

# Rast bakterije *Yersinia enterocolitica* u mljevenom svinjskom mesu na +4C i +10C

---

**Bijelić, Tea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:774438>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2020-10-30**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**VETERINARSKI FAKULTET**

**Tea Bijeli**

**RAST BAKTERIJE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* U  
MLJEVENOM SVINJSKOM MESU NA +4°C i +10°C**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2016.**

**VETERINARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU**

**ZAVOD ZA HIGIJENU, TEHNOLOGIJU**

**I SIGURNOST HRANE**

**Predstojnica:**

**Izv. prof. dr. sc. Vesna Dobrani**

**Mentor:**

**Doc. dr. sc. Nevijo Zdolec**

**Članovi povjerenstva:**

- 1. Izv. prof. dr. sc. Vesna Dobrani**
- 2. dr. sc. Ivana Filipovi**
- 3. Doc. dr. sc. Nevijo Zdolec**

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Mljeveno meso</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. Yersinia enterocolitica</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2.1. Povijest</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2.2. Taksonomija i fiziološke karakteristike</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3. Izolacija i identifikacija <i>Y. enterocolitica</i></b> .....	<b>7</b>
<b>2.4. Pojavnost patogene <i>Y. enterocolitica</i></b> .....	<b>10</b>
<b>2.4.1. Svinje i svinjsko meso</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4.2. Preživa i i perad</b> .....	<b>12</b>
<b>2.4.3. Ostalo</b> .....	<b>12</b>
<b>2.5. Jersinioza ljudi</b> .....	<b>13</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1. Izolat <i>Yersinia enterocolitica</i></b> .....	<b>15</b>
<b>3.1.1. MALDI-TOF MS</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2. Inokulacija mljevenog mesa i brojenje <i>Y. enterocolitica</i></b> .....	<b>16</b>
<b>3.3. Statisti ka obrada</b> .....	<b>16</b>
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>17</b>
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>20</b>
<b>6. ZAKLJU AK</b> .....	<b>23</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>24</b>
<b>8. SAŽETAK</b> .....	<b>28</b>
<b>9. SUMMARY</b> .....	<b>29</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>30</b>

## *Zahvala*

*Zahvaljujem se mentoru, doc.dr.sc. Neviju Zdolecu, na ukazanom povjerenju prilikom obavljanja istraživanja te na velikoj pomoći i savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta koji su na bilo koji način sudjelovali u realizaciji ovog istraživanja.*

*Ujedno se zahvaljujem svim prijateljima i kolegama na pomoći i podršci tijekom razdoblja studiranja, te na kraju veliko hvala roditeljima, koja je potpora uvijek bila tu.*

## 1.UVOD

Mikrobiološka ispravnost zauzima značajan dio u prosudbi zdravstvene ispravnosti hrane životinjskog podrijetla, posebice u proizvodnji mesa i proizvoda od svježeg mesa. Naime, postupci klasične obrade, hlađenja, rasijecanja i daljnje obrade uvelike će uvjetovati mikrobiološku sliku svježeg mesa i proizvoda. Provođenje dobre proizvodne prakse i dobre higijenske prakse preduvjeti su postizanja propisanih kriterija higijene procesa u proizvodnji mesa.

Meso predstavlja idealnu podlogu za rast mikroorganizama koji mogu sudjelovati u procesima kvarenja ili čak izazvati otrovanja ljudi (MILIN, 2015.) Usitnjeno meso posebno je osjetljivo u smislu higijene u proizvodnji i sigurnosti proizvoda. Pri usitnjavanju mesa, mikroflora koja se nalazi na površini podjednako se raspoređuje u mljevenom mesu, što povećava površinu mikroorganizama i mesa, te uz visok aktivitet vode dovodi do brže bakterijske razgradnje i kvarenja nego li u porcioniranom mesu (MILIN i sur., 2016.). U primarnoj mikroflori mesa prevladavaju gram-negativne bakterije što uključuje i vrlo opasne crijevne bakterije kao što su *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. te neke vrste roda *Pseudomonas*, a od gram-pozitivnih najčešće nalazimo laktobacile i enterokoke (JAY i sur., 2005.; cit. MILIN, 2015.). Svinjsko meso može biti onečišćeno i patogenom bakterijom *Yersinia enterocolitica* koja je prirodno prisutna primarno u tonzilama zdravih svinja pa tijekom klasične obrade bude prenesena na meso i trupove (ZDOLEC i sur., 2015.). *Yersinia enterocolitica* je bila zanemaren uzročnik zoonoza i bolesti prenosivih hranom, no danas je prepoznata u javnom zdravstvu. Prema izvješću Europske agencije za sigurnosti hrane (EFSA, 2015.) broj prijavljenih hospitaliziranih slučajeva ljudi sa dijagnosticiranom jersiniozom nalazi se na trećem mjestu odmah iza kampilobakterioze i salmoneloze. Izvor zaraze za uvijek je kontaminirana hrana i to najčešće meso, mliječni proizvodi i kontaminirana voda. Izvješća o epidemijama jersinioze bila su najčešće povezana sa konzumacijom svinjskog mesa. Glavni rezervoar patogenih serovarova O:3 i O:9 je svinja. *Yersinia enterocolitica* je specifična i po tome što je kao i *Listeria monocytogenes* sposobna umnožavati na temperaturama hladnjaka, koje inače inhibiraju rast većine patogena koje uzrokuju trovanja hranom.

Kako bi se spriječila i predvidjela mogućnost sekundarne kontaminacije, u ovom slučaju svinjskog mesa, i usprkos činjenici da bakterija preživljava temperature hladnjaka

potrebno je poznavati dinamiku rasta bakterije na različitim temperaturama. Stoga je cilj ovog diplomskog rada ustanoviti potencijal rasta *Y. enterocolitica* O:3 u usitnjenom svinjskom mesu tijekom pohrane na +4 °C i +10 °C. Svrha istraživanja je simuliranje naknadne (sekundarne) kontaminacije mesa te usporedba dinamike rasta bakterije s obzirom na njenu psihrotrofnost. Dobiveni rezultati mogu doprinijeti predviđanju rasta *Y. enterocolitica* u mljevenom svinjskom mesu pohranjenom na temperaturi hladnjaka.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. *Mrjeveno meso*

Usitnjavanjem gove e, svinjskog ili ov jeg mesa, te mesa kopitara s dodacima ili bez njih dobiva se proizvod koji nazivamo usitnjeno mljeveno meso. Proizvodi od mljevenog mesa u promet se mogu stavljati kao usitnjeno mljeveno meso ili usitnjeno oblikovano meso-mesni pripravci. Mesni pripravci dobivaju naziv ( evap i i, pljeskavica, hamburger ili neki drugi) ovisno o kasnijem oblikovanju.

Prema Pravilniku o mesnim proizvodima (NN 131/12) mljeveno meso definirano je kao otkošteno meso samljeveno na komadi e koje sadrži manje od 1% soli. Na tržište se stavlja tako da se ispred naziva „mljeveno meso“ dodaje naziv životinjske vrste od koje meso potje e te mora biti naglašeno „ postotak masti manji od ...“ i „ omjer kolagena i bjelan evina mesa manji od ...“. Usitnjeno mljeveno meso dobiveno je usitnjavanjem mesa I. i II. kategorije s tim da usitnjeno svinjsko mljeveno meso ne smije sadržavati više od 30% masti, dok je postotak za gove e, ov je i meso kopitara 25%. Ostali zahtjevi propisani Pravilnikom o mesnim proizvodima (NN 131/12) navedeni su u Tablici 1.

Tablica 1. Zahtjevi za mljeveno meso prema Pravilniku o mesnim proizvodima (NN 131/12)

	<b>% MASTI</b>	<b>OMJER KOLAGENA I BJELAN EVINA*</b>
KRTO MLJEVENO MESO	7 %	12 %
GOVE E MLJEVENO MESO	20 %	15 %
MLJEVENO MESO KOJE SADRŽI SVINJETINU	30 %	18 %
MLJEVENO MESO DRUGIH VRSTA	25 %	15 %

\*Omjer kolagena i bjelan evina mesa izražen kao postotak kolagena u bjelan evinama mesa. Za koli inu kolagena se uzima koli ina hidropsiprolina, pomožena s faktorom 8.



Stroj za mljevenje mesa naziva se vuk (njem. volf = vuk, fleischmaschine), a za dodatno mljevenje i usitnjavanje se koriste strojevi za sjeckanje ili kuteri (engl. cutter = reza ). U stroju za mljevenje se meso nakon ulaza potiskuje u mehanizam sa inžen od rešetki koje su okrugle plohe s rupama različitog promjera (ovisno o željenoj razini mljevenja) i noževa koji su postavljeni prema rešetki pod kutem od 75 °, a nalaze se između puža i rešetke.

Svježe mljeveno meso je svojstvene, meko – elastične, a ponešto i gnjecave konzistencije. Ono nikako nije mazivo i ljepljivo. Boja mu je svjetlo crvena do tamnocrvena ovisno o vrsti, dobi i uhranjenosti životinja (ŽIVKOVI , 1986.) Struktura mu je homogenizirana, a mast je dispergirane čestice mišićnog tkiva u masti, dok disperznu sredinu čini otopina bjelancevina i elektrolita. Mljeveno meso je po svom kemijskom sastavu vrlo pogodan medij za rast i razmnožavanje mikroorganizama. Razlog tome je što se mljevenjem razaraju stanice tkiva, kidaju se vezivnotkivne ovojnice te se tako oslobađaju i nutrijenti koji omogućuju vrlo pogodan medij za razmnožavanje mikroorganizama (MILIN, 2015.). Osim što je dobar medij za razmnožavanje mikroorganizama, ograničena trajnost mljevenog mesa pripisuje se velikom broju bakterija koje se upotrebljavaju te uporabi lošije kakvoće mesa koje se upotrebljava pri obradi (DURAKOVI , 2002.). Sekundarna kontaminacija mljevenog mesa moguća je prilikom procesa obrade mesa i pohrane. Ambalaža koja je primjerena pakiranju mljevenog mesa je ona koja je nepropusna za vodu, kako bi se smanjila mogućnost stvaranja pogodnih uvjeta za rast bakterija. Temperatura na kojoj se čuva mljeveno meso u proizvodnji je od +0,5 °C do +4 °C, dok se u prodavaonicama čuva na temperaturi od + 8 °C. Temperatura od + 4 °C, koja je uobičajena temperatura čuvanja mesnih prerađevina povoljno djeluje na mogućnost razmnožavanja *Y. enterocolitica* (NOSO, 1990.). Laka kvarljivost, visoki stupanj bakterijske kontaminacije te velika mogućnost sekundarne kontaminacije razlog su zbog kojeg je mljeveno meso vrlo čest uzročnik alimentarnih infekcija i intoksikacija.

## **2.2. *Yersinia enterocolitica***

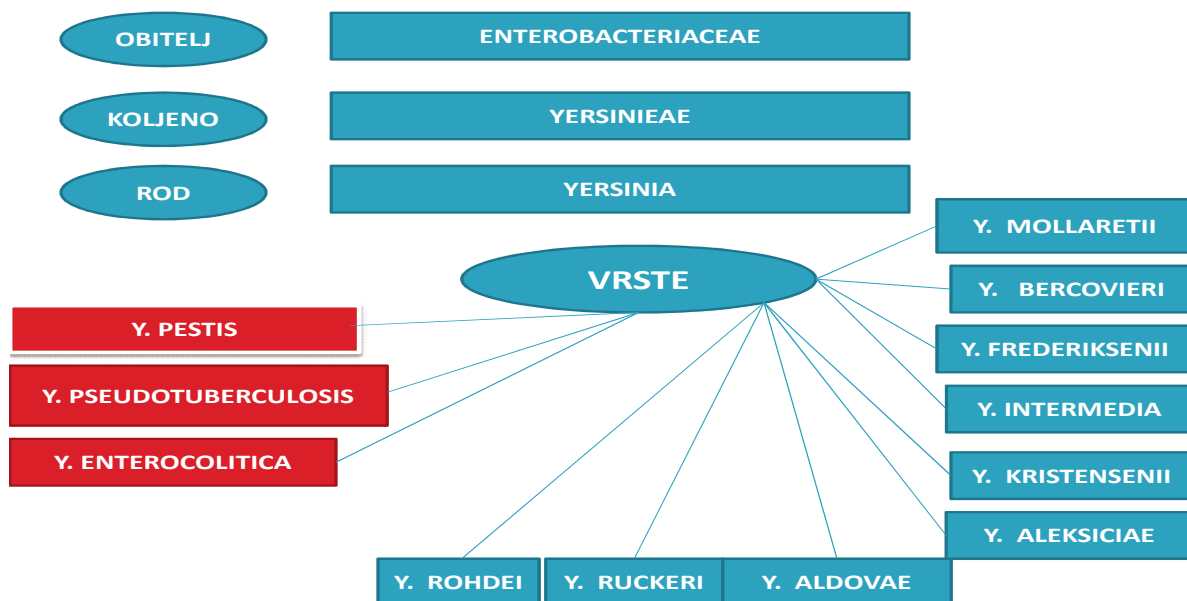
### **2.2.1. Povijest**

1939. godine u Americi su Schleifstein i Coleman iz crijeva ovjeka izdvojili gram-negativnu bakteriju koja je bila patogena za miša, te je nazvali *Bacterium enterocoliticum*.

Godine 1944. Van Longhem je u čast Alexandru Yersinu, koji otkrio bacil kuge, predložio ime *Yersinia*. Frederiksen je promijenio ime *Bacterium enterocoliticum* u *Yersinia enterocolitica*. Nakon što je otkrivena DNA-DNA hibridizacijska tehnika, 1980. godine dokazane su nove genomske različite skupine unutar vrste *Yersinia enterocolitica* (*Yersinia intermedia*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia kristensenii*) (CVETNIĆ, 2013.).

## 2.2.2. Taksonomija i fiziološke karakteristike

*Yersinia enterocolitica* svrstana je u obitelj *Enterobacteriaceae*, koljenu *Yersinieae*, rodu *Yersinia*, te sadrži 12 vrsta od kojih su tri (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* i *Y. pestis*) patogeni za ljude. Detaljnija taksonomija prikazana je na slici 1.



Slika 1. Taksonomija roda *Yersinia*

*Yersinia enterocolitica* je gram negativna ovoidna ili štapičasta bakterija promjera 0,5-0,8 μm i 1-3 μm dužine. Nepokretna je na 37 °C, dok je na nižim temperaturama od 22-28 °C pokretna. Ne stvara spore niti kapsule, na krvnom agaru nakon 24 sata stvara glatke i sjajne kolonije veličine 1-2 mm te je aerobna. Osim već navedene pokretljivosti pri različitim

temperaturama, oksidaza je negativna, katalaza pozitivna te posjeduje nitrazu tipa B, a prema ovim karakteristikama se razlikuje od ostalih srodnih rodova kao što su *Salmonella*, *Klebsiella* i *Escherichia*. Temperaturni raspon rasta je od 4 - 42 °C, dok je optimalna temperatura rasta 25-28 °C, a optimalni pH 7,2 – 7,4. Op e metaboli ke karakteristike *Yersinia enterocolitica* navedene su u Tablici 2.

Tablica 2. Op e metaboli ke karakteristike *Yersinia enterocolitica*

KARAKTERISTIKE		KARAKTERISTIKE	
Pokretljivost ( 25 °C)	+	-glutamil-transferaza	+
Lizin dekarboksilaza	-	Sorbitol	+
Ornitin dekarboksilaza	+	Katalaza	+
Ureaza	+	Oksidaza	-
-ksilozidaza	-	Tvorba kiselina iz :	
Želatinaza	-	Ramnoza	-
Citrat ( 25° C)	-	Saharoza	+
Redukcija nitrata u nitrite	+	Celobioza	+
		Melibioza	-

Me u sojevima *Y. enterocolitica* otkriveno je 29 O-antigena i 18-H antigena. U životinja i ljudi dokazani su serovarovi O:3, O:8, O:9, O:13, O:5, O:27 i drugi (CVETNI , 2013.). Kako bi me usobno povezali odre eni biovar i serovar sa patogenoš u uveden je pojam bioserovara koji su podijeljeni u 6 bioserovara (1A, 1B, 2, 3, 4 i 5) i u više od 48 serotipova. Prema patogenosti ovih 6 tipova svrstano je u 3 grupe: visoko patogeni,

djelomi no patogeni i apatogeni. Visoko patogen je tip 1B, apatogen je tip 1A, dok su oni od 2-5 svrstani u umjereno patogene (EFSA, 2007.).

Tablica 3. Karakteristike biovarova *Y. enterocolitica*

	BIOTIP					
	1A	1B	2	3	4	5
<b>Lipaza</b>	+	+	-	-	-	-
<b>Hidroliza eskulina</b>	+	-	-	-	-	-
<b>Salicin</b>	+	-	-	-	-	-
<b>Pirazinamidaza</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Indol</b>	+	+	(+)	-	-	-
<b>Ksiloza</b>	+	+	+	+	-	-
<b>Trehaloza</b>	+	+	+	+	+	-
<b>Redukcija nitrata</b>	+	+	+	+	+	-

+ = pozitivno; - = negativno; (+) = odgo eno ili slabo

### 2.3. Izolacija i identifikacija *Y. enterocolitica*

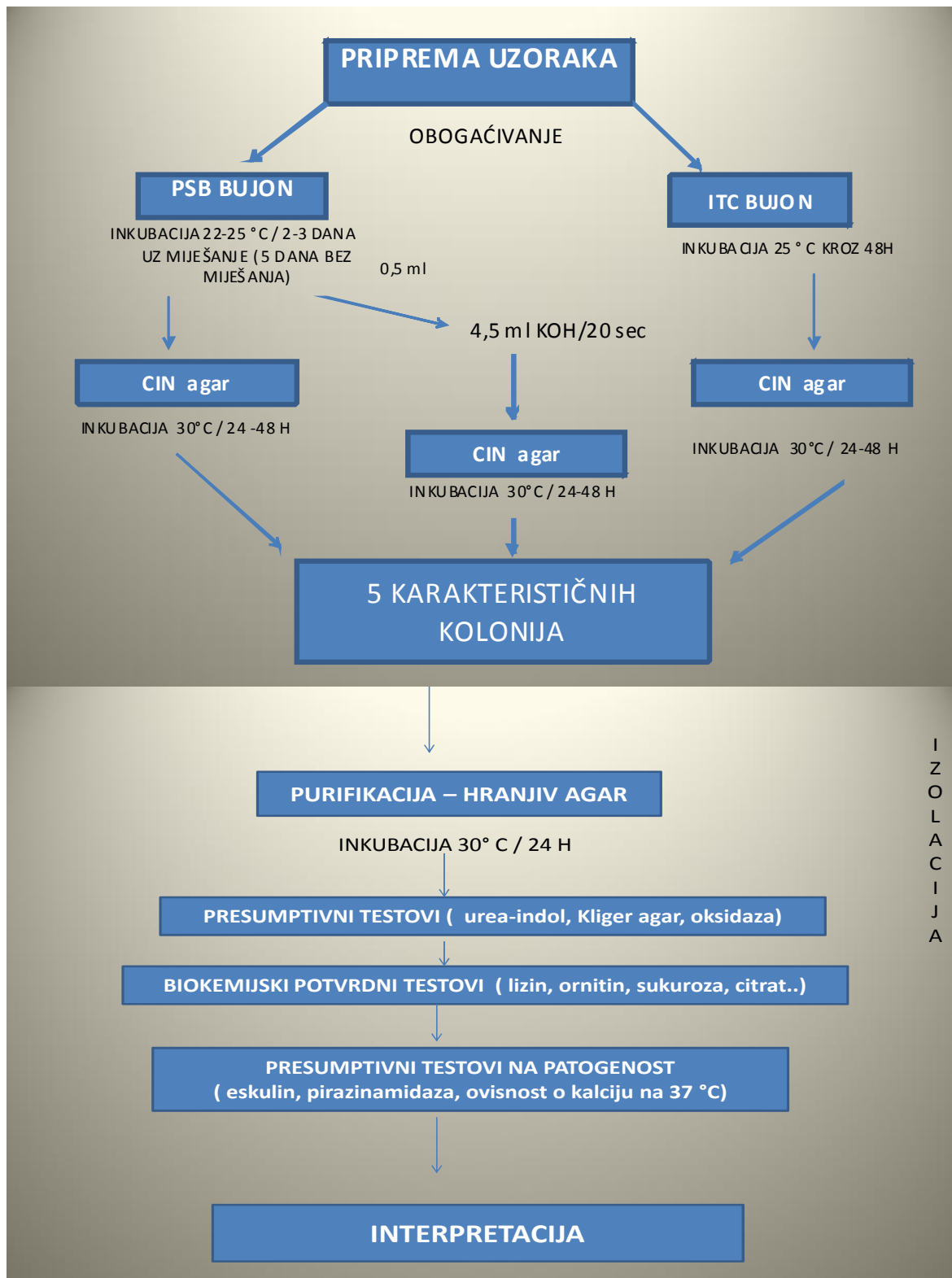
Kada uzorak za izolaciju *Y. enterocolitica* uzimamo iz primarno sterilnih materijala kao što su krv, likvor, urin, limfni vorovi i dr., bakterija raste na svim uobi ajenim neselektivnim podlogama (NIELHN, 1969.). Kada je uzorak uzet iz nesterilnih materijala (feces ovjeka i životinja, brisevi ždrijela i rana, voda, hrana te razli iti uzorci iz okoline) rast ovisi o ovim imbenicima:

- vrsti upotrebljene hranjive podloge
- o temperaturi inkubacije
- o broju *Y. enterocolitica* u odnosu na drugu bakteriološku floru u uzorku
- o sastavu mikroflore uzorka

Kako je broj *Y. enterocolitica* u hrani prilično malen, rezultati uvelike variraju ovisno o pozadinskoj mikroflori te je zbog toga selektivno izdvajanje i uzgoj na hranjivim podlogama metoda koja daje dobre rezultate. Ovakve metode obično uključuju obogaćivanje uzorka, nakon kojeg slijedi nasaćivanje na selektivnom agaru te identifikacija tipičnih kolonija. Kao i ostale enterobakterije, *Yersinia enterocolitica* može rasti na više vrsta selektivnih hranjivih podloga. Serotipovi O:3, O:8 i O:9 vrlo dobro rastu i tvore specifične kolonije na bizmunt sulfitu, endo metylen blue, eosin metylen blue, Mac Conkey, deoksikolat citrat, Salmonella-Shigella agar i drugima (WONG, 2016). Agari koji se mogu koristiti pri izoliranju *Y. enterocolitica* prema izvješću u EFSA-e iz 2007. godine su:

- MT agar: modificirani Mac Conkey agar koji sadrži Tween 80 i kalcijev klorid. Kolonije su velike oko 2 mm, plošne i naborane,
- DST agar: modificiran DNAaza agar koji sadrži Tween 80, sorbitol, natrijev sulfat te kalcijev klorid. Kolonije su transcedentne, bezbojne ili blago ružičasto obojene,
- Modificiran Salmonella-Shigella agar sa 2% deoksikolata,
- Y medij: sadrži natrijev oksalat, natrijev deoksikolat te žučne soli sa peptonom i kazein hidrolizatom,
- CIN agar: sadrži cefsulodin (4 ili 15 mg/L), irgasan (4 mg/L) i novobiocin (2,5 mg/L) koji služe kako bi održali selektivan rast,
- CAL medij: sadrži celobiozu, arginin i lizin. Celobioza pod djelovanjem *Y. enterocolitica* fermentira i nastaje kiselina koja dovodi do mijenjanja pH.
- DYS medij: kao i Y medij. Sadrži arginin, lizin, natrij deoksikolat, natrijev klorid.

Od svih ovih medija, CIN (Cefosulodin irgasan novobiocin) agar i SSDC (Salmonella-shigella deoksikolat kalcijev klorid) agar pokazuju najbolji uspjeh pri izoliranju ove bakterije te se zbog toga i najčešće koriste. Na slici 2. opisan je postupak od uzimanja uzoraka, do obogaćivanja i kasnije nasaćivanja na agar i konačno identifikacije.



Slika 2. Postupak izolacije *Y. enterocolitica* (HRN EN ISO 10273:2003)

## 2.4. Pojavnost patogene *Y. enterocolitica*

### 2.4.1. Svinje i svinjsko meso

Svinje su često asimptomatski nosioci humane patogene *Y. enterocolitica* i to najčešće biotipa 4 (serotip O:3) i nešto rjeđe biotipa 2 (serotip O:9 i O:5) (FREDRIKSSON-AHOMAA i sur., 2006.). U Danskoj je *Y. enterocolitica* (O:3) dokazana u 25 % zaklanih svinja iz 82 % uzgoja. U Finskoj su u divljih svinja izdvojeni biovarovi O:3 u 36 % slučajeva, O:9 u 29 %, a O:5 u 21 % slučajeva, dok u domaćih svinja dominira bioserova O:3 u 91 % istraživanih uzoraka podrijetlom iz domaćih svinja. *Y. enterocolitica* (O:3) dokazana je u 89 % tonzila zaklanih svinja u Estoniji (CVETNIČKI, 2013.). Uzročnik se u nosioocu nalazi u usnoj šupljini, podviličnim limfnim čvorovima, crijevu, fecesu te najčešće tonzilama. Prilikom klavničke obrade može doći do sekundarne kontaminacije trupova svinja fecesom ili intestinalnim sadržajem, pa uzročnika možemo izolirati i sa površine trupova svinja. Fekalna kontaminacija je u klavničkoj praksi reducirana na minimum jer se anus prije ekstrakcije organa trbušne šupljine podvezuje te se tako onemogućuje dodir trupova sa intestinalnim sadržajem. Kako je usna šupljina, a posebno tonzile izvor bakterija može doći do kontaminacije prilikom vađenja prsnih organa koji se vješaju na kuke i pregledavaju. Kako je rutinska klavnička praksa da se prsni organi zajedno sa tonzilama vješaju na kuke, ukoliko je bakterija prisutna u tonzilama ili usnoj šupljini, vrlo je vjerojatno da će doći do kontaminacije ostalih organa prsne šupljine. Posebno treba pažnju obratiti na mišićja koje okružuju tonzile kao što je *m. digastricus* koji često može biti kontaminiran (DE ZUTTER i VAN HOOF, 1987.). Zbog navedenih razloga, svinjske iznutrice koje su namjenjene za ljudsku konzumaciju kao što su jezik, srce i srce su puno češći izvor *Y. enterocolitica*, nego što je to svinjski trup (FREDRIKSSON-AHOMAA i sur., 1999.). Pojavnost *Y. enterocolitica* u pojedinim dijelovima trupa ili organa prikazana je u tablicama 5 i 6. Zbog svoje sposobnosti rasta na temperaturama hladnjaka *Y. enterocolitica* se može razmnožavati i prilikom pohrane mesa, ali ne preživljava pasteurizaciju i kuhanje.

Tablica 5. Distribucija *Y. enterocolitica* u različitim kategorijama svinjskog mesa (ESNAULT, 2013.)

KATEGORIJA MESA	BROJ UZORAKA	BROJ POZITIVNIH UZORAKA	% POZITIVNIH UZORAKA
JEZIK	24	3	12,5
MLJEVENO MESO	72	5	6,9
OSTALO	141	3	2,1
<b>UKUPNO</b>	<b>237</b>	<b>11</b>	<b>5,2</b>

Tablica 6. Pojavnost *Y. enterocolitica* (SWAMINATHAN i sur., 1982.; STERN, 1981.; cit. WONG, 2016.)

	% INCIDENCIJE
SVINJSKO MESO	34,5 %
	46 %
JEZICI	18,6 %
ŽDRIJELO	9 %
ŽDRIJELO	53 %
TONZILE	29,6 %
JEZICI	65 %
MLJEVENO MESO	60 %
OBRAĐENO MESO	7 %
PILETINA	28,9 %
GOVEDINA	10,9 %
	14,6 %



### 2.4.2. Preživa i i perad

Goveda mogu biti asimptomatski nosioci *Y. enterocolitica* i to serotipa O:9. Prema istraživanjima u Norveškoj i Novom Zelandu dokazan je biotip 5 (serotip O:2) u koza, dok je u Australiji tako en potvr en biotip 5 u koza i ovaca. Biotip 4 (serotip O:3) izoliran je iz janjadi.

*Y. enterocolitica* izolirana je iz mlijeka i mlije nih proizvoda, ali to su ve inom bili apatogeni tipovi *Y. enterocolitica*. Patogeni biotip 1B (serotip O:8) potvr en je u pasteriziranom mlijeku, mlijeku u prahu i okoladnom mlijeku. Pasterizirano mlijeko idealan je medij za razvoj *Y. enterocolitica*, a izvor infekcije mogu biti loša higijena boca u kojima se mlijeko pohranjuje, kontaminacija iz okoline, kontaminirano svježe mlijeko i dr.

Kontaminacija *Y. enterocolitica* u peradi je rijetka, a iz peradi je prema izvješ u EFSA-e izoliran biotip 4 ( serotip O:3) i biotip 2 ( serotip O:9) (EFSA, 2007.).

### 2.4.3. Ostalo

Osim doma ih i divljih životinja, glodavci su tako er rezervoar *Y. enterocolitica*, tako da su DDD mjere važan imbenik koji utje e na pojavnost infekcije. Kod divljih životinja spomenimo nedavno istraživanje provedeno u Hrvatskoj DUMBOVI A i sur. (2015) koji su pretražili 48 tonzila divljih svinja te utvrdili prisutnost *Yersinia enterocolitica* u 11 uzoraka, što ini relativno visoku pojavnost od 22,92 %.

Jezera i rijeke koje su kontaminirane fecesom doma ih i divljih životinja ili sadrže otpadne vode mogu biti izvor *Y. enterocolitica*. Pozitivna injenica je da biotipovi *Y. enterocolitica* koji su izolirani iz voda i rijeka ve inom pripadaju biotipu 1A ili nekom drugom koji je za ljude apatogen. Konzumacija vode ili povr a i vo a tretiranog vodom kontaminiranom biovarovima koji su patogeni za ljude mogu dovesti do pojave infekcije (EFSA, 2007.)

## 2.5. Jersinioza ljudi

Naj eš i na in prijenosa infekcije patogenih *Y.enterocolitica* u ljudi je feko-oralni put, iako je zabilježen i prijenos kontaktom. Prenošenje kontaktom doga a se zbog vrlo loše osobne higijene tj. manjkavih navika pranja ruku. Ku ni ljubimci, zbog bliskog kontakta sa ovjekom tako er mogu predstavljati put prijenosa *Y. enterocolitica*. Zbog ove injenice ku ni ljubimci se ne bi trebali hraniti sa svježim svinjskim mesom.

Prema izvješ u EFSA-e za 2014. godinu, broj prijavljenih slu ajeva jersinioze iznosi 6,471, što je stavlja na tre e mjesto naj eš e prijavljivanih zoonoza. Razdoblje izme u 2009. do 2013. godine bilo je statisti ki vrlo zna ajno u smanjenju broja slu ajeva jersinioze, dok prema podacima možemo zaklju iti da postoji pad od za 2,8 % prijavljenih slu ajeva jersinioze izme u 2012. do 2013. godine (EFSA, 2015.).

Tablica 7. Zabilježeni slu ajevi hospitalizacije i smrti uzrokovani zoonozama u ljudi u EU, 2013 (EFSA, 2015.)

	POTVR ENI SLU AJ	POSTOTAK HOSPITALIZACIJE	PRIJAVLJENI SLU AJEVI SMRTI (%)	POSTOTAK SMRTNOSTI(%)
<b>KAMPILOBAKTERIOZA</b>	214 779	43,6	52,9	0,05
<b>SALMONELOZA</b>	82 694	36,0	49,6	0,14
<b>JERSINIOZA</b>	6 471	48,4	62,4	0,05
<b>LISTERIOZA</b>	1 763	99,1	69,7	15,6
<b>Q GROZNICA</b>	648	NA	51,2	0,61
<b>BRUCELOZA</b>	357	70,6	28,3	0,99
<b>BOLEST ZAP.NILA</b>	250	52	90,8	3,4
<b>TRICHINELOZA</b>	217	106	82,5	0,56
<b>BJESNO A</b>	1	100	100	100

NA-nepoznato

Naj eš a manifestacija klini ke slike kod jersinioze ljudi je enterokolitis. Osim proljeva, može se o itovati i abdominalnim bolovima, artritismom te nodoznim eritemom. Proljevi

uzrokovani *Y. enterocolitica* čine 1-6% svih akutnih proljeva (CVETNIĆ, 2013.). Klinička slika varira ovisno o dobi i fizičkoj kondiciji oboljele osobe, ali generalno možemo reći i kako su infekcije češće u djece. Klinička slika u oboljele djece obično se abdominalnim bolovima, proljevom, povraćanjem te povišenom temperaturom. U malom broju bolesnika moguće je primjesa krvi u stolici. Bolest se dijagnosticira izdvajanjem uzročnika iz stolice, a liječi se tetraciklinima, aminoglikozidima, kloramfenikolom i cefalosporinima.

## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1. Izolat *Yersinia enterocolitica*

*Yersinia enterocolitica* O:3 soj izoliran je iz svinjskih tonzila na liniji klanja u prijašnjem istraživanju (ZDOLEC i sur., 2015.). Ukratko, tonzile su uzorkovane sterilnim priborom na liniji klanja svinja u lokalnoj klaonici. Do laboratorija su transportirane u sterilnim stomaher-vrećicama u prijenosnom hladnjaku te laboratorijski obrađene u roku 24 sata. 10 grama tonzila usitnjeno je škarama i homogenizirano u 90 mL tekuće podloge Peptone Sorbitol Broth (PSB, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) i potom razrijeđeno 1:100 u Irgan Tetracycline Chlorate bujonu (ITC, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) te inkubirano 48 h na 25 °C. Kulture su nacijepljene na cefsulodin-irgasan-novobiocin (CIN agar, AES Chemunex, Francuska) i inkubirane na 24 h na 30 °C, te kromogenu podlogu CHROMagar *Yersinia enterocolitica* (CHROMagar, Pariz, Francuska).

#### 3.1.1. MALDI-TOF MS

Uzorak za MALDI-TOF MS analizu pripremljen je slijedeći postupak za ekstrakciju etanola/mravlje kiseline koji je preporučio proizvođač (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka). Nekoliko kolonija suspendirano je u 300 µL vode (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) i dodano je 900 µL etanola (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska) te pomiješano sa staničnom suspenzijom. Nakon centrifugiranja na 13 000 okretaja u minuti tijekom 2 minute, supernatant je odbačen. Talog je pomiješan s 10 µL 70%-tne mravlje kiseline (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) i dodan je jednak volumen acetonitrila (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Smjesa je centrifugirana na 13 000 rpm tijekom 2 minute. 1 µL supernatanta nanešen je na ploču od poliranog elika i osušen na zraku na sobnoj temperaturi. Svaki uzorak prekriven je s 1 µL MALDI matriksa (zasićena otopina 2,5-dihidroksi-4-hidroksicijanaminske kiseline (HCCA, Bruker Daltonik, Njemačka) u 50% acetonitrila i 2.5% trifluoroctene kiseline) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) i osušen na zraku na sobnoj temperaturi.

Maseni spektri su automatski generirani pomoću microflex LT MALDI TOF masenog spektrometra (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka) koji je korišten u linearnom pozitivnom

modu unutar raspona mase od 2 000 – 20 000 Da. Instrument je kalibriran pomoću Bruker bakterijskog standardnog testa. Zabilježeni maseni spektri su obrađeni MALDI Biotyper 3.0 softverskim paketom (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka), koristeći standardne postavke. Izlaz u MALDI Biotyperu je log vrijednost rezultata u rasponu 0 – 3.0 koja predstavlja vjerojatnost ispravne identifikacije izolata, izražena u uspoređivanjem pikova (engl. peak) nepoznatog izolata s referentnim spektrom u bazi podataka. Korišteni su sljedeći kriteriji za identifikaciju: rezultat od 2,300 do 3,000 ukazivao je na vrlo vjerojatnu identifikaciju na razini vrste, rezultat od 2,000 do 2,299 ukazivao je na sigurnu identifikaciju roda s vjerojatnom identifikacijom vrste, rezultat 1,700 do 1,999 ukazivao je na vjerojatnu identifikaciju na razini roda, a rezultat <1,700 smatrao se nepouzdanim.

### **3.2. Inokulacija mljevenog mesa i brojenje *Y. enterocolitica***

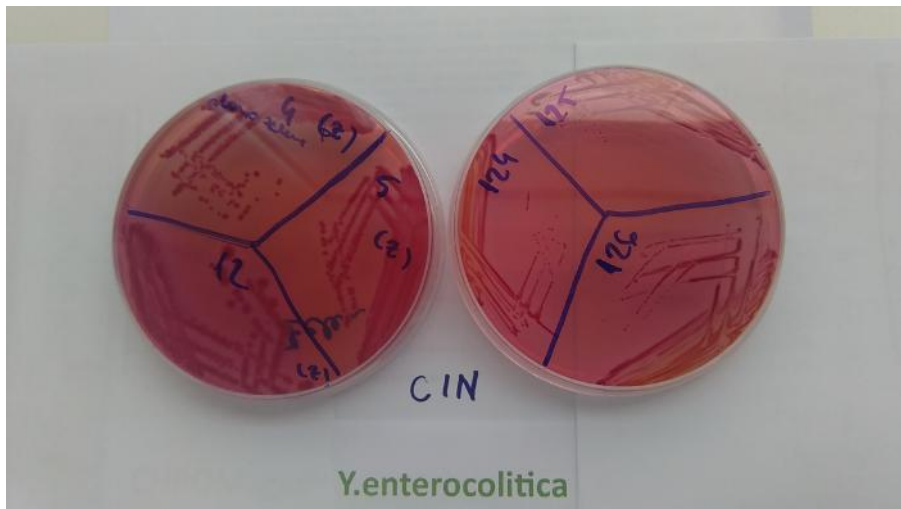
Svinjsko mljeveno meso pakirano u modificiranoj atmosferi kupljeno je u MAP pakiranju na tržištu. Prije inokulacije provjerena je prisutnost *Y. enterocolitica* gore opisanim postupkom. Broj *Y. enterocolitica* O:3 određen je nakon 24 h inkubiranja u PSB hranilištu na 25 °C. 1 mL određenog razrjeđenja s poznatim brojem stanica centrifugiran je na 10000 o/min 10 minuta. Supernatant je odbačen a stanice isprane dva puta u sterilnoj destiliranoj vodi i otopljene u fiziološkoj otopini. Potrebna količina stanica raspršena je u 10 grama mljevenog mesa u sterilnim stomaher-vrećicama kako bi se dobio po etni broj *Y. enterocolitica* u od približno 100 log CFU/g. Ukupno je inokulirano 48 uzoraka po 10 grama, nakon čega je 24 uzorka pohranjeno u hladnjak na 4 °C i 24 uzorka na 10 °C. Broj *Y. enterocolitica* određen je u 6 uzoraka 0., 1., 2. i 5. dan pohrane naciepljivanjem na CIN agar.

### **3.3. Statistička obrada**

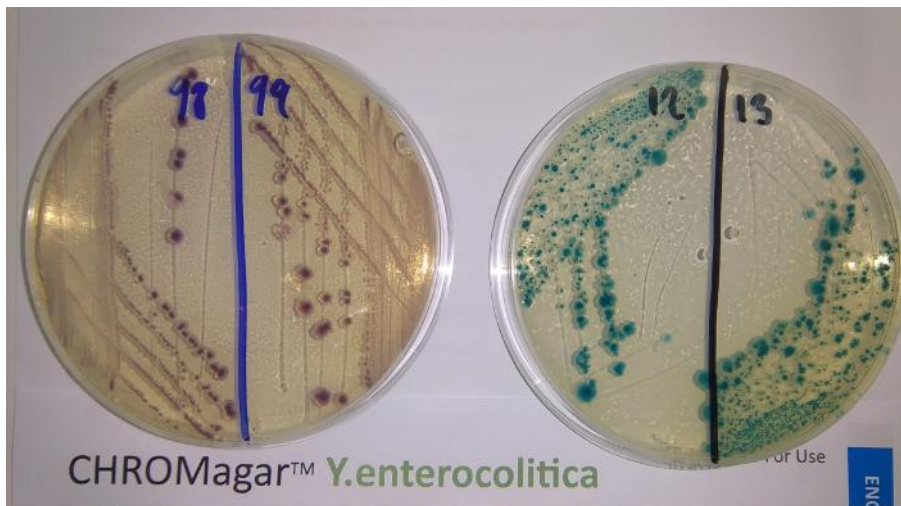
Broj kolonija mikroorganizama je izražen kao srednje vrijednosti rezultata 6 uzoraka prema danima uzorkovanja. Razlike među skupinama uzoraka u broju *Y. enterocolitica* u odnosu na temperaturu pohrane testiran je t-testom na razini značajnosti  $P < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

Izgled tipi nih kolonija *Y. enterocolitica* na korištenim CIN i ChromAgaru prikazan je na slikama 3 i 4.



Slika 3. *Y. enterocolitica* O:3 na CIN agaru (plo a desno; snimio: Nevijo Zdolec)



Slika 4. *Y. enterocolitica* O:3 na CHROMagar-u (plo a lijevo; snimio: Nevijo Zdolec)

Inokulirani soj *Y. enterocolitica* O:3 podvrgnut je determinaciji metodom MALDI-TOF MS kojom je bakterija i potvr ena (Tablica 8).

Tablica 8. Prikaz rezultata identifikacije bakterijske kulture s MALDI-TOF MS

AnalyteName	AnalyteID	Organism(best match)	ScoreValue	Organism(second best match)	ScoreValue
<a href="#">A1(++) (A)</a>	2	Yersinia enterocolitica	2.08	Yersinia enterocolitica	2.038
Rank(Quality)	Matched Pattern		ScoreValue	NCBIIdentifier	
1(++)	<a href="#">Yersinia enterocolitica ssp enterocolitica DSM 9676 DSM</a>		2.08	<a href="#">630</a>	
2(++)	<a href="#">Yersinia enterocolitica ssp palearctica (serovar O3 4) DSM 13030T HAM</a>		2.038	<a href="#">630</a>	
3(++)	<a href="#">Yersinia enterocolitica ssp enterocolitica DSM 11502 DSM</a>		2.033	<a href="#">630</a>	
4(+)	<a href="#">Yersinia enterocolitica ssp enterocolitica DSM 9499 DSM</a>		1.991	<a href="#">630</a>	
5(+)	<a href="#">Yersinia enterocolitica ssp enterocolitica DSM 11503 DSM</a>		1.938	<a href="#">630</a>	
6(+)	<a href="#">Yersinia enterocolitica ssp enterocolitica DSM 11504 DSM</a>		1.758	<a href="#">630</a>	
7(+)	<a href="#">Yersinia enterocolitica ssp enterocolitica DSM 4780T DSM</a>		1.703	<a href="#">630</a>	
8(-)	<a href="#">Yersinia pseudotuberculosis DSM 8992T DSM</a>		1.463	<a href="#">633</a>	
9(-)	Yersinia frederiksenii DSM 18490T HAM		1.455	<a href="#">29484</a>	
10(-)	<a href="#">Yersinia enterocolitica ssp enterocolitica (serovar O8) ATCC 9610T THL</a>		1.41	<a href="#">630</a>	

Inkubiranjem *Y. enterocolitica* O:3 u PSB bujonu nakon 24 h utvrđen je broj od  $10^8$  CFU/ml. Nakon inokulacije u mljeveno meso broj stanica po gramu mesa iznosio je 3,5 log CFU/g.

Kretanje broja *Y. enterocolitica* pra eno je do 5. dana pohrane na 4 i 10 °C što je prikazano na slici 5.



Slika 5. Rast *Y. enterocolitica* O:3 u mljevenom mesu tijekom pet dana pohrane na 4 i 10 °C

Po etni inokulirani broj *Y. enterocolitica* bio je podjednak u obje skupine uzoraka i nije se statisti ki zna ajno razlikovao ( $P > 0,05$ ). Nakon prvog dana pohrane rast patogena u uzorcima mljevenog mesa na 4 °C bio je za 0,4 log, a na 10 °C ak za 1,2 log. Razlike u broju patogena bile su statisti ki zna ajne ( $P < 0,05$ ). Drugoga dana pohrane na 4 °C broj je rastao za dodatnih 0,7 log, a na 10 °C 1,71 log ( $P < 0,05$ ). Zadnjeg dana pohrane broj *Y. enterocolitica* bio je u mljevenom mesu na 4 °C 2,72 log ve i u odnosu na po etni broj, a na 10 °C kona ni broj je bio ve i za 4,46 log u odnosu na inicijalnu populaciju.



## 5. RASPRAVA

*Yersinia enterocolitica* esto je zanemarena patogena bakterija u higijeni i mikrobiologiji hrane. Izolacija i determinacija bakterije može predstavljati izazov i danas su aktualna nastojanja za razvojem pouzdanijih metoda u odnosu na postojeće kulturelne metode. U našem smo istraživanju primijenili suvremenu metodu identifikacije MALDI-TOF MS koja se sve više koristi u mikrobiologiji hrane (PAVLOVIC i sur., 2013.; DOBRANI i sur., 2016.) kao pouzdana i brza metoda. Primjena kromogenih podloga tako može doprinijeti skraćivanju vremena potrebnog za izolaciju suspektnih kolonija, što je posebno primjenjivo na izolate *Y. enterocolitica* budući da su dodatni biokemijski testovi dugotrajni i kompleksni. Jedna od rijetko dostupnih kromogenih hranjivih podloga za diferencijaciju patogenih i apatogenih biotipova *Y. enterocolitica* korištena je u našem istraživanju, na kojoj kolonije patogenih biotipova rastu ljubičasto, a nepatogene su plave boje.

U Hrvatskoj su dostupna rijetka istraživanja *Y. enterocolitica* u kontekstu sigurnosti hrane. Tako su HADŽIOSMANOVI i sur. (1992.) istraživali prikladnost metodike, stupanj zagađenja mesa i mesnih preradevina u različitim fazama njihove proizvodnje, te površina i pribora s vrstom *Yersinia enterocolitica*. Posebna pažnja bila je posvećena mogućnosti rasta i razmnožavanja *Y. enterocolitica* u mesnim preradevinama tijekom pohrane, dinamici rasta i razmnožavanja pri različitim temperaturama, te osjetljivost prema dezinfekcijskim sredstvima i antibioticima. Od ukupno 1224 uzoraka mesa, mesnih preradevina i brisova s površina i pribora izolirano je ukupno 6 sumnjivih sojeva *Y. enterocolitica* no naknadnom serološkom tipizacijom i biokemijskom determinacijom utvrđeno je da je samo jedan soj pripadao spomenutoj vrsti. Istraživanja su nadalje pokazala da uobičajeni namirnicama na temperaturi oko 4 °C povoljno djeluje na mogućnost razmnožavanja *Y. enterocolitica* u namirnicama. U nedavnim istraživanjima (DUMBOVI i sur., 2015.; ZDOLEC i sur., 2015.) određivana je prisutnost *Y. enterocolitica* u tonzilama divljih i domaćih svinja nakon odstrela/klanja u svrhu potencijalnog rizika od onečišćenja mesa patogenom tijekom obrade trupova. Zabilježena je prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama divljih svinja od 22,9 % te u domaćih svinja od 33 %. Autori upozoravaju da procjenu takvih rezultata treba uzeti s oprezom budući da su tijekom istraživanja uočene nepravilnosti u obradi trupova koji rezultiraju križnom kontaminacijom (sterilizacija noževa, rasijecanje trupa s glavom, sterilizacija pile).

One iš enje stoga možemo najprije o ekvati u mesu regije vrata, glave, jeziku, ždrijelu, a manje na trupu. U svakom slučaju mljeveno meso mogu je izvor *Y. enterocolitica* što potvrđuju i istraživanja drugih autora no uspješnost izolacije i determinacije patogena uvelike ovisi o primijenjenoj metodologiji (FREDRIKSSON-AHOMAA i KORKEALA, 2003.). VISNUBHATLA i sur. (2001.) su zabilježili visok stupanj kontaminacije mljevene govedine i svinjetine patogenom *Y. enterocolitica* od čak  $10^6$  CFU/g što predstavlja rizik za potrošače. U našem smo istraživanju također simulirali relativno visok stupanj kontaminacije ( $3 \log$  CFU/g) koji je na kraju roka trajanja iznosio preko 6 odnosno 8  $\log$  CFU/g, na 4 odnosno 10 °C. Meso je bilo pohranjeno u aerobnim uvjetima koji ne ograničuju rast patogena, no drugi su autori koristili drugačiju atmosferu pakiranja mesa u svrhu sistiranja rasta *Y. enterocolitica* tijekom pohrane u hladnjaku. Primjerice, MANU-TAWIAH i sur. (1993.) izvješćuju da je rast *Y. enterocolitica* u svinjetini spriječen pakiranjem u vakuumu, što nije slučaj u uvjetima modificirane atmosfere (MA1= 20 % CO<sub>2</sub>, 0 % O<sub>2</sub>, 80 % N<sub>2</sub>; MA2= 40 % CO<sub>2</sub>, 10 % O<sub>2</sub>, 50 % N<sub>2</sub> i MA3= 40 % CO<sub>2</sub>, 0 % O<sub>2</sub>, 60 % N<sub>2</sub>). Zaključuju da je vakuum pakiranje učinkovitije od mješavine plinova u svrhu usporavanja rasta te da korišteni omjeri plinova omogućuju rast *Y. enterocolitica* i potencijalno mogu ugroziti sigurnost mesnih proizvoda.

Općenito, inicijalni broj bakterija u mljevenom mesu vrlo je bitan za daljnji tijek mikrobioloških procesa u pakiranom mesu, uključujući i u našem slučaju populaciju *Y. enterocolitica*. Održivost pakiranih mesa i mesnih proizvoda ovisna je također i o temperaturi pohrane (LIMBO i sur., 2010.). Različita su mišljenja o granicnom broju bakterija kada smatramo da je nastupilo kvarenje mesa, te se navodi da je to  $10^7$ - $10^8$  cfu/g ili čak  $10^9$  cfu/g kada nastupaju proteolitički procesi kvarenja (BROOKS i sur., 2008.). Produženje održivosti primjenom primjerice spomenute modificirane atmosfere temelji se na antimikrobnom djelovanju ugljikovog dioksida (CO<sub>2</sub>), pri čemu se može potencirati rast bakterija mliječne kiseline koje pak sistiraju rast gram-negativnih bakterija uključujući i neke patogene, u većem opsegu nego je to slučaj kod vakuum-pakiranja (ERCOLINI i sur., 2006.). U istraživanju MILINA i sur. (2016.) inicijalni broj aerobnih mezofilnih bakterija u mljevenom mesu pakiranom u modificiranoj atmosferi bio je visok (oko  $6 \log_{10}$  cfu/g) što jasno uvjetuje i kraću održivost proizvoda, a naročito pri oscilacijama temperature pohrane (engl. temperature abuse). U našem istraživanju simulirali smo takvo odstupanje temperature u pohrani u hladnjaku (10 °C) gdje je dinamika rasta populacije *Y. enterocolitica* značajno nadvisila onu

na 4 °C ( $P < 0,05$ ). HARRISON i sur. (2000.) tako er preporu uju temperature od 4 °C ili niže za uvanje hrane s obzirom na utvr ene stope rasta *Y. enterocolitica* u odnosu na vrijednosti dobivene na 8 °C.

## 6. ZAKLJUČAK

*Yersinia enterocolitica* O:3 izolirana iz tonzila svinja inokulirana u mljeveno meso (3 log CFU/g) pokazuje trend rasta tijekom aerobne pohrane na temperaturama 4 i 10 °C.

Tendencija rasta populacije *Y. enterocolitica* u mljevenom mesu sporija je na 4 °C.

Rezultati ukazuju na značajnu ulogu dobre higijenske prakse u klaonici koja obradi i proizvodi mljeveno meso, budući da se hladnjem na navedenim temperaturama ne sprečava rast patogene *Y. enterocolitica*.

MALDI-TOF MS metoda može se preporučiti za brzu i pouzdanu determinaciju *Y. enterocolitica* iz hrane i kliničkih uzoraka.

## 7. LITERATURA

1. ANONIMNO (2012): Pravilnik o mesnim proizvodima. Narodne novine 131/12
2. BROOKS, J.C., M. ALVARADO, T. STEPHENS, J.D. KELLERMEIER, A.W. TITTOR, M.F. MILLER, M.M. BRASHEARS (2008): Spoilage and Safety Characteristics of Ground Beef Packaged in Traditional and Modified Atmosphere Packages. *J. Food Protect.* 2, 293-301.
3. CVETNI , Ž. (2013): Bakterijske i gljivi ne zoonoze, Medicinska naklada, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, 192-193.
4. DE ZUTTER, L., J. VAN HOOFF (1987): Isolation of *Yersinia enterocolitica* from pork meat, Proceedings of the 33rd International Congress of Meat Science and Technology, Helsinki, 72-74.
5. DOBRANI , V., S. KAZAZI , I. FILIPOVI , N. MIKULEC, N. ZDOLEC (2016): Composition of raw cows milk microbiota and identification of enterococci by MALDI-TOF MS – short communication. *Vet. arhiv* 86, 581-590.
6. DUMBOVI , Z., V. DOBRANI , N. ZDOLEC (2015): Presence of *Yersinia enterocolitica* in wild boars tonsils. Proceedings of lectures and posters *Hygienea alimnetorum XXXVI*, Safe and quality products of poultry, fish, wild and farmed game. Nagy, J., Popelka, P., Kosice, 193-195.
7. DURAKOVI , S., F. DELAŠ, L.DURAKOVI (2002): Moderna mikrobiologija namirnica-knjiga druga, Kugler d.o.o., Zagreb, 116-117.
8. ERCOLINI, D., F. RUSSO, E. TORRIERI, P. MASI, F. VILLANI (2006): Changes in the Spoilage-related Microbiota of Beed during Refrigerated Storage under Different Packaging Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4663-4671.
9. EFSA (2007): Monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp.- scientific opinion of the panel on biological hazards. *EFSA Journal*, 5, 12, 1-30.

10. EFSA (2015.): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, 13, 12: 4329.
11. ESNAULT, E., LABBÉ A., HOUDAYER C., DENNIS M. (2013): *Yersinia enterocolitica* prevalence on fresh pork, poultry and beef meat at retail level in France, 10th International Conference on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork, str. 72-75.
12. FREDRIKSSON-AHOMAA, M., S. HIELM, H. KORKEALA (1999): High prevalence of *yadA*-positive *Yersinia enterocolitica* in pig tongues and minced meat at the retail level in Finland. *J. Food Protect.* 2, 123-127.
13. FREDRIKSSON-AHOMAA, M., H. KORKEALA (2003): Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 220-229.
14. FREDRIKSSON-AHOMAA, M., S. STOLLE, H. KORKEALA (2006): Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47, 315-329.
15. HARRISON W.A., A.C. PETERS, L.M. FIELDING (2000.): Growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* colonies under modified atmospheres at 4° C and 8 °C using a model food system. *J. Appl. Microbiol.* 188, 38-43.
16. HADŽIOSMANOVI , M., M. NOSO, J. ŽIVKOVI (1992.): Nalaz *Yersinia enterocolitica* u mesu i mesnim prera evinama. *Sto arstvo* 46, 5-6, 141-152.
17. JAY, J.M., M.J. LOESSNER, D.A. GOLDEN (2005.): *Modern food microbiology*. 7th edition Springer.
18. LIMBO, S., L. TORRI, N. SINELLI, L. FRANZETTI, E. CASIRAGHI (2010): Evaluation and predictive modeling of shelf life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. *Meat Sci.* 84, 129-136.

19. MILIN, M. (2015): Održivost mljevenog mesa pakiranog u modificiranoj atmosferi uz dodatak stabilizatora i antioksidansa. Diplomski rad. Zagreb: Veterinarski fakultet.
20. MILIN, M., N. ZDOLEC, K. SOKOLI , V. DOBRANI , V. PAŽIN, J. GRBAVAC, K. ZDOLEC (2016): Utjecaj antioksidansa i stabilizatora na mikrofloru mljevenog mesa pakiranog u modificiranoj atmosferi. Hrvatski veterinarski vjesnik 26, 3-4, 32-38.
21. NIELHN, B. (1969): Studies of *Yersinia enterocolitica* with special reference to diagnosis and occurrence in human acute enteric disease. Acta Pahtol. Microbiol. Scand. Suppl.206.
22. NOSO, M. (1990): *Yersinia enterocolitica* u mesu i mesnim prera evinama. Magistarski rad. Zagreb: Veterinarski fakultet.
23. PAVLOVIC, M., I. HUBER, R. KONRAD, U. BUSCH (2013): Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. Open Microbiol. J. 7, 135-141.
24. STERN, N. J. (1981): Isolation of potentially virulent *Yersinia enterocolitica*, J. Food Sci. 46, 41-42.
25. SWAMINATHAN, B., M.C. HARMON, I.J. MEHLMAN (1982): *Yersinia enterocolitica*. J. Appl. Bacteriol. 52, 151-183.
26. VISHNUBHATLA, A., R. D. OBERST, D. Y. C. FUNG, W. WONGLUMSOM, M. P. HAYS, AND T. G. NAGARAJA (2001): Evaluation of a 5'-nuclease (TaqMan) assay for the detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica* in raw meat and tofu samples. J. Food Prot. 64:355-360.
27. WONG, H.C. (2016.): *Yerisnia enterocolitica*. Dostupno na: <http://microbiology.scu.edu.tw/wong/courses/special/.../YERSINIA.pdf>
28. ZDOLEC, N., I. FILIPOVI , V. DOBRANI (2015): Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in/on tonsils and mandybular lymph nodes of slaughtered pigs. Folia Microbiol. 60, 2, 131-135.

29. ŽIVKOVI , J. (1986): Higijena i tehnologija mesa II. dio- Kakvo a i prerada, Veterinarski fakultet, Zagreb, str. 152-153.



## 8. SAŽETAK

*Yersinia enterocolitica* patogena je bakterija od javnozdravstvenog značaja u proizvodnji svinjskog mesa. U radu je istražen potencijal rasta u mljevenom mesu tijekom pohrane na 4 i 10 °C soja *Yersinia enterocolitica* O:3 izoliranog iz tonzila svinja. Determinirana je pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije i inokulirana u svinjsko mljeveno meso u broju 3 log CFU/g. Nakon prvog dana pohrane rast patogena u uzorcima mljevenog mesa na 4 °C bio je za 0,4 log, a na 10 °C za 1,2 log. Razlike u broju patogena bile su statistički značajne ( $P < 0,05$ ). Drugoga dana pohrane na 4 °C broj je rastao za dodatnih 0,7 log, a na 10 °C za 1,71 log ( $P < 0,05$ ). Zadnjeg dana pohrane broj *Y. enterocolitica* bio je u mljevenom mesu na 4 °C 2,72 log veći u odnosu na početni broj, a na 10 °C konačni broj je bio veći za 4,46 log u odnosu na inicijalnu populaciju. Rezultati ukazuju na značajno povećanje dobre higijenske prakse u klaonici kojim se obrađuje i proizvodi mljeveno meso, budući da se hladnjem na navedenim temperaturama ne sprečava rast patogene *Y. enterocolitica*.

Ključne riječi: *Yersinia enterocolitica*, MALDI-TOF MS, svinjsko mljeveno meso, hladnjača, potencijal rasta

## 9. SUMMARY

### GROWTH OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA* IN PORK MINCED MEAT STORED AT 4°C AND 10 °C

*Yersinia enterocolitica* is pathogenic bacteria which has a public health significance in pork production. In this reasearch growth potential in minced meat during storage at 4° and 10° C of *Yersinia enterocolitica* O:3 isolated from pig's tonsils was evaluated. *Y. enterocoloitica* was determinated using MALDI-TOF mass spectrometry and inoculated in pork in amount 3 log CFU/g. After first day of storage number of pathogens in sampes of minced meat at 4° were for 0,4 log, and on 10 °C for 1,2 log higher. Diferences in pathogen number were statistically significant (P 0,05). Second day of storage at 4 °C number of pathogens increased for 0,7 log, and at 10 °C for 1,71 log ( P 0,05). Last day of storage number of *Yersinia enterocolitica* in minced meat at 4 °C was higer for 2,72 log in the previous, and at 10 °C the final number was higer for 4,46 log from the initial population. Results indicate the importance of implementation good hygiene practice in slaughter processing and production of pork, since cooling at these temperatures does not prevent growth of pathogenic *Yersinia enterocolitica*.

Keywords : *Yersinia enterocolitica*, MALDI-TOF MS, pork minced meat, cooling, growth potential

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 15.11.1990. godine u Zagrebu. 2005. godine završila sam osnovnu školu „ Izidor Kršnjavi“, a 2009. maturirala u Privatnoj klasi noj gimnaziji u Zagrebu. Iste godine upisala sam integrirani preddiplomski i diplomski studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Bila sam uključena u aktivnosti studentskih udruga (IVSA i EQUUS), gdje 2010. obavljam funkciju voditelja sekcije za male životinje. Također, tijekom studiranja volontirala sam na Zavodu za rengenologiju i fizikalnu terapiju Veterinarskog fakulteta (2010-2011) i Klinici za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta (2014-2015).

Tijekom srpnja-kolovoza 2016. pohađala sam ljetnu školu javnog zdravstva "Food safety" na Veterinarskom fakultetu u Brnu, Republika Češka. Aktivno se koristim engleskim i njemačkim jezikom koji pohađam u školi stranih jezika. Tijekom studija obavljala sam poslove preko studentskog servisa.