

Povrće i voće kao vehikulumi salmoneloza

Siniša PAVIĆ¹, dr. sc., dr. vet. med.
Mladen SMOLJANOVIĆ¹, dr. med., spec.
 epidemiolog
Darko ROPAC¹, prof. dr. sc., spec.
 epidemiolog
Danja LAŠTRE¹, dipl. ing. biotehnologije
Elizabeta CETINIĆ¹, mr. sc., dipl. ing.
 biotehnologije
Mirza HADŽIOSMANOVIĆ², prof. dr. sc.,
 dr. vet. med.
Branimir MIOKOVIĆ², prof. dr. sc., dr. vet.
 med.
Lidija KOZAČINSKI², doc. dr. sc., dr. vet.
 med.

- 1) Zavod za javno zdravstvo Županije splitsko-dalmatinske, Split, Hrvatska
 2) Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagren, Hrvatska

Ključne riječi

Salmonella spp. u povrću i sjemenju

Key words

Salmonella spp. in vegetables and seeds

Primljeno: 2005–03–10

Received: 2005–03–10

Prihvaćeno: 2005–03–17

Accepted: 2005–03–17

Uvod

Višegodišnja epizootiološko-epidemiološka istraživanja salmoneloza ukazuju da su temeljni vektori prijenosa ovih patogena u lanac ljudske prehrane nedvojbeno namirnice animalnog podrijetla. Na prvom mjestu svakako valja spomenuti piletinu, kao i meso peradi

općenito, konzumna jaja, svinjetinu, odnosno jela pripremljena od ovih sirovina [1, 2].

Nažalost, istraživanja ovog problema u posljednjih desetak godina ukazuju na neke nove, dosada nepoznate mogućnosti adaptacije ovih mikroorganizama na namirnice biljnog podrijetla (primarno povrće) koje su više puta bile vehikulumi salmoneloza.

Stručni članak

U ovom radu izneseni su podaci o rezultatima višegodišnjeg praćenja salmoneloza kojima su vektori bili kontaminirano povrće, sjemenke, klice i voće. Najpoznatije epidemije u SAD-u i Zapadnim zemljama javile su se kao posljedica kontaminacije klica alfalfa (lucerna – djetelina sedmača), rajčica, salate, kikirikija, lubenica, dinja, riže i sl. Uobičajeno mišljenje kako salmonele kontaminiraju povrće i voće samo površinski, napušteno je u svjetlu otkrića da ovi mikroorganizmi, kao i drugi patogeni mogu penetrirati u stabljiku, lišće i plodove kroz neoštećeni korjenski sustav ali i zbog oštećenja ovih struktura. Istraživanja su pokazala da je na molekularnoj razini potreban sustav TTSS efektorskih proteinskih molekula pomoću kojega različiti patogeni prodiru kroz neoštećeni korjenski sustav u biljku. U fazi klijanja sjemena, zbog otpuštanja hranjivih spojeva, bakterijski biofilm na sjemenju i klicama može postići invazivne koncentracije od 10^6 – 10^7 CFU/g biljne mase. Temeljni je izvor patogena u poljoprivrednoj proizvodnji kontaminirana voda, pa se preporučuju postupci njenog kondicioniranja prije navodnjavanja poljoprivrednih kultura, ali i postupci dezinfekcije voća i povrća koje se konzumira bez termičke obrade i to uranjanjem u otopine Na hipoklorita, H_2O_2 i sl.

Fruit and vegetables as vehiculi of salmonellosis

Professional paper

The results of a long term study of salmonellosis caused by contaminated vegetables, seeds, sprouts and fruit have been reported in the paper. The most famous outbreaks in the USA and the Western countries resulted from the contaminated alfalfa sprouts, tomatoes, cantaloupe, lettuce, peanuts, etc., were described. Common opinion that *Salmonella* can be found only on the surfaces of fruit and vegetables has recently been abandoned due to the discovery of the fact that *Salmonella* as well as the other pathogenic microorganisms can penetrate stem, leaves and fruites of the plant through both damaged and undamaged roots. Molecular researches have proved that type III protein secretion system (TTSS) is necessary to the pathogenic microorganisms while penetrating the undamaged roots of the plant. During the phase of seed germination, nutrients are released enabling the bacterial biofilm on seeds and sprouts to reach the invasive concentrations of 10^6 – 10^7 CFU/g of sprouts biomass. The main source of pathogenic microorganisms in agriculture is, obviously, contaminated water so the procedure of its conditioning prior to the irrigation together with the disinfection of fruit and vegetables using Na hypochlorite or H_2O_2 has been strongly suggested.

Epidemiološki podaci

Saznanja da povrće i voće mogu biti vektori salmoneloza nisu nova već sežu do 1960-ih godina prošlog stoljeća. Navođenje svih do sada poznatih epidemija salmoneloza, kojima su vehikulumi bile namirnice biljnog podrijetla, izlazilo bi iz okvira ovog članka, pa ćemo u daljem prikazu iznijeti podatke o najpoznatijim epidemijama u posljednjih desetak godina, a koje su ne-
dvojbeno vezane uz povrće.

Klice alfalfa

Alfalfa klice (lucerna – djetelina sedmača) u više su navrata bile vehikulom salmoneloza, osobito u SAD, u kojima je, za razliku od naše zemlje, konzumacija svježih sirovih klica uobičajena. Tijekom jeseni 1995. na području 6 saveznih država SAD, a osobito u prosincu iste godine u Oregonu i Britanskoj Kolumbiji (Kanada), registrirana su 133 oboljela kod kojih je iz uzorka stolice izolirana *S. enterica* serotip *newport* (*S. newport*). Isti serotip izoliran je iz šarže alfalfa klica koje su se u tom periodu nalazile na tržištu. Sojevi *S. newport* bili su izolirani prema molekularnom profilu određenom gel elektroforezom u pulsirajućem polju (PFGE), neodvojivi od sojeva izoliranih iz suspektnih klica. Nakon povlačenja inkriminirane šarže iz prometa, epidemija je prestala. Ova otkrića ukazala su na pitanje neriješenog vehikuluma salmoneloze iz 1973. Isti vehikulum bio je odgovoran za pojavu epidemije u Finskoj tijekom 1980-ih i 1990-ih. Valja naglasiti da su ove epidemije pobudile relativno malo pažnje epidemiologa u smislu spoznaje da klice alfalfa mogu biti vehikulumi ovih patogena. Tijekom 1995. na području Skandinavije izbila je šira epidemija ovim vektorom koja je pobudila znatno više pažnje. Iste godine izbila je na području Sjeverne Amerike poznata epidemija sa *S. stanley*, koja je prethodila ranije spomenutoj epidemiji sa *S. newport*. Procjenjuje se da je ovom prilikom *S. newport* inficirala više od 20 000 ljudi [3].

Od veljače do ožujka 2001. »Odjel za zdravstvo« države Kalifornije registrirao je epidemiju (23 oboljela) izazvanu sa *S. kottbus*. I ovom prilikom vehikulum su bile klice alfalfa uvezene iz Australije tijekom studenog 2000. godine. Usporedba kliničkih izolata *S. kottbus* sa sojevima iz uskladištene šarže klica PFGE tehnikom pokazala su da se radi o identičnom uzročniku [3a].

Svježe rajčice

U posljednjih desetak godina u svijetu je registrirano nekoliko značajnih epidemija salmoneloza u kojima su kao vehikulum bile dokazane sirove rajčice. Odjeli za zdravstvo država Illinois, Michigan, Minnesota i Wisconsin registrirali su širu epidemiju izazvanu salmonelama tijekom 1990. (*S. javiana*/176 oboljelih), odnosno 1993. (*S. montevideo*/100 oboljelih). U oba slučaja vehikulum su bile sirove rajčice podrijetlom iz

pakirnice povrća u Južnoj Karolini u kojoj je povrće prije pakiranja uranjano u zajednički bazen s vodom [3b].

Od prosinca 1998. do veljače 1999. *S. bairdii* bila je uzrokom epidemije, koja je zahvatila ukupno 15 grofovija države Kalifornije, ali i 7 drugih saveznih država SAD. I ovom su prilikom sirove rajčice bili dokazani vehikulum epidemije [3c].

S. javiana bila je uzrokom epidemije među učesnicima sportskih igara osoba s transplantiranim organima u Orlando na Floridi tijekom lipnja 2002. (141 oboljeli iz 32 savezne države SAD). I ovom su prilikom kao inkriminirane namirnice dokazane svježe rajčice narezane na kockice [3d].

Ostalo povrće i voće

Krajem ljeta 2001. izbila je epidemija međunarodnih razmjera sa *S. stanley* i sa *S. newport* u Australiji, Kanadi i Velikoj Britaniji. Oba uzročnika izolirana su iz neotvorenih pakiranja Shandong kikirikija u Australiji i Kanadi, kao i kikirikija s aromom luka u Engleskoj. Obje šarže kikirikija potjecale su iz Kine, a na tržište su izvezene preko Singapura. Iz neotvorenih pakiranja kikirikija u Kanadi izolirana je i *S. lexington*, na sreću, bez obolijevanja konzumenata [3e, 3g].

U periodu travanj–svibanj 2000. u Kaliforniji, Washingtonu, Nevadi, Novom Meksiku, Oregonu i Koloradu registrirana je epidemija sa *S. poona* (47 oboljelih). Tom prilikom su vehikulum bile rebraste dinje, podrijetlom iz Meksika. Isti je uzročnik bio odgovoran za širu epidemiju iz perioda ožujka i svibnja 2002. u nizu saveznih država SAD i Kanadi.

Kao i u prethodnoj epidemiji, vehikulum su bile rebraste dinje iz Meksika [3f].

Od ostalih namirnica biljnog podrijetla, kazuistika salmoneloza navodi ljutike, maline, rotkvice, salatu i lubenice [4]. Pored salmonela povrće i voće nerijetko je bilo vehikulumom *E. coli* O157:H7, šigela i *Bacillus cereus*.

Mehanizam invazije biljnog tkiva

Uobičajeno je mišljenje, da je unutrašnjost zdravog i neoštećenog voća i povrća načelno sterilna. Kao suprotnost ovakvim stavovima već je duže vrijeme poznato da endofitske bakterije perzistiraju u brojnim vrstama biljnog tkiva [5].

Proučavajući 10 vrsta voća i povrća Samish i sur. već su 1962. dokazali da određene vrste bakterija, primarno pseudomonade i enterobakterije, perzistiraju u unutrašnjosti zdravih neoštećenih sirovih krastavaca i rajčica [6]. Istraživanja su, naime, pokazala da *Ralstonia solanacearum*, koja inače izaziva bakterijsko uvenuće rajčica, kroz korijenski sustav ulazi u biljku, prodire kroz ksilem, te sistematski kolonizira stabljiku [6].

Nadalje je dokazano da *Pseudomonas syringae*, inače uzročnik bakterijske pjegavosti rajčica, obitava u trihomi- ma lišća [5].

Posebno su instruktivna otkrića Hara-Kudoa i sur. te Itoha i sur. koji su, proučavajući kontaminaciju klica rotkvica s *E. coli* O157:H7 nakon velike epidemije među školskom djecom u Japanu, nedvojbeno utvrdili da je uzročnik iz kontaminirane vode prodro u klice rotkvica kroz korijenski sustav. Naime, iako su klice servirane kao salata bile propisano oprane u kloriranoj vodovodnoj vodi, a soj patogena izoliran iz uzoraka pacijenata nije mogao preživjeti koncentraciju rezidualnog klora, ipak je došlo do velike epidemije s oko 6000 oboljele školske djece. Jedino prihvatljivo objašnjenje bio je prodor patogena u unutrašnjost klica iz vode za navodnjavanje, što su autori uporabom fluorescirajućih proteina ugrađenih u inkrimirani soj, nedvojbeno dokazali [7, 8].

Istraživanja Baraka i sur. po pitanju razlika u adherenciji *S. enterica* i *E. coli* O157:H7 na klice alfalfa ukazuju da različiti sojevi *S. enterica* brže i lakše adheriraju na ove klice od *E. coli* O157:H7. Ponovljenim pranjem klica sojevi *E. coli* O157:H7 bili su praktično isprani s površine, dok to nije bio slučaj sa *S. newport* [9].

Pokusi Howarda i Hutchesona u svezi s dinamikom rasta različitih sojeva *S. enterica* (*Bovismorbificans*, *Stanley*, *Newport*, *Montevideo*, *Meleagridis*, *Infantalis*, *Anatum*, *Senftenberg*, *Havana*, *Tennessee*, *Saint Paul*, *Goldcoast*, *Mbandaka* i *Enteritidis*), nedvojbeno su pokazali da niska početna kontaminacija klica alfalfa može tijekom germinacije kroz nekoliko dana postići invazivne vrijednosti od 10^6 – 10^7 CFU po gramu svježe mase klica.

Prema ovim istraživanjima testirani sojevi *S. enterica* rastu saprofitski zahvaljujući nutrijentima koje otpušta sjemenje klica u fazi klijanja. Kao što je poznato, nakon pucanja endosperma sjemenje otpušta u vodu za navodnjavanje reduktivne šećere kao i druge organske molekule. Upravo ova činjenica pogoduje brzom rastu salmonela na klicama u fazi klijanja. Time se objašnjava relativno visoka koncentracija ovih patogena već nakon 48–72 sata [10].

Istražujući odnos između kontaminirajućih salmonela iz voda za navodnjavanje i rajčica koje se uzgajaju u vodenim bazenima, Xiang Guo i sur. dokazali su da nakon izlaganja korijenja rajčica vodi s definiranom koncentracijom salmonela, u roku od jednog dana, broj ovih mikroorganizama, na hipokotilima i kotiledonima, kao i u stabljici, postiže vrijednosti od 3,01 CFU/log 10 do 3,40 CFU/log 10 po gramu [5].

Molekularne osnove invazivnosti

Prema Howardu i Hutchensonu, bakterijska kolonizacija korijenja genetički je složen proces. U slučaju *Pseudomonas fluorescens* za kolonizaciju rizosfere kori-

jenja neophodan je sekretorni sustav proteina tip III (TTSS). Drži se da *Ps. fluorescens* koristi TTSS sustav kako bi postigao prednost nad ostalim bakterijama iz rizosfere tako da translocira efektorske molekule u citoplazmu stanica domaćina. Ova translokacija ima za posljedicu lučenje nutrijenata u rizosferu. TTSS sustav neophodan je za rast brojnih bakterija koje egzistiraju na biljkama, pa tako i *Pseudomonas syringae*. Čini se da, pored stimuliranja lučenja nutrijenata, efektorski proteini TTSS sustava suprimiraju i obrambeni odgovor stanica domaćina. Autori su dokazali sa *S. enterica* da se eksprimira dva različita TTSS sustava koje kodiraju odsječci njenog genoma odgovorni za patogenost označeni s SPI1 i SPI2. TTSS funkcija koja je u svezi sa SPI1 kodira invaziju stanica domaćina, dok se SPI2 eksprimira nakon invazije stanica domaćina. Zanimljivo je istaknuti da barem jedan od izlučenih efektorskih proteina translociranih preko SPI1/TTSS sustava iskazuje homolognost s izlučenim efektorskim proteinima mnogih fitopatogena. Postoje također i dokazi da neki faktori virulencije patogena sisavaca mogu djelovati ne samo kod životinjskih već i kod biljnih domaćina. Npr., klinički izolat *Ps. aeruginosa*, koji je bio uzrokom oportunističkih infekcija ljudi, imao je sposobnost izazvati i patološke simptome kod biljke *Arabidopsis thaliana* (pripada obitelji gorušica). Utvrđeno je, nadalje, da je najmanje 17 gena *Ps. aeruginosa* bilo u svezi s nastankom patoloških procesa i kod biljaka i kod pokusnih miševa. Što se tiče sojeva *S. enterica*, dokazano je da mutanti ovih bakterija, kojima je suprimiran sustav gena koji kodiraju SPI1/TTSS sustav (*hilA*::Tn mutanti), kao i mutanti kojima nedostaje kritični gen (*prgH*) neophodan za kompletiranje TTSS, ipak rastu na sjemenju alfalfa koje klija. Pošto se TTSS sustav kojega kodira SPI2 eksprimira nakon invazije stanica sisavaca čini se da je rast sojeva *S. enterica* na klicama nezavisan od poznatih determinanta patogenosti [10].

Izvor kontaminacije i preventiva

Proučavanja su pokazala da je najčešći izvor patogenih enterobakterija u biljnoj proizvodnji voda za navodnjavanje [10]. Naime, navodnjavanje većih poljoprivrednih površina tijekom uzgoja voća i povrća zahtijeva i veće količine vode, osobito ljeti. Zbog objektivnih razloga, ali i zbog smanjivanja troškova proizvodnje, uzgajivači za navodnjavanje nerijetko koriste vodu jezera, potoka ili rijeka bez prethodne obrade. Drugi problem predstavlja navodnjavanje poljoprivrednih površina neobrađenim otpadnim vodama s farma i to onima koje potječu izravno iz štalskog uzgoja peradi, svinja, goveda i sl. Prateći trend proizvodnje tzv. zdrave hrane, poljoprivrednici nerijetko koriste prirodno gnojivo iz svojih štala bez prethodno provedene tople fermentacije. Moguć izvor kontaminacije nadzemnog dijela biljaka svakako može biti izmet ptica, prašina, a u rijetkim slučajevima i ruke kliconoša, koji manipuliraju ubranim voćem i povrćem [5].

Temeljem kumuliranih spoznaja o voću i povrću kao vektorima salmoneloza, kao i drugih alimentarnih patogena u SAD je Center for Food Safety and Nutrition pri U.S. Food and Drug Administration, razradio preporuke za redukciju mikrobnih uzročnika na klijajućem sjemenju [11].

Slične naputke i preporuke publicirao je Beuchat u svezi površinske dekontaminacije voća i povrća u SAD. Piernas i Guiraud publicirali su svoja iskustva za dezinfekciju sjemenja riže prije klijanja [12, 13]. Većina preporučenih postupaka dezinfekcije temelji se na uranjanju klica, voća ili povrća u otopinu Na hipoklorita koncentracije od 20 g/L za sjemenje ili klice, odnosno 100–200 mg/L aktivnog klora za lisnato povrće koje se termički ne obrađuje. Pored dezinfekcije aktivnim klorom, preporuča se i obrada povrća, voća i sjemenja s H₂O₂, Tween 80, mliječnom i octenom kiselinom [14]. Kao posebno učinkovit postupak dekontaminacije preporučena je i pasterizacija ionizirajućim zračenjem. Nažalost, izvješća ukazuju da niti jedan postupak ne može potpuno obesključiti kontaminirano voće i povrće osobito ako je došlo do prodora infekata u unutrašnjost stabljike ili plodova [14].

Mikrobiološka kakvoća povrća u Hrvatskoj

Unatoč činjenici da među vektorima salmoneloza u Hrvatskoj dominiraju namirnice animalnog podrijetla, odnosno jela i slastice načinjenih pomoću ovih sirovina, ipak se ne smije zanemariti mogućnost pojave salmoneloza preko povrća ili voća koje se konzumira bez termičke obrade. Ovo tim više jer u svijetu, ali i kod nas, vlada trend konzumiranja zdrave – nekonzervirane hrane. S druge pak strane, prestankom političke podjele svijeta na Istok i Zapad, kao i zbog snažnog pritiska »Svjetske trgovinske organizacije« (WTO), došlo je do potpunog rušenja barijera pri uvozu i izvozu svih vrsta namirnica. Iz navedenih razloga na našem se tržištu danas može naći povrće i voće iz čitavog svijeta.

Ovdje, na žalost, moramo istaknuti da naš aktualni normativni akt o mikrobiološkim standardima za namirnice, iako kvalitetan, nema razrađene mikrobiološke standarde za sirovo voće i povrće [15]. Na tragu ovih spoznaja šira radna skupina sekcije za mikrobiologiju namirnica Hrvatskog mikrobiološkog društva izvršila je tijekom proljeća i ljeta 2004. kolaborativno istraživanje mikrobne kontaminacije povrća iz maloprodaje kontinentalnog i primorskog dijela Hrvatske. Rezultati ovih istraživanja objavljeni su na 3. hrvatskom mikrobiološkom kongresu (Poreč 2004.). Analizirana je kontaminacija povrća s mikroorganizmima roda *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, kao i bakterije roda *Enterococcus* (slika »Mikrobiološka kontaminacija svježeg povrća«). Od ukupno 229 pretraženih uzoraka svježeg povrća, svega je 15 uzoraka bilo iz uvoza (Italija, Španjolska, Nizozemska, Austrija, Makedonija i BiH),

dok je 214 uzoraka bilo domaće proizvodnje. Domaće povrće bilo je načelno podrijetlom iz vrtova regija u kojima je i uzorkovano. *S. enteritidis* bila je izolirana iz vrtnog uzgoja salate (Istra), za čiji je uzgoj uporabljeno prirodno gnojivo. U svim pretraženim uzorcima dokazane su enterobakterije (kontaminacija 100 %), enterokoki su dokazani kod 48 % uzoraka, dok je *E. coli* izolirana iz 37 % uzoraka lisnatog povrća, 25 % uzoraka povrća s plodovima, te iz 31 % korijenastog povrća.

Iako preliminarno, ovo istraživanje nedvojbeno ukazuje na visoki stupanj kontaminacije povrća u maloprodaji Hrvatske indikatorima fekalnog zagađenja.

Zaključak

Rezimirajući izneseno o povrću, klicama i voću kao potencijalnim vektorima salmoneloza, ali i ostalih crijevnih patogena, mislimo da bi sustavnom edukacijom poljoprivrednika u proizvodnji povrća, osobito onog koje se termički ne obrađuje, valjalo strogo provoditi načela dobre poljoprivredne prakse. Ovom bi prilikom trebalo:

- navodnjavanje povrća provoditi bakteriološki čistom vodom bez fekalne kontaminacije;
- u slučaju korištenja netretiranih voda (jezera, potoci, rijeke, otpadne vode) izvršiti prethodno obesključenje;
- pri korištenju prirodnog gnojiva prethodno izvršiti toplu fermentaciju u svrhu eliminacije nesporogenih alimentarnih patogena;
- prije serviranja sirovog povrća u obiteljskoj prehrani izvršiti višekratno pranje u vodovodnoj vodi;
- kod hotelskih objekata, kao i ostalih objekata masovne prehrane, oprano i očišćeno povrće valjalo bi dodatno obesključiti uranjanjem u otopinu Na hipoklorita preporučene koncentracije.

Unatoč iznesenom, zbog dokazane sposobnosti penetracije patogena u korijenje, stabljiku, lišće i plodove voća i povrća, realna opasnost izbijanja salmoneloza ovim vektorima ostaje i dalje prisutna.

Literatura

- [1] Pavić S, Smoljanović M, Živković J, Mioković B, Erceg M, Kozačinski L. Research into thermal resistance of *Salmonella enteritidis* phagovar 2 in the culinary preparation of eggs. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 1997;2:34–39.
- [2] Pavić S, Brzović M, Laštre D, Cetinić E. Prednost imunomagnetske separacije pri izolaciji *Salmonella enteritidis* iz suspektnih namirnica tijekom epidemije u sustavu dječjih vrtića. *Infektološki glasnik* 2001;2:42–50.
- [3] FAO/WHO Collaborating Centre for Research and training in Food Hygiene and Zoonoses of Federal Institute for Health

Mikrobna kontaminacija svježeg povrća

Andrea Benussi-Skukan¹, Bojana Božović², Diana Brlek-Gorski³, Lidija Bujas⁴, Marija Devčić⁵, Alemka Dunaj⁶, Blaženka Furjančić⁷, Brigita Homan-Krtić⁸, Vesna Hrastrar-Kostešić⁹, Sanja Hraštović¹⁰, Andrea Humski¹⁰, Tamara Iharoš¹¹, Ljiljana Jarcović¹¹, Danja Laštre¹², Boža Kolarović¹³, Ana Končurat¹⁴, Lidija Kozackinski¹⁵, Ivana Ljevaković-Musladin¹⁶, Vesna Mihajević-Herman¹⁷, Jelisava Oštrić-Kačar¹⁷, Ana Palijan¹⁷, Srinika Pavić¹², Nataša Pintić¹⁴, Anđela Premžić¹⁶, Blanka Pruzinec-Popović¹⁸, Benito Pucar¹⁷, Ivona Šaršon-Žarković¹⁴, Ana Šušćković¹⁹, Sunčica Uhtil²⁰, Sanja Unić-Klarin²⁰, Sanja Zagorščak¹⁶, Nevjio Zdolet¹⁵

¹PBF-Centar za kontrolu namirnica Zagreb, ²Veterinarska stanica Čakovec, ³Hrvatski zavod za javno zdravstvo Zagreb, ⁴Zavod za javno zdravstvo Šibensko-kninske županije Šibenik, ⁵Zavod za javno zdravstvo Bjelovarsko-bilogorske županije Bjelovar, ⁶Podravka-Kontrola kvalitete i razvoj tehnologije Koprivnica, ⁷Zavod za javno zdravstvo Karlovačke županije Karlovac, ⁸Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije Osijek, ⁹Zavod za javno zdravstvo Istarske županije Pula, ¹⁰Hrvatski veterinarski institut Zagreb, ¹¹Zavod za javno zdravstvo Sisačko-moslavačke županije Sisak, ¹²Zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije Split, ¹³Zavod za javno zdravstvo Koprivničko-križevačke županije Koprivnica, ¹⁴Veterinarski zavod Križevci, ¹⁵Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, ¹⁶Zavod za javno zdravstvo Dubrovačko-neretvanske županije Dubrovnik, ¹⁷Zavod za javno zdravstvo Zadarske županije Zadar, ¹⁸Zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije Rijeka, ¹⁹Cedevita-Osiguranje kvalitete Zagreb, ²⁰Veterinarska stanica Zagreb

Sažetak

Svježe voće i povrće, termični neobrađeno, kao dio naše svakodnevne prehrane, posebno obilno u proljeće i ljeto, rijetko se ili gotovo nikada mikrobiološki kontrolira, dok postoji čitav niz literaturnih podataka o epidemijama uzrokovanim bakterijama porijeklom iz svježeg voća i povrća. Potaknuti navedenim, članovi Sekcije za mikrobiologiju namirnica su tijekom ljetnih mjeseci ispitivali mikrobiološku kontaminaciju svježeg povrća koje se uobičajeno konzumira sirovo, a koje se prodaje na našim zelenim tržnicama ili u trgovinama hranom.

Svrha rada bio je odgovor na pitanje: kakvo svježe povrće kupujemo?

Materijali i metode

U ljetnom periodu 2004 g. (srpanj, kolovoz) analizirano je 229 uzoraka svježeg povrća koje se uobičajeno konzumira sirovo, kakvo se nalazi na tržnicama i u trgovinama hranom diljem Hrvatske.

Uzorki su ispitivani bez ikakve prethodne obrade (bez čišćenja, bez uklanjanja vanjskih listova, bez pranja), u stanju kako su doneseni u laboratorij. U odvgi svakog uzorka bio su proporcionalno zastupljeni svi dijelovi ispitivanog uzorka (vanjski - površinski i unutrašnji).

U uzorcima je ispitivano:

1. prisustvo bakterija roda *Salmonella* u 50g i 25g
2. prisustvo bakterije *Listeria monocytogenes* u 25g, 10g i 1g
3. prisustvo i broj bakterije *Escherichia coli* u 10 i 1 g
4. broj bakterija roda *Enterobacteriaceae* u 1g
5. broj bakterija roda *Enterococcus* u 1g

Rezultati

1. Bakterija roda *Salmonella* izolirana je u samo jednom uzorku analiziranog povrća: u uzorku zelene salate "puterice", u odvgi od 50 g. U istom uzorku, u odvgi od 10 g, nije dokazana bakterija roda *Salmonella*. Identifikacijom je utvrđeno da se radi o bakteriji *Salmonella enteritidis*.
2. Prisustvo bakterije *Listeria monocytogenes* nije dokazano ni u jednom uzorku niti u jednoj ispitivanoj odvgi uzorka.

Prisustvo i broj navedenih bakterija ispitivani su sljedećim metodama:

1. HRN EN 12824:1999 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za dokazivanje bakterija iz roda *Salmonella* (ISO 6579:1993 modificirana, EN 12824:1997) ili HRN EN ISO 6579:2003 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp (ISO 6579:2002; EN ISO 6579:2002)
2. HRN EN ISO 11290-1:1999 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za dokazivanje i određivanje broja stanica *Listeria monocytogenes* - 1. dio: Metoda dokazivanja (ISO 11290-1:1996; EN ISO 11290-1:1996) i HRN EN ISO 11290-2:1999 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za dokazivanje i određivanje broja stanica *Listeria monocytogenes* - 2. dio: Metoda brojenja (ISO 11290-2:1996; EN ISO 11290-2:1996)
3. HRN ISO 4831:1999 Mikrobiologija - Opće upute za brojenje koliformnih bakterija - Postupak određivanja najvjerojatnijeg broja (ISO 4831:1991) i HRN ISO 7251:2002 Mikrobiologija - Opće upute za brojenje *Escherichia coli* - Postupak najvjerojatnijeg broja (ISO 7251:1993)
4. HRN ISO 7402:1999 Mikrobiologija - Opće upute za brojenje *Enterobacteriaceae* bez ponovnog oživljavanja - Postupak najvjerojatnijeg broja i postupak brojenja kolonija (ISO 7402:1993)
5. Kanamycin esculin azide agar (KEA) i Aesculin bile azide agar (EA), 24-48 sati na 37°C i 44°C

Podjela uzoraka prema dobivenim rezultatima ispitivanja broja bakterija *Enterobacteriaceae* i *Enterococcus* u analiziranom povrću

4. Broj bakterija roda *Enterobacteriaceae* u 1g uzorka analiziranog povrća

5. Broj bakterija roda *Enterococcus* u 1g uzorka analiziranog povrća

Kategorija povrća	Uzorak	Broj bakterija roda <i>Enterobacteriaceae</i> u 1g uzorka analiziranog povrća						najveća kontaminacija	Broj bakterija roda <i>Enterococcus</i> u 1g uzorka analiziranog povrća						najveća kontaminacija
		<10 ²	10 ² - 10 ³	10 ³ - 10 ⁴	10 ⁴ - 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶	>10 ⁶		<10	10 - 10 ¹	10 ¹ - 10 ²	10 ² - 10 ³	10 ³ - 10 ⁴	>10 ⁴	
LISNATO PAVRĆE 16 uzoraka	ZELENE SALATE kristal, puterica, anđelica, hrastov list, ledarica 110 uzoraka			11 (10%)	36 (33%)	52 (47%)	11 (10%)	salata kristal 5 x 10 ³ /g							zelena salata 2,8 x 10 ³ /g
	KUPUS, bijeli i crveni 42 uzorka		11 (26%)	9 (21%)	10 (24%)	5 (12%)	7 (17%)	bijeli kupus rezani, pakirani 2 x 10 ³ /g							bijeli kupus rezani, pakirani 6 x 10 ³ /g
	RADIĆ, zeleni i crveni 13 uzoraka					4 (31%)	9 (69%)	radić zeleni, rezani 1 x 10 ³ /g							radić zeleni 3 x 10 ³ /g
	PERSIN I CELER list 8 uzoraka		2 (25%)	2 (25%)	1 (12%)		3 (38%)	persin list 5 x 10 ³ /g							persin list 3 x 10 ³ /g
	PAKIRANE OČIŠĆENE MJEŠAVINE POVRĆA z salate+kupus+mrvine i radić+ze salate+poruk 2 uzorka				1 (50%)	1 (50%)		rezano povrće pakirano 7 x 10 ³ /g							rezano povrće pakirano 3 x 10 ³ /g
POVRĆE PLODA 28 uzoraka	OSTALO ribula, cikorkija, špinat, blitve, kaj, loboda, kineska s. 10 uzoraka			4 (40%)	2 (20%)	2 (20%)	2 (20%)	loboda 4 x 10 ³ /g							ribula 7 x 10 ³ /g
	PAPRIKA 11 uzoraka	4 (36%)	2 (19%)	4 (36%)	1 (9%)			paprika 4 x 10 ³ /g							paprika 1 x 10 ³ /g
	RAJČICA 10 uzoraka	4 (40%)	3 (30%)	3 (30%)				rajčica 1,5 x 10 ³ /g							rajčica 1 x 10 ³ /g
POVRĆE KORIJENA 18 uzoraka	OSTALO krastavac, pečurke, brokula, cvjetača 7 uzorka	3 (42%)	2 (29%)	2 (29%)				krastavac 1 x 10 ³ /g							pečurke 4 x 10 ³ /g
	MRKVA 6 uzoraka		1 (17%)	1 (17%)	2 (33%)	2 (33%)		mrkva 6 x 10 ³ /g							mrkva ribana, pakirana 1 x 10 ³ /g
POVRĆE KORIŠĆE 8 uzoraka	OSTALO celer, cikla, rotkova, luk, poruk, komorač 8 uzorka	2 (25%)	1 (12%)	1 (12%)	1 (12%)		3 (38%)	celer korjen 1 x 10 ³ /g							komorač 6 x 10 ³ /g
	SVIJEŽE KLJICE pšenice i zelene soje (mungo grah) 2 uzorka					2 (100%)		3 x 10 ³ /g 4 x 10 ³ /g							kljice soje 7 x 10 ³ /g

Diskusija i zaključak

U 19 mikrobioloških laboratorija iz svih dijelova Hrvatske, u kojima se svakodnevno analiziraju uzorci različite hrane, ispitano je ukupno 229 uzoraka raznog svježeg povrća. Najviše je obrađeno uzoraka lisnatog povrća (185), a znatno manje pečurke, povrća ploda (28) i povrća korijena (16). Pored uobičajenog lisnatog povrća (zelene salate, kupusa, radića, špinata, blitve, kaj, lipe persina i celera), povrća ploda (paprike, rajčice, krastavaca, pečurke, cvjetača, brokula) i povrća korijena (mrkve, celera, cikla, rotkova, luka, poruka), analizirano je i povrće rjeđe korišteno u našoj prehrani: ribula, cikorkija, kineska salata, komorač, list loboda ("lušt" ili "štie"), te kljice pšenice i zelene soje. Svega 15 uzoraka bilo je od povrća iz uvoza, porijeklom iz Italije (5 uzoraka: radić i komorač), iz Španjolske (3 uzorka: radić i rajčica), iz Nizozemske (3 uzorka: crveni kupus, celer korjen, cikorkija), iz Austrije (2 uzorka: crveni kupus, mrkva), iz Makedonije (1 uzorak rajčice), te iz BiH (1 uzorak paprika). Ostalo analizirano povrće uzgajano je u Hrvatskoj, najvećim dijelom u krajolju u kojem se prodaje. Za 62 uzorka poznat je podatak o upotrebi istaknuta gnojiva u pripremi tla ili u toku uzgoja povrća.

U svim analiziranim uzorcima izolirane su bakterije roda *Enterobacteriaceae*. Bakterija roda *Enterococcus*, indikatora fekalnog zagađenja, dokazano je više od 10 u gramu u 48% ispitanih uzoraka. Bakterija *Escherichia coli* izolirana je iz 37% uzoraka lisnatog povrća, 25% uzoraka povrća ploda i 31% uzoraka povrća korijena.

Iz jednog uzorka zelene salate "puterice" iz vertnog uzgoja, gdje je za prihranu korišteno stajsko gnojivo, izolirana je i dokazana bakterija *Salmonella enteritidis*.

Dokaz bakterije *Salmonella enteritidis* u jednom uzorku salate, prisutnost bakterija roda *Enterobacteriaceae* u svim uzorcima i roda *Enterococcus* u skoro polovici uzoraka, te nalaz bakterije *Escherichia coli*, potvrđuju pretpostavku da svježe povrće koje u svoju kuhinju donesemo s tržnica i iz trgovina predstavlja realnu opasnost za ljudsko zdravlje. Obzirom na dobivene rezultate analiza važno je istaknuti da se u postupanju sa svježim povrćem i pripremi jela od tog povrća treba pridržavati svih pravila "dobre kuhinjske i kulinarske prakse", kako bi se smanjila ili uklonila početna kontaminacija, spriječila kroskontaminacija gotovih jela i održavala potrebna čistota radnih površina, posuda i opreme u kuhinji.

33.Hrvatski mikrobiološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem
Poreč, 4. - 7. listopada 2004.

Svi autori ovog rada članovi su Hrvatskog mikrobiološkog društva, Sekcije za mikrobiologiju namirnica

- Protection of consumers and Veterinary Medicine-Berlin Multinational Outbreak of *Salmonella enterica* Serotype Newport infections due to contaminated Alfalfa Sprouts. Newsletter 2000;63:4-5.
- [3a] FAO/WHO Outbreak of *Salmonella kottbus* infections associated with eating Alfalfa Sprouts-Arizona, California, Colorado and New Mexico February-April 2001. Newsletter 2002;70:5-6.
- [3b] FAO/WHO Outbreaks of Salmonellosis associated with Eating Uncooked Tomatoes: Implication for Public Health. Newsletter 2000;63:3.
- [3c] FAO/WHO *Salmonella* Outbreak linked to Raw Tomatoes in California. Newsletter 2000;63:3-4.
- [3d] FAO/WHO Outbreak of *Salmonella* Serotype Javiana Infections-Orlando, Florida, June 2002. Newsletter 2003;74/75:8-9.
- [3e] FAO/WHO An outbreak due to Peanuts in their Shell Caused by *Salmonella enterica* Serotype Stanley and Newport-Sharing Molecular Information to Solve International Outbreaks. Newsletter 2004;81/82:5.
- [3f] FAO/WHO Multistate Outbreak of *Salmonella* Serotype Poona Infections Associated With Eating Cantaloupe from Mexico-United States and Canada, 2000-2002. Newsletter 2003;74/75:7.
- [3g] FAO/WHO *Salmonella* Stanley and *Salmonella* Newport in Imported Peanuts-International Outbreak. Newsletter 2001;70:5.
- [4] Cooley MB, Miller WG, Mandrell RE. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Competition with *Enterobacter asburiae*. Appl. Environ. Microbiol. 2003; Vol 69, No 8:4915-4926.
- [5] Xiang Guo, Van Iersel WM, Jindu Chen, Brackett ER, Beuchat RL. Evidence of Association of *Salmonellae* with Tomato Plants Grown Hydroponically in Inoculated Nutrient solution. Appl. Environ. Microbiol. 2002; Vol 68, No 7:3639-3643.
- [6] Samish Z, Etinger-Tulczynska R, Bick M. The Microflora Within the Tissue of Fruits and Vegetables. J. Food Sci. 1962;28:259-266.
- [7] Hara-Kudo Y, Konuma H, Iwaki M, Kasuga F, Sugita-Konishi Y, Ito Y, et al. Potential Hazard of Radish Sprouts as a Vehicle of *Escherichia coli* O157:H7. J. Food Prot. 1997;60:1125-1127.
- [8] Itoh Y, Sugita-Konishi Y, Kasuga F, Iwaki M, Hara-Kudo Y, Saito N, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Present In Radish Sprouts. Appl. Environ. Microbiol. 1998;64:1532-1535.
- [9] Barak DJ, Whitehead LC, Charkowski AO. Difference in Attachment of *Salmonella enterica* Serovars and *Escherichia coli* O157:H7 to Alfalfa Sprouts. Appl. Environ. Microbiol. 2003; Vol 69, No 8:4556-4560.
- [10] Howard MB, Hutcheson SW. Growth Dynamic of *Salmonella enterica* Strains on Alfalfa Sprouts and in Wast Seed Irrigaton Water. Appl. Environ. Microbiol. 2003; Vol 69, No 1:548-553.
- [11] Anonymous. Microbiological Safety Evaluation and Recommendation on Sprouting seeds. Center for Food Safety and Nutrition, U.S. Food and Drug Administration. 1999. Washington D.C.
- [12] Beuchat LR. Surface Decontamination of Fruits and Vegetables Raw: a Review 1998. Publication W.H.O./FSF/FOS/98.2. World Health Organisation, Geneva, Switzerland.
- [13] Piernas V, Guiraud J. Disinfection of Rice Seeds Prior to Sprouting. J. Food. Sci. 1997;62:611-615.
- [14] FAO/WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses of the Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine-Berlin Survival of *Escherichia coli* O157:H7 on Strawberry Fruit and Reduction by Chemical Agents. Newsletter 2001;70:4.
- [15] Ministarstvo zdravstva RH Pravilnik o izmjenama i dopunama mikrobioloških standarda za namirnice (NNRH br.125/2003.)