosti oz. števila mikroorganizmov v zraku smo uporabili dve metodi:

- **Aktivni odvzem** vzorcev zraka, s katerim smo določali koncentracijo oz. število kolonij aerogenih listerij in aerobnih mezofilnih mikroorganizmov v enoti zraka. Metoda temelji na aktivnem prečrpavanju zraka preko gojišča za listerije oziroma na gojišče za aerobne mezofilne mikroorganizme. Vzorčenje s tehniko aktivnega črpanja zraka (MAS 100) v klavnicah K1 – K3 je bilo izvedeno tako, da smo napravo za črpanje zraka postavili na prirejeno stojalo na različne višine 0,5 m, 1,0 m do 2,0 m od tal. Stojalo z vzorevalnikom smo locirali 1 do 2 m od linije za klanje (delavcev in trupov na liniji klanja) oziroma v sredini hladilnic za goveje meso 0,4 m od tal. Na enaki razdalji (0,4 m) od tal smo aktivno črpali zrak z napravo MAS 100 tudi v sredini hladilnic in prostorov za predelavo predelovanih obratov P1 – P3.
- **Pasivno usedanje** oz. sedimentacija mezofilnih mikroorganizmov na točno določeno površino v enoti časa. Metoda temelji na sedimentaciji mikroorganizmov iz zraka na površino gojišča v Petrijevi plošči. Vzorčenje zraka s sedimentacijsko metodo je potekalo na istih lokacijah kot aktivno črpanje zraka.

Znano je, da vlažnost in gibanje zraka pomembno vplivata na bioaerosole v zraku, zato smo na mestih odvzema zraka za bakteriološke preiskave spremljali temperaturo, relativno vlažnosti in gibanje zraka. Namen slednjih meritev je bil ugotoviti vplive mikroklimatskih dejavnikov na koncentracijo aerogenih listerij in aerobnih mezofilnih mikroorganizmov. Meritve mikroklimatskih parametrov so bile izvedene v času odvzema vzorcev med

proizvodnim procesom v klavnicih in predelovalnih obratih in sicer na višini 1,5 m od tal na lokacijah, ki jih prikazujemo v Tabeli 8.

Ker smo v hipotezah izhajali iz domneve, da se v zraku nahajajo arogene listerije, ki lahko kontaminirajo trupe klavnih živali, smo na teh, v času meritev zraka, odvzeli brise, vedno na isti lokaciji posamezne klavnice in istih reprezentativnih mestih trupa. Brisi trupov klavnih govedi so bili odvzeti na stegnu, rebrih in plečih med proizvodnim procesom na lokacijah in mestih, ki jih prikazujemo v Tabelah 4, 5, in 6.

V klavnicih in predelovalnih obratih smo na istih lokacijah, ki so bile izbrane za vzorčenje zraka in merjenje mikroklimatskih parametrov, odvzeli brise površin objektov in opreme, na katerih smo določali prisotnost listerij. S to preiskavo smo žeeli ugotoviti kontaminiranost površin z listerijami in posledično njihovim širjenjem z bioaerosoli v okolico-zrak. Izhajamo namreč iz domneve, da se zaradi različnih dejavnosti v obratih, listerije s površin dvigujejo v zrak, v njem krožijo (v aerosolu ali na delcih prahu) in padajo nazaj na površine. Brisi s površin objektov in opreme so bili v klavnicih odvzeti pred pričetkom delovnega procesa, v predelovalnih obratih pa med delovnim procesom, na lokacijah in mestih, ki jih prikazujemo v Tabelah 4, 5, 6, 7.

V času raziskave smo opravili 18 merilnih dni v klavnicih in predelovalnih obratih. Za ugotavljanje listerij z aktivnim odvzemom je bilo odvzetih 158 vzorcev, za kar smo skupno prečrpali 237.000 l zraka. Za določanje aerobnih mezofilnih mikroorganizmov z aktivnim odvzemom je bilo odvzetih 141 vzorcev, za kar smo skupno prečrpali 148.500 l zraka. V postopkih sedimentacije zraka za določanje aerogenih mezofilnih mikroorganizmov je bilo odvzetih 43 vzorcev. Odvzeli smo 163 vzorcev brisov za določitev listerij na trupih. Odvzeli smo 202 vzorcev brisov za določitev listerij na površinah objektov in opreme v klavnicih in predelovalnih obratov. Opravili smo 66 meritev temperature, 66 meritev relativne vlažnosti in 66 meritev gibanja zraka v klavnicih in predelovalnih obratih.

3.2 Material

3.2.1 Testni objekti

Raziskava je potekala v treh velikih komercialnih klavnicih za rdeče meso (K1, K2, K3) in treh manjših predelovalnih obratih mesa (P1, P2, P3). Klavnice so sestavljača temeljna funkcionalna področja, kot so garderobe za delavce, sanitarije, hlev, klavna linija, hladilnice, razsekovalnica, vamparna in črevarna, prostor za spravilo živalskih stranskih proizvodov in odprema. Predelovalne obrate so sestavljača naslednja funkcionalna področja: garderobe za delavce, sanitarije, razkladalna rampa, hladilnice, prostor za predelavo, razsekovalnice, zamrzovalnice, termična obdelava, sušilnice, pakirnice in odprema ter prostor za spravilo živalskih stranskih proizvodov. V sklopu dveh predelovalnih obratov so bile tudi mesnice. Klavnice in obrati so bili opremljeni in uporabljeni v skladu s standardi EU za zakol govedi in prašičev ter predelavo mesa. Kapacitete klavnic in obratov so prikazane v Tabeli 3.

Tabela 3: Kapaciteta klanja v klavnicih K1, K2, K3 in kapaciteta predelave v predelavah P1, P2, P3.

Testni objekt	Dejavnost	Proizvodna kapaciteta/leto
K1	Zakol	9.500 govedi in 7.500 prašičev
K2	Zakol	20.000 govedi in 30.000 prašičev
K3	Zakol	12.000 govedi in 90.000 prašičev
Proizvodna kapaciteta/mesec		
P1	Predelava	120 ton surovega mesa in 44 ton mesnih proizvodov
P2	Predelava	38 ton surovega mesa in 10 ton mesnih proizvodov
P3	Predelava	20 ton surovega mesa in 4,4 ton mesnih proizvodov

Klavnica 1

Klavnica 1 (K1) je klavnični objekt manjših kapacitet zakola, ki pa se ga ob večjih potrebah po zakolu živali »na uslugo« izkoristi tudi preko zmogljivosti. To ne pomeni, da klavna linija oziroma hladilne kapacitete ne ustrezajo številu zaklanih živali, temveč je objekt grajen v neskladju s potrebami po prostoru. Pri tem posebej izstopa premajhen, predvsem preozek prostor, v katerem se nahaja klavna linija, saj v času klanja delavcem onemogoča prehodnost in gibanje, vpliva na mikroklimatske razmere, med katerimi prednjačita neustrezno prezračevanje in previsoka zračna vlaga. Ločenost klavnih linij za prašiče in govedo je

neustrezna, prav tako je neustrezna razdalja med čistim in nečistim delom linije. Prostor in oprema ustvarjata številne mrtve kote, kjer je pretok zraka onemogočen. Vsi navedeni dejavniki pomembno vplivajo na osnovne pogoje higiene površin in s tem tudi zraka, tako da so ustvarjeni pogoji za potencialno nastajanje bioaerosolov.

Klavnica 2

Klavnica 2 (K2) je objekt visoke kapacitete zakola, katerega opremljenost in prostor ustreza dnevni proizvodnji. Delavci imajo med delom dovolj prostora za gibanje in manipulacijo, pri čemer je vzdrževanje higieniskih standardov ustrezeno, ustrezena je tudi mikroklima zraka. Kljub temu se kažejo pomanjkljivosti v izvedbi ventilacije. Nekateri ventilatorji nefiltrirani zrak v prostor dovajajo neposredno v prostor za zakol, kar povečuje možnost za aerogeno kontaminacijo iz zunanjega okolja. Ločenost klavnih linij za prašiče in govedo je ustrezena, razdalja med čistim in nečistim delom prav tako, vendar ločenost ni jasna. Neprimerena pa je konstrukcija žleba in dvigala za odpremo prebavil, ki je na določenih mestih dvignjena do višine klavne linije. Pri manipulaciji in transportu s prebavili prihaja do nastajanja velikih količin bioaerosola. Viri slednjega so prebavila, ki z višine padajo na tekoči trak in zaradi permanentnega avtomatskega čiščenja z vodnim curkom nakladalne posode za manipulacijo prebavil.

Klavnica 3

Klavnica 3 (K3) je bila med objekti prostorsko in tehnološko urejena kot klavnica K2. Iz navedenih razlogov klavnica ni pomenila večjih tveganj za nastajanje bioaerosolov. Kot dejavnik tveganja za mikrobiološko kontaminacijo je potrebno omeniti neustreznost postavitve vhoda za delavce iz garderob, ki se nahaja nasproti mesta za žaganje trupov. To pomeni stalen pretok ljudi oz. križanje poti, kar povečuje možnosti za kontaminacijo zraka.

Predelovalni obrat 1

Predelovalni obrat 1 (P1) je v tehnološki zasnovi primerno konstruiran, vendar bistveno preobremenjen s količino surovin in mesnih proizvodov. V prostoru za predelavo različnih

surovin se delovni postopki odvijajo neprekinjeno, zato se sprotno čiščenje s curki vode, zaradi katerih nastaja bioaerosol, odvija med delom, s čimer se izrazito poveča tveganje rekontaminacije mesnih izdelkov. Hladilnice in zamrzovalnice so prenatrpane z mesom, zato je občasno onemogočeno redno čiščenje in razkuževanje površin in opreme. Potencialna onesnaženost površin v hladilnicah in zamrzovalnicah pomeni precejšnjo verjetnost kontaminacije klimatskih oz. zamrzovalnih naprav, ki so pomemben vir kontaminacije zraka, še posebej psihrofilnih mikroorganizmov.

Predelovalni obrat 2

Predelovalni obrat 2 (P2) je tehnološko primeren in ustreza kapaciteti predelave. Objekt formalno ne prikazuje pomanjkljivosti kot tudi ne večjih možnosti za nastajanje bioaerosolov.

Predelovalni obrat 3

Predelovalni obrat 3 (P3) tehnološko ni ustrezeno zasnovan. Prostori za predelavo in skladiščenje so glede na kapaciteto proizvodnje premajhni. Križajo se čiste in nečiste poti. V prostoru za predelavo zaradi majhnosti prostora in neustreznega prezračevalnega sistema v času proizvodnih postopkov nastajajo bioaerosoli, ki so potencialno nevarni za rekontaminacijo izdelkov. Hladilnica je prenatrpana z zamrznjenimi izdelki, zato se postavlja dvom v ustrezeno redno izvajanje sanitacije. Iz tega razloga se pojavlja podobno tveganje kontaminacije zraka iz klimatskih naprav, kot je bilo že omenjeno pri opisu predelovalnega obrata 1 (P1).

3.2.1.1 Mesta odvzema vzorcev v klavnicih (K1, K2, K3) in predelavah (P1, P2, P3)

Raziskavo smo izvedli v prostorih klavnic in predelovalnih obratov, kjer so se odvijali najintenzivnejši procesi proizvodnje ter na trupih govedi in sicer:

Klavnice K1 – K3

- a. klavniški hlev za goveda
- b. klavna linija
- c. hladilnica

d. trupi govedi na klavni liniji

Predelovalni obrati P1 – P3

- a. prostor za predelavo
- b. pakirnica
- c. hladilnica

Za meritve smo v testnih objektih izbrali reprezentativna mesta, ki so pokrila najpomembnejše dele proizvodnje. Zaradi izenačenosti tehnoloških proizvodnih procesov v klavnicih in obratih za predelavo smo lahko izbirali medsebojno primerljive lokacije in mesta meritev v vseh testnih objektih, čeprav zaradi različne organiziranosti klavnic ni bilo mogoče izvajati vzorčenja na povsem identičnih mestih.

V klavniči K1 smo meritve mikroklima in vzorčenje zraka ter površin izvedli na različnih mestih na 11 lokacijah označenih z K1LV1 – K1LV11 (Tabela 4, 8). V klavniči K2 so bile meritve mikroklima in vzorčenje zraka ter površin izvedene na 8 različnih mestih označenih z K2LV12 – K2LV19 (Tabela 5, 8) in v klavniči K3 na 7 lokacijah označenih z K3LV20 – K3LV26 (Tabela 6, 8).

V predelovalnem obratu P1 smo meritve mikroklima izvedli na različnih mestih na 4 lokacijah označenih z P1LV27 – P1LV30 (Tabela 8). V predelovalnem obratu P2 so bile meritve izvedene na 2 različnih mestih označenih z P1LV31 – P1LV32 in v predelovalnem obratu P3 na 3 lokacijah označenih z P1LV33 – P1LV35 (Tabeli 8).

Legenda za Tabele 4, 5, 6,7

Primer: **K3LV23 = (K3)(LV)(23)**

(K3) = klavnica 3

(P1) = predelovalni obrat 1

(LV) = lokacija vzorca

(23) = številka lokacije vzorčenja

(1) = številka lokacije vzorčenja

Primer: **P1LV1 = (P1)(LV)(1)**

SŠM (KE/m^3) = skupno število kolonijskih enot aerogenih mezofilnih mikroorganizmov v 1 m^3 zraka

SŠM ($KE/ploščo$) = skupno število kolonijskih enot aerogenih mezofilnih mikroorganizmov na površini Petrijeve plošče ($56,72 \text{ cm}^2$)

1000 l: vzorec 1000 litrov zraka

1500 l: vzorec 1500 litrov zraka

3000 l: vzorec 3000 litrov zraka

* = lokacija meritve mikroklime

(+/-) = prisotnost/odsotnost bakterij rodu *Listeria* v enoti zraka.

Tabela 4: Lokacije in vrste vzorčenja/meritev ter število odvzetih vzorcev v klavnici K1.

Objekt K1						
Lokacija vzorčenja/meritve	Oznaka	Mesta meritve na lokaciji	Vrsta preiskave	Vrsta vzorčenja/ meritve	Število vzorčenj (n)	
zraven mesta za omamljanje in izkoževanje govedi	K1LV1*	med mestom za omamljanje in mestom za izkoževanje	<i>Listeria spp. (+/-)</i>	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	12	
			SŠM (KE/m ³)	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	12	
			SŠM (KE/ploščo)	Sedimentacija	3	
tla pod mestom za omamljanje	K1LV2	tla pred stopnicami, ki vodijo do mesta za omamljanje, tla pod strojem za izkoževanje	<i>Listeria spp. (+/-)</i>	Bris	10	
zraven mesta za pregled na BSE	K1LV3*	zraven bazena za garanje prašičev in za mestom za odvzem BSE vzorcev	<i>Listeria spp. (+/-)</i>	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	18	
			SŠM (KE/m ³)	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	18	
			SŠM (KE/ploščo)	Sedimentacija	5	
zraven mesta za evisceracijo govedi	K1LV4*	zraven mesta za evisceracijo govedi in pred vhodom v razsekovalnico	<i>Listeria spp. (+/-)</i>	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	12	
			SŠM (KE/m ³)	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	12	
			SŠM (KE/ploščo)	Sedimentacija	3	
stena zraven mesta za pranje in obdelavo trupov	K1LV5	stana zraven vhoda v razsekovalnico, stojalo za pranje glav, mreža podesta za veterinarje	<i>Listeria spp.</i>	Odvzem brisa	11	
pred vrti hladilnice za zadržano robo	K1LV6*	pred vhodom v hladilnico za zadržano robo/ stena zraven vhoda v razsekovalnico, stojalo za pranje glav, mreža podesta za veterinarje	<i>Listeria spp. (+/-)</i>	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	3	
tla zraven mesta za odstranjevanje notranjih organov in krvi	K1LV7	mreža podesta za evisceracijo, mreža podesta za pranje trupov	<i>Listeria spp.</i>	Bris	3	
za mestom za žaganje trupov	K1LV8*	za mestom za žaganje trupov govedi, pranjem, tehtanjem in označevanjem trupov	<i>Listeria spp. (+/-)</i>	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	15	
			SŠM (KE/m ³)	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	15	
			SŠM (KE/ploščo)	Sedimentacija	4	
v sredini hladilnic za goveje meso	K1LV9*	tla v hladilnici/ tla v hladilnici, stena, klimatska naprava, traverze zgoraj	<i>Listeria spp. (+/-)</i>	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	3	
			<i>Listeria spp.</i>	Bris	20	
hlev	K1LV10	stena v hlevu, cev boksa št. 8, . tla pri boksu št.7, tla na prehodu pri boksu za goveda št. 10	<i>Listeria spp.</i>	Bris	12	
trupi	K1LV11	površina trupov govedi: stegno, rebra, pleče	<i>Listeria spp.</i>	Bris	79	

Tabela 5: Lokacije in vrste vzorčenja/meritev, ter število odvzetih vzorcev v klavnici K2.

Objekt K2					
Lokacija vzorčenja/meritve	Oznaka	Mesta meritve na lokaciji	Vrsta preiskave	Vrsta vzorčenja/meritve	Število vzorčenj (n)
zraven mesta za evisceracijo govedi	K2LV12*	zraven mesta za evisceracijo govedi in pred vhodom v razsekovalnico	<i>Listeria spp. (+/-)</i>	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	27
			SŠM (KE/m ³)	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	27
			SŠM (KE/ploščo)	Sedimentacija	10
tla pod mestom za omamljanje	K2LV13	tla pod strojem za izkoževanje in podestom za veterinarske inšpektorje, stena in steber zraven mesta za omamljanje, stojalo za pranje glav, mesto za pranje trupov	<i>Listeria spp.</i>	Bris	20
stena pod mestom za omamljanje	K2LV14	stena pod mesta za omamljanje govedi, stena zraven vhoda v prostor za veterinarje	<i>Listeria spp.</i>	Bris	3
zraven mesta za transport notranjih organov	K2LV15*	mreža podesta za evisceracijo, mreža podesta za pranje trupov	<i>Listeria spp. (+/-)</i>	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	18
			SŠM (KE/m ³)	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	18
			SŠM (KE/ploščo)	Sedimentacija	5
za mestom za žaganje trupov	K2LV16*	za mestom za žaganje trupov govedi, pranjem, tehtanjem in označevanjem trupov	<i>Listeria spp. (+/-)</i>	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	15
			SŠM (KE/m ³)	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	15
			SŠM (KE/ploščo)	Sedimentacija	5
v sredini hladilnic za goveje meso	K2LV17*	tla v hladilnici/ tla v hladilnici, stena, klimatska naprava, traverze zgoraj	<i>Listeria spp. (+/-)</i>	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	4
			<i>Listeria spp.</i>	Bris	28
hlev	K2LV18	tla v boksu 1, stena levo v boksu 1, tla v boksu 2, prečna ograja v boksu 1	<i>Listeria spp.</i>	Bris	12
trupi	K2LV19	površina trupov govedi: stegno, rebra, pleče	<i>Listeria spp.</i>	Bris	60

Tabela 6: Lokacije in vrste vzorčenja/meritev, ter število odvzetih vzorcev v klavnici K3.

Objekt K3					
Lokacija vzorčenja/meritve	Oznaka	Mesta meritve na lokaciji	Vrsta preiskave	Vrsta vzorčenja/meritve	Število vzorčenj (n)
zraven mesta za omamljanje in izkoževanje govedi	K3LV20*	nasproti mesta za omamljanje	<i>Listeria spp. (+/-)</i>	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	12
			SŠM (KE/m ³)	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	12
			SŠM (KE/ploščo)	Sedimentacija	4
za mestom za žaganje trupov	K3LV21*	za podestom za žaganje trupov	<i>Listeria spp. (+/-)</i>	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	6
			SŠM (KE/m ³)	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	6
			SŠM (KE/ploščo)	Sedimentacija	2
nasproti mesta za obrezovanje trupov	K3LV22*	nasproti mesta za obrezovanje trupov govedi	<i>Listeria spp. (+/-)</i>	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	6
			SŠM (KE/m ³)	Aktivno vzorčenje zraka, 1500 l	6
			SŠM (KE/ploščo)	Sedimentacija	2
tla pod mestom za omamljanje	K3LV23	tla pod napravo za izkoževanje, tla zraven tira za odstranjevanje vampov, tla pod podestom za žaganje trupov, mreža podesta za obrezovanje trupov, mreža podesta za končni pregled trupov, mreža podesta za veterinarski pregled trupov	<i>Listeria spp.</i>	Bris	6
tla zraven mesta za odstranjevanje notranjih organov in krvi	K3LV24	tla zraven kanala za notranje organe, pod mestom za označevanje trupov, pod stojalom za glave, podest na mestu za odstranjevanje vampov, tla zraven kanala za odstranjevanje krvi	<i>Listeria spp.</i>	Bris	5
hlev	K3LV25	tla v boksu 1, stena levo v boksu 1, tla v boksu 2, prečna ograja v boksu 1	<i>Listeria spp.</i>	Bris	5
trupi	K3LV26	površina trupov govedi: stegno, rebra, pleče,	<i>Listeria spp.</i>	Bris	24

Tabela 7: Lokacije in vrste vzorčenja/meritev, ter število odvzetih vzorcev v predelavah (P1, P2, P3).

Objekt P1				
Lokacija vzorčenja/meritve	Oznaka	Vrsta preiskave	Vrsta vzorčenja/ meritve	Število vzorčenj (n)
tla na sredini hladilnice	P1LV27*	<i>Listeria spp.</i> (+/-)	Aktivno vzorčenje zraka, 3000 l	2
tla na sredini prostora za predelavo	P1LV28*	<i>Listeria spp.</i> (+/-)	Aktivno vzorčenje zraka, 3000 l	3
tla, stena, traverza v hladilnici	P1LV29	<i>Listeria spp.</i>	Bris	15
stena, tla, traverza, kuter, voziček,	P1LV30	<i>Listeria spp.</i>	Bris	12

Objekt P2				
Lokacija vzorčenja/meritve	Oznaka	Vrsta preiskave	Vrsta vzorčenja/ meritve	Število vzorčenj (n)
tla v sredini pakirnice	P2LV31*	<i>Listeria spp.</i> (+/-)	Aktivno vzorčenje zraka, 3000 l	1
tla, deska za pripravo izdelkov, stroj za pakiranje	P2LV32	<i>Listeria spp.</i>	Bris	6

Objekt P3				
Lokacija vzorčenja/meritve	Oznaka	Vrsta preiskave	Vrsta vzorčenja/ meritve	Število vzorčenj (n)
tla na sredini hladilnice	P3LV33*	<i>Listeria spp.</i> (+/-)	Aktivno vzorčenje zraka, 3000 l	1
tla, stena v kotu v hladilnici	P3LV34	<i>Listeria spp.</i>	Bris	5
tla, odtok v prostoru za predelavo mesa	P3LV35*	<i>Listeria spp.</i>	Bris	5

3.2.2 Materiali za mikrobiološke preiskave

3.2.2.1 Mikrobiološka gojišča

Gojišče za ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov

Gojišče TGYA

Za vzorčenje aerogenih mezofilnih mikroorganizmov iz zraka s postopkom sedimentacije smo uporabili klasične polietilenske (PE) Petrijeve plošče, površine 56,72 cm², prekrite z obogatitvenim gojiščem TGYA (Tryptic glucose yeast agar, Biolife Italija). Gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca tako, da smo stehtali 16,45 g liofiliziranega komercialno pripravljenega gojišča in dodali 700 ml destilirane vode. Gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 121°C in ga po predhodnem ohlajanju razlili v Petrijeve posodice. Na gojišče sedimentirane bakterije se po inkubaciji prešteje kot skupno število kolonijskih enot (KE).

Gojišča za preiskavo na bakterije iz rodu *Listeria*

Vsa gojišča za izolacijo in identifikacijo bakterij iz rodu *Listeria* so bila pripravljena v skladu s postopki, ki so opisani v Standardnem operativnem postopku SOP-147, Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani (Zdovc, 2007).

Gojišče Fraser 1

Za vzorčenje zraka na klavnici, oziroma prvo stopnjo preiskave na prisotnost bakterij iz rodu *Listeria*, smo uporabili komercialno pripravljeno mešanico za gojišče Fraser (Oxoid, ltd, Basingstoke, Hampshire, Velika Britanija) z dodatkom polovične koncentracije antibiotika (Fraser selective supplement, 1 st.).

Gojišče Fraser 2

Za drugo stopnjo preiskave na prisotnost bakterij iz rodu *Listeria* smo uporabili komercialno pripravljeno mešanico za gojišče Fraser (Oxoid, ltd, Basingstoke, Hampshire, Velika Britanija) z dodatkom polne koncentracije antibiotika (Fraser selective supplement, 2 st.).

Za izolacijo bakterij iz rodu *Listeria* smo uporabili dve selektivni trdni gojišči, ki sta navedeni spodaj.

Gojišče Aloa

Komercialno pripravljeno mešanico za gojišče Aloa (Aloa agar, Biolife, Italija) smo pripravili dodatkom selektivnih snovi (Aloa selective supplement) po navodilih proizvajalca.

Gojišče Palcam

Komercialno pripravljeno mešanico za gojišče Palcam (Palcam agar, Oxoid) smo pripravili dodatkom selektivnih snovi (Palcam supplement) po navodilih proizvajalca.

Krvni agar

Za presajanje sumljivih kolonij, pripravo čiste kulture in dokaz hemolitične aktivnosti smo uporabili krvni agar. Pripravili smo ga z uporabo komercialno pripravljene mešanice gojišča (Blood agar base No. 2, Oxoid) po navodilih proizvajalca in po ohlajanju (približno 48°C) dodali 5% defibrinirane ovčje krvi.

Gojišče CAMP

Za dokaz CAMP efekta smo uporabili gojišče iz komercialno pripravljene mešanice (Blood agar base No. 2, Oxoid), pripravljene po navodilu proizvajalca, ki smo mu dodali železov amonijev citrat (0,1 g/100 ml) in eskulin (0,1 g/100 ml). Po ohlajanju (približno 48°C) smo dodali 5 % defibrinirane ovčje krvi.

3.3 Merilna tehnika in oprema za meritve

3.3.1 Naprava za vzorčenje zraka za mikrobiološke preiskave

V raziskavi smo za aktivno vzorčenje zraka uporabili napravo za bakteriološke analize zraka (MAS 100 Microbial Air Monitoring Systems®, Merck) (Slika 7). Eno stopenjski vzorčevalnik MAS 100 deluje po principu Andersenovega vzorčevalnika zraka (Anderson, 1958; Merck, 2001). Vzorčevalnik izpolnjuje zahteve splošnih uredbenih aktov za medicinsko opremo v EU in EN ISO 14698-1/2 (Kelly, 2005).



Slika 7: Naprava za bakteriološko analizo zraka (MAS 100 Microbial Air Monitoring Systems®) (foto Š. Pintarič).

3.3.2 Merilna oprema za merjenje temperature, relativne vlage in gibanja zraka

Merjenje temperature, relativne vlage in gibanja zraka je bilo izvedeno z uporabo 3-funkcijske sonde za simultano merjenje temperature, vlage in gibanja zraka (Testo® 350-M/XL testo 454 Control Unit) (GasTech Australia, 2009). Sonda je sestavljena iz termično občutljivih rezistorjev in senzorjev za vlažnost zraka, ki oddajajo ustrezne električne impulze skladno s temperaturo, gibanjem zraka in koncentracijo vlage v zraku (merilno območje -20 do +70 °C, 0 do +100 %RH, 0 do +10 m/s).

3.3.3 Bris

Brise smo odvzeli s standardiziranimi vatiranimi palčkami (Deltalab, Španija), ki smo jih po odvzemu vstavili v epruvete s 3 ml sterilne fiziološke raztopine. Odvzem brisov smo opravili z uporabo PVC šablone s površino 20 cm².

3.3.4 Oprema za transport vzorcev

Vzorce smo prevažali v laboratorij v prenosnih hladilnih skrinjah ohlajenih na 4 – 6⁰C. Temperatura hladilnih skrinj je bila med prevozom vzdrževana s hladilnimi telesi.

3.3.5 Kalibracija

Vse naprave za merjenje so bile redno kalibrirane.

3.4 Metode vzorčenja in meritve

3.4.1 Vzorčenja zraka

Pri obeh metodah vzorčenja se je vzorec ob odvzemu že neposredno nanesel na ustrezeno gojišče, kar je pomenilo začetno fazo mikrobiološke preiskave.

3.4.1.1 Impakcijska metoda

Osnovni princip impakcijske metode bakteriološkega vzorčenja zraka je usmerjanje zraka neposredno na gojišče v Petrijevi plošči premera 9 cm (površina 56,72 cm²). Črpalka (MAS 100 Microbial Air Monitoring Systems®) kot eno stopenjski vzorčevalnik zraka usmerja konstantni pretok zraka s kapaciteto 100 l/min direktno na petrijevo ploščo v skladu z EN ISO 14698-1/2. Hitrost črpanja zraka znaša 0,45 m/s v laminarnem pretoku, pri čemer hitrost zraka neposredno na gojišče ne presega 20 m/s. Pred vsakim vzorčenjem smo črpalko zraka najprej sterilizirali (121°C/15 min.), nato pa pred in po vsakem vzorčenju dezinficirali s 70 % etilnim alkoholom. Vzorce smo odvzeli 1 uro pred in v času trajanja proizvodnega procesa.

Zrak za ugotavljanje bakterij rodu *Listeria* smo vzorčili pred pričetkom delovnega procesa (1500 l) in med delovnim procesom (1500 l), za ugotavljanje aerogenih mezofilnih mikroorganizmov pa (1500 l) pred pričetkom delovnega procesa in (1000 l) med delovnim procesom.

V primeru vzorčenja zraka za ugotavljanje bakterij iz rodu *Listeria* smo metodo ustrezno modificirali. Vzorčevalnik lahko usmerja zrak neposredno na Petrijevo ploščo s trdnim gojiščem (Slika 8) ali pa v posodo s tekočim gojiščem. Zaradi močne kontaminacije preiskovanih vzorcev smo v prvi fazi preiskave na listerije potrebovali tekoče selektivno obogatitveno gojišče (Fraser 1). Gojišče se je ob močnem dotoku zraka zelo penilo in onemogočalo delo, zato smo metodo priredili tako, da smo uporabili manjšo količino tekočega gojišča, s katerim smo natopili filter (Univerzalni filter za nape debeline od 2-3 mm in zračno propustnostjo 3600 l/m²/s – (Etis d.o.o., Slovenija)). Filter za nape smo razrezali v obliki krogov, premera 9 cm, jih sterilizirali v avtoklavu pri 121°C 15 minut, po sterilizaciji smo ga vložili v Petrijeve plošče. Filter smo pred vzorčenjem navlažili z 2 ml obogatitvenega gojišča Fraser s polovično koncentracijo antibiotika. Filter je v primeru vzorčenja na listerije pomenil gobasto (vlaknasto) in za vzorčeni zrak porozno strukturo, na katerem se je nahajalo tekoče gojišče. Vanjo so se lahko ujele sicer zelo redke aerogene listerije, ki smo jih prečrpali skupaj z vzorci zraka (Slika 9).



Slika 8: Vzorčevalnik zraka z gojiščem za štetje skupnega števila mikroorganizmov
(foto Š. Pintarič).



Slika 9: Vzorčevalnik zraka s tkočim gojiščem za preiskavo na bakterije iz rodu *Listeria*
(foto Š. Pintarič)

Zaradi vzorčenja zraka neposredno v obogatitveno gojišče kvantitativna preiskava ni bila mogoča in smo lahko ugotavljali le prisotnost oz. odsotnost listerij v enoti zraka.

V primeru vzorčenja aerogenih mezofilnih mikroorganizmov smo kot gojišče uporabili TGYA, ki se jih po inkubaciji prešteje kot skupno število kolonijskih enot (KE) in (po preračunu) izrazi na volumsko enoto m^3 kot SŠM/ m^3 . Preračun temelji na naslednji formuli (Merck, 2001):

$$\text{VSŠM} = N \left(\frac{1}{N} + \frac{1}{N-1} + \frac{1}{N-2} + \frac{1}{N-r} + 1 \right)$$

VSŠM = Verjetno Skupno Število Mikroorganizmov

N = skupno število por (odprtin) na pokrovu vzorčevalnika, skozi katerega črpamo zrak (400)
r = število por, preko katerih so delci že pasirali (ker gre za enostopenjski vzorčevalnik, je to število enako N)

3.4.1.2 Sedimentacijska metoda

Mikrobiološko obremenjenost zraka z aerogenimi mezofilnimi mikroorganizmi smo izvedli tudi z metodo sedimentacije, ki izkorišča gravitacijske in inercijske fizikalne procese gibanja delcev v zraku. Sedimentacijska metoda je odvisna od gravitacijske sile in zračnih tokov v okolju kot tudi od teže, oblike in velikosti delcev, zaradi česar večji delci sedimentirajo,

medtem ko se nekateri manjši delci ne vsedajo (Reck in sod., 2002; Kornacki 2006; Svenum in sod., 1992; Salustiano in sod., 2003) .

Kljub temu da sedimentacijska metoda vzorčenja daje po poročilih le kvalitativne in ne tudi kvantitativnih rezultatov (Morris in sod., 2000), smo to metodo uporabili predvsem z namenom simulacije oziroma informacije o sedimentaciji mikroorganizmov na površine, ki iz zraka lahko kontaminirajo površine objektov in opreme. Čeprav ima metoda pomanjkljivosti, je v realnih pogojih identična naravnemu usedanju mikroorganizmov in zato obvezen del preverjanja možne kontaminacije površin z aerogenimi mikroorganizmi.

Metodo smo uporabili v klavnicih (ne pa tudi v predelavah). Vzorce smo odvzeli tako, da smo zraku horizontalno izpostavili odprte Petrijeve plošče površine $56,72 \text{ cm}^2$, prekrite z gojiščem. Čas izpostavljenosti petrijevih plošč z gojišči je bil 60 minut.

3.4.2 Vzorčenje površin in trupov klavnih polovic z brisom

Vzorec brisa na smo odvzeli v okviru šablone na površini 20 cm^2 z vatenko prepojeno s fiziološko raztopino. Med sočasnim vrtenjem vatenke na paličici smo enakomerno obrisali površino v vzdolžni in prečni smeri. Vatenko smo vstavili nazaj v fiziološko raztopino NaCl (0,9 %) v epruveti, ki smo jo v hladilni skrinji dostavili v laboratorij.

3.4.3 Ravnanje, označevanje in prevoz vzorcev v laboratorij

Vse vzorce smo v laboratorij prepeljali ohlajene na $4 - 6^\circ\text{C}$ najkasneje v 12 urah po odvzemu. Vzorce na Petrijevih ploščah smo ustrezno zatesnili, označili, vnesli v protokol in naložili v hladilne skrinje na način, da ni prihajalo do razlivanja ali medsebojne kontaminacije. V drugih hladilnih skrinjah smo prevažali epruvete z vatenkami, ki smo jih zatesnili, označili, vnesli v protokol in namestili v stojala, da ni moglo priti do razlitja ali mešanja vzorcev. Vzorce smo razporedili po skupinah, tako da smo jih dali v plastične vrečke, ki so bile ločene med seboj.

3.4.4 Meritve mikroklima v klavnicih in predelavah

V klavnicah in predelavah smo izvajali meritve mikroklima (temperatura zraka, relativna vlažnost in hitrost gibanja zraka) z napravo Testo® 350-M/XL 454 Control Unit. Merjenje na vsakem izmed merilnih mest je potekalo dovolj časa, da so se rezistorji in senzorji prilagodili ustreznim razmeram v zraku in prikazali ustrezne in pravilne vrednosti merjenih parametrov. Meritve so bile izvedene skladno z navodili v priročniku za uporabo (manuals/Testo-350). (GasTech Australia, 2009).

V klavnicah (K1, K2, K3) smo opravili 56 meritve mikroklima na 13 lokacijah, v klavnici (K1) 27 meritve na šestih lokacijah, v klavnici (K2) 22 meritve na štirih lokacijah in v klavnici (K3) 7 meritve na treh lokacijah (Tabela 8).

V predelavah (P1, P2, P3) smo opravili 7 meritve mikroklima na petih lokacijah, v predelavi (P1) 4 meritve na dveh lokacijah, v predelavi (P2) 1 meritev na eni lokaciji in v predelavi (P3) 2 meritvi na dveh lokacijah (Tabela 8).

Vse meritve so bile izvedene v času odvzema vzorcev zraka in odvzema brisov, da so prikazale realno stanje fizikalnih parametrov zraka. Še posebej pozorno smo spremljali ob merjenju hitrosti tudi smer gibanja zraka, saj je to pomembno vplivalo na gibanje in sedimentacijo mikroorganizmov v zraku. Zelo pozorno smo spremljali tudi relativno vlažnost in temperaturo zraka, ki sta pomemben dejavnik preživetja aerogenih listerij v zraku (Doyle in sod, 2001).

Tabela 8: Lokacije in število meritev mikroklima v klavnicih (K1, K2, K3) in predelavah (P1, P2, P3)

Objekt	Lokacija vzorčenja/meritev	Meritve mikroklima – število vzorčenj (n)		
		Temperatura (°C)	Relativna vlažnost (%)	Gibanje zraka (m/s)
K1	K1LV8	5	5	5
	K1LV3	5	5	5
	K1LV4	4	4	4
	K1LV1	4	4	4
	K1LV6	4	4	4
	K1LV9	5	5	5
K2	K2LV12	10	10	10
	K2LV16	5	5	5
	K2LV15	5	5	5
	K2LV17	2	2	2
K3	K3LV20	3	3	3
	K3LV21	2	2	2
	K3LV22	2	2	2
P1	P1LV27	2	2	2
	P1LV28	2	2	2
P2	P2LV31	1	1	1
P3	P3LV33	1	1	1
	P3LV35	1	1	1

3.5 Mikrobiološke preiskave vzorcev

3.5.1 Določanje bakterij iz rodu *Listeria*

Laboratorijski del preiskav na listeriji je bil izveden v skladu s Standardnim operativnim postopkom SOP 147 (Preiskava na bakterije vrste *Listeria monocytogenes* Izolacija-1. del in Identifikacija-2. del) (Zdovc, 2007).

Za preiskavo brisov površin smo uporabili Fraserjevo primarno obogatitveno in selektivno gojišče s polovično koncentracijo selektivnega dodatka, in sicer smo 1 del vzorca obogatili v 9 delih gojišča. Vzorce zraka na filter papirju smo ob sprejemu v laboratorij potopili v dodatno količino tekočega gojišča HF tako, da je skupni volumen znašal 10 ml. V nadaljevanju smo obe vrsti vzorcev preiskovali po enakem protokolu za izolacijo listerij. Gojišča HF smo inkubirali pri 30°C 24 ur +/- 3 ure.

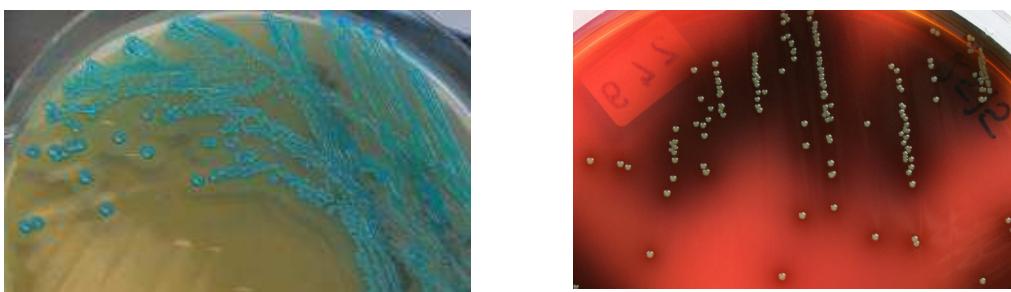
Po primarni obogatitvi smo prenesli 0,1 ml suspenzije v epruveto z 10 ml sekundarnega obogatitvenega gojišča s polno koncentracijo selektivnih snovi (Fraser). Suspenzijo smo inkubirali 48 ur pri 37°C.

Izolacija:

- Iz primarne obogatitve smo po 24 urah prenesli po 1 zanko kulture na selektivna trdna gojišča (gojišči ALOA in PALCAM) in razsadili po površini gojišča. Poleg tega smo prenesli 0,1 ml kulture v epruveto z 10 ml sekundarnega obogatitvenega gojišča (F2).
- Po 24 in 48 urah inkubacije kulture F2 smo prenesli obakrat iz tega gojišča po 1 zanko na selektivno gojišče ALOA in PLC in jih inkubirali pri 37°C.
- Kulture smo inkubirali 24 ur, po potrebi pa 48 ur in pregledali gojišča na morebitno rast bakterij iz rodu *Listeria*.

3.5.1.1 Tipične kolonije na trdnih selektivnih gojiščih

- Na gojišču ALOA so bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24 urah inkubacije majhne zelene kolonije, okoli katerih gojišče rahlo pomotni (halo efekt). Podobno rastejo tudi bakterije vrste *L. ivanovii*, ostale listerije pa imajo enake kolonije, vendar je okolica gojišča nespremenjena (Slika 10).
- Na gojišču PALCAM so bakterije iz rodu *Listeria* po 24 urah inkubacije majhne, sivo zelene ali olivne kolonije, okoli katerih se gojišče temneje barva. Po 48 urah so kolonije zelene, velike 1,5 do 2 mm v premeru, v sredini ugreznjene, okolno gojišče pa je obarvano črno (Slika 10).



Slika 10: Rast bakterij vrste *Listeria monocytogenes* na umetnih gojiščih, ALOA in PALCAM (foto M. Lepen).

3.5.1.2 Kontrola postopka izolacije

- Za kontrolo postopka izolacije bakterije vrste *L. monocytogenes* na obogatitvenih in selektivnih gojiščih smo pripravili pozitivno in negativno kontrolo. Za pozitivno kontrolo smo uporabili mleko, ki je vsebovalo znano število bakterij (10-100 celic referenčne delovne kulture, RDK 059 *L. monocytogenes* v 1 ml mleka). Kot negativno kontrolo smo uporabili sterilno mleko. Oba kontrolna vzorca smo inkubirali in precepljali naprej po enakem postopku kot preiskovane vzorce (SOP 147).

3.6 Identifikacija bakterij iz rodu *Listeria*

3.6.1 Potrditev bakterij iz rodu *Listeria*

Za potrditev smo precepili iz vsakega selektivnega gojišča po pet kolonij, značilnih za bakterije iz rodu *Listeria*. Kolonije smo predhodno cepili na krvni agar (KA) z razsaditvijo, da smo dobili po inkubaciji posamezne kolonije. Kulture smo inkubirali v termostatu 18-24 ur pri 35-37°C oziroma toliko časa (do 48 ur), da smo dobili zadovoljivo rast. Tipične kolonije so bile velike 1-2 mm v premeru, konveksne, brezbarvne in motne z gladkim robom.

Katalazni preizkus

Preiskovano kolonijo smo prenesli v kapljico 10% raztopine H₂O₂. V pozitivnem primeru so se pojavili mehurčki plina.

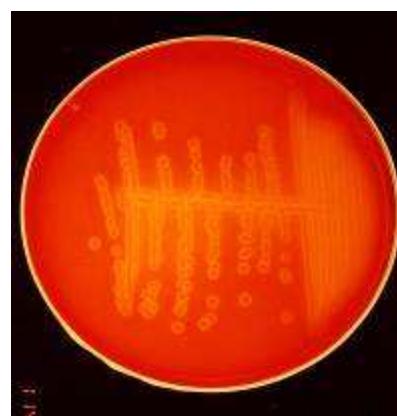
Barvanje po Gramu

Kolonije, sumljive na listerije, smo pregledali z mikroskopsko preiskavo po predhodnem barvanju po Gramu. Za barvanje smo uporabili komercialno pripravljen set barvil (Merck, Nemčja) po navodilih proizvajalca bakterij iz rodu *Listeria*. so grampozitivne kratke paličke, razporejene posamezno, v parih pod kotom ali postavljene vzporedno.

3.6.2 Potrditev bakterij vrste *L. monocytogenes*

Hemoliza

Če so bile morfološke lastnosti ter katalazni preizkus ustrezne za bakterije iz rodu *Listeria*, smo kulturo precepili na krvni agar z ovčjo krvjo za ugotovitev hemolitične aktivnosti (Slika 11). Posamezne kolonije smo razsadili na suho površino gojišča. Kolonije smo inkubirali 24 (+/-3) ur pri 37°C (+/-1). Bakterije vrste *L. monocytogenes* povzročajo jasno beta hemolizo, ki je včasih vidna le pod kolonijami, zato smo jih z bakteriološko zanko previdno odstranili in opazovali gojišče na mestu rasti bakterije vrste *L. innocua* ne povzroča hemolize. Slabo hemolizirjo tudi bakterije vrste *L. seeligeri*, bakterije vrste *L. ivanovii* pa tvorijo zelo močno široko beta hemolizo na krvnem agarju.



Slika 11: Kultura bakterij vrste *L. monocytogenes* na krvnem agarju.
(foto V. Jenčič)

Test CAMP

Na krvni CAMP agar smo cepili vzporedno precej narazen (vsaj 3 cm) v obliki ravnih črt bakterije vrste *S. aureus* (RDK 056 = ATCC 25923) in *R. equi* (RDK 064). Med njiju smo pravokotno v obliki črt z zanko nanesli preiskovani sev ter kontrolni sev *L. monocytogenes*. Od bakterije vrste *S. aureus* in bakterije vrste *R. equi* smo seve listerij nanesli do razdalje 1-2 mm oziroma toliko, da se niso dotikali.

Povečana cona beta hemolize na mestu med preiskovanim sevom in *S. aureus* oz. *R. equi* pomeni pozitivno reakcijo. Pozitivna reakcija z bakterijmi vrste *R. equi* je vidna kot široka hemoliza (5-10 mm) v obliki puščice. Če je bila cona hemolize ob *R. equi* šibka (približno 1 mm), smo ocenili reakcijo kot negativno. Pozitivna reakcija s bakterijami vrste *S. aureus* je vidna kot majhna cona povečane beta hemolize (približno 2 mm) znotraj cone nepopolne hemolize, ki jo povzročjo sam *S. aureus*.

Bakterije vrste *L. monocytogenes* tvorijo majhen CAMP fenomen (polkrožna hemoliza) s bakterijami vrste *S. aureus*, ne pa s bakterijami vrste *R. equi*, *L. ivanovii* pa daje CAMP fenomen le z bakterijami vrste *R. equi*, ne pa s bakterijami vrste *S. aureus*. Bakterije vrste *L. innocua*, *L. seeligeri* in *L. welshimeri* ne ustvarjajo CAMP fenomena z nobeno bakterijo.

3.7 Identifikacija s komercialnim setom API Listeria

Za končno potrditev vrste smo opravili biokemijsko preiskavo s komercialnim setom API Listeria (BioMerieux) po navodilu proizvajalca, ki je priloženo uporabljenemu setu (Slika 12).



Slika 12: Biokemijska determinacija listerij s komercialnim kompletom API Listeria, (foto M. Lepen).

3.8 Statistična analiza

Rezultate smo analizirali s programom SPSS (statistični paket za družbene vede) statističnega programa 17,0. Podatke smo analizirali z izračunavanjem mediane, modusov, variance in standardnega odklona, analizo variance z ANOVA in t-testom korelacije (po Pearsonu). Pri analizah smo se poslužili neparametričnih testov in sicer Fisherjevega eksaktnega testa (FET), ki ga uporabljamo za analiziranje kontingenčnih tabel (preverjanje domneve o neodvisnosti) v primeru malih vzorcev. Je tako imenovani eksaktni test, ker natančno izračuna signifikanco. FET je izračunljiv samo z računalnikom, saj je potrebno izračunati verjetnosti vseh razporeditev celičnih vrednosti, ki dajo isto robno porazdelitev frekvenc. Fisher je pokazal, da se verjetnost p porazdeljuje po hipergeometrijski distribuciji. Za merjenje povezanosti nominalnih spremenljivk smo kot mero povezanosti uporabili Hi-kvadrat statistiko, ki meri razliko med teoretičnimi (pričakovanimi) in dejanskimi frekvencami, upoštevajo prostostne stopnje (število celičnih frekvenc, ki lahko prosto variirajo). V primeru, ko je število pričakovanih enot manjše od 5 smo uporabili razmerje verjetij (Likelihood Ratio), ki je primernejši preizkus za manjše vzorce. Uporabili smo tudi Lilliefors in Cochran - ov test za evaluacijo enotnosti rezultatov. Povprečja smo primerjali z Duncan – novim testom (5 %).

4 REZULTATI

4.1 Prisotnost bakterij iz rodu *Listeria* v zraku testnih objektov

4.1.1 Prisotnost bakterij iz rodu *Listeria* v zraku klavnici (K1, K2 in K3)

V klavnici (K1) smo v 63 vzorcih zraka na lokacijah K1LV1 - K1LV11 listerije določili v treh vzorcih ($n=3$) (4,76%), v vseh treh primerih smo identificirali bakterije vrste *L. seeligeri*. Vzorci so bili odvzeti na liniji klanja na višinah (0,5, 1,0 in 2,0 m) zraven mesta za evisceracijo govejih trupov (K1LV4) (Tabela 11, Graf 2).

V klavnici (K2) smo v 64 vzorcih zraka na lokacijah K2LV12 - K2LV19 listerije določili v treh vzorcih ($n=3$) (4,68 %), v vseh treh primerih smo identificirali bakterije vrste *L. innocua* in to v enem vzorcu zraven tekočega traka za notranje organe (K2LV15) na višinah (0,5 m in 2,0 m) in dveh vzorcih zraven mesta za žaganje trupov govedi (K2LV1) na višini 2,0 m (Tabela 11, Graf 2).

V klavnici (K3) smo v 24 vzorcih zraka na lokacijah K3LV20 - K3LV26 listerije določili v enem vzorcu ($n=1$) (4,16 %), v vzorcu smo identificirali bakterije vrste *L. innocua* zraven mesta za žaganje govejih trupov na višini 1,0 m (Tabela 11, Graf 2).

V vseh treh klavnicah smo v 151 vzorcih zraka določili bakterije iz rodu *Listeria* v sedmih vzorcih ($n=7$) (4,6 %). Na posameznih lokacijah pa je bilo število pozitivnih vzorcev zraka naslednje (Tabela 11, Graf 2):

- na liniji klanja zraven mesta za evisceracijo (K1LV4) smo v 39 vzorcih zraka listerije določili v treh vzorcih ($n=3$) (7,7 %) v vseh treh primerih smo identificirali bakterije vrste *L. seeligeri*,
- zraven tekočega traka za notranje organe (K2LV15) smo v 18 vzorcih zraka listerije določili v enem vzorcu ($n=1$) (5,5 %), v vzorcu smo identificirali bakterije vrste *L. innocua*,

- zraven mesta za žaganje trupov govedi (K2LV16, K3LV21) smo v 36 vzorcih zraka listerije določili v treh vzorcih (n=3) (8,3 %), vseh treh primerih smo identificirali bakterije vrste *L. innocua*.

Tabela 9: Prisotnost bakterij iz rodu *Listeria* v zraku klavnic K1, K2, K3.

	lokaciji zraven mesta za evisceracijo	lokacija zraven tekočega traka za notranje organe	lokacije zraven mesta za žaganje trupov govedi
Bakterije rodu <i>Listeria</i>	K1LV4 K2LV12	K2LV15	K1LV8 K2LV16 K3LV21
K 1 ($\Sigma n=63$)	n=12	n=0	n=15
<i>L. monocytogenes</i>	0	/	0
<i>L. innocua</i>	0	/	0
<i>L. seeligeri</i>	3	/	0
<i>L. welsheimeri</i>	0	/	0
K 2 ($\Sigma n=64$)	n=27	n=18	n=15
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	0
<i>L. innocua</i>	0	1	2
<i>L. seeligeri</i>	0	0	0
<i>L. welsheimeri</i>	0	0	0
K 3 ($\Sigma n=24$)	n=0	n=0	n=6
<i>L. monocytogenes</i>	/	/	0
<i>L. innocua</i>	/	/	1
<i>L. seeligeri</i>	/	/	0
<i>L. welsheimeri</i>	/	/	0
Skupaj ($\Sigma n=151$)	$\Sigma n=39$	$\Sigma n=18$	$\Sigma n=36$
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	0
<i>L. innocua</i>	0	1	3
<i>L. seeligeri</i>	3	0	0
<i>L. welsheimeri</i>	0	0	0
Izolatov 7 (4.6%)	3 (7.7%)	1 (5.5%)	3 (8.3%)

Legenda: Σn = skupno število vseh vzetih vzorcev, n = število odvzetih vzorcev na opisanih lokacijah

4.1.2 Prisotnost bakterij iz rodu *Listeria* v zraku predelovalnih obratov (P1, P2, P3)

V treh predelavah smo v 5 vzorcih zraka določili bakterije iz rodu *Listeria* v enem vzorcu (n=1) (14,3 %), v vzorcu smo identificirali bakterije vrste *L. innocua* (Tabela 13).

V predelavi P 1 smo v 5 vzorcih zraka listerije določili v enem vzorcu (n= 1) (20 %), v vzorcu smo identificirali bakterije vrste *L. innocua*, ki je bil odvzet v sredini prostora za predelavo (P1LV28) (Tabela 13).

V predelavah P 2 in P 3 v vzorcih zraka nismo identificirali bakterij iz rodu *Listeria* (Tabela 13).

4.2 Prisotnost bakterij iz rodu *Listeria* na površinah testnih objektov

*4.2.1 Prisotnost bakterij iz rodu *Listeria* na površinah trupov*

V klavnicih (K1 – K3) smo v 163 vzorcih listerije določili v enem vzorcu (n=1) (1,63 %), v vzorcu smo identificirali bakterije vrste *L. innocua* (Tabela 12).

V klavnici (K1) smo v 79 vzorcih listerije določili v enem vzorcu (n=1) (0,79 %), v vzorcu smo identificirali bakterije vrste *L. innocua* (Tabela 12).

V klavnici (K 2) v 60 vzorcih in v klavnici (K 3) v 24 vzorcih nismo določili bakterij iz rodu *Listeria*. (Tabela 12).

*4.2.2 Prisotnost bakterij iz rodu *Listeria* na površinah objektov in opreme v klavnicah (K1 – K3)*

V klavnici K1 smo v 12 vzorcih listerije določili na mestu nasproti evisceracije govedi (K1LV10) v treh vzorcih (n=3) (25 %), v vseh treh vzorcih smo identificirali bakterije vrste *L. monocytogenes*. V hladilnici za goveje trupe smo v 20 vzorcih listerije določili na lokaciji K1LV9 v sedmih vzorcih in sicer, v enem vzorcu (n=1) (5 %), smo identificirali bakterije vrste *L. innocua*, v dveh vzorcih (n=2) (10 %), bakterije vrste *L. seeligeri*, ter v šestih vzorcih (n=6) (30 %), bakterije vrste *L. monocytogenes* (Tabela 12).

V klavnici K2 smo v 12 vzorcih v hlevu za goveda listerije določili na lokaciji K2LV18, v enem vzorcu (n=1) (8,3 %), identificirali smo bakterije vrste *L. innocua*. V hladilnici za goveje meso pa smo v 28 vzorcih listerije določili na lokaciji K2LV17 v osmih vzorcih in sicer, v petih vzorcih (n=5) (17,8 %), smo identificirali bakterije vrste *L. innocua*, v treh vzorcih (n=3) (10,7 %), pa bakterije vrste *L. welshimeri* (Tabela 12).

V klavnici K3 v 16 odvzetih vzorcih (n=16) v vzorcih nismo določili bakterij iz rodu *Listeria* (Tabela 12).

Tabela 10: Prisotnost bakterij iz rodu *Listeria* na površinah in trupih v klavnicah (K1, K2, K3).

Površine	K1LV10	K1LV2	K1LV9	K1LV5	K1LV7	K1LV11 TRUPI
K1 ($\Sigma n=135$)	n=12	n=10	n=20	n=11	n=3	n=79
<i>L. monocytogenes</i>	3	0	6	0	0	1
<i>L. innocua</i>	0	0	1	0	0	0
<i>L. seeligeri</i>	0	0	2	0	0	0
<i>L. welshimeri</i>	0	0	0	0	0	0
Površine	K2LV18	K2LV14	K2LV13	K2LV17	K2LV16	K2LV19 TRUPI
K2 ($\Sigma n=123$)	n=12	n=3	n=14	n=28	n=6	n=60
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	0
<i>L. innocua</i>	1	0	0	5	0	0
<i>L. seeligeri</i>	0	0	0	0	0	0
<i>L. welshimeri</i>	0	0	0	3	0	0
Površine	K3LV25	K3LV23	K3LV24	K3LV26 TRUPI	/	/
K3 ($\Sigma n=40$)	n=5	n=6	n=5	n=24		
<i>Listeria spp.</i>	0	0	0	0	/	/

Legenda: (Σn = skupno število vseh vzetih vzorcev, n= število odvzetih vzorcev na opisanih lokacijah)

4.2.3 Prisotnost bakterij iz rodu *Listeria* na površinah objektov in opreme v predelovalnih obratih (P1 – P3)

V predelavi P1 smo v 15 vzorcih listerije določili v hladilnici za goveje trupe na lokaciji P1LV29 v 15 vzorcih in sicer, v sedmih vzorcih vzorcih (n=7) (46,6 %), smo identificirali bakterije vrste *L. innocua*, v sedmih vzorcih (n=7) (46,6 %), bakterije vrste *L. monocytogenes*, v enem vzorcu (n=1) (6,6 %), pa smo identificirali bakterije vrste *L. welshimeri*. V prostoru za predelavo smo v 12 vzorcih listerije določili v sredini prostora za predelavo mesa (P1LV30) v 9 vzorcih in sicer, v sedmih vzorcih (n=7) (58,3 %), smo identificirali bakterije vrste *L. innocua*, v dveh vzorcih (n=2) (16,6 %), pa bakterije vrste *L. monocytogenes* (Tabela 13).

V predelavi P2 smo v 6 vzorcih listerije določili v prostoru za pakiranje mesa na lokaciji P2LV32 v 6 vzorcih in sicer; treh vzorcih (n=3) (50 %), smo identificirali bakterije vrste *L. innocua*, v ostalih treh vzorcih (n=3) (50 %), pa bakterije vrste *L. monocytogenes* (Tabela 13).

V predelavi P3 smo v 5 vzorcih listerije določili v hladilnici za sveže meso na lokaciji P3LV34 v petih vzorcih ($n=5$) (100 %), v vseh vzorcih smo identificirali bakterije vrste *L. monocytogenes*. V prostoru za predelavo na lokaciji P3LV35 pa smo v 5 vzorcih listerije določili v enem vzorcu ($n=1$) (20 %), smo identificirali bakterije vrste *L. innocua*, v treh vzorcih ($n=3$) (60 %), pa smo identificirali bakterije vrste *L. monocytogenes* (Tabela 13).

Tabela 11: Prisotnost bakterij iz rodu *Listeria* v zraku in na površinah predelovalnih obratov (P1, P2, P3).

Zrak	P1LV27	P1LV28	P2LV31	P2LV33	
P1, P2 ($\Sigma n=7$)	n=2	n=3	n=1	n=1	
<i>L. innocua</i>	0	<u>1</u>	0	0	
Površine	P1LV29	P1LV30	P2LV32	P3LV34	P3LV35
P1, P2, P3 ($\Sigma n=43$)	n=15	n=12	n=6	n=5	n=5
<i>L. monocytogenes</i>	<u>7</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>5</u>	<u>3</u>
<i>L. innocua</i>	<u>7</u>	<u>7</u>	<u>3</u>	0	<u>1</u>
<i>L. seeligeri</i>	0	0	0	0	0
<i>L. welshimeri</i>	<u>1</u>	0	0	0	0

(Σn = skupno število vseh vzetih vzorcev, n = število odvzetih vzorcev na opisanih lokacijah)

4.3 Skupno število mezofilnih mikroorganizmov v zraku klavnic K1 - K3

V klavnici K1 smo na 4 lokacijah z metodo aktivnega vzorčenja zraka odvzeli 57 vzorcev zraka in ugotovili povprečno vrednost skupnega števila mezofilnih mikroorganizmov 623 ± 130 KE/m³. Najnvišjo vrednost KE/m³ smo ugotovili na lokaciji K1LV8 (818 ± 164) (Tabela 14). Z metodo sedimentacije smo na istih lokacijah odvzeli 15 vzorcev zraka in ugotovili povprečno vrednost 506 ± 500 KE/ploščo) (Tabela 14).

Tabela 12: Povprečne vrednosti skupnega števila mezofilnih mikroorganizmov v zraku klavnice K1.

Klavnica 1	K1LV8	K1LV3	K1LV4	K1LV1
K 1 ($\Sigma n=57$)	n=15	n=18	n=12	n=12
KE/m ³	330 ± 79	776 ± 114	818 ± 164	570 ± 163
K 1 ($\Sigma n=15$)	n=4	n=5	n=3	n=3
KE/ploščo	64 ± 118	568 ± 373	883 ± 715	512 ± 793

(Σn = skupno število vseh vzetih vzorcev, n = število odvzetih vzorcev na opisanih lokacijah)

V klavnici K2 smo na 3 lokacijah z metodo aktivnega vzorčenja zraka odvzeli 60 vzorcev zraka in ugotovili povprečno vrednost 339 ± 61 KE/m³). Najnvišjo vrednost KE/m³ smo

ugotovili na lokaciji K2LV12 (380 ± 57) (Tabela 15). Z metodo sedimentacije smo na istih lokacijah odvzeli 20 vzorcev zraka in ugotovili povprečno vrednost 277 ± 187 KE (SŠM/ploščo) (Tabela 15).

Tabela 13: Povprečne vrednosti SŠM/m³ in SŠM/ploščo v zraku klavnice K2.

Klavnica 2	K2LV12	K2LV16	K2LV15
K 2 ($\Sigma n=60$)	n=27	n=15	n=18
KE/m ³	380 ± 57	312 ± 92	362 ± 36
K 2 ($\Sigma n=20$)	n=10	n=5	n=5
KE/ploščo	264 ± 109	318 ± 247	249 ± 205

(Σn = skupno število vseh vzetih vzorcev, n= število odvzetih vzorcev na opisanih lokacijah)

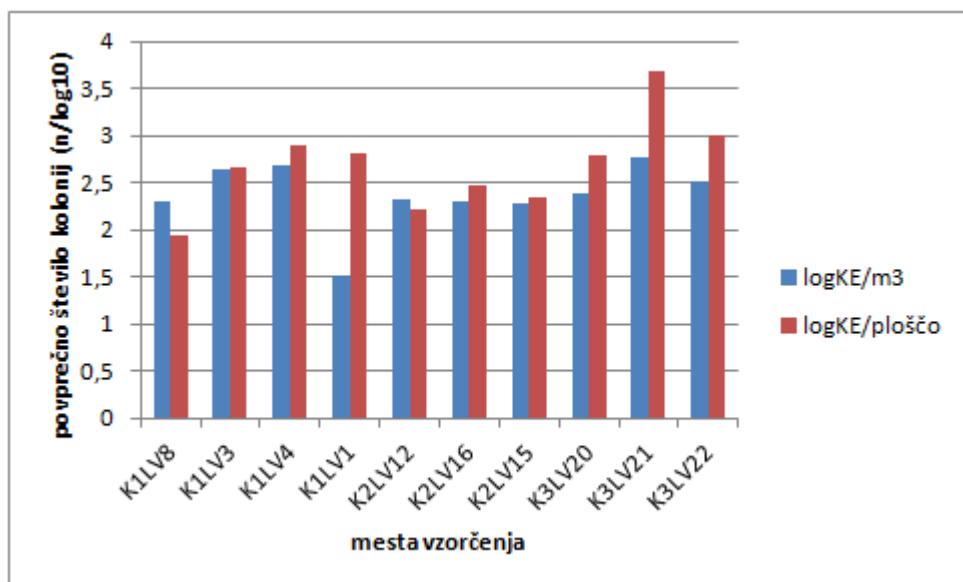
V klavnici K3 smo na 3 lokacijah z metodo aktivnega črpanja zraka odvzeli 24 vzorcev zraka in ugotovili povprečno vrednost 459 ± 340 KE/m³. Najnvišjo vrednost KE/m³ smo ugotovili na lokaciji K3LV21 (636 ± 597) (Tabela 16). Z metodo sedimentacije smo na istih lokacijah odvzeli 8 vzorcev zraka in ugotovili povprečno vrednost 564 ± 3841 KE (SŠM/ploščo) (Tabela 16).

Tabela 14: Povprečne vrednosti SŠM/m³ in SŠM/ploščo v zraku klavnice K3.

Klavnica 3	K3LV20	K3LV21	K3LV22
K 3 ($\Sigma n=24$)	n=12	n=6	n=6
KE/m ³	391 ± 99	636 ± 597	351 ± 324
K 3 ($\Sigma n=8$)	n=4	n=2	n=2
KE/ploščo	527 ± 731	921 ± 9027	245 ± 1766

(Σn = skupno število vseh vzetih vzorcev, n= število odvzetih vzorcev na opisanih lokacijah)

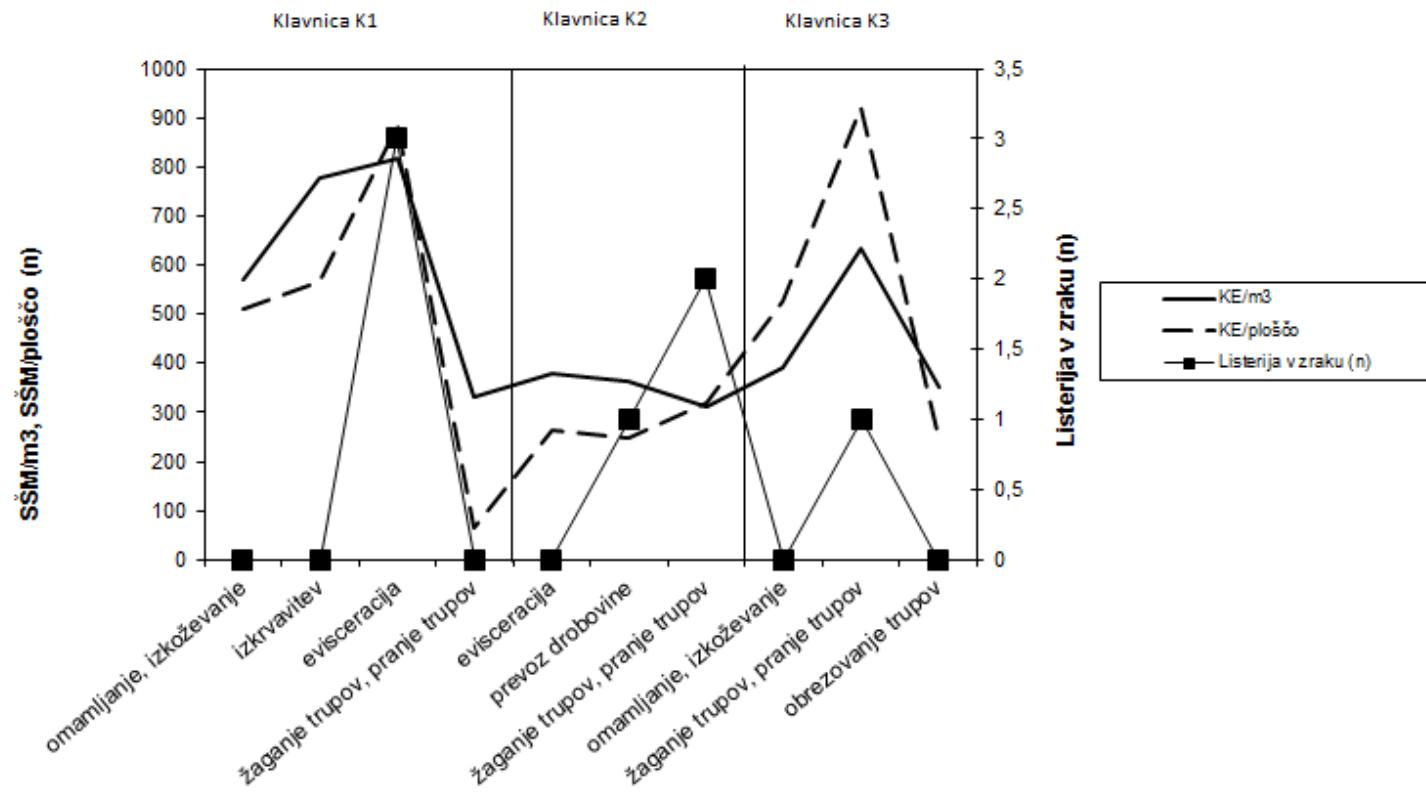
Najvišja vrednost skupnega števila aerobnih mikroorganizmov na kubični meter (KE/m³) je bila ugotovljena v klavnici K1, medtem ko je bila najvišja vrednost na petrijevo ploščo (KE/ploščo) ugotovljena v klavnici K3 (Graf 1).



Graf 1: Povprečne vrednosti skupnega števila aerobnih mikroorganizmov v zraku klavnic K1, K2, K3.

Najvišja vrednost aerobnih mezofilnih mikroorganizmov, odvzetih z aktivnim črpanjem (KE/m^3), je bila ugotovljena v klavnici K1, medtem, ko je bilo njihovo število pri uporabi metode sedimentacije KE (SŠM/ploščo) najvišje v klavnici K3 (Graf 1, 2). V klavnici K2 je bilo število aerobnih mikroorganizmov odvzetih z aktivnim črpanjem (KE/m^3) absolutno najnižje, pri čemer je bila med povprečnimi števili aerogenih mezofilnih mikroorganizmov KE/m^3 v klavnicah K2 in K3 ugotovljena celo značilna negativna korelacija ($r = -0,501$, $P < 0,05$) (Graf 2).

Trendi števil aerobnih mezofilnih mikroorganizmov odvzetih z aktivnim črpanjem (KE/m^3) in metodo sedimentacije ($\text{KE}/\text{ploščo}$) so bili v klavnicah K1-K3 podobni in v značilni povezavi ($r = 0,824$, $P < 0,01$). Četudi nismo ugotovili značilne povezave ($P > 0,05$) med pozitivnimi vzorci listerij v zraku in aerobnimi mikroorganizmi, pa smo ugotovili, da se z naraščanjem števila mikroorganizmov poveča tudi število listerij v zraku. Povezava je še posebej opazna v klavnicah K1 in K3 (Graf 2.).



Graf 2: Pogostost izolacije bakterij iz rodu *Listeria* v primerjavi s skupnim številom aerobnih mikroorganizmov v zraku klavnic K1, K2, K3.

4.4 Meritve mikroklima v klavnicih (K1, K2, K3) in predelavah (P1, P2, P3)

V klavniči K1 smo pri 27 meritvah na šestih lokacijah izmerili naslednje vrednosti: vlaga od 60,1 do 98,2 %, temperatura od 1,6 do 15,1°C in gibanje zraka od 0,02 do 0,62 m/s (Tabela 17).

Tabela 15: Rezultati meritve mikroklima v klavniči K1.

Mikroklima zraka	K1LV8	K1LV3	K1LV4	K1LV1	K1LV6	K1LV9
K1 ($\Sigma n=27$)	n=5	n=5	n=4	n=4	n=4	n=5
Temperatura(°C) povprečje (°C)	9,3 ~ 15,1 12,2	7,5 ~ 13,9 10,7	9,8 ~ 14,3 11,8	8,2 ~ 13,8 11,0	14,3 ~ 14,7 14,5	1,6 ~ 11,2 6,4
Rel. vlaga (%) povprečje (%)	60,1 ~ 79,7 69,9	64,1 ~ 83,6 73,8	78,6 ~ 97,2 87,9	64,4 ~ 92,6 78,5	97,4 ~ 98,2 97,8	76,8 ~ 2,0 84,4
Gibanje zraka (m/s) povprečje (m/s)	0,03 ~ 0,25 0,14	0,02 ~ 0,16 0,09	0,03 ~ 0,29 0,16	0,09 ~ 0,14 0,12	0,39 ~ 0,64 0,51	0,03 ~ 1,76 0,89

(Σn = skupno število vseh vzetih vzorcev, n= število odvzetih vzorcev na opisanih lokacijah, \sim = do)

V klavniči K2 smo pri 22 meritvah na štirih lokacijah izmerili naslednje vrednosti: vlaga od 45,4 do 90,7 %, temperatura od 2,1 do 14,7°C in gibanje zraka od 0,002 do 1,13 m/s) (Tabela 18).

Tabela 16: Rezultati meritve mikroklima v klavniči K2.

Mikroklima zraka	K2LV12	K2LV16	K2LV15	K2LV17
K2 ($\Sigma n=22$)	n=10	n=5	n=5	n=2
Temperatura(°C) povprečje (°C)	9,3 ~ 14,7 12	9,2 ~ 14,2 11,7	10,1 ~ 14,5 12,3	2,1 ~ 11,4 6,7
Rel. vlaga (%) povprečje (%)	45,4 ~ 86,4 65,9	75,9 ~ 86,2 81,5	71,6 ~ 90,7 81,1	73,7 ~ 76,5 75,1
Gibanje zraka (m/s) povprečje (m/s)	0,02 ~ 0,25 0,13	0,04 ~ 0,28 0,16	0,03 ~ 0,19 0,11	0,04 ~ 1,13 0,58

(Σn = skupno število vseh vzetih vzorcev, n= število odvzetih vzorcev na opisanih lokacijah, \sim = do)

V klavniči K3 smo pri 7 meritvah na treh lokacijah izmerili naslednje vrednosti: Vlaga od 49,1 do 83,6 %, temperatura 21,4 do 23,6°C in gibanje zraka od 0,06 do 0,35m/s (Tabela 19).

Tabela 17: Rezultati meritve mikroklima v klavnici K3.

Mikroklima zraka	K3LV20	K3LV21	K3LV22
K3 ($\Sigma n=7$)	n=3	n=2	n=2
Temperatura($^{\circ}\text{C}$) povprečje ($^{\circ}\text{C}$)	21,4 ~ 22,8 22,1	23,1 ~ 23,5 23,3	23,4 ~ 23,6 23,5
Rel. vlaga (%) povprečje (%)	49,1 ~ 83,6 66,3	63,8 ~ 68,6 66,2	61,4 ~ 65,2 66,3
Gibanje zraka (m/s) povprečje (m/s)	0,06 ~ 0,35 0,20	0,12 ~ 0,22 0,17	0,07 ~ 0,27 0,17

(Σn = skupno število vseh vzetih vzorcev, n= število odvzetih vzorcev na opisanih lokacijah, \sim = do)

V predelovalnih obratih (P1, P2, P3) smo pri 7 meritvah na štirih lokacijah izmerili naslednje vrednosti.

V perdelovalnem obroku P1 smo izmerili naslednje vrednosti: vlaga od 73,8 do 83,9 %, temperatura od 5,0 do 12,2 $^{\circ}\text{C}$ in gibanje zraka od 0,02 do 0,18 m/s (Tabela 20).

V predelavi (P 2) smo izmerili naslednje vrednosti: vlaga 58,5 %, temperatura 11,1 $^{\circ}\text{C}$ in gibanje zraka 0,02 m/s (Tabela 20).

V predelavi (P 3) smo izmerili naslednje vrednosti: Vlaga 74,5 %, temperatura 3,2 $^{\circ}\text{C}$ in gibanje zraka 0,02 m/s (Tabela 20).

Tabela 18: Rezultati meritve mikroklima v predelovalnih obratih (P1, P2, P3).

Mikroklima zraka	P1LV27	P1LVV28	P2LV31	P3LV33	P3LV35
P1, P2, P3 ($\Sigma n=7$)	n=2	n=2	n=1	n=1	n=1
Temperatura($^{\circ}\text{C}$) povprečje ($^{\circ}\text{C}$)	2,7 ~ 5,0 3,85	11,2 ~ 12,2 11,7	12,2	3,2	14,0
Rel. vlaga (%) povprečje (%)	73,8 ~ 80,8 77,3	77,7 ~ 83,9 80,8	77,7	74,5	62,7
Gibanje zraka (m/s) povprečje (m/s)	0,11 ~ 0,18 0,14	0,02 ~ 0,06 0,04	0,06	0,02	0,06

(Σn = skupno število vseh vzetih vzorcev, n= število odvzetih vzorcev na opisanih lokacijah, \sim = do)

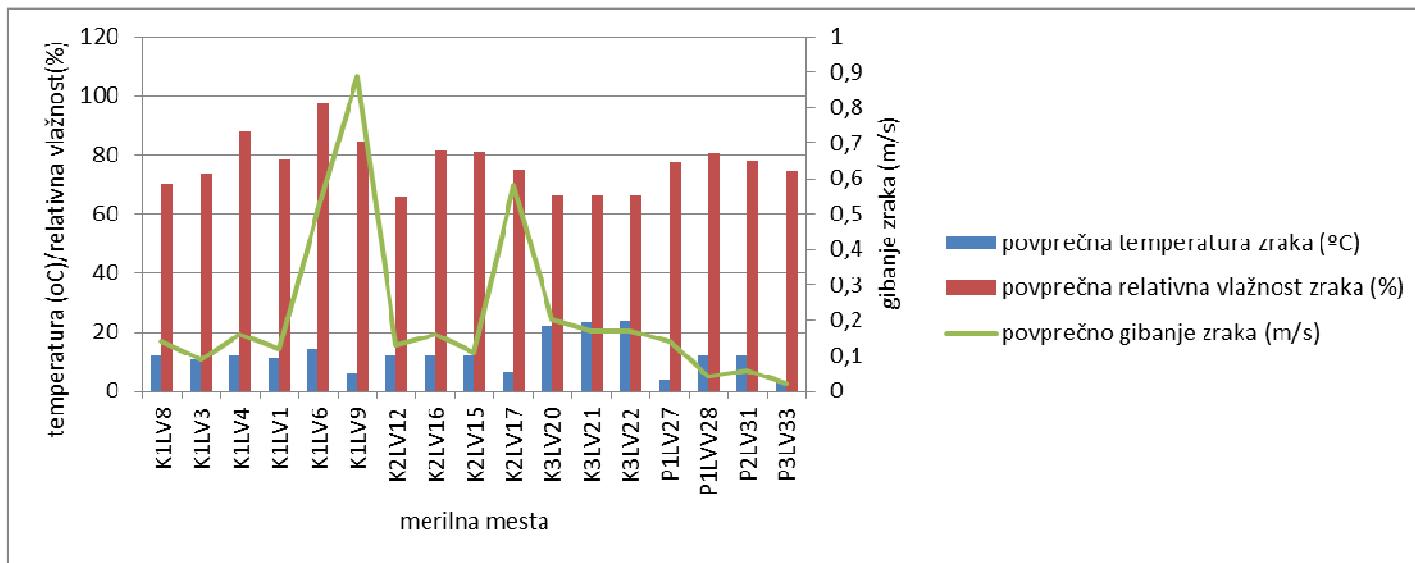
Najvišja povprečna temperatura zraka (23,6 $^{\circ}\text{C}$) je bila izmerjena v klavnici (K3), kar je razumljivo saj so bile meritve opravljene v poletnem času.

Najvišja povprečna relativna vlažnost zraka (98,2%) je bila izmerjena v klavnici (K1).

Povprečno gibanje zraka je bilo najmočnejše (0,64m/s) v klavnici (K1).

Povprečna temperatura zraka ($7,5^{\circ}\text{C}$) je bila v obratih za predelavo najvišja v obratih (P1 in P2), povprečna relativna vlažnost pa je bila najvišja (79 %) v obratu (P1), prav tako tudi povprečno gibanje zraka (0,09m/s).

Izmerjene povprečne vrednosti pri merjenju mikroklime v testnih klavnicah in predelavah so prikazane v Grafu 3.



Graf 3: Rezultati meritve mikroklima v klavnicah (K1, K2, K3) in predelavah (P1, P2, P3).

4.5 Statistična obdelava rezultatov

4.5.1 Ugotovitve statističnih analiz:

Tabela 19: Statistična analiza povezave med prisotnostjo aerogenih listerij in višino merilnega mesta.

Hi-kvadrat			
	Vrednost	Stopnja prostosti	Asimptomatična stopnja značilnosti (dvostranska)
Personov koreacijski koeficient	,423 ^a	2	,809
Verjetnostni izračun	,441	2	,802
Lienarna združitev	,065	1	,798
Število veljavnih primerov	161		

Med prisotnostjo aerogenih listerij in višino merilnega mesta ni ugotovljenih statistično značilnih povezav.

Tabela 20: Statistična analiza povezave med prisotnostjo aerogenih listerij in merilnimi mesti.

Hi-kvadrat			
	Vrednost	Stopinja prostosti	Asimptomatična stopnja značilnosti (dvostranska)
Personov koreacijski koeficient	7,073 ^a	5	,215
Verjetnosti izračun	7,828	5	,166
Lienarna združitev	,028	1	,867
Število veljavnih primerov	161		

Medprisotnostjo aerogenih listerij in merilnimi mesti ni ugotovljenih statistično značilnih povezav.

Tabela 21: Statistična analiza povezave med prisotnostjo aerogenih listerij in letnim časom.

Hi-kvadrat			
	Vrednost	Stopinja prostosti	Asimptomatična stopnja značilnosti (dvostranska)
Personov korelacijski koeficient	2,192 ^a	3	,534
Verjetnosti izračun	1,959	3	,581
Lienarna združitev	1,096	1	,295
Število veljavnih primerov	161		

Med prisotnostjo aerogenih listerij in letnim časom ni ugotovljenih statistično značilnih povezav.

Tabela 22: Statistična analiza povezave med prisotnostjo aerogenih listerij in temperaturo.

	Vrednost	Stopinja prostosti	Asimptomatična stopnja značilnosti (dvostranska)	Točna stopnja značilnosti (dvostranska)	Točna stopnja značilnosti (enstranska)
Personov korelacijski koeficient	1,135 ^a	1	,287		
Jeastov popravek	,444	1	,505		
Verjetnosti izračun	1,323	1	,250		
Fišerjeva porazdelitev				,439	,265
Lienarna združitev	1,128	1	,288		
Število veljavnih primerov	161				

Med prisotnostjo aerogenih listerij in temperaturo ni ugotovljenih statistično značilnih povezav.

Tabela 23: Statistična analiza povezave med prisotnostjo listerij v zraku in mest, kjer se tvori večja količina aerosola.

	Vrednost	Stopinja prostosti	Asimptomatična stopnja značilnosti (dvostranska)	Točna stopnja značilnosti (dvostranska)	Točna stopnja značilnosti (enstranska)
Personov korelacijski koeficient	12,214 ^a	1	,000		
Popravek	9,416	1	,002		
Verjetnostni izračun	9,966	1	,002		
Fišerjeva porazdelitev	,000			,002	,002
Lienarna združitev	12,137	1	,000		
Število veljavnih primerov	160				

Prisotnost listerij v zraku je dvisna od mest, kjer se zaradi tehnološkega procesa ustvarjajo večje količine aerosolov pri stopnji značilnosti 0,002.

Ugotovljena je bila značilna negativna korelacija ($r = -0,501$, $P < 0,05$) med številom aerogenih mezofilnih mikroorganizmov KE/m³) v klavnicih K2 in K3.

Ugotovljena je bila značilna korelacija ($r = 0,824$, $P < 0,01$) med številom aerogenih mezofilnih mikroorganizmov odvzetih z aktivnim črpanjem KE/m³) in metodo sedimentacije (KE/ploščo).

5 RAZPRAVA

Doslej so bile raziskave na področju prisotnosti in vloge aerogenih listerij omejene le na redke laboratorijske poizkuse (Zang in sod., 2007) in peščico raziskav v realnih pogojih perutninskih klavnic (Lues in sod., 2007, Heber in sod., 2006). Raziskava prisotnosti in vplivov na širjenje aerogenih listerij v realnih pogojih klavnic in predelovalnih obratov za rdeče meso je bila zato smiselna in potrebna za varovanje zdravja potrošnikov. Namen in cilj naše raziskave je bil ugotoviti potencialno prisotnost bakterij iz rodu *Listeria* v zraku treh klavnic in treh predelovalnih obratov za rdeče meso.

Z raziskavo smo poleg potrditve listerij v zraku žeeli ugotoviti tudi korelacijo med prisotnostjo aerogenih listerij in aerobnih mezofilnih bakterij v zraku ter možne povezave s kontaminacijo površin trupov govedi, vključno s kontaminacijo površin in opreme. Zanimal nas je tudi vpliv temperatur, vlage in gibanja zraka na potencialno prisotnost listerij v zraku.

5.1 Prisotnost listerij v zraku

Glede na to, da so listerije v naravnem okolju izjemno odporne proti ekstremnim razmeram (DeRoin in sod., 2003) in sposobne tvorbe biofilma (Berthold in sod., 1999; Tompkin, 2002), smo izhajali iz dejstva, da se lahko prenašajo z živalmi, transportnimi sredstvi, opremo ter drugimi materiali iz hlevov v živilske obrate in iz teh na živila (Doyle in sod., 2001; Hansson, 2001; Peccio, 2003; Thévenot in sod., 2006). V šestih testnih obratih - 3 klavnicah in 3 obratih za predelavo mesa smo odvzeli skupno 158 vzorcev ($237,0 \text{ m}^3$) zraka in v 8 vzorcih (5.06%) izolirali bakterije vrste *L. seeligeri* in bakterije vrste *L. innocua* (Tabeli 9 in 11). Rezultat je v nasprotju z nekaterimi raziskovalci (Florjanc, 1996; Sutton, 2004; Dobeic in sod., 2005), ki v svojih raziskavah niso ugotovili listerij v zraku klavnic in predelovalnih obratov. Možno je, da avtorji (Florjanc, 1996) niso ugotovili listerij v zraku predelav zaradi odvzema premajhnega števila vzorcev ($n=5$) in premajhnega volumna vzorčenega zraka za posamezni vzorec (200-300 l), za razliko od naše raziskave, v kateri smo odvzeli 158 vzorcev zraka in prečrpali od 1500 – 3000 litrov zraka na posamezni vzorec. Za ugotavljanje prisotnosti listerij v zraku je Florjanc (1996) uporabljal napravo, ki črpa zrak neposredno na petrijevke z gojiščem (Microbian air sampler). Poleg tega je zrak vzorčil tudi z modificirano

metodo uporabe laboratorijske črpalke, ki sesa zrak preko preko suhega filtra (SuporVacTM). Po vzorčenju je filtre prelil z gojiščem. Posledici obeh načinov vzorčenja so verjetne poškodbe bakterijskih celic in posledična nezmožnost rasti na gojiščih. Bakterije pri vzorčenju zraka z air samplerjem približno z veliko hitrostjo na petrijevo ploščo, kar lahko mehansko poškoduje celično steno celice. Verjetno se zgodi podobno tudi pri prečrpavanju zraka preko filtra. V upanju, da bi vsaj delno preprečili poškodbe bakterij, smo pri prečrpavanju zraka z vzorčevalnikom v Petrijevo posodo vložili univerzalni filter za nape, ki smo ga vnaprej navlažili z obogatitvenim gojiščem, kar je verjetno pripomoglo k povečanju možnosti za zadržanje in preživetje listerij. Glede na to, da smo v vzorcih zraka ugotovili prisotnost drugih listerij, menimo, da smo uvedli primerno modifikacijo postopka za izolacijo listerij iz zraka. Opisana metoda bi bila z manjšimi prilagoditvami uporabna tudi za ugotavljanje drugih vrst patogenih mikroorganizmov v zraku, ki zahtevajo usmerjeno bakteriološko preiskavo, npr. za bakterije iz rodov *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Clostridium*.

V nobenem izmed odvzetih vzorcev v 3 testnih klavnicah in 3 obratih za predelavo rdečega mesa sicer niso bile ugotovljene bakterije vrste *L. monocytogenes*, kar se sklada tudi z ugotovitvami drugih avtorjev (Florjanc, 1996; Jacquet in sod., 1993; Salvat in sod., 1995; Autio, 1999; Sutton, 2004; Dobeic in sod., 2011), vendar pa smo prvi uspeli ugotoviti prisotnost drugih listerij (*L. innocua* in *L. seeligeri*) v zraku. Odkritie le-teh v zraku testnih klavnic in obratov za predelavo močno nakazujejo na dejstvo, da se lahko listerije, tako tudi patogena *L. monocytogenes*, nahajajo v zraku klavnic in mesno predelovalnih obratov za rdeče meso in se torej lahko prenašajo s prašnimi delci in aerosoli, kar so v eksperimentalnih pogojih ugotovili tudi drugi avtorji (Brown, 2003; Zhang s sod. 2007; Posch, 2006).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so sicer ugotovili v zraku perutninskih klavnic (Lues in sod., 2007, Heber in sod., 2006), kar sta kot kaže tudi edini poročili s področja raziskav aerogenih listerij v realnih pogojih živilsko predelovalne industrije. Z metodo vzorčenja, razvito med našo raziskavo, smo tudi sami potrdili prisotnost listerij v 38 % vzorcev zraka iz perutninskih klavnic, in sicer bakterije vrste *L. monocytogenes* v 22 % (18/81) in bakterije vrste *L. innocua* v 16 % (13/81) (rezultati v postopku objave).

5.2 Primerjava prisotnosti listerij in aerobnih mezofilnih mikroorganizmov v zraku

Čeprav v tej študiji nismo opravljali meritev aerosola in ostalih delcev v zraku, smo ugotovili, da je v klavnicih največ aerogenih listerij in aerobnih mezofilnih bakterij (KE/m^3 , $\text{KE}/\text{ploščo}$) v bližini lokacij, kjer je zaradi delovnih postopkov, kot so: evisceracija in transport notranjih organov, žaganje trupov in pranje trupov, evisceracije in transport notranjih organov, obstajala velika verjetnost izločanja bioaerosola in drugih delcev v okolje, kar so v svojih raziskavah ugotavljeni tudi (Rahkio in Korkeala, 1991, Prendergast s sod., 2004 in Ma s sod., 2004).

Ugotovili smo statistično značilno povezavo ($P < 0,05$) med prisotnostjo listerij v zraku in mesti, kjer se zaradi tehnološkega procesa ustvarjajo večje količine aerosolov. Na mestih, kjer se izloča več aerosola, smo ugotovili značilno višje število aerogenih listerij. Pri teh ugotovitvah posebej izstopa klavniča K1, kjer smo ugotovili bakterije vrste *L. seeligeri* v 4,76% (3/63) na lokaciji zraven mesta za evisceracijo govedi (K1LV4) na vseh merilnih mestih na višinah 0,5 m, 1,0 m in 2,0 m (Tabela 9), kar predstavlja najvišje število ugotovljenih aerogenih listerij v vseh testnih klavnicih. Mesto za evisceracijo (K1LV4) je na lokaciji, kjer odstranjeno drobovje pada z višine najmanj 0,5 m na transportni voziček in pri tem pride do pršenja vodnih kapljic in delcev vsebine v okolje. Obstaja verjetnost, da so ti postopki skupaj z velikimi količinami odpadnih vod vzrok za nastanek bioaerosolov, kontaminiranih z listerijami in drugimi bakterijami (Downes in Ito, 2001). Hkrati smo na isti lokaciji K1LV4 ugotovili tudi najvišje povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij (KE/m^3) (Graf 1). Istočasno je bilo število aerobnih mezofilnih bakterij (KE/m^3) v klavniči K1 najvišje v primerjavi z ostalimi klavnici (K2 in K3) (Graf 1). Najverjetnejši razlogi za omenjeno kontaminacijo z aerobnimi mikroorganizmi so relativna majhnost klavnice K1, zelo ozek prostor okrog klavne linije, obenem čisti in nečisti deli v klavniči K1, ki niso bili ločeni med seboj. Nasprotno pa Prendergast in sod., (2004) ugotavlja, da ni značilnih razlik v številu bakterij med temi področji. Nasičenost zraka z aerosolom in število aerobnih mezofilnih bakterij (KE/m^3) je bilo najnižje v klavniči K2, v primerjavi s klavnicama K1 in K3, verjetno zato, ker je bil tukaj delovni prostor največji, ločenost čistega in nečistega dela pa ustrezna. Do podobnih zaključkov je prišel tudi Worfel s sod., (1996), ki trdi da je bilo v klavnicih z dobro ločenim čistim in nečistim delom na klavni liniji signifikantno ($P < 0,05$)

manjše število bakterij v zraku v čistem delu, kot pa v klavnici, kjer ta področja niso bila dobro ločena. Poleg tega smo na lokaciji klavnice K2 zraven mesta za transport notranjih organov (K2LV15), torej v bližini mesta za evisceracijo, na višini 2,0 m ugotovili bakterije vrste *L. innocua* v enem vzorcu (Tabela 9). Hkrati smo na isti lokaciji v odvzetih vzorcih zraka ugotovili tudi drugo najvišje povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij (KE/m^3) (Graf 1). Kot v primeru klavnice K1, sta se tudi na tej lokaciji pospešeno odvijala transport in manipulacija z drobovinom, zato predvidevamo, da tudi v klavnici K2 na tej lokaciji klavne linije prihaja do nasičenosti zraka z aerosoli in posledično večje verjetnosti za kontaminacijo zraka z bakterijami, kar so ugotovili tudi drugi avtorji (Rahkio in Korkeala, 1991; Prendergast s sod., 2004; Ma in sod., 2004). Živali so lahko asimptomatski prenašalci listerij, med drugim tudi patogene bakterije vrste *L. monocytogenes*, v fecesu (Wesley, 1993).

Veliko verjetnost kontaminacije zraka z listerijami smo ugotovili v klavnici K2 na lokaciji blizu mesta za žaganje trupov (K2LV16) na višinah (0,5 m in 2,0 m). Na mestu, kjer je bilo najvišje število aerobnih mezofilnih bakterij ($\text{KE}/\text{ploščo}$) v primerjavi z drugimi lokacijami v klavnici K2, je bila iz dveh vzorcev izolirane bakterije vrste *L. innocua* (Graf 2). Menimo, da je zaradi žaganja in pranja trupov na tej lokaciji prišlo do večje nasičenosti zraka s kontaminiranimi aerosoli (bioaerosoli), v primerjavi z drugimi mesti vzdolž klavne linije. Tudi drugi avtorji ugotavljajo, da sta poleg evisceracije in manipulacije s prebavili, žaganje in pranje trupov med najpomembnejšimi izvori bioaerosolov (Rahkio in Korkeala, 1991; Koutla, 1988; Sutton, 2004). Pri razpolavljanju govejih trupov se namreč uporabljajo posebne žage, ki so izdelane tako, da je na list žage usmerjen tanek curek vode, ki ga hladi. Zaradi vrtenja lista pride do izločanja vodnih kapljic v okolico in do posledične tvorbe aerosolov (Rahkio in Korkeala, 1991). Tudi Koutla (1988) ugotavlja, da zaradi uporabe orodja, ki deluje z veliko hitrostjo, pride v času klanja do tvorbe bioaerosolov. Dejstvo, da je bilo precejšnje število aerobnih mezofilnih bakterij ugotovljenih z metodo sedimentacije, kaže na pomembnost primerjalne uporabe te metode, saj ta simulira potencialno naravno kontaminacijo površin z mikroorganizmi iz zraka.

Tudi v klavnici K3 smo na lokaciji K3LV21 višini 1,0 m iz zraka izolirali bakterije vrste *L. innocua* v 4,16 % (1/24) vzorcev (Tabela 9). Lokacija K3LV21 se nahaja zraven mesta za žaganje trupov, podobno kot v klavnici K2, zaradi česar je obstajala velika verjetnost za

nasičenje zraka z bioaerosolom. To dokazujemo z dejstvom, da smo tudi na lokaciji K3LV21 ugotovili najvišje število aerobnih mezofilnih bakterij (KE/m^3 , $\text{KE}/\text{ploščo}$) v primerjavi z ostalimi lokacijami v K3 (Graf 2). Ob tem moramo poudariti, da smo ugotovili statistično značilno korelacijo ($r = 0,824$, $P < 0,01$) med številom aerogenih mezofilnih mikroorganizmov, odvetih z aktivnim črpanjem in metodo sedimentacije v vseh klavnicih (K1 – K3), kar hkrati potrjuje ustreznost obeh metod.

V klavniči K3 smo na lokaciji za mestom za žaganje trupov (K3LV21) ugotovili višje število aerobnih mezofilnih bakterij kot v ostalih klavnicah (K1 in K2). Menimo, da je zato lahko več vzrokov. Zraven meritnega mesta so bila vrata, ki so vodila v garderobe za delavce. Skozi njih so tudi med delovnim postopkom in našimi meritvami delavci prihajali in odhajali, poleg tega so bila vrata skoraj stalno odprta in posledično je prihajalo do močnejšega pretoka zraka. Zračni tok, kot vzrok povečane kontaminacije navaja tudi Reck, 2002. (Graf 3). Rahkio in Korkeala (1991) pa ugotavlja, da so lahko delavci, ki se gibljejo iz nečistega dela obrata v čistega, vir kontaminacije. Ena izmed verjetnih možnosti je tudi, da se lokacija K3LV21 nahaja za mestom za žaganje trupov, ki stimulira nastajanje bioaerosolov, kar so na podobnih mestih ugotavljali tudi drugi (Rahkio in Korkeala, 1991; ter Sutton, 2004).

5.3 Vpliv dejavnikov temperature, vlage in gibanja zraka na pojavnost listerij in aerobnih mezofilnih mikroorganizmov v zraku

Predvidevamo, da so na ugotovljene listerije in aerobne mezofilne mikroorganizme v zraku v veliki meri vplivali tudi mikroklimatski dejavniki, čeprav zaradi nizkega števila izolatov statistično značilnih povezav nismo ugotovili ($P < 0,05$). V času meritev so bile temperature zraka v testnih klavnicah v veliki meri odvisne od letnega časa, v katerem so bile opravljene meritve, torej od dejavnikov zunanje klime. Poudariti je potrebno, da smo v klavnicah (K1 in K2) izvajali raziskavo v zimskem času in ugotovili na liniji klanja povprečno temperaturo $11,9^\circ\text{C}$, v klavniči (K3) pa v poletnem času in izmerili povprečne temperature zraka $21,6^\circ\text{C}$. Med prisotnostjo aerogenih listerij in letnim časom ni bilo ugotovljenih statistično značilnih povezav ($P > 0,05$). Na osnovi primerjave rezultatov med testnimi klavnicami lahko ugotovimo, da je bilo v klavniči (K3) v zraku ugotovljeno najnižje število pozitivnih vzorcev

na listerije, pri čemer smo v klavnici K3 zabeležili najnižjo relativno vlažnost zraka (RH = 66%) (Blackburn, 2002), najvišjo temperaturo zraka ($T = 21,6^{\circ}\text{C}$) in najmočnejši pretok zraka (0,18 m/s). To nakazuje, da obstaja določena povezava ($P > 0,05$) med parametri mikroklime in številčnostjo listerij v zraku. Tudi Kornacki s sod. (2006); Mothershaw in Raisi, (2008) ugotavljajo, da na preživetje mikroorganizmov v zraku delujejo številni dejavniki pri čemer je najpomembnejša visoka relativna vlag. Do podobnih ugotovitev je prišel tudi Ma s sod. (2004), ki je dokazal, da višja relativna vlažnost RH (75 %) predstavlja boljše pogoje za preživetje listerij v okolju kot pa nižja RH (40 %). Kang in Frank, (1989) pa ugotavlja, da je za obnašanje in preživetje bakterij v zraku poleg vlage pomembna tudi temperatura zraka. Podobno je tudi s stopnjo usedanja listerij, ki je nekoliko višja pri višji relativni vlažnosti zraka (Downws in Ito, 2001).

Vpliv vlažnosti zraka na pojavnost aerogene listerije smo potrdili tudi s potrditvijo prisotnosti aerogenih bakterij vrste *L. innocua* v mesno predelovalnem obratu P1. Prisotnost listerij smo dokazali na lokaciji P1LV28 v sredini prostora za predelavo mesa na višini 1,0 m v 20 % (1/5), v zraku z najvišjo relativno vlažnostjo (83,9 %), ki je bila hkrati najvišja v primerjavi z ostalimi testnimi predelovalnimi obrati (P2 in P3), v katerih nismo uspeli ugotoviti aerogenih listerij. Na tem mestu so potekali glavni procesi obdelave surovega mesa, glede na same postopke dela, zato so bili ustvarjeni pogoji za tvorbo aerosolov in sproščanje drugih delcev v zrak. Gibanje zraka je bilo na lokaciji na sredini prostora za predelavo (P1LV28), v primerjavi z drugimi testnimi predelovalnimi obrati podobno ali pa šibkejše (0,06 m/s). Povezave med jakostjo pretoka zraka in bakterijsko kontaminacijo nismo ugotovili, kar se sklada z ugotovitvami drugih avtorjev (Rahiko in Korkeala, 1997; Lues in sod., 2007).

5.4 Kontaminacija trupov klavnih polovic z listerijami iz zraka na liniji klanja

Na splošno velja, da je stopnja usedanja bioaerosolov in posledična kontaminacija površin na klavnicah in v predelovalnih obratih nepredvidljiva in odvisna od mnogih dejavnikov, predvsem pa od velikosti delcev in relativne vlažnosti (Ma s sod., 2006; McEvoy s sod., 1999; Posh s sod., 2006). Ker so izpostavljeni kontaminaciji z bioaerosoli tudi trupi klavnih živali, smo v naši raziskavi ugotavljal možnost kontaminacije govejih trupov z listerijami na liniji

klanja. Predvidevali smo, da so trupi v klavnicih izpostavljeni kontaminaciji z listerijami predvsem preko zraka, seveda pa obstaja tudi možnost kontaminacije z rokami ali orodjem (Antrekker, (2003). Ugotovili smo, da je bil med vsemi tremi testnimi klavnicami (K1, K2, K3) od 144 odvzetih brisov na trupih govedi samo en bris pozitiven na bakterije vrste *L. innocua* in sicer v klavniči K1 na lokaciji K1LV11. Rezultat je vreden omembe, ker se lokacija nahaja takoj za mestom (2,2 m) za evisceracijo (K1LV4), kjer je bilo ugotovljenih največ pozitivnih primerov aerogennih bakterij vrste *L. seeligeri*, kot tudi najvišje število aerobnih mezofilnih bakterij SŠM/m³ med vsemi lokacijami in objekti. Lokacija K1LV11 je zraven mesta (1,0 m) za žaganje trupov (K1LV8), ki se sicer upošteva kot pomembna kritična kontrolna točka za kontaminacijo trupov z aerogenimi mikrorganizmi (Pearce s sod., 2006), hkrati pa smo v (K2) in (K3) ugotovili pozitivne vzorce zraka na listerije. Zato menimo, da je na tem območju lahko prišlo do nasičenosti zraka z aerosolom, kontaminiranim z listerijami in posledično do edinega na listerijo pozitivnega brisa klavne polovice. Sicer sklepamo, da je nizka kontaminacija trupov z listerijami posledica majhnega števila listerij v zraku, zato tudi povezav med številom, ugotovljenih listerij v zraku in kontaminacijo govejih trupov z listerijami nismo ugotovili, kar je podobno drugim poročilom (McEvoy, 1999; Rahiko in Korkeala, 1997; Prendergast s sod., 2004; Helm-Archer, 2008). Tudi Sutton (2004) v podobnih raziskavah ni ugotovila listerij na površini govejih trupov. So pa naši rezultati v nasprotju z rezultati nekaterih drugih raziskovalcev, ki so ugotovili močno povezavo med kontaminacijo trupov z mikroorganizmi in mikrobiološkim onesnaženjem zraka (Posh s sod., 2006; Pearce s sod., 2006). Doyle s sod., (2004) ugotavlja, da pride prav pri majhnih oddaljenostih od izvora bioaerosolov do največjega usedanja teh na površine objektov in opreme. Sutton (2004) zato predlaga, da bi morali na klavnih linijah postaviti pregrade med čistim in nečistim delom in omogočiti, da sta ta dva dela čim bolj oddaljena drug od drugega.

5.5 Analiza kontaminiranosti površin testnih objektov

Zaradi preverjanja pristnosti listerij v pregledovanih objektih smo pred pričetkom dela odvzeli tudi brise nekaterih površin in opreme. Pričakovali smo, da bomo v bližini mest, kjer smo ugotovili listerije v zraku, tudi na površinah našli več listerij.

Listerije smo našli večinoma na površinah klavniških hlevov in hladilnic ter prostorih za predelavo. V hlevih klavnic smo na stenah, ceveh in tleh boksov ter prehodih med boksi ugotovili bakterije vrste *L. innocua* v klavnici K1 na lokaciji K1LV10 v 25 % (3/12) in v 8 % (1/12) v hlevu klavnice (K2) na lokaciji K2LV18. V vzorcih, odvzetih na površinah v hlevu klavnice K3, nismo ugotovili listerij. Hlevi so na splošno pomemben vir kontaminacije klavnic, saj je tukaj stalno prisoten potencialno kontaminiran feces živali, ki so namenjene za zakol, hkrati pa se tukaj odvija dnevna izmenjava živali iz različnih izvorov, kar ugotavlja tudi drugi avtorji (Doyle in sod., 2001; Hansson, 2001; Wesley, 1993).

Nadalje smo ugotovili, da so bile hladilnice v klavnicah in predelovalnih obratih verjetno najbolj ugodno okolje za rast listerij, o čemer sta poročala tudi Elzen in Snijders, 1993. Izolirali smo nepatogene bakterije vrste *L. innocua* in bakterije vrste *L. welshimeri*, vendar smo ugotovili tudi patogene bakterije vrste *L. monocytogenes*, na lokaciji P3LV34 celo iz vseh odvzetih vzorcev (Tabela 11). V podobnih raziskavah je Sammarco s sod. (1997) ugotovila bakterije vrste *L. monocytogenes* v 13,3 % odvzetih brisih s površin v hladilnicah testnih klavnic. Ugotovili smo tudi kontaminacijo višje ležečih površin (obod ventilatorja hladilnega sistema in traverza v hladilnici klavnice K1, ki sta nekje 3,5 m nad tlemi), kamor so se listerije lahko prenesle samo z aerogeno.

Dejstvo, da smo ugotovili največ listerij na površinah v hladilnicah tako v klavnicah, kot v obratih za predelavo, niti ne preseneča glede na njihovo sposobnost preživetja in razmnoževanja pri nizkih temperaturah (Evans s sod., 2004; Kang in Frank, 1990; DeRoin in sod., 2003). Florjanc (1996) je ugotovil listerije v kondenzu na ceveh hladilnega sistema, prav tako pa je našel listerije na mestih, kamor je kapljal kondenz s cevi.

Spurlock in Zottola, (1991) opisujeta cirkulacijske naprave v hladilnih sistemih kot možen vir kontaminacije živil s patogenimi mikroorganizmi. Pri delovanju hladilnega sistema se ustvari pospešen tok zraka, ki trga kontaminirane delce s površin prezračevalnih jaškov in drugih delov klimatske naprave.

Naslednji razlog za nastajanje bioaerosolov je sanitacija hladilnc z visokotlčanimi čistilci, zaradi česar lahko pride do sprostitev bakterij s kontaminiranih površin v okolje in do tvorbe

aerosolov (Antekker, 2003; Mothershaw in Raisi, 2008). V takem primeru verjetno lahko govorimo o obstoju tako imenovanih internih sistemov kroženja aerogenih listerij (Florjanc, 1996), ki so po našem mnenju lahko izvori kontaminacije mesa. Če primerjamo število ugotovljenih listerij na površinah v hladilnicah klavnic in obratov za predelavo, ugotovimo določene razlike. V hladilnicah klavnic smo ugotovili listerije v 27,5 % vzorcev, v hladilnicah obratov za predelavo pa v 43,4 % vzorcev. To si razlagamo z dejstvom, da delujejo hladilnice za sveže meso v klavnicah po principu "all in all out" v 48 urnih intervalih in je možno opraviti celovito sanitacijo v tem časovnem intervalu. Tako hitra in popolna sanitacija tudi onemogoča nastajanje bakterijskih žarišč, do neke mere pa tudi tvorbo biofilmov (Kornacki, 200). V obratih za predelavo je ta sistem drugačen, saj hladilnice za meso redko popolnoma izpraznijo in tako tudi redko izvajajo popolno sanitacijo. Tak način dela pa dopušča nastanek žarišč in biofilmov na površinah predelovalnih obratov.

Zanimivo je, da v prostorih za klanje nismo ugotovili listerij, medtem ko je v podobni raziskavi (Autio, 2003) ugotovila od (0 % - 40 %) bakterij vrste *L. monocytogenes*, na površinah predelovalnih obratih (P1) in (P3) pa smo v prostoru za predelavo ugotovili bakterije vrste *L. innocua* (46,6 % oz. 20 %) in bakterije vrste *L. monocytogenes* (13,3 % oz. 60 %).

Bakterije vrste *L. innocua* smo ugotovili na istem mestu (na sredini prostora za predelavo) na površini tal in v zraku predelovalnega obrata P1. Kot poročajo drugi avtorji (Antekker, 2003), smo tudi mi ugotovili, da kontaminiranost površin, kjer potekajo kritični procesi (čiščenje, gibanje delavcev, proizvodnih postopkov), vpliva na sproščanje aerogenih bakterij. Podobno kot drugi avtorji (Fenolon, 1996; oo, 2003), smo našli več listerij v predelovalnih obratih kot v klavnicah. Pojav listerij v obratih za predelavo hrane je povezan z njihovo kolonizacijo v okolju in sposobnostjo, da se prilagodijo in preživijo na čisti opremi in okolju (Pitchard, 1995; Lundén s sod., 2000). Glede na to da, smo bakterije vrste *L. innocua*, poleg klavne linije, ugotovili tako v hlevih klavnic kot tudi na površinah v hladilnicah, menimo, da bi lahko prišlo do prenosa listerij preko živali in delavcev v prostore za klanje in posledično v hladilnice.

Možni pokazatelj za višje število pozitivnih vzorcev v predelovalnih obratih kot v klavnicih je čas vzorčenja, saj so bili vzorci v predelovalnih obratih odvzeti med delovnim procesom, v klavnicih pa pred pričetkom delovnega procesa (Thévenot s sod., 2005; Autio, 1999).

5.6 Sklepne ugotovitve

Na splošno lahko predpostavljam, da je zrak v klavnicih bolj nasičen z aerosolom na tistih mestih klavne linije, kjer se izvaja evisceracija in groba manipulacija s trupi govedi. Pri evisceraciji lahko pride do rupture črevesja in izločanja vsebine z mikroorganizmi v okolje in zrak z aerosoli, kapljicami in trdimi delci (Prendergast s sod., 2004; Posh s sod., 2006), saj so živali lahko asimptomatski prenašalci bakterij vrste *L. monocytogenes* v blatu (Wesley, 1993). Aktivnosti na liniji klanja ob zakolu in obdelavi trupov, kot so razpolavljanje in pranje trupov ter pranje tal, so lahko vzrok za aktivno širjene potencialno kontaminiranega aerosola v okolje (Prendergast s sod., 2004; Burfoot s sod., 2000; Kang in Frank, 1990).

Ob upoštevanju rezultatov, pridobljenih v tej študiji, ugotovitve nakazujejo, da se listerije lahko nahajajo v zraku, zlasti na mestih, kjer smo predvidevali, da je prišlo do nastajanja aerosola, hkrati pa smo na teh mestih zasledili tudi povečano skupno število bakterij v zraku. Ta ugotovitev nakazuje na možnost, da bi bilo lahko število ugotovljenih listerij v zraku v povezavi s številom aerobnih mezofilnih bakterij, čeprav v tej študiji nismo ugotovili značilne povezave ($P>0,05$).

V naši raziskavi, podobno kot Helm-Archer (2008), nismo opazili korelacije med ugotovljenimi listerijami v zraku in na površinah testnih klavnic in predelovalnih obratov.

Ker v naši študiji nismo ugotavljali aerosolov v zraku, lahko samo predvidevamo, da lahko pride pri različnih delovnih procesih do izločanja aerosolov, ki so sestavljeni iz delcev različnih velikosti in okuženih z različnim številom mikroorganizmov (Kotula in Emswiler-Rose, 1988; Rahkio in Korkeala, 1991; Sutton, 2004). Zato bi morali v prihodnje posvetiti več pozornosti študiji bioaerosolov in njihovi potencialni kontaminaciji površin. Potrebno bi bilo natančno preučiti vse informacije o okoljskih dejavnikih, ki bi lahko vplivali na pojavnost

listerij v zraku (Ma s sod., 2004). Posebno pozornost bi bilo potrebno posvetiti hladilnim sistemom v hladilnicah, kjer so pogoji za rast bakterij ugodni in kjer s postopki čiščenja ne morejo odstraniti vseh odpadkov in substratov, primernih za rast bakterij, predvsem listerij (Evans s sod., 2004; Kang in Frank, 1990). Tudi sami postopki razkuževanja in dezinfekcije niso vedno uspešni (Aarnisalo, 2000; Giovannacci, 1999).

Priporočilo nosilcem dejavnosti v klavnih obratih in obratih za predelavo mesa je dati večji poudarek ustreznemu ločevanju čistih in nečistih delov obratov ter zagotovitvi zadostne površine in prostornine objektov, v katerih se odvijajo posamezne dejavnosti. Izvajanje sprotne in popolne sanitacije obratov je obvezno (Aarnisalo, 2000; Giovannacci, 1999), prepovedati je potrebno uporabo visokotlačnih čistilnih naprav med proizvodnim procesom, ker ti ustvarjajo bioaerosol. Striktno mora biti vzdrževanje klimatskih in hladilnih naprav, izboljšati je potrebno mikroklimo. Glede na situacijo v klavniči K1, kjer je bil zrak najpogosteje kontaminiran z listerijami in drugimi mikoorganizmi, priporočamo, da se kot preventivni ukrep za preprečevanje pojavnosti aerogenih mikoorganizmov v zraku proizvodnje živil živalskega izvora zadosti ustreznim prostorskim in mikroklimatskim pogojem glede na tip in kapaciteto proizvodnje.

Ne glede na vodenje zakonsko predpisane dokumentacije in izvajanje načel HACCP v predelovalnih obratih, bi bilo potrebno posvetiti več pozornosti splošnemu prenosu listerij (Gasbis, 1988; EU Commission, 1999; Henning in Cutter, 2001;). Prizadevanja, da bi preprečili onesnaženje mesa in mesnih izdelkov z mikoorganizmi, predvsem pa s patogenimi bakterijami vrste *L. monocytogenes*, so potrebna v vseh fazah proizvodnje, predvsem zaradi dejstva, da so bakterije vrste *L. monocytogenes* ubikvitarne bakterije z možnostjo aerogenega prenosa.

Rezultati naših raziskav in uspešna modifikacija metode vzorčenja so dobro izhodišče za nadaljevanje podobnih raziskav, ki bodo prispevale k razjasnitvi vpliva zraka kot zadnje kritične točke kontaminacije v živilsko predelovalni industriji.

6 ZAKLJUČKI

V doktorski disertaciji so na podlagi hipotez naši zaključki naslednji:

1. V vzorcih zraka v testnih klavnicih K1, K2, K3 in v predelavi P1 smo ugotovili bakterije vrste *L. innocua* in *L. seeligeri*, s čimer smo dokazali, da obstaja nevarnost kontaminacije trupov klavnih živali z listerijami iz zraka.

Po nam znanih in dostopnih podatkih je to prvi primer izolacije listerij iz zraka v realnih pogojih klavnic in predelovalnih obratov za rdeče meso. To smo dosegli z modifikacijo metode vzorčenja zraka. Iz vzorcev zraka sicer nismo izolirali bakterij vrste *L. monocytogenes*, vendar je izolacija drugih listerij zadosten dokaz za ustreznost metode.

2. V vzorcih zraka testnih klavnic smo ugotovili sorazmerno visoko skupno število aerobnih mikroorganizmov (KE/m^3). Visoko skupno število aerobnih mikroorganizmov ($\text{SŠM}/\text{ploščo}$) smo ugotovili tudi s sedimentacijsko metodo, s čimer smo dokazali aerogeno mikrobiološko kontaminacijo površin in opreme v testnih klavnicah.

Ugotovljena je bila značilna korelacija ($P < 0,01$) med številom aerogenih mezofilnih mikroorganizmov odvzetih z aktivnim črpanjem in metodo sedimentacije.

3. Povezave med številom ugotovljenih listerij v zraku in kontaminacijo govejih trupov z listerijami nismo ugotovili, saj smo od 163 odvzetih brisov s trupov govedi na klavni liniji ugotovili samo v enem vzorcu (0,63 %) *L. innocua*.

4. Glede na to, da smo v vzorcih zraka v testnih klavnicah in predelavah ugotovili bakterije vrste *L. innocua* in *L. seeligeri*, nismo pa ugotovili bakterij vrste *L. monocytogenes*, tipizacija ni bila mogoča. Vendar pa prisotnost različnih vrst listerij kaže na različne vire kontaminacij.

5. V študiji smo ugotovili, da vlaga v okolju, pretok zraka in temperatura okolja niso imeli večjega vpliva ($P>0,05$) na pojavnost listerij v zraku in na površinah mesa (trupov).

Ugotovili smo, da je na mestih, kjer se izloča več aerosola, prisotnih značilno višje število ($P < 0,01$) aerogenih listerij.

7 POVZETEK

Kontaminacija mesa in mesnih proizvodov je eden izmed najpomembnejših problemov mesne industrije. Poti kontaminacije mesa in mesnih izdelkov s kvarljivci in patogenimi mikroorganizmi so različne. V mesnopredelovalni industriji je zrak med najpomembnejšimi dejavniki kontaminacije površin z mikroorganizmi. Rekontaminacija mesa in mesnih izdelkov iz zraka in delovnih površin je velikokrat posledica bioaerosolov ter mikroorganizmov, ki se največkrat prenašajo na prašnih delcih. Vloga ocene mikrobiološkega tveganja (MRA) je nujna pri ugotavljanju možnosti načinov kontaminacije živil, pri čemer so raziskave večinoma usmerjene na preučevanje kontaminacije s površin. Izdelani so bili številni modeli za predvidevanje in nadzor nad kontaminacijo živil s površin, literatura pa v zelo majhnem obsegu opisuje vrste in aerogeni prenos mikroorganizmov na delovne površine in površine mesa in mesnih izdelkov. Razmeroma neraziskano je področje načinov zniževanja mikroorganizmov v zraku in zniževanje tveganja rekontaminacije. Iz tega razloga je bilo smiselno izvesti raziskavo iz tega področja.

Namen naloge je bil kvantitativno ovrednotiti prisotnost bakterije vrste *Listeria monocytogenes* oz. bakreij iz rodu *Listeria spp.* v zraku treh velikih komercialnih klavnic za rdeče meso in v zraku treh manjših predelovalnih obratov ter proučiti načine in jakost aerogenega prenosa. Poleg tega nas je zanimalo, ali obstaja medsebojna povezava med listerijami in drugimi vrstami mikroorganizmov v zraku testiranih obratov, zato smo v zraku ugotavliali tudi skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov. Preverjali smo vpliv okoljskih pogojev in mikroklimatskih dejavnikov, kot so temperatura, vlaga in pretok zraka na prisotnost listerij in mezofilnih mikroorganizmov v zraku. Z odvzemom brisov s površin v obratih in trupov govedi smo ugotavliali, kakšna je kontaminacija trupov in površin z listerijami.

V klavnicah smo ugotovili aerogene listerije v 4,6 % (7/151) vzorcev, v predelovalnih obratih pa v 14,3 % (1/7) vzorcev. Listerije smo izolirali na mestih, kjer se zaradi delovnih postopkov v okolje izloča večja količina aerosola (evisceracija, žaganje trupov, transport notranjih organov, predelava mesa). Ugotovili smo bakterije vrst *L. innocua* in *L. seeligeri*, nismo pa izolirali patogene bakterij vrste *L. monocytogenes*.

Z izolacijo bakterij vrste *L. seeligeri* in bakterij vrste *L. innocua* smo potrdili domnevo, da je možen aerogeni prenos listerij, še posebej v pogojih visoke zračne vlage in povečane kontaminacije obratov z aerobnimi mezofilnimi mikroorganizmi. Število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov je bilo v naši študiji višje ali pa enako kot v podobnih študijah.

Na površinah, kjer prevladujejo pogoji, ki ustrezajo tvorbi biofilmov ter preživetju in rasti listerij, smo v vzorcih ugotovili bakterije vrste *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* in *L. welshimeri*. Kontaminiranost površin z listerijami v klavnicih je bila občutno nižja kot pa v predelovalnih obratih. Največ listerij smo ugotovili v vzorcih odvzetih v hladilnicah.

Od 163 odvzetih brisov s trupov govedi na klavni liniji smo samo v enem vzorcu (0,63 %) ugotovili bakterije vrste *L. innocua*, kar pomeni, da goveji trupi ne pomenijo tveganja za kontaminacijo z listerijami.

V študiji smo ugotovili, da vlaga v okolju, pretok zraka in temperatura okolja niso imeli večjega vpliva na pojavnost listerij v zraku in na površinah.

Ugotovitve naše raziskave je potrebno upoštevati kot priporočilo za uvedbo višjih standardov za preprečevanje kontaminacije z listerijami v mesni industriji.

8 SUMMARY

Contamination of meat and meat products is one of the most important problems of the meat industry. Contamination paths of meat and meat products with spoilage agents and pathogenic microorganisms differ. In the meat processing industry air is the most important factor in surface contamination with microorganisms. Recontamination of meat and meat products from air and work surfaces is most often a result of bioaerosols and microorganisms, which are most often carried by dust particles. The role of the microbiological risk assessment (MRA) is essential in determining possible means of food contamination and research often focuses on studying contamination from surfaces. A number of models for predicting and controlling food contamination from surfaces have been prepared, but literature only briefly describes species and aerogenic transfer of microorganisms onto work surfaces, meat and meat products. The field of reducing microorganisms in air and lowering contamination risks has been relatively unexplored. This is why it made sense to conduct a research of this field.

The purpose of this paper was to quantitatively evaluate the presence of *Listeria monocytogenes* species of bacteria or *Listeria* genus in the air of three large commercial slaughterhouses for red meat and in the air of three smaller processing plants, and also to study means and intensity of aerogenic transfer. Alongside we were interested whether there is a mutual connection between listeria and other types of microorganisms in the air of test facilities, therefore we were also determining the total number of aerobic mesophilic microorganisms in the air. We were studying the effect of ambient conditions such as temperature, moisture and airflow on the presence of listeria and mesophilic microorganisms in the air. By taking swabs from surfaces on the premises and from cattle carcasses, we were determining the contamination level of carcasses and surfaces with listeria.

In the slaughterhouses, listeria were determined in 4.6% (7/151) of samples and in processing plants in 14.3% (1/7) of samples. Listeria were isolated at locations, where production processes (e.g. evisceration, carcass cutting, transport of internal organs, meat processing) mean more aerosol is released into the environment. We revealed *L. innocua* and *L. seeligeri* species of bacteria, but did not isolate the pathogenic *L. monocytogenes* bacteria species.

By isolating *L. seeligeri* and *L. innocua* specie of bacteria, we confirmed the assumption that aerogenic transfer of listeria is possible, especially in conditions, when contamination of facilities with aerobic mesophilic microorganisms has been increased and when air humidity is extremely high. The number of aerobic mesophilic microorganisms in our studies was generally higher or the same as in similar studies.

Samples from surfaces, where conditions are favourable for forming biofilms and for the survival and growth of listeria, have revealed *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* specie of bacteria. Surface contamination with listeria in slaughterhouses was considerably lower than in processing plants. The most listeria was found in samples taken at cold storage rooms.

Only one sample (0.63 %) of 163 taken swabs from cattle carcasses at the slaughter line revealed *L. innocua* specie of bacteria, meaning that cattle carcasses do not present a risk for listeria contamination.

In this study we have determined that ambient moisture, airflow and ambient temperature did not have a significant effect on the occurrence of listeria in the air and on surfaces.

The findings of our research are to be considered as a recommendation for implementing higher standards for preventing contamination with listeria in the meat industry.

9 ZAHVALE

Cenjenemu mentorju, *prof. dr. Martinu Dobeicu*. Iskrena hvala za nesebično in iskreno pomoč pri izdelavi naloge ter neizmerno zaupanje v uspeh projekta.

Spoštovani somentorici, *doc. dr. Ireni Zdovc*. Najlepša hvala opravljeno delo in za zaupanje v naše delo in spodbudne načrte v prihodnosti.

Spoštovanim predsedniku *prof. dr. Janezu Marinšku* in članoma komisije za oceno doktorske disertacije, viš. znan. sod. *dr. Matjažu Ocepeku* in *doc. dr. Barbari Jeršek*. Hvala za mnoge nasvete, usmeritve in spodbude.

Ženi *Tatjani* in otrokom, *Karin*, *Renatu* in *Mariu* za njihovo brezmejno podporo in razumevanje pri delitvi mojega prostega časa.

Mami za vse njene nasvete, zaupanje in pozitivno naravnost v življenu.

Na koncu se zahvaljujem vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastajanju moje naloge.

10 LITERATURA

1. Aarnisalo K, Salo S, Miettinen H et al. (2000). Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. Int J Food Safety 20: 237-50.
2. Anderson (1958). New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. J Bacteriol 76: 471-484.
3. Anonymus (1987). Meat industry research shows *Listeria* widespread, control difficult. Food Chem News 29(17): 27- 9.
4. Anonymus (2003). Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. <http://www.foodsafety.gov / dms/lmr2-toc.html>, pp. 146-151.(17.3.2010)
5. Antrekker ED, Boom RM, Zwietering MH, Schothorst M (2003). Quantifying recontamination through factory environments: a review. Int J Food Microbiol, 80(2): 117- 30.
6. Aureli P, Fiorucci GC, Caroli D, Marchiaro G, et al. (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. N Engl J Med 342: 1236-41.
7. Autio T, Hielm S, Miettinen M et al. (1999). Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. Appl Environ Microbiol 65: 150-55.
8. Autio T (2003). Tracing the sources of *Listeria monocytogenes* contamination and listeriosis using molecular tools. Academic Dissertation, Helsinki.
9. Bakadijev AI, Stacy BA, Partnoy DA, (2005) Growth of *Listeria monocytogenes* in the guinea pig placenta and role of cell-to-cell spread in fetal infection. J Infect Dis 164: 221-2.
10. Bakker HC, Cummings CA, Ferreira V et al. (2010). Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. BMC Genomics 11: e688.
<http://biomedcentral.com/1471-2164/11/688> (7.10.2011)
11. Berdholt S, Maukonen J, Kujanpää K et al. (1999). Microbial methods for assessment of cleaning and disinfection of food-processing surfaces cleaned in low-pressure system. Eur Food Res Technol 209: 145-52.

12. Beaufort A, Rudelle S, Genou-Bessen N et al. (2007). Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated cold-smoked salmon. *Lett Appl Microbiol* 44: 406-11.
13. Bergey's manual of systematic bacteriology (1986). Vol 2. Baltimore: Williams & Wilkins: 1234-245.
14. Björkroth KJ, Korkeala HJ (1997). Use of RNA gene restriction patterns to evaluate lactic acid bacterium contamination of vacuum-packaged sliced cooked whole-meat product in a meat processing plant. *Appl Environ Biolol* 63: 488-53.
15. Blackburn CW, McClure PJ (2002). Foodborne pathogens. Hazard, risk analysis and control. Cambridge: Woodhead and CCR, 162-5.
16. Bower CK, McGuire J, Daeschel MA (1996). The adhesion and detachment of bacteria and spores on food contact surfaces. *Trends Food Sci Technol* 7: 152-7.
17. Bremer PJ, Monk I, Osborne CM (2001). Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. *J Food Prot* 64: 1369-76.
18. Brown KL (2003). Control of airborne contamination. In: Lelieveld HLM, Mostert MA, Holah J, White B, eds. Hygiene and food processing. Cambridge: Woodhead publishing, 106-121.
19. Burfoot D, Brown K, Xu Y, et al. (2000). Localized air delivery systems in the food industry. *Food Sci Tech*, 11: 410-8.
20. Buttner MP, Cruz-Perez P, Stetzenbach LD (2001). Enhanced detection of surface-associated bacteria in indoor environments by quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* 67: 2564-2570.
21. Byrne B, Lyng J, Dune G, Bolton DJ (2008). An assessment of the microbial quality of the air within a pork processing plant. *Food Control* 19: 915-20.
22. Chasseignaux E, Gérault P, Toquin MT, Salvat G, Colin P, Ermel G (2002). Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiol Lett* 210: 271-5.
23. Colodner R, Sakran W, Miron D, Teiler N, Khavalevsky E, Kopelowitz J (2003). *Listeria monocytogenes* cross-contamination in a nursery. *Am J Infect Control* 31: 322-4.

24. Cossart P, Sansonetti PJ (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304:242-8.
25. Crum NF (2002). Update on *Listeria monocytogenes* infection. *Curr Gastroenter Rep* 4: 278-96.
26. Cummins AJ, Fielding AK, McLauchlin J (1994). *Listeria ivanivii* infection in a patient with AIDS. *J Infect* 28: 89-91.
27. Cundith CJ, Kerth CR, Jones WR, Mccaskey TA, Kuhlers DL (2002). Air-cleaning system effectiveness for control of airborne microbes in a meat-processing plant. *J Food Sci* 67(3): 1170-74.
28. De Roin MA, Foong SC, Dixon PM, Dickson JS (2003). Survival and recovery of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats inoculated with a desiccated and nutritionally depleted dustlike vector. *J Food Prot* 66: 962-9.
29. Denny J, McLauchin J (2008). Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe: an opportunity for improved European surveillance. *Euro Surveill* 27: 13.
<http://eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=8082> (7.3.2010)
30. DiMaio H (2000). Listeria infection in woman:listeriosis in pregnancy: food for thought. *Prim Care Update Ob Gyns*, 7(1): 40-45.
31. Dickson JS (1989). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on beef tissue surface as affected by simulated processing conditions. *J Food Saf* 10: 165-74.
32. Djordjevic D, Wiedman M, McLandsborough LA (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 68: 2950-8.
33. Dobeic M, Kenda E, Mičunovič J, Zdovc I (2011). Airborne *Listeria spp.* in the read meat processing industry. *Czec J Food Sci* 4: 441-447.
34. Dobeic M, Gobec I, Kenda E (2005). Airborne microorganisms *Brochotrix thermospecta*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus alimentarius* in meat industry as a risk in food safety. *ISAH, Warshav* 2: 346-9.
35. Doyle MP, Beuchat LR, Montville (2001). Food microbiology: fundamentals and frontiers. Washington DC, ASM Press.

36. Doyle MP, Kornacki Y, Lin CM, et al (2004). The role of aerosols in transmission of microorganisms (including *Listeria*) to ready- to- eat meat/poultry products. In final report to American Meat Institute Foundation. Georgia: Center of food Safety, 34 sh.
<http://www.amif.org/ht/a/GetDocumentAction/i/7398> (22.10.2011)
37. Downes FP, Ito K (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington DC: American Public Health Association Press.
38. Douwes J, Thorne P, Pearce N, Heederik D (2003). Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. Ann Occup Hyg 47: 187-200.
39. Doumith M, Cazalet C, Simoes N et al. (2004). New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revolved by comparative genomics and DNA Arrays. Infect Immun 72(2): 1072-83.
40. Drevts DA, Leenen PJ, Greenfield RA (2004). Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria. Clin Microbiol Rev 17: 323-47.
41. EFSA (2011). Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2009. EFSA 9(3) : 136-65.
42. EFSA (2010). Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. EFSA 8 (1): 137-66.
43. EFSA (2009). Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2007. EFSA 8: 135-59.
44. Erdogan HM, Cetinkaya B, Green LE, Cripps PJ, et al. (2001). Prevalence, incidence, signs and treatment of clinical listeriosis in dairy cattle in England. Vet Rec 149: 289-93.
45. Eklund MW, Poysky FT, Paranjpye RN, Lashbrook LC, Peterson ME, Pelroy GA (1995). Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants. J Food Prot 58: 502-8.
46. Elzen AM, Snijders JM (1993). Critical points in meat production lines regarding the introduction of *Listeria monocytogenes*. Vet Q 15: 143-5.
47. Evans JR, Allen AC, Stinson DA (1985). Perinatal listeriosis: report outbreak. Pediatr Infect Dis J 4: 237-41.
48. Evans JA, Russell SL, James C, Corry JEL (2004). Microbial contamination of food refrigeration equipment. J Food Eng 62: 225-32.

49. EU Commission (1999). Opinion of Scietific Committee on veterinary measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*. Annex 1-5, 1-44, Apensix 2: 1-3.
50. Farber JM, Peterkin PI (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Rev 1991 55: 476-511.
51. Fenolon DR, Wilson J, Donachie W (1996). The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. J Appl Bacteriol 81 (6): 641-50.
52. Fenolon DR (1999). *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In Ryser ET and Marth EH (ed.), *Listeria, listeriosis, and food safety*. 2nded. Marcel Dekker, 21-38.
53. Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL et al. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N Engl J Med 312: 404-7.
54. Florjanc P (1996). Pogostnost in soodvisnost vrst *Listeria monocytogene* in *Listeria inocua* v živilih živalskega izvora v Sloveniji. Ljubljana: Veterinarska Fakulteta. Doktorska disertacija.
55. Franco CM, Quinto EJ, Fente C, Rodriguez-Otero JL, Dominguez L, Cepeda A (1995). Determination of the principal sources of *Listeria spp.* contamination in poultry meat and poultry processing plant. J Food Prot 58: 1320-5.
56. Frye DM, Zweig R, Sturgeon J et al. (2002). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*. Clin Infect Dis 35: 35-943.
57. Gabis D, Faust RE (1988). Controlling microbial growth in food processing environments. Food Tehnol 89: 81-2.
58. GasTech Australia (2009). Testo 350 M/XL-testo 454. Instruction manual. Wangara: Gas Teh Australia, 285 str.
59. Gianfranceschi M, Aureli P (1996). Freezing and frozen storage on the survival of *Listeria monocytogenes* in different foods. Ital J Food Sci 4:303-9.
60. Gill CO, Sofos JN (2005). Sources of microbial contamination at slaughtering plants. In: Improving the safety of fresh meat. Cambridge: Woodhead Publishing.

61. Giovannacci I, Ragimbeau C, Quenguiner S, Salvat G, et al (1999). *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants. Use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *Int J Food Microbiol* 53:127-140.
62. Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C et al. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294: 849-52.
63. Glass KA, Doyle MP (1989). Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. *Appl Environ Microbiol* 55: 1565-69.
64. Górný RL (2004). Filamentous microorganisms and their fragments in indoor air: a review. *Ann Agric Environ Med* 11: 185-97.
65. Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG et al. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 1280-88.
66. Grau FH, Cannon H, Vanderlinde PB (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged beef. *J Food Prot* 53: 739-741.
67. Gray ML, Killinger AH (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bact Rev* 30: 309-82.
68. Green CF, Gibbs SG, Tarwater PM, Mota LC, Scarpino PV (2006). Bacterial plume emanating from the air surrounding swine confinement operations. *J Occup Environ Hyg* 3(1): 9-15.
69. Green CF, Scarpino PV, Gibbs SG (2003). Assessment and modeling of indoor fungal and bacterial bioaerosol concentrations. *Aerobiologia* 19: 159-69.
70. Griffiths WD, DeCesemo GAL (1994). The assessment of bioaerosols: a critical review. *J Aerosol Sci* 25: 1425-58.
71. Grinshpun SA, Buttner MP, Willeke K (2007). Sampling for airborne microorganisms. In: Hurst CJ, Crawford RL, Garland JL, eds. *Manual of environmental microbiology*, 3rd ed. Washington: DC, ASM Press, 939-51.
72. Guillet C, Join-Lambert O, Monnier A et al. (2010). Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis* 16: 136-8.
73. Guyer S, Jemmi T (1991). Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally smoked salmon. *Appl Environ Microbiol* 57: 1523-7.

74. Hampson BC, Kaiser D (1995). Air quality in the food-processing environment: a cleanable HEPA filtration system. *Dairy Food Environ Sanit* 5: 371-4.
75. Hansson IB (2001). Microbiological meat quality in high- and low- capacity slaughterhouses in Sweden. *J Food Prot* 64: 820-5.
76. Harvey PJH (1940). Listeria: change of name for a genus of bacteria. *Nature* 145: 264.
77. Hardy R, Schilling K, Froom J, et al.(2006). Listeria: change of name for a genus of bacteria. *Nature* 145-264.
78. Helm-Archer AA, Kerth CR, Jones Wr, McCaskey TA, Conner DE (2008). Relationship between aerosolized microbial load and contamination of fully cooked then frozen meat products. *J Food Sci* 69: 13-6.
79. Henning WR, Cutter C (2001). Controlling *Listeria monocytogenes* in small and very small meat and poultry plants. Washington: Food Safety and Inspection Service, United States Departement of Agriculture.
80. Hof H (2001). *Listeria monocytogenes*: a causative agent of gastroenteritis? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20: 369-73.
81. Ivanek R, Gröhn JT, Weidmann M (2006). *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. *Foodborne Pathog Dis* 3: 319-36.
82. Jay JM, Loessner M, Golden AD (2005). Modern food Microbiology, 7 ed. Foos Sci Tex Series. Springer, 606-617.
83. Jacquet C, Rocourt J, Reynaud A (1993). Study of *Listeria monocytogenes* contamination in a dairy plant characterization of the strains isolated. *Int J food Microbiol* 20: 13-22.
84. Jemmi T, Stephan R (2006). *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Rev Sci Tech* 25: 571-80.
85. Johnson JL, Doyle MP, Cassens RG (1988). Survival of *Listeria monocytogenes* in grunde beef. *Int J Food Microbiol* 6: 243-7.
86. Junntila JR, Niemelä SI, Hirn J (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic listeria. *J Appl Bacteriol* 65: 321-7.

87. Kalmokoff ML, Austin JW, Wan XD, Sanders G, Banerjee S, Farber JM. (2001). Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. J Appl Microbiol 91: 725-34.
88. Kang YJ, Frank JF (1989). Biological aerosols: a review of airborne contamination and its measurement in dairy processing plants. J Food Prot 52: 512-524.
89. Kang YJ, Frank JF (1990). Characterstics of biological aerosols in dairy processing plants. Journal of Dairy Science 73: 621-626.
90. Kathairou S (2002). *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. J Food Prot 65: 1811-829.
91. Kelly J (2005). Microbiological air samplers and ISO 14698-1/2. Controlled Environ (May): 1-3. <http://www.cemog.US/article/microbiological-air-samples-and-iso-14698-12?page=0,0> (16.7.2010)
92. Kenneth T (2011). *Listeria monocytogenes*. Todor's Online Textbook of Bacteriology, 1-3. <http://textbookofbacteriology.net/Listeria.html> (21.10.2011)
93. Knudston LM, Hartman PA (1993). Enterococci in pork processing. J Food Prot 56: 6-9.
94. Krämr KH, Baumgart J (1992). Brühwurst cold cats. Fleischwirtschaft 72: 666-7.
95. Ko R, Smith LT, and Smith GM (1994). Glycin betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance of *Listeria monocytogenes*. J Bacteriol 176: 426-1.
96. Kornacki JL (2006). Detecting sources of *Listeria monocytogenes* in the ready-to-eat food processing environment. Kornacky Microbiology Solutions, Inc., *Listeria* Detection RTE Plants: 1-15.
97. Kotula AW, Emswiler-Rose BS (1988). Airborne microorganisms in a pork processing establishment. J Food Protect 51: 935-7.
98. Koutsoumanis KP, Kendall PA, i JN (2004). A comparatives study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, ph and aw when grown in suspensions or on solid surface. Food Microbiol 21: 415-22.
99. Larson AE, Johnson EA, Nelson JH (1999). Survival of *Listeri monocytogenes* in comercial chees brines. J Dairy Sci 82:1860-8.

100. Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont P, et al. (2009). *Listeria rocourtiae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 60: 2210-4.
101. Lessing MP, Fielding AK, Bowlwr IC (1994). *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. J Infect 29: 230-1.
102. Leucit M (2005). Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. Clin Microbiol Infect 11: 430-6.
103. Li Y, Brackett RE, Chen J, Beuchat LR (2002). Mild heat treatment of lettuce enhances growth of *Listeria monocytogenes* during subsequent storage at 5°C or 15°C. J Appl Microbiol 92: 269-5.
104. Low JC, Donachie W (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. Vet J 153: 9-29.
105. Lues JF, Theron MM, Venter P, et al. (2007). Microbial Composition in Bioaerosols of a High – Throughput Chicken-Slaughtering Facility. Poult Sci 86 (1): 142-149.
106. Lundén JM, Autio TJ, Korkeala HJ (2002). Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. J Food Prot 65: 1129-33.
107. Lundén JM, Miettinen MK, Autio TJ, Korkeala HJ (2000). Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. J Food Prot 63: 1204-7.
108. Lutgring KR, Linton RH, Zimmerman NJ, Peugh M, Heber J (1997). Distribution and quantification of bioaerosols in poultry-slaughtering plants. J Food Prot 60: 804-10.
109. Maier RM, Pepper IL, Gerba CP (2009). Environmental Microbiology. Burlington; Elsevier Inc (85-92).
110. Marinšek J, Grebenc S (2002): *Listeria Monocytogenes* in minced meat and thermally untreated meat products in Slovenia. Slov Vet Res 39: 131-136.
111. Marthi B, Fieland VP, Walter M, Seidler RJ (1990). Survival of bacteria during aerosolization. Appl Environ Microbiol 56: 3463-7.
112. McCormick KE, Han IY, Acton JC, Sheldon BW, Dawson PL (2005). In-package pasteurization combined with biocide – impregnated films to inhibit *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in turkey bologna. J Food Sci 70: 52-7.

113. McEvoy JM, Doherty AM, Sheridan JJ, McGuire JJ, Teagasc L (1999). The incidence of *Listeria spp.* and *Escherichia coli* 0157:H7 on beef carcasses. The Hygiene Review 1999. Middelton: The Societi of Food Hygiene and Technology, 1-3.
114. McLauchlin J (1987). *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. J Appl Bacteriol 63: 1-11.
115. McLauchlin J, Low JC (1994). Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. Vet Rec 135: 615-7.
116. Mena C, Almeida G, Carneiro L, Texeira P, Hogg T, Gibbs PA (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. Food Microbiol 21: 213-6.
117. Merck (2001). Microbial air monitoring – MAS 100 Air Sampler: Technical Information. Net. Taiwan. (<http://www.merck.com.tw/>) (15.6.2010)
118. Miettinen H, Arnisalo K, Salo S, Sjöberg M (2001). Evolution of surface contamination and the presence of *Listeria monocytogenes* in fish processing factories. J Food Prot 64: 635-9.
119. Montville TJ, Karl RM (2008). Food microbiology. Washington: ASM Press :173-86.
120. Morris G, Kokki MH, Anderson K, Richardson MD (2000). Sampling of *Aspergillus* spores in air. J Hosp Infect 44: 81-92.
121. Mothershaw AS, Raisi ANA (2008). Air as a source of bacterial contamination in slaughterhouse prior to implementation of higienic control systems. Int J Posthar Techn Inov 3: 337-7.
122. Mylonakis E, Pauliou M, Hoffmann EL, Calder SB, Wing EJ (2002). Listeriosis during pregnancy: a case series and review of 22 cases. Medicine (Baltimore) 81: 260-9.
123. Müller-Premru M (2002). Nesporogeni po Gramu pozitivni bacili. In: Gubina M, Ihan A, eds. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Madicinski razgledi 255-3.
124. Murray EGD, Webb RE, Swann MBR (1926). A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. J Pathol Bacteriol 29: 407-39.

125. Nesbakken T, Kapperund G, Caugant A (1996). Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry. Int J Food Microbiol 31: 161-71.
126. Nieman RE, Lorber B (2007). Listeriosis. In: Goldfine H, Shane H, eds. *Listeria monocytogenes: pathogenesis and host response*. New York: Springer Science. Springerlink.com/content/13gn1/#section=3105578&page1&locus=0
127. Nikolaev YA, Plakunov VK (2007). Biofilm-city of microbes or an analogue of multicellular organism? Microbiology 76: 125-38.
128. Nørrung B, Anderson JK, Schlundt J (1999). Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Danemark. Int J Food Microbiol 53: 195-203.
129. Nolan DA, Chamblin DC, Troller JA (1992). Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. Int J Food Microbiol 16: 323-35.
130. Northcutt JK, Jones DR, Musgrove MT (2004). Airborne microorganisms during the commercial production and processing of Japanese quail. Int J Poult Sci 3: 242-7.
131. Oliveira MMM, Brugnera DF, Alves E, Piccoli HR (2010). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainlees steel surface and biotransfer. Potential Braz J Microbiol 41: 97-106.
<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v41n1/v41n1a16.pdf> (24.11.2011)
132. Ojeniyi B, Wegener HC, Jensen NE, Bisgard M (1996). *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. J Appl Bactriol 80: 395-401.
133. Parrett F, Crilly K (2000). Microbiological air monitoring. Int Food Hyg 10: 5-7.
134. Papper IL, Dowd SE (2009). Aeromicrobiology. In Environmental microbiology, 2nd ed. London: Academic Press, 85-101.
135. Pearce RA, Sheridan JJ, Bolton DJ (2006). Distribution of airborne microorganisms in commercial pork slaughter processes. Int J Food Microbiol 107: 186-91.
136. Peccio A, Autio T, Korkeala H, Rosmini R, Trevisiani M (2003). *Listeria monocytogenes* occurence and characterization in meat-producing plants. Lett Appl Microbiol 37: 234-8.

137. Petran RL, Zottola EA (1989). A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes*. J Food Sci 54: 458-60.
138. Pine L, Malcom GB, Brooks JB, Daneshvar MI (1989). Physiological studies on the growth and utilization of sugars by Listeria species. Can J Microbiol 35: 245-54.
139. Pitchard TJ, Flanders KJ, Donnelly CW (1995). Comparision of the incidence of listeria on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. Int J Food Microbiol 26: 375-84.
140. Prendergast DM, Daly DJ, Sheridan JJ, McDowell DA, Blair IS (2004). The effect of abattoir design on aerial contamination levels and the relationship between aerial and carcass contamination levels in two Irish beef abattoirs. Food Microbiol 21: 589-96.
141. Potel J (1952). Zur Granulomatosis infantiseptica. Zentralbl Bakteriol I Orig 158: 329-31
142. Posch J, Feierl G, Wuest G, et al. (2006). Transmission of *Campylobacter spp.* in a poultry slaughterhouse and genetic characterisation of the isolates by pulsed-field gel electrophoresis. Br Poultry Sci 47: 286-93.
143. Rahiko MT, Korkeala HJ (1997). Airborne bacteria and carcass contamination in slaughterhouses. J Food Prot 60: 38-42.
144. Reck M, Larsen PS, Ullum U (2002). Particle deposition in low-speed, high turbulence flows. Atmospheric Environ 36: 4801-9.
145. RenTJ, Frank JF (1992). Measurement of airborne contamination in two commercial ice cream plants. J Food Prot 55: 43-47.
146. Riedo FX, Pinner RW, Tosca ML, et al. (1994). A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. J Infect Dis 170: 693-6.
147. Rivera-Betancourt M, Shackelford SD, Arthur TM et al. (2004). Prevalence of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. J Food Prot 67: 295-302.
148. Rocourt J, Boerline P, Grimont F, Jacquet C, Piffareti JC (1992). Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi* with a revised description of *Listeria grayi*. Int J Syst Bacteriol 42: 171-4.

149. Rocourt J, Hogue A, Toyofuku H, Jacquet C, Schlundt J (2001). *Listeria* and listeriosis: risk assessment as a new tool to unravel a multifaceted problem. Am J Infect Control 29: 225-7.
150. Romanova Na, Gamande PV, Brovko LY, Griffiths MW (2007). Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. J Microbiol Meth 71: 231-7.
151. Rørvik LM, Ase B, Alvestad T, Caugant DA (2000). Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in seafoods and seafood-processing plants. Appl Environ Microbiol 66: 4770-784.
152. Rørvik LM, Ase B, Alvestad T, Caugant DA (2003). Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in broilers and poultry products. J Appl Microbiol 94: 633-40.
153. Ryser ET, Marth EH. Listeria, listeriosis and food safety (2007). New York: Taylor&Francis Group.
154. Salustiano VC, Angrado NJ, Brandão SCC, et al (2003). Microbiological air quality of processing in dairy plants as evaluated by the sedimentation technique and a one-stage air sampler. Braz J Microbiol 34 (3): São Paulo.
155. Saunders BD, Durak MZ, Fortes E et al. (2006). Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* from natural and urban environments. J food Prot 69: 93-105
156. Schlech WF, Lavingne PM, Bortlussi RA, et al (1983). Epidemic listeriosis: evidence for transmissions by food. New Engl J Med 308: 203-6.
157. Schlech WF, Acheson D (2001). "Foodborne listeriosis". Clin Infect Dis 31: 770-5.
158. Senczek D, Stephan R, Untermann F (2000). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. Int J Food Microbiol 62: 155-9.
159. Sim J, Hood D, Finne L, et al. (2002). Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. Lett Appl Microbiol 35: 409-13.
160. Sinde E, Carballo J (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluoroethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. Food Microbiol 17: 439-47.

161. Smith MA, Takeuchi K, Brackett RE et al. (2003). Nonhuman primate model for *Listeria monocytogenes*-induced stillbirths. *Infect Immun* 71:1574-79.
162. Smoot LM, Pierson MD (1998). Influence of environmental stress on the kinetics and strength of attachment of *Listeria monocytogenes* Scott A to Buna-N rubber and stainless steel. *J Food Prot* 61: 1286-92.
163. Shelef LA (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef of liver during storage at 4 °C and 25 °C. *J Food Prot* 52: 379-83.
164. Sofos JN, Kochevar SL, Bellinger MGR, Buege DR, Hancock DD, Ingham SC, Morgan JB, Regan JO, Smith GC (1999 a). Sources and extent of microbiological contamination of beef carcasses in seven United States slaughtering plants. *J Food Prot* 62: 140-5.
165. Sofos JN, Kochevar SL, Regan JO, Smith GC (1999 b). Extent of beef carcass contamination with *Escherichia coli* and probabilities of passing U.S. regulatory criteria. *J Food Prot* 62: 234-8
166. Sorrells KM, Enigl DC (1990). Effect of pH, acidulant, sodium chloride, and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J Food Safety* 11: 31-7.
167. Southwick FS, Purich DL (1996). Intracellular pathogenesis of listeriosis. *N Engl J Med* 334: 770-6.
168. Spurlock AT, Zottola EA (1991). The survival of *Listeria monocytogenes* in aerosols. *J Food Prot* 54: 910-2.
169. Stetzenbach LD, Buttner MP, Cruz P (2004). Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Curr Opin in Biotechnol* 15: 170-4.
170. Svenum WH, Moberg LJ, Rude R, et al (1992). Microbiological monitoring of the food processing environment. In Vandezant C, Splitstoesser DF (eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* 3. APHA, Charpter 3: 51-75.
171. Sutton GHC (2004). Enumeration of total airborne bacteria, yeast and mold contaminations and identification of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria* spp., *Salmonella* spp., and *Staphylococcus* spp. in beef and pork sloughter facility. Gainesville: University of Florida. Doktorska diseratcija.
172. Thévenot D, Dernburg A, Vernozy-Rozand C (2006). An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *J Appl Microbiol* 101: 7-17.

173. Thévenot D, Delignette-Muller ML, Christieans S, Vernozy-Rozandc C (2005). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *Int J Food Microbiol* 102: 85-94.
174. Tienungoon S, Ratkowsky DA, McMeekin TA, Ross T (2000). Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Appl Environ Microbiol* 66: 4979-87.
175. Theunissen HJ, Lemmens-den Toom NA, Burggraaf A, Stoltz E, Michel MF (1993). Influence of temperature and relative humidity on the survival of *Chlamidia pneumoniae* in aerosols. *Appl Environ Microbiol* 59: 2589-93.
176. Todor K (2011) *Listeria monocytogenes*. In: Todor's online textbook of bacteriology. Madison Wisconsin: K Todor, 1-3
<http://textbookofbacteriology.net/Listeria.html> (21.10.2011)
177. Tompkin RB (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J Food Prot* 65: 709-25.
178. Tompkin RB, Scott VN, Bernard DT, Sveum WH, Gombas KS (1999). Guidelines to prevent post-processing contamination from *Listeria monocytogenes*. *Dairy Food Environ Sanit* 19: 551-62.
179. Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, et al. J (2001). Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 584-640.
180. Vogel BF, Huss HH, Ojeniyi B, Ahrens P, Gram L (2001). Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmonon procsing plants by DNA-based typing methods. *Appl Environ Microbiol* 67: 2586-95.
181. Quin PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR (2002).Clinical veterinary microbiology. Edinburgh: Mosby, 170-4.
182. Quin PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR (2002). Clinical Veterinary microbiology. London: Mosby, 170-174.
183. Weis J, Seeliger HPR (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in Nature. *Appl Microbiol* 30: 29-32.
184. Wehr HM (1987). *Listeria monocytogenes*: a current dilemma. *J Assoc Off Anal Chem* 70: 769-72.

185. Welshimer HJ, Meredith AL (1971). *Listeria murrayi* sp. n.: a nitrate-reducing mannitol-fermenting listeria. Int J Syst Bacteriol 21: 3-7.
186. Wesly IV (1993). *Listeriosis* in animals. In Ryser ET (ed.): *Listeria listeriosis, and food safety*. New York: Marcel Dekker, 39-73.
187. Willcox F, Tobback P, Hendrickx M (1994) Microbial safety assurance of minimally processed vegetables by implementation of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) system. Acta Aliment 23: 221-38.
188. Witschger O, Grinshpun SA, Favel S, Bass G (2004) Performance of personal inhalable aerosols samplers in very slow moving air when facing the aerosols source. Ann Occup Hyg 48: 351-68.
189. Whyte P, Collins JD, McGill K, Monahan C, O'Mahony H (2001). Distribution and prevalence of airborne microorganisms in three commercial poultry processing plants. J Food Prot 64: 388-91.
190. Worrel RC, Sofos JN, Smith GC, Schmid GR (1996). Airborne bacterial contamination in beef slaughterin-dressing plants with different layouts. Food Environ Saint 16: 440-3.
191. Zhang G, Ma L, Oyarzabal OA, Doyle MP (2007). Aerosol Studies with *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. J Food Prot 8: 1857-65.
192. Zdovc I, Zelenik K, Pate M, et al.(2008). A case of cutaneous listeriosis in a man. In: 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, Spain, 19-22 April 2008. *Abstracts on CD-ROM*, (Clinical Microbiology and Infection, Vol. 14, Suppl. 7). [S. l.]: Marathon International: ECCMID, cop. 2008, p646.
193. Zorman T, Jeršek B (2008). Assessment of Bioaerosols concentrations in Different Indoor Environments. Indor and Built Environmental 17 (2): 155-63.