Nalaz bakterije Escherichia coli u mesnim pripravcima

Robina, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:400756

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Nalaz bakterije *Escherichia coli* u mesnim pripravcima

DIPLOMSKI RAD

Ana Robina

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Agroekologija – Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

Nalaz bakterije *Escherichia coli* u mesnim pripravcima

DIPLOMSKI RAD

Ana Robina

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Kozačinski

Neposredni voditelj: univ. mag. med. vet. Kornelija Jurina

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Ana Robina**, JMBAG 1003086618, rođena dana 25.02.1993. u Novoj Gradiški, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Nalaz bakterije *Escherichia coli* u mesnim pripravcima

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Ane Robina**, JMBAG 1003086618, naslova

Nalaz bakterije *Escherichia coli* u mesnim pripravcima

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:		potpisi:
1.	Prof. dr. sc. Lidija Kozačinski	mentor _____
	Univ. mag. med. vet. Kornelija Jurina	neposredni voditelj _____
2.	Prof. dr. sc. Bela Njari	član _____
3.	Izv.prof.dr.sc. Mirna Mrkonjić Fuka	član _____

Zahvala

Zahvaljujem se svim svojim profesorima Agronomskog fakulteta u Zagrebu koji su doprinijeli svojim trudom na proširenju moga znanja i nesebičnom pružanju informacija stečenih svojim iskustvom. Također zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima te svojim kolegama studentima. Najveću zahvalu posvećujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Lidiji Kozačinski koja mi je svojom strpljivošću i profesionalnim pristupom omogućila proširenju znanja u području Laboratorijskih metoda u mikrobiologiji hrane ujedno time i pisanju ovoga rada te neposrednoj voditeljici univ. mag. med. vet. Korneliji Jurina na pomoći tijekom istraživanja.

Sažetak

Mikrobiološka pretraga hrane jedan je od vrlo važnih procesa kontrole u proizvodnji i prometu hrane. Tako omogućavamo stavljanje sigurne hrane na tržište, ali i konzumaciju zdravstveno ispravnih namirnica te sprječavanje pojave bolesti koje se mogu prenijeti hranom kontaminiranom mikroorganizmima. U ovom radu pretraženo je 50 uzoraka mesnih pripravaka na nalaz bakterije *Escherichia coli* čiji dokaz ukazuje na fekalno zagađenje hrane. Samo u 8% uzoraka bakterija je dokazana u broju manjem od 500 cfu/g, što govori da su svi analizirani uzorci u ovom istraživanju pokazali zadovoljavajuće rezultate u odnosu na propisane mikrobiološke kriterije za hranu.

Ključne riječi: *Escherichia coli*, mesni pripravci

Summary

Findings of *Escherichia coli* in minced meat products

Microbiological examination of food is one of the most important process of control in food production and transport. This allows us to put safe food on the market but also the consumption of healthy food and prevention of spreading diseases that can be transmitted by food which is contaminated by microorganisms. In this paper, 50 samples of meat products were screened for the presence of Escherichia coli bacteria, whose evidence indicates faecal contamination of food. Just in8% of samples bacteria was proven to be less than 500 cfu / g, which suggests that all samples analyzed in this study showed satisfactory results in relation to the microbiological criteria set for food.

Keywords: *Escherichia coli*, minced meat products

Sadržaj

1. Uvod 1
2. Pregled literature 2
2.1. Bakterija *Escherichia coli* 2
2.1.1. Klasifikacija bakterije *Escherichia coli* 3
2.1.2. Rasprostranjenost bakterije *Escherichia coli* 3
2.1.3. Podjela patogene bakterije *Escherichia coli* 4
2.2. Učestalost pojave bakterije *Escherichia coli* 8
2.2.1 Učestalost pojave bakterije *Escherichia coli* u Europskoj uniji 8
2.2.2. Pojavnost EHEC u Hrvatskoj 9
2.3. Mljeveno meso i mesni pripravci 10
4. Zadatci rada 12
5. Materijali i metode 13
5.1. Uzorkovanje za mikrobiološko ispitivanje 13
5.2. Mikrobiološka pretraga 15
6. Rezultati i rasprava 23
7. Zaključci 25
8. Literatura 26
Životopis 28

1.Uvod

U velikim trgovačkim lancima potrošačima se meso osim kao konfekcionirano veoma često nudi kao unaprijed pripremljeno oblikovano usitnjeno mljeveno meso. Namirnice životinjskog podrijetla pogodan su medij za rast i razmnožavanje bakterija. Stoga spomenuti proizvodi imaju veliko epidemiološko značenje, a ukoliko budu uzrokom otrovanja hranom, često govorimo o velikom broju oboljelih ili masovnom otrovanju.

Jedan od čestih uzročnika kontaminacije hranom je bakterija *Escherichia coli*. Bakterija *E. coli* je uobičajeni stanovnik crijeva čovjeka i domaćih životinja. Njezina prisutnost u vodi i hrani pokazatelj je fekalnog zagađenja. Sirova ili nedovoljno toplinski obrađena hrana često sadrži bakteriju *E. coli*. Neki od serovarova *E. coli* su enteropatogeni, te su uzrokom velikog broja otrovanja hranom. Simptomi oboljenja ovise o infektivnoj dozi i patogenosti soja. Iako je veliki broj sojeva *E. coli* bezopasan, postoje oni koji stvaraju verotoksine (VTEC ili verotoksigeni sojevi *E. coli*) i uzrokuju ozbiljna oboljenja. VTEC sojevi su identificirani kao ljudski patogeni i uzročnici alimentarnih infekcija, a najčešći izdvojeni serovar je O157:H7 (Marinculić i sur. 2009.).

Otrovanja bakterijom su povezana s konzumacijom mesa i mlijeka, ali i voća, povrća, te s pitkom i bazenskom vodom, što se dovodi u korelaciju s fekalnom kontaminacijom tla. Tome je razlog izrazito mala infektivna doza, čak jedan mikroorganizam, pa umnažanje bakterije u hrani ili vodi nije ni potrebno.

U uvjetima proizvodnje i distribucije kontaminacija bakterijom *E. coli* je uvijek moguća. Stoga je od izuzetne važnosti učestalost kontrole i normativi mikrobiološke čistoće proizvodnih pogona i mesnica koji su predviđeni i zakonskim propisima.

Cilj ovoga rada bio je utvrditi mikrobiološku ispravnost mesnih pripravaka s obzirom na nalaz bakterije *E. coli*. Na taj način možemo procijeniti mikrobiološku ispravnost uzoraka, odnosno njihovu zdravstvenu ispravnost te higijenske uvjete proizvodnje i distribucije proizvoda.

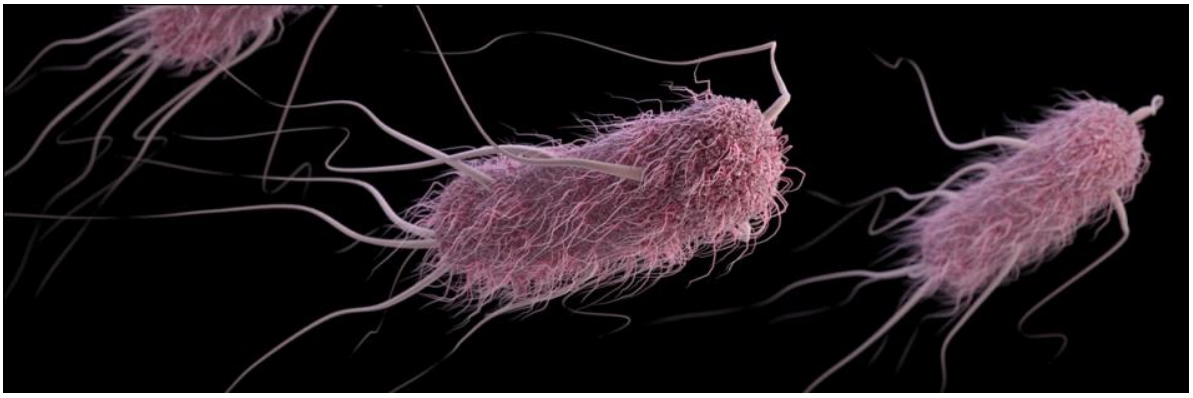
2.Pregled literature

2.1. Bakterija *Escherichia coli*

Escherichia coli je jedan od najpoznatijih mikroorganizama današnjice. Otkrivena je 1885. godine od strane austrijsko njemačkog pedijatra i mikrobiologa Theodora Escherichia, koji ju je tada nazvao *Bacterium coli* (Shulman i sur. 2007.). Godine 1919. predložena je promjena naziva ove bakterije u *Escherichia coli*, radi velikog broja otkrića novih vrsta bakterija (Blount 2015.).

E. coli je kratka štapićasta Gram-negativna bakterija, zaobljenih ili ravnih krajeva veličine samo oko 1 μm dužine širine 0,35 μm. Može znatno razlikovati ovisno o soju (Blount 2015.). Nakon bojenja štapići se smanje. Štapići mogu biti raspoređeni pojedinačno, u paru ili nepravilnim grupama (Anonimno 2012.).

E. coli može imati bičastu flagelu koja se koristi za kretanje po okolini ili pile koji joj omogućuju da se pričvrsti na površinu ili na druge stanice (Slika 1.). Asporogena je bakterija, a neki njeni sojevi mogu posjedovati kapsulu. Fakultativni je anaerob što znači da može rasti sa ili bez kisika (Blount 2015., Anonimno 2012.).



Slika 1. *E. coli*
Izvor: Centers for DiseaseControlandPrevention,2016.https://www.cdc.gov/ecoli/index.html

E. coli raspolaže velikom oksidativnom i fermetativnom aktivnošću. Razlaže šećere do mliječne kiseline, koja je glavni proizvod, i u manjoj mjeri do octene i jantarne, etilalkohola i CO_2 ili mješavina CO_2 i H_2O najčešće u odnosu 1:1.

Optimalna temperatura rasta iznosi 37°C, a neki se sojevi dobro razmnožavaju i na 44°C, što se koristi ako selektivni faktor za umnožavanje na bujonu. Minimalni pH iznosi 4,3, a minimalni aktivitet vode 0,96-0,93.

2.1.1. Klasifikacija bakterije *Escherichia coli*

E. coli je uvrštena unutar roda *Escherichia* koji ima samo jednu vrstu, ali veliki broj biotipova, serotipova i varijateta. Pripada porodici *Enterobacteriaceae* u skupinu koliformnih bakterija. U ovu porodicu pripadaju i rodovi nekih izrazitih patogena: *Klebsiella, Salmonella, Shigella, Proteus, Enterobacter, Edwardsiella, Serratia* i dr., koji obitavaju u crijevima čovjeka i uzrokuju različita oboljenja (Marinculić i sur. 2009.).

Klasifikacija vrste *Escherichia coli*:

Carstvo:	Bacteria
Koljeno:	Proteobacteria
Razred:	Gammaproteobacteria
Red:	Enterobacteriales
Porodica:	*Enterobacteriaceae*
Rod:	*Escherichia*
Vrsta:	*Escherichia coli*

2.1.2. Rasprostranjenost bakterije *Escherichia coli*

E. coli ima veliku sposobnost prilagođavanja na različitim staništima, time ima različite utjecaje na čovjeka i životinje što ju čini pogodnom za proučavanje bakterijske evolucije. Njena genomska i fenotipska raznolikost otežava procjenu rizika i tipizaciju sojeva. Značajna plastičnost genoma ključna je za varijabilnost ove vrste. Za njenu konkurentnost na pojedinim nišama zaslužne su sposobnosti stjecanja genetske informacije putem horizontalnog prijenosa gena, gubitak gena, genomske modifikacije, ko što su preraspodjela DNA i točkastih mutacija, stalo mijenjaju sadržaj genoma, a time i sposobnost i konkurentnost na pojedinim nišama (Leimbach i sur. 2013.).

Život *E. coli* podijeljen je u dvije faze, odnosno njena niša je vezana za dvije vrste staništa. Prva faza je boravak unutar domaćina kao crijevni mikrob u kojemu su uvjeti života puno stabilniji u odnosu na drugu fazu. Druga faza života *E. coli* se odnosi na život izvan domaćina. U vanjskom okruženju svi aspekti, kako prehrana, temperatura, pH, kisik, vlaga, te mikrobna zajednica kojim je okružena bakterija mogu varirati u velikim razmjerima. E. coli ne samo da preživljava boravak izvan domaćina ona postaje član mikro zajednice tla, vode i zajednica povezanih s biljkama. Njena prilagodna na puno teže uvijete preživljavanja pokazuje kako je ovaj organizam otporan i fleksibilan za preživljavanje izvan domaćina te time i vrijedan istraživanja (Blount 2015.).

Najveći broj stanica *E. coli* unutar domaćina nalazi se u crijevima ljudi i životinja. U ljudskom

crijevu čini 0,1-5% zajednice. Odnos domaćina i *E. coli* je dvosmjeran, odnosno mutualistički. Dok domaćin bakteriji osigurava uvjete za život, *E. coli* proizvodi vitamin K i vitamin B12 kod sisavaca, što dokazuje uzajamne pozitivne utjecaje u tom odnosu. Također pozitivno utječe na ostalu anaerobnu mikrobnu zajednicu trošeći kisik koji ulazi u crijeva te svojom sposobnošću isključivanja patogena iz svoje niše (Blount 2015.).

E. coli je prilično otporna bakterija. Mjesecima može živjeti u vodi i zemlji, a u različitim namirnicama se vrlo lako i brzo razmnožava. Otporna je na niske temperature, razmnožavaju se i na 0^{o}C i niže do – 5^{o}C, brzo postaje otporna na antibiotike. Osjetljiva je na temperature 60^{o}C/15-30 min ili 90^{o}C/4min. Može preživjeti čak i pasterizaciju mlijeka. Kao i druge bakterije iz ove porodice osjetljiva je na klor i klorne spojeve (Blount 2015.).

2.1.3. Podjela patogene bakterije *Escherichia coli*

Sredinom četrdesetih godina prošlog stoljeća dolazi do saznanja da su određeni sojevi *E. coli* patogeni te uzrokuju proljev, osobito kod dojenčadi. *E. coli* stvara toksine i izaziva različita oboljenja. Nalaz *E. coli* u hrani i vodi ukazuje na fekalno zagađenje. Brzo se razmnožava u hrani u idealnim uvjetima. Može izazvati infekcije. Načini prijenosa ove bakterije su vodom, prljavim rukama, namirnicama. Sojevi *E. coli* koji mogu uzrokovati oboljenja probavnog sustava čovjeka nazivaju se enterovirulentni sojevi. Unutar enteroviruletnih sojeva *E. coli* nalazi se više tipova. Podijeljeni su u šest skupina baziranih na njihovoj sposobnosti stvaranja toksina, sposobnosti vezanja i napadanja epitelnih stanica (Marinculić i sur. 2009).

Enterovirulentni sojevi bakterijske vrste *E. coli* dijele se u slijedeće skupine (Marinculić i sur. 2009):

- enterotoksična *E. Coli* (ETEC)
- enteropatogena *E. coli* (EPEC)
- enteroinvazivna *E. coli* (EIEC)
- enterohemoragijska *E. coli* (EHEC) u koji pripada serotip O157:H7
- enteroagregatna *E. coli* (EAEC)
- adherentna *E. coli*(DAEC)

Dvojbeno je da li u ovu grupu intestinalnih patogena uključiti i adherentno-invazivnu *E. coli* (AIEC) jer njezina moguća uloga u patogenezi Crohnove bolesti nije još definitivno potvrđena. (Desnica 2011.). Na koncu treba dodati i skupinu prihvaćajuće (eng. attaching and effacing) *E. coli* (AEEC).

Enterotoksična *E. coli*

Ovi sojevi su glavi uzrok proljeva među putnicima naročito kada su u pitanju zemlje u razvoju gdje su loši sanitarni uvjeti. Hrana i voda su povezane s pojavama epidemija ili pojedinačnih slučajeva trovanja kod ljudi. Procjenjuje se da je 300,000-500,000 smrti djece mlađe od 5 godina povezano s ETEC. Prisutnost bolesti je rezultat sposobnosti patogena da koloniziraju epitelne stanice crijeva pomoću pila ili faktora kolonizacije antigena (CFA), a zatim proizvodi toplinski labilni toksin (LT) ili toplinski stabilni toksin (ST) ili oba. LT toksini se vežu za GM1 gangliozidni receptor u eritrocitima i ne uzrokuje nikakve histološke promjene u slojevima sluznice. Moguća je se mala upala u crijevima. Toksin uzrokuje povećanje propusnosti membrane crijeva što uzrokuje neravnotežu elektrolita (Na+, K+) te veliki gubitak tekućine. Simptomi su gastroenteritis, kao blagi oblik kolere koji je smrtonosan za djecu radi gubitka tekućine i dehidracije. Zatim ostali znakovi i simptomi uključuju glavobolju, groznicu, mučninu i povraćanje. U terapiji je bitna rehidracija, naročito novorođenčadi i starijih osoba (FENG i sur. 2017.; Ray i Bhunia 2013.).

Enteropategone *E. coli*

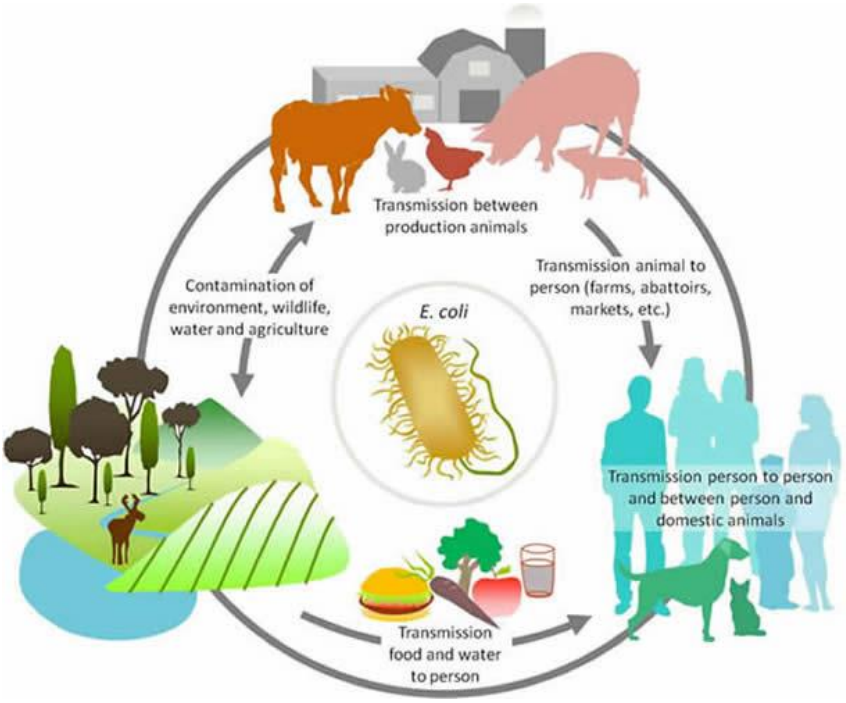
Atipični EPEC (aEPEC) je češći od tipičnog EPEC (tEPEC) u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju. Prenosi se direktno i indirektno putem zaraženih ljudi. Nekoliko serotipova (O111:H12; O55:H6) su uključeni u pojavu bolesti putem hrane i vode u različitim zemljama. Ovi sojevi su važni pri pojavi krvavog i vodenastog proljeva kod dojenčadi u cijelom svijetu naročito u mjestima s lošim sanitarnim uvjetima. Najčešći izvor ovih sojeva je sirova govedina i piletina, iako je svaka hrana koja je izložena kontaminaciji ljudskim fekalijama potencijalni izvor infekcije (FENG i sur. 2017.; Ray i Bhunia 2013.).

Enteroinvazivna *E. coli*

Poznato je samo za ljude da mogu biti domaćini patogena. Hrana se može kontaminirati direktno ili indirektno preko fekalne kontaminacije. Patogeni su osjetljivi na pasterizacijske temperature, stoga pravilan toplinski tretman uklanja mogućnost kontaminacije od toplinske obrade do „stola“ i potrebno je hlađenje hrane odmah nakon pripreme za kontrolu bolesti. Ovi sojevi su poznati uzročnici dizenterije, slično shigellozi. Prvo se vežu za epitelnu stanicu i prodiru od stanice do stanice šireći infekciju u crijevima. Oštećene stanice rezultat su krvavog mukoznog proljeva sličnog bakterijskom proljevu uzrokovanom *Shigellom*. Ljudski prijenosnici direktno i indirektno prenose bolest. Potrebna je konzumacija čak 10^6 stanica da bi pojedinac razvio simptome. Simptomi su grčevi u želucu, obilan proljev, glavobolja, zimica i temperatura. Veliki broj patogena se izlučuje putem fecesa. Bolest nastupa 12 do 72 sata nakon infekcije, a kao komplikacija se može javiti hemoragijski uremijski sindrom. Simptomi traju 7-12 dana, ali osoba može ostati prenositelj i širiti patogene putem fekalija dugo vremena (FENG i sur. 2017.; Ray i Bhunia 2013.).

Enterohemoragična *E. coli*

Enterohemoragična *E. coli* (EHEC) još se naziva i shiga-toxigenic*E. coli* (STEC). Sojevi iz ove grupe (od kojih je glavni serotip O157:H7) otkriveni su relativno nedavno (1982) kao uzročnici krvavih dijareja (hemoragijskikolitis) i hemolitičko-uremičkih sindroma (HUS) kod ljudi. Glavna karakteristika ovog serotipa je produciranje „Shiga-like“ toxina (Stx) koji je važan virulentni faktor odgovoran za HUS. Životinje, osobito goveda, smatraju se prijenosnicima naročito putem nedovoljno termički obrađenim hamburgerima. Unošenjem 10-100 stanica može rezultirati bolestima, osobito kod osjetljivih pojedinaca. (Više o kruženju *E. coli* na Slici 2.)Bolest se očituje snažnim bolovima u trbuhu i proljevom koji je isprva vodenast, a poslije sadrži velike količine krvi. Povraćanje nije uvijek prisutno. Temperatura je neznatno povišena ili normalna. Bolest obično traje oko 8 dana, a pojedini oboljeli imaju samo vodenast proljev. Sve su dobne skupine ljudi osjetljive prema hemoragijskom kolitisu, ali mala djeca i stariji ljudi obično imaju puno ozbiljnije simptome nego ostale dobne skupine.



Slika 2. Kruženje *E. coli* i način prijenosa infekcije

Izvor: EclLab, 2004. http://www.ecl-lab.com/en/ecoli/index.asp

Enteroagregatna *E. coli*

EAEC produciraju dva tipa toksina: EAST (enteroagregatni temperaturno stabilni toksin) i hemolizin koji formira pore. Iako EAEC ne producira shiga toksin, ali 2011. je otkriven novi EAEC serotip (O104:H4) koji stvara Stx i uzrokuje bolesti slične EHEC.

EAEC uzrokuje dijareju kod djece i odraslih koja traje više od 14 dana i prevladava u zemljama u razvoju. Dijareja kod djece je slična kao ETEC i uzrokuje blago, ali značajno oštećenje sluznice. Tijekom infekcije agregatno adherentne fimbrije pomažu bakteriji da formiraju karakteristične naslagane agregata u crijevnim stanicama i uzrokuju oštećenje sluznice (FENG i sur. 2017.; Ray i Bhunia 2013.).

E. coli O157

Za razliku od ostalih pripadnika roda *E. coli,* serotip O157 ne fermentira sorbitol. Nekoliko je mikrobioloških metoda razvijeno za izdvajanje serotipa O157 iz hrane. *E. coli* O157 je prepoznat kao glavni uzročnik infekcija koji se prenosi hranom. Pripada skupini enterohemoragijske *E. coli*. Proizvodi velike količine verotoksina koji uzrokuje ozbiljna oštećenja sluznice crijeva. Taj toksin još naziva i "shiga – like" toksin radi izrazite sličnosti toksinu bakterije *Shigella disenteriae*. Ovaj toksin napada male krvne žile, ubijaju crijevne stanice i izazivaju krvav proljev i tešku bol u trbuhu. Mogu se javiti teška zdravstvena stanja hemoragijskikolitis (HS),hemolitičkiuremski sindrom (HUS), trombocitopenija i zatajenje bubrega. Kod goveda i drugih stoke nalazi se asimptomatski. Prijenos na ljude odvija se putem fekalne kontaminacije mesa tijekom mljevenja i pakiranja. Gnojenjem i zagađenom vodom dolazi do kontaminacije povrće (FENG i sur. 2017.; Ray i Bhunia 2013.).

.

2.2. Učestalost pojave bakterije *Escherichia coli*

2.2.1 Učestalost pojave bakterije *Escherichia coli* u Europskoj uniji

Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) i Europski centra za prevenciju i kontrolu bolesti u godišnjim izvješću „*Europske unije o trendovima i izvorima zoonoza, zoonoticima i epidemijama uzrokovanim hranom"* prikazuje rezultate aktivnosti praćenja zoonoza koje su se provodile u toj godini. U 2015. godini sudjelovale su 32 europske zemlje.

U EU je u 2015. godini prijavljeno 5.901 potvrđenih slučajeva infekcija *Escherichia coli* (STEC) koje proizvode shiga toksin ljudi. Stopa prijave EU-a bila u 2016. godini niža je od stope prijavljivanja u 2014. godini. Najveća stopa prijave EU bila je nakon velikih izbijanja u 2011. godini u razdoblju od 2012. do 2015. godine, ali je stabilizirana u posljednje dvije godine. U 2015. godini u EU je zabilježeno osam smrtnih slučajeva zbog infekcije STEC-om, što je više u odnosu na 2014. godinu u kojoj je prijavljeno 7 slučajeva sa smrtnim ishodom. Kao i prethodnih godina, najčešće prijavljena serozna skupina STEC-a u 2015. godini bila je O157, 41,7%. Serogrupe O157 slijedile su serumske skupine O26, O103, O91, O145, O146 i O128. Većina slučajeva zaraženo je u vlastitoj zemlji 64,4%, zatim slijede slučajevi povezani s putovanjima 13,8% i 21,8% nepoznatog podrijetla. Najveći broja hospitalizacija 65% potvrđen je kod djece u starosti do 4 godine te 20% u starosti između 5 i 14 godina.

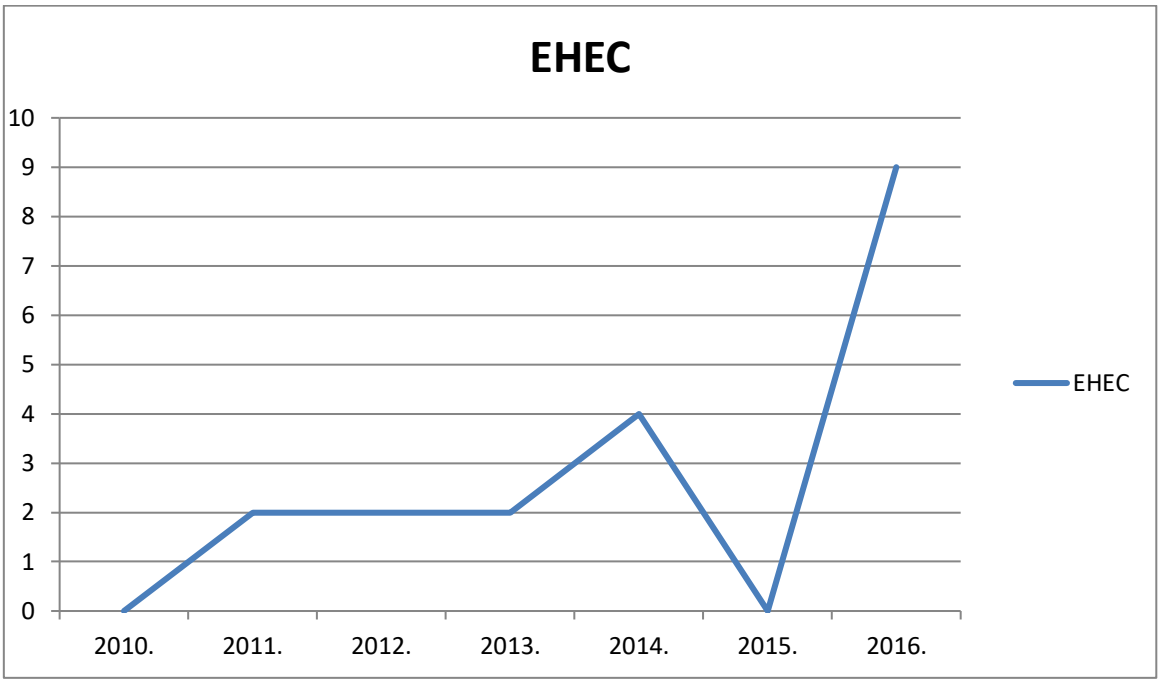
U 2015. godini prijavljeno je ukupno 4.362 epidemije *E. coli* uzrokovanih hranom, uključujući epidemije u vodi. Sveukupno, ove epidemije uzrokovale su 45.874 slučajeva bolesti (više od 2014), 3.892 hospitalizacija (manje od 2014) i 17 smrtnih slučajeva (manje od 2014. Kao i prethodnih godina, najčešće prijavljena serumska skupina je O157 koja je činila 41,7% slučajeva poznatih serotipova.

Shiga toksin koji proizvodi *E. coli* u hrani je dokazan u 602 uzoraka, što odgovara 2,9% od hrane testiranih u EU. Od toga pozitivnih na STEC O157 (1,3%). Najveći postotak pozitivnih uzoraka zabilježen je za svježi ovčji i kozji meso (12,2%), a slijedi meso od drugih preživača. Udio pozitivnih uzoraka u mesu jelena bio je 9,7%, znatno niži nego u 2014. godini. Kod ostalih kategorija hrane omjer varira između 0,2% i 2,7% ispitanih uzoraka. Udio pozitivnih uzoraka mlijeka (u koje se ne ubraja sirovo mlijeko) i mliječnih proizvoda iznosi 2,7%, nakon čega slijedi sirovo mlijeko 1,7% od, svježe govedo meso 1,6% od i svježe meso od ostalih životinja 1,1%. Voće i povrće te ostala hrana pokazuju postotke pozitivnosti ispod 1%. U 2015. godini, dva od 925 sjemenskih uzoraka sjemena navodno su sadržavala STEC. U cjelini, 12 MS je izvijestilo o podacima o STEC-u u ovoj kategoriji hrane.

Ukupna prisutnost STEC-a kod testiranih životinja u 2015. godini je zabilježena u 6,8% uzoraka. Udio pozitivnih uzoraka kod ovaca i koza iznosi 18,5%, zatim kod goveda 8,3% što je više u odnosu na prethodne godine i kod svinja 8,3% što je manje nego u 2014. i 2013. godini.

2.2.2.Pojavnost EHEC u Hrvatskoj

Prema godišnjim izvještajima trenda kretanja zaraznih bolesti u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2010.- 2016. godine objavljenom od strane Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar u (Tablica 1.) možemo vidjeti kako je posljednju godinu broj zabilježenih zaraza EHEC porastao, odnosno da je broj prijavljenih oboljenja u 2016. god. do sada najveći zabilježeni. U razdoblju od 2011. do 2013. broj prijavljenih oboljenja bio je konstantan (2 osobe godišnje), a u 2014. oboljele su četiri osobe. Slučaj smrt uzrokovan *E. coli* u Republici Hrvatskoj do sada nije zabilježen. Postoji mogućnost da neki slučajevi u datom razdoblju nisu prijavljeni radi blažih simptoma i samostalnom oporavku organizama prije otkrivanja uzročnika zaraze (Anonimno, 2017.).



Grafikon 1. Kretanje EHEC 2010.- 2016. (prema podacima HZZJZ)

2.3. Mljeveno meso i mesni pripravci

Prema Pravilniku o mesnim proizvodima, mesni proizvodi su definirani kao proizvodi zaklanih životinja i divljači, odnosno proizvodi od svježeg mesa dijele se na proizvode od mljevenog mesa i marinirani, panirani i tretirani proizvodi. Daljnjom podjelom, prema načinu na koji se stavljaju na tržište, proizvodi od mljevenog mesa dijele se na mljeveno meso i mesne pripravke. Mesni pripravci se proizvode i stavljaju na tržište pod nazivima: ćevapčići, pljeskavica, hamburger ili pod drugim nazivima.

Mesni pripravci mogu biti proizvedeni od jedne ili više vrsta mljeveno mesa i dodanih sastojaka uz pravilno i uredno oblikovanje. Kod svinjskog mesa proizvodi mogu sadržavati maksimalno 30% masti, a od goveđeg, ovčjeg i mesa kopitara maksimalno 25% masti.

Proizvode se i stavljaju na tržište kao toplinski neobrađeni, ohlađeni ili smrznuti, odnosno duboko smrznuti. Nije dozvoljena proizvodnja ovih proizvoda iz prethodno odmrznutog mesa.

Kada je u pitanju mikrobiološka ispravnost mljevenog mesa i mesnih pripravaka nalaz bakterije *E. coli* reguliran je Uredbom o mikrobiološkim kriterijima za hranu broj 2073/2005. Nalaz bakterije kontrolira se kako bi se procijenila higijena procesa proizvodnje. Kriterij se primjenjuje na kraju proizvodnog procesa, a u slučaju pozitivnog nalaza (>5000 cfu/g; n=5, c=2) moraju se poduzeti mjere poboljšanja higijene proizvodnje, izbora i/ili podrijetla sirovina. U ovom se slučaju nalaz *E. coli* koristi kao pokazatelj fekalne kontaminacije.

Varga i sur. (2012.) istraživali su mikrobiološku ispravnost proizvoda od mljevenog mesa te utvrdili *E. coli* u broju manjem od 10 cfu/g u 38 uzoraka mljevenog mesa, 27 uzoraka ćevapčića i 35 uzoraka svježih kobasica za roštilj.

Lindberg i sur. (1998.) su u svom istraživanju nalaza bakterija roda *Enterobacteriaceae*¸u mljevenom mesu nisu utvrdili *E. coli.*

Postupci testiranja hrane na mikrobiološko zagađenje obaveza su svih subjekata u poslovanju hranom. U Europskoj uniji takav monitor uključuje određivanje ukupnog broja bakterija, i broj enterobakterija na polovicama te nalaz *E. coli* i salmonela u mljevenom mesu. Paulsen i sur. (2006.) istraživali su brze metode izolacije bakterija i u tu svrhu upotrijebili kompjuterizirani MPN sustav (TEMPO, bioMe´rieux, Marcyl'Etoile, Francuska. Metodu su usporedili sa standardnim metodama. Pretražili su 62 uzorka zamrznutog mljevenog mesa (govedina, svinjetina i miješano mljeveno meso) te 55 uzoraka mljevenog mesa pohranjenog na temperaturi hladnjaka porijeklom od 37 lokalnih maloprodajnih dućana i četiri supermarketa. U mljevenom mesu *E. coli* je izolirana unutar razine detekcije u 80 uzoraka i to automatska MPN metoda *vs* standardna metoda na podlozi Coli-ID u rasponu od 1,0-4,2 log CFU/g , dok je MPN *vs* TBX agar taj raspon iznosio 1,0-4,2 log CFU/g.

Černelić (2002.) je istraživao bakteriološku ispravnost usitnjenog oblikovanog mesa (20 uzoraka ćevapčića i 20 uzoraka pljeskavica) porijeklom iz maloprodajnih radnji, pečenjara i restorana. U pretraženim uzorcima nalaz *E. coli* (>10^3/g) bio je pozitivan u jednom uzorku ćevapčića (5%) i u 2 uzorka pljeskavica (10%).

Slično je u svom istraživanju utvrdio i Kočila (1995.) koji je u 11,8% pretraženih uzoraka pljeskavica i ćevapčića utvrdio *E. coli* u broju većem od 1000/g uzorka. Prema tadašnjim propisima o mikrobiološkim standardima za namirnice (NN broj 46/94, 20/91, 40/01, 125/03 i 32/04), *E. coli* je smjela biti prisutna u najvećem broju od $<10^3$/g.

Popović (1998.) je također utvrdio onečišćenje proizvoda od usitnjenog mesa (pljeskavice i ćevapčići) u 16,7% pretraženih uzoraka (n=30). Autor smatra da rezultati ukazuju na potrebu osiguranja higijenski besprijekorne proizvodnje i pravilnu pohranu proizvoda od usitnjenog oblikovanog mesa, a jednako tako govori i Černelić (2002.) koji naglašava da bi se uvođenjem sustava samokontrole (HACCP) u male proizvodne pogone mogli poboljšati higijenski uvjeti.

4. Zadatci rada

Higijena hrane označava skup mjera koje osiguravaju sigurnu konzumaciju hrane. Kako bi se spriječile epidemije, trovanja hranom i zarazne bolesti, mjere koje se provode opisane su u zakonima i pravilnicima. Doneseni su propisi koji određuju konkretna pravila vezana za procjenu zdravstvene ispravnosti hrane u proizvodnji i distribuciji. Od podjele namirnice, učestalosti kontrole analiziranja, same analize, dokumentiranja rezultata te provođenje mjera ukoliko su rezultati nezadovoljavajući.

Zakoni i pravilnici na kojima se temelji ova analiza su: Zakon o hrani (NN 81/13, 14/14), Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 81/13), odnosno Uredba EZ o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2073/2005). Vodili smo se i kriterijima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu (2011.). koji je izdalo Ministarstvo poljoprivrede uzimajući u obzir Pravilnik o mesnim proizvodima kao i Pravilnik o učestalosti uzorkovanja trupova, mljevenog mesa i mesnih pripravaka te uvjetima i načinu smanjenja broja elementarnih jedinica uzorka u objektima manjeg kapaciteta proizvodnje (NN 38/10, 38/12).

5. Materijali i metode

Dokazivanje mikrobiološke ispravnosti mesnih pripravaka s obzirom na nalaz bakterije *E. coli* provedeno je u razdoblju 29.11. 2016.- 27.12. 2016. u laboratoriju za ispitivanje zdravstvene ispravnosti namirnica i predmeta opće uporabe *Zin-lab* u Zagrebu.

Analizom je pretraženo 50 uzoraka mesnih pripravaka.

Prije uzorkovanja uzorak je vizualno pregledan kako bi se utvrdila eventualna onečišćenja ili oštećenja pakovanja.

5.1. Uzorkovanje za mikrobiološko ispitivanje

Prilikom uzorkovanja važno je da se spriječi svako onečišćenje i kvarenje, kako uzorka tako i hrane iz koje je uzet sam uzorak. Uzorak mora biti reprezentativan. Broj uzetih elementarnih jedinica te količina uzetog uzorka mora odgovarati onima propisanim pravilima (Tablica 1.).

Tablica 1. Učestalost uzorkovanja mljevenoga mesa, mesnih pripravaka i strojno otkoštenog mesa (SOM) ovisno o kapacitetima proizvodnje (Anon. 2012.)

Mjesečni kapaciteti proizvodnje	**Vrsta mesa**	**Učestalost uzorkovanja**	
		Početna učestalost uzorkovanja	Smanjena učestalost uzorkovanja (kod zadovoljavajućih rezultata)
od 5 do 10 tona mesnih pripravaka	sve vrste mesa, osim mesa peradi	*E. coli:* 1 uzorak u 2 tjedna, do dobivanja 6 uzastopnih zadovoljavajućih rezultata	*E. coli:* 1 uzorak mjesečno
od 1 do 5 tona mesnih pripravaka	sve vrste mesa, osim mesa peradi	*E. coli:* 1 uzorak mjesečno, do dobivanja 4 uzastopna zadovoljavajuća rezultata	*E. coli:* 1 uzorak u 2 mjeseca
od 501 kg do 1 tone mesnih pripravaka	sve vrste mesa, osim mesa peradi	*E. coli:* 1 uzorak u 2 mjeseca, do dobivanja 3 uzastopna zadovoljavajuća rezultata	*E. coli:* 1 uzorak svaka 4 mjeseca
do 500 kg mesnih pripravaka	sve vrste mesa, osim mesa peradi	*E. coli:* 1 uzorak u 4 mjeseca, do dobivanja 3 uzastopna zadovoljavajuća rezultata	*E. coli:* 1 uzorak u polugodištu

U objektima za proizvodnju mljevenog mesa i mesnih pripravaka čiji mjesečni kapaciteti proizvodnje ne prelaze 10 tona mljevenog mesa ili mesnih pripravaka, učestalost uzorkovanja se smanjuje.

Transport i pohranjivanje

Transport i pohrana uzoraka ovise o vrsti namirnice, odnosno o njenoj brzini kvarenja, temperaturi koja bi uzrokovala kvarenje, izlaganju sunčevoj svijetlosti, vremenu od uzimanja uzorka do njegove analize. Sve o održavanju različitih vrata hrane propisano je u normi HRN ISO 7218/Amd 1:2004.

5.2. Mikrobiološka pretraga

Dokaz *E. coli* proveden je prema postupku opisanom u HRN ISO 16649-2:2001. Metoda brojenja beta-glukuronidaza pozitivne *E. coli* – Dio2.: Brojenje kolonija pri 44 °C uporabom 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide

Oprema i pribor

- Uređaj za sterilizaciju suhu ili vlažnu
- Termostati radne temperature od 44°C± 1°C
- Vodena kupelj radne temperature od 44°C do 47°C
- Epruvete, bočice i boce odgovarajuće zapremine
- Pipete i mikropipete, širokog otvora od 1 do 10 ml, graduirane pod 0.1 ml i 0.5 ml
- Petrijeve posude promjera 90 mm
- pH metar raspona mjerenja od ±0,1 pH jedinice, treba biti opremljen ili za ručno ili za automatsko podešavanje temperature

Hranjiva podloga

Za metodu brojanja beta-glukuronidasa pozitivne *E. coli* u proizvodima namijenjenima za prehranu ljudi i životinja koristi se tehnika brojanja kolonija pri 44°C na podlozi koja sadrži kromogene komponente za detekciju enzima β-glukuronidaze (sojevi *E. coli* koji ne rastu pri 44°C neće biti utvrđeni, kao što je *E. coli* O157). U ovoj metodi korištena je Triptone-bile-glucuronicmedium – TBX agar.

Priprema podloge:
Otopljeno je 30.6 g dehidrirane podloge u 1L destilirane vode. Lagano je zagrijavano do ključanja i miješano dok se dehidrirana podloga ne otopi u potpunosti. Razliveno je u bočice te stavljeno na sterilizaciju u autoklavu pri 121°C kroz 15 min.

Izolacija *E. coli*
Priprema uzoraka

Svaki uzorak je sastavljen od pet elementarnih jedinica (Slika 3.) te je pretragom dobiveno pet rezultata.



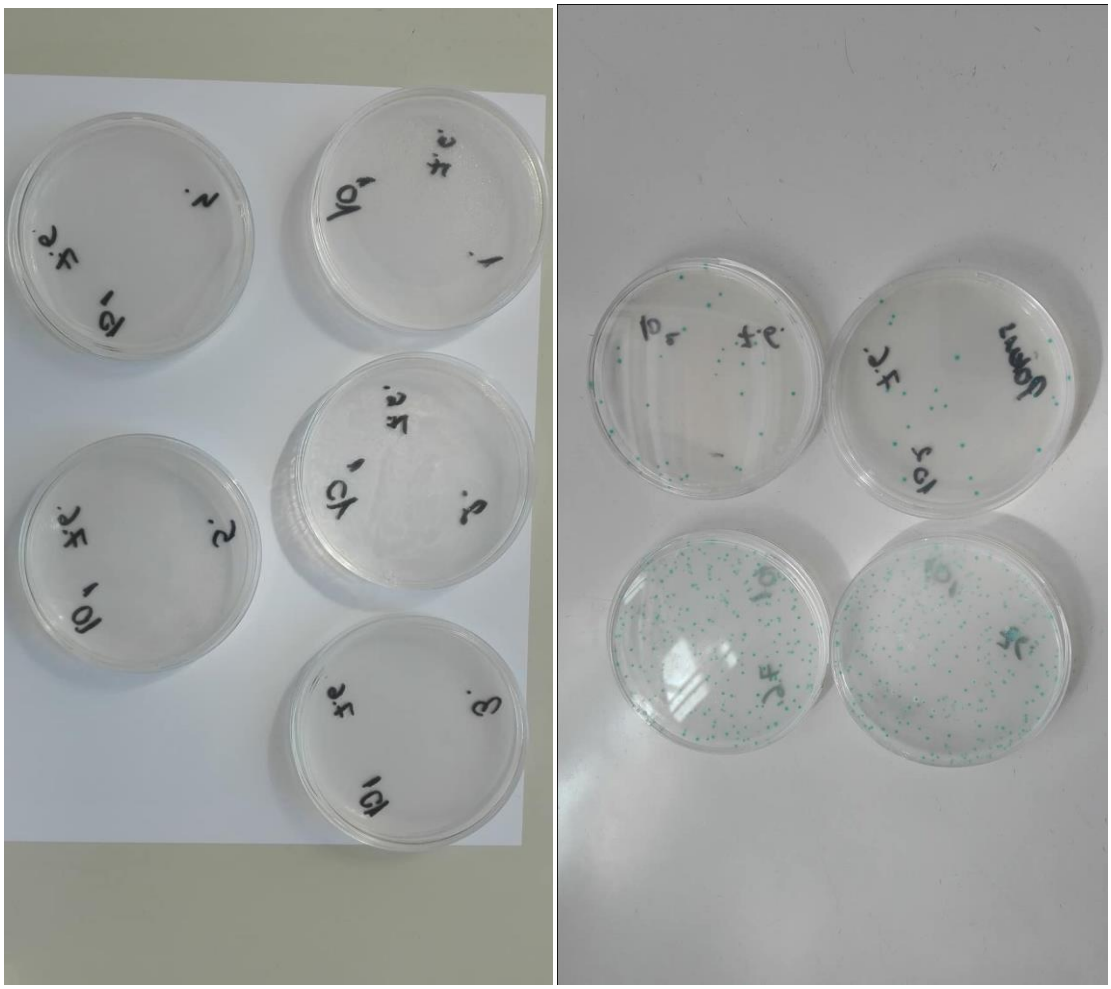
Slika 3. Uzorak podijeljen u pet jedinica (foto: Ana Robina)

Kako bi ispitni uzorak bio podesan za inokulaciju bilo je potrebno napraviti osnovno razrjeđenje. U tu svrhu izvagano je 25g uzorka, kojemu je dodano 255 ml fiziološke otopine. Uzorak je homogeniziran u sterilnoj vrećici (Slika 4.). Dobivena homogena smjesa korištena je za seriju razrjeđenja, odnosno 1 ml osnovnog razrjeđenja (10^{-1}). Inokulacija je provođena u rasponu razrjeđenja od 10^{-1} do 10^{-2} na jednu ploče po razrjeđenju. Za svako decimalno razrjeđenje, korištene su uvijek nove sterilne pipete.



Slika 4. Homogenizacija uzorka (foto: Ana Robina)

U svaku Petrijevu posudu izliveno je 15 ml TBX podloge, prethodno rashlađene na od 44°C do 47°C u vodenoj kupelji. Pažljivo izmiješani inokulum s podlogom ostavljen je na ravnoj vodoravnoj podlozi da se polimerizira. Dozvoljeno vrijeme između nacjepljivanja u Petrijeve posude i dodavanje podloge je maksimalno 15min.Petrijeve posude su okrenute tako da dno bude okrenuto prema gore i odložene u termostat na 44°C, između 18h i 24h. Ukupno vrijeme inkubacije ne bi smjelo biti duže od 24h (slika 5.). Korištenjem ove metode nastale kolonije *E. coli* su se pojavile u plavo zelenoj boji (slika 6.). Nakon određenog vremena inkubacije, izbrojene su tipične kolonije β-glukoronidaza-pozitivne *E.coli* porasle u svakoj Petrijevoj posudi koja ne sadrži manje od 15 tipičnih.



Slika 5.Inokulirani uzorak na seriji razrjeđenja 10^1- 10^6 - lijevo (foto: Ana Robina)
Slika 6. *E. coli* na TBX agaru, po 2 razrjeđenja 10^1 i 10^2 - desno (foto: Ana Robina)

Izračun

Nakon inkubacije izbrojen je ukupan broj formiranih kolonija. Da bi rezultat bio valjan broj CFU na jednoj ploči mora iznositi najmanje 15. Izračun N, broj CFU *E. coli* prisutnih u ispitanom uzorku po g, kao i u sljedećim razrjeđenjima je:

$$N = \frac{\Sigma a}{V\,(n1 + 0{,}1n2)d}$$

Σa- je ukupan broj CFU izbrojen na svim pločama izdvojenim za brojanje kod dva uzastopna razrjeđenja, gdje je kod najmanje jedne ploče broj CFU minimalno 15 plavih CFU

n_1- broj ploča izdvojen za brojenje kod prvog razrjeđenja

V- volumen inokuluma nacijepljen na svaku ploču (ml)

n_2- broj ploča izdvojen za brojenje kod drugog razrjeđenja

d- faktor razrjeđenja koji odgovara prvom razrjeđenju

Skupni rezultat uzorka je dobiven združivanjem pet elementarnih jedinica u uzorak te se ispitivanje provodilo na tom uzorku i dobiven se jedan rezultat koji se interpretira sukladno Uredbi o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2073/2005).

Na temelju izračuna provodi se interpretacija rezultata mikrobioloških ispitivanja. Rezultat može biti zadovoljavajući ukoliko je manji od granične vrijednosti m-500 cfu/g ili cm^2, prihvatljiv ukoliko se nalazi između prve i druge granične vrijednosti m-500 cfu/g ili cm^2M-5000 cfu/g ili cm^2 te nezadovoljavajući ukoliko se nalazi iza druge granične vrijednosti M (Tablica 2) (Uredba 2073/2005; Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, 2011.)

Tablica 2. Kriteriji za *E. coli* (Uredba 2073/2005)

Kategorija hrane	Mikroorganizmi	Plan uzimanja uzoraka		Granične vrijednosti		Ispitna referentna metoda	Faza u kojoj se kriterij primjenjuje	Mjera u slučaju nezadovoljavajućih rezultata
		n	C	M	M			
Mesni pripravci	*E. coli*	2	5	500 cfu/g ili cm^2	5000 cfu/g ili cm^2	HRN EN ISO 16649-1 ili HRN ISO 16649-2	Kraj proizvodnog procesa	Poboljšanje higijene proizvodnji, izbora i/ili podrijetla sirovina

API 20 E identifikacija

API (Analytical Profile Index) je metoda identifikacije mikroorganizama na razini vrste. API 20 E vrši identifikaciju i diferencijaciju vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae*. Metoda se vrši pomoću posebne plastične trake i skale za čitanje reakcije. Traka sadrži 20 malih biokemijskih testova u kojima se nalaze dehidrirani mediji (Tablica 3.).

Test se sastoji u dodavanju suspenzije *E. coli* u sve epruvete i nakon inkubiranja dodavanja odgovarajućih reagensa na neke od epruveta. Promjene u boji sadržaja cijevi omogućuju određivanje supstrata koji se raspadaju ili kakva je enzimska aktivnost prisutna. Specifikacija skupine ili žanra izrađuje se na temelju dijagnostičkog ključa koje pruža proizvođač.

Tablica 3. Biokemijski testovi za *E. coli* koje sadržava API 20 E test

1.	ONPG	ispitivanje enzima β-galaktozidaze hidrolizom supstrata o-nitrofenil-bD-galaktopiranozida
2.	ADH	dekarboksilacijaargininske aminokiseline argininskimdihidrolazom
3.	LDC	dekarboksilacijelizinskih aminokiselina pomoću lizindekarboksilaze
4.	ODC	dekarboksilacijeornitinaamino kiseline s ornitindekarboksilazom
5.	CIT	korištenje citrata kao izvora ugljika
6.	H_2S	proizvodnja sumporovodika
7.	URE	test za enzim ureazu
8.	TDA	TDA (triptofandeaminaza): detekcija enzima triptofandeaminaza: Reagens za stavljanje FerricChloride.
9.	IND	proizvodnja indola iz triptofana enzimom triptofanazom. Reagens- *Indol je detektiran dodavanjem Kovačevog reagensa.*
10.	VP	test Voges-Proskauer za detekciju acetoina (acetilmetilkarbinol) proizveden fermentacijom glukoze bakterijama koristeći stazu butilenglikola
11.	GEL	test za proizvodnju enzim želatinaze koji ukapljuje želatinu
12.	GLU	fermentacija glukoze (heksoznog šećera)
13.	MAN	fermentacija manoze (heksoznog šećera)
14.	INO	fermentacija inozitola (ciklički polialkohol)
15.	SOR	fermentacija sorbitola (alkoholni šećer)
16.	RHA	fermentacija ramnoze (metil pentoznog šećera)
17.	SAC	fermentacija saharoze (disaharid)
18.	MEL	fermentacija melibiose (disaharid)
19.	AMY	fermentacija amigdalina (glikozida)
20.	ARA	fermentacija arabinoze (pentoznog šećera)

Postavljanje API20E biokemijske test trake

Nakon što je mikroskopiranjem utvrđena čistoća kulture, uzeta je jedna izolirana kolonija te pomiješana s 3mL sterilne fiziološke otopine. Na traci API 20 E pomoću pipete ispunjene su jažice do ruba s bakterijskom suspenzijom, a jažice s biokemijski testovima CIT, VP, GEL ispunile u cijelosti. U odjeljke ADH, LDC, ODC, H2S i URE doda se sterilno ulje kako bi stvorili anaerobne uvjete (Slika 6). Zatvorimo test traku te ju označimo s identifikacijskom brojem i datumom. Trakicu stavimo na inkubaciju na 37°C na 18 do 24 sata. Čitanje rezultata kod nekih odjeljaka je moguće odmah nakon promjene boje po isteku 24 sata, a u neke je potrebno dodati reagense prije samog čitanja rezultata. Dodani reagensi su u TDA jedna kap FerricChloride, IND kapu reagensa Kovacs i VP jednu kap 40% KOH i jednu kapi VP Reagenta 2 (Slika 7).

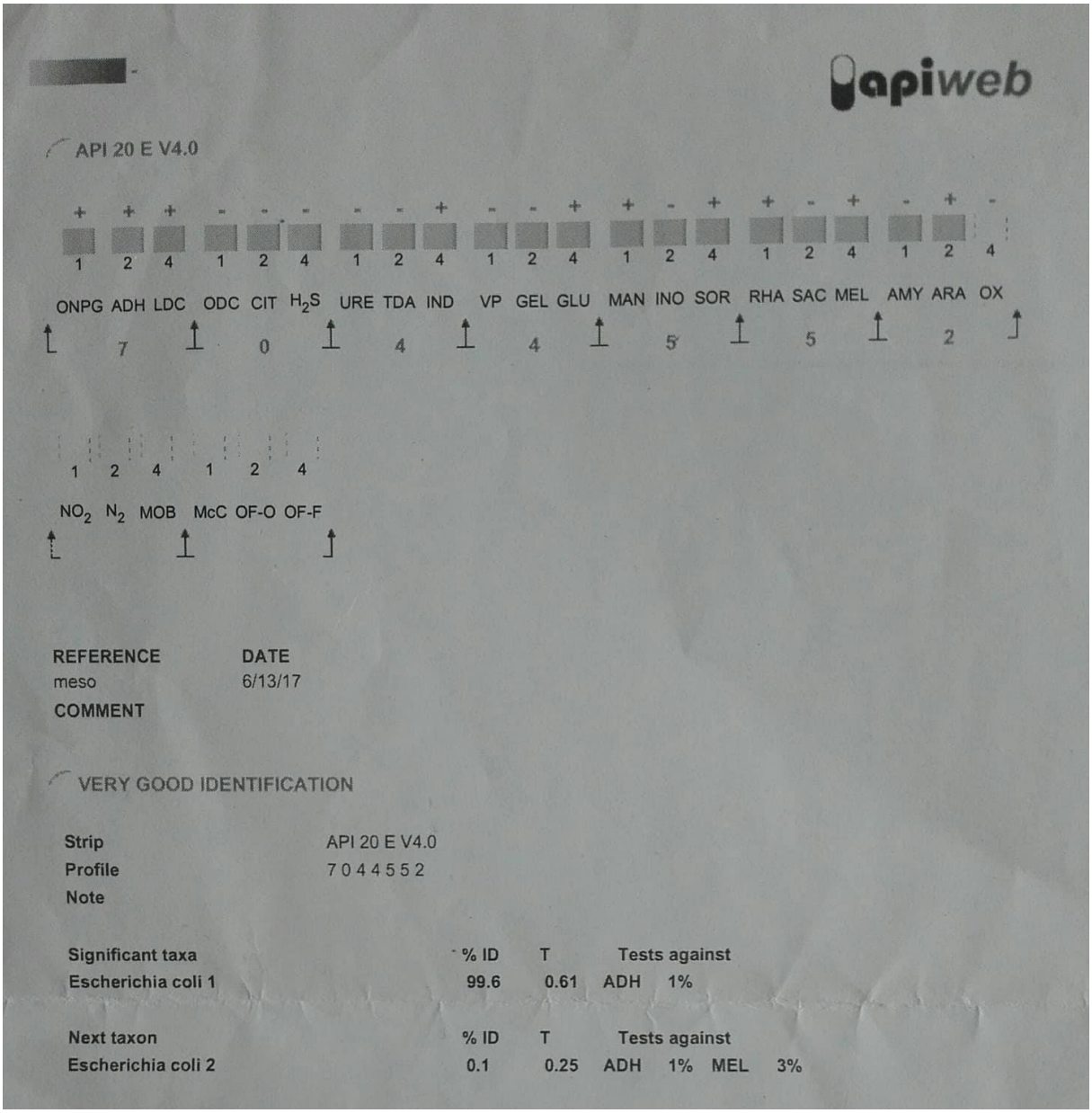


Slika 6. Inokulirana API 20 E test traka prije inkubacije (foto: Ana Robina)



Slika 7. Inokulirana API 20 E test traka nakon inkubacije (foto: Ana Robina)

Rezultati su očitani pomoću sheme boja, odnosno API skale za čitanje rezultata. Očitavanjem reakcija shemu boja zamjenjuju oznake plus i minus koje se unose u obrazac. Na obrascu su nacrtane jažice kojima je dodijeljen broj 1, 2 ili4. Skupine brojeva se zbrajaju i daju jedinstveni numerički kod. Unose u program gdje dobivamo rezultate analize i otkrivamo profil organizma (Slika 8.).



Slika 8. Ispis rezultata dobivenih API 20 E testom (foto: Ana Robina)

6. Rezultati i rasprava

U uzorcima mesnih pripravaka *E. coli* nije utvrđena u broju većem od 5000 cfu/g, ali je utvrđena u četiri uzorka ili 8% (n=50) u vrijednostima manjima od 500 cfu/g. Rezultati bakteriološke pretrage za uzorke 5, 14, 23 i 46 u kojima je utvrđena prisutnost *E. coli* prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Rezultati bakteriološke pretrage na nalaz *E. coli*

Broj uzorka	Metoda	Granične vrijednosti	*E. coli*, cfu/g		Procjena
5	HRN ISO 16649-2:2001	500- 5.000	EJ* br. 1.	70	Ispravno
			EJ* br. 2.	50	
			EJ* br. 3.	60	
			EJ* br. 4.	50	
			EJ* br. 5.	60	
14	HRN ISO 16649-2:2001	500- 5.000	EJ* br. 1.	100	Ispravno
			EJ* br. 2.	80	
			EJ* br. 3.	60	
			EJ* br. 4.	70	
			EJ* br. 5.	100	
23	HRN ISO 16649-2:2001	500- 5.000	EJ* br. 1.	200	Ispravno
			EJ* br. 2.	300	
			EJ* br. 3.	400	
			EJ* br. 4.	200	
			EJ* br. 5.	300	
46	HRN ISO 16649-2:2001	500- 5.000	EJ* br. 1.	120	Ispravno
			EJ* br. 2.	140	
			EJ* br. 3.	100	
			EJ* br. 4.	110	
			EJ* br. 5.	120	

* EJ- elementarna jedinica

Kao što je vidljivo uz Tablice 4. svi su uzorci u kojima je utvrđen nalaz *E. coli* sadržavali bakteriju u broju manjem od 500 cfu/g i to u svih pet pretraženi elementarnih jedinica. Prema Uredbi 2073/2005 uzorci se smatraju zdravstveno ispravnima. U uzorku broj 5 taj je broj iznosio od 50-70 cfu/g, u uzorku broj 14 od 60-100 cfu/g, u uzorku broj 23 od 200-400 cfu/g i u uzroku broj 46 od 120-140 cfu/g. Kao što smo već rekli u preostali 46 uzoraka bakterija nije utvrđena.

Naši rezultati ukazuju na veći broj utvrđenih bakterija *E. coli* u mesnim pripravcima u odnosu na istraživanja Lindberga i sur. (1998) i Varge i sur. (2012). Unatoč činjenici da *E. coli* u njihovim istraživanjima nije utvrđena ili je utvrđena u broju manjem od 10 u gramu uzorka, važno je napomenuti da su naši uzorci bili procijenjeni ispravnima u odnosu na postojeće propise.

Za razliku od našeg istraživanja, Černelić (2002.) je utvrdio u sirovim ćevapčićima i pjeskavicama *E. coli* u broju većem od 1000/g. Također, Kočila (1995.) i Popović (1998.) utvrdili su u svojim istraživanjima mikrobiološke ispravnosti mesnih pripravaka da 11,8% odnosno 16,7% pretraženih uzoraka ne zadovoljava propise zbog nalaza većeg broja *E. coli* od dozvoljenog. Iako je u našem je istraživanju, bakterija utvrđena u 8% pretraženih uzoraka, utvrđeni broj *E. coli* bio je u granicama dozvoljenog pa se uzorci smatraju ispravnima prema mikrobiološkim kriterijima.

7. Zaključci

Na osnovi rezultata istraživanja analiziranih mesnih pripravaka možemo zaključiti sljedeće:

- Svi pretraženi uzorci nakon bakteriološke pretrage na *E. coli* odgovaraju kriterijima o sigurnosti hrane prema Uredbi 2073/2005 te zadovoljava kriterije Vodiča o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2011)
- Bakterija *E. coli* utvrđena je u četiri uzorka mesnih pripravaka u broju manjem od dozvoljenih graničnih vrijednosti (<500/g)
- Mjere koje se poduzimaju u procesu proizvodnje mesnih pripravaka u cilju sprječavanja kontaminacije bakterijom *E. coli* mogu se smatrati zadovoljavajućima s obzirom na dobre rezultate analize

8. Literatura

1. Anonimno (2005). Uredba komisije (EZ) br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu (L 338/1).
2. Anonimno (2011). Vodič o mikrobiološkim kriterijima za hranu (3. izmijenjeno izdanje, ožujak, 2011)
3. Anonimno (2012). Enciklopedija. Mikrobiologija hrane. Objavljeno 02.09.2012. https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/rod-escherichia. Pristupljeno 1. 9.2018.
4. Anonimno (2012). Pravilnik o mesnim proizvodima (NN 131/2012)
5. Anonimno (2012). Pravilnik o učestalosti uzorkovanja trupova, mljevenog mesa i mesnih pripravaka te uvjetima i načinu smanjenja broja elementarnih jedinica uzorka u objektima manjeg kapaciteta proizvodnje (NN 30/10 i 38/12)
6. Anonimno (2017). Statistički ljetopis 2016. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Tablični podaci. Zarazne bolesti u Hrvatskoj u 2016. godini.
7. Blount ZD (2015). The unexhaustedpotentialof *E. coli.* eLife 4: e05826 DOI: 10.7554/eLife.05826
8. Černelić S. (2002). Kakvoća proizvoda od usitnjenog oblikovanog mesa. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu. Veterinarski fakultet. Rukopis (strojem), str. 26.
9. Desnica B (2011). Shiga toksin enteroagregacijska*Escherichiacoli* O104:H4 – emergentniserotip. Infektološki glasnik 31:4, 185–188.
10. Feng P, Weagant SD., Jinneman K (2017): Diarrheagenic *Escherichia coli*, ch. 4a, Updated 10/2017. U: Bacteriological Analytical Manual), U.S. Food Drug Administration - FDA/BAM, dostupno na https://www.fda.gov/food/ foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070080.htm.Pristupano: 9.9.2018.
11. Kočila P. (1995). Bakteriološka ispravnost proizvoda od usitnjenog oblikovanog mesa. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu. Veterinarski fakultet. Rukopis (strojem), str. 33.
12. Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U (2013).E. coli as anall-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. U: between pathogenicity and commensalism. Edts Dobrindt Ulrich, Jörg H. Hacker, Svanborg Catharina. Pp 3-32
13. Marinculić A, Habrun B, Barbić LJ, Beck R (2009): Biološke opasnosti u hrani. Hrvatska agencija za hranu, Osijek.
14. Paulsen P., Schopf E, Smulders J. M. (2006). Enumeration of Total Aerobic Bacteria and Escherichia coli in Minced Meat and on Carcass Surface Samples with an Automated Most-Probable-Number Method Compared with Colony Count Protocols. Journal of Food Protection 69:10, 2500–2503
15. Popović V. (1998): Higijenska ispravnost proizvoda od usitnjenog mesa. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu. Veterinarski fakultet. Rukopis (strojem), str. 26.
16. Ray B, Bhunia A (2013.) Fundamental Food Microbiology, Fifth Edition. CRC Press
17. Shulman ST, Friedmann HC, Sims RH (2007). Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? Clinical Infectious Diseases. 45:1025–1029. doi: 10.1086/521946.
18. Varga A., Plavšić D., Kokić B., Tasić T., Šarić L., Gubić J., Šarić B. (2012): Assessment

of minced and grill meat microbiological safety in year 2012. XV International Feed Technology Symposium. COST-"Feed for Health" joint Workshop, Proceedings. Edts Lević, J.; Sredanović, S.; Đuragić, O. Novi Sad, Serbia, 3-5 October, 2012 2012 pp.273-277

Životopis

Ana Robina rođena 25.02.1993. godine u Novoj Gradiški. U Zagrebu, 2011., završava srednju školu za medicinske sestre Mlinarska. Iste godine upisuje preddiplomski studij sanitarnog inženjerstva na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu koji završava 2015. godine obranom završnog rada pod naslovom „Postupanje sanitarne inspekcije u uvjetima elementarne nepogode – poplava na području Slavonije“. Te stječe akademski naziv prvostupnica sanitarnog inženjerstva (bacc. san. ing.). Po završetku preddiplomskog studija, iste godine upisuje diplomski studij na Agronomskom fakultetu u Zagrebu smjera agroekologija, usmjerenja mikrobna biotehnologija u poljoprivredi.