

# Prisutnost sulfitreducirajućih klostridija u gotovim jelima prikupljenim u restoranima na području Primorsko-goranske županije

---

Čimbora, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:653613>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dora Čimbora

**PRISUTNOST SULFITREDUCIRAJUĆIH KLOSTRIDIJA U  
GOTOVIM JELIMA PRIKUPLJENIM U RESTORANIMA NA  
PODRUČJU PRIMORSKO-GORANSKE ŽUPANIJE**

Diplomski rad

U Rijeci, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dora Čimbora

**PRISUTNOST SULFITREDUCIRAJUĆIH KLOSTRIDIJA U  
GOTOVIM JELIMA PRIKUPLJENIM U RESTORANIMA NA  
PODRUČJU PRIMORSKO-GORANSKE ŽUPANIJE**

Diplomski rad

U Rijeci, 2022.

Mentor rada: izv.prof.dr.sc. Darija Vukić Lušić, dipl.sanit.ing.

Diplomski rad ocjenjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad sadrži \_\_\_\_\_50\_\_\_\_\_ stranica, \_\_\_\_\_15\_\_\_\_\_ slika, \_\_\_\_\_2\_\_\_\_\_ tablica, \_\_\_\_\_44\_\_\_\_\_ literaturnih  
navoda.

## ZAHVALA

*Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Dariji Vukić Lušić, dipl.sanit.ing. koja mi je bezuvjetno omogućila sve potrebne informacije, opremu i savjete kako bi ovaj diplomski rad bio uspješno odrađen.*

*Posebno se zahvaljujem roditeljima, sestri i prijateljima koji su razumjeli važnost studiranja te me, financijski i motivacijski, podržavali od samoga početka te da bi akademske godine prošle sa što manje stresa.*

*Na kraju, htjela bih se zahvaliti Zavodu za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije na ustupljenoj pomoći i materijalima što je dodatno olakšalo pisanje rada.*

*Ovaj rad posvećujem obitelji, prijateljima i EXO koji su mi bili životna inspiracija i naučili me da nikada ne treba odustati od svojih ciljeva. Hvala vam od srca.*

*Dora Čimbora*

## SAŽETAK:

Zdravstvena ispravnost hrane jedna je od osnovnih pretpostavki ljudskog zdravlja. U ovom radu ispitana je prisutnost sulfitreducirajućih klostridija u nekoliko vrsta hrane uzete u restoranima i drugim javnim objektima na području Primorsko-goranske županije u razdoblju između 2015. i 2020. godine. Ukupno je analizirano 7710 uzoraka u kojima je ispitan pokazatelj sulfitreducirajuće klostridije i još nekoliko mikrobioloških pokazatelja temeljem kojih se ocjenjuje zdravstvena ispravnost hrane.

Prema dobivenim rezultatima, od 7710 ispitanih uzoraka, 1,4% (N=176) je bilo pozitivno na pokazatelj sulfitreducirajuće klostridije. Od toga, koncentracija bakterija je kod 61% (N=108) uzoraka bila iznad maksimalno dopuštenih koncentracija za određenu kategoriju hrane, prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2011.). U promatranom razdoblju najveći broj ispitivanja na parametar sulfitreducirajuće klostridije zabilježen je 2019. (N=1475) i 2018. (N=1418) godine. Najviši postotak pozitivnih rezultata (2,3%) uočen je 2017. godine. Prema sezonama, najizraženija raširenost sulfitreducirajućih klostridija utvrđena je tijekom ljetnih mjeseci, u srpnju i rujnu. Prema vrsti hrane, 50% pozitivnih uzoraka utvrđen je u kategoriji gotove hrane (N=54), slijedi led, začini, tvrdi sirevi, med i različiti mesni proizvodi. Obzirom na vrstu objekta u kojem je uzorkovanje provedeno, utvrđeno je da je najveći udio pozitivnih uzoraka (27,8%) gotove hrane na sulfitreducirajuće klostridije uzorkovan u restoranima. Pokazatelj sulfitreducirajuće klostridije statistički je značajno povezan s ostalim mikrobiološkim pokazateljima kontaminacije hrane, ukupnim aerobnim mezofilnim bakterijama (UBB), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i enterobakterijama.

Rezultati nam govore da prilikom pripreme i skladištenja hrane treba uložiti dodatne napore za praćenje i dokumentiranje kritičnih kontrolnih točaka, kao i educirati osoblje i korisnike o dobroj higijenskoj praksi.

**Ključne riječi:** sulfitreducirajuće klostridije, Primorsko-goranska županija, gotova hrana, restorani

## **ABSTRACT:**

Food safety management is one of the keypoints to ensure human health. This thesis was based on examining the presence of sulphite-reducing Clostridia in several types of food taken in restaurants and other public facilities in the area of Primorje-Gorski Kotar County between 2015. and 2020. A total of 7,710 samples were analysed for the presence of sulphite-reducing Clostridia and several other microbiological indicators and results were used to determine food safety.

According to the obtained results, out of the 7710 samples examined, 1,4% (N=176) tested positive for the sulphite-reducing Clostridia. Out of positive results, the concentration of bacteria in 61% (N=108) of samples were above the maximum permissible concentrations for a particular food category, according to the Guide to Microbiological Criteria for Food (2011). In the observed period, the largest number of analysis for the sulphite-reducing Clostridia was recorded in year of 2019. (N=1475) and 2018. (N=1418). The highest percentage of positive results (2.3%) was observed in 2017. Based on the seasons, the most evident prevalence of sulphite-reducing Clostridia was established during the summer months, in July and September. Based on the type of food, 50% of the positive samples were found in the category of prepared meals (N=54), followed by ice, spices, hard cheeses, honey and various meat products. Given the type of facility in which the sampling was carried out, it was concluded that the highest quantity of positive samples (27.8%) of prepared food on sulphite-reducing Clostridia were sampled in restaurants. The indicator sulphite-reducing Clostridia is statistically significantly associated with other microbiological indicators of food contamination, aerobic mesophilic bacteria (UBB), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae*.

The results tell us that, when preparing and storing food, additional efforts should be made to monitor and document critical checkpoints, as well as to educate staff about good hygiene practices.

**Keywords:** sulphite-reducing Clostridia, Primorje-Gorski Kotar county, prepared food, restaurant

## Sadržaj:

<b>1</b>	<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1	Hrana kao život .....	1
1.2	Faktori koji utječu na mikrobiološki rast u hrani.....	2
1.2.1	Temperatura.....	2
1.2.2	pH.....	3
1.2.3	Aktivitet vode.....	3
1.2.4	Ostali čimbenici rasta .....	3
1.3	Sulfitreducirajuće klostridije .....	4
1.3.1	<i>Clostridium perfringens</i> .....	4
1.3.1.1	Općenito o <i>C. perfringens</i> .....	4
1.3.1.2	Izvori <i>C. perfringens</i> .....	8
1.3.1.3	Patogeneza <i>C. perfringens</i> .....	9
1.3.1.4	Prevenција i liječenje.....	11
1.3.2	<i>Clostridium botulinum</i> .....	12
1.3.2.1	Općenito o <i>C. botulinum</i> .....	12
1.3.2.2	Izvori <i>C. botulinum</i> .....	15
1.3.2.3	Patogeneza <i>C. botulinum</i> .....	16
1.3.2.4	Prevenција i liječenje.....	17
1.4	Zakonska regulativa Republike Hrvatske.....	18
<b>2</b>	<b>CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>21</b>
3.1	Svrha i područje primjene.....	21
3.2	Uzimanje uzoraka.....	21
3.3	Transport uzoraka .....	22
3.4	Horizontalna metoda za brojenje sulfitreducirajućih bakterija u anaerobnim uvjetima HRN ISO 15213:2004.....	22
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>30</b>
4.1	Deskriptivna statistika .....	30
4.2	Korelacijska analiza .....	36
<b>5</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>50</b>



# 1 UVOD

## 1.1 Hrana kao život

Hrana je, uz vodu i zrak, osnovna potreba svakog živog bića. U biološkom smislu, hranom podrazumijevamo svaku tvar koja posjeduje nutritivnu vrijednost i namijenjena je konzumaciji u svrhu održavanja života ljudi, životinja, biljaka (1).

Svaka hrana, osim nekoliko sterilnih namirnica, predstavlja vrlo povoljan medij za razvoj barem jedne vrste mikroorganizama. Bakterije, virusi, kvasci, plijesni, alge i protozoe su živa bića mikroskopske veličine i mogu se razmnožavati gotovo svugdje, u ili na ljudskom i životinjskom tijelu, biljkama ili drugim živim bićima, kao u vodi i u hrani. Dok određeni mikroorganizmi imaju poželjne uloge u proizvodnji hrane (npr. fermentirana hrana), drugi mogu uzrokovati kvarenje ili bolesti prilikom konzumacije (2).

Pristup dovoljnim količinama zdravstveno sigurne, kemijski i mikrobiološki prihvatljive hrane, ključno je za održavanje života i promicanje zdravlja. Svaka hrana koja sadrži štetne bakterije, viruse, parazite ili kemijske tvari može uzrokovati više od 200 različitih bolesti, od proljeva pa čak i do raka. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (eng. World Health Organization, WHO) procjenjuje se da se nakon konzumacije kontaminirane hrane simptomi bolesti godišnje pojave kod 600 milijuna ljudi. Od navedenih 600 milijuna oboljelih ljudi, 420 000 slučajeva je sa smrtnim ishodom (3).

## 1.2 Faktori koji utječu na mikrobiološki rast u hrani

### 1.2.1 Temperatura

Kada se govori u čimbenicima koji utječu na mikrobno ponašanje u hrani, temperatura je zasigurno najvažnija. Prema temperaturnim rasponima rasta, mikroorganizmi se mogu razvrstati u tri skupine:

- psihrotrofi – koji dobro rastu na 7°C ili niže (optimalan rast je u temperaturnom rasponu od 20–30°C)
- mezofili – koji dobro rastu između 20 i 45°C (optimalan rast je u temperaturnom rasponu od 30–40°C)
- termofili – koji dobro rastu na 45°C ili više (optimalan rast je u temperaturnom rasponu od 55–65°C)

Većina patogena koji se prenose hranom su mezofilni mikroorganizmi, osim nekoliko baakterija u čiju grupu spada i *Clostridium botulinum* tipa E, koji pokazuje izrazito psihrofilno ponašanje.

Jedan od najvažnijih načina usporavanja mikrobne metaboličke aktivnosti u hrani je skladištenje na niskim temperaturama (4). Inkubacijom na niskim temperaturama moguće je izmijeniti lipidni sastav mikrobnih stanica. Kako se temperatura snižava, bakterije i kvasci sadrže sve veći udio nezasićenih masnih kiselina. Stoga lipidne komponente membrane, koje su uobičajeno tekuće, snižavanjem temperature prelaze u stanje poput gela i onemogućuju pravilno funkcioniranje proteina pa membrana puca. Međutim, preinakama u sastavu fosfolipida i glikolipida dolazi do optimizacije fluidnosti membrane, sprječavanja nastanka gela i tako lakšeg prolaska hranjivih tvari potrebnih organizmu za rast. Drugi odgovor na naglo sniženje temperature uključuje ekspresiju gena, nazvan odgovor hladnog šoka. Odgovor hladnog šoka uključuje indukciju proteina hladnog šoka (nukleaze, helikaze itd.) i proteina protiv smrzavanja, te potiskivanje proteina toplinskog šoka. No, hladni stres ponekad nije učinkovit (5). Učinak hladnog stresa ovisi o brojnim čimbenicima, kao što su temperatura, brzina hlađenja/smrzavanja, medij kulture te vrijeme skladištenja. Niske temperature zaustavit će razvoj mezofila i termofila, ali ne i psihrotrofa čiji je rast moguće zaustaviti podešavanjem drugih unutarnjih i vanjskih čimbenika (4).

### 1.2.2 pH

Većina mikroorganizama najbolje raste pri neutralnim pH vrijednostima, oko 7,0. Bakterije su, za razliku od kvasaca i gljivica, u pravilu osjetljivije na pH uvjete, iako neke mogu rasti i pri vrijednostima  $\leq 4,0$ . Neki patogeni mikroorganizmi, poput *C. botulinum*, neće rasti na pH vrijednostima ispod 4,6. Zbog različitog patogenog potencijala, upravo se vrijednost od pH=4,6 koristi kao granica za razvrstavanje hrane na dvije kategorije: hranu niske kiselosti (pH>4,6) i hrane visoke kiselosti (pH<4,6). Vrijednosti pH osobito su važne i kod predviđanja intenziteta termičke obrade hrane niske i visoke kiselosti (4).

### 1.2.3 Aktivitet vode

Aktivitet vode (eng. water activity,  $a_w$ ) predstavlja količinu vode dostupne za metaboličke reakcije unutar stanice. U svježoj hrani aktivitet vode prelazi 0,99. Općenito, Gram-negativnim bakterijama je potrebna viša vrijednost aktiviteta vode za rast u odnosu na Gram-pozitivne. Najniža vrijednost aktiviteta vode koja je potrebna bakterijama za rast 0,75 (halofilne bakterije), dok kserofilne plijesni i osmofilni kvasci mogu rasti na 0,65. Redukcija vrijednosti aktiviteta vode, u odnosu na optimalnu vrijednost za rast mikroorganizama, dovodi do odgađanja diobe stanica, ograničavanja brzine rasta, te smanjenja broja mikrobnih stanica (6).

### 1.2.4 Ostali čimbenici rasta

Uz temperaturu, pH i aktivitet vode i drugi značajno utječu na rast bakterija, primjerice redoks potencijal (Eh), sustav pakiranja, struktura hrane, relativna vlaga i atmosferski sastav zraka (4).

## 1.3 Sulfitreducirajuće klostridije

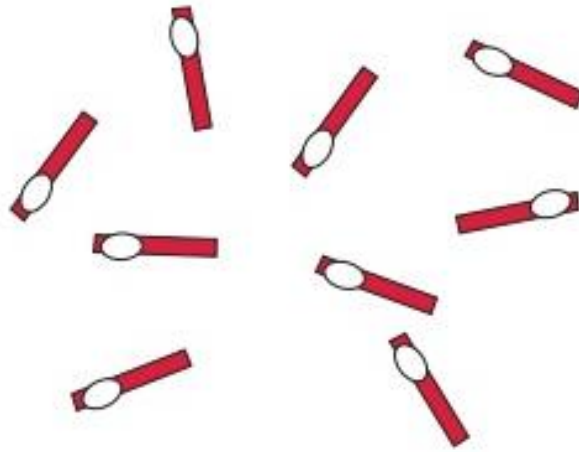
*Clostridium spp.* su anaerobne bakterije koje se najčešće povezuju s hranom. Široko su rasprostranjene u tlu, mulju i prašini, ali i u probavnom sustavu ljudi i životinja. Pokazuju veliku raznolikost u metaboličkoj aktivnosti i nutritivnim zahtjevima. Kako su klostridije prilično heterogena skupina bakterija, nije dostupan medij koji bi poticao rast svih klostridija te istovremeno zaustavljao rast cjelokupne kompetitivne flore. Veliki broj klostridija u anaerobnim uvjetima reduciraju sulfit u sulfid uz pojavu crnih točkica željeznog sulfida (7). U skupinu sulfitreducirajućih klostridija spadaju bakterije *C. perfringens* i *C. botulinum*, koje su jedan od najčešćih uzročnika bolesti prilikom konzumacije kontaminiranih namirnica. Ove bakterije rastu u uvjetima bez prisutnosti kisika, a u nepovoljnim uvjetima stvaraju spore. Sulfitreducirajuće klostridije često su povezane s fekalnom kontaminacijom hrane (8).

### 1.3.1 *Clostridium perfringens*

#### 1.3.1.1 Općenito o *C. perfringens*

*Clostridium perfringens* (*Clostridium welchii*) još je od 1892. godine poznat uzročnik plinske gangrene, ozbiljne infekcije rana, kada je prvi put opisan od strane američkog bakteriologa Welch. Iako su znanstvenici već 1895. i 1899. godine povezali *C. perfringens* s epidemijom gastroenteritisa u bolnici St. Bartholomew u Londonu, tek je sredinom 1840-ih godina utvrđeno da je *C. perfringens* uzročnik trovanja hranom. Tada je povezan s epidemijom koja se širila putem školskih obroka u Engleskoj 1943. godine, te kuhanih obroka od piletine u SAD-u 1945. godine (9). Prema podacima EFSA-e (eng. *European Food Safety Authority*), u Republici Hrvatskoj je posljednja epidemija trovanja hranom uzrokovana *C. perfringens* zabilježena 2018. godine, kada je oboljelo 40 osoba nakon konzumiranja pečenog graha iz kantine na poslu (10). Prema podacima CDC (eng. *Centers for Disease Control and Prevention*), epidemije se najčešće javljaju na mjestima na kojima se hrana poslužuje velikim grupama ljudi, a obzirom na sezonalnost, uglavnom se pojavljuje u studenom i prosincu za vrijeme blagdana (11).

*Clostridium perfringens* je Gram-pozitivna, anaerobna bakterija koja tvori ovalne subterminalne spore te se pod mikroskopom vidi u obliku štapića. *C. perfringens* se od većine drugih klostridija, razlikuje po tome što su štapići relativno veliki (1x3-9  $\mu\text{m}$ ), kapsulirani i nepomični. Unatoč tome što je katalaza–negativan anaerob, *C. perfringens* još uvijek može rasti u prisustvu do 6% kisika, na temperaturama u rasponu od 12°C do 50°C (temperaturni optimum je 43°C do 47°C). Vegetativne stanice ne pokazuju izraženu toleranciju na kiselinu (optimalnim pH 6.0-7.5), minimalni aktivitet vode ( $a_w$ ) potreban za rast je 0.95-0.97 a koncentracije soli ne smiju prelaziti više od 6% (8). Vegetativne oblike ove bakterije ubija temperatura od 59°C tijekom 8 min., a spore temperatura od 99°C tijekom 32 minute.



Slika 1. Prikaz *C. perfringens* s ovalnim, subterminalnim sporama

(izvor: [https://www.brainkart.com/article/General-Properties-of-Clostridia\\_18077/](https://www.brainkart.com/article/General-Properties-of-Clostridia_18077/))

Virulencija *C. perfringens* uvelike ovisi o proizvodnji toksina, kojih prema podacima iz literature ima 17 vrsta. Obzirom da pojedinačni izolati ove bakterije ne proizvode sve toksine, *C. perfringens* se svrstava u jednu od pet vrsta (A-E). Tako *C. perfringens* Tip A gotovo uvijek izlučuje toksin tipa A (12). Iako su svi sojevi *C. perfringens* patogeni, samo sojevi Tipa A i C su štetni za ljude dok su Tip B, C, D i E životinjski patogeni (13).

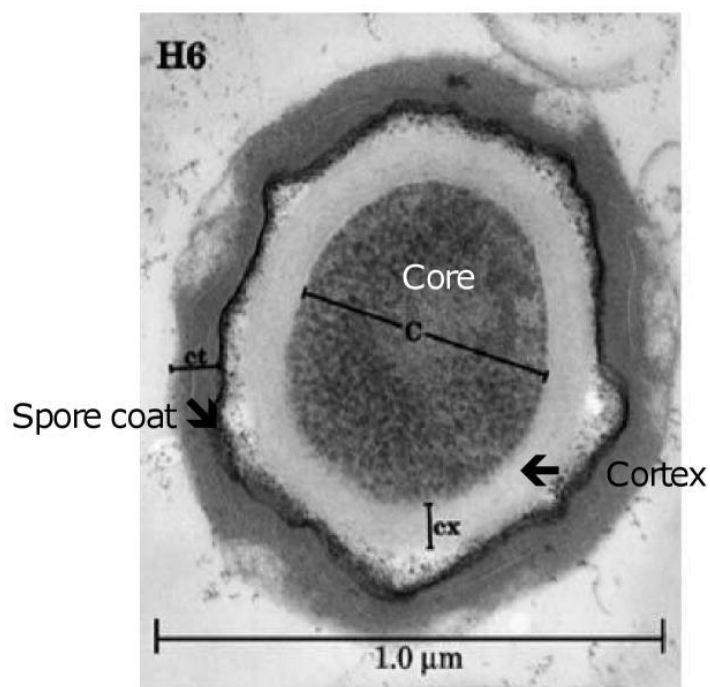
#### 1.3.1.1.1 Stanični ciklus *C. perfringens*

##### 1.3.1.1.1.1 Vegetativan rast stanice

Najbolji medij za rast *C. perfringens* je hrana bogata aminokiselinama i vitaminima, poput mesa i ribe. Uspoređujući s ostalim mikroorganizmima, *C. perfringens* ima najbržu stopu rasta, uz generacijsko vrijeme od 6,3 minute u bujonu i 6,6 minuta u mesu, na temperaturama između 43-47°C. Prilikom pripreme gotove hrane mikroorganizmi se podvrgavaju brojnim temperaturnim promjenama. U cilju inhibicije rasta mikroorganizama hrana se uobičajeno čuva u hladnim uvjetima ispod 7°C ili na temperaturama iznad 60°C. Međutim, spore *C. perfringens* preživljavaju temperature kuhanja. Kod čuvanja hrane na nedovoljno visokim temperaturama riskira se da temperatura padne ispod 50°C, pri čemu se događa klijanje (germinizacija) ove bakterije. Također, neadekvatno zagrijavanje i skladištenje na visokim temperaturama će rezultirati povećanjem termo-rezistencije vegetativnih stanica induciranjem sinteze proteina toplotnog šoka (14). Iako je držanje hrane na visokim temperaturama kritična točka, hlađenje je isto tako važno. Naknadno hlađenje ili zamrzavanje hrane reducira broj *C. perfringens*. Također, pH hrane ispod 5,0 i vrijednosti aktiviteta ispod 0,94-0,96 inhibira rast ovog patogena.

##### 1.3.1.1.2 Spore *C. perfringens*

Proces sporulacije podrazumijeva prijelaz iz metabolički aktivne vegetativne stanice u metabolički inaktivnu, dehidratiziranu, vrlo otpornu sporu. Bakterijske spore omogućuju preživljavanje bakterija čak i stotinama godina (15). Spore *C. perfringens* sastoje se od nekoliko različitih strukturnih slojeva, koji doprinose svojstvima rezistencije na ekstremne uvijete. Za razliku od nekih drugih sporogenih mikroorganizama, *C. perfringens* ne posjeduje egzospore pa se vanjski sloj sastoji od omotača spore. Funkcija omotača spore još nije u cijelosti proučena, ali se smatra da se sastoji od više od 50 različitih proteina koji pružaju zaštitu od reaktivnih kemikalija i litičkih enzima. Ispod omotača spore, nalazi se vanjska membrana koja ne služi kao zaštita sporama već sudjeluje u formaciji spore. Korteks spore se sastoji od peptidoglikana koji čini vanjsku membranu i tako sudjeluje u dehidrataciji stanice time povećavajući rezistenciju na određene kemikalije i okolišni stres. Unutarnja membrana je vrlo kompaktna i sadrži vrlo nepokretne lipide što rezultira niskom permeabilnošću malih molekula, kao što su voda i kemikalije koje oštećuju DNA. Najdublji sloj jezgre spore sadrži DNA i RNA spore, te enzime (9).



Slika 2. Ultrastruktura spore *C. perfringens*  
(izvor: <https://europepmc.org/article/MED/27337447>)

Radi preživljavanja nepovoljnih uvjeta, *C. perfringens* se podvrgava asimetričnoj podjeli citoplazmatske membrane. Sporulacija je genski kontrolirana i dolazi do odvajanja dva odjeljka, (mali odjeljak–forespora i veliki odjeljak–matična stanica) svaki s kompletnim genomom. Nakon niza biokemijskih i morfoloških promjena, forespora postaje zrela spora *C. perfringens* i oslobađa se u okoliš nakon lize matične stanice. Sporulacija izravno doprinosi patogenezi *C. perfringens* jer dovodi do sinteze *C. perfringens* enterotoksina (eng. Clostridium perfringens enterotoxin, CPE) i oštećenja crijeva epitelnih stanica (16).

### 1.3.1.2 Izvori *C. perfringens*

*C. perfringens* ubikvitaran je mikroorganizam koji se može naći u različitim okruženjima. Dio je normalne flore gastrointestinalnog sustava i kože ljudi i životinja (17). Obzirom da *C. perfringens* tvori spore koje štite stanicu, može se naći i u tlu, prašini i zagađenoj vodi gdje inače vladaju nepovoljni uvjeti za rast bakterija (18). U ljudski (ili životinjski) organizam mogu se unijeti direktno putem zagađene hrane ili vode, ali moguć je i prijenos putem predmeta koji se koriste prilikom pripremanja hrane, a izvor zaraze može biti i zaražena osoba. Endogena flora zdravih osoba sadrži manje od  $10^3$ - $10^5$  CFU/g *C. perfringens* bakterija u fecesu, dok kod trovanja hranom njihov broj raste  $10^3$ - $10^6$  CFU/g (19).

*C. perfringens* se najčešće izolira iz mesnih proizvoda i to iz sirovog mesa (66% svježe svinjsko meso, 26% svježe goveđe meso, 81% obrađeno svinjsko meso, itd.) (13). Također, veliki izvor *C. perfringens* predstavljaju različiti začini, od kojih je čak 59% uzoraka kontaminirano (20).



### 1.3.1.3 Patogeneza *C. perfringens*

#### 1.3.1.3.1 Histotoksične infekcije

Klostridijalna mionekroza ili plinska gangrena je vrlo smrtonosna, nekrotizirajuća infekcija skeletnih mišića i potkožnog tkiva, najčešće uzrokovana *C. perfringens* tipom A (21). Patogenezu plinske gangrene prvenstveno opisuje invazija rane zadobivene nakon traume ili deoksigeniranog tkiva od strane *C. perfringens* (22). Plin koji *C. perfringens* stvara u deoksigeniranoj rani (posebno ugljični dioksid) lokalno se širi duž fascijalnih pojasa pri čemu ne dolazi do bakterijemije i zahvaćanja zdravih tkiva pa time ne dolazi do ranog prepoznavanja bolesti i eventualnog odstranjenja oštećenog tkiva. Bolest se razvija vrlo brzo, nakon 5–48 sati te se u zaraženoj rani stvaraju karakteristični mjehurići plina. Stvoreni eterotoksini (uglavnom fosfolipaze C i citolizini) mogu dovesti do poremećaja zgrušavanja krvi te izazvati sistemsku toksemiju i šok. Učestalost plinske gangrene kod ljudi je niska, ali smrtnost je i dalje relativno visoka. Uz pomoć brze dijagnoze i odgovarajućeg liječenja (kirurška njega, liječenje antibioticima i hiperbarična terapija kisikom) smrtnost varira između 5% i 30%. Ukoliko se ne liječi, bolest doseže 100%-tnu smrtnost. Ponekada je potrebna i amputacija zahvaćenog tkiva. Učestalost plinske gangrene u Sjedinjenim Američkim Državama je oko 1.000 slučajeva godišnje. No, taj broj je zasigurno veći tijekom prirodnih katastrofa kao što su potresi (23).

### 1.3.1.3.2 Bolesti koje se prenose hranom

*C. perfringens* je uzročnik mnogih manjih epidemija koje se prenose hranom. Trovanje *C. perfringens* tipom A uobičajeno započinje konzumiranjem hrane kontaminirane velikim brojem vegetativnih stanica kromosomskog soja tipa A koji producira enterotoksin (CPE). Infektivna doza je viša od  $10^6$ - $10^7$  cfu/g vegetativnih stanica *C. perfringens*. Veliki broj vegetativnih stanica biva uništen od strane želučane kiseline, no ako je stupanj kontaminacije velik, stanice preživljavaju i putuju u tanko crijevo. Nakon početnog rasta, te stanice *C. perfringens* zatim prolaze in vivo sporulaciju. Tijekom *in-vivo* množenja u tankom crijevu, CPE-pozitivan soj *C. perfringens* počinje proizvoditi enterotoksin (CPE). CPE se ne izlučuje iz organizma već se akumulira u matičnoj stanici. Nakon lize matične stanice radi oslobađanja zrele endospore, CPE se počinje lučiti u crijevni lumen, brzo se veže za receptore na epitelnim stanicama u crijevnoj sluznici i oštećuje ih (24).

Način djelovanja CPE:

1. CPE se veže za receptore enterotoksina klauđin, na apikalnoj površini epitelnih stanica, tvoreći mali kompleks
2. mali se kompleks oligomerizira na površini stanice kako bi se stvorila prepora CH-1
3. formirana prepora se ugrađuje u membranu i tvori aktivnu poru koja uzrokuje promjene u permeabilnosti stanica za male molekule
4. kao rezultat, kalcij ulazi u stanicu i uzrokuje apoptozu (niske doze CPE) ili onkozu (visoke doze CPE) (12).

Trovanje hranom s *C. perfringens* tip A je relativno blago a manifestira se kao proljev i grčevi u trbuhu. Simptomi se obično pojavljuju unutar 8-22 h od konzumacije kontaminirane hrane i obično spontano prolaze unutar 24 sata. Zabilježeni su i slučajevi kod kojih su pacijenti imali slabe simptome koji su trajali do dva tjedna. Smrtni slučajevi nisu česti i obično se pojavljuju kod starijih i fizički oslabljenih osoba zbog komplikacija dehidracije. Bolesti *C. perfringens* tipa A ne mogu se širiti s osobe na osobu zbog vrlo velike infektivne doze. Liječenje je simptomatsko, bez primjene antibiotika.

*C. perfringens* također može uzrokovati klostridijski nekrotizirajući kolitis (Pigbel). To je teška, segmentalna upala jejunuma i ileuma s različitim stupnjem nekroze, krvarenja pa čak i perforacije stjenke crijeva. Bolest uzrokuje klostridijski  $\beta$ -toksin, koji je vrlo osjetljiv na proteolitičke enzime, a inaktivira ga i obično kuhanje. Uglavnom zahvaća osobe s rizičnim čimbenicima, kao što je prehrana u kojoj postoji nedostatak bjelančevina (nedovoljna sinteza enzima proteaza), dijeta koja sadrži inhibitore tripsina (slatki krumpir), loša higijena prehrane, itd. Ova vrsta kolitisa je vrlo rijetka i slučajevi su zabilježeni uglavnom na nekim područjima Nove Gvineje, Afrike, središnje i južne Amerike te Azije. Težina bolesti varira od blagog proljeva do jakih bolova u trbuhu, povraćanja, krvavim stolicama, te ponekada i smrti. Liječi se antibioticima (penicilin G ili metronidazol) (24).

#### 1.3.1.4 Prevenirija i liječenje

Prevenirija trovanja hranom uzrokovanim *C. perfringens*, uključuje brzo hlađenje hrane ili temeljitog zagrijavanja ostataka hrane (kako bi temperatura unutar hrane bila oko 75°C) prije posluživanja. Da bi se olakšalo brzo hlađenje, hranu treba distribuirati u malim porcijama, te u plitkim spremnicima. U velikim kuhinjama važno je maksimalno smanjivati period između pripreme i posluživanja hrane (25). Također je bitno da hladnjaci postižu temperaturu ispod 6°C (12). Vrlo je važno voditi računa o dezinfekciji i higijeni ruku, površina na kojima se priprema hrana te pribora koji se koriste prilikom pripreme hrane.

## 1.3.2 *Clostridium botulinum*

### 1.3.2.1 Općenito o *C. botulinum*

*Clostridium botulinum* je Gram-pozitivna bakterija koja se pod mikroskopom vidi u obliku štapića, a veličine je 2-10 µm. Pokretna je s peritrihijalnom flagelom. *C. botulinum* je obligatni anaerob i formira centralne ili subterminalne spore (9). Također stvara botulinum toksin koji spada u kategoriju najtoksičnijih poznatih supstanci s letalnom dozom od svega 30-100 ng (26). Zbog svoje iznimno niske letalne doze, lakog transporta i rukovanja, botulinum toksin potencijalno bi mogao služiti i kao oružje za bioterorizam.

Prema razlikama u biokemijskoj aktivnosti, *C. botulinum* može se podijeliti u četiri podskupine:

1. Skupina I-proteolitička, raste na temperaturama između 10-45°C i proizvodi toksine tipa A, B i F
2. Skupina II-neproteolitička, psihotrofna skupina, (raste na temperaturama između 3-45°C) i proizvodi toksine tipa B, E i F
3. Skupina III-neproteolitička, proizvode toksine tipa C i D
4. Skupina IV-slabi proteolitici i proizvode samo toksin tipa G (27).

Botulizam je prvi put opisan već 1793. godine u Njemačkoj (Wildbadu, Wurttemberg) kada je trinaest ljudi oboljelo nakon konzumacije kobasica proizvedenih pakiranjem krvi i ostalih sastojaka u svinjski želudac. Kobasice su bile kuhane i dimljene, nakon čega se smatralo da su pogodne za konzumaciju. Od zaraženih osoba, kod njih šest je infekcija završila smrtnim ishodom. Zbog ozbiljnosti simptoma kao što je paraliza i visoke stope smrtnosti (oko 60%), bolest je izazvala veliku zabrinutost. To je potaknulo njemačkog liječnika Justinius Kerner na istraživanje bolesti koje je tada nazvano botulizam (latinski botulus–kobasica). Kerner je otkrio da je preduvjet nastanka toksičnih učinaka postupak zagrijavanja, te da su male kobasice i one koje sadrže određenu koncentraciju kisika manje rizične za konzumaciju. Tek 1897. godine uspijeva se s izolacijom ovog mikroorganizma. Profesor bakteriologije Emile Pierre van Ermengema opisuje *C botulinum* nakon izbivanja epidemije botulizma kod 34 članova glazbenog kluba u Belgiji. Nakon konzumiranja sirove, nedimljene šunke, 23 članova grupe se razboljelo, a tri osobe su preminule (9). Bakteriolog Van Ermengem tada prepoznaje da uzrok bolesti nisu same bakterije, već botulinum toksin (28). Prema podacima EFSA-e u Republici Hrvatskoj su 2015. godine zabilježene dvije epidemije trovanja hranom uzrokovane *C. botulinum*. Pet osoba je obolilo nakon konzumiranja mesa i mesnih proizvoda prilikom kuhanja u vlastitim kuhinja. Od toga je jedna osoba bila hospitalizirana (29). *C. botulinum* je saprofit u tlu, povrću, morskom blatu i životinjskom gnojivu. Neinvazivna je bakterija pa se patogenezu veže za produkciju snažnog neurotoksina, botulinum toksina (BoNT). Postoji 8 seroloških tipova botulinum toksina (A, B, C1, C2, D, E, F i G), a samo A, B i E uzrokuju botulizam kod ljudi (30). Ovi neurotoksini su građeni od polipeptidnih lanaca s molekularnom masom od oko 150 kDa i relativno su neaktivni. Lanac polipeptida čini teški (H) lanac i laki (L) lanac, a međusobno su povezani disulfidnom vezom. Svi navedeni serotipovi blokiraju oslobađanje acetilkolina, glavnog neurotransmitera, i tako ometaju prijenos impulsa duž motoričkih neurona.

Botulinum toksini djeluju na četiri različita mjesta u tijelu, na:

- neuromuskularnom spoju,
- autonomnim ganglijima,
- postganglijskim parasimpatičkim živčanim završetcima,
- postganglijskim simpatičkim živčanim završetcima.

Poznato je pet vrsta botulizma:

1. Botulizam dojenčadi događa se nakon kolonizacije *C. botulinum* u crijevima. Spore rastu i proizvode botulinum toksin koji uzrokuje progresivnu paralizu. Spore se najčešće nalaze u medu stoga se ne preporuča roditeljima davanje meda djeci mlađoj od 12 mjeseci (botulizam dojenčadi).
2. Botulizam rana događa se nakon ulaska spora bakterija u ranu i lučenja toksina. Najčešće se događa nakon određenih traumatskih ozljeda kao što su motociklističke nesreće ili nakon operacije. Postoje slučajevi zaraze i nakon uzimanja ilegalnih droga, poput heroina, injektiranjem ispod kože ili u mišić.
3. Botulizam koji se prenosi hranom pojavljuje se nakon konzumiranja hrane koja je kontaminirana botulinum toksinom. Namirnice koje su nepravilno konzervirane ili fermentirane predstavljaju uobičajeni izvor botulizma.
4. Jatrogeni botulizam pojavljuje se nakon ubrizgavanja prevelikih količina botulinum toksina tokom kozmetičkog postupka uklanjanja bora (botoks) ili u liječenju nekih neuromuskularnih poremećaja.
5. Crijevna toksemija kod odraslih je vrlo rijetka vrsta botulizma koja se događa nakon ulaska spora bakterija u crijeva odrasle osobe gdje luče botulinum toksin (slično i kao botulizam dojenčadi). Još nije sasvim poznato što uzrokuje ovu bolest ali smatra se da oboljevaju osobe s ozbiljnim zdravstvenim problemima crijeva (31).

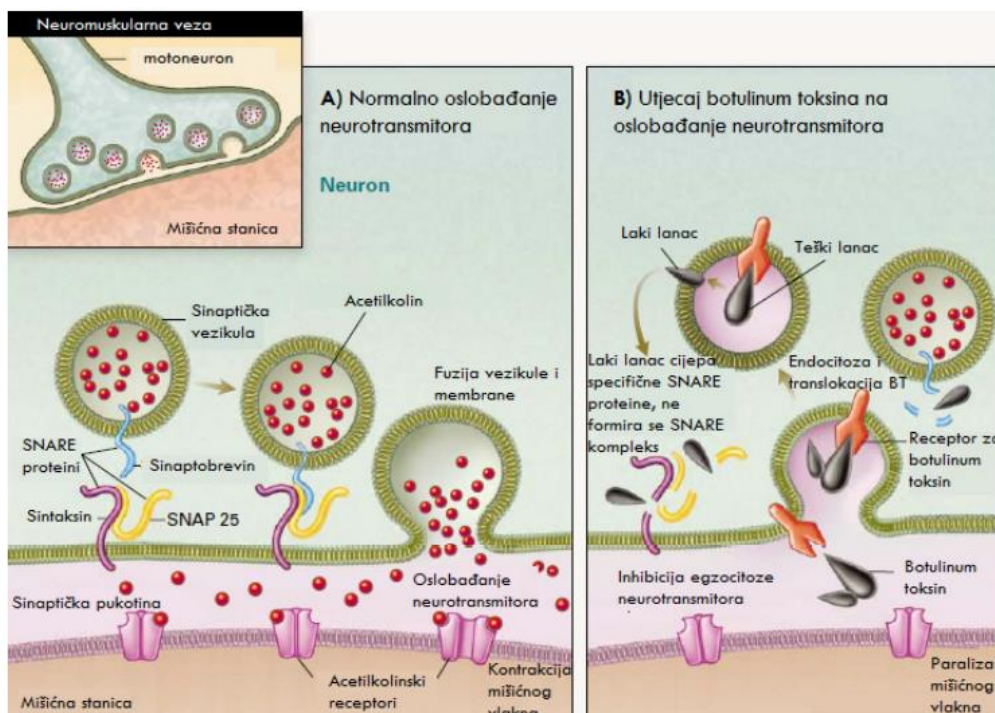
### 1.3.2.2 Izvori *C. botulinum*

Hrana koja je najčešće povezana kao izvor infekcije je med, domaća konzervirana hrana (šparoge, mahune, kukuruz), fermentirana riba, sirova i gotova jela koji se čuvaju u anaerobnim uvjetima (modificirana atmosfera, vakuum) i slično. Kod dječjeg botulizma najčešći izvori su tlo, voda iz cisterni, prašina i med. Sve vrste hrane koje su pogodne za razmnožavanje *C. botulinum* i produkciju botulinum toksina, a koje se termički neadekvatno obrade na način koji ne uništava spore i ne inaktivira neurotoksin, mogu izazvati botulizam. Genaralno, sve vrste hrane s  $\text{pH} > 4.6$ , u kojoj vladaju anaerobni uvjeti, mogu biti medij za razvoj *C. botulinum*.

Botulinim toksin dokazan je u različitim vrstama namirnica: konzerviranim usoljenim paprikama, mahunama, juhama, cikli, šparogama, zrelim maslinama, špinatu, tuni, pilećem mesu, pilećoj jetri, jetrenoj pašteti, mesu, šunki, kobasicama, punjenim patlidžanima, jastozima, dimljenoj i usoljenoj ribi (25).

### 1.3.2.3 Patogeneza *C. botulinum*

Nakon unosa (ingestije hranom, inhalacije ili preko rana), botulinum toksin se krvlju prenosi do perifernih kolinergičnih živčanih završetaka. Teški (H) lanac toksina veže se selektivno i ireverzibilno na receptore visokog afiniteta na presinaptičkoj površini kolinergičkih neurona. Takav kompleks toksina i receptora ulazi u stanicu procesom endocitoze. Cijepanjem disulfidne veze između dva lanca, toksin odlazi u citoplazmu. Dolazi do interakcije lakog (L) lanca s različitim proteinima na živčanim završecima kako bi se onemogućilo spajanje vezikula acetilkolina sa staničnom membranom. To rezultira paralizom poprečno-prugastog mišićja zbog inhibicije prijenosa živčanih impulsa. Učinak je najintenzivniji četiri do sedam dana nakon infekcije, a traje gotovo 8-12 tjedana. Simptomi se najčešće opažaju 12-36 sati nakon konzumacije i uključuju poremećaje vida, opuštanje kapaka, poteškoće gutanja, slabost mišića i nerazgovijetan govor. U teškim slučajevima blokiraju se živčani impulsi u glatkom mišićju dišnog sustava i u srcu što dovodi do smrti (32).



Slika 3. Mehanizam djelovanja botulinum toksina na oslobađanje acetilkolina

(izvor: <https://repozitorij.pharma.unizg.hr/islandora/object/pharma:938>)



#### 1.3.2.4 Prevenirija i liječenje

Za liječenje botulizma uobičajeno se koristi lijek zvan antitoksin. Antitoksinom se ne liječi nastala šteta koju je toksin botulizma napravio, već sprječava daljnji uzrok štete. Ovisno o stupnju jačine simptoma, osobe s blažim simptomima moraju u bolnici provesti nekoliko tjedana pa čak i mjeseci. U slučaju težih simptoma, pacijenti s problemom disanja priključuju se na aparat za disanje sve do ponovne mogućnosti samostalnog disanja. Osobe s botulizmom rana ponekad trebaju operaciju radi odstranjenja izvora bakterija te terapiju antibioticima (33).

Prevenirija botulizma podrazumijeva nekoliko koraka:

- prilikom konzumiranja domaće konzervirane hrane niske kiselosti hranu treba zagrijavati na toplini od najmanje 80°C/30 min ili 90°C/10 min
- postizanje pH ispod 5,0, aktiviteta vode ispod 0,97 i niska razinu soli u hrani od 3,5%
- uporaba konzervansa – nitritne soli (koncentracija  $\geq 2\%$ ) (30)
- limenke s vidljivim oštećenjima poklopca (ispupčenje, propuštanje) ili neobičnim mirisom ne smiju se konzumirati
- inspekcija konzerviranih prehrambenih proizvoda (proizvedenih komercijalno ili kod kuće)
- tijekom skladištenja održavanje primjerene temperature – vruća hrana na temperaturi iznad 57°C, hladna na temperaturi ispod 5°C, u cilju sprječavanja klijanja spora i proizvodnje toksina
- pravilna higijena ruku, kuhinjskih površina, pribora koje dolaze u doticaj s hranom (34).

## 1.4 Zakonska regulativa Republike Hrvatske

Temeljni zakon Republike Hrvatske koji se odnosi na hranu je Zakon o hrani (NN 81/13, 14/14, 30/15, 115/18). Ovim Zakonom propisuju se odredbe na nacionalnoj razini kojima se uređuju nadležnosti za uspostavu i provedbu politike sigurnosti hrane, nadležnosti u području analize rizika, opća pravila sustava brzog uzbunjivanja, opća pravila upravljanja krizom u području sigurnosti hrane i hrane za životinje, uspostava i koordinacija mreže institucija, davanje znanstvenog i stručnog mišljenja i nacionalne mjere potrebne za provedbu politike sigurnosti hrane.

U ožujku 2011. godine, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja je, temeljem Zakona o hrani, donijelo Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu. Ovim Vodičem se utvrđuju mikrobiološki kriteriji za određene mikroorganizme te pravila kojih se subjekt u poslovanju s hranom (SPH) mora pridržavati pri provođenju općih i posebnih zahtjeva koji se odnose na higijenu u skladu s propisima navedenih u Glavi II. Vodiča.

Zakonom o hrani u potpunosti je osigurana provedba Uredbe (EZ-a) 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Ovom se Uredbom utvrđuju mikrobiološki kriteriji za određene mikroorganizme i pravila kojih se subjekti u poslovanju s hranom moraju pridržavati pri provođenju općih i posebnih higijenskih mjera u zakonodavstvu Zajednice.

Zakon o hrani navodi kako SPH mora osigurati da hrana udovoljava zahtjevima o hrani u svim fazama proizvodnje, prerade i distribucije. Temeljem Zakona, SPH je dužan uspostaviti, provoditi i održavati trajni postupak samokontrole temeljen na sustavu analize opasnosti i kritičnih kontrolnih točaka HACCP-a (eng. *Hazard Analysis and Critical Control Points*). HACCP omogućava prepoznavanje i kontrolu mikrobioloških, kemijskih i fizikalnih čimbenika, koji mogu biti štetni za zdravlje ljudi.

Vodič daje pregled mikrobioloških zahtjeva kao i preporuke u odnosu na ispitivanje alternativnih mikroorganizama u procesu proizvodnje hrane. Reference iz Glave 2. Priloga 1. Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu pomažu SPH u odvajanju zdravstveno ispravnih od zdravstveno neispravnih uzorka, te u obavljanju provjere učinkovitosti sustava samokontrole kao temelja za osiguranje zdravstvene ispravnosti hrane.

U Glavi 3. Vodiča obavezni i preporučeni mikroorganizmi, koji SPH mora uvesti u poslovanje s hranom, upisani su u tablice. Tablice sadrže informacije o vrsti hrane, kriterije koje hrana mora udovoljavati, te poveznice sa Uredbom (EZ-a) 2073/2005 u slučaju ako za određenu vrstu hrane postoje propisani i obavezni kriteriji kojima mora zadovoljiti. Kriteriji sigurnosti hrane i njihove granične vrijednosti navedeni u Prilogu I. Uredbe (EZ-a) 2073/2005 odnose se na hranu od faze otpreme iz objekta sve do isteka roka trajanja (35).

U tablici 1. prikazani su kriteriji za ocjenjivanje zdravstvene ispravnosti određenih vrsta hrane na sulfidreducirajuće klostridije. Zdravstveno ispravna hrana je prihvatljiva za konzumaciju i ne sadrži štetne mikroorganizme (njihove metabolite i toksine) u količinama koja bi akutno ili kronično ugrozile zdravlje ljudi. Zdravstveno neispravna hrana, to jest hrana koja ne odgovara kriterijima u tablici, ne smije se stavljati na tržište. U slučaju da je analizom dokazana zdravstvena neispravnost uzorka, hrana se mora opozvati ili povući s tržišta.

Tablica 1. Kriteriji za ocjenjivanje zdravstvene ispravnosti određenih vrsta hrane vezano uz sulfidreducirajuće klostridije

KATEGORIJA HRANE	Kriteriji	
	m	M
Gotova jela	10	100
Led	/	0 u 50 mL
Začini	100	1000
Tvrđi sirevi	1	10
Med	/	10
Trajne kobasice	10	100
Porcionirano meso i meso u malim komadima	100	1000
Dimljena i sušena riba	10	100
Sušeno i kandirano voće, sjemenke	10	100
Polutvrđi sir	10	100
Svježe rezano povrće	10	100
Svježa i smrznuta riba	100	1000
Soljena riba	10	100
Polutrajne kobasice	10	100
Meso peradi	10	100
Aditivi, bjelančevinasti proizvodi	100	1000
m= granična vrijednost ispod koje se svi rezultati smatraju zadovoljavajućim M= granična dopuštena vrijednost iznad koje se rezultati smatraju ne zadovoljavajućim. Ukoliko samo jedan rezultat nadilazi tu vrijednost (prilikom ispitivanja većeg broja jedinica uzorka), uzorak je nezadovoljavajući.		

## 2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je analiza rezultata mikrobiološkog ispitivanja gotove hrane prikupljene u restoranima te drugim ugostiteljskim i javnim objektima na području Primorsko-goranske županije u razdoblju od 2015. do 2020. godine. Utvrđen je udio uzoraka pozitivnih na sulfitreducirajuće klostridije u gotovoj hrani te u ostalim vrstama hrane. Ispitana je godišnja i mjesečna distribucija broja ispitanih uzoraka te udjela SRK pozitivnih uzoraka u istraživanom razdoblju. Izvršena je korelacijska analiza rezultata ispitivanja na SRK i ostalih ispitanih mikrobioloških pokazatelja.

Dodatni cilj je bio istražiti potencijalne uzroke kontaminacije gotove hrane sulfitreducirajućim klostridijama te predložiti moguće preventivne mjere.

## 3 MATERIJALI I METODE

### 3.1 Svrha i područje primjene

Analizirani su rezultati mikrobiološkog ispitivanja 7710 uzoraka hrane u kojima je ispitan pokazatelj sulfitreducirajuće klostridije, prikupljenim na području Primorsko-goranske županije. Uzorci su skupljeni i obrađeni u razdoblju od 2015. do 2020. godine. Uzorkovanje i ispitivanje uzoraka je provedeno od strane djelatnika Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorskogoranske županije, Zdravstveno-ekološki odjel (Odsjek za mikrobiologiju okoliša) i Epidemiološki odjel.

Osim određivanja broja sulfit-reducirajućih klostridija (SRK) u uzorcima gotove hrane, ispitani su i slijedeći mikrobiološki parametri: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, enterobakterije te ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija (UBB).

### 3.2 Uzimanje uzoraka

Uzorci hrane uzimali su se u sterilne staklene boce s priborom za uzorkovanje, uz pažljivo rukovanje kako bi se spriječilo svako naknadno onečišćenje, kvarenje i oštećenje hrane. Također, prilikom uzimanja uzoraka koristila se odgovarajuća zaštitna odjeća (što su pokrivala za glavu i zaštitna obuća). Pri uzorkovanju moraju se uvažavati načela dobre higijenske prakse što uključuje pranje i dezinfekciju ruku, te moguće dodatne odredbe koje vrijede za objekt iz kojeg se uzima uzorak. Uzet uzorak za analizu mora biti reprezentativan, odnosno najvećoj mogućoj mjeri odražavati sastav cijelog lota ili serije proizvoda iz kojeg je uzet. Broj elementarnih jedinica uzoraka koji uzorkovač mora uzeti propisan je Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/2008) i Pravilnikom o učestalosti uzorkovanja trupova, mljevenog mesa i mesnih pripravaka te uvjetima i načinu smanjenja broja elementarnih jedinica uzorka u objektima manjeg kapaciteta proizvodnje (NN 30/2010). Također, potrebno je voditi računa i o količini uzetog uzorka. Preporučena minimalna količina uzorka (jedna elementarna jedinica uzorka) za mikrobiološko ispitivanje je 500 g ili mL ili jedinično pakiranje. U slučaju da nije moguće uzorkovati tu količinu, uzorkovač se savjetuje s laboratorijem o količini uzorka koji će biti dostatan za određeno mikrobiološko ispitivanje (35).

### **3.3 Transport uzoraka**

Rezultati ispitivanja uvelike ovise o načinu transporta i pohrane. U postupku uzorkovanja obavezno je zabilježiti vrijeme uzimanja uzorka, vrijeme dostave uzorka u laboratorij te vrijeme početka ispitivanja. Dozvoljeno vrijeme od trenutka uzimanja uzoraka do početka ispitivanja, za različitu je hranu navedeno u normi HRN ISO 7218/Amd 1:2004. Uzorak se mora transportirati u temperaturnim uvjetima koji ne dovode do mikrobioloških promjena uzorka. Hlađene uzorke je tijekom transporta potrebno pohranjivati na točno određenoj temperaturi, navedenoj na originalnoj ambalaži hrane, a smrznute uzorke pri temperaturi i u uvjetima koji sprečavaju otapanje. Analiza se, u pravilu, mora obaviti unutar 24 sata (35).

### **3.4 Horizontalna metoda za brojenje sulfitreducirajućih bakterija u anaerobnim uvjetima HRN ISO 15213:2004**

#### Svrha:

Navedeni postupak definira način provođenja metode za brojenje sulfitreducirajućih bakterija u anaerobnim uvjetima prema normi HRN ISO 15213:2004.

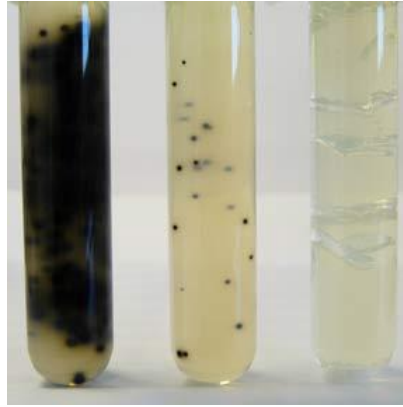
#### Područje primjene:

Metodom se određuje broj uzgojenih sulfitreducirajućih bakterija u uzorcima hrane.

#### Postupak:

#### Reagensi:

- čvrsti agar – Iron sulfite agar
- neselektivni bujon – Saline peptone diluent
- radna uputa za pripremu podloge (RU 89-200)



Slika 4. Čvrsti agar (Iron sulfite agar)

(izvor: <https://www.food-safety.com/articles/3464-iron-sulphite-agar-facilitates-detecting-anaerobes-in-canned-foods>)

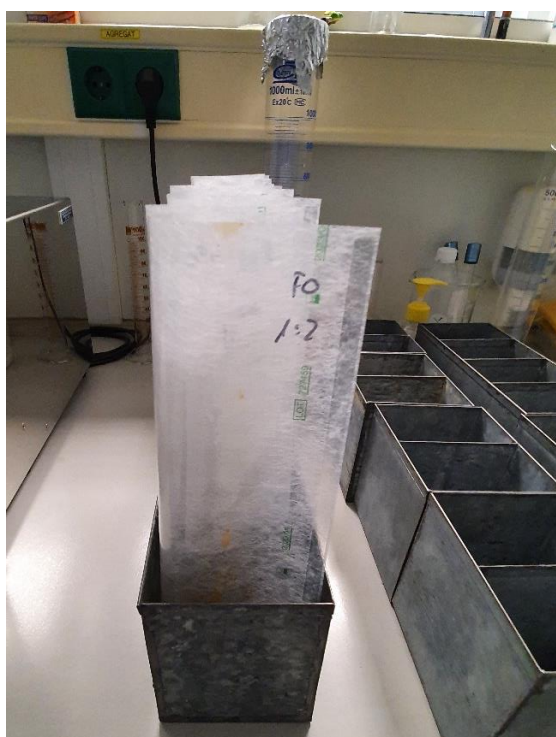
Prema uputama proizvođača, reagensi se čuvaju u hladnjaku na temperaturi od +2°C do +8°C. Potrebno je provođenje kontrole temperature uz pomoć kontrolnih temperaturnih listi.

Aparatura i pribor:

- elektronička vaga
- sterilne vrećice za homogenizaciju
- sterilne graduirane pipete (1,5 mL)
- epruvete
- biokabinet
- homogenizator
- termostat (37°C±1)
- vodena kupelj za održavanje temperature od 44°C do 47°C

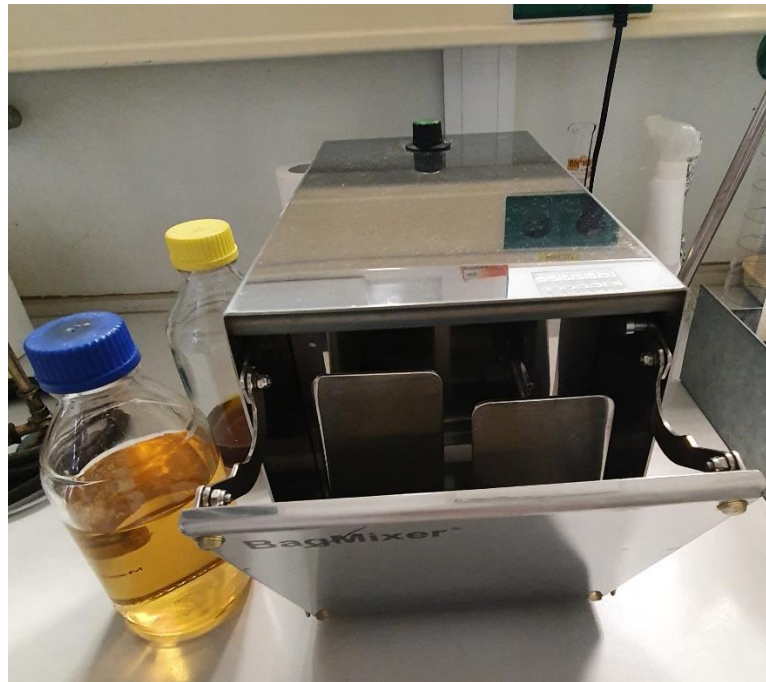


Slika 5. Elektronička vaga



Slika 6. Sterilne vrećice za homogenizaciju





Slika 7. Homogenizator



Slika 8. Vodena kupelj

### Referentni etaloni:

- utezi za vagu, 100 i 200 g
- termometri

### Provedba postupka:

Zaprimljeni uzorak obrađuje se odmah.

1. vaganje 25 g uzorka i dodavanje 255 mL bujona
2. homogenizacija - da bi se postigla ravnomjerna raspodjela mikroorganizama
3. prijenos uzorka pipetom u epruvetu - ispitivani volumen uzorka ili razrjeđenja od 1 mL
4. grijanje na 80°C kroz 5 minuta - eliminacija vegetativnih oblika bakterija
5. dodavanje po 1 mL uzorka (ukoliko je tekući) ili po 1 mL prvog razrjeđenja (drugi uzorci) u druge dvije epruvete
6. dodavanje 1 mL slijedećeg razrjeđenja u druge dvije epruvete - ako je uzorak tekući dodaje se 10<sup>-1</sup> razrjeđenja, ukoliko nije onda 10<sup>-2</sup>
7. dodavanje 15 mL otopljenog Iron sulfite agara u epruvetu – mora biti ohlađen na 44°C - 47°C. Vrijeme proteklo između dodavanja uzorka i rastopljenog agara ne smije biti veće od 15 minuta
8. dolijevanje još 2-3 mL agara u epruvete – nakon učvršćenja agara
9. inkubacija uzorka – na 37±1°C tijekom 24-48 sati
10. brojanje poraslih kolonija crne boje s mogućnošću formiranja crne zone
11. brojanje kolonija u epruvetama u kojima je poraslo manje od 150 tipičnih i manje od 300 ukupnih kolonija
12. odabiranje pet tipičnih kolonija i slanje na potvrdne testove – respiratorni test i spore-formirajući test
13. izražavanje rezultata – broj cfu u 1g/L ili ml/L

Respiratorni test – prenese se kolonija na krvni agar i inkubira aerobno pri 37°C kroz 24 sata. Ne bilježi se porast ako su bakterije anaerobne.

Spore formirajući test: mikroskopiranje kolonija da bi se vidjelo ako je formirana spora.

### Interpretacija rezultata ispitivanja

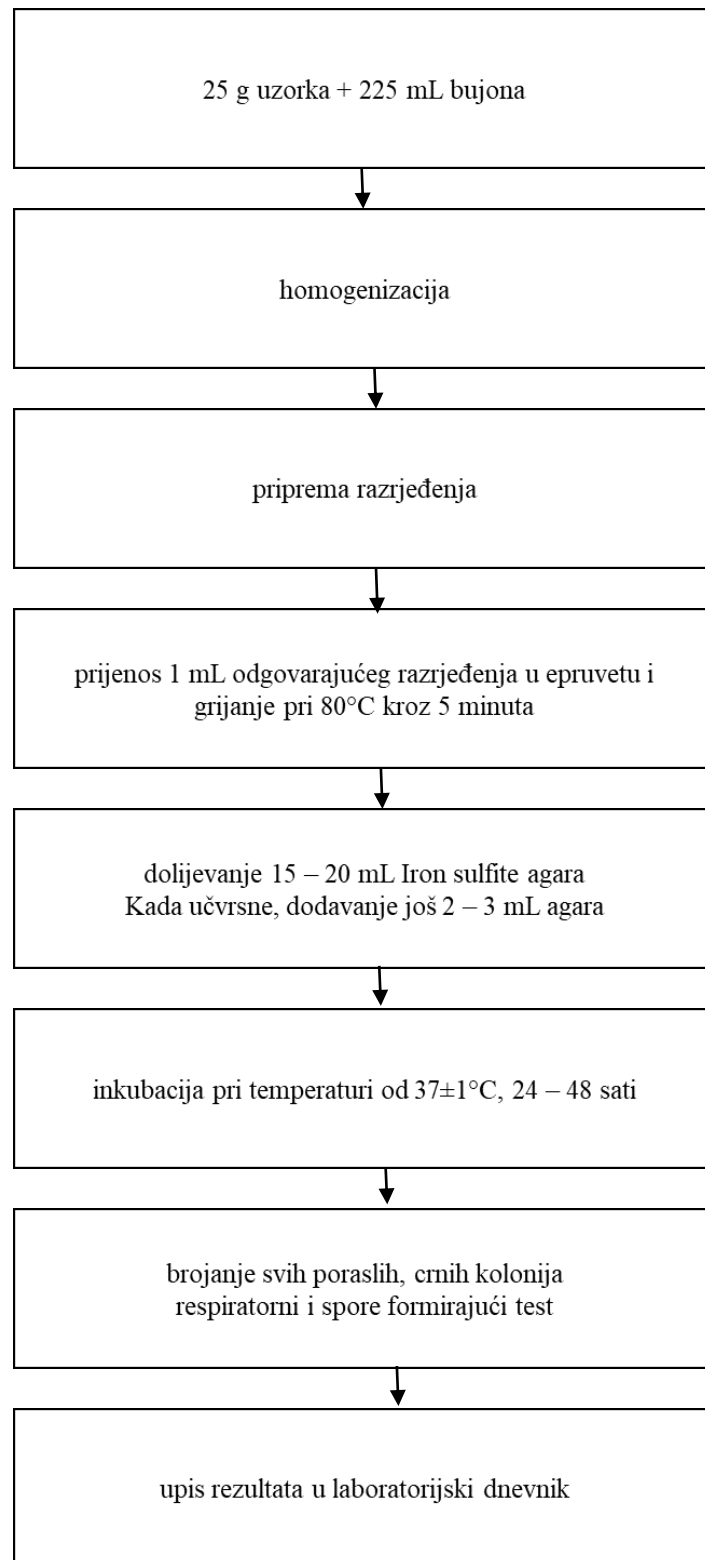
Rezultat se izražava brojčano u 1g ili mL uzorka (cfu/g ili cfu/mL)

Formula za izračun:

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

- $\sum C$  – broj izbrojenih kolonija na pločama
- $V$  – volumen inokuluma na svakoj ploči, u mL
- $d$  – faktor razrjeđenja koji odgovara prvom odabranom razrjeđenju

Dijagram tijeka:



## Kontrola kvalitete rezultata ispitivanja:

### Unutarnja kontrola

Unutarnja kontrola kvalitete obavlja se radi kontinuirane procjene točnosti dobivenih rezultata prema normi HRN EN ISO 7218:2008/A1:2013. Izračunava se interval unutar kojeg bi se rezultati morali nalaziti. Unutarnja kontrola se provodi jedanput mjesečno za svaki mikrobiološki parametar te se rezultati upisuju u prikladni obrazac.

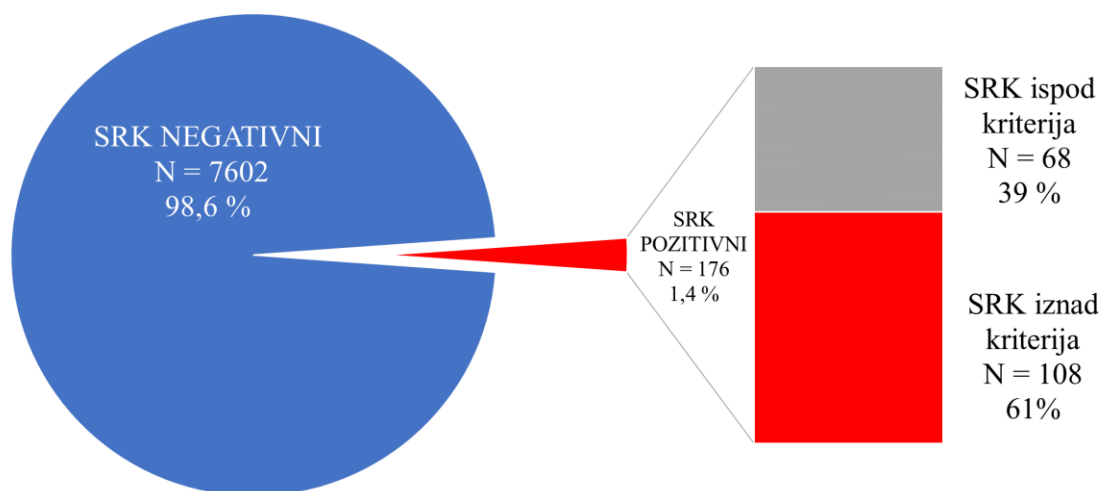
### Vanjska kontrola

Vanjska kontrola kvalitete rezultata ispitivanja provodi se međulaboratorijskim ispitivanjima, prema procjeni rizika zapisanoj u radnoj uputi. Dobiveni rezultati dostavljaju se organizatorima međulaboratorijskih ispitivanja koji publiciraju Izvještaje s analizom rezultata (36).

## 4 REZULTATI

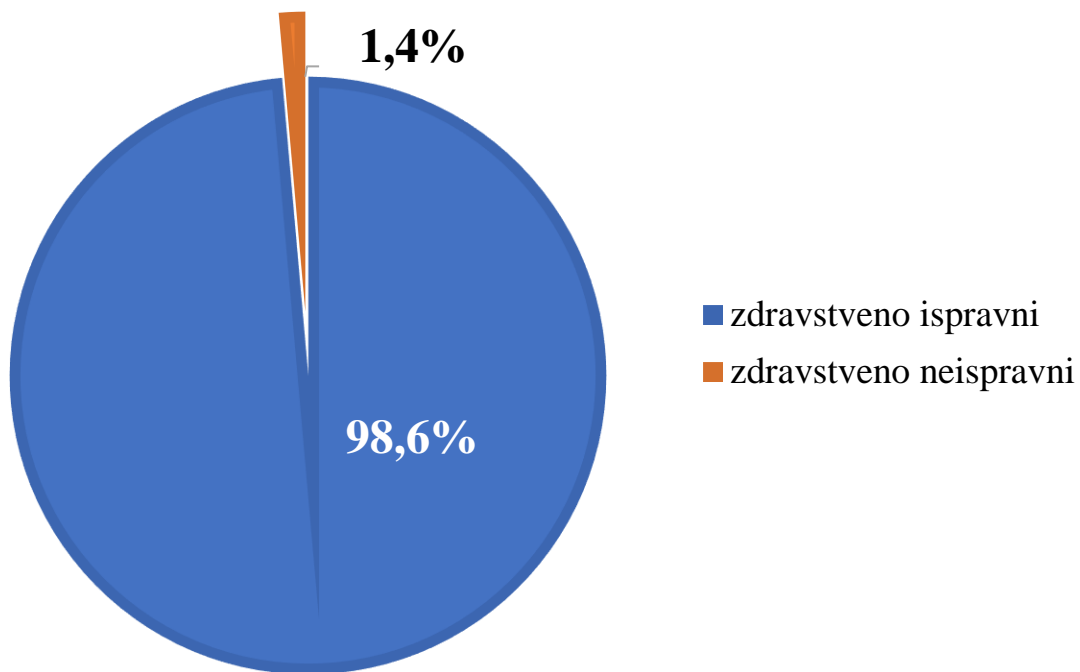
### 4.1 Deskriptivna statistika

U razdoblju od 2015. do 2020. godine sveukupno je analizirano 7710 uzoraka hrane uzetih na području Primorsko-goranske županije u kojima je ispitan pokazatelj sulfitreducirajuće klostridije. Na slici 10. prikazan je udio zdravstveno ispravnih i zdravstveno neispravnih uzoraka hrane. Od ukupnog broja ispitanih uzoraka, zabilježeno je 7602 (oko 99%) zdravstveno ispravnih te 108 (oko 1%) zdravstveno neispravnih uzorka.



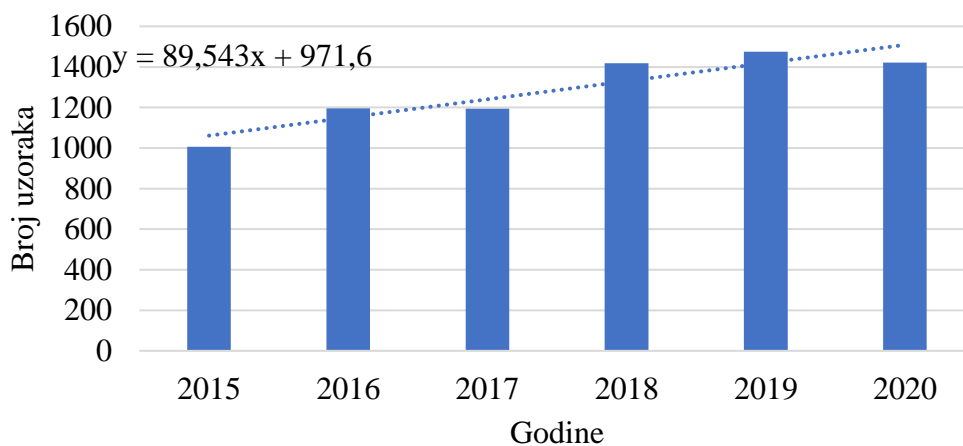
Slika 9. Prikaz udjela pozitivnih uzoraka koji su bili ispod i iznad maksimalno dozvoljenih koncentracija (MDK), u razdoblju istraživanja 2015.-2020.

Slika 9. prikazuje udio SRK pozitivnih i negativnih uzoraka hrane. U petogodišnjem vremenskom intervalu u 176 (1,4%) uzoraka utvrđeno je prisustvo sulfitreducirajućih klostridija. Od ukupnog broja pozitivnih uzoraka (N=176), kod 68 uzoraka (39%) dobivene vrijednosti SRK bili je ispod vrijednosti maksimalno dopuštenih koncentracija (MDK) za određenu kategoriju hrane, a 108 uzoraka (61%) iznad MDK. Prema tome, udio zdravstveno neispravnih uzoraka hrane zbog nesukladnosti s kriterijem za sulfitreducirajuće klostridije iznosio je 1,4% (108/7602) što se prikazuje na Slici 10.



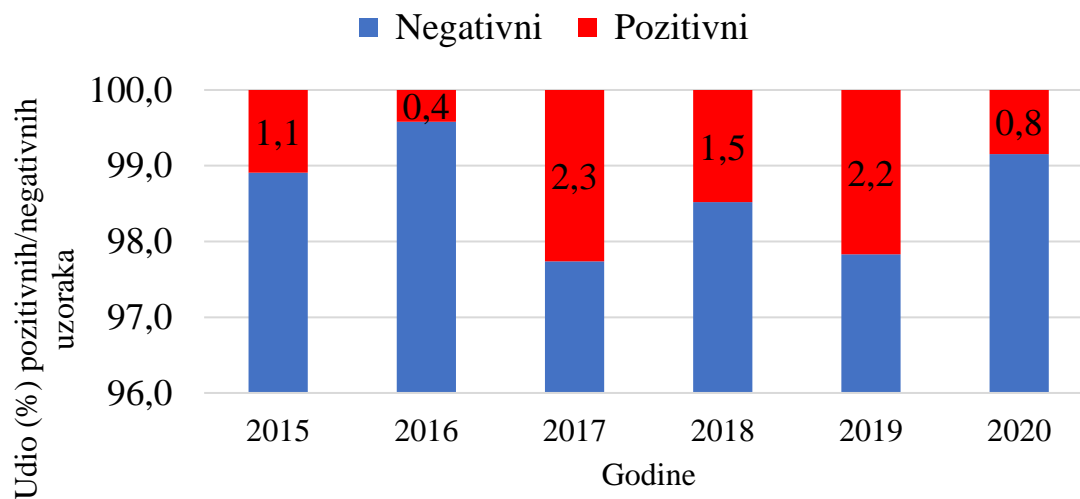
Slika 10. Prikaz udjela zdravstveno neispravnih i zdravstveno ispravnih uzoraka, u razdoblju istraživanja 2015.-2020.

Promatrajući distribuciju broja ispitanih uzoraka po godinama u istraživanom razdoblju (2015.-2020.) na slici 11. se može uočiti da je u 2018. godini (N=1418) i 2019. godini (N=1475) analiziran najveći broj uzoraka hrane, a u 2015. najmanji (1007).



Slika 11. Prikaz broja analiziranih uzoraka po godinama

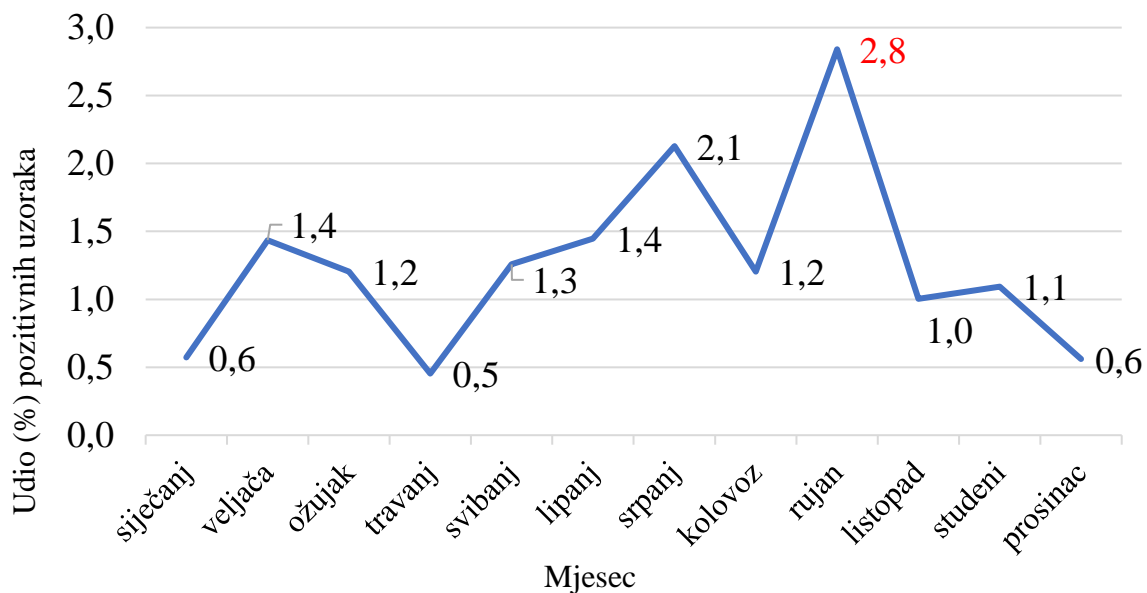
Udio pozitivnih i negativnih uzorka po godinama prikazan je na slici 12. Iako je 2019. godine ispitan najveći broj uzoraka hrane (Slika 11.), najviši udio pozitivnih uzoraka (2,3%) utvrđen je 2017. godine. U 2016. godini udio pozitivnih uzoraka bio je najniži (0,4%).



Slika 12. Grafički prikaz udjela pozitivnih/negativnih uzoraka po godinama

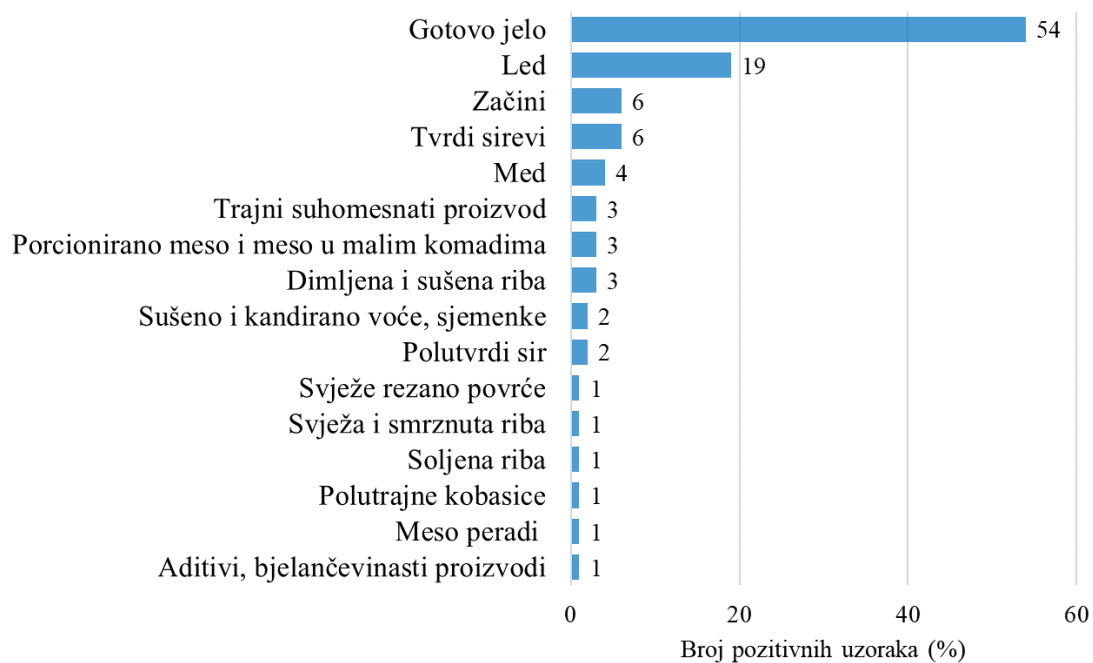


Mjesečna distribucija broja ispitanih i udjela pozitivnih uzorka hrane na sulfitreducirajuće klostridije prikazana je na slici 13. Tijekom petogodišnjeg razdoblja, u srpnju je analiziran najveći broj uzoraka (N=893). Najviši udio pozitivnih uzoraka po mjesecima, 2,8% zabilježen je u rujnu (N=24/845). Mjesec u kojem je analizirano najmanji broj uzoraka (N=175) i dobiven najniži udio pozitivnih uzoraka (0,6%) je siječanj.



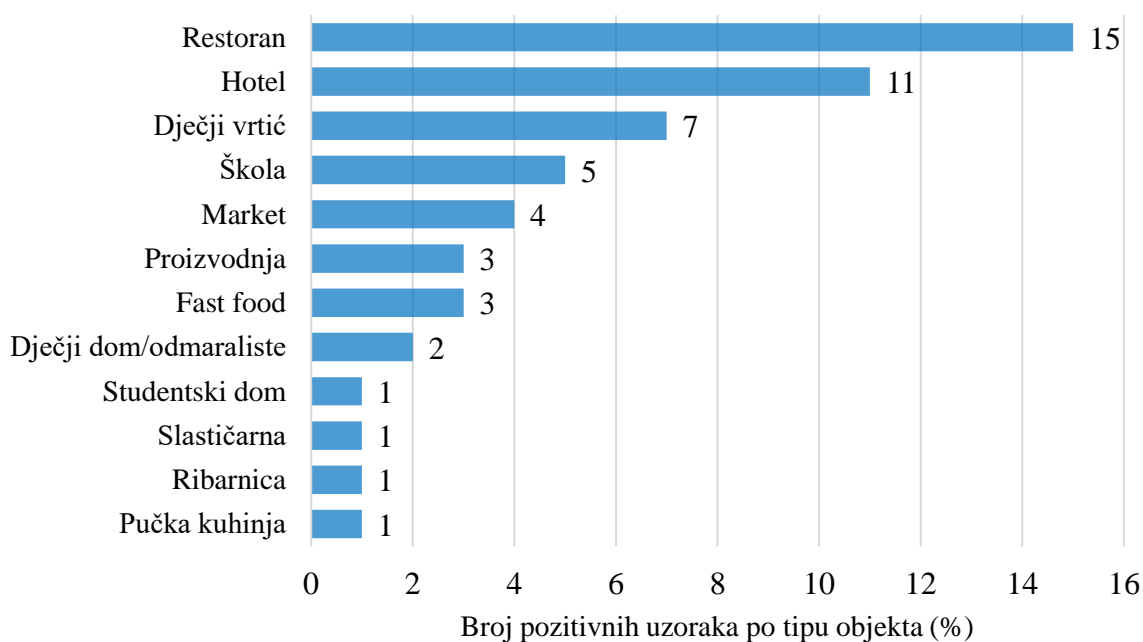
Slika 13. Prikaz udjela pozitivnih uzoraka na sulfitreducirajuće klostridije (SRK) po mjesecima, u razdoblju istraživanja 2015.-2020.

Od 108 uzoraka hrane kod kojih je broj SRK bio iznad granične vrijednosti za pripadajuću kategoriju hrane, 50% uzoraka (N=54) se je odnosilo na gotova jela (Slika 14.). Međutim, i ostale vrste namirnica, poput leda, začina, tvrdih sireva i trajnih suhomesnatih proizvoda su, također, pokazivale viši postotak pozitivnih uzoraka.



Slika 14. Broj pozitivnih uzoraka na sulfitreducirajuće klostridije (SRK) prema vrsti hrane, u razdoblju istraživanja 2015.-2020.

Obzirom na vrstu objekta u kojem je uzorkovanje provedeno, utvrđeno je da je najveći udio (27,8%) pozitivnih uzoraka gotove hrane na sulfitreducirajuće klostridije uzorkovan u restoranima (N=15/54). Povećan udio pozitivnih uzoraka, također, uočen je u uzorcima gotove hrane uzete u hotelima, dječjim vrtićima i školama.



Slika 15. Broj pozitivnih uzoraka na sulfitreducirajuće klostridije (SRK) prema vrsti objekta iz kojih je uzorak uzet, u razdoblju istraživanja 2015.-2020.

## 4.2 Korelacijska analiza

Mjera povezanosti između broja SRK i drugih analiziranih mikrobioloških pokazatelja prikazana je pomoću Spearmanov-og korelacijskog koeficijenta u Tablici 2. Korelacijska analiza provedena je na 7710 uzoraka hrane u kojima je ispitan pokazatelj sulfitreducirajuće klostridije, u petogodišnjem vremenskom intervalu. Statistički značajna korelacija ( $p < 0.05$ ) označena je podebljanim slovima.

Rezultati prikazani u tablici 2. ukazuju na značajnu korelaciju ( $p < 0,05$ ) između SRK i svih ostalih ispitanih mikrobioloških parametara. Najjača pozitivna korelacija uočena je između SRK i enterobakterija ( $r_s = 0,24$ ) a najslabija pozitivna korelacija između SRK i *Escherichia coli* ( $r_s = 0,11$ ).

Tablica 2. Spearmanov korelacijski koeficijent između ispitanih pokazatelja

	Broj uzoraka	Spearman R	p-vrijednost*
SRK & UBB	7113	0,172589	<b>0,000</b>
SRK & EC	1337	0,110692	<b>0,000</b>
SRK & PA	1043	0,160573	<b>0,000</b>
SRK & SA	6178	0,151031	<b>0,000</b>
SRK & ENTER	6349	0,239381	<b>0,000</b>
SRK – Sulfitreducirajuće klostridije EC – <i>Escherichia coli</i> PA – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SA – <i>Staphylococcus aureus</i> ENTER – enterobakterije <b>*Statistički značajna korelacija (<math>p &lt; 0.05</math>) označena je podebljanim slovima</b>			

## 5 RASPRAVA

U razdoblju istraživanja od 2015.-2020. godine sveukupno je ispitano 7710 uzoraka hrane s područja Primorsko-goranske županije, u kojima je ispitan pokazatelj sulfitreducirajuće klostridije. Udio uzoraka sulfitreducirajućih klostridija, čije su vrijednosti bile iznad maksimalno dopuštenih granica (MDK) propisanih Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/08, 156/08, 89/10), iznosio je oko 1,4% (108/7710).

Iako su sulfitreducirajuće klostridije vrlo otporne bakterije na ekstremne uvjete kao što su visoke temperature, pH, aktivitet vode i koncentracije soli, izolirane su u vrlo malom udjelu uzoraka u petogodišnjem vremenskom razdoblju. U istraživanju o prisutnosti patogenih mikroorganizama u namirnicama u Dubrovačko-neretvanskoj županiji u razdoblju od 2002. do 2006. godine kojeg je provela Musladin Ljevaković, također je utvrđena slaba pojavnost (0,1%) pozitivnih uzoraka sulfitreducirajućih klostridija u različitim namirnicama (37). Sulfitreducirajuće klostridije su bakterije koje najbolje rastu i razmnožavaju se na povišenim temperaturama. Optimalna temperatura za rast je između 43°C i 47°C, ali mogu rasti i razmnožavati se u rasponu od 12°C do 50°C. Rezultati analiza potvrdili su kako je godišnji udio pojavnosti pozitivnih uzoraka najviši u toplom dijelu godine, ljetnim mjesecima (od 2,1% do 2,8% u srpnju i rujnu), a najmanji u zimskim mjesecima (od 0,6% u siječnju i prosincu). U istraživanju o čimbenicima koji doprinose pojavi epidemija bolesti koje se prenose hranom provedenog od strane Brian 1978. godine, dokazano je da su se epidemije pojavile prilikom neadekvatnog hlađenja (ostavljanja hrane na sobnim temperaturama, skladištenjem u velikim loncima, opterećivanjem hladnjaka ili pohranjivanjem hrane u hladnjacima koji održavaju temperature iznad preporučenih) (38). Stoga se može zaključiti da visoke temperature tijekom ljetnih mjeseci značajno utječu na rast i razmnožavanje bakterija te produkciju opasnih toksina u hranu zbog nepravilnog i neadekvatnog hlađenja ili podgrijavanja gotove hrane.

Prema informacijama Državnog meteorološkog zavoda (DMZ) o srednjim godišnjim temperaturama zraka za opservatorij Zagreb-Grič utvrđeno je da je 2019. godina bila najtoplija godina od početka meteoroloških mjerenja (od 1862. godine). Srednja godišnja temperatura zraka 2017. svrstava se na treće mjesto u skupini najtoplijih godina od početka mjerenja, ali zapažena je ista temperatura kao i 2007. godine, koja je zauzela drugo mjesto. Takve ekstremne temperature pogodovale su razmnožavanju sulfitreducirajućih klostridija i ostalih mikroorganizama u hrani. Taj okolišni čimbenik pridonio je da je udio SRK pozitivnih uzoraka (u 2017. godini 2,3%, u 2019. godini 2,2%) u navedenim godinama, bio najveći.

Gotova jela se definiraju kao već pripremljen obrok koji zahtijeva minimalnu pripremu te ga je prije konzumacije dovoljno samo zagrijati (39). Prema udjelu SRK pozitivnih uzoraka u odnosu na vrstu hrane, rezultati su pokazali da gotova jela čine većinu kontaminirane hrane (50%, 54 uzorka). Prati ih led s 19 uzoraka (18%), začini i tvrdi sirevi s 6 uzoraka (6%), med s 4 uzorka (4%) i razne vrste mesnih proizvoda. U istraživanju prisutnosti *C. perfringens* u hrani u SAD-u incidencija pozitivnih uzoraka bila je oko 6,1% (31 uzorak od sveukupno 510 analiziranih) i to dominantno kod sirovog mesa govedine, janjetine, svinjetine, peradi i riba. Najmanju incidenciju pojavnosti kontaminacije pokazali su obroci spremljeni u domaćinstvima, što je dovelo do zaključka da se prilikom procesa kuhanja uzročnik uništio (40). Istraživanje koje su proveli El-Prince i sur. u Egiptu od 2011. do 2012. godine na različitim vrstama sireva dovelo je do zaključka da meki ili topljeni sirevi imaju veću incidenciju kontaminacije sulfitreducirajućim klostridijama u odnosu na tvrde sireve. Zaključeno je da su ti rezultati posljedica djelovanja lizozima, antimikrobnog enzima, koji se kao zaštitno sredstvo dodaje u proizvodnji tvrdih sireva (41).

Restorani su ustanove u kojima postoji velika ponuda hrane i pića, te gdje su obroci servirani kupcima (42). Rezultati ovog istraživanja istaknuli su restorane, hotele, dječje vrtiće i škole kao primarne ustanove u kojima se događa kontaminacija hrane sulfitreducirajućim klostridijama. Navedeni objekti uobičajeno poslužuju velik broj ljudi u isto vrijeme te je za pretpostaviti da gotova hrana ne prolazi kroz sve propisane procese podgrijavanja i hlađenja. Često, radi nezadovoljstva kupaca zbog dugog čekanja hrane, zaposlenici u restoranima pokušavaju smanjiti vrijeme trajanja procesa zagrijavanja kako bi se hrana brže servirala. Također, mikrobiološka čistoća objekata u kojima se rukuje s hranom je jedan od preduvjeta osiguranja zdravstvene ispravnosti namirnica. Istraživanje higijenske ispravnosti otisaka/briseva provedeno u Dubrovačko-neretvanskoj županiji u razdoblju od 2002.-2006. godine zaključeno je da se povećanje udjela nezadovoljavajućih rezultata otisaka i briseva često javlja sezonski (obično ljeti), zbog velikog prometa namirnica i turizma. Rezultati istraživanja potvrdili su da dječji vrtići, đачki domovi, bolnice i domovi umirovljenika imaju najbolju mikrobiološku čistoću ispitanih površina. Najlošija mikrobiološka čistoća površinautvrđena je u restoranima, caffè barovima i trgovinama uslijed neučinkovitosti dezinfekcije i velikog broja gostiju (37).

Korelacijska analiza rezultata pokazuje statistički značajnu korelaciju ( $p < 0,05$ ) između sulfitreducirajućih klostridija i ostalih ispitanih parametara mikrobiološke ispravnosti hrane. Najjača pozitivna korelacija uočava se između SRK i enterobakterija ( $r_s = 0,293$ ) te između SRK i ukupanog broja aerobnih mezofilnih bakterija, UBB ( $r_s = 0,173$ ). Statistički značajna pozitivna korelacija govori da porast broja SRK prati porast broja enterobakterija te također i UBB, i obrnuto. U istraživanju provedenom u Saudijskoj Arabiji na različitim vrstama sireva dokazano je da su se enterobakterije u najvećem broju pojavljivale u mekom siru zbog visokog postotka vlage, što je doprinosilo lakšem prodoru različitih vrsta bakterija u proizvod. U našem istraživanju udio SRK pozitivnih uzoraka kod tvrdih sireva bio je veći u odnosu na ostale vrste sireva, a obzirom da su SRK i enterobakterije pozitivno korelirane, rezultati nisu u skladu s rezultatima istraživanja koje El-Ziney proveo u Saudijskoj Arabiji na 119 uzoraka sira (43).

U komparativnoj analizi *C. perfringens*, *E. coli* i *E. faecalis* kao indikatora fekalnog onečišćenja u mljevenom goveđem mesu u Kansasu, Obaidat. i sur. su zaključili da postoji specifična pozitivna korelacija između sva tri mikroorganizma, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Također, autori su mišljenja da bi se *C. perfringens* mogao koristiti i kao alternativa indikatora fekalnog onečišćenja namirnica, u zamjenu za *E. coli*. Uspoređujući rezultate istraživanja na uzorcima mljevenog mesa goveda, autori su došli do zaključka da su spore *C. perfringens* otpornije te mogu, na dulje vrijeme, tolerirati širi spektar nepovoljnih okološnih čimbenika za razliku od *E.coli*. Kako se *C. perfringens*, za razliku od ostalih analiziranih mikrobioloških parametara, rjeđe pojavljuje u prirodi, autori zaključuju da bi baš ovaj patogen najbolje služio kao indikator fekalne kontaminacije. 70% analiziranih uzoraka mljevenog goveđeg mesa koji su pokazali prisutnost *E. coli*, sadržali su visoki broj, a preko 60% *C. perfringens* pozitivnih uzoraka, niski broj bakterijskih stanica. Takvi rezultati se mogu pripisati činjenici da *E. coli* može porasti na temperaturama hladnjaka stoga dobiveni pozitivni rezultati ne moraju nužno značiti da je zaista došlo do fekalne kontaminacije mesa. Autori smatraju da je *C. perfringens* vrlo dobar indikator fekalne kontaminacije posebice kada drugi indikatori nisu više detektibilni (44).



## 6 ZAKLJUČAK

Iako su sulfitreducirajuće klostridije vrlo otporne bakterije na temperaturu, niski i visoki pH, te aktivitet vode, ovim istraživanjem je ustanovljeno da se bakterije pojavljuju u vrlo malom udjelu ispitanih uzoraka, svega 1,4%. Kako je temperaturni optimum za rast sulfitreducirajućih klostridija od 43°C do 47°C, pokazalo se je kako su rekordne temperature u Republici Hrvatskoj 2017. i 2019. godine doprinijele povišenom broju SRK pozitivnih uzoraka u hrani, pogotovo u ljetnim mjesecima (srpanj i rujan).

Gotova hrana prikupljena u restoranima na području Primorsko-goranske županije bila je medij s najvećim udjelom SRK pozitivnih uzoraka. Kako je gotova hrana namijenjena brzom serviranju, pri čemu je potrebno obrok podgrijati prije serviranja na stol, može se zaključiti da je temperatura na kojem je hrana toplinski obrađivana ili se čuvala, bila preniska da bi se uništili svi oblici sulfitreducirajućih klostridija. Stoga je vrlo važno da se prate i dokumentiraju kritične kontrolne točke prilikom pripreme i skladištenja te da se educira osoblje o dobroj higijenskoj praksi kako i u buduću ne bi došlo do epidemija uzrokovane ovim uzročnikom.

## 7 LITERATURA

- 1) IMP CENTER. Importance of Food – Essay [Internet]. I. 2018 [citirano 16.8.2021.]. Dostupno na: <https://imp.center/i/importance-of-food-essay-7887/>
- 2) Ray B. Fundamental food microbiology. 3.izd. Boca Raton; London; New York: Crc Press; 2004. Stranica 1.
- 3) World Health Organization. Food safety [Internet]. Who.int. WHO. [ažurirano: 30.4.2020; citirano 16.8.2021.]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- 4) Hungaro H., & Peña W.E.L., Silva N., & Carvalho R.V., Alvarenga V., Verônica, Sant'Ana A.,(2014). Food Microbiology. Encyclopedia of Agriculture and Food Systems. Stranica: 213-223. [Internet]. [citirano 17.4.2022.]. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/288208448\\_Food\\_Microbiology](https://www.researchgate.net/publication/288208448_Food_Microbiology)
- 5) Beales N. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 3(1), 1–20. 2004. [Internet]. [citirano: 15.7.2022.]. Dostupno na: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x>
- 6) Knezović M. Utjecaj aktiviteta vode, temperature i timola na rast odabranih vrsta plijesni roda Aspergillus Diplomski rad. 2014. [Internet]. [citirano: 18.4.2022.]. Dostupno na: <https://repozitorij.ptfos.hr/islandora/object/ptfos%3A123/datastream/PDF/view>
- 7) Bredius M.W.J., de Ree E.M., Poglavlje 3: Media for the detection and enumeration of clostridia in foods. Progress in Industrial Microbiology. Elsevier. Volume 37. 2003. Stranica 49-60. [Internet]. [citirano 18.4.2022.]. Dostupno na: [sci-hub.se/10.1016/s0079-6352\(03\)80006-1](https://sci-hub.se/10.1016/s0079-6352(03)80006-1)
- 8) Zavod za javno zdravstvo Dubrovačko-neretvanske županije. Sulfitoreducirajuće klostridije. Rječnik pojmova. [Internet]. [citirano 18.4.2022.]. Dostupno na: <https://www.zzjzdnz.hr/hr/o-nama/rjecnik-pojmova/971>
- 9) Adams M.R., Moss M.O. Food Microbiology 3rd Edition. University of Surrey, Guildford. UK. 2008. The Royal Society of Chemistry. Stranica: 198-213. [Citirano 18.4.2022.].

- 10) European Food Safety Authority (EFSA). Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in foodstuffs, animals and feedingstuffs including information on foodborne outbreaks, antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria and some pathogenic microbiological agents – Croatia. 2018. [Internet]. [Citirano 18.4.2022.].  
Dostupno na: <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/zoocountryreport18hr.pdf>
- 11) CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Clostridium Perfringens Food Poisoning. 2021. [Internet]. [citirano: 21.4.2022.]. Dostupno na: <https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/clostridium-perfringens.html?fbclid=IwAR2PLkuHDG9dFhra8-yvPuFnzMTA8SLsIt-UpKFiSMJQ49YRViiHROfNuKU>
- 12) Robertson S., Li J., McClane B.A. BACTERIA. Clostridium perfringens. University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA. Elsevier Inc. 28.12.2012. [Internet]. [citirano: 16.5.2022.]. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555818463.ch18>
- 13) de Jong A.E.I., *Clostridium perfringens*: spores&cells, media&modeling. Thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 2003. [Internet]. [citirano: 16.5.2022.]. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/40127438\\_Clostridium\\_perfringens\\_spores\\_cells\\_media\\_modeling](https://www.researchgate.net/publication/40127438_Clostridium_perfringens_spores_cells_media_modeling)
- 14) Heredia NL, Garcia GA., Luévanos R., Labbe R.G., García-Alvarado. Elevation of the Heat Resistance of Vegetative Cells and Spores of *Clostridium perfringens* Type A by Sublethal Heat Shock. J. Food Protect. 60: 998-1000. 1997. [Internet]. [citirano: 19.5.2022.]. Dostupno na: [https://watermark.silverchair.com/0362-028x-60\\_8\\_998.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW\\_Ercy7Dm3ZL\\_9Cf3qfKAc485ysgAAAtkwggL\\_VBgkqhkiG9w0BBwagggLGMIIcwgIBADCCArSgCSqGSIb3DQEHAATAeBgIghkgBZQMEAS4wEQ\\_QMQKb11hFgLnbf4nrAgEQgIICjAH6eZ3qe-REH-SluVCmuzAxDqglbsM3X8naBIQrJZyQGfWAFHjwW\\_P2meu8K4RUoH\\_LL0lx1THHvOSiDXL7vxe\\_VSJHL3z9tg7ZCXmUxH9GOq\\_HR\\_Gz0rjh3Lc5xO4yyTBenGfGz\\_Q70hb6ILi1WlbnSTwmkn1N8oD8b6ilOO2ODICNnSMMxLy55f7KSBHiC\\_Aly6sVgMsNGBvF4BSJxneVDwm4dTAIPZ4GdUUHtshp\\_106XK-MLvFwA4gqpHi2JICsr8xn1tLnlo4Epp-d3tuR84WFJMEGKckh-rzOODs-hq\\_lyNoTwLosPJ9KTZDHzGB0ETKwtCWRrPLR1UFq5jpg1E2vrCa9kqekfnrXIp3xUieoqMqC9Od\\_mHXfFWfU\\_27\\_xebadg-HOVcb\\_GDmkPXdHMMq-S51Nw7ulb45T57520C42UFTxbiT2D9\\_RAAOtpn0WSCKwE2WflueWRteHREZerSSzyfamRp5CLW\\_NmG6zjH-I2gXPzUJr8tz-38AqUdvcns87dwbThsAHbgvW7Vi7hSuXMsk4iJk\\_Dd2mPQSpwJD\\_zu6SIANBtgXyVPq\\_u6fPaM2](https://watermark.silverchair.com/0362-028x-60_8_998.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAtkwggL_VBgkqhkiG9w0BBwagggLGMIIcwgIBADCCArSgCSqGSIb3DQEHAATAeBgIghkgBZQMEAS4wEQ_QMQKb11hFgLnbf4nrAgEQgIICjAH6eZ3qe-REH-SluVCmuzAxDqglbsM3X8naBIQrJZyQGfWAFHjwW_P2meu8K4RUoH_LL0lx1THHvOSiDXL7vxe_VSJHL3z9tg7ZCXmUxH9GOq_HR_Gz0rjh3Lc5xO4yyTBenGfGz_Q70hb6ILi1WlbnSTwmkn1N8oD8b6ilOO2ODICNnSMMxLy55f7KSBHiC_Aly6sVgMsNGBvF4BSJxneVDwm4dTAIPZ4GdUUHtshp_106XK-MLvFwA4gqpHi2JICsr8xn1tLnlo4Epp-d3tuR84WFJMEGKckh-rzOODs-hq_lyNoTwLosPJ9KTZDHzGB0ETKwtCWRrPLR1UFq5jpg1E2vrCa9kqekfnrXIp3xUieoqMqC9Od_mHXfFWfU_27_xebadg-HOVcb_GDmkPXdHMMq-S51Nw7ulb45T57520C42UFTxbiT2D9_RAAOtpn0WSCKwE2WflueWRteHREZerSSzyfamRp5CLW_NmG6zjH-I2gXPzUJr8tz-38AqUdvcns87dwbThsAHbgvW7Vi7hSuXMsk4iJk_Dd2mPQSpwJD_zu6SIANBtgXyVPq_u6fPaM2)

[YXU2WPfN4BV3ptZ5\\_06YB1r9oMqlrOIXpEZND3dx46MTiwDLwLAs6VsXhQWTff-2-HXqLcj13w37gRPqPaaYvo1hZX02AOPwfppwmMUPev608RUWvX0Rpwm0omXyIBGeqoZ-yCELgeFjAc-XrAAI4OKSy44aWJqDBLL1H8MNTHyMUe13ib236G64O3Uv6INC48WekDwdVq28vXZ0Rd9uzdGbrKECCebQS-FvMLhRYiwDOild4KETg5HkmvRZsOF55vtogm3Qn1tjsNL7i9pRu3h2bWvrQqI](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30917479/)

- 15) McKane L., Kandel J. Bacterial structures and their functions. Microbiology; essentials and application. McGraw-Hill, Inc., New York. 1996. stranica: 66-95. [citirano: 19.5.2022.].
- 16) Sarker MR, Carman RJ, McClane BA. Inactivation of the gene (cpe) encoding *Clostridium perfringens* enterotoxin eliminates the ability of two cpe-positive *C. perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. Mol Microbiol. 1999. Sep;33(5):946-58. [Internet]. [citirano: 26.5.2022.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10476029/>
- 17) Thpanorama. Karakteristike *Clostridium perfringens*, taksonomija, morfologija, stanište. [Internet]. [citirano: 16.5.2022.]. Dostupno na: <https://hr.thpanorama.com/articles/biologa/clostridium-perfringens-charactersticas-taxonoma-morfologa-hbitat.html>
- 18) CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Prevent Illness From *C. perfringens* Poisoning. 2018. [Internet]. [citirano: 16.5.2022.]. Dostupno na: [https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/clostridium-perfringens.html?CDC\\_AA\\_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Ffoodsafety%2Fclostridium-perfringens.html](https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/clostridium-perfringens.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Ffoodsafety%2Fclostridium-perfringens.html)
- 19) Hughes JA., Turnbull P.CB., Stringer M.F. A serotyping system for *Clostridium welchii* (*C. perfringens*) type a, and studies on the type-specific antigens. Journal of Medical Microbiology. 1976.;9(4):475–85. [Internet]. [citirano: 19.5.2022.]. Dostupno na: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/9/4/medmicro-9-4-475.pdf?expires=1656320368&id=id&accname=guest&checksum=3995027B804DD848D0895077D3EBB08A>
- 20) DE Boer E, Boot EM., Comparison of Methods for Isolation and Confirmation of *Clostridium perfringens* from Spices and Herbs. Journal of Food Protection. 1983. 46(6):533–6. [Internet]. [citirano: 19.5.2022.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30917479/>

- 21) Mehdizadeh Gohari I., A Navarro M., Li J., Shrestha A., Uzal F., A McClane B. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence*. 2021 Dec;12(1):723-753. [Internet]. [citirano: 26.5.2022.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8043184/>
- 22) Awad MM., Bryant AE., Stevens DL., Rood JI. Virulence studies on chromosomal alpha-toxin and theta-toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of alpha-toxin in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene. *Mol Microbiol*. 1995 Jan;15(2):191-202. [Internet]. [citirano: 26.5.2022.]. Dostupno na: <https://sci-hub.se/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02234.x>
- 23) Delić B., Sorić M., Žiga S., Miletić W., Baršić Gračanin T., Grabovac V. PLINSKA GANGRENA RETROPERITONEJA. *Acta medica Croatica* [Internet]. 2020 [citirano: 26.5.2022.]. 74(Supl 1):127-130. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/file/343715>
- 24) MSD priručnik dijagnostike i terapije: Klostridijski nekrotizirajući enteritis. [Internet]. [citirano: 26.5.2022.]. Dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/infektologija/anaerobne-bakterije/klostridijski-nekrotizirajuci-enteritis>
- 25) Albert Marinculić, Boris Habrun, Ljubo Barbić, Relja Beck. Biološke opasnosti u hrani. HAH, Osijek, 2009. [Internet]. [citirano: 15.7.2022.]. Dostupno na: [https://www.hah.hr/pdf/Prirucnik\\_bioloske\\_opasnosti.pdf](https://www.hah.hr/pdf/Prirucnik_bioloske_opasnosti.pdf)
- 26) Tiwari A., Nagalli S. *Clostridium Botulinum*. Nih.gov. StatPearls Publishing; 2019. [Internet]. [citirano: 26.5.2022.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553081/>
- 27) Harris A. *Clostridium botulinum*. *Encyclopedia of Food and Health*, The Food and Environment Research Agency (Fera), York, UK. 2016. Stranica: 141–145. [Internet]. [citirano: 27.5.2022.]. Dostupno na: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00172-0>
- 28) Pellett S. Pathogenesis of *Clostridium botulinum* in Humans. *Human Emerging and Re-Emerging Infections*, Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA. 2015. Stranica: 821–839. [Internet]. [citirano: 27.5.2022.]. Dostupno na: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1002/9781118644843.ch43>

- 29) European Food Safety Authority (EFSA). Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in foodstuffs, animals and feedingstuffs including information on foodborne outbreaks, antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria and some pathogenic microbiological agents – Croatia. 2015. [Internet]. [citirano: 27.5.2022.]. Dostupno na: <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/zoocountryreport15hr.pdf>
- 30) Tankeshwar A. Clostridium botulinum: Properties, Pathogenesis, Lab Diagnosis. Microbe Online. 2020. [Internet]. [citirano:27.5.2022.]. Dostupno na: <https://microbeonline.com/clostridium-botulinum-properties-pathogenesis-diagnosis/#Pathogenesis>
- 31) Osborne N. Fact sheet on Clostridium botulinum. Examining Food. 2013. [Internet]. [citirano: 5.6.2022.]. Dostupno na: <https://www.thermofisher.com/blog/food/fact-sheet-on-clostridium-botulinum/>
- 32) McCusker M. Clean label rješenje za kontrolu bakterije *Clostridium botulinum* u kuhanom mesu - studija slučaja. MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu. 21.(3.):304-310. 2019. [Internet]. [citirano: 5.6.2022.]. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/221108>
- 33) CDC. Diagnosis and Treatment. cdc.gov. 2019. [Internet]. [citirano: 5.6.2022.]. Dostupno na: <https://www.cdc.gov/botulism/testing-treatment.html>
- 34) Schneider KR, Goodrich Schneider RM, Kurdmonkoltham P, Bertoldi B. Preventing Foodborne Illness: Clostridium botulinum. EDIS. 2017 Jul 21;2017(4). [Internet]. [citirano:5.6.2022.]. Dostupno na: <https://www.nifa.usda.gov/sites/default/files/resource/Preventing-Foodborne-Illness-Clostridium-botulinum.pdf>
- 35) Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja. Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu. Hrvatska. ožujak 2011.
- 36) Nastavni zavod za javno zdravstvo PGŽ. Zdravstveno ekološki odjel. Postupak: Horizontalna metoda za brojenje sulfitreducirajućih bakterija u anaerobnim uvjetima. Oznaka dokumenta: M 153-200. Izdanje: 1. [citirano: 6.6.2022.].
- 37) Musladin-Ljevaković I, Prisutnost patogenih mikroorganizama u namirnicama u Dubrovačko-neretvanskoj županiji u razdoblju od 2002.-2006. godine. Zavod za javno zdravstvo Dubrovačko-neretvanske županije. Vjesnik. Hrvatski časopis za javno zdravstvo. Rujan 2007. Godina VI. Broj 17/18. [Internet]. [citirano: 6.6.2022.]. Dostupno na: [https://www.zzjzdnz.hr/downloadf/Vjesnik\\_br\\_17-18.pdf](https://www.zzjzdnz.hr/downloadf/Vjesnik_br_17-18.pdf)

- 38) Bryan FL., Factors that Contribute to Outbreaks of Foodborne Disease. International Association of Milk, Food, and Environmental Sanitarians. Journal of Food Protection 41(10), 816–827. 1978. [Internet]. [citirano: 15.6.2022.]. Dostupno na: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.4315/0362-028x-41.10.816>
- 39) Miss Zdrava. Gotova jela na zdraviji način. Redakcija zdrave hrane. 2015. [Internet]. [citirano: 15.6.2022.]. Dostupno na: <https://miss7zdrava.24sata.hr/hrana/gotova-jela-5653>
- 40) Strong DH, Canada JC, Griffiths BB. Incidence of Clostridium perfringens in American Foods. Applied Microbiology. 1963 Jan;11(1):42–4. [Internet]. [citirano: 15.6.2022.]. Dostupno na: <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/am.11.1.42-44.1963>
- 41) El-Prince E, Ahmed Abdel-Hameid Ahmed A, Abdel-Haleem AA., Amin MM. Studies on Anaerobic Bacteria in Some Cheeses Sold in Assiut City, Egypt. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Assiut University, Egypt. Animal Health Research Institute, Assiut, Egypt. 2018. [Internet]. [citirano: 15.6.2022.]. Dostupno na: <https://core.ac.uk/download/pdf/327143108.pdf>
- 42) YourDictionary. Restaurant Definitions: What does restaurant mean? Best 4 Definitions of Restaurant. [Internet]. [citirano: 15.6.2022.]. Dostupno na: <https://www.yourdictionary.com/restaurant>
- 43) El-Ziney MG. Evaluation of Microbiological Quality and Safety of Milk and Dairy Products with Reference to European and Gulf Standards. Department of Dairy Science and Technology, Faculty of Agriculture, Alexandria University. Scientific & Academic Publishing. 2018. [Internet]. [citirano: 15.6.2022.]. Dostupno na: <http://article.sapub.org/10.5923.j.fph.20180802.03.html#Ref>
- 44) Obaidat MM., Fung DYC. (2005). COMPARATIVE ANALYSIS OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*, *ESCHERICHIA COLI* AND *ENTEROCOCCI* AS INDICATORS OF FECAL CONTAMINATION OF GROUND BEEF. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 13(4), 225–242. 2005. [Internet]. [citirano: 17.6.2022.]. Dostupno na: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2005.00023.x>

POPIS TABLICA:

Tablica 1. Kriteriji za ocjenjivanje zdravstvene ispravnosti određenih vrsta hrane vezano uz sulfitreducirajuće klostridije.....	19
Tablica 2. Spearmanov korelacijski koeficijent između ispitanih pokazatelja .....	36



## POPIS SLIKA

Slika 1. Prikaz <i>C. perfringens</i> s ovalnim, subterminalnim sporama .....	5
(izvor: <a href="https://www.brainkart.com/article/General-Properties-of-Clostridia_18077/">https://www.brainkart.com/article/General-Properties-of-Clostridia_18077/</a> )	
Slika 2. Ultrastruktura spore <i>C. perfringens</i> .....	7
(izvor: <a href="https://europepmc.org/article/MED/27337447">https://europepmc.org/article/MED/27337447</a> )	
Slika 3. Mehanizam djelovanja botulinum toksina na oslobađanje acetilkolina) .....	16
(izvor: <a href="https://repositorij.pharma.unizg.hr/islandora/object/pharma:938">https://repositorij.pharma.unizg.hr/islandora/object/pharma:938</a> )	
Slika 4. Čvrsti agar (Iron sulfite agar).....	23
(izvor: <a href="https://www.food-safety.com/articles/3464-iron-sulphite-agar-facilitates-detecting-anaerobes-in-canned-foods">https://www.food-safety.com/articles/3464-iron-sulphite-agar-facilitates-detecting-anaerobes-in-canned-foods</a> )	
Slika 5. Elektronička vaga.....	24
Slika 6. Sterilne vrećice za homogenizaciju.....	24
Slika 7. Homogenizator.....	25
Slika 8. Vodena kupelj .....	25
Slika 9. Prikaz udjela pozitivnih uzoraka koji su bili ispod i iznad maksimalno dozvoljenih koncentracija (MDK), u razdoblju istraživanja 2015.-2020.....	30
Slika 10. Prikaz udjela zdravstveno neispravnih i zdravstveno ispravnih uzoraka, u razdoblju istraživanja 2015.-2020. ....	31
Slika 11. Prikaz broja analiziranih uzoraka po godinama.....	31
Slika 12. Grafički prikaz udjela pozitivnih/negativnih uzoraka po godinama.....	32
Slika 13. Prikaz udjela pozitivnih uzoraka na sulfitreducirajuće klostridije (SRK) po mjesecima, u razdoblju istraživanja 2015.-2020.....	33
Slika 14. Broj pozitivnih uzoraka na sulfitreducirajuće klostridije (SRK) prema vrsti hrane, u razdoblju istraživanja 2015.-2020.....	34
Slika 15. Broj pozitivnih uzoraka na sulfitreducirajuće klostridije (SRK) prema vrsti objekta iz kojih je uzorak uzet, u razdoblju istraživanja 2015.-2020. ....	35

## 8 ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Dora Čimbora

Datum i mjesto rođenja: 18. svibnja 1996. godine; U Rijeci

Adresa: Rubeši 133/4; 51215 Kastav

Državljanstvo: Hrvatsko

Mobitel: 091/334-9003

E-mail: doracimbora1@gmail.com

Obrazovanje:

- 2003. – 2011. Osnovna škola Srdoči, Rijeka
- 2011. – 2015. Medicinska škola u Rijeci, smjer Zdravstveno-laboratorijski tehničar
- 2015. – 2019. Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet; Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarnog inženjerstva
- 2019. – 2022.; Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet; Diplomski sveučilišni studij Sanitarnog inženjerstva

Osobne vještine:

Materinji jezik: hrvatski

Ostali jezici: engleski (napredno)

Rad na računalu: poznavanje i aktivno korištenje MS Office paketa

Vozačka dozvola: B kategorija

Ostalo:

- sport - streličarstvo
- sudjelovanje u natjecanju Zdravstveno-laboratorijskih tehničara 20. listopada 2014. godine – osvojeno drugo mjesto