

Rast *Yersinia enterocolitica* O:3 u mljevenome svinjskom mesu

Tea Bijelić, Vesna Dobranić, Snježana Kazazić, Ivana Filipović,
Z. Dumbović i N. Zdolec*



Uvod

Mikrobiološka ispravnost zauzima značajan dio u prosudbi zdravstvene ispravnosti hrane životinjskog podrijetla, posebice u proizvodnji mesa i proizvoda od svježeg mesa. Naime, postupci klaoničke obrade, hlađenja, rasijecanja i daljnje obrade uvelike će uvjetovati mikrobiološku sliku svježeg mesa i proizvoda. Provođenje dobre proizvođačke 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, a izazvati oboljenja 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 dodirnu 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 česte 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/na tonzilama zdravih svinja pa tijekom klaoničke 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 s dijagnosticiranom jersiniozom nalazi se na trećem mjestu odmah iza kampilobakterioze i salmoneloze. Izvor zaraze za ljude je kontaminirana hrana i to najčešće meso, mliječni proizvodi i kontaminirana voda. Izvješća o epidemijama jersinioze bila su najčešće povezana s konzamacijom svinjskog mesa. Glavni rezervoar patogenih serovarova O:3 i O:9 je svinja. *Yersinia*

Tea BIJELIĆ, dr. med. vet., Hrvatska; dr. sc. Vesna DOBRANIĆ, dr. med. vet., izvanredna profesorica, dr. sc. Ivana FILIPOVIĆ, dr. med. vet., postdoktorandica, dr. sc. Nevijo ZDOLEC*, dr. med. vet., docent, (dopisni autor, e-mail: nzdolec@vef.hr), Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; dr. sc. Snježana KAZAZIĆ, dipl. ing., znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska; Zvonimir DUMBOVIĆ, dr. med. vet., student doktorskog studija „Veterinarske znanosti“, Ministarstvo poljoprivrede, Zagreb, Hrvatska

enterocolitica je specifična i po tome što je kao i *Listeria monocytogenes* sposobna se umnožavati na temperaturama hladnjaka, koje inače inhibiraju rast većine patogena koje prouzroče 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 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.

Materijali i metode

Izolacija i identifikacija *Yersinia enterocolitica*

Izolat *Yersinia enterocolitica* izdvojen je iz svinjskih tonzila na liniji klanja u prijašnjem istraživanju (Zdolec i sur., 2015.) te identificiran primjenom MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka). 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. Deset 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 Irgasan Ticarcillin Chlorate bujonu (ITC, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) te inkubirano 48 h na 25 °C. Kulture su naciepljene 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). Serološka tipizacija provedena je monovalentnim serumima (Statens Serum Institut, Danska).

Uzorak za MALDI-TOF MS analizu pripremljen je prema preporukama proizvođača (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, nadtalog 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 nadtaloga nanešen je na ploču od poliranog čelika i osušen na zraku na sobnoj temperaturi. Svaki uzorak prekriven je s 1 µL MALDI matriksa (zasićena otopina α -cijano-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, izračunata uspoređivanjem pikova (Engl. peak) nepoznatog izolata s referentnim spektrom u bazi podataka.

Inokulacija mljevenog mesa i brojanje *Y. enterocolitica*

Svinjsko mljeveno meso pakirano u modificiranoj atmosferi kupljeno je u maloprodaji. 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 10 000 o/min 10 minuta. Nadtalog 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 stomahervrecicama kako bi se dobio početni broj *Y. enterocolitica* u gramu mesa od približno 3 log CFU/g. Ukupno je inokulirano 48 uzoraka od 10 grama, nakon čega su 24 uzorka pohranjeno u hladnjak na 4 °C i 24 uzorka na 10 °C. Broj *Y. enterocolitica* određivan je u 6 uzoraka 0., 1., 2. i 5. dana pohrane naciepljivanjem na CIN agar.

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 testirane su t-testom na razini značajnosti $P < 0,05$.

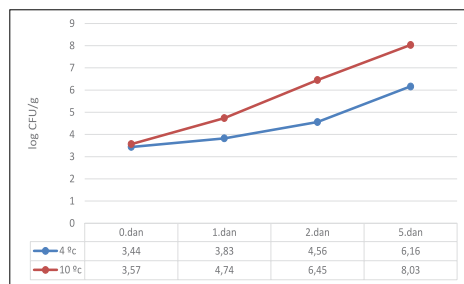
Rezultati i rasprava

Izolat koji je korišten u inokulaciji mljevenog mesa identificiran je MALDI-TOF MS metodom kao *Y. enterocolitica* (score 2,08), a tipiziran kao O:3 serotip. Izolacija i determinacija ove bakterije može predstavljati izazov i danas su aktualna nastojanja za razvojem pouzdanih metoda u odnosu na postojeće kulturne metode. U našem smo istraživanju primijenili suvremenu metodu identifikacije MALDI-TOF MS koja se sve više koristi u mikrobiologiji hrane (Pavlovic i sur., 2013., Dobranić i sur., 2016.) kao po-

uzdana i brza metoda. Primjena kromogenih podloga također može doprinijeti skraćenju vremena potrebnog za izolaciju suspektih 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.

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* praćeno je do 5. dana pohrane na 4 i 10 °C što je prikazano na slici 1.

Početni inokulirani broj *Y. enterocolitica* bio je podjednak u obje skupine uzoraka i nije se statistički značajno razlikovao ($P > 0,05$). Nakon prvog dana pohrane broj patogena u uzorcima mljevenog mesa na 4 °C bio je veći 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 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.



Slika 1. Rast *Y. enterocolitica* O:3 u mljevenom mesu tijekom pet dana pohrane na 4 i 10 °C

Općenito, inicijalni broj bakterija u mljevenom mesu vrlo je bitan za daljnji tijek mikrobioloških procesa u pakiranom mesu, uključujući u našem slučaju populaciju *Y. enterocolitica*. Održivost pakiranih mesa i mesnih proizvoda ovisna je i o temperaturi pohrane (Limbo i sur., 2010.). 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.) također preporučuju temperature od 4 °C ili niže za čuvanje hrane s obzirom na utvrđene stope rasta *Y. enterocolitica* u odnosu na vrijednosti dobivene na 8 °C.

U Hrvatskoj su dostupna rijetka istraživanja *Y. enterocolitica* u kontekstu sigurnosti hrane. Tako su Hadžiosmanović i sur. (1992.) istraživali prikladnost metodologije, stupanj onečišćenja mesa i mesnih prerađevina 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 prerađevinama tijekom pohrane, dinamici rasta i razmnožavanja pri različitim temperaturama te osjetljivost prema dezinfekcijskim sredstvima i antibioticima. Od ukupno 1224 uzoraka mesa, mesnih prerađevina 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 način čuvanja namirnica na temperaturi oko 4 °C povoljno djeluje na mogućnost razmnožavanja *Y. enterocolitica* u namirnicama. U nedavnim istraživa-

vanjima (Dumbović 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). Stoga onečišćenje možemo najprije očekivati u mesu regije vrata, glave, jeziku, ždrijelu, a manje na trupu. U svakom je slučaju mljeveno meso mogući izvor *Y. enterocolitica* što potvrđuju i istraživanja drugih autora. 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 simulirali i 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.

Zaključno, rezultati ukazuju na značajnije provođenje dobre higijenske prakse u klaoničkoj obradi i proizvodnji mljevenog mesa, budući da se hlađenje (mljevenog) mesa na uobičajenim temperaturama ne sprječava rast patogene *Y. enterocolitica*.

Zahvala

Istraživanje je financirano Programskim ugovorom Sveučilišta u Zagrebu 2015.-2016., „Pojavnost i karakterizacija patogene *Yersinia enterocolitica* u lancu proizvodnje mesa domaćih i divljih svinja“ (voditelj: doc. dr. sc. N. Zdolec). Prikazani rezultati dio su diplomskog rada Tee Bijelić (mentor: doc. dr. sc. Nevijo Zdolec).

Sažetak

Yersinia enterocolitica patogena je bakterija od javnozdravstvenog značenja 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 broj patogena u uzorcima mljevenog mesa na 4 °C bio je veći za 0,4 log, a na 10 °C za 1,2 log ($P<0,05$). 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 važnost provođenja dobre higijenske prakse u klaoničkoj obradi i proizvodnji mljevenog mesa, budući da se hlađenjem na navedenim temperaturama ne sprječava rast patogene *Y. enterocolitica*.

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

Literatura

- DOBRANIĆ, V., S. KAZAZIĆ, I. FILIPOVIĆ, N. MIKULEC and N. ZDOLEC (2016): Composition of raw cows milk microbiota and identification of enterococci by MALDI-TOF MS – short communication. *Vet. arhiv* 86, 581-590.
- DUMBOVIĆ, Z., V. DOBRANIĆ and N. ZDOLEC (2015): Presence of *Yersinia enterocolitica* in wild boars tonsils. *Hygiene alimnetorum XXXVI*, Safe and quality products of poultry, fish, wild and farmed game (Štrbske Pleso, 13. - 15. May 2015). Proceedings of lectures and posters. Kosice (193-195).
- EFSA (2015): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA J.* 13, 12: 4329.
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M. and H. KORKEALA (2003): Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 220-229.
- HARRISON, W. A., A. C. PETERS and 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.
- HADŽIOSMANOVIĆ, M., M. NOSO I J. ŽIVKOVIĆ (1992): Nalaz *Yersinia enterocolitica* u mesu i mesnim prerađevinama. *Stočarstvo* 46, 141-152.
- JAY, J. M., M. J. LOESSNER and D. A. GOLDEN (2005): *Modern food microbiology*. 7th edition. Springer.
- LIMBO, S., L. TORRI, N. SINELLI, L. FRANZETTI and 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.
- MILIN, M. (2015): Održivost mljevenog mesa pakiranog u modificiranoj atmosferi uz dodatak stabilizatora i antioksidansa. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- MILIN, M., N. ZDOLEC, K. SOKOLIĆ, V. DOBRANIĆ, V. PAŽIN, J. GRBAVAC I K. ZDOLEC (2016): Utjecaj antioksidansa i stabilizatora na mikrofloru mljevenog mesa pakiranog u modificiranoj atmosferi. *Hrv. vet. vjesn.* 26, 32-38.
- PAVLOVIĆ, M., I. HUBER, R. KONRAD and U. BUSCH (2013): Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. *Open Microbiol. J.* 7, 135-141.
- 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.
- ZDOLEC, N., I. FILIPOVIĆ and V. DOBRANIĆ (2015): Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in/on tonsils and mandibular lymph nodes of slaughtered pigs. *Folia Microbiol.* 60, 131-135.

Growth of *Yersinia enterocolitica* O:3 in Minced Pork Meat

Tea BIJEIĆ, DVM, Croatia; Vesna DOBRANIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Ivana FILIPOVIĆ, DVM, PhD, Postdoctoral Student, Nevijo ZDOLEC, DVM, PhD, Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia; Snježana KAZAZIĆ, BSc, Scientific Associate, Institute Ruđer Bošković, Zagreb, Croatia; Zvonimir DUMBOVIĆ, DVM, Postdoctoral Student, Ministry of Agriculture, Zagreb, Croatia

Yersinia enterocolitica is a pathogenic bacteria of public health relevance in pork meat production. This study evaluated the growth potential of *Y. enterocolitica* O:3 isolated from pig's tonsils in minced meat stored aerobically at 4 °C and 10 °C. *Y. enterocolitica* was determined using MALDI-TOF mass spectrometry and inoculated to pork at a level of 3 log CFU/g. After the first day of storage, the pathogen count in minced meat at 4 °C and 10 °C was 0.4 log and 1.2 log higher, respectively ($P<0,05$). On the second day of storage, the increase of the population was 0.7 and 1.71 log ($P<0,05$). At

the end of storage, the *Yersinia* count in samples stored at 4 °C was 2.72 log higher than the initial population, while in samples stored at 10 °C it was 4.46 log higher. These results indicate the importance of implementing good hygiene practices in slaughter processing and production of minced pork, since cooling at the usual temperatures does not prevent the growth of the pathogenic *Y. enterocolitica*.

Key words: *Yersinia enterocolitica*, MALDI-TOF MS, Pork minced meat, Cooling, Growth potential