

Bakteriološka kvaliteta ribe iz rijeke Save: izolacija i karakterizacija *Staphylococcus aureus* iz tkiva klena (*Squalius cephalus*)

Kapetanović D., Kurtović B., Valić D.,
Vardić Smrzlić I., Teskeredžić Z., Teskeredžić E.

Institut Ruđer Bošković, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za
akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama



7. Međunarodni gospodarsko - znanstveni skup
HRVATSKO RIBARSTVO NA PRAGU EU
Riba kao funkcionalna hrana Vukovar 7.-9.4.2011.



Bakterije i trovanja hranom

- Trovanje hranom obuhvaća sva oboljenja uzrokovana uzimanjem nezdrave, pokvarene ili otrovne hrane
- Alimentarne toksikoinfekcije: trovanja hranom koja je zagađena bakterijama i/ili njihovim toksinima (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*)
- Salmoneloza prava zaraza hranom koja sadrži žive bakterije *Salmonela*

Staphylococcus aureus

značajke mikroorganizma

- Član porodice *Staphylococcaceae*
- Gram pozitivni, kuglaste stanice (0,8 - 1,0 μm), nepravilne nakupine nalik grozdovima
- Nepokretni
- Nesporotvorni
- Mezofilni (10°C - 42°C)
- Fakultativno anaerobni rast
- Primarni rezervoar životinje i ljudi (koža i sluznice), namirnice, tlo, prašina i voda
- Uvjetno patogeni

Staphylococcus aureus

značajke mikroorganizma

- Rast na hranjivom bujonu, serumskom ili krvnom agaru
- Nakon diobe stanice u nepravilnim grozdolikim nakupinama
- Kolonije za 24 h promjera 2 – 4 mm
- Tvore pigment krem do žuto-narančast
- Proizvodi enzime: koagulazu, DN-azu, stafilokinazu (fibrinolizin), hemolizin α i β , β -laktamazu, dermonekrotoksin, leukocidin
- Enterotoksini: A, B, C1, C2, D i E
- Termostabilni i otporni na proteolitičke enzime
- Riba bogata proteinima
- Proteoliza podupire rast *S. aureus*

Staphylococcus aureus značajke intoksikacije

- Pravi uzročnik trovanja hranom
- Rast *S. aureus* ne uzrokuje promjene boje, mirisa, okusa i strukture mišićja ribe
- Toksin je termostabilan
- Simptomi za 4-6 h nakon jela
- Glavobolja, mučnina, povraćanje, bolovi u trbuhu, proljev
- Često prođu neevidentirane

Staphylococcus aureus značajke intoksikacije

■ Stafilokokne intoksikacije u Europi

- **Velika Britanija (1969-1990)**
 - 53% meso, špek
 - 22% perad
 - 8% mlijeko i mliječni proizvodi
 - **7% riba i školjkaši**
 - 3,5% jaja
- **Francuska (1999-2000)**
 - 32% mlijeko i sirevi
 - 22% meso
 - 15% kobasice
 - **11% riba**
 - 11% jaja
 - 9,5% perad

(Wieneke i sur., 1993. *Epidemiol. Infect.*)

(Haeghebaert i sur., 2002. *Bull. Epidémiol. Hebdo.*)

Staphylococcus aureus značajke intoksikacije

- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1986): Granična vrijednost *S. aureus* u svježoj ribi $< 10^3$ CFU/g
(Microorganisms in Foods 2: Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications)
- RH: Pravilnik o mikrobiološkim standardima za namirnice (NN 46/94, 20/91, 40/01, 125/03, 32/04):
 - Granična vrijednost *S. aureus* u
 - Svježoj i smrznutoj ribi (u komadima težim od 0,5 kg) $< 10^2$ CFU/g
 - Svježoj i smrznutoj ribi (u komadima do 0,5 kg) 0 CFU/g

Klen (*Squalius cephalus*)

- Uobičajena vrsta u Europi
- Živi u rijekama, jezerima i bočatoj vodi
- Rasprostranjen od pastrvskih do šaranskih voda
- Hrani se:
 - algama
 - biljem
 - sjemenkama palim u vodu
 - mekušcima
 - ljuskarima
 - ličinkama kukaca
 - manjim ribama
- Mišićno tkivo uzorkovano kod 90 klenova na 5 lokacija u travnju i rujnu



Lokacije uzorkovanja



Mikrobiološka pretraga vode

- Mikrobiološki pokazatelji
- Heterotrofne bakterije
 - Yeast Extract Agar (HR EN ISO 6222:2000) 22°C/3-5 dana; 35°C/24 h; CFU/mL
- Ukupni koliformi
 - Colilert (IDEXX) 35°C/24 h; NBB/100 mL
- *Escherichia coli*
 - Colilert (IDEXX) 35°C/24 h; NBB/100 mL
- Enterokoki
 - Enterolert (IDEXX) 41°C/24 h; NBB/100 mL



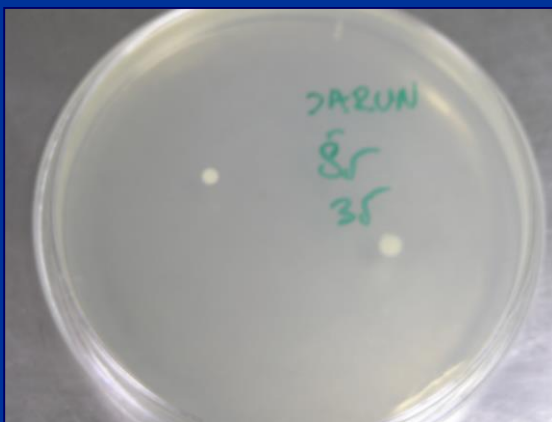
Bakteriološka pretraga tkiva klena

- Neposredno po uzorkovanju uzet je bris s kože/škrga za određivanje broja heterotrofnih bakterija na koži/škragama
- Bris 1 cm² kože/škrga sa sterilnim štapićem



Bakteriološka pretraga tkiva klena

- Resuspendirano u 10 ml Ringerove otopine (Pliva) i serijski razrijeđeno
- Inkubirano na Yeast Extract Agar (HR EN ISO 6222:2000) 22°C/3-5 dana; 35°C/24 h; CFU/cm²



Bakteriološka pretraga tkiva klena

- cca. 5 g mišića ribe aseptično izrezano
- Skupni uzorak 25 g mišića i 225 mL PBS-a (Merck)
- Homogenizacija tvrdim ručnim valjkom 5 min.
- Serijska razrjeđenja



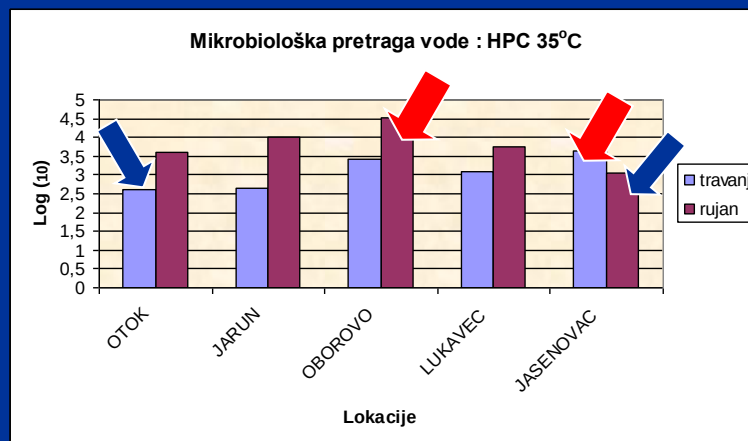
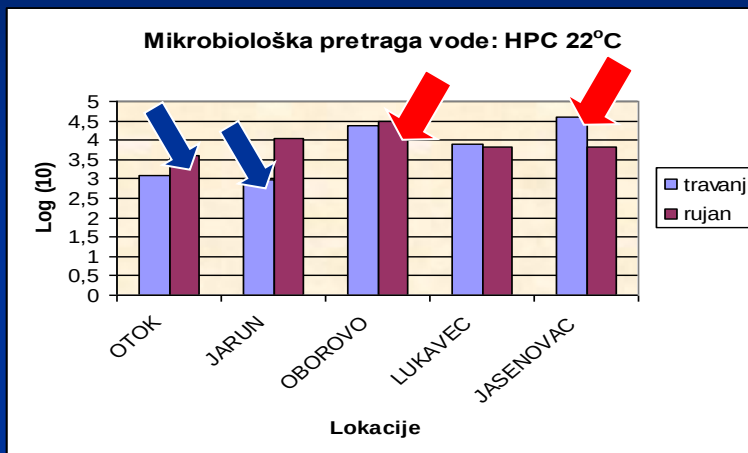
Bakteriološka pretraga tkiva klena

- Brojanje na Baird-Parkerovom agaru (HRN EN ISO 6888-1:2004)
- Inkubacija na 35°C/24-48 h
- Tipične sivo-crne kolonije, CFU/g
- Identifikacija API Staph (Bio Mérieux)



Rezultati

Mikrobiološka pretraga vode

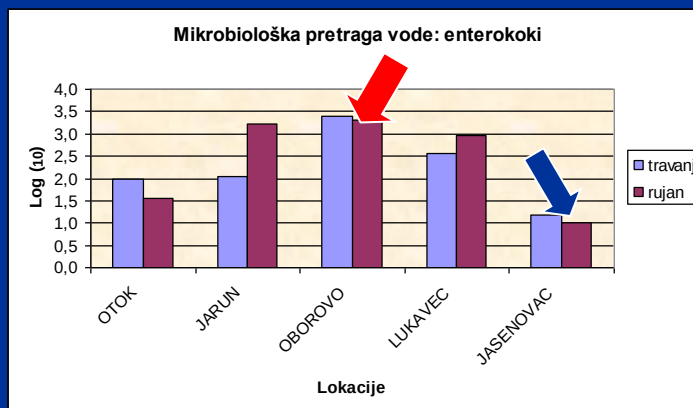
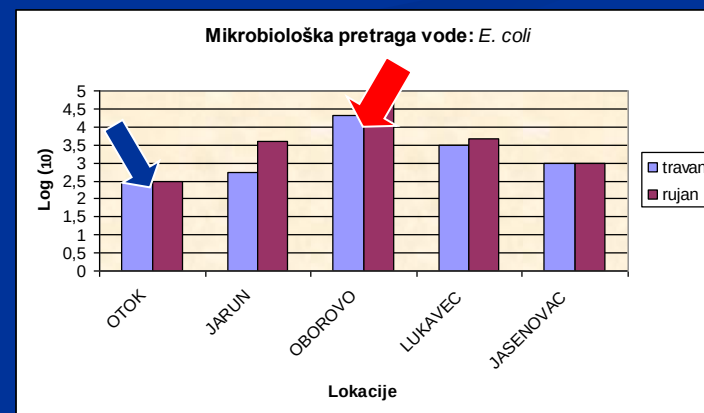
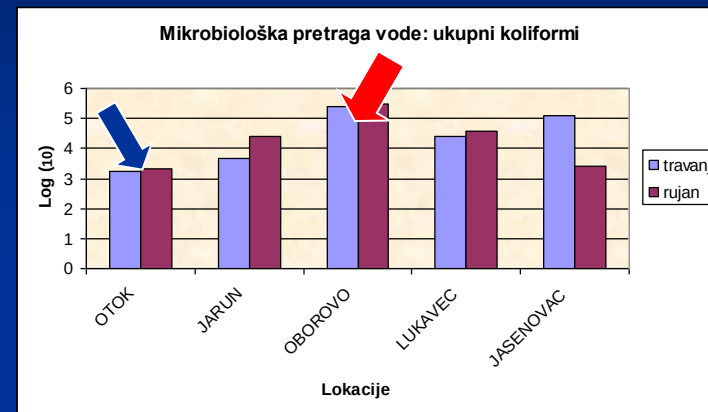


- Broj heterotrofnih bakterija (HPC) na 22°C i 35°C: razlika između lokacija i mjeseca uzorkovanja je nepravilna
- HPC 22°C u travnju najveći na Jasenovcu, a najmanji na Jarunu
- HPC 22°C u rujnu najveći na Oborovu, a najmanji na Otoku
- HPC 35°C u travnju najveći na Jasenovcu, a najmanji na Otoku
- HPC 35°C u rujnu najveći na Oborovu, a najmanji na Jasenovcu
- Razlika između dva uzorkovanja nije bila značajna

Rezultati

Mikrobiološka pretraga vode

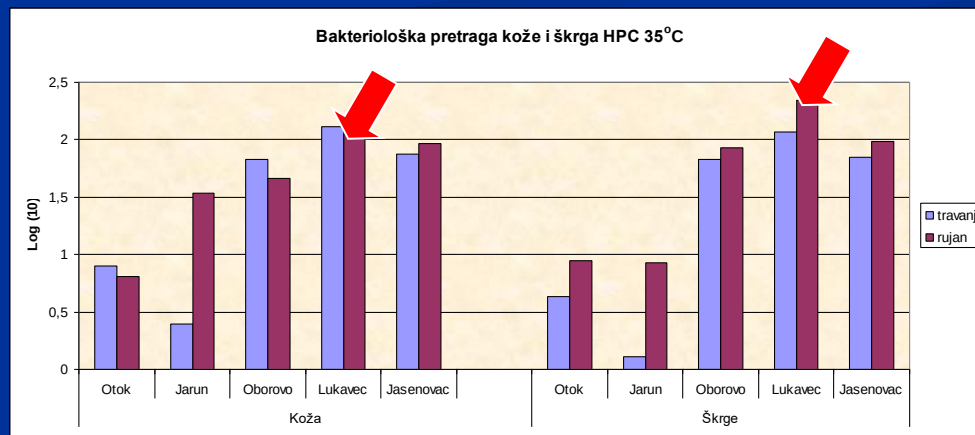
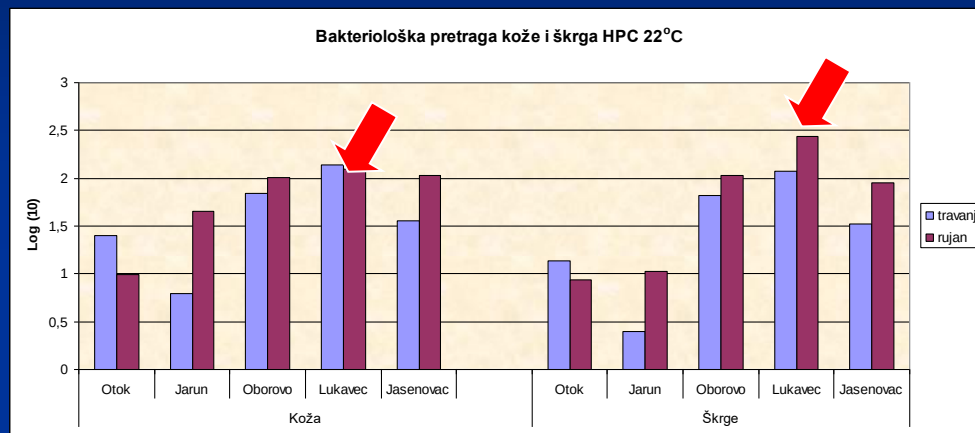
- Oborovo je lokacija s najvećim vrijednostima sva tri fekalna pokazatelja u oba uzorkovanja
- Na lokaciji Otok utvrđene su najmanje vrijednosti koliforma i *E. coli*, a na Jasenovcu enterokoka
- Koncentracije fekalnih koliforma $10^3/100$ mL mogućnost akumulacije i penetracija patogena u ribe je mala (Ampofo i Clerk, 2003. *Aquacult. Res.*)



Rezultati

Bakteriološka pretraga tkiva klena

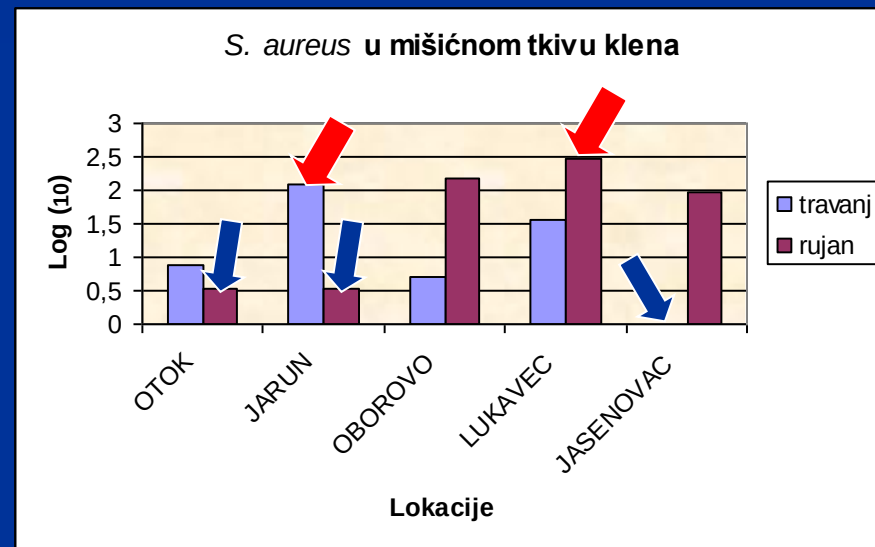
- Najveće nakupljanje heterotrofnih bakterija (HPC) na obje temperature inkubacije je na lokaciji Lukavec na koži i škrigama u travnju i rujnu



Rezultati

Bakteriološka pretraga tkiva klena

- U travnju najveći broj *S. aureus* utvrđen je u mišićnom tkivu klena lokacija Jarun (125 CFU/g), a najmanje na lokaciji Jasenovac (1 CFU/g)
- U rujnu najveća i maksimalna vrijednost *S. aureus* utvrđena je na lokaciji Lukavec (300 CFU/g), a najmanje na Otoku i Jarunu (3 CFU/g)



Zaključak

- Utvrđene vrijednosti *S. aureus* u mišićnom tkivu klena ne prelaze preporučene granične vrijednosti $< 10^3$ CFU/g u svježoj ribi (ICMSF, 1986)
- Rezultati mikrobiološke pretrage mišićnog tkiva klena iz rijeke Save pokazali su da analizirani uzorci ne zadovoljavaju odredbe Pravilnika o mikrobiološkim standardima za namirnice u svježoj i smrznutoj ribi (u komadima do 0,5 kg) 0 CFU/g (NN 46/94, 20/91, 40/01, 125/03, 32/04)

Zaključak

- Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/08):
 - Članak 11.
Danom stupanja na snagu ovoga Pravilnika, prestaje važiti Pravilnik o mikrobiološkim standardima za namirnice (NN 46/94, 20/01, 40/01, 125/03, 32 /04)
- Uzorci mišićnog tkiva klenova iz rijeke Save nisu opasni po ljudsko zdravlje



Hvala na pažnji

ZAHVALA

Ovo istraživanje je dio EU Framework 6 project: Sava River Basin: Sustainable Use, Management and Protection of Resources (contract no. INCO-CT-2004-509160)

<http://www.irb.hr/hr/str/zimo/laboratoriji/lira/>

