



МИНИСТЕРСТВО НА ЗДРАВЕОПАЗВАНЕТО

**НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ОПАЗВАНЕ НА ОБЩЕСТВЕННОТО ЗДРАВЕ**

Директор на НЦООЗ

Бул. „Акад.Иван Гешов” №15

Тел: +359 2/ 8056 261

Ст.н.с. д-р Стефка Петрова, дм

1431 София

Факс: +359 2/ 954 11 14

E-mail: [s.petrova@ncphp.government.bg](mailto:s.petrova@ncphp.government.bg)



# **БЪЛГАРСКИ НАЦИОНАЛНИ КРИТЕРИИ ЗА МИКРОБИОЛОГИЧНА БЕЗОПАСНОСТ НА ХРАНИТЕ**

## **СТАНОВИЩЕ**

**От доц. д-р Росица Еникова, дм, зав.лаборатория „Микробиология на храните”  
към НЦООЗ**

**София, 2009 г.**

## СЪДЪРЖАНИЕ

	Стр.
УВОД	4
ПРЕГЛЕД НА ДОСЕГАШНАТА НАЦИОНАЛНА НОРМАТИВНА УРЕДБА	5
ПРОЕКТ НА СЪВРЕМЕННИ НАЦИОНАЛНИ КРИТЕРИИ ЗА МИКРОБИОЛОГИЧНА БЕЗОПАСНОСТ НА ХРАНИТЕ	7
МИКРОБИОЛОГИЧНИ КРИТЕРИИ ЗА БЕЗОПАСНОСТ НА ХРАНИТЕ	10
• <i>Salmonella</i> и салмонелози	11
• <i>Campylobacter</i> и кампилобактериози	12
• Веротоксигенни <i>Escherichia coli</i> (VTEC)	13
• <i>Mycobacterim, Brucella, Yersinia, Vibrio</i>	14
• <i>Shigella</i> и бактериална дизентерия	14
• <i>Listeria monocytogenes</i> и листериози	15
• <i>Staphylococcus aureus</i> и стафилококови ентеротоксикози	17
• <i>Clostridia</i> и заболявания от тях	18
• <i>Enterobacter sakazakii</i>	19
МИКРОБИОЛОГИЧНИ КРИТЕРИИ ЗА ХИГИЕНАТА НА ПРОЦЕСИТЕ. ИНДИКАТОРНИ МИКРООРГАНИЗМИ В ХРАНИТЕ	20
ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА НА ИНДИКАТОРНИТЕ МИКРООРГАНИЗМИ	22
МИКРОБИОЛОГИЧНИ КРИТЕРИИ ЗА БЕЗОПАСНОСТ И ЗА ХИГИЕНАТА НА ПРОЦЕСИТЕ В РАЗЛИЧНИ ГРУПИ БЪЛГАРСКИ ХРАНИ	28
• Зърнени храни и продукти на тяхната преработка	28
• Маслени и емулсионни продукти	27
• Плодове, зеленчуци и продукти на тяхната преработка	30
• Хранителни концентрати (сухи супи, бульони, сосове, ястия)	31
• Захарни и сладкарски изделия	32
• Пчелен мед	33
• Готови ястия и кетъринг-продукция	33
• Растителни подправки и дроги	33

• Кафе, чай	36
• Безалкохолни и слабо алкохолни напитки	36
• Боза	36
• Хранителни добавки (суплементи)	38
• Технологични добавки в храните (адитиви), стартерни култури	38
• Детски храни	39
МЕТОДИ ЗА МИКРОБИОЛОГИЧЕН АНАЛИЗ	40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	41

# БЪЛГАРСКИ НАЦИОНАЛНИ КРИТЕРИИ ЗА МИКРОБИОЛОГИЧНА БЕЗОПАСНОСТ НА ХРАНИТЕ

## УВОД

До 2006 г. в европейската практика по правило не се прилагаха международни микробиологични критерии и норми за храни. Това се дължеше на много фактори – различия в националните и културни традиции в храненето на различните народи и етноси, в производството на храни и кулинарните практики, в организацията на контрола в отделните страни. В тази област се разчиташе изцяло на националното законодателство. Малко изключение от това правило бяха някои препоръчителни микробиологични критерии на Codex Alimentarius за сухи млека, сухи детски храни, пастьоризирани яйчни продукти, сладолед и пр., разработвани още през 70-те години на XX век <sup>[36]</sup>, публикувани и по-късно в различните последващи издания на Кодекса.

През 2005 г. в Европейското законодателство бе утвърден Регламент ЕО 2073/2005 г., който е първи по рода си международен нормативен документ, задължаващ страните-членки на Европейската общност да използват хармонизирани критерии за микробиологична безопасност и за хигиената на технологичните процеси <sup>[27]</sup>. Две години по-късно той бе допълнен с Регламент ЕО 1441/2007, който уточни някои допълнителни конкретни нормативи <sup>[28]</sup>. Двата Европейски регламента се прилагат в България от момента на нейното влизане в ЕС.

Обекти на Регламенти ЕО 2073/2005 и 1441/2007 <sup>[27,28]</sup> са микробиологичните критерии за безопасност на продуктите от животински произход (месни, млечни, рибни, продукти с яйца). От тези с неживотински произход двата Регламента съдържат критерии само за покълнали семена, сурови нарязани плодове и зеленчуци и непастьоризирани плодови сокове (тип «фреш»). Животинските храни бяха нормирани по актуални микробиологични критерии, с план за вземане на проби, указания за референтните методи за анализ, с посочване на мястото на контрола в хранителната верига, с разграничение между показателите за безопасност и тези за оценка на хигиената на процесите, с указания за предприеманите мерки при несъответствия.

След влизането в сила на тези международни нормативни документи у нас се получи голям дисонанс в практиката на хигиенния контрол. Проблемът е в това, че останалите групи храни, които съгласно Закона за храните <sup>[11]</sup> в България се наблюдават от органите на здравеопазването, останаха без съвременни европейски

микробиологични критерии и изисквания. Създаде се нормативен вакуум, който пречи на органите на официалния контрол да взема ефективни решения и да прилага мерки, ограничаващи риска от биологични опасности.

Производителите на неживотински храни също бяха съществено затруднени в изпълнение на отговорностите си към безопасността. Опитите за попълване на нормативния вакуум чрез залагане на микробиологични критерии и норми в технологичните документации на произвежданите продукти в голямата си част са неуспешни. Не винаги бизнес операторите имат необходимата подготовка и компетентност при подбора на показателите, служат си със стари норми, преписват ги по аналогия от други продукти. Такива фирмени „норми“ изобилстват с грешки и неадекватни изисквания, не съответстващи на характера на продукта и неговата технология, на потенциалните и реални микробиологични опасности.

## **ПРЕГЛЕД НА ДОСЕГАШНАТА НАЦИОНАЛНА НОРМАТИВНА УРЕДБА**

Неживотинските храни досега се контролираха у нас все още по български национални нормативи, обозначени в Наредба № 31 от 2004 г. на МЗ и МЗХ (Приложение 1 към чл. 9, таблици 9, 9а и 9б) <sup>[17]</sup>. В тази Наредба таблиците с микробиологичните критерии и норми са заимствани, т.е. буквално препечатани, от отменената стара Наредба № 5 на МНЗ за пределно допустимите количества химични и биологични замърсители в хранителните продукти от далечната 1984 година (ДВ, бр. 39/1984 г. - Сл.бюл. на МЗ, бр. 7, 1984 г.). <sup>[15]</sup>

Безусловно, тези стари норми не можеше повече да съществуват в практиката на контрола върху храните в България. Те бяха разработени въз основа на изискванията на Българските държавни стандарти от 70-те и 80-години на отминалото ХХ столетие и съдържаха анахронични, често рестриктивни изисквания към храните, без обаче адекватно да отразяват същността на риска от биологични контаминанти при съвременното социално и икономическо развитие, променените условия на производство, търговия, свободно движение на стоки и т.н. По-конкретно недостатъците на цитираната Наредба 31 можем накратко да формулираме, както следва :

- Голямата ѝ част е посветена на храни от животински произход, които с влизането в сила на горесцитираните два Регламента на ЕС вече са обект на

международно, европейско нормиране, следователно тези раздели от Наредбата автоматично отпадат;

- Номенклатурата на храните, за които са посочени показатели и норми, е много бедна и не обхваща съвременното разнообразие от групи храни и техни асортименти;
- В Наредба 31 няма диференциране между индикаторните и патогенните микроорганизми, съответно като показатели за хигиена на процесите на производство и като директни показатели за безопасност на храните;
- В Наредба 31 не фигурират особено актуалните показатели за безопасност и за хигиена на процесите - патогенните и индикаторни микроби като например *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* и пр.;
- Не са посочени референтни методи за анализ по отделните микробиологични критерии ;
- Нормите са разработени за единични проби; отсъства план за вземане на проби, а именно : **n** (задължителен брой проби за окачествяване на партида); **c** ( допустим брой проби с отклонения от нормата) ; **m** (нормата, определена за всеки микробиологичен критерий) ; **M** (допустимото отклонение от тази норма);
- Не се съдържат указания за характера на корективните действия, необходими при незадоволителни резултати от микробиологичния контрол;
- В Наредбата има някои твърде рестриктивни изисквания по отделни показатели. Конкретни примери за това ще посочим по-нататък в изложението.

Липсата на диференциране между показателите за безопасност и тези за хигиена на процесите, в комбинация с отсъствието на план за вземане на проби, бе предпоставка за често вземане на нелогични, неадекватни решения за големи партии храни въз основа на отклонения от един единствен индикаторен показател – например „общ брой на аеробните мезофилни микроорганизми”, „Coliforms” и др. Вместо да бъдат предприемани корективни действия на технологичните процеси и/или на хигиената на производство, партидите се изнемваха от пазара, без по същество да носят реален риск за здравето на населението, а това неизбежно носи големи и неоправдани икономически загуби на бизнес-операторите.

На практика след влизането в сила на двата микробиологични Регламента

извън обсега на хигиенното микробиологично нормиране останаха големи групи храни, например :

- зърнени храни и продукти на тяхната преработка;
- мазнини, маслени и емулсионни продукти;
- плодове, зеленчуци, гъби, кореноплодни, ядки и продукти от тяхната преработка;
- стерилизирани консерви ;
- готови ястия и кетъринг-продукция ;
- захарни и сладкарски изделия;
- детски храни, които не са на млечна основа;
- хранителни добавки;
- стартерни култури и други технологични добавки;
- безалкохолни напитки, включително боза;
- и др.

Тези и още други важни мотиви направиха наложително създаването на национални микробиологични критерии за хранителни продукти, които да запълнят нормативния вакуум в областта на биологичните контаминанти и да послужат както на контролните органи, така и на бизнес-операторите при производството и търговията с храни на вътрешния и външен пазар, включително и при вноса от трети страни.

## **ПРОЕКТ НА СЪВРЕМЕННИ НАЦИОНАЛНИ КРИТЕРИИ ЗА МИКРОБИОЛОГИЧНА БЕЗОПАСНОСТ НА ХРАНИТЕ**

През 2009 г. окончателно приключихме с разработката на български национални микробиологични критерии за хранителни продукти, подготвени под формата на проект на **Методично указание** <sup>[14]</sup>, предназначено да ползва както основните отговорни за безопасността на храните бизнес-оператори – производители и търговци, така и органите на официалния контрол.

Обект на този проект са главно храните от неживотински произход и някои други като детски храни, готови ястия, стерилизирани консерви, пчелен мед, подправки, стартерни култури, ензимни препарати, хранителни добавки, национални продукти като например бозата, и др., за които досега не е имало адекватно национално нормиране, няма и международен нормативен документ.

Разработеното **Методично указание** има за цел да попълни така създалия се вакуум в националната нормативна уредба по отношение на биологичните контаминанти в гореизброените храни. В документа е използвана методологията на съвременното микробиологично нормиране с неговите основни принципи, отразени в Регламент ЕО 2073/2005, документи на Codex Alimentarius, SANCO [10, 24, 27]. Формулирани са микробиологичните критерии за безопасност, които се изследват по цялата хранителна верига до края на сроковете на трайност на храните и най-вече в търговската мрежа. Посочват се също така и критериите за хигиена на процесите, приложими в контрола на технологията и хигиената на процесите. Определени са референтните хоризонтални международни и български стандартни микробиологични методи за контрол на неживотинските храни.

При разработката на **Методичното указание** [14] сме се ръководили от основните принципи за установяване и приложение на микробиологични критерии в храните, поставени от Codex Alimentarius [24]. В цитирания документ се казва, че критериите се използват за формулиране на основните изисквания към суровините, съставките и крайния продукт на всеки от етапите от хранителната верига. Освен това те могат да бъдат прилагани за верифициране на ефикасността на НАССР-системите и Добрата хигиенна практика. Могат да се прилагат както от контролните органи, така и от бизнес-операторите. Критериите трябва да бъдат технически постижими при приложението на Добра технологична практика. Основните изисквания към тях са да отразяват или да имат предвид :

- реалните и/или актуалните опасности за здравето;
- микробиологичното състояние на суровините;
- ефекта на обработката върху микрофлората на продукта;
- евентуалните последствия от размножаването на остатъчната или вторично внесена микрофлора при съхранението и използването на продукта;
- консуматора, за който е предназначена храната;
- последствията от приложението на критерия;
- начина на използване на храната.

Представеното **Методично указание** включва най-голямата и най-значима група биологични агенти – бактериите и микроскопичните гъбички (дрожди и плесени). Вирусите, паразитите, алгите, едноклетъчните паразити, хелминтите и биотоксините са извън обсега на проекта поради различията в методологията и



организацията на диагностиката и по-ограничената актуалност за здравето на населението в нашия географски регион.

В навечерието на 1 януари 2006 г., когато влезе в сила първият международен микробиологичен Регламент 2073/2005 <sup>[27]</sup>, Европейската комисия, Директорат D (Direction D-Sécurité alimentaire : chaines de production et de distribution), отдел D2 (Risques biologiques) се обърна към колегията от страните-членки с писмо с предмет на обсъждане – степента на хармонизация на европейските микробиологични критерии спрямо националните критерии <sup>[26]</sup>. В писмото-обръщение се казва, че страните-членки могат прилагат национални микробиологични критерии в случаите, когато те не противоречат на общоевропейските, не пречат на тяхното приложение и не са рестриктивни. В същото обръщение се уточнява, че критериите за хигиена на процесите не могат да бъдат бариера пред международното търговия в ЕО (б.а. - поради това, че се прилагат превантивно, преди изнасянето на хранителната продукция на пазара). Що се отнася до критериите за безопасност, то страните-членки имат правото да преценят необходимостта от приложението им. Впоследствие Европейската комисия може да предприеме нотифицирането на такива национални критерии и да допълва Регламентите с тях по начин, не ограничаващ обаче свободното движение на стоки. В представения проект с национални микробиологични критерии ние се придържаме към тези основни положения <sup>[26]</sup>.

Разработените и представени в **Методичното указание** микробиологични критерии и норми са резултат от десетилетия научно-изследователска работа в областта на микробиологичното нормиране на храните от лаборатория „Микробиология на храните” при НЦООЗ <sup>[13, 6, 7, 32]</sup>, обобщаване на опита на други страни, изложен в съвременната научна литература, компетентните становища на международни организации и институции като ICMSF, EFSA, SANCO, Codex Alimentarius, ЕНІА и пр.

Считаме, че въз основа на казаното по-горе мотивите за разработване и внедряване на национални микробиологични критерии са ясни и добре обосновани. Конкретните мотиви за определянето на микробиологичните критерии за отделните групи храни ще представим в хода на по-нататъшното изложение.

## МИКРОБИОЛОГИЧНИ КРИТЕРИИ ЗА БЕЗОПАСНОСТ НА ХРАНИТЕ

На първо място следва да се спрем върху микроорганизмите, приети като показатели за безопасност. Това са тези микроби, чието присъствие и възможно размножаване в храните представлява съществен риск от бактериални хранителни заболявания. В основата на тяхното нормиране се поставят резултатите от оценката на риска [68, 37, 77, 78, 79, 80]. Тази оценка е сложен процес, включващ за биологичните агенти задължително надзора и оценката на :

- Заболеваемост
- Смъртност
- Природен биотоп на микроба
- Биологични свойства на микроба
- Патогенност, вирулентност, токсинообразуване
- Разпространение на микроба в храните и в околната среда
- Възможности за размножаване на микроба в конкретни видове храни
- Инфекциозни дози, необходими за възникване на клинично изразено заболяване
- Носителство – реконвалесцентно, здраво
- Уязвими популации сред населението – детски, възрастни контингенти, имунокомпрометирани лица

В областта на биологичните контаминанти засега не се осъществява количествена оценка на риска, въпреки че такава потребност назрява, но научните основи и методологията са на фаза обсъждане и още не са разработени и приети [40].

Заболеваемостта от хранителни инфекции, токсикоинфекции и интоксикации в нашата страна е ниска. През 2008 г. у нас са регистрирани официално 17 взрива – главно по вина на заведения за обществено хранене (хранителни блокове в детски и учебно-възпитателни заведения, столове, ресторанти), следвани от продукти от търговската мрежа и на последно място – храна, приготвена в домашни условия. Общият брой на болелите е 181, смъртни случаи няма. Лабораторно са потвърдени 12 взрива – 7 от *Salmonella*, два от *Trichinella* и три случая от други микроорганизми. При 4 взрива (т.е. в ¼ от случаите) причинителят на заболяването не е известен. Най-чести са заболяванията след консумация на месо и месни изделия, следвани от ястия с яйца, риба, сладкарски продукти. Извън статистиката са единични случаи на ботулизъм, при консумация обичайно на домашно приготвени консерви. През 2007 и

2006 г. са регистрирани съответно 22 и 24 взрива, при аналогична етиологична и епидемиологична характеристика.

Както в повечето страни, това очевидно е „върхът на айсберга” – в повечето случаи при хранителни инциденти регистрацията на заболяванията е много ограничена.

В страната няма регистрирани случаи на тревожните в последното десетилетие заболявания като трансмисивни спонгиформни енцефалопатии, птичи грип, хеморагична треска и пр. Не са наблюдавани и хранителни листериози.

### **Salmonella и салмонелози**

Водещо място в етиологията на хранителните заболявания в света и в Европа заемат нетифните представители на рода *Salmonella*, причинители на токсикоинфекции с полиморфна клинична картина – от безсимптомно носителство до тежки генерализирани форми, нерядко с фатален изход или с тежки усложнения [23]. Известно е разпространението на салмонелите в природата – техен биотоп е чревният тракт на много от свободно живеещите животински видове – риби, земноводни, рептилии, птици, млекопитаещи, както и домашните животни, като човекът заема междинно място в сложния им кръговрат в природата. Заболяванията, предизвиквани от салмонели, се отнасят към зооантропонозите и са най-често регистрираните предавани по хранителен път токсикоинфекции [23, 29, 30, 77, 81]. Така например за периода 2001 – 2006 години в Европа са регистрирани 1 091 132 случая на салмонели, изолирани от хора, предимно заболели. Само за 2005 г. в Европа са регистрирани общо 3 406 взрива от хранителни салмонелози, заемащи 63,6 % от общия брой на хранителните взривове в Общността. За 2006 г. взривове са 3 131, като заемат 53,9 % от общия им брой в ЕО. Статистиката определя заболеваемостта в рамките на 38,1/100 000 население за 2005 г. и 34,6/100 000 за 2006 г.. Най-често доказваните серовари в тази част на света са *S.enteritidis* и *S.typhimurium*. У нас в салмонелозите също заемат водещо място сред взривове от хранителни заболявания. През 70-те и 80-те години на XX век сме наблюдавали и участвали в диагностиката на тежки и драматични масови взривове главно от *S.enteritidis* - около 1000 заболели с 1 exitus в гр. Ловеч след консумацията на телешки суджук от местния месокомбинат, не преминал през пълноценен процес на зреене (1976 г.) ; около 250 заболели в с. Рила от кебапчета, консумирани на сватбено тържество (1974 г.); няколко взрива от яйчен сладкарски десерт в луксозен ресторант в гр. София, в който пострадалите са

студенти-медици на абсолвентски бал; няколко взрива от белтъчен яйчен крем във вафлени пури, продавани около пътуващ цирк от частен производител в различни населени места; взрив от крем-супа, застроена с яйца, сред пациентите на гастроентерологично отделение на столична университетска болница; взрив сред чужди граждани, гости на луксозен Пловдивски хотел, от палачинки с пилешко месо и пр. През последните години у нас има тенденция към ограничаване на броя на пострадалите.

Безусловно, в предаването на салмонелозите водеща роля носят животинските храни – птиче месо от бройлери и пуйки, изделия с яйца, месо от едри и дребни преживни животни, свине, сирена [29, 30, 31, 77]. Те се заразяват със салмонела първично – при бактериемия попадат в месото на закланите животни, при салмонелозни оофорити – в яйчното съдържимо, а още по-често – върху черупките на яйцата при снасянето им през клоаката на птиците. Излъчвани в околната среда чрез фекалиите и урината, салмонелите могат да попадат в хранителните продукти и вторично, и по пътя на кръстосаното контаминиране. Могат да се пренасят навсякъде от диви и синантропни гризачи, от насекоми. Човекът може да бъде носител на салмонели, включително и безсимптомен, и при нарушения на правилата на личната хигиена да инфектира вторично всякакъв род храни – и животински, и неживотински. Поради това почти няма група храни, в които попадането на салмонелите да е изключено. Имаме например случай с доказване на салмонели в сухи растителни дроги (*Mentha Piperita*), съхранявани в склад, разположен в близост до птицеферма.

Казаното дава основание голямата част и от неживотинските храни да бъдат контролирани по този основен показател за безопасност, което е намерило отражение в разработеното **Методично указание**. Естествено, в детските храни салмонелите заемат първото място сред показателите за безопасност [81].

### **Campylobacter и кампилобактериози**

На второ място по риск от бактериални хранителни заболявания през последните години се сочи *Campylobacter*. През 2005 г. например в Европа той заема първото място, изпреварвайки салмонелозите по брой на случаите. Регистрирани са 200 122 случая или 51,7/100 000 население [29]. За 2006 г. случаите в Европа са 176 013 или 46,1/100 000 население [30]. Относителният дял на взривовете от *Campylobacter* през 2005 г. е 9,2 % (494 взрива), а през 2006 г. – 6,9 % (400 взрива). Европейските страни посочват различно разпространение на кампилобактериозите – от 302,7/100 000 в Чехия

до 0,1/100 000 в Полша за 2005 г., което очевидно се дължи на различия в нивото на диагностиката в отделните страни на ЕС. У нас официално не са регистрирани взривове от *Campylobacter*.

Широко разпространени в природата с носителство при животните и птиците, както и човека, бактериите от рода *Campylobacter* са причина за заболявания почти изключително от животински храни – месото на всички домашни животни и птици, суровото мляко, при груби нарушения на хигиената, кръстосано контаминиране, консумация на недостатъчно термично преработени животински продукти. Независимо обаче от широкото разпространение през последните години на кампилобактериозите и от ниските инфекциозни дози, водещи до клинично изразено заболяване, този род бактерии не е дефиниран като показател за безопасност в храните дори от животински произход в двата Регламента на ЕО [27, 28]. Нямаме засега основания той да бъде включван и у нас в контрола на неживотинските храни, предмет на **Методичното указание** [14].

#### **Веротоксигенни *Escherichia coli* (VTEC)**

Все по-голям е интересът към веротоксигенните *Escherichia coli* (VTEC), представени най-често от сероварите 0157, 026, 0103, 091 и 0145. Освен *Shiga*-токсин, VTEC обикновено продуцират и фактори на вирулентност, които водят до развитие на инфекциозен процес у човека. Заболяванията протичат с хеморагична диария и тежки абдоминални болки, а често усложнение е хемолитичният уремичен синдром (HUS), водещ до анемични състояния, особено при децата. През 2005 г. в Европа са регистрирани 3 314 случая на заболявания от VTEC при хора (0,4/100 000 население), а през 2006 г. – 4 924 случая (1,1/100 000). В механизма на предаване основна е ролята на говеждото и овче месо, но така също и на пастьоризирано мляко, замърсена питейна вода, дори зеленчуци [20, 28]. Засега обаче Европейската комисия се въздържа от въвеждането на VTEC или *E.coli* 0157 в системния контрол върху храните. Регламенти ЕО 2073/2005 и 1441/2007 не включват такъв критерий в листата на показателите за безопасност [27, 28]. Експертите на Европейската комисия считат, че включването на VTEC не би повлияло на честотата на инфекцията. Изхождайки от степента на риска, нямаме засега основания да приемаме такъв показател в българските национални критерии за неживотински храни, още повече, че диагностиката им все още не се е наложила в лабораторната практика на страната ни.

### *Mycobacterim, Brucella, Yersinia, Vibrio*

Други актуални патогенни микроорганизми, причинители на заболявания по хранителен път, носят твърде ниска степен на риск в неживотинските храни в България.

Така например *Mycobacterium bovis*, освен че се предава само чрез животински храни, има много ограничено епидемично значение в Европа (заболеваемостта за 2005 и 2006 г. е  $<0,1/100\ 000$  население).

Аналогично е положението с бруцелозата, макар у нас през 2008 г. да бяха регистрирани няколко случая, резултат от трансграничен пренос на инфекцията от Гърция. В Европа за 2005 г. и 2006 г. е регистрирана заболеваемост  $0,2/100\ 000$  население, главно в страните на Пиренейския полуостров, Италия, Гърция, Кипър, където има традиции в отглеждането на дребен рогат добитък<sup>[29, 30]</sup>. При тази ограничена степен на риск няма основания за включването на *Brucella* в списъка на постоянните критерии за микробиологична безопасност на храните, особено неживотинските.

Ограничена степен на риск има и при *Yersinia enterocolitica*. През 2005 г. в Европа са регистрирани 9 взрива (0,2 %) и 9 630 случая на изолиране при хора ( $2,6/100\ 000$  население), главно при деца, предавани от замърсени с животински екскрети вода и храни. През 2006 г. броят на взривовете е 26 (0,4 %) с общо 8 983 случая ( $2,1/100\ 000$  население)<sup>[29, 30]</sup>. Засега няма също основания йерсиниите да бъдат наблюдавани като постоянни критерии за безопасност на храните с неживотински произход.

Засега Европейската комисия не счита за целесъобразно включването и на патогенните вибриони (*V.parahaemolyticus*, *V.vulnificus*, *V.cholerae*) в листата на наблюдаваните постоянно критерии за безопасност на храните. Това становище е обозначено в Регламент ЕО 2073/2005<sup>[27]</sup>. Заболеваемост от тези микроорганизми в Европа през последните години не е наблюдавана<sup>[29, 30]</sup>, по-скоро тя е актуална в страни с традиционно честа консумация на недостатъчно термично преработени морски продукти.

### *Shigella* и бактериална дизентерия

За разлика от гореизброените зооантропонози (зоонози), хранителните заболявания от *Shigella* са типични антропонози. Източник на заразата е човекът-

носител, а водещ епидемиологичен път на предаването им е фекално-оралният, като ролята на посредник изпълняват най-често водата, предметите на бита, преносът от мухи, а храните са механичен фактор на предаването и такова предаване е относително много рядко. У нас например има регистриран взрив от дизентерия сред войници във военно поделение (Божурище, Софийско), от консумацията на боза, произведена и заразена в гр. Сливница от замърсена питейна вода по време на голяма дизентерийна епидемия сред населението в града (1988 г.). Механизмът на замърсяване на храните с бактерии от рода *Shigella* очевидно е главно антропогенен. Но такъв род директно контаминиране е относително рядък, шигелните бактерии като правило не се размножават в храните, което ограничава степента на риск и не дава основания за включването на *Shigella* в листата на постоянно наблюдаваните микробиологични критерии за безопасност на храните. В Европейските страни взривите от *Shigella* са заемали съответно 0,6 % и 0,9 % от общия брой на хранителните заболявания през 2005 и 2006 г. [29, 30].

### **Listeria monocytogenes и листериози**

За разлика от изброените досега зоонози и антропонози, *Listeria monocytogenes* придоби особено голяма актуалност като причинител на масови и спорадични случаи от хранителни инфекции. Убиквитарното разпространение на микроба, значителната му устойчивост във външната среда, неочаквано широкото разпространение и в околната среда, и в различни храни – от животински и неживотински произход, тежестта на листериозите при човека, мотивират едно изострено внимание към патогенните листерии и включването на *L.monocytogenes* в списъка на задължителните критерии за безопасност при много храни, особено готовите за консумация. Съвременната научна литература изобилства с фактически материал по оценката на риска и все повече убеждава изследователите и контролиращите лаборатории в целесъобразността на този повишен интерес [20, 21, 25, 34, 69, 73, 78, 80]. За 2006 г. в Европа са регистрирани 1 588 случая на листериози у човека, през 2005 г. - 1 439, през 2004 г. – 1264, през 2003 г. 1 070, през 2002 – 909 и през 2001 – 910 случая. Това говори за ограничено, но нарастващо разпространение на инфекцията в развитите страни. Най-сериозни цифри дава Германия, следвана от Великобритания и Франция, т.е. страни, в които диагностиката на листериозите е на необходимото високо равнище. За много страни се предполага, че регистрираната заболеваемост от

листерии е само „върхът на айсберга”, както и при много други инфекции. У нас случаи на хранителни листериози не са регистрирани. Масовите взривове в европейските страни са само 5 за 2005 г. и 9 за 2006 г., основната маса случаи на листериози у човека са спорадични [29, 30]. Освен това, по-продължителният инкубационен период е препятствие пред диагностиката – инкриминираният продукт като правило не се открива или това е много трудно. Решаващи при оценката на риска са тежестта на листериозите и техните усложнения, както и високата смъртност, предимно у деца в ранна възраст, недоносени кърмачета, при имунокомпрометирани индивиди.

В някои храни *L.monocytogenes* може да се развива и размножава, включително при хладилни температури, което задълбочава сериозността на риска. Готовите за консумация храни (REF) се оценяват на тази база като стимулиращи или не развитието на този патогенен агент. Разработена е и методология за оценка на риска от размножаването на микроба в този тип храни [20, 21, 73, 80]. Трябва да имаме предвид, че готовите за консумация храни (REF) са извънредно разнообразни, на животинска и на растителна основа, и в това отношение определянето на *L.monocytogenes* като критерий за безопасност трябва да бъде строго оценявано [80]. Там, където характерът на технологичната обработка предполага минимална вероятност от инфектиране, надеждно унищожаване на микроба и елиминиране на риска от вторично замърсяване, то неговото изследване при текущ контрол е безпредметно. Върху това обръщат внимание Регламенти ЕО 2073/2005 и 1441/2007. Според забележките под таблиците към Приложение 1 на Регламентите [27, 28] няма нужда от контрол на *L.monocytogenes* в храни, преминали през висока температурна обработка, хлебопекарни изделия, бисквити, захарни, какаови и шоколадови изделия, пчелен мед, бутилирани води, безалкохолни и ниско алкохолни напитки. Конкретно за храните, преминали през сериозна термична обработка, бихме посочили стерилизираните консерви, обработените по УНТ-методи плодови сокове и млечни продукти, топлинно пулверизационно и барабанно сушени храни, варени, печени, пастьоризирани при температури над 80°C храни [10].

Към продуктите (REF), които не представляват благоприятна среда за развитието на *L. monocytogenes*, се отнасят преди всичко такива с  $pH \leq 4,4 - 5,0$ ; с  $a_w \leq 0,92 - 0,94$  или продукти със срок на трайност по-малък от 5 дни [27, 28]. Има и други категории продукти, неблагоприятни за растежа и развитието на микроба, но в тези



случаи се изисква специална научно обоснована мотивировка. Например в българското кисело мляко *L. monocytogenes* загиват не по-късно от 48 часа след заквасването <sup>[19]</sup>, а предварителната пастеризация на млякото преди заквасване при 95°C със задръжка 15-30 min априори гарантира нейното отсъствие. Изолираните в България *L. monocytogenes* са от комбинирани салати, сандвичи и от месни и млечни продукти с кратък и недостатъчен срок на зреене.

В разработения проект на **Методичното указание** с българските национални микробиологични критерии <sup>[14]</sup> *L. monocytogenes* като показател за безопасност фигурира в много групи храни, главно предназначени за директна консумация : в сурови охладени, замразени и/или сушени плодове и зеленчуци, в готови ястия и кетъринг-продукция, в ордъври, салати и сандвичи, които като правило са многокомпонентни храни, в бозата, в някои специални продукти като храни-добавки, ензимни препарати, комбинирани подобрители за храни, стартерни млечнокисели култури, и задължително – във всички детски храни, независимо от обработката (топлинно сушене и пр.). *L. monocytogenes* не подлежат на наблюдение във всички стерилизирани консерви (включително и детските), в безалкохолните и слабоалкохолни напитки, в хлебопекарните изделия, в маслените и емулсионните продукти, в готварските подправки, в плодovите и зеленчукови полуфабрикати, предназначени за висока температурна обработка.

### **Staphylococcus aureus и стафилококови ентеротоксикози**

Много интересни сред показателите за безопасност на храните са коагулазоположителните стафилококки или *Staphylococcus aureus*. В българската традиционна нормативна база – БДС, наредби и пр., патогенните (коагулазоположителните) стафилококи винаги са били третираны като облигатно патогенен причинител на хранителни заболявания с много строги, рестриктивни нормативни изисквания. В месните и част от млечните и сладкарски продукти нормативът бе – отсъствие в 1,0 g от продукта ; в други млечни храни, сладоледи, във вафли и нетрайни сладкарски изделия се изискваше отсъствие на патогенни стафилококи в 10,0 g от продукта <sup>[15, 17]</sup>. В двата Европейски Регламента ЕО 2073/2005 и 1441/2007 коагулазоположителните стафилококи се третират категорично само като критерии за хигиената на процесите – в сиренà и термично обработени готови за консумация ракообразни и черупкови морски мекотели. Критерий за безопасност обаче

са стафилококовите ентеротоксини, които се изследват директно в продуктите [27, 28]. Трябва със съжаление да отбележим, че в практиката на лабораториите, извършващи официалния текущ контрол у нас, методите за директно откриване на стафилококовите ентеротоксини още не са намерили повсеместно приложение, поради което в настоящия етап се въздържа от включването им в листата на биологичните критерии за безопасност.

Стафилококите у нас са на второ място сред причинителите на взривове от хранителни заболявания – от готови многокомпонентни ястия, ордъври и салати, от нетрайни сладкарски изделия и др. асортименти. Те най-често са резултат на вторично контаминиране на храните от носители – в горните дихателни пътища и ръцете на персонала на хранителните обекти, но могат да се предават и чрез животинските продукти – мляко, месни полуфабрикати, рибни, яйчни продукти и пр. В сборно сурово изкупваемо мляко винаги има находка на коагулазоположителни стафилококи, едно от последствията от мастита при животните. Устойчиви в околната среда, осмоотолерантни и развиващи се при по-високи концентрации на готварска сол и захари, те носят определен риск от хранителни заболявания. Касае се всъщност за типични случаи на хранителни интоксикации - следствие от размножаването на коагулазоположителните стафилококи в храните и екскрецията на ентеротоксини, които са известни в медицинската практика много отдавна [67, 72]. Европейската статистика поставя взривите от стафилококови заболявания на трето място по честота след салмонелозите и кампилобактериозите : 164 взрива за 2005 и 236 за 2006 г., респ. 3,1 % от взривите за 2005 г. и 4,1 % от взривите за 2006 г. [29, 30].

В нашия проект на национални микробиологични норми коагулазоположителните стафилококи се третираат като показатели за безопасност при определени групи храни – само в детските продукти и в сладкарските и десертни изделия. За останалите видове храни **Методичното указание** предвижда контрола върху коагулазоположителните стафилококи по логиката на критериите за хигиена на процесите [14].

### **Clostridia** и заболявания от тях

Особено място сред микроорганизмите, причинители на хранителни заболявания, заемат анаеробните клостридии, в частност *C.botulinum* и *C. perfringens*,

[18, 23]. В страните на ЕС за 2005 г. са регистрирани 79 взрива (1,5 %) с 1633 заболели, а за 2006 г. – 81 взрива (1,5 %) с 1 651 заболели. Заболяванията от ботулизъм носят характера на единични спорадични случаи. През 2005 г. в Европейския съюз от *C.botulinum* са регистрирани 13 случая, а през 2006 – 18, със сравнително нисък брой на заболелите – 32 за 2005 г. и 33 за 2006 г. [29, 30]. У нас ежегодно се доказват единични спорадични случаи на ботулинови интоксикации, изключително от домашно приготвени консерви. По-чести са заболяванията от *C. perfringens*, които също се отнасят към хранителните интоксикации – 55 взрива с 132 заболели за 2005 г. и 63 взрива с 1618 заболели за 2006 г. в страните на ЕС. Тази умерена степен на риска поради по-ограниченото разпространение на заболяванията от анаеробни клостридии не дава основание за системен контрол на тази група микроорганизми в храните. Двата Европейски регламента [27, 28] не съдържат критерии за анаеробните клостридии нито като безопасност, нито като показатели за хигиена на процесите. Характера на разпространението им обаче – не само в животински храни, особено месни, но и в почвата, оттам – и в растителните храни, и особено наличието на твърде устойчиви спори дава основание за насочено внимание и необходимост от здравно нормиране на анаеробите в редица специфични храни. На първо място това са стерилизираните консерви, при които трябва да бъдат осигурени елементарни изисквания към промишлената стерилност и на първо място – отсъствие на вегетативни и спорови форми на анаеробни микроорганизми [4, 7]. На второ място поставяме редица комбинирани храни и готови ястия, съдържащи и месни, и растителни компоненти ; на трето място – подправките, които при влагане в производни продукти могат да внесат значителни количества клостридии. Не пледираме за постоянен текущ контрол на безопасността по отношение на *C.botulinum* – неговата диагностика е скъпа и продължителна, а и много трудна. Тя се осъществява само при специални показания – при случаи на заболявания или директен риск. В случая е необходимо да се борави с индикаторни критерии от групата на клостридиите, а именно – сулфитредуциращите клостридии. Това е мотивът за нормирането на този критерий за хигиената на процесите в някои от българските храни с неживотински произход като превантивна мярка за елиминиране на риска от попадането и на токсигенни анаеробни клостридии.

### *Enterobacter sakazakii*

Сред микробиологичните критерии за безопасност в последните години актуалност придоби *Enterobacter sakazakii* [37, 74, 76, 81], който в двата Регламента

задължително се контролира в детските храни на млечна основа за кърмачета до 6-месечна възраст [27, 28]. Изключително сериозната тежест на заболяванията, проявяващи се като менинго-енцефалити и некротични ентерити, високата смъртност и отдалечените последствия от заболяването обуславят високата степен на риск и правят необходимостта от този критерий безкомпромисна за детските храни за кърмачета до 6 месеца, а това са не само тези на млечна основа, но и храни с друг състав [23, 37, 74, 76, 81]. У нас детските „формули“ за кърмачета на млечна основа са от внос, но детски храни на комбинирана зърнено-млечна основа за рисковата възраст до 6 месеца се произвеждат и това изисква въвеждането на национални критерии за тях. Касае се за изключително добре посрещаните на пазара храни от серията „Слънчо“, контролът на които задължително включва *Enterobacter sakazakii* като критерий за безопасност според разработената от производителя технологична документация. С влизането в сила на **Методичното указание** този критерий ще заеме мястото си и в националната нормативна уредба.

С казаното досега накратко изчерпваме мотивите, послужили за основа за създаването на български национални микробиологични критерии за безопасност на неживотинските и детските храни.

## **МИКРОБИОЛОГИЧНИ КРИТЕРИИ ЗА ХИГИЕНАТА НА ПРОЦЕСИТЕ. ИНДИКАТОРНИ МИКРООРГАНИЗМИ В ХРАНИТЕ**

Вторият голям проблем е създаването на критерии за хигиената на процесите, които са в основата на превантивните мерки за производство на безопасна и качествена хранителна продукция. Микробиологичните критерии за хигиената на процесите по същество са индикаторните или „хигиенно-показателните“ микроорганизми, широко прилагани в контрола. Индикаторните микроорганизми се наблюдаваха не само в процеса на производството, но и в търговската мрежа до крайния срок на трайност на храните. Резултатите от микробиологичните изследвания на индикаторните микроорганизми бяха едни от най-трудните за хигиенна интерпретация факти от текущата практика. Вече отбелязахме, че старата методология на контрола позволяваше недостатъчно оправдано вземане на строги мерки при доказване на несъответствия по тези показатели, понякога стигащи дори до изтегляне на продукция

от пазара. С възприемането на подхода, обозначен в двата Регламента ЕО 2074/2005 и 1441/2007 г., критериите за хигиена на процесите ще заемат подобаващото им се място в контрола на храните. Те се прилагат от бизнес-операторите по цялата верига от суровините до етапа на готовата продукция, обективизират ефективността на технологиите и производствената хигиена и подсказват критичните точки, в които могат да се прилагат корективни действия. Те по никакъв начин не са предназначени за показатели за годност или негодност на продукцията за консумация. Прилагат се избирателно в различните етапи на технологичната верига. Периодичността на наблюденията върху тях се определя чрез плана по НАССР. Като правило целият набор от показатели за хигиената на процесите за всеки може да се прилага за готовия продукт преди излизането му на пазара. Контролните органи имат за задачата да проследят правилното приложение на критериите за хигиена на процесите в диалог с бизнес-оператора.

Списъкът на индикаторните микроорганизми, прилаган от българската и чуждестранната практика в контрола на храните, е изключително голям и сложен. При оценката на индикаторните микроорганизми трябва да имаме предвид многостранната оценка на всеки критерий, изхождайки от неговата конкретна характеристика <sup>[4, 7, 8, 13, 15, 17, 22, 35, 71,]</sup>. И така, критериите за хигиена на процесите или индикаторните микроорганизми могат да имат хигиенно-показателно значение в следния смисъл :

- **фекално-индикаторна стойност** (в по-широк смисъл тя може да бъде обозначена като антропогенно замърсяване – от човека, главно неговият чревен тракт или горните дихателни пътища, и/или биогенно замърсяване - от животните, почвата, растенията, т.е. биосферата и пр.) ;
- **технологично-индикаторна стойност**, т.е. става дума за възможността на дадена група микроорганизми да преживява или не в продукта при технологичната преработка на суровините и по този начин да служи като индикатор за ефективността на технологичните процеси;
- **ролята** на микроорганизма (или на групата микроорганизми) **при оценката на процесите на съхранение** – способностите за размножаване и отделяне на бактериални екзоензими, които катализират процесите на развала;
- **потенциалните епидемиологични рискове**, на които повечето от индикаторните микроорганизми, които са и потенциално патогенни, са носители при размножаване и натрупване на големи инфекциозни дози.

Такава комплексна оценка на всеки показател трябва да се прави, когато се решава въпросът за адекватен микробиологичен контрол за всяка една група храни.

Например, при стерилизираните консерви изследването за присъствие примерно на *Enterobacteriaceae*, *Coliform*, *Salmonella* или *Listeria* е безсмислено поради ниската температурна устойчивост на тези неспорообразуващи бактерии, резултат от фекално и биогенно замърсяване. В стерилизирани консерви обаче при термичните режими на практика устояват най-вече споровите форми на *Bacillaceae* и много рядко – неспорообразуващите бактерии. Последните, обаче, ако се установят в продукта, са надежден индикатор за ниска ефективност и дефект на стерилизационния режим. Именно *Bacillus* и *Clostridium*, както и общо неспорообразуващи бактерии трябва да следим системно, за да сме в състояние да направим адекватна оценка на ефективността на режимите на стерилизация.

Друг пример – в сурови, термично непреработени плодове и зеленчуци, включително и сушени, същият този показател *Enterobacteriaceae* е пряк, чувствителен индикатор за фекално и биогенно замърсяване и лошо измиване, а това е косвен белег за риск от зараза със *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, чревни вируси, *Protozoa*, хелминти и други инфекциозни агенти.

Ще приведем кратък списък на най-широко прилаганите индикаторни критерии в храните <sup>[7, 8, 13, 15, 17, 22]</sup>, голяма част от които са включени като критерии за хигиената на процесите в разработеното **Методично указание**– виж Таблица 1.

Не всички представени в таблицата критерии използваме в българските национални норми. Част от тях бизнес-операторите могат да включват като допълнителни характеристики на ефективността на производствените цикли и тяхната хигиена. Естествено е препоръчаните критерии да бъдат допълвани, когато това е продиктувано от спецификата на проблемите. Тук има значение и компетентното участие на контролните органи.

**ТАБЛИЦА 1**  
**ХАРАКТЕРИСТИКА НА ИНДИКАТОРНИТЕ МИКРООРГАНИЗМИ**

<b>МИКРОБИОЛОГИЧЕН КРИТЕРИЙ</b>	<b>КРАТКА ХАРАКТЕРИСТИКА НА КРИТЕРИЯ И НА НЕГОВОТО ИНДИКАТОРНО ЗНАЧЕНИЕ</b>	<b>ГРУПИ ХРАНИ, В КОИТО КРИТЕРИЯТ НАМИРА ПРИЛОЖЕНИЕ</b>
<p>1. Общ брой на мезофилните аеробни и факултативно анаеробни микроорганизми (Total Plate Count)</p>	<p>Група разнородни по таксономия микроорганизми, обединени въз основа на физиолого-биохимични признаци – растеж в универсална хранителна среда при 30°C – 72 часа. Универсален, пряк чувствителен показател за общата степен на микробно замърсяване, технологично-индикаторен при пастеризационни или стерилизационни режими на топлинна обработка и други технологични методи.</p>	<p>Сурово и пастеризирано мляко, мляно месо, повърхност на кланични трупове, сухи пулверизационно сушени продукти – мляко, яйца на прах; детски храни за ранната възраст на млечна, зърнена, соева и друга основа ; сухи полуфабрикати за детски храни и храни за директна консумация на млечна, зърнена и друга основа; хранителни добавки ; подправки растителни ; готови ястия, преминали термична обработка; други храни за директна консумация и пр.</p> <p>Не се прилага при храни, получени по биотехнологичен път чрез ферментация (зреене) – естествено или под влиянието на стартерни култури</p>
<p>2. Мезофилни аеробни и факултативно анаеробни микроорганизми (неспоробразуващи, вегетативни и спорови форми на споробразуващи)</p>	<p>Показатели за биогенно, главно почвено замърсяване. Технологично-индикаторен показател при пастеризационни или стерилизационни режими на топлинна обработка, притежава особено устойчиви спори, които са критерий за ефективността на тези режими. Причинител на развалата на термично преработени храни.</p>	<p>Стерилизирани и пастеризирани консерви – месни, птичи, рибни, месо-растителни, растителни;</p> <p>Детски консерви ;</p> <p>Стерилизирани чрез УНТ-методи мляко, сметана, млечни продукти;</p> <p>Стерилизирани чрез УНТ-методи плодови и зеленчукови сокове;</p> <p>Стерилизирани чрез УНТ-методи сметани и кремове на основата на растителни хидрирани масла, сосове и емулсионни продукти.</p>
<p>3. Мезофилни анаеробни микроорганизми (неспоробразуващи, вегетативни и спорови форми на споробразуващи)</p>	<p>Показатели за антропогенно и биогенно, главно почвено замърсяване. Технологичен индикатор за ефективността на стерилизационни режими. Приложими при продукти в херметично затворени опаковки и под вакуум, т.е. съхранявани при анаеробни условия, при които могат да се размножават. Косвен индикатор за присъствието на токсигенни анаеробни клостридии. Недопустими при всички стерилизирани храни.</p>	<p>Стерилизирани и пастеризирани консерви – месни, птичи, рибни, месо-растителни, растителни;</p> <p>Детски консерви ;</p> <p>Стерилизирани чрез УНТ-методи мляко, сметана, млечни продукти;</p> <p>Стерилизирани чрез УНТ-методи плодови и зеленчукови сокове ;</p>

	Актуални за консерви и за продукти с ниско съдържание на кислород, напр. опаковани под вакуум.	Стерилизирани чрез УНТ-методи сметани и кремове на основата на растителни хидрирани масла, сосове и емулсионни продукти.
4. Термофилни аеробни, факултативно анаеробни и анаеробни микроорганизми (неспорообразуващи, вегетативни и спорови форми на спорообразуващи)	Показатели за биогенно, главно почвено замърсяване. Технологичен индикатор за ефективността на стерилизационни режими. Приложими при продукти в херметично затворени опаковки и под вакуум, т.е. съхранявани при анаеробни условия, при които могат да се размножават. Носят риск от „плоскокисела” развала на консервите. Недопустими при всички стерилизирани храни.  Актуални за консерви и за продукти с ниско съдържание на кислород, напр. опаковани под вакуум и съхранявани при повисоки температури. Индикаторни в стерилизирани консерви, съдържащи растителни суровини.	Стерилизирани и пастьоризирани растителни консерви;  Детски консерви ;  Стерилизирани чрез УНТ-методи плодови и зеленчукови сокове ;  Консерви, предназначени за разпространение в страни с топъл климат – субтропичен, екваториален.
5. Психротрофни микроорганизми	Група разнородни микроорганизми, обединени въз основа на физиолого-биохимични признаци – растеж при 6,5°C – 10 дни. Индикаторни за охладени продукти (от -1°C до +10°C), носят риск от развала на храните при съхранение в хладилни условия, при които екскретират екзоензими, участващи в развалата на храните.	Месни, птичи, млечни, рибни, месо-растителни, растителни продукти и ястия, съхранявани при температури от 0 до 10°C.  Използват се като критерии за хигиената на процесите при специални показания – например при мотивирането на сроковете на трайност на охладени продукти и ястия
6. Протеолитични микроорганизми	Актуални като индикатор на риск от развала в продукти, богати на белтък.	Млечни, месни и други продукти, богати на белтък, предназначени за продължително съхранение и зреене.  Използват се като критерии за хигиената на процесите при специални показания – например при мотивирането на сроковете на трайност на охладени продукти и ястия
7. Липолитични микроорганизми	Актуални като индикатор на риск от развала в храни, богати на мазнини.	Растителни и животински мазнини и масла,  Маслени и емулсионни продукти ;  Хидрирани масла и маргарини.  Използват се като критерии за хигиената на процесите при специални показания – например при мотивирането на сроковете на



		трайност на продукти и ястия с високо съдържание на мазнини.
<b>8. Осмотолерантни микроорганизми</b>	Актуални в храни с повишено осмотично налягане; носят риск от развала.	Джемове, конфитюри, мармелади, сладка ; Силно осолени продукти.
<b>9. Enterobacteriaceae</b>	Показатели за фекално и биогенно замърсяване, за лоша хигиена и недостатъчна температурна обработка (имат термично-индикаторна стойност); отразяват степента на риск от чревни инфекции.  Имат по-универсално индикаторно значение от колиформите поради това, че обхващат и лактозо-негативните представители на чревните бактерии.	Практически всички нестерилизирани продукти, ястия и напитки.
<b>10. Coliform (колиформи)</b>	Показатели за фекално и биогенно замърсяване, за лоша хигиена и недостатъчна температурна обработка (имат термично-индикаторна стойност); отразяват степента на риск от чревни инфекции.	Практически всички нестерилизирани продукти, ястия и напитки.
<b>11. Escherichia coli</b>	Показатели за антропогенно фекално и за биогенно замърсяване, за лоша хигиена и недостатъчна температурна обработка (имат термично-индикаторна стойност); отразяват степента на риск от чревни инфекции. Могат да носят директен здравен риск от ентеропатогенни <i>E. coli</i> и VTEC.	Практически всички нестерилизирани продукти, ястия и напитки.
<b>12. Сулфитредуциращи клостридии</b>	Показатели за антропогенно и биогенно, главно почвено замърсяване. Технологичен индикатор за ефективността на стерилизационни, пастеризационни и други термични режими. Приложими при продукти в херметично затворени опаковки и под вакуум, т.е. съхранявани при анаеробни условия, при които могат да се размножават. Косвен индикатор за присъствието на токсигенни анаеробни клостридии.  Актуални за продукти с ниско съдържание на кислород, напр. опаковани под вакуум, колбасни изделия с големи размери.	Месни, птичи, рибни продукти. Всички видове готови ястия. Продукти с предполагаемо почвено замърсяване – комбинирани ястия, растителни подправки и др.
	Показатели за антропогенно и биогенно, главно почвено замърсяване. Технологично-индикаторни за топлинно	Месни, птичи, рибни продукти и ястия ; Продукти с предполагаемо почвено замърсяване – комбинирани

<p><b>13. <i>Clostridium perfringens</i></b></p>	<p>обработени храни. Носят директен риск от хранителни заболявания. Актуални за продукти с ниско съдържание на кислород, напр. опаковани под вакуум, колбасни изделия с големи размери.</p>	<p>ястия, растителни подправки и др.</p>
<p><b>14. <i>Bacillus cereus</i></b></p>	<p>Показатели за почвено и растително замърсяване. Технологично-индикаторни за топлинно обработени храни. Участват в развалата на храни и готови ястия. Носят директен риск от хранителни заболявания.</p>	<p>Месни, птичи, рибни, млечни продукти и ястия ;  Сухи детски храни ;  Сухи млека, яйца на прах, сухи смеси за супи, сосове, десерти, каши и пр. ;  Сухи храни на зърнена основа ;  Растителни подправки ;  Комбинирани салати, ордьоври, сосове, готови ястия, десертни кремове ;  Сочни сладкарски изделия ;</p>
<p><b>15. <i>Bacillus subtilis, var. mesentericus</i></b></p>	<p>Показател за почвено замърсяване ; риск от картофена болест при хляба ; риск от развала на продукти, съдържащи зърнени, бобови и други растителни храни</p>	<p>Брашно, грис;  Тестени изделия.  Растителни храни и подправки.</p>
<p><b>16. <i>Leuconostoc mesenteroides</i></b></p>	<p>Показател за биогенно замърсяване ; риск от развала на напитки, съдържащи захар</p>	<p>Захар ;  Безалкохолни напитки.</p>
<p><b>17. Млечнокисели микроорганизми</b></p>	<p>Показатели за биогенно замърсяване; риск от развала на храните.</p>	<p>Стерилизирани и пастьоризирани растителни консерви;</p>

		<p>Доматени продукти,          Плодови и зеленчукови пюре и пулпове          * Не са индикаторни за млечнокисели и други храни, произвеждани с млечнокисела ферментация – сурово-сушени колбаси, туршии и пр.</p>
<b>18. <i>Lactobacillus, Lactococcus, Bifidobacteria</i></b>	<p>Специфични микроорганизми на стартерни култури, пробиотични хранителни добавки и продукти, произведени по ферментативен път с участието на стартерни култури.          Индикатори за правилното протичане на биотехнологичните процеси.</p>	<p>Стартерни култури;          Хранителни добавки с пробиотични свойства;          Заквасени (ферментирани) млека, сирена, сурово-сушени колбаси, други ферментирани храни (туршии и пр.)</p>
<b>19. Плесени</b>	<p>Показатели за биогенно замърсяване; риск от развала на храните ; риск от микотоксини.</p>	<p>Детски храни ;          Зърнени храни ;          Нестерилизирани храни за директна консумация от животински произход ;          Растителни консерви ;          Сухи детски храни ;          Други нестерилни продукти за директна консумация.</p>
<b>20. Дрожди</b>	<p>Показатели за биогенно замърсяване; риск от развала на храните.</p>	<p>Детски храни ;          Млечни продукти;          Нестерилизирани храни за директна консумация от животински произход ;          Растителни консерви;          Безалкохолни напитки;          Други нестерилни продукти за директна консумация.</p>

С този кратък преглед на най-широко прилаганите индикаторни микроорганизми, всеки от които има своята специфична характеристика, даваме основата на мотивировката за приложението им като микробиологични критерии за хигиената на процесите при производството на храни в изготвения проект на **Методичното указание**.

## **МИКРОБИОЛОГИЧНИ КРИТЕРИИ ЗА БЕЗОПАСНОСТ И ЗА ХИГИЕНАТА НА ПРОЦЕСИТЕ В РАЗЛИЧНИ ГРУПИ БЪЛГАРСКИ ХРАНИ**

Да разгледаме накратко мотивите, с които предлагаме микробиологичните критерии за отделните групи храни\*.

### **Зърнени храни и продукти на тяхната преработка**

В епидемиологията на заболяванията от биологични агенти, предавани чрез храната, хлябът никога не е играл съществена роля. В добре изпечения хляб микроорганизми не би трябвало да се задържат, върху коричката на хляба едва ли би могло да има развитие на случайно попаднали патогени. Поради това откриването на болестотворни микроби там би представлявало чиста медицинска казуистика и текущият контрол изключва микробиологичните наблюдения – такива биха могли да се правят само по строги епидемични показания. Хлябът обаче при неправилно съхранение може да плесенясва – това е доказано от многовековния човешки опит, както и да «боледува» от т.н. «картофена болест», причинител на която е *Bacillus subtilis*, ssp. *mesentericus* (01.01). Не е необходимо да търсим този микроорганизъм във всяка партида хляб – нужен е контрол на брашната и на други спомагателни материали с оглед предотвратяването на тази болест чрез чисто технологични и хигиенни мерки, добре известни на специалистите. Поради това препоръчваме *Bacillus subtilis* да се изследва в брашната като критерий за хигиената на процесите. Като адекватен индикаторен показател в брашната може да се използват и *Enterobacteriaceae*, интегрално отразяващи хигиената на тяхното производство. (01.02)

Съвременната промишленост предлага изключително разнообразие от зърнени храни за директна консумация, част от които се използват и в диетологичната практика,

---

\*По-нататък в текста в скоби поставяме номерата на групите храни, представени в Приложение 1 на Методичното указание.

много от тях се консумират след заливане с вода, мляко, сокове, което носи допълнителен епидемичен риск. Те могат да съдържат микроорганизми с антропогенен произход, което прави задължителен контрола им по повече критерии, включително такива за безопасност (01.03 и 01.04).

В огромното разнообразие от хлебни закуски с различен пълнеж, независимо от обичайната термична обработка чрез изпичане или пържене, могат да попадат патогенни и условно-патогенни микроорганизми, които налагат микробиологични наблюдения както в производството, така и на пазара (01.05.).

### **Маслени и емулсионни продукти**

В маслените и емулсионни продукти за директна консумация, които се предлагат на пазара във впечатляващо многообразие, контролът на показателите за безопасност трябва да включва като минимум *Salmonella species*, особено актуални при майонезите и сосовете, а за критериите за хигиена на процесите да бъдат използвани индикаторните чревни бактерии, стафилококите, микроскопичните гъбички<sup>[9, 70]</sup>.

Майонезите и емулсионните продукти – салати, сосове, дресинги и пр. са голяма група храни, добре приемани от населението и имащи широко разпространение. С тях могат да бъдат свързани някои епидемични рискове, характерни за яйчените продукти, например от *Salmonella*<sup>[70]</sup>. Едновременно с това обаче в майонезите има високо съдържание на растителни мазнини, ниско рН и други фактори, ограничаващи микробните процеси. Експериментално инфектиране на трапезна майонеза с различни инфекциозни дози *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus* показва, че при ниски дози, близки до реалните, тези рискови микроорганизми загиват още на 24 час, а при високи инфекциозни дози от порядъка на  $10^5$  CfU/g още след 24 часа броят на салмонелите се редуцира до  $10^4$  CfU/g, на 48 – 72 час вече не се откриват. Стафилококите не загиват и не се изолират още на 24 час дори от течни обогатителни среди в големи посевни количества. Резултатите са очевидни – майонезата не само е неблагоприятна среда за размножаването на салмонели и стафилококи, но има и бактерицидни свойства<sup>[9]</sup>. Считаме, че този ефект се дължи на три основни фактора – присъствието на консерванти и органични киселини в рецептурата, като рН на изследваните майонези варира от 3,9 до 4,4, както и високата концентрация на мазнини, които не са благоприятен субстрат за микробните популации.

Микрофлората на майонезите е от значение за производни изделия, такива като майонезни салати, в които горните фактори загубват отчасти влиянието си поради намаляването на концентрацията на мазнините и органичните киселини в общата маса. В производните продукти вече е реално развитието на чревни бактерии, стафилококи, аеробни спорообразуващи бацили, кластридии, плесени, дрожди. В самата майонеза последните притежават силно липолитични свойства и могат да играят нежелана роля за качеството и при развалата, поради това са необходими критерии за хигиената (02).

### **Плодове, зеленчуци и продукти на тяхната преработка**

В продуктите от плодове и зеленчуци (03.01, 03.06, 03.08), предназначени за директна консумация, основните критерии за безопасност са отново *Salmonella* и *Listeria*, а сред индикаторните микроорганизми наред с ентеробактериите особено място заемат сулфитредуциращите кластридии, характеризиращи риска от почвено замърсяване. В предназначените за термична преработка плодови и зеленчукови полуфабрикати изискванията към микробното съдържание са значително по-умерени (03.02). В преработените по физични методи концентрати и пулпове съществено ограничение следва да имат микроскопичните гъбички и като технологично-индикаторни микроби, и като важни за по-нататъшното съхранение с оглед предотвратяване на процесите на развалата. Същото се отнася и за асептично опакованите домати концентрати (03.03., 03.04). Стерилизираните плодови и зеленчукови консерви, сокове и нектари трябва да отговарят на изискванията за промишлена стерилност. Тук не правим диференциране, каквато е класическата стара практика на някои страни, между консервите с по-висока и по-ниска киселинност <sup>[4, 7, 41]</sup>, а прилагаме интегрално нормиране, което не допуска анаеробни микроорганизми, неспорообразуващи бактерии, плесени и дрожди. Единствено допустими са малки количества спорови форми на сапрофитните аероби от рода *Bacillus*. Това гарантира както промишлената стерилност, така и безопасността на консервите за консумация, независимо от тяхната киселинност. За особената група на сладката, джемове и други високо захарни консерви (03.05, 03.07) от значение са анаеробите и осмоотолерантните микроскопични гъбички, каквито на практика откриваме при някои изследвания. В нестерилните солени и солено-мариновани плодове, зеленчуци, гъби, на производствен контрол подлежат ентеробактериите, кластридиите, стафилококите като осмоотолерантни бактерии (03.09).

### **Хранителни концентрати (сухи супи, бульони, сосове, ястия)**

В хранителните концентрати като сухи супи, бульони и сосове, много от които имат и компоненти с животински произход, са важни критериите за хигиена на процесите като общ брой на аеробните микроорганизми, плесените, дрождите, ентеробактериите, стафилококите и клостридите, като род *Salmonella* е необходимият реален критерий за безопасност (04).

### **Захарни и сладкарски изделия**

Захарта и захарните изделия (05) могат да бъдат носители на редица условно-патогенни микроорганизми, ограничавани чрез критериите за хигиена на процесите като ентеробактерии, стафилококки, *B.cereus*, плесените. Уникален и специфичен показател там е *Leuconostoc mesenteroides*, ограничаването на който е превантивна мярка срещу замърсяването на уязвимите от този микроб захарни разтвори с него. Готовите за консумация захарни изделия не представляват благоприятна среда за развитие на микроорганизмите и все-пак безопасността трябва да е гарантирана чрез критерия *Salmonella*. Същото се отнася за сухите сладкарски (06.01) и за шоколадовите изделия (07). В шоколадовите изделия какаото допълнително може да е носител и на анаеробни клостридии.

Особено рискова група представляват нетрайните сладкарски изделия – кремове, торти, пасти (06.02). При тяхното високо водно съдържание, комбиниран състав и много ръчни манипулации възможностите за първично и вторично контаминиране с патогенни и условно-патогенни микроорганизми са много сериозни, а условията за развитието им – твърде благоприятни. Тук отделяме внимание на двата най-рискови за групата микроорганизми, чести причинители на хранителни взривове – салмонелите и стафилококите, които предлагаме като показатели за безопасност. В критериите за хигиена на процесите, освен ентеробактериите, се нормират също така *Pseudomonas* и *B.cereus*, не само като критерии за хигиената, но и като потенциални причинители на заболявания или развала на сочните сладкарски изделия.

### **Пчелен мед**

Пчелният мед по традиция не е обект на микробиологични изследвания. Вниманието ни към микрофлората на меда бе привлечено от съобщенията в литературата за значението на този продукт като причина за рядко наблюдаваните, но описани ботулинови заболявания у кърмачета, на които е даван биберон, намазан с

пчелен мед <sup>[18, 23]</sup>. Lynt и съавт., 1982, <sup>[цит. по 23]</sup> изолират *C.botulinum* от пчелен мед, за аналогична находка съобщава Arnon S., 1979 г. <sup>[цит. по 18]</sup>. Оказва се, че медът много често е носител на микроорганизми от сем. *Bacillaceae* – много по-често *Bacillus* и много по-рядко - *Clostridium*. Според наши непубликувани данни те се откриват и във вегетативна, и в спорова форма в 17 от общо 28 изследвани партии пчелен мед от различни региони на страната (60,7 %) в количества до 10<sup>2</sup> CfU/g. Анаеробни сулфитредуциращи клостридии се откриха в две от партидите (7,1%). Предстоят както набирането на повече фактически материал по този въпрос с изследване на по-голям брой партии пчелен мед, така и по-задълбочено таксономично определяне на изолираните *Bacillaceae*, но отсега може да се каже, че в продукта една от най-честите находки е *Bacillus cereus*. Логично тази микрофлора е представител на екосистемите, в които се осъществява събирането на мед от пчелите, респ. този продукт не може да бъде стерилен. Високата степен на риск обаче, обусловена от тежестта на ботулиновата токсикоинфекция у кърмачета, дава основание да поставим за меда критерий – отсъствие на сулфитредуциращи клостридии, чийто представител е и *C.botulinum*.

#### **Готови ястия и кетъринг-продукция**

Микрофлората на готовите ястия, както и подходите към тяхното микробиологично нормиране, са изключително сложни въпроси. Когато се касае за кетъринг-продукция, поставена на промишлена основа, тогава проблемите са по-ясни, за разлика от готовите ястия в общественото хранене, където сроковете на трайност са до края на цикъла на сервиране. За експресен микробиологичен контрол не може да става и дума. В това отношение в заведенията за обществено хранене е подходящо да бъде установен периодичен контрол на показателите за хигиена на процесите в специфичните за различните ястия критични точки, определяни от технологията и състава. Интересно е например каква е динамиката на общия брой на мезофилните аеробни бактерии в процеса на съхранение на ястията при температура над 63°C до края на дневния работен цикъл. Друг пример – има ли *Bacillus cereus* в картофената салата и каква е неговата динамика до края на работния ден.

Кетъринг-продукцията обаче е най-често охладена и дълбоко замразена и там микробиологичният контрол може да бъде по-действен. Фактически в случая се касае за полуфабрикати, които изискват специално и задълбочено наблюдение. За вътрешно заводския контрол на кетъринг-продукцията от голямо значение са критериите за хигиена на процесите - както фекално-индикаторните групи микроорганизми, така и



технологично-индикаторната страна на отделните критерии. Много от компонентите в готовите ястия, които са с различна степен на технологична обработка, също създават прецеденти в интерпретацията на микробиологичните изследвания. Към групата на готовите ястия отнасяме също така и кулинарните салати, ордьоври, комбинираните сандвичи, както и кулинарните десерти.

Наши системни изследвания върху кетърингова продукция, включваща основни ястия, ордьоври, комбинирани сандвичи и други комбинирани блюда, дадоха следните резултати <sup>[12]</sup> :

Патогенните *Salmonella species* и *Listeria monocytogenes* не бяха доказани в нито една от изследваните проби готова кетъринг-продукция. Рядко, с единични находки се регистрираха и други микроорганизми като *Proteus species*, *Pseudomonas species*, аеробни бацили и пр. Не се изолираха анаеробни сулфитредуциращи кластридии.

Като правило готовите кетърингови продукти са с нисък общ брой на мезофилните аеробни микроорганизми – не повече от 14 % от тях са над  $10^4$  CFU/g, независимо от това, че са многокомпонентни и съдържат елементи и гарнитюри от сурови храни. В над 85 % от пробите не се съдържат колиформи и *Escherichia coli* (MPN < 10). Тези чревни микроорганизми се изолират рядко и в ограничени количества, като рисковете от тяхното попадане са в ордьоврите, закуските и десертите – там, където има ръчни операции и съответно антропогенно замърсяване. Подобно е положението и при микроскопичните плесенни гъбички и дрождите.

Изхождайки от тези разсъждения, както и от набрания фактически материал от анализи на кетъринг-продукция и сравнения с някои фирмени норми за такъв род храни, препоръчваме един широк набор от критерии, включващи ентеробактериите, стафилококите, *B. cereus* и сулфитредуциращите кластридии, *Pseudomonas*, микроскопичните гъбички <sup>[12]</sup>. Критериите за безопасност в тази група храни безусловно са *Salmonella* и *L.monocytogenes*, както е логично за всички готови за консумация храни (09.01, 09.02, 09.04). Изключение от общата листа на готовите ястия са кулинарните десерти (09.03), чието нормиране е по аналогия с това на нетрайните сладкарски изделия.

### **Растителни подправки и дроги**

Много интересен е проблемът за микробиологичното нормиране на подправките. Смисълът на това нормиране, освен елиминиране на директния риск, е

ограничаването на ролята им като вторичен замърсител на производни храни с микроорганизми. В България производството, вносът и износът на подправки са много активни, а старите норми са непълноценни и рестриктивни и представляват постоянно препятствие за бизнес-операторите.

Известно е, че подправките са носители на почвени и антропогенни микроби, флората им е неуправляемо многобройна, а в последните години се избягват допълнителни методи за деконтаминиране като например облъчването с гама-лъчи.

Готварските растителни подправки, които по същество са сушени растения или части от растения, носят своята специфична микрофлора, характерна за екосистемите, от които биват добивани, като всяка подправка е със своите уникални особености [35]. Като правило семената (кимшон, кориандър и др.) са по-чисти, отколкото подправките от други растителни части – върху тяхната повърхност бактериите трудно биха се размножавали. При канелата - кора на канеленото дърво, условията за размножаване на бактерии са ограничени допълнително от бактерицидните свойства на канеленото масло. При ронената чубрица се касае за листа и цветове, които трудно се измиват добре преди сушенето и при бързата загуба на водната си фаза задържат голяма част от минералните примеси и микрофлората. При червения пипер имаме най-сложен специфичен процес - продължително сушене на паренхима на плодното тяло, само по себе си благоприятна среда за размножаване на микробите – бактерии, микроскопични плесени, дрожди. Това дава основание червеният пипер да бъде поставен на обособено място сред другите растителни подправки с по-широки граници на естествената микрофлора. Много от подправките са екзотични за страната ни, произходът им е от южни страни с по-примитивни хигиенни практики, което, наред с първичното почвено, носи директен риск от вторично замърсяване при добива, обработката и транспорта с патогенни микроорганизми с антропогенен произход. По аналогичен начин стои и проблемът с растителните дроги. Практически от екологична гледна точка границите между подправките и растителните дроги, използвани и като билкови чаеове, и като съставна част на модерните днес хранителни добавки, са много относителни и позволяват поставянето им под един знаменател от гледна точка на специфичната микрофлора. Впрочем, растителните дроги могат да се оценяват и въз основа на някои фармакопейни изисквания, близки до нашите наблюдения по проблема.

Според наши изследвания общият брой на мезофилните аеробни и факултативно анаеробни микроорганизми – неспорообразуващи и ветегетативни форми на

спорообразуващи в растителни подправки е бил над  $10^6$  CfU/g в 96,2 % от пробите червен пипер, в 87,1 % - в зърнени подправки ; в 80,5 % - общо за готварски подправки. Броят на споровите форми е бил съответно над  $10^6$  CfU/g в 66,7 % - общо в готварски подправки, в червен пипер – 100 % ; в зърнени подправки – 50,0 %. Това означава с всеки грам растителни подправки да се внасят огромни количества термоустойчиви микроорганизми. Интересни са и други наши данни : колиформи в количества над  $10^3$  CfU/g са съдържали 56,0 % от изследваните подправки, а плесени над  $10^3$  CfU/g – 49,3 %. Възможно е с подправките в храните да попадат и патогенни и условно-патогенни микроорганизми. В последно време става актуална ролята им като значим източник на *Bacillus cereus*. Не трябва да се подценява и възможността с подправките да се пренасят и спорите на рода *Clostridium*, поради което един от актуалните показатели за техния контрол е „сулфитредуциращи клостридии” [6, 7].

Несъмнено е, че микробиологичният контрол на такива продукти е задължителен и особено необходим за гарантиране на безопасността както при директна консумация, така и за производни храни с различна степен на кулинарна обработка, включително и пастьоризирани и стерилизирани консерви.

Европейската асоциация по подправките (ESA) и ЕНИА [33, 35] по отношение на микробиологичните показатели изказват следното становище :

Минималните изисквания към микробиологичните качества са :

- отсъствие на *Salmonella* в 25,0 g от продукта ;
- плесени и дрожди – допускат се до  $10^5$  cfu/g при допустим максимум  $10^6$  cfu /g;
- *E.coli* - допускат се до  $10^2$ /g при допустим максимум  $10^3$  cfu/g;

Според JCMSF [42, 43] растителните подправки трябва да отговарят на следните микробиологични критерии :

- общ брой на мезофилните аеробни микроорганизми :  $1,0 \cdot 10^6$  –  $1,0 \cdot 10^7$  cfu/g;
- *Coliform* :  $1,0 \cdot 10^3$  –  $1,0 \cdot 10^4$  cfu/g;
- *E.coli* : 100 cfu/g;
- отсъствие на *Salmonella* в 25,0 g от продукта ;
- *Staphylococcus aureus* : 100 cfu/g;
- Сулфитредуциращи клостридии : 10 – 100 cfu/g;
- Спори на микроскопични плесенни гъбички :  $1,0 \cdot 10^3$  –  $5,0 \cdot 10^3$  cfu/g;

Според стандарт на Швейцария *E.coli* се допускат до 10 cfu/g, а *S.aureus* : 1,0.10<sup>4</sup> – 1,0.10<sup>5</sup> cfu/g. Според стандарт на Германия *E.coli* се допускат до 1,0.10<sup>2</sup> – 1,0.10<sup>3</sup> cfu/g, *S.aureus* : 1,0.10<sup>2</sup> – 1,0.10<sup>3</sup> cfu/g, а спорите на микроскопичните плесенни гъбички са 1,0.10<sup>5</sup> – 1,0.10<sup>6</sup> cfu/g.

Според публикувани данни на Канада [71] в подправките наред със салмонелите, *E.coli*, стафилококите, микроскопичните гъбички, е целесъобразно да се нормират и *C.perfringens* и *Bacillus cereus* в количества 1,0.10<sup>4</sup> – 1,0.10<sup>6</sup> cfu/g.

Както се вижда от изложеното от авторитетни източници на информация, от натрупания собствен опит в областта на микробиологията на подправките, тяхното нормиране е необходимо не само за гарантиране на безопасността при директна консумация, но и като превантивна мярка за ограничаване на ролята им за вторичното контаминиране на разнообразните храни и ястия, в които се влагат. Предлаганите от нас микробиологични критерии (11.01, 11.02) изпълняват поставените цели и са съпоставими с международния опит по проблема.

### **Кафе, чай**

Кафето за директна консумация (печено, мляно и разтворимо) трябва да съдържа ограничителни микробиологични критерии за хигиената на процесите и за безопасността, представени главно от ентеробактериите. Класическите чаеве са екзотични за България продукти, в тях основни контаминанти, респективно критерии за хигиената, са микроскопичните гъбички (10.01, 10.02).

### **Безалкохолни и слабо алкохолни напитки**

В този раздел сме предвидили микробиологични критерии за безопасност и хигиена на процесите както в сухите или концентрирани полуфабрикати за производството на напитки, така и в готовите за консумация безалкохолни и ниско алкохолни напитки (12). В сухите продукти е важно ограничението на общия брой на аеробните мезофилни микроорганизми, микроскопичните гъбички и ентеробактериите. В готовите за консумация напитки нормирането е по аналогия с трапезните бутилирани води [16]. В пивото са актуални ентеробактериите, както и микроскопичните гъбички, нежелани в този масово произвеждан биотехнологичен продукт (15).

### **Боза**

Много важен проблем в тази група продукти е нормирането по микробиологични показатели на бозата (12.05). Национален продукт, разпространен и в

други страни на Балканския полуостров, класическата боза се явява пребиотичен и пробиотичен продукт, съдържащ продуктите на една дълбока хидролиза на нишестето, аминокиселините на зърнените култури, техните витамини и микроелементи, както и стартерни или „диви” култури на дрожди от рода на захаромицетите. Бозата винаги е била потенциален риск от микробиологична гледна точка продукт. По наши публикувани и непубликувани данни в нея винаги в различни количества се съдържат разнообразни *Enterobacteriaceae*, резултат от вторично контаминиране след основните технологични процеси – автоклавирането на зърнената маса, пасирането ѝ и добавянето на захарен сироп. Постоянна е и находката на микрококи и дрожди. Периодично в отделни партии се изолират *Pseudomonas*, *Proteus*, ентерококи <sup>[5]</sup>. Други автори описват, освен дрождите, и находката на млечнокисели микроорганизми от родовете *Lactobacillus* и *Leuconostoc* като естествени контаминанти <sup>[38, 39, 83]</sup>. Най-важното обаче от нашите изследвания са опитите с експериментално инфектиране на бозата класически тип с култури на патогенни и условно-патогенни микроорганизми – *Eschericia coli*, *Shigella zonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*. Тези опити установиха, че до 48 – 72 часа, т.е. до края на срока на трайност на продукта в хладилни условия, посочените микроорганизми леко редуцираха първоначалния си брой, но не загинаха, независимо от нарастващата киселинност и бързо развитие на ферментационния процес <sup>[5]</sup>. Това дава основание за сериозно признание на потенциалния епидемичен риск от хранителни заболявания, предавани чрез бозата, и налага съвременното ѝ микробиологично нормиране. Към добре познатите критерии за безопасност добавяме и *Listeria monocytogenes*, а по отношение на критериите за хигиена на процесите вземаме под внимание не само *Enterobacteriaceae*, но и *Pseudomonas* като представител на внасяната с водата индикаторна микрофлора (12.05).

Идеята за влагане в бозата на стартерни култури не е нова. В България се е практикувало внасянето като стартер на *Saccharomyces cerevisiae*. Турски автори препоръчват комбинирани стартери, съдържащи подобрени култури от родовете *Lactobacillus*, *Saccharomyces* и *Leuconostoc* <sup>[83]</sup>. Стартерите биха могли да оказват влияние върху степента на риск в бозата, наред с повишаването на нейните диетични качества, но това още не е доказано по експериментален път.

Днес в производството на боза настъпиха сериозни промени, касаещи в най-голяма степен нейната микрофлора. Тези промени се заключават в замяна на захарта

със синтетични подсладители, най-често аспартам, и в добавянето на консерванти (соли на сорбиновата и бензоената киселини). Бозата по този начин престана да бъде бързо развалящ се, ферментирал продукт, което безусловно променя и нейните диетични качества. Това налага и съвременни по-задълбочени изследвания на микрофлората на бозата и динамиката на преживяване на патогенни и индикаторни микроорганизми, като част от мониторинга на микробиологичната безопасност на българските храни, организиран от органите на здравеопазването.

### **Хранителни добавки (суплементи)**

Хранителните добавки (суплементи) днес като продукт на цивилизационното развитие се произвеждат и предлагат на пазара в огромно разнообразие. До голяма степен микробиологичните изисквания към тях трябва да съответстват на фармакопейните <sup>[82]</sup>, прилагани към лекарствените средства за перорална употреба, като не се забравя също, че се отнасят и към категорията на готовите за консумация храни. Обособена група сред суплементите са тези, съдържащи пробиотици. Това обуславя подхода към микробиологичното им нормиране (13.01, 13.02). Наред с добавянето на *Listeria monocytogenes* към критериите за безопасност, в пробиотичните храни-добавки е необходимо и нормирането на обявените в състава пробиотични микроорганизми, които трябва да бъдат в достатъчно големи дози, за да оправдаят претенциите за пробиотичен ефект. Тези съображения са взети предвид в предлагания от нас проект на **Методично указание**.

### **Технологични добавки в храните (адитиви), стартерни култури**

Технологичните добавки в храните (адитивите) имат свое европейско нормиране, което включва и микробиологични показатели там, където се налага. Някои от технологичните добавки обаче не се вписват в групата на адитивите като например ензимните препарати от микробен или животински произход (14.01), предназначени за хранителната промишленост. Специфичният произход поставя сериозни микробиологични проблеми и пред двете групи ензимни препарати, но позволява обединението на техните микробиологични критерии. Подборът на последните е въз основа на експертен опит от наблюдението на ензимни препарати, произвеждани у нас от специализирани предприятия на промишлената микробиология за вътрешния пазар и за износ. По същия начин стои проблемът с комбинираните подобрители за хранителната промишленост (14.02, 14.03). Презумпцията за критериите е недопускане

на вторично контаминиране на храните, за които са предназначени, с нежелана, биохимично активна или патогенна микрофлора.

Особен обект на микробиологичното нормиране са стартерните култури (16.01 – 16.05). Първото условие при тях е коректност по отношение на количествата на обявените микроорганизми на стартера, засега само като интегрален показател, т.е. не само присъствие, но и достатъчни количества специфични микроорганизми. Второто условие е недопускане на вторични контаминанти – антропогенни и биогенни бактерии и микроскопични гъбички, които биха могли да променят посоките на биотехнологичните процеси. Третото условие е – постигане на пълна микробиологична безопасност. Източниците на информация са както собствения експертен опит при контрол на разнообразни стартерни култури, така и фирмените документации, защитени от производителите на стартери – български и чуждестранни (конфиденциални данни).

### **Детски храни**

Важна група, за която предлагаме микробиологични критерии, са детските храни (17.01-17.06). Тези на млечна основа, предназначени за кърмачета и деца до 6 месечна и над 6-месечна възраст, са обект и на Регламент ЕО 1441/2007 <sup>[28]</sup>, който изисква задължително контрола на *Salmonella*, *Enterobacter sakazakii*, *Bacillus cereus* и *Enterobacteriaceae*. Двата последни микроорганизма са показатели за хигиена на процесите. Коагулазоположителните стафилококи не са в листата на Регламента, но за сметка на това в него се нормира отсъствието на стафилококови ентеротоксини. Ние считаме, че в детските храни при нашата действителност *B.cereus*, *S.aureus* и *Escherichia coli* също трябва да се наблюдават и третираат като критерии за безопасност на храните за най-ранната детска възраст, а критерии за хигиена на процесите да бъдат *Enterobacteriaceae* и микроскопичните плесенни гъбички. Това е традиционна практика за българските, а и за вносните детски храни и така формулираните нормативи могат да бъдат постигнати. Казаното се отнася и за детските храни на зърнена основа, които също са различни по възрастово предназначение и част от тях обхваща периода над 4 месеца, т.е. най-ранната детска възраст.

Особена група тук са стерилизираните детски консерви, изискващи специален надзор и повишени изисквания към промишлената стерилност. Те са не само равностойни на общата група на стерилизираните консерви, но изискват системно

наблюдение и върху термофилните микроорганизми като допълнение към общата схема. Пазарът не трябва да допуска партида детски консерви, не преминала през пълния цикъл на микробиологични изследвания по критериите, обозначени в проекта на **Методичното указание**. Тези критерии са изпитани в българската национална практика в продължение на десетилетия и са доказали своята обективност.

## МЕТОДИ ЗА МИКРОБИОЛОГИЧЕН АНАЛИЗ

Едно от задължителните условия за коректни микробиологични изследвания са прилаганите методи. За голямата част от показателите за безопасност и за хигиена на процесите има международно признати стандарти на ISO и EN ISO. В Регламенти ЕО 2073/2005 и 1441/2007 г. такива методи са посочени като референтни. Такъв подход сме възприели и ние при разработването на Методичното указание <sup>[45...- ...66]</sup>.

Референтните методи на ISO, EN и EN ISO могат да бъдат заменяни с алтернативни микробиологични методи само в случаите, когато последните са валидирани по процедурата от ISO 16140 <sup>[44]</sup>.

Трябва да отбележим, обаче, че не за всички критерии има международно признати методи. Това например се отнася за анаеробните микроорганизми и за други показатели, свързани с определянето на промишлената стерилност на консервите и за *Bacillus subtilis, ssp. mesentericus*. При определянето на промишлената стерилност в действие са българските стандартни методи БДС 1035-89 и БДС 6916-87 <sup>[1, 2]</sup>, а за *Bacillus subtilis, ssp. nesentericus* – отменения поради административен пропуск БДС 15090-80 <sup>[3]</sup>, който няма еквивалентна замяна в българските и международните стандарти.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нормирането на храните по микробиологични критерии не е еднократен акт. Това е процес, който се развива и усъвършенства в зависимост от потребностите на обществото, от конкретните хигиенни, технологични и производствени проблеми, от свободното движение на стоки в рамките на Европейския съюз и от рисковете, свързани с търговията с трети страни, от повишените изисквания към безопасността и качеството на храните, от задълбочаването и разширяването на научните познания. Предложените в **Методичното указание** критерии и методите за тяхната диагностика ще бъдат постоянно усъвършенствани и допълвани не без помощта на бизнес-операторите и контролните органи, които на практика ще изпитват тяхната приложна стойност и целесъобразност в името на безопасността и качеството на храните.

Очевидно е, че и международните микробиологични норми за храни и конкретно двата Регламента на ЕО ще бъдат постоянно обогатявани и усъвършенствувани в зависимост от задълбочените анализи на епидемичните рискове, от прогреса в хранителната промишленост, от потреблението и не на последно място – от научните факти и постижения в областта на микробиологията на храните и свързаната с нея оценка на биологичния риск.

На дадения етап обаче, бе необходимо да се удовлетвори острата потребност от национални норми за големи групи храни, които не са обхванати от Европейските нормативни документи. Тези храни имат своето място в традиционното хранене на населението и не по-малко се нуждаят от гарантиране на биологичната безопасност и производство при висока хигиена и съвременни технологии. Убедени сме, че разработката на българските национални микробиологични критерии за храни е навременна и необходима. Тяхното ползване при мониторинга, провеждан от контролните органи, ще способства за натрупването на автентични факти за хигиенното състояние на храните в България и ще бъде в основата на адекватната оценка на риска от биологични опасности у нас.

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. БДС 1035-89 Консерви месни, месо-растителни, рибни и други, приготвени с продукти от животински произход. Правила за вземане на проби и методи за изпитване
2. БДС 6916-87 Консерви плодови и зеленчукови стерилизирани. Методи за микробиологично изследване
3. БДС 15090-80 БРАШНА И ГРИС. Метод за определяне на *Bacillus mesentericus*
4. *Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы* СанПиН 2.3.2.1078.01, Минздрав России, Москва, 2002.
5. Еникова Р., М.Козарева, Ц.Иванова, Ж.Янгъзова. **Хигиенно-микробиологични проучвания на боза**. Хранителнопромишлена наука, I, 1985, 7, с. 73-8
6. Еникова Р., Е. Радоилска, Н.Петков, Б.Симова. **Микрофлора и нормиране на подправките от растителен произход**. Хранително-вкусова промишленост, 2004, 6, с. 11-16
7. Еникова Р. **Микробиологични рискове и контрол на преработени плодове и зеленчуци**. В „Наръчник за управление на безопасността на храните при преработката на плодове и зеленчуци”, 2007, С., Съюз на преработвателите на плодове и зеленчуци, Изд. Къща „ХВП”, с. 35-69
8. Еникова Р. **Биологични опасности в храните**. Изд. НЦООЗ, 2007, 40 с.
9. Еникова Р., Радоилска Р., К.Иванчева. **Микрофлора на майонезни и емулсионни продукти**. Сб. «Науката за хранене пред нови възможности и предизвикателства.» Под. Ред.Б.Попов, София, 2008, с.35-39
10. Еникова Р. **Регламенти 2073/2005 и 1441/2007 на Европейския съюз за микробиологичните критерии за хранителни продукти. Указания за практическо приложение**. Изд. НЦООЗ, С., 2008 г., с. 41
11. **ЗАКОН ЗА ХРАНИТЕ** Обн. ДВ. бр.90 от 15 Октомври 1999 г., изм. ДВ. бр.102 от 21 Ноември 2003 г., изм. ДВ. бр.70 от 10 Август 2004 г., изм. ДВ. бр.87 от 1 Ноември 2005 г., изм. ДВ. бр.99 от 9 Декември 2005 г., изм. ДВ. бр.105 от 29 Декември 2005 г., изм. ДВ. бр.30 от 11 Април 2006 г., изм. ДВ. бр.31 от 14 Април 2006 г., изм. ДВ. бр.34 от 25 Април 2006 г., изм. ДВ. бр.51 от 23 Юни 2006 г., изм. ДВ. бр.55 от 7 Юли 2006 г.
12. Иванчева К., Р.Еникова, Е.Радоилска. **Микробиологична характеристика и норми за кетъринг-продукция**. Сб. «Науката за хранене пред нови възможности и предизвикателства.» Под. Ред.Б.Попов, София, 2008, с.85-87
13. Козарева М., М. Димитров, Р.Еникова, И. Дончева. **Проблеми на микробиологията и микотоксикологията на хранителните продукти** (монография). С., 1981, Мед. и физк., с. 42-56 ; с. 67-69

14. **МЕТОДИЧНО УКАЗАНИЕ** за националните микробиологични критерии за хранителни продукти, които не са обект на Регламент ЕС 2073/2005 и Регламент ЕС 1441/2007 (Проект). С., НЦООЗ, 2009, [www.foodsafety.bg/images/files\\_1/all.pdf](http://www.foodsafety.bg/images/files_1/all.pdf)
15. **Наредба № 5** на МНЗ за пределно допустимите количества химични и биологични замърсители в хранителните продукти (ДВ, бр. 39/1984 г. - Сл.бюл. на МЗ, бр. 7, 1984 г.)
16. **Наредба** за изискванията към бутилираните натурални минерални, изворни и трапезни води, предназначени за питейни цели. Министерство на здравеопазването (ДВ, бр. 68/2004 г.)
17. **Наредба № 31** от 29 юли 2004 г. на МЗ и МЗХ за максимално допустимите количества замърсители в храните (Обн., ДВ, бр. 88 от 08.10.2004 г.; изм. и доп., бр. 51 от 23.06.2006 г.)
18. Никифоров В.Н., В.В.Никифоров. **Ботулизъм**, Л. „Медицина, 1985, 498
19. Симова Б., Р.Еникова. **Антибактериална активност на млечнокисели микроорганизми спрямо *L.monocytogenes***. Хиг. и здравеопазване, XLI, 1998, 2/3, с.43-46
20. AFFSA. TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT **On shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods** WORKING DOCUMENT Draft – July 2008
21. AFSSA. EU COMMUNITY REFERENCE LABORATORY FOR *LISTERIA MONOCYTOGENES*. **Guidance document for conducting shelf-life studies to determine compliance with microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods set out in ec regulation no 2073/2005, Version 1 - january 2008**
22. **An Evaluation of the Role of Microbiological Criteria for Foods and Food Ingredients.** Subcommittee on Microbiological Criteria, Committee on Food Protection, National Research Council (1985) National Academy Press, Washington, C.A.1985
23. **Bacteria Associated with Foodborn Diseases – Scientific Status Summary.** Institut Food Technologists, USA, august 2004
24. CAC/GL 21-1997. **Principles for the establishment and application of microbial criteria for foods.**
25. *CAC/GL 61 – 2007* Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods.
26. CE. Direction D-Sécurité alimentaire : chaines de production et de distribution, D2 – Risques biologiques **Dégré d'harmonisation des critères microbiologiques, maintien de critères nationaux.** Bruxelles, D(2005) ACR/eg/420953, 12.10.2005
27. COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on **microbiological criteria for foodstuffs**; Official Journal of the European Union ;22.12.2005; L 338/1 - L 338/26

28. COMMISSION REGULATION (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on **microbiological criteria for foodstuffs**; Official Journal of the European Union; 12.2007;L 322/12 - L 322/29
  
29. EFSA. **The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial resistance and Foodborne outbreaks in the European Union in 2005**, *The EFSA Journal* 2006-94, 3-288
  
30. EFSA. **The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial resistance and Foodborne outbreaks in the European Union in 2006**, *The EFSA Journal* 2007-130, 3-352
  
31. EFSA **Special measures to reduce the risk for consumers through *Salmonella* in table eggs** SCIENTIFIC OPINION *The EFSA Journal* (2009) 957, 1-29
  
32. Enikova R. **Bulgarian national microbiological limits for foods** сп. Advances in Bulgarien Science, 4, 2006, p. 34-41
  
33. European Spice Association. (ESA) **Quality Minima Document**. Adopted at the Business and Technical Meeting, Bonn, 19 november 2004
  
34. European Comission Directorate B - Scientific Health Opinions Unit B3 - Management of scientific committees II. **Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on *Listeria monocytogenes***, 1999
  
35. **European Herbal Infusions Association (EHIA) *Microbiological Status of Intreated Herbal Materials*** Microbiological Working Group of the European Herbal Infusions Association (EHIA),Hamburg, 2006.
  
36. **FAO/WHO Microbiological Specifications for Foods**. Report of the Second Joint FAO/WHO Expert Consultation held in Geneve, 21 February-2 March 1977
  
37. **FAO/WHO Food safety risk analysis**. A guide for national food safety authorities. Food and Nutrition Paper., Rome, 2006
  
38. Gotcheva V., S.S.Pandiela, A.Angelov, Z.G.Roshkova, G.Webb. **Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage Boza**. *Process Biochemistry* 36 (2000), 127-130
  
39. Hancioglu Ö., M. Karapinar. **Microflora of Boza, a traditional fermented Turkish beverage**. *Int. J. of Food Microbiology*. 35 (1997), 271-274
  
40. Havelaar A.H., E.G.Evers, M.J.Hauta. **Challenges of quantative microbial risk assesement at EU level**. *Trends in food Science & Technology* 19 (2008) 826-833

41. Hersom A.C., E.D.Hulland. **Canned Foods. Thermal processing and Microbiology.** 7-th ed. CL, Edinburg, London, New York, 1980
  
42. **ICMSF. Microbial Ecology of Foods. Vol.2. Food commodities.** Acad. Press, 1980, New York
  
43. **ICMSF. Microorganisms in Foods 2. Sampling for microbiological analysis. Principles and specific application,** 1986
  
44. **ISO 16140** Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol of validation of alternative methods
  
45. **ISO 4833** Microbiology of foods and feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration des micro-organisms – Colony count technique at 30°C
  
46. **ISO 4831** Microbiology of food and animal feeding stuffs - General guidance for the enumeration of *coliforms* - Most propable number techique
  
47. **ISO 4832** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of *coliforms* – Colony-count technique
  
48. **ISO 21528-1** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* - Part 1 : Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment
  
49. **ISO 21528-2** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* - Part 2 : Colony-count method
  
50. **ISO 16649-1** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 1 : Colony-count technique at 44°C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide
  
51. **ISO 16649-2** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2 : Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide
  
52. **ISO 16649-3** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 3 : Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide
  
53. **ISO 6579** Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of *Salmonella spp.*
  
54. **ISO 6888-1** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 1 : Technique using Baird-Parker agar medium
  
55. **ISO 6888-2** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of

- coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 2 : Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium
56. **ISO 6888-3** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 3 : Detection and MPN technique for low numbers
  57. **ISO 11290-1** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1 :Detection method. AMD 1 : Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data
  58. **ISO 11290-2** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1 : Enumeration method AMD 1 : Modification of the enumeration medium
  59. **ISO 7932** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptifs *Bacillus cereus* –Colony count technique at 30°C.
  60. **ISO 15213** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions
  61. **ISO 7937** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the enumeration of *Clostridium perfringens* –Colony count technique.
  62. **ISO 15214** Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria -- Colony-count technique at 30 degrees C
  63. **ISO/TS 22964 IDF/RM 210** Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*
  64. **ISO 13720** Meat and meat products – Enumeration of *Pseudomonas spp.*
  65. **ISO 7889/IDF 117** YOGURT – Enumeration of characteristic microorganisms – Colony-count technique at 37°C
  66. **ISO 7218** Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations
  67. Minor T.E, E.X.Marsh. **Staphylococci and their significance in foods**, Elsevier Sci. Publ. Company, Amsterdam-Oxford-New York 1976.
  68. **Principles and guidelines for incorporating microbiological risk assessment in the development of food safety standards, guidelines and related texts.** Report FAO/WHO Consultation, Kiel, Germany, 18-22 March 2002.
  69. **Request for the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *L.monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness.** Sci. Opinion of the Panel on BIOHAZ , Dec.2007; The EFSA Journal (2007) 599, 1-42

70. Smittle R.B., **Microbiological safety of mayonnaise, salad dressing, and sauces produced in the United States** Journal of Food Protection , 2000, vol. 63, No 8, pp 1144-1153.
71. **Standards and Guidelines for Microbiological Safety of Foods – an Interpretative Summary** Government of Canada. HPFB, Bureau of Microbiological Hazards, Food Directorate. Sir Frederic G.Banting Research Centre. Ottawa, Ontario, Juli, 2006.
72. Tatini S.R, Hoover D.G., Lachica R.V.F., **Methods for the isolation of *S.aureus* – in Compendium of methods for microbiological examination of foods**, 1984, 2-th ed.. Ed M.L.Speck, p.411
73. **WHO/FAO. Risk assesement of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**, Interpretative Summary. Geneve, 2004
74. **WHO/FAO *Enterobacter sakazakii* in powdered follow-up formulae** Microbiological risk assessment series 6 Meeting report, 2004
75. **WHO/FAO Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula.** Guideling. Rome, 2007
76. **WHO/FAO *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formula.** Microbiological risk assessment series 15 Meeting report, 2008
77. **WHO/FAO Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens** Interpretative summary. Microbiological risk assessment series 1, 2002
78. **WHO/FAO Hazard Characterization for Pathogens in Food and Water. Guidelines.** Microbiological risk assessment series 3, 2003
79. **WHO/FAO Exposure assesement microbiological hazards in foods.** Guideling. . Microbiological risk assessment series 7, Rome, 2008
80. **WHO/FAO Risk assessments of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods** Interpretative summary. Microbiological risk assessment series 4, 2004
81. **WHO/FAO *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula.** Microbiological risk assessment series 10 Meeting report, 2007
82. **WHO. The International Pharmacopoeia**, Third ed., Vol.5, Geneve, 2003
83. Zorba M., Ö. Hacıoglu, M.Gene, M. Karapinar, G.Ova. **The use of starter cultures in the fermentation of Boza, a traditional fermented Turkish beverage.** Process Biochemistry 38 (2003), 1403-1411