

# ZASTUPLJENOST VEROTOKSIČNIH SOJEVA BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI* U GOVEĐEM MESU I MESNIM PROIZVODIMA U KLAONICAMA BOSNE I HERCEGOVINE

Smajlović<sup>1</sup> M., Theda von Müffling<sup>3</sup>, F. Čaklovića<sup>1</sup>, D. Alagić<sup>1</sup>, A. Smajlović<sup>2</sup>

## SAŽETAK

Sojevi bakterije *Escherichia coli* koji proizvode verotoksin (VTEC) su u prošlosti povezivani s pojavom masovnih kao i pojedinačnih slučajeva trovanja mesom i mesnim proizvodima. Simptomi oboljenja su polazili od "jednostavnih" proljeva preko hemoragičnog kolitisa do hemolitičko-uremičkog sindroma (HUS). Dominantni VTEC serotip je O157:H7, koji je jedan od najčešćih uzročnika epidemija bolesti uzrokovanih hranom u cijelom svijetu. Zbog činjenice da se gore spomenuti patogeni veoma često pojavljuju kod goveda, kontrola kontaminacije hrane bi trebala počinjati na nivou farmi i klaonice. Ciljevi našeg istraživanja su bili da ustanovimo zastupljenost VTEC sojeva kod goveda u klaonicama na području Bosne i Hercegovine, te u goveđem mesu i mesnim proizvodima. Ukupno je pretraženo 2040 uzoraka od čega 1560 briseva i 480 uzoraka mesa i mesnih proizvoda. Od ukupnog broja uzoraka, devet je bilo pozitivno na prisustvo verotoksičnih sojeva *E. coli*, i to šest od njih porijeklom iz klaonice, i tri iz uzoraka mesa. Među njima pet uzoraka je identificirano kao O157:H7, tri kao O96:H19, a jedan kao O27:H7 soj. Važnost istraživanja se može vidjeti u činjenici da je ono rezultiralo prvom izolacijom i identifikacijom verotoksičnih sojeva *E. coli* u Bosni i Hercegovini.

**Ključne riječi:** *E. coli*, verotoksični sojevi, meso i mesni proizvodi, brisevi.

## UVOD

Verotoksični sojevi *Escherichia coli* (VTEC) su u prošlosti često povezivani s bolestima uzrokovanim trovanjem hranom kako kod pojedinačnih

slučajeva, tako i kod pojave oboljenja velikog broja ljudi. Simptomi oboljenja su polazili od proljeva bez komplikacija do hemoragičnog kolitisa i hemolitičko-uremičkog sindroma (HUS). HUS je po život opasna komplikacija koja se može pojaviti kod 5–10 % pacijenata, a koja se karakterizira trombocitopenijom, mikroangiopatskom hemolitičkom anemijom i akutnom slabošću bubrega (Nataro i Kaper, 1998, Paton i Paton, 1998). Dominantni VTEC serotip je O157:H7 koji je obično uzrok masovnog izbijanja oboljenja u SAD, Kanadi i Velikoj Britaniji (Mead i sur., 1999; Nataro i Kaper, 1998). Više od 100 različitih O:H tipova sojeva je povezano s oboljenjima kod ljudi. Sposobnost spomenutih sojeva da izazovu ozbiljna oboljenja kod ljudi je bez sumnje povezana s njihovom sposobnošću proizvodnje verotoksina koji se također u literaturi nazivaju i šigatoksini. Zbog činjenice da se spomenuti patogeni između ostalih najčešće pojavljuju kod goveda, kontrola kontaminacije hrane bi trebala početi s kontrolom patogena unutar populacije domaćih životinja. Većina goveda se uzgaja i priprema za iskorištavanje u velikim komercijalnim tovilištima, i prevozi direktno iz tovilišta u pogone za iskorištavanje (klaonice). Prema tome, pokušaj smanjivanja rizika od kontaminacije hrane namijenjene za ljudsku prehranu zoonotičkim patogenima bio bi efikasniji kad bi se fokusirao na nivoe tovilišta i klaonice.

Cilj našeg istraživanja je bio da ustanovimo zastupljenost verotoksičnih sojeva *E. coli* kod goveda, u

<sup>1</sup> Mr.sc. Muhamed Smajlović, viši asistent; dr.sc. Faruk Čaklovića, redoviti profesor, Zavod za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porijekla; <sup>2</sup> mr.sc. Ahmed Smajlović, Zavod za farmakologiju i toksikologiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Sarajevu, Bosna i Hercegovina; <sup>3</sup> dr.sc. Teda von Müffling, Institut za kvalitet i sigurnost hrane, Fakultet veterinarske medicine, Hanover, Njemačka

goveđem mesu i mesnim proizvodima, u klaonicama na području naše zemlje.

## MATERIJAL I METODE

Uzorci su uzimani iz dvije domaće klaonice - jedna s implementiranim HACCP-sustavom kontrole, a druga klaonica bez ikakvih sistema kontrole procesa proizvodnje. Uzorkovanje je izvršeno u periodu 2002. – 2004. godine, po sezonama - proljeće/ljeto i jesen/zima.

Ukupno 2040 uzoraka je analizirano na prisustvo verotoksičnih sojeva *E. coli*, od čega:

- 1560 brisova s radnih površina, pribora, opreme i ruku radnika u klaonici;
- 480 uzoraka goveđeg mesa i mesnih proizvoda.

Istraživanja su obavljena u Zavodu za higijenski nadzor namirnica animalnog porijekla Veterinarskog fakulteta Univerziteta u Sarajevu, Bosna i Hercegovina, u Institutu za kvalitetu i sigurnost hrane, Fakultet veterinarske medicine, Hanover, Njemačka, Nacionalnom referentnom laboratoriju za *E. coli*, u Berlinu, Njemačka te u Institutu za javno zdravstvo Kobe, Japan.

### Izolacija

Za izolaciju *E. coli* spp. je korištena selektivna podloga Endo agar (24 sata na 37°C).

Pozitivni izolati su biokemijski potvrđeni s API ID3-2E testom (BioMérieux, Marcy-L'Etoile, France).

### PCR identifikacija verotoksičnih sojeva

Korišten protokol je modifikacija opisane od autora Von P. Gallien i sur. (1998). Pozitivne bakterijske kulture su obogaćene inkubacijom u 90 ml Brilliant

Green bujona 2% (40 g/l) kroz 10 sati na 37°C (1).

Izolacija bakterijske DNK – Uzeto je po 1ml bujona u kivete od 2 ml i centrifugirano 20 minuta na 10000 okretaja. Višak tekućine iznad pelete je odbačen. U kivetu s peletom dodan je CTAB (pufer) - 1 ml a 1 je kiveta bez pelete (taloga) kao negativna kontrola u koju se dodaje samo CTAB (1 ml). U kivete je dodano 50µl Lizocima (10 mg/ml) i 50 µl Rnase (20 mg/ml). Promućkane su na vortexu i inkubirane jedan sat na 37°C. Dodano je 25 µl Proteinase K (20 mg/ml) i promućkano na vortexu. Slijedila je inkubacija 1 sat na 65°C u termobloku. Nakon mućkanja dodano je 800 µl kloroforma i ponovno promućkano 1 min. Nakon centrifugiranja 15 min na 14000 obrtaja u kiveti se vide dva sloja. Uzeto je 700µl gornjeg sloja i prebačeno u prethodno pripremljene i označene nove kivete (donji sloj je kloroform). Dodano je ponovo 700 µl kloroforma, promućkano i centrifugirano na 10 000 okretaja 15 minuta. Nakon centrifugiranja, 500 µl gornjeg sloja prebačeno je u prethodno pripremljene i označene nove kivete. Dodano je 500 µl Isopropanola i 50 µl Natriumacetata. Promućkano je lagano, ručno (ne u vortexu). Ostavljeno je 30 minuta (u ovoj fazi uzorci se mogu ostaviti preko noći). Slijedilo je centrifugiranje 15 min. na 14 000 okretaja. Izvučena je sva tekućina iznad pelete, dodano 500 µl 70-75% etanola. Centrifugirano je 5 minuta na 10 000 okretaja. Izvučen je etanol iznad pelete. Otvorene kivete stavljene su u termoblok na 60°C da otpare ostaci etanola (oko 10 min.) – ne dozvoliti da se presuši. Dodano je 100µl TE pufera u malu kivetu. Poslije ovoga uzorci su spremni za PCR.

Mastermix - Uzorci DNK (2 µl) su amplificirani u 25 µl reakcijskoj mješavini koja je sadržavala 10 x PCR

### ▼ Primeri

Naziv primera	Sekvenca 5' – 3'	Meta	Dužina fragmenata (bp)
MK1	TTT ACg ATA gAC TTC TCg AC	STX gen	230
MK2	CAC ATA TAA ATT ATT TCg CTC		

Programiranje termocyclera

15 min 94°C	1 min 94°C	1 min 44 °C	1 min 72°C	30 x	3 min 44 °C	5 min 72°C
Aktivacija Tag -polimeraze	Denaturacija	Nalijeganje (Annealing)	Elongacija	PCR ciklusi	Završno nalijeganje	Elongacija

Gel elektroforeza – 2 % agaroz gel s etidumbromidom. Korištena je struja od 200 V/ 400 mA kroz trideset minuta.

puffer 2,5 µl, dNTP 0,5 µl, MK 1 prajmer 2,0 µl, MK 2 prajmer 2,0 µl, MgCl<sub>2</sub> 1,5 µl i Tag polimerazu 0,170 µl u 14, 33 µl vode.

### Serotipizacija

Serotipizacija izoliranih sojeva je izvršena u Nacionalnom referentnom laboratoriju za *E. coli* u Berlinu, Njemačka, te u Institutu za javno zdravstvo, Kobe Japan.

### REZULTATI

Od ukupnog broja uzoraka (n = 2040), *E. coli* spp. pozitivno je bilo 180 izolata (8,82 %). Od tog broja na sposobnost lučenja verotoksina, bilo je pozitivno devet sojeva (5 %).

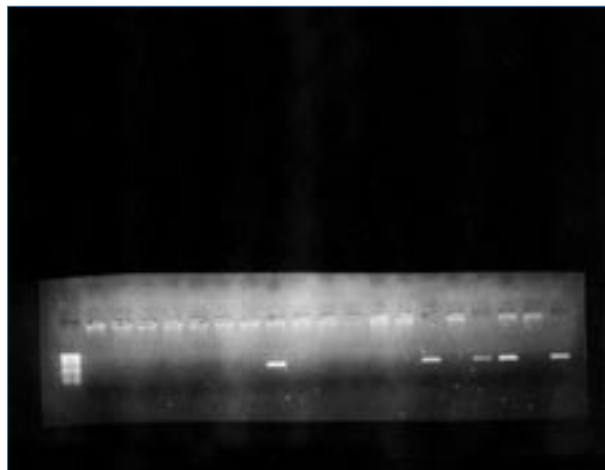
Šest sojeva je izolirano iz briseva uzetih u klaonici, a tri iz uzoraka mesa. Među njima pet sojeva je identificirano kao O157:H7, tri kao O96:H19, a jedan kao O27:H7 serotip.

Primijećeno je da su diareageni sojevi *E. coli* izolirani iz briseva porijeklom iz klaonica bez ikakvih sistema kontrole procesa proizvodnje.

### ZAKLJUČAK

Značaj našeg istraživanja ogleda se u činjenici da je ono rezultiralo prvom izolacijom i identifikacijom verotoksičnih sojeva *E. coli* u Bosni i Hercegovini i

▼ **Slika 1.** Polaroid fotografija agarozna gela s VTEC pozitivnim sojevima



posebno identifikacijom serotipa O157:H7, jednog od najčešćih uzročnika oboljenja izazvanih trovanjem hranom u svijetu. Također je veoma interesantno da smo imali tri uzorka iz kojih je izoliran i identificiran veoma rijedak verotoksični serotip O96:H19.

Još jednom je potvrđen put kontaminacije mesa i mesnih proizvoda verotoksičnim sojevima *E. coli* preko neadekvatno čistih radnih površina, pribora i ruku radnika u proizvodnim pogonima.

Pošto su verotoksični sojevi *E. coli* izolirani iz bri-

▼ **Tablica 1.** Identifikacija toksina i serološka identifikacija VTEC pozitivnih izolata

Vrsta uzorka	Identifikacija toksina i serotipa		
	VT1*	VT2*	Serotip
Bris kože goveda	+	+	O157:H7
Bris radne površine za rezanje mesa u klaonici 1	+	+	O96:H19
Bris radne površine za rezanje mesa u klaonici 2	+	+	O96:H19
Bris površine goveđe polovice	+	+	O157:H7
Bris zaštitne pregače	+	+	O157:H7
Bris ruku radnika u klaonici	+	+	O157:H7
Sirovo teleće meso	+	+	O157:H7
Sirovi čevapčići	+	+	O96:H19
Sirovo goveđe meso	+	+	O27:H7

\*VT1, VT2 - Verotoksini

seva i uzoraka goveđeg mesa i mesnih proizvoda porijeklom iz klaonica bez ikakvih sistema kontrole procesa proizvodnje, sugeriramo promociju preventivnih veterinarskih mjera na nivou farme kao i implementaciju i unapređenje standardnih operativnih postupaka i HACCP sistema kontrole u klaonicama i pogonima za preradu mesa na području naše zemlje.

## SUMMARY

### **OCCURRENCE OF VERO-TOXIN PRODUCING STRAINS OF *E. COLI* IN RAW BEEF PRODUCED IN BOSNIA AND HERZEGOVINA**

*Vero-toxin producing Escherichia coli (VTEC) have been associated with both, outbreaks and sporadic cases of human disease, ranging from uncomplicated diarrhoea to hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome (HUS). The dominant VTEC serotype is O157:H7, which is also most commonly involved in large outbreaks all over the world. Due to the fact that the above named pathogens also frequently occur in cattle, control of food contamination ought to begin with control of pathogens in domestic animal populations. The objective of our research was to investigate occurrence of VTEC strains in cattle and beef along the feedlot – slaughterhouse chain in Bosnia and Herzegovina. We collected and investigated the total of 2040 samples, out of which 1560 of swabs (swabs of working areas and hands of workers in slaughterhouses and beef specimens) and 480 samples of beef meat and*

*meat products. Out of all the samples, nine strains, which were isolated from swabs from slaughterhouse (six) and meat specimens (three), were identified as VTEC positive. Among them, five strains were identified as O157:H7, three as O96:H19 and one as O27:H7. Importance of our research may be seen in fact that our investigation resulted in the first isolation and identification of VTEC strains in Bosnia and Herzegovina and particularly identification of O157:H7 strain, one of worldwide most prevalent food-borne pathogen.*

**Key words:** *E. coli, Vero-toxic strains, meat and meat products, swabs*

## LITERATURA

Elder, R. O., J. E. Keen, G. R. Siragusa, G. A. Barkocy-Gallagher, M. Koohmaraie, W. W. Laegreid. (2000): Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2999-3003.

Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe (1999): Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5, 607-625.

Nataro, J. P., and J. B. Kaper (1998): Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11, 142-201.

Paton, J. C., and A. W. Paton (1998): Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev. 11, 450-479.

Von P. Gallien, H. Richter, H. Klie, M. Timm, H. Karch, S. Lehmann, K.W. Perlberg, P. Teufel und D. Protz (1998): Nachweis von Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC) in Lebensmitteln und Charakterisierung der Isolate. Bundesgesundhbl. Sonderheft. 26-29. ■

# KLAONIČKO ISKORIŠTENJE I KEMIJSKI SASTAV MESA KOPUNA

Mandić<sup>1</sup>, V., T. Tušek<sup>1</sup>, D. Alagić<sup>1</sup>, V. Podhraški-Pomper<sup>2</sup>, D. Majnarić<sup>2</sup>

## SAŽETAK

U radu je istraživana učinkovitost kopunizacije na količinu i kakvoću mesa kopuna. Rezultati istraživanja ukazuju na visok randman i visok udio najvrijednijih dijelova trupa (prsa, batak, zabatak). Kemijskom analizom utvrđeni su

osnovni kemijski parametri (% vode, % proteina, % masti i % pepela). Rezultati kemijskih analiza mesa kopuna pokazali su veći postotak masti u usporedbi s mesom utovljenih pijetlova kontrolne skupine. Pri tome mast nije izdvojena kao ekstramuskularna (masno tkivo) već je

<sup>1</sup> Mr sc. Vlasta Mandić, viši predavač; dr. sc. Tatjana Tušek, prof. visoke škole; mr sc. Damir Alagić, viši predavač Visoko gospodarskog učilišta u Križevcima, M. Demerca 1, Križevci; <sup>2</sup> Verica Podhraški-Pomper, dipl. inž. kemije; mr sc. Darko Majnarić, dr. vet. med., Odjel za kemiju, Veterinarski zavod Križevci, Zakmardijeva 10, Križevci