

KONTAMINACIJA KLANIČNIH POVRŠINA I OPREME SA *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Snežana Ivanović*, Milenko Žutić, Oliver Radanović
Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Vojvode Toze 14, Beograd

Kratak sadržaj

Listerioza je infektivna bolest mnogih vrsta životinja i čoveka (zoonoza). Klinički se manifestuje u različitim oblicima, najčešće u vidu abortusa i meningitisa. Uzročnik bolesti je *Listeria monocytogenes*. To je ubikvitarna bakterija, ustanovljena kod preko 40 vrsta sisara, 20 vrsta ptica, više vrsta riba i insekata. Nakon inficiranja kod životinja se ne moraju javiti klinički simptomi i one se u klanicu otpremaju kao zdrave (inaparentna infekcija). Kada životinje, u ovom slučaju koze, dođu na klanje, sa njih se ne mora uzročnik preneti na meso ali se prenosi na opremu. U našem ispitivanju, nakon klanja klinički zdravih koza u klanici, neposredno posle klanja, uzorkovali smo 20 briseva sa kolica za prihvat iznutrica, pet briseva sa žleba noževa (između sečiva i drške) i dvadeset briseva sa poda. Nakon tri dana od momenta klanja, uzeti su ponovo brisevi sa poda (deset briseva sa različitih mesta) i sa dna kolica (20 briseva) u koja su bili prihvaćeni unutrašnji organi (creva i uterus). Brisevi su zasejani na selektivni, obogaćeni bujon koji je stavljen u frižider na temperaturu od 5-8°C. Treći i sedmi dan su bujoni presejani na krvni agar (5% ovčije krvi), Columbia (Himedia) i MacConkey agar (Biomedics) i inkubirani na temperaturi od 37°C tokom 24-48 h. Suspektne kolonije, sa krvnog i kolumbijskog agara, mikroskopski su kontrolisane i dalje radi dobijanja čiste kulture, rekultivisane na istu vrstu podloga. Za ispitivanje biohemijske aktivnosti korišćeni su komercijalni testovi. Za proveru identifikacije, primenjen je BBL Crystal G/P ID kit. Dobijeni su sledeći rezultati: iz dva brisa uzetih sa poda, jednog brisa sa noža i dva brisa sa kolica, izolovali smo *Listeriu monocytogenes*. Osim iz jednog brisa sa poda, svi sojevi *L. monocytogenes* izolovani su i iz bujona presejanih sedmog dana. *Listeria monocytogenes* je izolovana iz 2 brisa sa poda uzetih tri dana nakon klanja. Ovi sojevi su izolovani i iz bujona presejanih sedmog dana. Naš nalaz ukazuje na mogućnost posrednog prenošenja *Listeria monocytogenes* na meso.

Ključne reči: klanica, oprema, *Listeria monocytogenes*, meso, oboljenje, ljudi

* E-mail: snezaivanovic@gmail.com

CONTAMINATION OF SURFACES AND EQUIPMENT IN THE SLAUGHTERHOUSE WITH *LISTERIA* *MONOCYTOGENES*

Snežana Ivanović, Milenko Žutić, Oliver Radanović
Scientific Veterinary Institute of Serbia, Vojvode Toze 14, Belgrade

Abstract

Listeriosis is an infective disease of many animals and humans (zoonosis). Clinically it is manifested in various forms, mostly as abortion and meningitis. The cause is *Listeria monocytogenes*. It is an ubiquitous bacterium, found in over than 40 mammals, 20 bird species, several fish species and insects. After infection, clinical symptoms are sometimes not diagnosed and the animals arrive in slaughterhouse as healthy animals (unapparent infection). When animals, in this case goats, arrive for slaughter, the cause of the disease can be transmitted on the equipment and possibly on meat. In our examination, immediately after slaughter of clinically healthy goats, 20 swabs were taken from the bottom of trolleys for placing of the organs, 5 swabs from knives (between blade and grip) and 20 swabs from the floor. Three days after slaughter, 10 swabs were taken again from floor (from ten different places) and from the bottom of trollies (20 swabs) where the intestine and uterus were placed. The swabs were incubated in selective, enriched broth refrigerated at 5-8°C. On the third and seventh day they were inoculated on blood agar (5% sheep blood), Columbia (HiMedia) and MacConkey agar (Biomedics) and incubated under the temperature of 37°C for 24-48 hours. The suspect colonies from blood and Columbia agar were controlled microscopically and, because of getting pure culture, re-cultivated on the same media. For examination of biochemical activity, commercial tests were used. For the identification BBL Crystal G/P ID kit was used. *Listeria monocytogenes* was isolated from two floor swabs, one knife swab and from two swabs from trollies. Except the one from floor, each isolate of *Listeria monocytogenes* was isolated from the broth inoculated for seven days. *Listeria monocytogenes* was isolated from two floor swabs three days after slaughter. These isolates were isolated from the broth inoculated for seven days. Our finding shows the possibility of indirect transmission of *Listeria monocytogenes* on meat.

Key words: slaughter house, equipment, *Listeria monocytogenes*, meat, disease, humans

UVOD

Listerioza je infektivna bolest mnogih vrsta životinja i čoveka (zoonoza). Klinički se manifestuje u različitim oblicima, najčešće u vidu abortusa i meningitisa (Quinn i sar., 2000). Uzročnik bolesti je *Listeria monocytogenes*. To je ubikvitarna bakterija, ustanovljena kod preko 40 vrsta sisara, 20 vrsta ptica, više vrsta riba i insekata. Rezervoar infekcije u prirodi su glodari i ptice kod kojih su česte inaparentne infekcije i čije fekalije sadrže veliki broj uzročnika kojima kontaminiraju okolinu. Pored toga što se nalazi u životinjskom i ljudskom fecesu, uzročnik se može naći u otpadnim i površinskim vodama, tlu, biljkama, životinjskoj hrani, na zidovima i podovima objekata gde borave životinje. U zemljište uglavnom dospeva preko stajskog đubriva. Ova činjenica ukazuje da zemljište može predstavljati inicijalni faktor u procesu inficiranja životinja (Infectious Disease Epidemiology Section, Louisiana, 2004). Infekcija najčešće nastaje peroralno i pernazalno, a dokazana je infekcija duž ogranka nervusa trigeminusa. Patogeneza, a time i klinička slika, zavise umnogome od puta kojim su listerije prodrle u organizam i od mesta njihove lokalizacije.

Pri peroralnoj infekciji uzročnik penetrira crevnu sluzokožu posle čega nastaje, ili inaparentna infekcija uz dugotrajno izlučivanje uzročnika fecesom, uzročnik se locira u različite organe ili se razvija septikemija. Septikemijski oblik sa meningitisom ili bez njega najčešće se javlja kod monogastričnih životinja i mladih preživara a posebno kod fetusa i mladunčadi. *Listeria monocytogenes* se često kod subkliničkih mastita izlučuje mlekom. Najčešće oboljevaju goveda, ovce, koze ali i svinje. Kad se listerioza pojavi kao enzootija, bilo na kojoj vrsti domaćih životinja, moguće je sa dosta tačnosti ustanoviti izvor infekcije, što je kod sporadičnih slučajeva vrlo teško.

U nekim slučajevima nakon infekcije kod životinja se ne pojavljuju klinički simptomi i takve se životinje u klanicu otpremaju kao zdrave (inaparentna infekcija). U tim slučajevima uzročnik se može preneti ne samo na meso nego i na opremu, zidove, podove, kecelje radnika, čizme i dr.

Oprema u klanici, ali i mlekaru, je brojna i različita: konvejeri, tankovi, mašine za hlađenje i zamrzavanje, skidanje kože, pribor za rezanje, sečenje, mašina za punjenje i pakovanje. Sva pomenuta oprema je složena, sa uzanim otvorima i dostupnim mestima za nečistoće ali nepristupačnim za pranje, čišćenje i dezinfekciju. Prema tome, nije iznenađujuće ako se *Listeria monocytogenes* nađe na opremi koja je oprana i dezinfikovana i tako naknadno kontaminira meso i proizvode od mesa. Neki serotipovi *Listeria monocytogenes* su uporni i na opremi mogu da opstanu nekoliko meseci ili godina (Rij i sar., 2003). To je verovatno posledica, u brojnim istraživanjima dokazane sposobnosti *Listeria monocytogenes* da formira biofilm (Milanov, 2009; Harvey, 2007).

Sposobnost bakterija da se pričvrste za određene površine i da stvaraju biofilme privukla je značajnu pažnju velikog broja istraživača u brojnim industrijama uključujući i prehrambenu. To se događa zahvaljujući sposobnosti bakterija da se zadržavaju na površinama i da stvaraju mikrokolonije. Pri tome flagele *Listeria monocytogenes* imaju značajnu ulogu (Todhanakasem 2008, Lemon 2007). Gotovo da

se može reći da sposobnost formiranja biofilma diktira novu koncepciju u razumevanju infektivnih oboljenja.

Listeria monocytogenes je mala, pokretljiva, gram-pozitivna bakterija. Ne stvara spore, visoko je otporna i ima štapičasti do kokobacilarni oblik. Optimalna temperatura rasta je od 30-37°C, ali zapravo može da raste na temperaturi od 4-44°C (Holt i sar., 1994). Može da preživi pasterizaciju na 71,6°C u trajanju 15 sekundi. *Listeria monocytogenes* raste u granicama pH između 4,3-9,6.

Ljudi se uglavnom inficiraju kada jedu hranu u kojoj se nalazi *Listeria monocytogenes*. U istraživanjima Ivanović i sar. (2006) dokazano je da se ova bakterija ne samo održava, već i razmnožava na temperaturi od +4 do +8°C i pH 6. Zato hrana koja se nalazi u frižideru može biti rizična za nastajanje infekcije.

Listeria monocytogenes se na ljude najčešće prenosi preko sira, naročito ako je pravljen od nekuvanog mleka, ali i nedovoljno kuvanog i pečenog mesa ali i preko mozga, svinjskog jezika u želudca i kuvanih kobasica.

Ako dospe u organizam čoveka *Listeria monocytogenes* može biti uzročnik invazivne i neinvazivne infekcije. Prema korišćenim literaturnim podacima, invazivna listerioza je retka, godišnje se javi kod 2-9 slučajeva na milion. Ona je jedna od snažnih infekcija prenetih hranom koja u približno 30% slučajeva završava smrću. Listeriozi su predisponirane imunokompromitovane osobe, kao što su oboleli od raka, alkoholičari, dijabetičari, HIV pozitivni, stare osobe, te trudnice i novorođenčad. Kao posledica infekcije sa listerijama, može se javiti oboljenje CNS, septikemija, abortus, infekcija novorođenčadi i dr. Vreme inkubacije kod invazivne listerioze je različito: od jednog dana do nekoliko nedelja.

Listeria monocytogenes može da izazove i kontaktni dermatitis koji je opisan kod veterinara i farmera. Valja napomenuti da ljudi mogu nositi *Listeria monocytogenes* u digestivnom traktu kao normalnu floru. I pored intenzivnih istraživanja o *L. monocytogenes* i listeriozi, još uvek nije poznata minimalna infektivna doza koja dovodi do oboljenja ljudi, nagoveštava se da je to individualna osobina (Autio, 2003). Teškoće u određivanju najmanje infektivne doze za ljude diktirane su u pojedinačnim slučajevima nepoznavanjem imuniteta domaćina i koncentracije patogena u konzumiranoj namirnici. Zbirni podaci sakupljeni nakon nekoliko većih epidemija listerioze upućuju da bi infektivna doza mogla biti vrednosti od 10^7 do 10^{11} CFU po gramu namirnice. Razvoj bolesti moguć je i nakon unosa nižih infektivnih doza. Iz tog razloga su, a zbog učestalosti pojavljivanja epidemija i specifičnih karakteristika ovog patogena, SAD i Novi Zeland odredile takozvanu „nultu toleranciju” za prisustvo *L. monocytogenes* u hrani spremnoj za konzumiranje. Hrana se smatra zaraženom ako se u uzorku od 25 g detektuje *L. monocytogenes*. Evropska unija podržava ovaj normativ procene rizika za meke sireve i pasterizovano mleko (ne sme se naći u 25 g uzorka) kao i za ostale proizvode od mleka (odsustvo u 1 g), a Australija za većinu namirnica spremnih za konzumiranje. Italija, uglavnom, koristi princip „nulte tolerancije” u proceni higijenske ispravnosti hrane kada je *L. monocytogenes* u pitanju (Vesković, 2005). U nastojanju da smanji i eliminiše prisustvo *L.*

monocytogenes u namirnicama, Američka agencija za hranu i lekove (Food and Drug Administration, FDA) je 2006. godine, prvi put odobrila korišćenje *Listeria* specifičnih bakteriofaga kao aditiva mesnim prerađevinama koje se konzumiraju bez dodatne termičke obrade (FDA 2006).

Cilj našeg ispitivanja je bio da se utvrdi da li postoji kontaminacija klaničnih površina i opreme sa *Listeria monocytogenes* nakon klanja koza.

MATERIJAL I METODE

Nakon klanja klinički zdravih koza u klanici, neposredno posle klanja, uzorkovati 20 briseva sa kolica za prihvrat iznutrica, pet briseva sa žleba noževa (između sečiva i drške) i 20 briseva sa poda. Na nekoliko mesta na podu je posle klanja zapaženo prisustvo fecesa zaklanih životinja. Tri dana nakon klanja uzeli smo ponovo briseve sa poda (10 briseva sa različitih mesta) i sa dna kolica (20 briseva) u koja su bili prihvaćeni unutrašnji organi (creva i uterus). Površine sa kojih smo uzimali briseve nakon trećeg dana klanja su prethodno čišćene, prane i dezinfikovane.

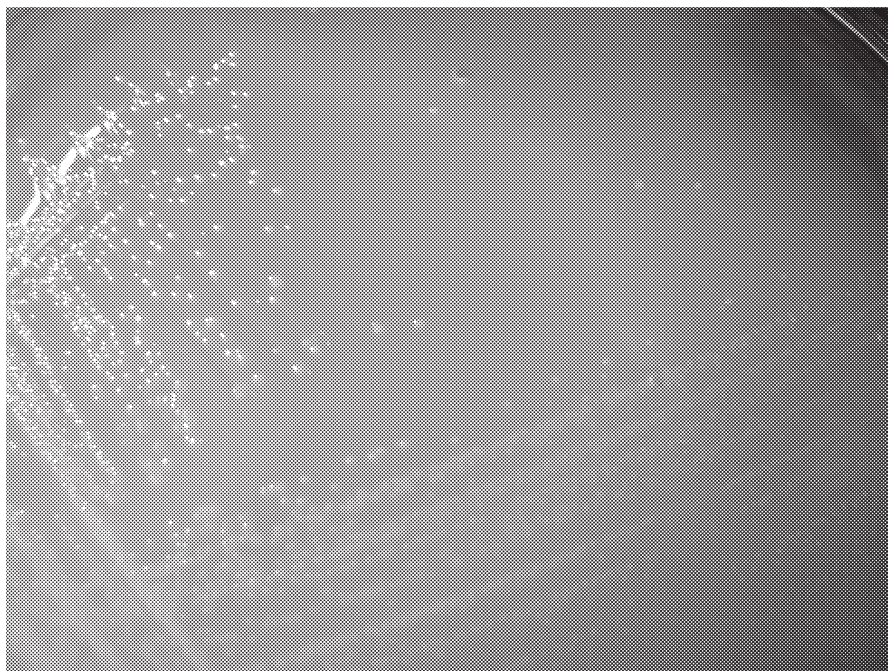
Brisevi su zasejani na selektivni, obogaćeni bujon (*Listeria* enrichment broth Himedia M888) koji je stavljen u frižider na temperaturu od 5-8°C. Treći i sedmi dan su bujoni presejani na krvni agar (5% ovčije krvi), Columbia (Himedia) i MacConkey agar (Biomedics) i inkubirani na temperaturi od 37°C tokom 24-48 h. Suspektne kolonije, sa krvnog i kolumbije agara, mikroskopski su kontrolisane i dalje radi dobijanja čiste kulture, rekultivisane na istu vrstu podloga.

Za ispitivanje biohemijske aktivnosti (oksidaza, VP, urea, Indol, glukoza, salicin, eskulin, manitol, redukcija nitrata, ramnoza i ksiloza) korišćeni su komercijalni testovi (HiMedia). Takođe je urađen test katalaze (ID color Catalase, bioMerieux), pokretljivost kulture na 25°C (api M Medium, bioMerieux) i CAMP test.

Za proveru identifikacije primenjen je BBL Crystal G/P ID kit (Becton Dickinson).

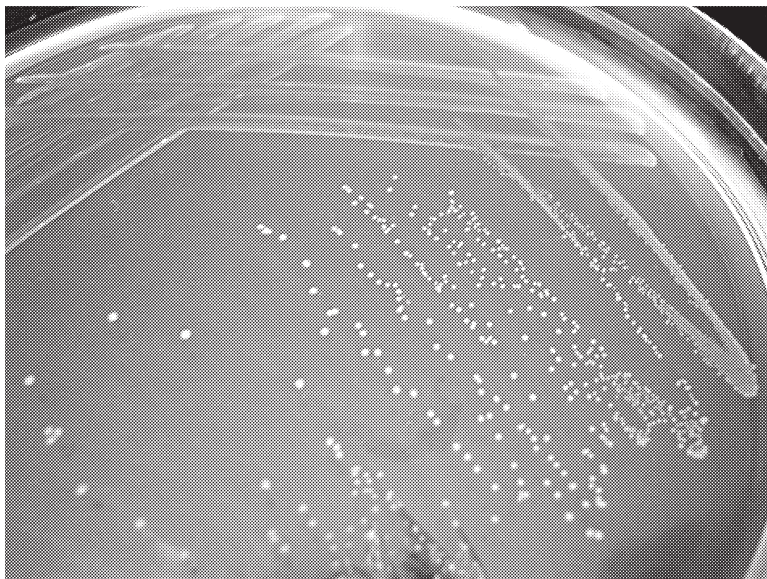
REZULTATI I DISKUSIJA

U našim ispitivanjima iz dva brisa uzetih sa poda, jednog brisa sa noža i dva brisa sa kolica, izolovali smo *Listeria monocytogenes*. Osim iz jednog brisa sa poda, svi sojevi *L. monocytogenes* izolovani su i iz bujona presejanih sedmog dana. *Listeria monocytogenes* je izolovana iz 2 brisa sa poda uzetih tri dana nakon klanja. Ovi sojevi su izolovani i iz bujona presejanih sedmog dana. Izrasle kolonije na krvnom agaru bile su sitne, konveksne, identičnog oblika, okružene uskom zonom hemolize (slika 1).



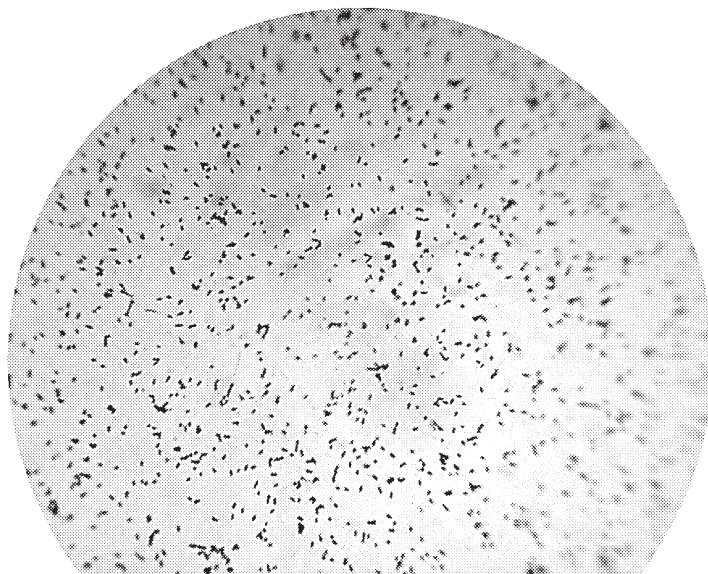
Slika 1. Izgled kolonija na krvnom agaru okružene uskom zonom hemolize

Na Columbia agaru izrasla je kultura u vidu sitnih, transparentnih, sivkastih kolonija (slika 2).



Slika 2. Izgled kolonija na Columbia agaru

U mikroskopskom preparatu urađenom iz kulture, ustanovljeni su gram-pozitivni većinom pojedinačni štapići, rede kokobacilarni oblici (slika 3).



Slika 3. Mikroskopski preparat

U tabeli 1 su prikazani rezultati ispitivanja. Izrasle kolonije su pokazale hemolizu na krvnom agaru, pozitivnu katalaza a negativnu oksidaza reakciju. Kultura je bila pokretljiva na 25°C. Reakcija na VP, eskulin, glukozu, salicin, ramnozu bila je pozitivna a sa ureom, indolom, manitolom, ksilozom je bila negativna. Kultura nije izazvala redukciju nitrata. Pozitivan CAMP test ustanovljen je sa *Staphylococcus aureus* i negativan sa *Rhodococcus equi*.

Tabela 1. Kulturelno-fiziološke i biohemijske osobine izolovane *Listeria monocytogenes*

Hemoliza	+	Glukoza	+
Pokretljivost na 25°C	+	Salicin	+
Katalaza	+	Manitol	-
Oksidaza	-	Ramnoza	+
VP	+	Ksiloza	-
Urea	-	Nitrati	-
Indol	-	CAMP (sa <i>S. aureus</i>)	+
Eskulin	+	CAMP (sa <i>R. equi</i>)	-

Na osnovu rezultata provedenih analiza kultura je identifikovana kao *Listeria monocytogenes* što je u skladu sa njenim karakteristikama koje su opisali Quinn (2002) i Holt (1994). Identifikacija je potvrđena BBL Crystal GP ID kit.

Već je rečeno da su mnoge životinjske vrste prijemčive za listeriju i da se nakon inficiranja kod životinja ne moraju javiti klinički simptomi, te se one u klanicu otpremaju kao zdrave (inaparentna infekcija). Kada tako inficirana životinja dođe na klanje, uzročnik se može preneti na meso i opremu, zidove, podove, što potvrđuju naši rezultati. Oprema u klanici je brojna i različita, sa mestima pogodnim za održavanje nečistoće što otežava njeno pranje, čišćenje i dezinfekciju. To je i razlog da oprema i pribor mogu kod nepravilnog održavanja, naknadno kontaminirati meso i proizvode od mesa. Naši nalazi *Listeria monocytogenes* u brisevima, trećeg dana od momenta klanja, kada je prethodno izvršeno čišćenje, pranje i dezinfekcija u saglasnosti su sa saopštenjima Rij-a i sar. (2003), koji je saopštio da sojevi *Listeria monocytogenes* na opremi i priboru mogu opstati više meseci, pa i godina.

ZAKLJUČAK

Rezultati naših ispitivanja u saglasnosti su sa literaturnim podacima i ukazuju na mogućnost indirektnog puta prenosa *Listerije monocytogenes* na meso. Višegodišnja epizootiološko-epidemiološka istraživanja listerioze pokazuju da su osnovni vektori prenosa ovog patogena u lanac ljudske ishrane namirnice animalnog porekla. Posebno značajnom smatramo činjenicu da *L. monocytogenes* formira biofilm a poznata je prednost života u biofilmu, u smislu povećane otpornosti bakterija, i to ne samo prema antibioticima već i prema dezinficijensima i deterdžentima (Borucki, 2003). Prisustvo biofilмова u pogonima prehrambene industrije nesumnjivo predstavlja potencijalnu opasnost mikrobiološke kontaminacije proizvoda, opreme i prostora, bilo patogenim, bilo bakterijama koje dovode do kvarenja namirnica (Chmielewski, 2006). Svojom održivošću, prisustvo biofilмова može da dovede i do naknadne mikrobiološke kontaminacije što može dovesti do skraćanja roka trajanja namirnica, ali i širenja i prenosa patogena kao što je to slučaj sa *L. monocytogenes*. Mogućnost formiranja biofilma od strane *L. monocytogenes*, a i drugih bakterija, treba svakako imati na umu prilikom implementacije i održavanja HACCP sistema. Intenziviranjem prehrambene industrije raste i broj faktora rizika po bezbednost hrane. Stoga u svrhu prevencije posebnu pažnju treba posvetiti održavanju higijene opreme, pribora i prostorija u kojima se hrana proizvodi a sve u cilju zaštite zdravlja ljudi. Tome u prilog govori i činjenica da je već dugo radna sredina prepoznata kao potencijalni izvor zdravstvenog rizika. Pravilna procena uticaja radnog procesa na zdravlje, preduslov je za odgovarajuće preventivne aktivnosti i zaštitu zdravlja ljudi određenih zanimanja u konkretnom radnom procesu ali istovremeno i sprečavanje prenosa patogena putem hrane. Sve to ima poseban značaj i dimenziju u celokupnom tehnološkom procesu proizvodnje kvalitetne i zdravstveno bezbedne hrane (Moretro i sar., 2004).

LITERATURA

1. Autio T.: Tracing the sources of *Listeria Monocytogenes* contamination and listeriosis using molecular tools. Academic disertation, Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Helsinki, Finland, 2003.
2. Borucki M.K., Peppin J.D., White D., Loge F., Call D.R.: Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*, *Apl Envir Microbiol*, 69, 12, 7336-7342, 2003.
3. Chmielewski R.A.N., Frank J.F.: Biofilm formation and control in food processing facilities, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 1, 22-32, 2006.
4. FDA Approval of *Listeria*-specific Bacteriophage Preparation on Ready-to-Eat (RTE) Meat and Poultry Products. U Washington D. C., S. Food and Drug Administration, 2006. <http://www.cfsan.fda.gov/dms/opabacqa.html>.)
5. Harvey J., Keenan K.P., Gilmour A: Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains *Food Microbiology*, 24, 4, 380-392, 2007.
6. Holt J.G., Noel R., Krieg P., Sneath H. A., Staley J. T., Stanley T. W.: Bergey's manual of determinative bacteriology, Williams& Wilkins, 1994.
7. Infectious Disease Epidemiology Section: Office of Public Health, Louisiana, Dept of Health&Hospitals, 2004.
8. Ivanović S., Žutić M., Radanović O., Puškarica M.: Slaughterhouse as reservoir of *Listeria monocytogenes* Proceedings of 5th International symposium on biocides in public health and environment, 5th International symposium on antisepsis, disinfection and sterilization, Belgrade conference on vector control in urban environments, Belgrade, 2006, 126-128.
9. Lemon K.P., Higgins D.E, Kolter R.: Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J Bacteriol.*, 189, 12, 4418-24, 2007.
10. Milanov D., Ašanin R., Vidić B., Krnjaić D., Petrović J., Savić S.: Scanning electron microscopy of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces, *Acta Veterinaria*, 59, 4, 423-435, 2009.
11. Moretro T., Langsrud S.: *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments, *Biofilm*, 1-2, 107-121, 2004.
12. Reij M. W., Aantrekker E.D.: Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 1-11, 2003.
13. Todhanakasem T., Young G.M.: Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. *J Bacteriol. Sep*, 190, 17, 6030-4, 2008.
14. Vesković S.: Uticaj bakteriocina *Leuconostoc mesenteroides* E 131, *Lactobacillus sakei* I 154 na *Listeria Monocytogenes* u toku proizvodnje sremske kobasice. Magistarska teza. Zemun, Poljoprivredni fakultet, 2005.
15. Quinn P.J.: Veterinary Microbiology and Microbial Disease. London, Blackwell Science Ltd, UK, 2002.

16. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR Clinical Veterinary Microbiology, London, Mosby, 2000.

Istraživanje je vršeno u okviru projekta TP 20005 „Unapređenje proizvodnih svojstava i kvaliteta mesa koza i jaradi u ekološkom sistemu gajenja” koji finansira Ministarstvo za nauku Republike Srbije.

Primljeno: 19.11.2009.

Odobreno: 20.11.2009.