Nalaz bakterije Listeria monocytogenes u ribi i ribljim proizvodima

Rožman, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:204:294997

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

Agroekologija - Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

JELENA ROŽMAN

Nalaz bakterije *Listeria monocytogenes* u ribi i ribljim proizvodima

DIPLOMSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Lidija Kozačinski

Zagreb, 2016.

UNIVERSITY OF ZAGREB

FACULTY OF AGRICULTURE

Agroecology - Microbial Biotechnology in Agriculture

JELENA ROŽMAN

Finding of bacteria *Listeria monocytogenes* in fish and fish products

MASTER THESIS

Mentor: Prof. dr. sc. Lidija Kozačinski

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je ocijenjen i obranjen dana _____

s ocjenom _____ pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Lidija Kozačinski _____
2. Prof. dr. sc. Bela Njari _____
3. Doc. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka _____

Zahvala

Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Lidiji Kozačinski na vodstvu, susretljivosti, dostupnosti kada god mi je to bilo potrebno, velikoj pomoći pri izradi ovog diplomskog rada, te korisnim sugestijama što je ovaj diplomski rad učinilo kvalitetnijim.

Izrazito zahvaljujem svojim roditeljima koji su mi omogućili cjelokupno školovanje i koji su mi uvijek bili velika podrška i potpora.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. PREGLED LITERATURE 3

2.1. Karakteristike bakterije *L. monocytogenes* 3

2.2. Nalaz bakterije *L. monocytogenes* u hrani 5

2.3. Izolacija i identifikacija *L. monocytogenes* 10

2.4. Riba kao hrana 12

2.5. Mikrobiološke promjene u mesu ribe i ribljim proizvodima 13

2.6. HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) 15

3. CILJ RADA 17

4. MATERIJALI I METODE 18

5. REZULTATI 21

6. RASPRAVA 23

7. ZAKLJUČCI 26

8. LITERATURA 27

OBJAŠNJENJE KRATICA KORIŠTENIH U TEKSTU: 33

ŽIVOTOPIS AUTORA 34

SAŽETAK

Listerioza je bolest koja se prenosi hranom a bakterija *Listeria monocytogenes* je jedan od najznačajnijih javnozdravstvenih problema i uvjet prometa hrane u svijetu. Prije svega povezana je s konzumacijom gotovih proizvoda. U ovom radu je pretražena svježa riba (brancin) i riblji proizvodi (dimljena i marinirana riba, orada i brancin) na nalaz bakterije *L. monocytogenes*. Također, pretraženi su uzorci brisova uzeti s radnih površina i ruku djelatnika u pogonima prerade morske ribe. U pretraživanim uzorcima svježe, dimljene i marinirane ribe bakterija *L. monocytogenes* nije utvrđena. Međutim, u uzorcima marinirane i dimljene ribe utvrđena je *L. inocua.* U jednom uzorku brisa utvrđena je *L. monocytogenes* dok je *L. inocua* utvrđena na radnim površinama obrade, sortiranja i prerade ribe, odnosno na poziciji evisceracije, kontrole obrade ribe i na rukama radnika na operaciji filetiranja ribe.

Ključne riječi: *L.monocytogenes*, *L. inocua*, riba, riblji proizvodi, higijena pogona

SUMMARY

Finding of bacteria *Listeria monocytogenes* in fish and fish products

Listeriosis is a foodborne disease and *Listeria monocytogenes* is one of the most important public health problems as well as the condition of transport of food in the world. Primarily it is associated with the consumption of ready-to-eat food products. This paper examines fresh fish (sea bass) and fishery products (smoked and marinated fish, sea bream and sea bass) on the findings of *L. monocytogenes*. Swab samples taken from working surfaces and hands of workers in fish processing plants have also been examined. In the examined samples of fresh, smoked and marinated fish *L. monocytogenes* has not been established. However, in samples of marinated and smoked fish *L. inocula* was found. In one swab sample *L. monocytogenes* was found while *L. inocula* was found on workig surfaces for processing, sorting and processing of fish, or the position of evisceration, control of fish processing and on the hands of workers at fish filleting operations.

Keywords: *L. monocytogenes, L. innocua*, fish, fish products, hygiene of the facility

1. UVOD

U praksi je stalno prisutno pitanje sigurnosti hrane koje uključuje potencijalne javnozdravstvene probleme vezane uz oboljenja ljudi uzrokovanih konzumiranjem hrane onečišćene bakterijama. Listerioza je bolest koja se prenosi hranom a najčešće obolijevaju rizične skupine ljudi (imunosupresivne, starije osobe i novorođenčad). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (World Health Organisation; WHO) *Listeria monocytogenes* je pored bakterija roda *Salmonella* najznačajniji javnozdravstveni problem. Listerioza je bolest koja može završiti letalnim ishodom u visokih 25 % slučajeva. Prema izvješću Europske agencije za hranu (Eurpean Food Safety Agency, EFSA) u 2013. godini države članice Europske unije prijavile su 1.763 slučaja listerioze, što predstavlja povećanje od 8,6 % u odnosu na 2012. godinu. Ukupno je umrla 191 osoba, samo u Francuskoj zabilježena su 64 smrtna ishoda (Anon., 2015.). Bolest se može javiti u obliku epidemija ali i sporadično. Prije svega povezana je s konzumacijom gotovih proizvoda („ready to eat"; RTE) s produženom održivošću na temperaturi hladnjaka. Pojava bolesti vezana je najčešće uz mliječne i mesne proizvode, no jednako tako i uz ribu i blago konzervirane riblje proizvode (dimljena riba). Tako je u 2013. godini 17 država članica EU prijavilo nalaz *L. monocytogenes* u gotovim ribljim proizvodima. U ukupno 1.649 uzoraka različitih ribljih proizvoda *L. monocytogenes* je utvrđena u 1,6 % uzoraka (u mikrobiološkoj pretrazi korištene su kvalitativna i kvantitativna metoda). Jednako kao i prethodnih godina, *L. monocytogenes* je češće utvrđena u RTE ribi (uglavnom dimljena riba).

Najveći broj pretraženih riba potjecao je iz proizvodnih pogona, a bakterija je utvrđena u 12,9% od ukupno 9.443 pretražena uzorka. U 18,6 % (5.850 uzoraka) listerija je bila potvrđena u kvalitativnoj pretrazi i bila prisutna u brojem većem od 100 cfu/g u 2,2 % (3.489) pretraženih uzoraka. U maloprodaji *L. monocytogenes* je utvrđena u 5,6 % od ukupno 198 uzoraka testiranih kvalitativnom metodom, a u broju većem od 100 cfu/g nađena je u 0,5 % od ukupno 2.767 uzoraka u kvantitativnoj pretrazi. U ribi i ribljim proizvodima uzorkovanima u proizvodnim pogonima, *L. monocytogenes* je utvrđena u ukupno 10,8 % pretraženih uzoraka, dok je 1,6 % RTE uzoraka sadržavalo bakteriju u broju većem od 100 cfu/g.

O značenju kontrole ribljih proizvoda govore i podaci RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) iz 2004. godine (Week 2004/16) kada su u dva navrata povučene s tržišta pošiljke

dimljenog lubina porijeklom iz Španjolske zbog nalaza *L. monocytogenes.* Također, 2010. godine povučeni su s tržišta dimljeni riblji proizvodi, a među njima i dimljeni lubin, proizvodi tvrtke D & M Smoked Fish, Inc. (Marler, 2010.).

Prema zahtjevima Uredbe o mikrobiološkim kriterijima za hranu (Anon., 2005.) *L. monocytogenes* ne smije biti prisutna u broju većem od 100 cfu/g tijekom deklariranog roka održivosti proizvoda. Dodatno, proizvodi u kojima je moguć rast bakterije ne smiju ju sadržavati u 25 g u trenutku stavljanja na tržište. Slijedom navedenoga, subjekt u poslovanju s hranom (SPH) mora osigurati poštivanje kriterija sigurnosti hrane definiranih Uredbom u odnosu na bakteriju *L. monocytogenes,* za cijelo vrijeme roka trajanja hrane (poštujući uvjete skladištenja, transporta, izlaganja i prodaje kod ostalih SPH koji će njome rukovati te potrošača, a do isteka roka trajanja). Kod kategorije „Gotova hrana u kojoj može doći do rasta bakterije *L. monocytogenes*“ postavljen je kriterij 100 cfu/g tijekom roka trajanja koji se primjenjuje ukoliko SPH provode istraživanja unutar roka trajanja a koja dokazuju da proizvod ne prelazi granicu od 100 cfu/g tijekom roka trajanja. SPH može utvrditi i privremene granične vrijednosti tijekom procesa proizvodnje, koje moraju biti dovoljno niske da bi jamčile da se do kraja roka trajanja neće prijeći granica od 100 cfu/g. Kada SPH ne može na zadovoljavajući način dokazati da proizvod neće prijeći granicu od 100 cfu/g, primjenjuje se kriterij odsutnosti bakterije *L. monocytogenes* u 25 g. Pored tih kriterija, hrana se ispituje i na mikroorganizme koji su utvrđeni Vodičem o mikrobiološkim kriterijima za hranu (Anon., 2011.), koji ukazuju na higijenu proizvodnje.

Stoga će u ovome radu biti prikazani rezultati pretrage uzoraka ribe (lubin) i ribljih proizvoda (dimljeni lubin i dimljena orada) na prisutnost bakterije *L. monocytogenes*. U radu ćemo koristiti i dio rezultata istraživanja u okviru projekta FP7 Selection and improving of fit – for - purpose Sampling Procedures for specific foods and risks – BASELINE Grant Agreement number 222738; 2009. – 2013. (voditelj tima Veterinarskog fakulteta prof. dr. sc. Lidija Kozačinski).

2.PREGLED LITERATURE

Rod *Listeria* sastoji se od 6 vrsta, međutim, kod ljudi listeriozu uzrokuje vrsta *L. monocytogenes* (Helwigh i sur., 2012). *L. monocytogenes* prvi puta detaljno je opisana 1926. godine kada ju je Murray izolirao iz kunića. Prepoznata je kao važan patogen kod ljudi i životinja, a u posljednje vrijeme postala je predmet zanimanja medicinske, veterinarske i prehrambene mikrobiologije (Bubonja i sur., 2007).

2.1. Karakteristike bakterije *L. monocytogenes*

L. monocytogenes je štapićasta, fakultativno anaerobna bakterija. Pripada skupini gram pozitivnih bakterija (Slika 1). To su mikroaerofilne bakterije koje rastu u uvjetima smanjene koncentracije kisika. Ne proizvode spore, mogu se razmnožavati unutar velikog raspona pH (4,3 – 9,6) i temperature (1 – 45 °C). Uspijeva u supstratima od blago kiselih do alkalnih pH vrijednosti, ali ne i u vrlo kiselom okruženju. Opseg vrijednosti pH u okviru kojih se može razvijati ovisi o supstratu i temperaturi.

Slika 1. *Listeria monocytogenes* (http://thefoodpoisoninglawyers.com)

Optimalan raspon temperature za razmnožavanje ovog mikroorganizma je od 30 – 37 °C, to je patogen koji ima veliku otpornost na visoke i niske temperature. Preživljava temperature smrzavanja i obično se uništava na temperaturi obrade iznad 61,5 °C. Izrazito je otporna prema visokim koncentracijama NaCl-a (do 12 %). Ovi parametri omogućuju ovom mikroorganizmu preživljavanje različitih postupaka koji se koriste tijekom obrade namirnica. Pored toga, i sposobnost razmnožavanja na temperaturama skladištenja (4 °C), čine da ovaj mikroorganizam predstavlja veliki problem u prehrambenoj industriji, kao i potencijalnu

opasnost za ljudsko zdravlje (Bubonja i sur., 2007.; Popović i Đurđević-Milošević, 2008). *L. monocytogenes* se može spojiti s površinom koja je u dodiru s hranom proizvodeći fibrile za pripajanje, a potom stvarajući biofilm, koji otežava njezino uklanjanje prilikom čišćenja. Pričvršćivanje listerije za čvrstu površinu se odvija u dvije faze. Prva faza predstavlja primarni kontakt stanica s površinom, a druga čvrsto pripajanje koja slijedi poslije perioda inkubacije. *L. monocytogenes* se pripaja za podlogu proizvodeći veliku količinu isprepletenih polisaharidnih vlakana, koja se pružaju od površine bakterije kako bi formirala „glikolkaliks" koji, opet, okružuje stanice kolonije i ima ulogu provođenja hranjive tvari u stanicu i oslobađa enzime i toksine. Ovaj mikroorganizam je također i potencijalni kontaminant sirovih tvari koji se koriste u industrijama.

Popović i Đurđević-Milošević (2008.) navode da *L. monocytogenes* može biti prisutna u različitim prehrambenim proizvodima. Mikrobiološka neispravnost gotovog proizvoda često se povezuje uz kontaminaciju samog proizvoda ili nepravilnosti u procesu proizvodnje. U slučaju *L. monocytogenes,* u rizičnoj skupini se nalaze svježe, neprerađene namirnice kao što su mlijeko, meso, meki sirevi, ali i riba i riblji proizvodi. Ovaj patogen se najčešće prenosi konzumacijom kontaminirane hrane, ali se može prenijeti i s osobe na osobu ili inhalacijom ovog mikroorganizma. Uništavanje listerije je nepraktično i vjerojatno nemoguće. Razna istraživanja su pokazala da je *L. monocytogenes* otporna na djelovanje sanitarnih sredstava. Također, otpornija je na proces kuhanja od ostalih mikroorganizama, te samo kuhanje nije uvijek dovoljno za njezinu eliminaciju iz hrane. Iako je osjetljiva na zračenje, postupak se ne preporučuje kao konačno rješenje za uklanjanje iz svježeg mesa.

2.2. Nalaz bakterije *L. monocytogenes* u hrani

L. monocytogenes je mikroorganizam koji je rasprostranjen u okolišu. Može se naći u biljnom tkivu, tlu i vodi, u zaraženim životinjama, što je i glavni put prijenosa na ljude. Na ljude i životinje se prenosi najčešće konzumacijom kontaminirane hrane ili hrane za životinje. Raste u hladnim uvjetima, podnosi sušu i visoke koncentracije soli, preživljava i blage toplinske obrade. To je sveprisutan mikroorganizam koji je u stanju kolonizirati i sudjelovati u formaciji biofilma, te na taj način uspostaviti kontakt u sustavima proizvodnje hrane. Sirova hrana i sirovina za proizvodnju hrane će vrlo vjerojatno biti kontaminirane s *L. monocytogenes*, čak i toplinski tretirana hrana može biti ponovno onečišćena ovom bakterijom ukoliko stupi u kontakt sa sirovinom, alatom, rukovanjem, pa čak i kroz ventilacijske sustave (Helwigh i sur., 2012).

Javnozdravstvena važnost listerioze nerijetko je podcijenjena jer je ona puno rjeđa u usporedbi s drugim akutnim infektivnim bolestima koje se prenose hranom, kao što je primjerice salmoneloza. Međutim, važno je znati da se među infekcijama koje se prenose hranom, listerioza svrstava među bolesti s najčešćim smrtnim ishodom. Njezina incidencija u SAD-u bilježi pad od 1990. godine sve do nedavne, najsmrtonosnije epidemije 2011. godine koja se dovodi u vezu s dinjama uzgojenima na poljoprivrednim zemljištima u Coloradu, gdje su bile zaražene 72 osobe, od kojih je smrtno stradalo njih 13 (Anon., 2011. a). Sustav praćenja zdravstvene ispravnosti namirnica i predmeta opće uporabe temelji se na obvezi laboratorija ovlaštenih za ispitivanja zdravstvene ispravnosti da tromjesečno Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo dostavljaju izvješća o broju i tipu pregledanih uzoraka i ishodu analiza. Najčešći razlog mikrobiološke neispravnosti uzoraka namirnica u smislu higijenske neispravnosti hrane bio je nalaz aerobnih mezofilnih bakterija, enterobakterija, *Escherichia coli*, kvasaca i plijesni koji nije bio sukladan preporučenim mikrobiološkim kriterijima prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (Anon., 2011). Nadalje, razlog zdravstvene neispravnosti mikrobiološki pregledanih uzoraka namirnica bio je nalaz bakterija *Salmonella spp.* i *L. monocytogenes* koji nije odgovarao odredbama o mikrobiološkim kriterijima za hranu (Anon., 2015. a).

Godišnja incidencija listerioze u većini zemalja Europske unije (EU) prosječno se kreće od dva do deset prijavljenih slučajeva na milijun stanovnika. U periodu od 2004. – 2009. godine države članice EU-a predale su informacije o mikrobiološkim kontaminantima (*Salmonella,*

Campylobacter, Listeria, Yersinia, verotoksigena *Escherichia coli* (VTEC), *Brucella*) u hrani. Ukupno je prikupljeno 421,120 pojedinačnih i skupnih uzoraka koji su pretraživani na prisutnost listerije u različitoj hrani. Veliki broj izvještaja podnesen je od država članica EU-a o bakteriji *L. monocytogenes* utvrđenoj u hrani iz maloprodaje. Većina uzoraka prikupljena je iz različitih vrsta RTE mesnih proizvoda, a *L. monocytogenes* češće je otkrivena u proizvodima od govedine u donosu na proizvode od svinjetine, te proizvode od mesa peradi. Riba i riblja jela, mekani sirevi i suhomesnati proizvodi pripadaju kategoriji hrane koja je bila uvrštena u skupinu uzoraka nesukladnih s kriterijima sigurnosti hrane u pogledu nalaza *L. monocytogenes*. Relativno visoka razina nesukladnosti također je utvrđena u uzorcima koji su bili prijavljeni kao ostali RTE proizvodi testirani na obradi. U periodu od 2006. – 2009. povećan je broj istraživanja u uzorcima koji su bili neodgovarajući a bili su zabilježeni u ribi i ribljim proizvodima iz proizvodnje i maloprodaje, kao i u mekim sirevima (Helwigh i sur., 2012.).

U istraživanju iz 2004. godine provedenome u našoj zemlji, *L. monocytogenes* izolirana je u nešto više od 4 % uzoraka kolača iz ugostiteljskih objekata tijekom godine dana, a izolirani serotipovi i količina bakterija u pregledanim kolačima imali su visok potencijalni rizik za infekciju kod ljudi. U Hrvatskoj su isto tako provedena istraživanja na domaćim nepasteriziranim mliječnim proizvodima gdje je ovaj uzorak također pronađen, a izoliran je i iz 3 % uzoraka svježega i smrznutoga mesa peradi (Anon., 2011. a). Od 2004. – 2008./9. od strane država članica EU-a povećava se broj izvještaja o izolaciji *L. monocytogenes* u mesu i mesnim proizvodima (19 - 32 države), voću i povrću (5 - 9 država), kao i u posebnim namirnicama (do 9 država). Čak 19 - 21 država članica EU-a prijavilo je nalaz *L. monocytogenes* u drugim kategorijama hrane, kao što su mlijeko i sir te pogoni mljekare. Nalaz bakterije u ribi i ribljim proizvodima prijavilo je 17 - 22 država članica EU-a. Velika količina prikupljenih podataka iz uzoraka različitih kategorija hrane u EU dokaz je kako se *L. monocytogenes* nalazi u većini ispitivanih namirnica (meso, riba, mliječni proizvodi, povrće; Helwigh i sur., 2012).

Podaci objavljeni u Americi pokazuju da 4 – 5 % uzoraka dimljene ribe sadrži bakteriju *L. monocytogenes* (Gombas i sur., 2003.). Stupanj kontaminacije proizvodnih pogona može biti različit na što su odavno ukazivali Jørgensen i sur. (1998), pa su u njihovom istraživanju utvrđeni pogoni u kojima su svi pretraženi uzorci bili pozitivni na listeriju, dok u drugima nije bila utvrđena. Gombas i sur. (2003) navode da se *L. monocytogenes* najčešće pojavljuje u

malom broju od <10 cfu L.m./g, ali sporadično njezin broj bude i daleko veći (Gombas i sur., 2003.; Jørgensen i sur., 1998) i iznosi od 10^4 – 10^6 cfu L.m./g.

Riblji proizvodi mogu veoma lako biti kontaminirani bakterijom *L. monocytogenes* tijekom proizvodnje. Sirova riba može biti važan izvor onečišćenja opreme i uređaja što će rezultirati kontaminacijom proizvoda (Miettinen i Wirtanen, 2005.). Evisceracija i čišćenje ribe prije prodaje može uzrokovati širenje bakterije u proizvodnom pogonu što opet dovodi do križne kontaminacije ribe, opreme, zaposlenih i okoliša uopće (Papadopoulos i sur., 2010.).

Dominguez i sur. (2001) su u uzorcima dimljene ribe u maloprodaji utvrdili *L. monocytogenes* u 22,3 % uzoraka (n = 170). Čak 20 uzoraka sadržavalo je bakteriju u broju većem od 100 cfu/g. Ujedno, utvrdili su i druge vrste, i to *L. inocua* (26 izolata), *Listeria grayi* (9), *Listeria welshimeri* (3), *Listeria seeligeri* (3) i *Listeria ivanovii* (2).

Kuzmanović i sur. (2011.) su u svojem istraživanju prevalencije ribe i ribljih poizvoda (n=470) bakterijama roda *Listeria* utvrdili patogena u 58 uzoraka (12,34%). *L. monocytogenes* je utvrđena kod 1,92% pregledanih uzoraka (9 izolata) i čini 15,52% od svih vrsta iz roda *Listeria* koje su izoloirane. Ostale vrste listerija pripadale su vrstama *L. innocua* (8,51%), *L. welshimeri* (1,28%), *L. welshimeri/innocua* (0,21%), *L. grayi* (0,21%) i *L. seeligeri* (0,21%).

Lakicevic i sur. (2015) istraživali su prisutnost *L. monocytogenes* u ribi i proizvodnim pogonima. Rezultati su pokazali da je 12,4 % uzoraka ribe (svježi i dimljeni losos), 8,3 % uzoraka salata od plodova mora i 2,3 % uzoraka brisova iz proizvodnih pogona sadržavalo bakteriju.

L. monocytogenes utvrđena je i u ribi i u akvatičnom okolišu, pa posljedično u različitim ribljim proizvodima, uključujući zamrznutu ribu, hladno i toplo dimljeni losos, mariniranu ribu, fermentiranu ribu i riblje salate (González-Rodríguez i sur., 2002.; Papadopoulos i sur., 2010.; Tocmo i sur., 2014).

Jeyasekaran i sur. (1996) su u istraživanju incidencije bakterija roda *Listeria* u tropskim ribama utvrdili da su najčešće vrste *L. monocytogenes* (17,2 % pozitivnih uzoraka ribe i 12,1 % pozitivnih uzoraka školjkaša) i *L. inocua.* Također, obje su bakterijske vrste istovremeno utvrđene u 6,9 % pretraženih riba i 5,6 % uzoraka školjkaša. *L. inocua* smatra se nehemolitičnom saprofitskom bakterijom koja je široko rasprostranjena u okolišu. Može preživjeti ekstremne uvjete (visoki pH, visoke i niske temperature, visoke koncentracije soli) a izolirana je iz tla, površinskih voda, gnjilog povrća, kanalizacije i hrane (Moreno i sur.,

2012). Vrlo je bliska bakteriji *L. monocytogenes*, ali se ne smatra patogenom bakterijskom vrstom. *L. inocua* ne nosi virulentne gene koji su opisani u *L. monocytogenes* i *L. ivanovii*. Međutim, opisani su neki atipični hemolitični sojevi nalik na *L. monocytogenes* (Johnson i sur., 2004.; Moreno i sur., 2012). Perrin i sur. (2003.) opisali su prvi slučaj bakterijemije uzrokovane s *L. innocua*, dok su Favaro i sur. (2014.) opisali slučaj akutnog meningitisa u osobe koja je bolovala od reumatoidnog artritisa.

Vitt i sur. (2008.) su istraživali utjecaj komercijalnih pripravaka tekućeg dima u proizvodnji dimljenog lososa na smanjenje broja bakterija *L. monocytogenes* i *L. inocua*. Dim u koncentraciji od 60 – 100 % smanjuje broj *L. inocua* za oko 3 log10/g u konačnom proizvodu.

Sabanadesan i sur. (2000.) su istraživali sposobnost *L. inocua* da preživi u filetima lososa tijekom dimljenja. Temperatura dima nije značajno utjecala ($P < 0,005$) na smanjenje broja bakterije u ribi, ali je zato značajni utjecaj na njezino smanjenje imalo vrijeme dimljenja. Tako je tijekom dimljenja od 12 sati broj *L. inocua* smanjen za 3 log, na što nije imao utjecaj pH, aktivitet vode ili koncentracija soli u filetima.

Mariniranje je jedan od najstarijih oblika konzerviranja koji se koristi i u ribljoj industriji. Giuffrida i sur. (2007.) istraživali su ponašanje bakterije *L. monocytogenes* u mariniranim proizvodima od lubina. U tu su svrhu filetirane lubine marinirali u mješavini octa i vode (1:1) 0,1% limunske kiseline, 8 % NaCl i 50 g sukroze na kg mesa ribe. Nakon 48 sati (pohrana na 4 ºC) fileti su ocijeđeni i pakirani u vakuumu. Uzorci koji su sadržavali cijelu ribu, sirovi fileti i marinirani fileti su uzorkovani nakon 0, 3, 12, 24, 28 i 36 dana pohrane na 4 ºC. Mjeren je pH i aktivitet vode (a_w) te su utvrđivane enterobakterije, ukupni broj bakterija i bakterije mliječne kiseline. Također, 20 uzoraka fileta lubina kontaminirano je suspenzijom *L. monocytogenes* a potom marinirano na opisani način. pH, a_w i određivanje broja *L. monocytogenes* obavljeno je nakon 3, 5, 35 i 48 sati. U mariniranim proizvodima broj enterobakterija se smanjio kroz tri dana, dok je ukupni broj bakterija i bakterija mliječne kiseline lagano rastao tijekom pohrane. pH je naglo pao ispod 4,5 i bio u granicama od 4,4 do 4,9. Aktivitet vode je dosegao prosječnu vrijednost od 0,987 nakon tri dana i potom pao na 0,972 nakon 35 dana pohrane. U drugom dijelu pokusa, inicijalni broj *L. monocytogenes* iznosio je log 2,66 cfu/g i dosegao log 1,17 nakon 5 sati. Nakon 35 sati po mariniranju broj bakterije bio je ispod razine detekcije.

Masniyom i sur. (2006.) utvrdili su smanjenje broja *L. monocytogenes* u uzorcima fileta lubina pakiranog u modificiranoj atmosferi, ali njezin rast nije zaustavljen. Općenito,

održivost ribljih proizvoda može biti produljena pakiranjem u modificiranoj atmosferi, pa iako mikrobni rast nije zaustavljen odgođeno je onečišćenje i razgradnja ribljeg mesa. Kombinirana primjena MAP-a i još nekog od postupaka konzerviranja je učinkovitija u očuvanju kvalitete ribe i ribljih proizvoda tijekom produljene pohrane, ali jedino uz primjenu dobre higijenske i proizvodne prakse (Masniyom, 2011).

Meso lososa se često koristi u proizvodnji ribljih proizvoda (sushi, sashimi) koji se smatraju RTE hranom. Kako je *L. monocytogenes* povremeno prisutna u svježem lososu (lunestad i sur., 2013.) postavlja se pitanje onečišćenja i konzumacije ovih sirovih ribljih proizvoda. Skjerdal i sur. (2014.) istraživali su razinu kontaminacije svježeg lososa u industriji u čijim je pogonima *L. monocytogenes* utvrđena u malom broju i mogla je kontaminirati ribu tijekom obrade – filetiranja. Cilj studije bio je da se utvrdi dozvoljena razina bakterije u sirovini koja neće utjecati na zdravstvenu neispravnost gotovog proizvoda (sushi). Tako u ribi koja je namijenjena proizvodnji sushija nakon filetiranja i pohrane na 4 °C unutar jednog tjedna broj *L. monocytogenes* ne smije prelaziti 2 cfu/g na dan filetiranja.

2.3. Izolacija i identifikacija *L. monocytogenes*

Klasične (tradicionalne) mikrobiološke metode

Porast epidemija listerioze imao je za posljedicu neprekidno usavršavanje metodologije izolacije i identifikacije bakterije *L. monocytogenes* iz hrane. Prisutnost velikog broja ostalih bakterija u namirnicama, te različiti uvjeti (temperatura, hlađenje i dr.) kojima je izložena hrana otežavaju izolaciju bakterije *L. monocytogenes* (Curtis i sur., 1989.; Van Netten i sur., 1989.; Golden i sur.,1990.; Petran i Swanson, 1993.). Stoga je bilo važno:

- Povećati selektivnost podloga za namnažanje i podloga za izolaciju
- Poboljšati mogućnost detekcije malog broja *L. monocytogenes*
- Skratiti vrijeme izolacije
- Osigurati izolaciju subletalno oštećenih stanica

Uvjeti za izolaciju bakterije *L. monocytogenes* su: aerobna atmosfera, temperatura inkubacije od 30 - 37 °C, podloge za obogaćivanje i selektivne podloge (Doyle i Schoeni, 1986.; Gasanov i sur., 2005.; Geornaras i sur., 2006.).

Klasična mikrobiološka metoda za izolaciju *L. monocytogenes* obuhvaća 4 faze: faza prednadmažanja, faza namnažanja, faza izolacije i faza identifikacije (potvrde).

- *Faza prednadmažanja* obuhvaća revitalizaciju oštećenih stanica (nizak pH hrane ili smrzavanje hrane) u bujonskoj podlozi.
- U *fazi namnažanja* nastoji se povećati broj bakterije *L. monocytogenes,* izlažući uzorak selektivnim uvjetima ili skupini agensa koji inhibiraju rast ostalih bakterija, a ne ometaju rast ciljane bakterije. Ova faza smatra se fazom „povećanja broja ciljanog mikroorganizma“.
- *Faza izolacije* obuhvaća primjenu jedne ili više krutih selektivnih podloga s jednim ili više selektivnih agensa.
- *Faza identifikacije (potvrde)* je završna faza. Najčešće se koristi 9 testova za potvrdu roda. Kratki gram pozitivni štapić, pokretljivost, katalaza - pozitivna reakcija, oksidaza - negativna reakcija, Voges Proskauer pozitivan, eskulin - pozitivna reakcija, telurit - pozitivna reakcija i produkcija kiseline iz glukoze.

Klasične mikrobiološke metode za izolaciju i identifikaciju mikroorganizama uključuju homogenizaciju uzorka hrane, njezinu inokulaciju na različite tekuće podloge za

prednamnažanje i namnažanje, te inokulaciju na različite selektivne podloge uz određeni vremenski period inkubacije (Boer, 1998). Uzorci hrane mogu biti kruti ili tekući, a metode uzorkovanja ovise o vrsti materijala i očekivanog stupnja kontaminacije. Razrjeđenja ili korak obogaćivanja je neophodan, a ovisi o stupnju bakterijske kontaminacije hrane. U slučaju kvalitativne izolacije patogenih bakterija iz uzoraka hrane korak (pred) namnažanja može biti zamijenjen tehnikom filtracije, centrifugiranja ili magnetske separacije. Nakon koraka (pred) namnažanja slijedi inokulacija na selektivne podloge, te biokemijska i serološka identifikacija dobivenih bakterijskih izolata.

2.4. Riba kao hrana

Riblje se meso po svom sastavu ne razlikuje značajno od mesa toplokrvnih životinja. Kemijski sastav ribe varira ovisno o vrsti ribe, prehrani, starosti, spolu, migraciji, uvjetima okoliša te godišnjem dobu i značajni je pokazatelj smjernica postmortalnih promjena koje možemo očekivati. Ribogojilišta do određene mjere kontroliraju faktore koji utječu na kemijski sastav ribe poput okoliša, genetskih osobina, tehnološkog ciklusa itd. (Reintz, 1983.; Huss, 1995). Meso ribe je male energetske vrijednosti u odnosu na meso sisavaca koje se koristi u prehrani, no nutritivno je njegov značaj velik. Riba kao namirnica predstavlja jedan od glavnih izvora bjelančevina životinjskog porijekla. Odlikuje se bogatim sastavom masti i bjelančevina koje sadrže mnoge esencijalne aminokiseline i masne kiseline prijeko potrebne organizmu za odvijanje metaboličkih funkcija. U odnosu na meso ostalih životinja riba sadrži vrlo malo vezivnog tkiva i ne sadrži elastin. Sve te karakteristike čine riblje meso dijetalnim prehrambenim proizvodom i daju mu posebno mjesto u prehrani ljudi.

Osnovni kemijski sastav riba (udio vode, bjelančevina, masti, ugljikohidrata, minerala) varira u odnosu na vrstu ribe, dob, veličinu, spol i spolnu zrelost te vrijeme mrijesta, način ishrane, geografsko područje ulova, godišnje doba i drugo. Kemijski sastav riba varira od jedne do druge vrste pa čak i unutar iste vrste. Meso ribe brže se kvari od mesa sisavaca čemu je uzrok visoka količina vode i slobodnih aminokiselina a niska količina vezivnog tkiva (Žlender, 2000). Odmah nakon smrti ribe, različite biokemijske i enzimatske promjene događaju se u mišićju riba, posebno pri neadekvatnom tretiranju ribe. Zato, kvarenje ne ovisi samo o vrsti ribe i njezinom kemijskom sastavu, već i o vanjskim utjecajima. Ove promjene zajedno s enzimatskim i mikrobiološkim aktivnostima utječu na razgradnju mišića (Šoša, 1989; Pereira de Abreu i sur., 2010).

2.5. Mikrobiološke promjene u mesu ribe i ribljim proizvodima

Mikrobiološko kvarenje mesa ribe i ribljih proizvoda može biti uzrokovano aktivnostima enzima i mikroorganizama. Različita istraživanja pokazala su da prirodna mikroflora ribe može utjecati na kvarenje ribe ovisno o okolišu, načinu ulova ribe, manipulaciji ribom i transportu. Potom, svaki mikrobiološki rast tijekom konzerviranja ribe ovisi o uvjetima čuvanja proizvoda. Gram i Huss (2000.) navode da su mikroorganizmi odgovorni za kvarenje pretežno psihrotolerantne G- bakterije pripadnice rodova *Pseudomonas* i *Shewanella* koje se mogu razmnožavati i u smrznutoj ribi. G+ bakterije kao što su *Staphylococcus spp., Micrococcus, Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Brochothric thermosphacta* i *Streptococcus,* pronađene su kao dominantna mikroflora u morskoj ribi tropskih mora (Bulushi i sur., 2010). Kvarenje morske ribe je uzrokovano specifičnim organizmima kvarenja *Pseudomonas, Shewanella* i *P. phosphoreum* (Gram i Dalgaard, 2002). Ti organizmi mogu rasti i proizvesti metabolite kvarenja, posebno baze koje brzo isparavaju hipoksantin i organske kiseline. Neki metaboliti kvarenja mogu biti indikator pogoršanja stanja kod riba i školjkaša. Biogeni amini, uključujući agmatin, kadaverin, dopamin, histamin, noradrenalin, putrescin, serotonin, spermidin, spermin, triptamin i tiramin su produkti bakterijskog kvarenja. Njihovi sastojci se često koriste kao pokazatelji procjene čuvanja kvalitete i roka trajanja ribljih proizvoda. Dakako, većina putrescina, kadeverina i histamina u tkivu skuše ima svoje izvorište u dekarboksilaciji aminokiselina nekih mikroorganizama kao što su pripadnici rodova *Pseudomonas, Vibrio* i *Photobacterium* (Okuzumi i sur., 1990). Rok trajanja svježe ribe ograničen je u prisutnosti atmosferskog O_2 rastom i biokemijskom aktivnošću G- bakterija.

Mikroorganizmi kvarenja mogu biti inhibirani kod pakiranja proizvoda nepropusnim filmom u modificiranoj atmosferi (Modified Atmosphere Packaging; MAP) obogaćenoj atmosferskim CO_2 koji usporava respiraciju organizama i dominira nad bakterijom *Photobacterium phosphoreum* (Dalgaard, 2000). Sivertsvik i sur., (2002.) tvrde da psihrotrofična, aerobna ili moguće anaerobna G-bakterija, obično bude identificirana iz rodova *Pseudomonas, Moraxella, Acinetobacter, Vibrio, Flavobacterium, Photobacterium* i *Aeromonas* ili kao *S. putrefaciens,* a dominira nad bakterijama kvarenja u umjereno toploj vodi. MAP metoda se koristi za produljenje roka trajanja ribljih proizvoda i plodova mora jer je dokazano da usporava mikrobiološki rast i enzimatsko kvarenje.

Tehnologije pakiranja hrane su važne da bi se zaštitili proizvodi od kvarenja što može uključiti mikrobiološke, biokemijske i fizičke aktivnosti koje uvjetuje utjecaj okoline. To uključuje usporavanje kvarenja, produljenje roka trajanja i održavanja kvalitete pakirane hrane (Restuccia i sur., 2010.; Ravi-Sankar i sur., 2008).

Da bi se usporio rast mikroorganizama u takvim pakiranjima koriste se zaštitne tvari kao što su mliječna kiselina, sorbati, fosfatna kiselina i esencijalna ulja kojima se postiže značajan antimikrobni efekt na različite štetne mikroorganizme. Vjeruje se da laktati snizuju štetan utjecaj okoline što pokazuje antimikrobni efekt (Pothuri i sur., 1995). Pothuri i sur. (1995.) su izvijestili da mliječna kiselina u kombinaciji s MAP-om učinkovito kontrolira *L. monocytogenes* u mesu slatkovodnog raka. Rok trajanja je produžen osam dana u uzorku tretiranom s 1 % mliječne kiseline u modificiranoj atmosferi u usporedbi s tretmanom na zraku. Antimikrobna svojstva kiseline dovode do smanjenja pH vrijednosti na kojoj je inhibiran rast mnogih bakterija (Masniyom i sur., 2007). Esencijalna ulja biljaka i začina upotrebljavaju se da bi produljili rok trajanja svježih ribljih proizvoda. Esencijalna ulja, uključujući klinčić, cimet, origano, češnjak, ružmarin, majčinu dušicu ili njihovi ekstrakti dokazano posjeduju antimikrobnu aktivnost i antioksidativna svojstva potrebna kako bi se produljio rok trajanja riba i školjkaša (Zaika i sur., 1997.; Goulas i Kontominas, 2007.; Fernandez i sur., 2009).

MAP se upotrebljava da bi se produžio rok trajanja lako kvarljive hrane, no unatoč tome zabilježena je aktivnost različitih bakterijskih vrsta kao što su *L. monocytogenes, Escherichia. coli, Staphylococcus aureus* i *Clostridium botulinum* (Kimura i sur., 1999). MAP ribljih proizvoda može stoga biti i potencijalna opasnost jer neće spriječiti rast određenih patogena.

2.6. HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points)

Sustavi samokontrole, posebice primjena analize rizika kritičnih točaka proizvodnje (Hazard Analysisi Critical Control Points; HACCP) i drugih postupaka za kontrolu procesa obrade je najučinkovitija metoda kontrole mikroorganizama u industrijskom okruženju. U pokušaju da se smanji, odnosno eliminira prisutnost *L. monocytogenes* u namirnicama, američka Agencija za hranu i lijekove (Food and Drug Administration, FDA) prvi puta je 2006. godine odobrila korištenje *Listeria* specifičnih bakteriofaga kao aditiva mesnim prerađevinama koje se konzumiraju bez dodatne toplinske obrade (Bubonja i sur., 2007).

L. monocytogenes je patogen koji se nalazi u okolišu i koji će vrlo lako onečistiti hranu tijekom njezine pripreme i kao kontaminant preživjeti u pogonima i na radnim površinama te uporno kontaminirati proizvode. Stoga je njezin nalaz češći u proizvodnim pogonima i u samom proizvodu nego u sirovini (Fonnesbech Vogel i sur., 2001.; Fonnesbech Vogel i sur., 2001. a*;* Norton i sur., 2001). Autori smatraju da u pogonima u kojima se proizvodi dimljena riba postoji jedinstveni soj *L. monocytogenes.* Kao ubikvitarna bakterija može preživjeti u različitim okolišnim uvjetima, te se može skrivati u salamuri, strojevima za narezivanje, površinama za filetiranje ribe, radnim površinama, na podovima. Stoga se programi dobre proizvodne i higijenske prakse moraju zasnivati na poduzimanju specifičnih uzorkovanja iz okoliša i dokaza bakterija u pogonima kako bi se eliminirala iz proizvodnih pogona i površina koje dolaze u kontakt s hranom (Rorvik i sur., 1995; Autio i sur., 1999.; Bagge Ravn i sur., 2003).

Gram (2004.) navodi da je uvijek moguć slučajni nalaz *L. monocytogenes* u proizvodnji, ili distribuciji smrznutih lososa, a jednako tako i u skladištu koje je kritična kontrolna točka. Kako *L. monocytogenes* može preživjeti različite nepogodne uvjete ne smije se zanemariti mogućnost rekontaminacije proizvoda u različitim fazama proizvodnje i preko različitih strojeva, opreme ili radnih površina. Sporadično su utvrđene visoke razine organizama pa je naglasak na kontroli i prevenciji tim veći kako bi se onemogućila kontaminacija smrznute hrane i hrane s ograničenim rokom trajanja. Različite studije pokazuju da rast *L. monocytogenes* u gotovom proizvodu i u pakovanjima (ambalaži) može biti veći nego u prirodno kontaminiranoj sirovini. Naime, razina kontaminacije svježe ribe varira od objekta do objekta, ali treba zapamtiti da je svježa riba izvor *L. monocytogenes* koja na taj način kontaminira pogone.

Kako bi se smanjio ili sveo na najmanju moguću mjeru rizik od onečišćenja proizvoda bakterijom *L. monocytogenes,* mogu se upotrijebiti različite mjere prevencije njezinog rasta. Na primjeru dimljenih ribljih proizvoda to bi značilo (Gram, 2004):

- Skladištenje ili distribucija zamrznute ribe
- Dodatak proizvodima više od 10 % NaCl-a ili drugih inhibicijskih faktora
- Upotreba laktata sa ili bez atmosferskog CO_2
- Upotreba bakterija mliječne kiseline i/ili njihovih bakteriocina
- Odabir „sol-dim“ kombinacije, ali obratiti pozornost na sadržaj fenola u dimu
- Eliminirati *L. monocytogenes* nakon pakiranja korištenjem postupaka kao što je primjena visokog tlaka, radijacije i sl.

Veoma je važno u proizvodnim procesnim kriterijima uključiti korake eliminacije *L. monocytogenes*.

Mikrobiološki kriteriji mogu se koristiti i kao mjere kontrole. Stoga je važno uzorkovanje ribe i proizvoda te sama mikrobiološka pretraga. Kriteriji mogu biti odabrani na način da prate kriterij sigurnosti hrane (Food Safety Objective; FSO) koji prema važećim odredbama iznose 100 cfu/g ili se kontrola bazira na procesnim kriterijima odnosno parametrima kontrole u tehnološkim postupcima koji se koriste kako bi se smanjio mikrobiološki rizik. Bilo koji odabrani kriterij osigurava viši stupanj sigurnosti hrane (Gram, 2004). U praksi je dokazano da je jedini način da gotovi proizvod, dimljeni losos, zadrži FSO od 100 cfu/g nakon tri tjedna pohrane u maloprodaji, da se smanji rast mikroorganizama za 1-2 log.

3.CILJ RADA

Cilj ovoga rada je pretražiti svježu ribu i riblje proizvode spremne za konzumaciju (fileti dimljene ribe i marinirana riba) na nalaz bakterije *L. monocytogenes*. Prema zahtjevima Uredbe (EC) o mikrobiološkim kriterijima za hranu broj 2073/2005 *L. monocytogenes* ne smije biti prisutna u broju većem od 100 cfu/g tijekom deklariranog roka održivosti proizvoda. Dodatno, proizvodi u kojima je moguć rast bakterije ne smiju je sadržavati u 25 g u trenutku stavljanja na tržište. Kako je bakterija ubikvitarnog karaktera, komentirat ćemo rezultate njezinog nalaza u pogonima prerade ribe te pokušati povezati nalaz bakterije u svježoj ribi i okolišu u odnosu na riblje proizvode.

4.MATERIJALI I METODE

U ovom su radu pretraženi uzorci ribe i ribljih proizvoda, ukupno 21 uzorak. Na nalaz *L. monocytgoenes* pretraženo je devet uzoraka svježe ribe (brancin), šest uzoraka marinirane ribe (tri uzorka marinirane orade i tri uzorka mariniranog brancina) te šest uzoraka dimljene ribe (tri uzorka dimljene orade i tri uzorka dimljenog brancina).

U istraživanju smo koristili i dio rezultata bakteriološke pretrage svježe ribe, brancina (n=39) dobivenih u okviru projekta FP7 Selection and improving of fit-for-purpose Sampling Procedures for specific foods and risks – BASELINE Grant Agreement number 222738 ; 2009. – 2013. (voditelj tima Veterinarskog fakulteta prof. dr. sc. Lidija Kozačinski), te rezultate ocjene mikrobiološke čistoće pogona za obradu ribe s obzirom na nalaz bakterije *L. monocytogenes*..

Uzorci ribe i ribljih proizvoda dostavljeni su u Zavod za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane nakon proizvodnje i u trenutku kada se distribuiraju na tržište. Uzorci su dostavljeni u ručnom hladnjaku. Pakiranja su bila neoštećena. Svježa riba (brancin) bila je mase oko 300 g, pakirana u pliticama u modificiranoj atmosferi. Marinirani brancin i marinirana orada pakirani su u posudicama mase 100 g. U marinadi je riba filetirana. Dimljeni fileti brancina i orade također su pakirani u ambalaži od 100 g.

U okviru zadataka projekta BASELINE svježi brancin je dostavljen u kašetama u dva navrata. Uzorci su uzorkovani po izlovu i nakon primarne obrade (evisceracija) u pogonu prerade ribe a prije pakiranja za maloprodaju. U drugom su slučaju uzorci brancina uzorkovani iz maloprodaje, u ribarnicama. Također, pri uzorkovanju ribe u pogonu prerade uzeti su i uzorci brisova s radnih površina i ruku djelatnika. I riba i uzorci brisova pretraživani su samo na prisutnost bakterije *L. monocytogenes.*

Postupak uzorkovanja s radnih površina i dlanova

Na ispitivane radne površine / dlanove postavljeni su sterilni obrasci („šablone“) načinjeni od nekorozivnog materijala površine od (5x4) 20cm^2. U epruveti s brisovima (štapić s namotajem vate) dodan je kao otapalo Maximum Recovery Diluent (MRD) s 0,85% NaCl, a po uzorkovanju drška brisa je odlomljena, epruveta začepljena, te je tako dostavljena u laboratorij. U laboratoriju je dodan MRD do 10 ml i sve zajedno homogenizirano korištenjem

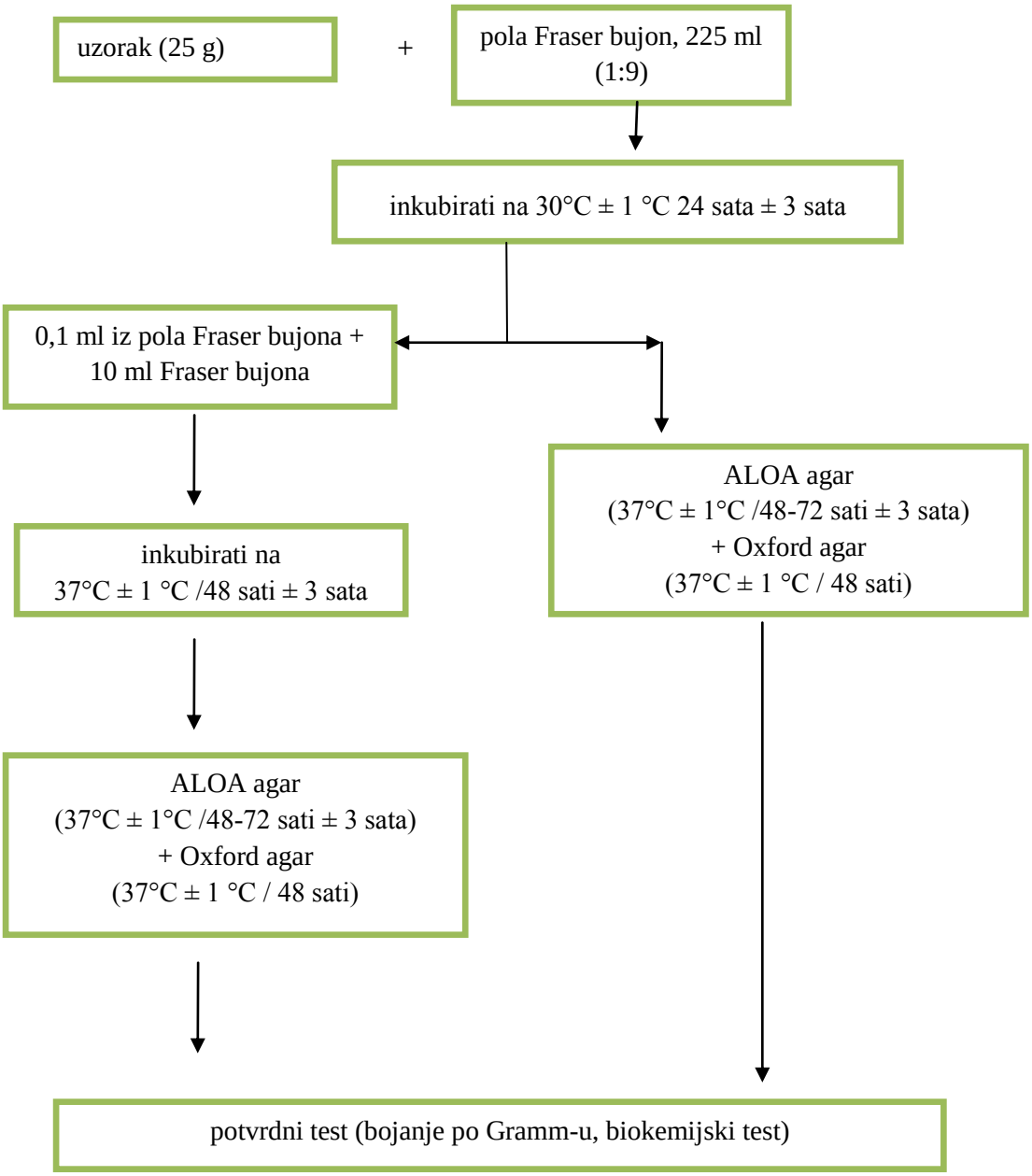
vibracijske mućkalice kroz 30 sekundi. U skladu s metodom za dokaz *L. monocytogenes*, 1 ml inokuluma korišten je u daljnjem postupku izolacije bakterije.

Uzorci ribe i proizvoda pretraženi su na prisutnost *L. monocytogenes* u 25 g prema normi HRN EN ISO 11290-2:1999 (Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za dokazivanje i određivanje broja stanica *Listeria monocytogenes* - 1. dio: Metoda dokazivanja (HRN EN ISO 11290-1:1999 + HRN EN ISO 11290-1:1999/A1:2008).

Postupak: Uzorak od 25 g ribe doda se u 225 ml Half -Fraser bujon, homogenizira i inkubira 24 sata na 30 °C. Potom 0,1 ml homogeniziranog uzorka dodamo u 10 ml Fraser bujona te inkubiramo 48 sati na 37 °C. Uzorci se nakon toga nasađuju u duplikatu na Agosti and Ottaviani Listeria Agar (ALOA) i inkubiraju pri temperaturi 37 °C u trajanju 48 sati (shema 1).

Potvrdni test za dokaz bakterije *L. monocytogenes*

L. monocytogenes potvrđena je pomoću komercijalno dostupnog API Listeria testa prema uputi proizvođača (Biomerieux), nakon što nasadimo odabrane kolonije na selektivni agar za potvrdu API testom. API test se sastoji se od 10 mikrotuba s dehidriranim supstratom koji očitavaju enzimatske reakcije ili fermentacije šećera. Reakcije se očitavaju vizualno nakon inkubacije (18-24 sata / 37 ^{0}C, aerobni uvjeti) ili nastaju spontano nakon dodatka reagensa (ZYM B reagens u DIM testu), te se očitavaju promjenom boje.



Shema 1. Postupak izolacije bakterije *L. monocytogenes* (HRN EN ISO 11290-1:1999)

5. REZULTATI

U tablici 1. prikazani su rezultati bakteriološke pretrage ribe i proizvoda na *L. monocytogenes*.

Tablica 1. Rezultati pretrage ribe i ribljih proizvoda na prisutnost bakterije *L. monocytogenes*

Uzorak	**n**	***L. monocytogenes*/25 g**	**Napomena**
Svježi brancin	9	neg.	-
Marinirana orada	3	neg.	*Listeria inocua* / 25 g = poz.
Marinirani brancin	3	neg.	*Listeria inocua* / 25 g = poz.
Dimljena orada	3	neg.	*Listeria inocua* / 25 g = poz.
Dimljeni brancin	3	neg.	*Listeria inocua* / 25 g = poz.

Kao što je vidljivo iz tablice 1., niti u jednom pretraženom uzorku ribe ili ribljih proizvoda nije utvrđena bakterija *L. monocytogenes*. No u biokemijskoj identifikaciji (API Listeria test, Biomerieux) utvrđena je bakterija *L. inocua* u svim pretraženim uzorcima ribljih proizvoda (n= 12)..

U tablici 2. prikazani su rezultati mikrobiološke pretrage svježe ribe (brancin) iz uzgoja uzorkovane u otpremnim centrima i u maloprodaji, a u tablici 3. rezultati pretrage brisova radnih površina i dlanova djelatnika u pogonu prerade ribe koji su rezultat radnih zadataka u okviru projekta BASELINE.

Tablica 2. Rezultati pretrage svježe ribe (brancin) na prisutnost bakterije *L. monocytogenes*

Uzorkovanje		***L. monocytogenes*/25 g**
Pogon prerade ribe	**Maloprodaja**	
8	31	neg.

Svi uzorci svježeg brancina koji su uzorkovani prije otpreme iz pogona prerade ribe i iz maloprodaje (ribarnica) bili su negativni na nalaz bakterije *L. monocytogenes.*

Tablica 3. Rezultati mikrobiološke pretrage radnih površina i ruku djelatnika u pogonima za obradu ribe

Mjesto uzorkovanja	**1. uzorkovanje**			**2. uzorkovanje**		
	n	**Lm**	**Li**	**n**	**Lm**	**Li**
Radna površina – evisceracija	2	**poz.**	neg.	2	neg.	**poz.**
Radna površina – obrada ribe	2	neg.	**poz.**	2	neg.	neg.
Radna površina – sortiranje ribe	2	neg.	**poz.**	2	neg.	neg.
Radna površina – filetiranje ribe	2	neg.	**poz.**	2	neg.	neg.
Radna površina – soljenje ribe	2	neg.	neg.	2	neg.	neg.
Radna površina – kontrola obrade ribe	2	neg.	neg.	2	neg.	**poz.**
Ruke radnika - evisceracija	2	neg.	neg.	2	neg.	neg.
Ruke radnika - filetiranje	2	neg.	neg.	2	neg.	**poz.**
Ruke radnika - sortiranje	2	neg.	neg.	2	neg.	neg.
Ruke radnika - kontrola	2	neg.	neg.	2	neg.	neg.
Ukupno	20	1	3	20	0	3

Lm = *Listeria monocytogenes;* Li = *Listeria inocua*

U uzorcima brisova s radnih površina (Tablica 3) i ruku djelatnika *L. monocytogenes* utvrđena je samo u jednom slučaju, na radnoj površini na kojoj se riba eviscerira. *L. inocua* utvrđena je, međutim, u oba uzrokovanja u tri slučaja na radnim površinama obrade, sortiranja i prerade ribe, odnosno kod drugog uzorkovanja na poziciji evisceracije, kontrole obrade ribe i na rukama radnika na operaciji filetiranja brancina.

6. RASPRAVA

Rezultati istraživanja pokazuju da u pretraženim uzorcima svježe, dimljene i marinirane ribe bakterija *L. monocytogenes* nije utvrđena (Tablica 1.). Također, prema rezultatima prikazanima u Tablici 2. vidljivo je da *L. monocytogenes* nije utvrđena niti u ribi uzorkovanoj u pogonima prerade ribe, prije otpreme na tržište, a jednako tako nije utvrđena u uzorcima ribe koja je potjecala iz ribarnica. Iako su drugi autori nalazili bakteriju *L. monocytogenes* u svježoj ribi ili u ribljim proizvodima – dimljenoj i mariniranoj ribi (Jeyasekaran i sur.,1996.; Dominguez i sur., 2001.; González-Rodríguez i sur., 2002.; Papadopoulos i sur., 2010.; Dimitijevic i sur., 2011.; Tocmo i sur., 2014.; Lakicevic i sur., 2015.) u našem je istraživanju njezin nalaz bio negativan.

Međutim, u uzorcima marinirane i dimljene ribe (Tablica 1.) utvrđena je *L. inocua.* Ovakav nalaz nalazi uporište u istraživanjima drugih autora koji su u ribljim proizvodima utvrdili bakteriju *L. inocua* (Jeyasekaran i sur., 1996.; Dominguez i sur., 2001.). Također, bakterija se veoma često utvrđuje zajedno s *L. monocytogenes,* a utvrđeni su atipični hemolitični sojevi veoma nalik na nju (Petran i Swanson, 199.3; Johnson i sur., 2004.; Moreno i sur., 2012.). Nalazi bakterije *L. inocua* u našem istraživanju nalaze uporište i u istraživanju Kuzmanović i sur. (2011.) koji su utvrdili *L. inocua* u 8,51 % pretraženih uzoraka ribe. Rezultati našeg istraživanja (Tablica 1.) govore u prilog činjenici da u pogonu prerade ribe dolazi do naknadne kontaminacije koja je prema Papandopoulosu i sur. (2010.) posljedica obrade ribe (evisceracija, uklanjanje škrga, čišćenje ljuske, filetiranje). Svakako ovakvi nalazi ukazuju na potreban oprez jer bakterije *L. inocua* u proizvodne pogone dospijeva na sličan način kao *L. monocytogenes.* Ubikvitarna je bakterija i može preživjeti ekstremne uvjete poput visoke pH vrijednosti, visoke i niske temperature, visoke koncentracije soli (Moreno i sur., 2012.). Veoma je bliska bakteriji *L. monocytogenes,* ali se ne smatra patogenom bakterijskom vrstom. Zasigurno bi trebalo istražiti izvor bakterije i način na koji ulazi u pogone prerade ribe. Ukoliko uzmemo u obzir istraživanja Vitta i sur. (2008.) i Sabanadesana i sur. (2000.) o utjecaju dima odnosno odabira pripravaka tekućeg dima te vremena dimljenja, vjerujemo da bi također trebalo obratiti pozornost i na parametre obrade fileta ribe dimom.

U uzorcima brisova s radnih površina (Tablica 3) i ruku djelatnika (n=40) *L. monocytogenes* utvrđena je samo u jednom slučaju (2,5 %), na radnoj površini na kojoj se riba eviscerira. *L. inocua* utvrđena je, međutim, u oba uzrokovanja u tri slučaja na radnim površinama obrade,

sortiranja i prerade ribe, odnosno na poziciji evisceracije, kontrole obrade ribe i na rukama radnika na operaciji filetiranja brancina (15 % pretraženih brisova). Nalaz bakterije *L. monocytogenes* ali i *L. inocua* na radnim površinama u pogonima prerade ribe (Tablica 3.) možemo sagledati u okvirima tvrdnje Papandopoulosa i sur. (2010.), te pretpostaviti da je onečišćenje marinirane i dimljene ribe s *L. inocua* posljedica nalaza bakterija u okolišu. Jørgensen i sur. (1998) su u svom istraživanju utvrdili da su u pogonu prerade dimljene ribe svi pretraženi uzorci bili pozitivni na *L. monocytogenes*. Činjenica da je u našem istraživanju utvrđena na radnim površinama a *L. monocytogenes* nije utvrđena u ribi ili proizvodima, ne znači da naknadna kontaminacija nije moguća u bilo kojoj daljnjoj proizvodnoj fazi obrade, soljenja, filetiranja ili dimljenja ribe. Tako i Miettinen i Wirtanen (2005.) navode da sirova riba može biti važan izvor onečišćenja opreme i uređaja što će rezultirati kontaminacijom proizvoda.

Slično rezultatima pretrage brisova u našem istraživanju, Lakicevic i sur. (2015.) su utvrdili da je 2,3 % uzoraka brisova iz proizvodnih pogona sadržavalo *L. monocytogenes*. Za razliku od našeg istraživanja, Dimitrijevic i sur. (2011) su u pogonima prerade ribe na radnim površinama i rukama djelatnika utvrdili *L. monocytogenes* u 7 od ukupno pretraženih 99 brisova (7,0 %). Autori su u drugom proizvodnom pogonu utvrdili *L. monocytogenes* u 3 od ukupno 66 uzoraka brisova (4,5 %).

Svakako da nalaz *L. monocytogenes*, jednako kao i nalaz *L. inocua* (Tablica 3.) na radnim površinama filetiranja, sortiranja, obrade ribe, kontrole obrade fileta i na rukama djelatnika radnika ukazuje na potrebu praćenja i kontrole higijene pogona. Naime, prema odredbama Pravilnika o učestalosti kontrole i normativima mikrobiološke čistoće objekta pod sanitarnim nadzorom (NN 137/09) obavlja se procjena mikrobiološke čistoće objekta za proizvodnju hrane. Broj uzoraka ovisi o vrsti i namjeni objekta, a mikrobiološka se čistoća procjenjuje na osnovi rezultata bakteriološke pretrage s obzirom na broj aerobnih mezofilnih bakterija i enterobakterija. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je dobra higijenska praksa narušena i svakako bi trebalo u skladu s preporukama smanjivanja nalaza listerija u proizvodnim pogonima (Gram, 2004.) pojačati čišćenje, pranje i dezinfekciju te uvesti bakteriološku pretragu ne samo gotovih proizvoda već i brisova u okvirima samokontrole. Kao ubikvitarna bakterija listerija može preživjeti u različitim okolišnim uvjetima, te se može skrivati u salamuri, strojevima za narezivanje, površinama za filetiranje ribe, radnim površinama, na podovima. Stoga naglašavamo napomene autora koji ističu da se programi dobre proizvodne i higijenske prakse moraju zasnivati na poduzimanju specifičnih uzorkovanja iz okoliša i

dokaza bakterija u pogonima kako bi se eliminirala iz proizvodnih pogona i površina koje dolaze u kontakt s hranom (Rorvik i sur., 1995; Autio i sur., 1999.; Bagge Ravn i sur., 2003; Dimitrijevic i sur., 2011).

O značenju bakterije *L. monocytogenes* govori i činjenica da je EU objavila u svom Službenom listu Odluku o financijskom programu praćenja prevalencije bakterije *Listeria monocytogenes* u određenoj gotovoj hrani koji treba provesti u državama članicama (Anon., 2010). U nastavku ćemo citirati uvodne točke iz Odluke na kojima počiva značenje pretrage hrane, a posebno ribe i proizvoda ribarstva na *L. monocytogenes:*

(5) U skladu s Uredbom Komisije (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu subjekti u poslovanju s hranom moraju u pogledu gotove hrane ispunjavati kriterije sigurnosti hrane za bakteriju *Listeria monocytogenes* u okviru dobre higijenske prakse i programa analize opasnosti i određivanja kritičnih kontrolnih točaka (HACCP).

(6) Izvješća EFSA-ECDC pokazala su da je najveći broj slučajeva neispunjavanja kriterija za bakteriju Listeria monocytogenes zabilježen u gotovim sirevima, gotovim proizvodima ribarstva i termički obrađenim mesnim proizvodima

(7) Ljudi su izloženi bakteriji *Listeria monocytogenes* uglavnom putem hrane. Prevalenciju bakterije *Listeria monocytogenes* i razinu kontaminacije tom bakterijom u gotovim proizvodima ribarstva, sirevima i termički obrađenim mesnim proizvodima potrebno je, stoga, procijeniti na usklađen i usporediv način kroz usklađeni program praćenja na razini maloprodaje u svim državama članicama.

Kako u uzorcima ribe *L. monocytogenes* nije utvrđena, prema odredbama Uredbe 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu (Anon., 2005.) i Vodiča o mikrobiološkim kriterijima za hranu (Anon., 2011.), pretraženi se uzorci svježe ribe i ribljih proizvoda mogu smatrati mikrobiološki ispravnima.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu bakteriološke pretrage uzoraka svježe ribe (brancin), dimljene (orada i brancin) i marinirane riba (orada i brancin) te brisova uzetih iz pogona prerade ribe možemo zaključiti sljedeće:

- Niti u jednom pretraženom uzorku ribe odnosno ribljih proizvoda nije utvrđena bakterija *L. monocytogenes.*
- U uzorcima mariniranih i dimljenih ribljih proizvoda utvrđena je bakterija *L. inocua*.
- U uzorcima brisova *L. monocytogenes* je utvrđena na radnoj površini operacije evisceracije ribe, dok je *L. inocua* utvrđena u tri slučaja na radnim površinama obrade, sortiranja i prerade ribe, odnosno na poziciji evisceracije, kontrole obrade ribe i na rukama radnika na operaciji filetiranja brancina.
- Prema odredbama propisa o mikrobiološkim kriterijima za hranu (Uredba 2073/2005) pretraženi se uzorci ribe i ribljih proizvoda mogu smatrati zadovoljavajućima jer ne sadrže bakteriju *L. monocytogenes.*
- Rezultati mikrobiološke pretrage brisova iz pogona prerade ribe ukazuju da je narušena higijena pogona i dobra higijenska praksa. Svakako bi trebalo u skladu s preporukama smanjivanja nalaza listerija u proizvodnim pogonima pojačati čišćenje, pranje i dezinfekciju te uvesti bakteriološku pretragu ne samo gotovih proizvoda već i brisova u okvirima samokontrole.

8. LITERATURA

1. Anonimno (2005): Uredbe Komisije (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu (SL L 338/1, 22. 12. 2005.)
2. Anonimno (2009): Pravilnik o učetalosti kontrole i normativima mikrobiološke čistoće u objektima pod sanitarnim nadzorom (NN 137/09).
3. Anonimno (2010): Odluka komisije od 5. listopada 2010 o financijskom doprinosu Unije za usklađeni program praćenja prevalencije bakterije *Listeria monocytogenes* u određenoj gotovoj hrani koji treba provesti u državama članicama (L 292/40, 10.11.2010.)
4. Anonimno (2011): Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu. 3. izmijenjeno izdanje. Ožujak 2011. Ministarstvo poljoprivrede.
5. Anonimno (2011a): Zaraze i otrovanja. Listerioza – infekcija koja vreba iz hrane, <http://www.plivazdravlje.hr>. Pristupljeno 23. siječnja 2016.
6. Anonimno (2015): Scientific report of EFSA and ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA Journal 13(1):3991
7. Anonimno (2015a): Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2014. godinu. Hrvatski zavod za javno zdravstvo Zagreb, 2015. Web izdanje [online] 307-311 <http://www.hzjz.hr>. Pristupljeno 17. siječnja 2016.
8. Autio T., S. Hielm, M. Miettinen, A.-M Sjoberg, K. Aarnisalo, J. Bjorkroth, T. Mattila-Sandholm, H. Korkeala (1999): Sources of Listeria monocytogenes contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. Appl. Environ. Microbiol. 65, 150–155
9. Bagge-Ravn D., K. Gardshodn, L. Gram, B. Fonnesbech Vogel (2003): Comparison of fog and foam sanitizing procedures in a salmon smokehouse with respect to the general hygienic level and survival of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 66, 592–598
10. Bubonja, M., D. Vučković, R. Rubeša-Mihaljević, M. Abram (2007): Činitelji bakterije i domaćina u patogenezi listerioze. Medicina 43,15-20
11. Bulushi, I.M., Poole, S.E., Barlow, R., Deeth, H.C and Dykes, G.A. (2010): Specation of Gram-positive bacteria in fresh and ambient –stored sub- tropical marine fish. International Journal of Food Microbiology. 138, 32-38.

12. Curtis, G. D. W., R. G. Mitchell, A. F. King, E. J. Griffin (1989): A selective differential medium for the isolation of. Listeria monocytogenes. Letters in Applied Microbiol. 8, 95 98.
13. Dalgaard, P. (2000): Fresh and lightly preserved seafood. In Shelf – Life Evulation of Food. C. M. D. Man and A. A. Jones, editors. Aspen Publisher Inc, London, U. K., pp 110 – 139.
14. Dimitrijević, M., R. C. Anderson, N. Karabasil, N. Pavličević, S. Jovanović, J. Nadaljeković trajlović, V. Teodorović, M. Marković, S. Dojčinović (2011): environmental prevalence and persistence of Listeria monocytogenes in cold-smoke trout processing plants. Acta Veterinaria (Beograd) 61,4, 429-442.
15. Dominguez, C., I. Gomez, J. Zumalacarregui (2001): Prevalence and Contamination Levels of *Listeria monocytogenes* in Smoked Fish and Pâté Sold in Spain. J. Food Protection 12, 2075-2077(3)
16. Doyle, M.P., J.L. Schoeni (1986): Selective enrichment procedure for isolation of *Listeria monocytogenes* from fecal and biologic specimens. Appl. Environ. Microbiol. 51, 1127-1129.
17. Favaro, M., L. Sarmati, G. Sancesario, C. Fontana (2014): First case of Listeria innocua meningitis in a patient on steroids and eternecept. JMM Case Reports 1-5. DOI 10.1099/jmmcr.0.003103
18. Fernandez, K., Aspe, E. and Roeckel, M. (2009): Shelf-life extension on fillets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using natural additives, superchilling and modified atmosphere packaging. Food Control. 20, 1036-1042.
19. Fonnesbech Vogel B., B. Ojeniyi, P. Ahrens, L. Due Skov, H.H. Huss, L. Gram (2001): Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. Appl. Environ. Microbiol. 68, 2586–2595
20. Fonnesbech Vogel B., L.V. Jørgensen, B. Ojeniyi, H.H. Huss, L. Gram (2001a): Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates found in cold-smoked salmon from different smoke houses assessed by randomly amplified polymorphic DNA analyses. Int. J. Food Microbiol. 65, 83–92
21. Gasanov, U., D. Hughes, P. M. Hansbro (2005): Methods for the isolation and identification of Listeria spp. and Listeria monocytogenes: a review. FEMS Microbiology Reviews 29, 851-875.

22. Geornaras, I., P. N. Skandamis, K. E. Belk, J. A. Scanga, P. A. Kendall, G.C. Smith, J. N. Sofos (2006): Post-processing application of chemical solutions for control of Listeria monocytogenes, cultured under different conditions, on commercial smoked sausage formulated with and without potassium lactate–sodium diacetate. Food Microbiol. 23, 762-771
23. Giuffrida, A., G. Ziino, G. Orlando, A. Panebianco (2007): Hygienic evaluation of marinated sea bass and challenge test for Listeria monocytogenes. Vet. Res. Commun., 31: 369-371.
24. Golden, D. A., R. E. Brackett, L. R. Beuchat (1990): Efficacy of direct plating media for recovering *Listeria monocytogenes* from foods, Int. J. Food. Microbiol. 10, 143–156.
25. Gombas, D.E., Y. Chen, R.S. Clavero, V.N. Scott (2003): Survey of Listeria monocytogenes in Ready-to-Eat Foods. J. Food Prot. 66, 570–577
26. González-Rodríguez M.N., J.J. Sanz, J. A. Santos, A. Otero. M.L. García-López (2002): Foodborne pathogenic bacteria in prepackaged fresh retail portions of farmed rainbow trout and salmon stored at 3°C. Int J Food Microbiol 76:135–141
27. Goulas, A.E. and Kontominas, M:G: (2007): Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. Food Chemistry. 100, 287-296.
28. Gram, L. and Huss, H.H. (2000): Fresh and processed fish and shellfish. In the Microbiological Safety and Quality of Food. B. M. Lund, A. C. Baird – Parker and G. W. Gould, editors. Chapman and Hall., London, U. K., pp 472-506.
29. Gram, L. and Dalgaard, P. (2002): Fish spoilage bacteria problems and solutions. Current Opinion in Biotechnology. 13, 262 – 266.
30. Gram, L. (2004): How to meet an FSO – Control of Listeria monocytogenes in the smoked fish industry. Mitt. Lebensm. Hyg. 95, 59–67
31. Helwigh B., H. Korsgaard, A.J. Grønlund, A. H. Sørensen, A. Nygaard Jensen, J. A., Boel J., Borck Høg B. (2012): External scientific report. Microbiological contaminants in food in the European Union in 2004-2009. Technical University of Denmark. Supporting Publications 2012: EN-249. [259 pp.]
32. Huss, H.H. (1995): Quality and quality changes in fresh fish. FAO. Fisheries Technical Paper No 348. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy. pp. 195-202.

33. Jeyasekaran, G., I. Karunasagar, I. Karunasagar (1996): Incidence of Listeria spp. in tropical fish. Int. J. Food Microbiol. 31, 1–3, 333–340
34. Johnson, J., K. Jinneman, G. Stelma, B.G. Smith, D. Lye, J. Messer, J. Ulaszek, L. Evsen, S. Gendel, R.W. Bennet, B. Swaminathan, J. Pruckler, A. Steigerwalt, S. Kathariou, S. Yildirim, D. Volokhov, A. Rasooly, V. Chizhikov, M. Wiedmann, E. Fortes. R.E. Duvall, A.D. Hitchins (2004): Natural atypical Listeria innocua strains with Listeria monocytogenes pathogenicity island 1 genes. Appl Env Microbiol 70, 4256–4266.
35. Jørgensen L.V. H.H. Huss (1998): Prevalence and growth of Listeria monocytogenes in naturally contaminated seafood. Int. J. Food Microbiol. 42, 127–131
36. Kimura, B., Yoshiama, T., and Fujii, T. (1999): Carbon dioxide inhibited of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* on a pH adjusted surface in model system. Journal of Food Science. 64, 367-370.
37. Kuzmanović, J., R. Ašanin, M. Baltić, D. Mišić. M. Dimitrijević, M. Stojanović, N. Ašanin I. Kovačević (2011): Prisustvo Listerija vrsta u uzorcima riba, proizvoda od ribe i morskih plodova. Acta veterinaria 61, 2-3, 193-203, doi:10.2298/AVB1103193K
38. Lakicevic, B., T. Baltic, V. Jankovic, B. Velebita, M. Dimitrijevic, N. Parunovic, D. Milicevic (2015): Occurrence of Listeria monocytogenes in a Serbian salmon and seafood processing line during 2013. Procedia Food Science 5, 156 – 159
39. Lunestad, B.T., T.T.T. Truong, B.A. Lindstedt (2013): A multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) of Listeria monocytogenes isolated from Norwegian salmon-processing factories and from listeriosis patients. Epidemiol. Infect. 141, 2101–2110.
40. Merman, D. (2014): Food Born Illnesses, *Listeria*, MERMAN Law Firm, P. C. <http://thefoodpoisoninglawyers.com>. Pristupljeno 23. siječnja 2016.
41. Marler, B. (2010): Haifa Smoked Fish Recalled Due to Listeria monocytogenes. http://www.listeriablog.com/listeria-recalls/haifa-smoked-fish-recalled-due-to-listeria-monocytogenes/#.UNECHuRX2up; dostupno 23.1.2016.
42. Masniyom, P. (2011). Deterioration and shelf-life extension of fish and fishery products by modified atmosphere packaging. Songklanakarin J. Sci. Technol. 182 33 (2), 181-192
43. Masniyom, P., S. Benjakul, S. W. Visessanguan (2006): Synergistic antimicrobial effect of pyrophosphate on Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157 in modified packaged and refrigerated seabass slices. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie – Food Science and Technology. 39, 302-307.

44. Masniyom, P. and Benjama, O. (2007): Effect of lactic, acetic and citric acids on quality changes of refrigerated green mussel, *Perna viridis*. Songklanakarin Journal of Science and Tehnology. 29, 1123-1134.
45. Miettinen H., G. Wirtanen (2005): Prevalence and location of Listeria monocytogenes in farmed rainbow trout. Int J Food Microbiol 104, 135–143
46. Moreno, L. Z., R. Paixao, D.D. Gobbi, D. C. Raimundo, T.P. Ferreira, E. Hofer, M.H. Matte, A.M. Moreno (2012): Characterization of atypical Listeria innocua isolated from swine slaughterhouses and meat markets. Res Microbiol 163, 268–271.
47. Norton D., K. McCamey, J. Gall, K. Scarlett, M. Boor, M. Wiedmann (2001): Molecular studies on the ecology of Listeria monocytogenes in the smoked fish processing industry. Appl. Environ. Microbiol. 67, 198–205 (2001)
48. Okuzumi, M., Fukumoto, I. and Fuji, T. (1990): Changes in bacteria flora and polyamine contents during storage of horse mackerel meat. Nippon Suisan Gakkaishi. 56, 1307 – 1312.
49. Papadopoulos T., A. Abrahim, D. Sergelidis, I. Kirkoudis, K. Bitchava (2010): Prevalence of Listeria spp. in freshwater fish (Oncorhynchus mykiss and Carassius gibelio) and the environment of fish markets in Northern Greece. J Hell Vet Med Soc 61:15–22
50. Pereira de Abreu, D. A., Paseiro Losada, P., Maroto, J. and Cruz, J.M. (2010): Evulation of the effectiveness of a new active packing film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Food Research International. 43, 1277 – 1282.
51. Perrin, M., M. Bremer, C. Delamare (2003): A fatal case of Listeria innocua bacteremia. J Clin Microbiol 41, 5308–5309.
52. Petran, R.L., K. M. J. Swanson (1993): Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. J. Food Prot. 56, 616-618.
53. Pothuri, P., Marshell, D.L. and McMILLIN, K.W. (1995): Combined effect of packaging atmosphere and lactic acid on growth and survival of *L.monocytogenes* in crayfish tail meat at 4°C. Journal of Food Protection. 59, 253-256.
54. Ravi-Sankar, C.N., Lalitha, K.V., Jose, L., Manju, S. and Gopal, T.K.S. (2008): Effect of packaging atmosphere on the microbial attributes of pearlspot (*Eltroplus suratensis Bloch*) stored at 0-2°C. Food Microbiology. 25, 518-528.
55. Reinitz, G.L. (1983): Relative effect of age, diet, and feeding rate on the body composition of young Rainbow trout (Salmo gairdneri). Aquaculture 35, 19-27.

56. Rorvik L., D. Caugant, M. Yndestad (1995): Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. Int. J. Food Microbiol. 25, 19–27
57. Restuccia, D., Spizzirri, G.U., Parisi, I.O., Cirillo, G.,Curcio, M.,Iemma, F.,Puoci, F.,Vinci, G. and Picci, N. (2010): New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. Food Control. 21, 1425-1432.
58. Sabanadesan, S., A.M. Lammerding, M.W. Griffiths (2000): Survival of Listeria innocua in Salmon following Cold-Smoke Application. J. Food Prot. 6, 715-720
59. Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K. and Rosnes , J.T. (2002): A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products-significance of microbial growth, activities and safety. International Journal of Food Science and Technology. 37, 107-127.
60. Skjerdal, T., E. Reitehaug, K. Eckner (2014): Development of performance objectives for *Listeria monocytogenes* contaminated salmon (*Salmo salar*) intended used as sushi and sashimi based on analyses of naturally contaminated samples. Int. J. Food Microbiol. 184, 8-13.
61. Šoša, B. (1989): Higijena i tehnologija prerade morske ribe. Školska knjiga, Zagreb, 1989.
62. Tocmo R., K. Krizman, W.J. Khoo, L.K. Phua, M. Kim, H.G. Yuk (2014): Listeria monocytogenes in vacuum-packed smoked fish products: occurrence, routes of contamination, and potential intervention measures. Compr Rev Food Sci F13:172–189
63. Van Netten, P., A. Perales, A. van der Moosdijk, G. D. W. Curtis, D. A. A. Mossel (1989): Liquid and solid selective differential media for the detection and the enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. Int. J. Food Microbiol. 8, 299–316.
64. Vitt, S.M., B.H. Himelbloom, C.A. Crapo (2007): Inhibition of Listeria innocua and L. monocytogenes in a laboratory medium and cold-smoked salmon containing liquid smoke. J. Food Safety 21, 111-125
65. Zaika, L., Scullen, O.J. and Fanelli, J. (1997): Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by sodium polyphosphate as affected by polyvalent metal ions. Journal of Food Science. 62, 867-869.
66. Žlender, B. (2000): Morske in slatkovodne ribe. Sestava in kakovost mesa rib. Meso in mesnina, 1, 1:42-43

OBJAŠNJENJE KRATICA KORIŠTENIH U TEKSTU:

ALOA – Agosti and Ottaviani Listeria Agar

a_w – aktivitet vode

EFSA – European Food Safety Agency

EU – Europska unija

FDA – Food and Drug Administration

FSO – Food Safety Objective

HACCP – Hazard Analysisi Critical Control Points

MAP – Modified Atmosphere Packaging

RASFF – Rapid Alert System for Food and Feed

RTE – Ready To Eat

SPH – Subjekt u poslovanju s hranom

WHO – World Health Organisation

ŽIVOTOPIS AUTORA

Jelena Rožman rođena je 10.12.1990. u Zagrebu. Nakon osnovnoškolskog obrazovanja (osnovna škola Bistra) upisuje srednju Prehrambeno-tehnološku školu u Zagrebu, smjer tehničar nutricionist. 2009. godine upisuje Agronomski fakultet, smjer Agroekologija a 2013. godine obranom završnog rada pod naslovom „Masne kiseline mlijeka kao komponenta funkcionalne hrane“ završava preddiplomski sveučilišni studij i stječe zvanje sveučilišne prvostupnice (baccalaurea) / inženjerka agroekologije. 2013. godine upisuje diplomski studij na istom fakultetu, smjer Agroekologija - usmjerenje Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi. Živi u Gornjoj Bistri blizu Zaprešića.