

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL
Toiduainete instituut

Magistritöö

***LISTERIA SPP. ALLIKAD JA
LEVIKUTEED KÜLMSUITSU
LÕHEFILEE TOOTMISEL***

ANNA SHALUNOVA

TALLINN
2015

TALLINN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
Department of Food Processing

Master thesis

**THE SOURCES AND
CONTAMINATION ROUTES OF
LISTERIA SPP. IN COLD-SMOKED
SALMON PROCESSING PLANT**

ANNA SHALUNOVA

TALLINN
2015

Olen koostanud lõputöö iseseisvalt.
Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite
tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja
mujalt pärinevad andmed on viidatud.

Autor: Anna Shalunova

.....
(allkiri ja kuupäev)

Üliõpilase kood: 111788KATM

Töö vastab kehtivatele nõuetele:

Juhendaja: Tiina Veskus

.....
(allkiri ja kuupäev)

Konsultant/Kaasjuhendaja: Eesnimi Perekonnanimi (kui on)

.....
(allkiri ja kuupäev)

Kaitsmisele lubatud "....." 201.....a.

Kaitsmiskomisjoni esimees prof. Raivo Vokk

ANNOTATSIOON

Külmsuitsu lõhefilee on üks valmistoodetest, milles võib sisalduda ja paljuneda eluohtliku toiduinfektsiooni listerioosi tekitaja bakter *Listeria monocytogenes*. Haigus võib põhjustada tõsiseid terviseprobleeme riskigruppi kuuluvatele inimestele (rasedad, vastsündinud, eakad, nõrgestatud immuunsusega inimesed). Tüsistuste korral võib hinnanguliselt 40% juhtumitest lõppeda surmaga (Lawley et al., 2012).

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli mikrobioloogiliste uuringute abil välja selgitada bakterite *Listeria* spp. ja *Listeria monocytogenes* võimalikud allikad ja levikuteed külmsuitsu lõhefileed tootvas ettevõttes, mis asub Tallinnas.

Töö koosneb kirjanduse ülevaatest ja eksperimentaalsest osast. Kirjanduse osas antakse ülevaade *Listeria* spp. omadustest ja allikatest, esinemisest toidus, täpsemalt toorkalas ja külmsuitsulõhes. Samuti antakse ülevaade *Listeria* spp. leiduvusest kalatoodete tootmisel ja kirjeldatakse tootmisetappide mõju bakteritele. Eksperimentaalses osas on toodud külmsuitsu lõhefilee valmistamise tehnoloogiline skeem, analüüsimeetodite kirjeldused, kasutatud materjalid, analüüside tulemused ja arutelu ning järeldused ja soovitused.

Magistritöö tulemused näitasid, et antud ettevõttes on bakterite *Listeria* spp. ja *L. monocytogenes* allikaks saastunud toorkala, millelt bakterid levivad tootmispindadele ning seadmetele. Tootmise käigus saastub personal, kes omakorda mõjutab bakterite levikut. *L. monocytogenes* levikuteedest ja ohuastmest ülevaate saamiseks viidi läbi *Listeria monocytogenes* serotüpeerimine. Toorainena kasutatavast toorlõhest isoleeriti bakteri *L. monocytogenes* serotüüp 1/2a. Sama serotüübiga oli saastunud ka ettevõtte tootmiskeskond.

Magistritöö on esitatud 48 leheküljel, selles on 10 joonist, 20 tabelit ja 2 fotot.

ABSTRACT

Cold-smoked salmon is a ready-to-eat food that can be contaminated with *Listeria monocytogenes* – bacteria that causes foodborne infection listeriosis. Listeriosis mainly affects immunocompromised people, pregnant woman, newborns and elderly people and it is fatal in 40% of cases (Lawley et al., 2012).

The aim of this thesis was to investigate the sources and routes of contamination of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon processing plant located in Tallinn.

Thesis consists of literature review and experimental section. Literature review gives an account of *Listeria* spp. characteristics and sources, bacteria prevalence in food, namely raw fish and cold-smoked salmon, followed by prevalence of *Listeria* spp. in fish processing plant and influence of processing steps on growth of bacteria. Experimental section provides technology of cold-smoked salmon production, description of methods and used materials, followed by results, discussion and conclusions.

The results showed that contaminated raw salmon is a source of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes*. Then bacteria spread on processing equipment and other surfaces. Employees become a bacterial carriers during the workday, so they can spread it further. Serotyping of *L. monocytogenes* was carried out to better understand contamination routes of bacteria. The results showed that all the *L. monocytogenes* isolates from processing plant and raw salmon belonged to serotype 1/2a.

This thesis contains 48 pages, 10 figures, 20 tables and 2 photos.

SISUKORD

ANNOTATSIOON.....	4
ABSTRACT	5
KASUTATUD LÜHENDID	7
SISSEJUHATUS	8
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	9
1.1 <i>Listeria</i> perekonna iseloomustus	9
1.1.1 Bakteri <i>Listeria monocytogenes</i> tüpiseerimine.....	9
1.1.2 Allikad	10
1.1.3 Kasvuparameetrid.....	10
1.1.4 Biokile	11
1.2 Listerioos	12
1.2.1 Sümptomid	13
1.2.2 Riskirühmad	13
1.3 <i>Listeria</i> esinemine toidus	14
1.3.1 Piinormid.....	14
1.3.2 Kriitilised toidud.....	15
1.4 <i>Listeria</i> kalas	17
1.4.1 <i>Listeria</i> toores kalas.....	17
1.4.2 <i>Listeria</i> külmsuitsutatud lõhes.....	18
1.4.3 <i>Listeria</i> kalatoodete tootmisel	18
1.4.4 Tootmisetappide mõju bakteri <i>Listeria monocytogenes</i> arvukuse kasvule ...	19
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	22
2.1 Materjalid ja meetodid	22
2.1.1 Tehnoloogiline skeem	22
2.1.2 Proovide võtmine pindade, õhu ja vee mikrobioloogilise puhtuse määramiseks	24
2.1.3 Mikrobioloogilised analüüsid	27
2.1.4 Kasutatud materjalid, seadmed ja töövahendid	30
2.1.5 Statistilised analüüsid	31
2.2 Tulemused ja arutelu.....	32
2.2.1 <i>Listeria</i> spp. ja <i>Listeria monocytogenes</i> käitlemiskeskkonnas.....	32
2.2.2 Toorkala analüüs.....	37
2.2.3 Serotüübi määramine	38
2.2.4 Õhu analüüs	39
2.2.5 Vee analüüs.....	40
2.3 Järeldused.....	42
3. SOOVITUSED	43
4. KOKKUVÕTE	44
5. SUMMARY	45
6. KASUTATUD KIRJANDUS	46
LISA 1 Toiduohutuse mikrobioloogilised kriteeriumid bakteri <i>Listeria monocytogenes</i> kohta	49

KASUTATUD LÜHENDID

AFSSA	Prantsuse Toiduohutuse Amet (<i>French Agency for Food Safety</i>)
ALOA	<i>Listeria</i> agar Ottaviani ja Agosti järgi (<i>Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti</i>)
BHI	Aju-Südame Infusioon (<i>Brain-Heart Infusion</i>)
CFU	Kolooniat moodustav ühik (<i>Colony-Forming Unit</i>)
DNA	Desoksüribonukleiinhape (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ECDC	Haiguste Ennetamise ja Tõrje Euroopa Keskus (<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>)
EFSA	Euroopa Toiduohutusamet (<i>European Food Safety Authority</i>)
EURL Lm	Euroopa Liidu Referentslabor <i>Listeria monocytogenes</i> 'e jaoks (<i>European Union Reference Laboratory for Listeria monocytogenes</i>)
EÜ	Euroopa Ühendus (<i>European Community</i>)
FDA	Toidu- ja Ravimiamet (<i>Food and Drug Administration</i>)
FSIS	Toidu Ohutuse ja Kontrolli Talitus (<i>Food Safety and Inspection Service</i>)
ISO	Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (<i>International Organization for Standardization</i>)
LERQAP	Toidukvaliteedi ja Toidu Protsesside Uuringute Labor (<i>Laboratory for Studies and Research on Quality of Foods and on Food Processes</i>)
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCR	Polümeraasi ahelreaktsioon (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Rpm	Pööret minutis (<i>Revolutions per minute</i>)
VTL	Veterinaar- ja Toidulaboratoorium (<i>Veterinary and Food Laboratory</i>)

SISSEJUHATUS

Listerioos on harva esinev, kuid ohtlik toiduinfektsioon, mille tekitajaks on bakter *Listeria monocytogenes*. Eelkõige on ohustatud riskirühmadesse kuuluvad inimesed, kelle puhul suremus võib hinnanguliselt ulatuda kuni 40%-ni (Lawley et al., 2012).

L. monocytogenes eristub teistest bakteritest oma võime poolest paljuneda külmkapi temperatuuril, seepärast on suur osa listerioosi juhtumitest seotud valmistoitude tarvitamisega, ilma milleta on kaasaegset kiiret elu võimatu ette kujutada. Eelkõige on haigestumiste põhjustajateks olnud piima- ja lihatooted, aga ka külmsuitsutatud kalatooted. FDA/FSIS andmetel on hinnanguliselt 1% listerioosi juhtumitest põhjustatud külmsuitsutatud kalatoodete poolt (Gram, 2004). Dokumenteeritud listerioosidest on enamikel juhtudel olnud põhjustajateks külmsuitsu forell või teised kergelt töödeldud kalatooted. Samas ei ole dokumenteeritud mitte ühtegi haigusjuhtumit, mille oleks esilekutsunud külmsuitsutatud lõhe. Kuigi *Listeria* esinemist ja ellujäämist erinevates toitudes ja toidutöötlemise keskkondades on uurinud paljud erinevate maade teadlased, on antud teema siiani aktuaalne iga esinenud juhtumi ainulaadsuse tõttu.

Käesolev magistritöö käsitleb mikrobioloogilise ohutusetagamist külmsuitsu lõhefilee tootmisel ettevõttes, mis asub Tallinnas ja ekspordib oma toodangut paljudesse maailma riikidesse.

Magistritöö eesmärgiks on mikrobioloogiliste uuringute abil välja selgitada *Listeria* spp. ja *Listeria monocytogenes* võimalikud allikad ja levikuteed külmsuitsu lõhefilee tootmisel antud ettevõttes.

Selleks määrati *Listeria* spp. esinemine/mitteesinemine tooraines, tootmiskeskkonnas ning personali kätel ja tööriivastel. Lisaks hinnati tootmises kasutatava vee ja tootmiskeskkonna õhu mikrobioloogilist puhtust. Positiivsete proovide puhul viidi läbi *L. monocytogenes* tuvastamine ja serotüpeerimine.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 *Listeria* perekonna iseloomustus

Listeria perekond sai oma nime kirurgi Lord Listeri järgi. *Listeria* perekonda kuulus ainult üks liik: *L. monocytogenes*, mis avastati 1925 a. loomahaigusi uurides. Neli aastat hiljem isoleeriti Taanis *L. monocytogenes* esmakordselt nakatunud inimese verest. Teiste liikide olemasolu tuvastati alles 1982 a. bakteri DNA analüüsi käigus (McLauchlin, 2006). Käesoleval ajal on perekonnas kaheksa liiki: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. marthii* ja *L. rocourtii*. Neist kahte viimast kirjeldati 2009. aastal (Magalhães et al., 2014).

Listeria perekonda kuuluvad bakterid on pulgakujulised (pikkus 1,0-2,0 µm, diameeter 0,4-0,5 µm), liikuvad, Gram-positiivsed, fakultatiivsed anaeroobid, nad ei ole võimelised moodustama endospore. Nad on katalaas-positiivsed ja oksüdaas-negatiivsed, esinevad tavaliselt üksikult või lühemate ahelatena (McLauchlin, 2006; Wagner ja McLauchlin, 2008).

1.1.1 Bakteri *Listeria monocytogenes* tüpiseerimine

Bakteri erinevad tüved on erinevate omadustega, kuna nende struktuurne ehitus on erinev. Tüvede tüpiseerimine võimaldab jagada neid ühe fenotüübi või genotüübi tunnusega seotud alatüüpideks ning aitab mõista teatud tüve päritolu ja ohuastet. Tüpiseerimise meetodid jagatakse vastavalt kaheks rühmaks: fenotüübilisteks ja genotüübilisteks. Esimesse rühma kuuluvad nt serotüpeerimine ja fagotüpeerimine. Teise rühma kuuluvad nt PCR-il põhinevad meetodid (Chen ja Knabel, 2008).

Serotüpeerimine põhineb antikehade reaktsioonidel bakteri pinnaantigeenidega, mille tulemuseks tekib aglutinatsioon – teatud antigeenidega rakud liituvad antikehade toimel kokku ja moodustavad silmaga nähtava sademe. Antikehade allikaks kasutatakse antiseerumit, mida saadakse loomadelt võetud verest (Chen ja Knabel, 2008).

Põhinedes erinevatel somaatilise O- ja viburite H-antigeenide kombinatsioonidel on leitud vähemalt 13 bakteri *Listeria monocytogenes* serotüüpi: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e ja 7, millest ainult nelja (1/2a, 1/2b, 1/2c ja 4b) on seostatud inimese listerioosi juhtumitega (Magalhães et al., 2014).

1.1.2 Allikad

Listeria spp. ja *L. monocytogenes* on maailmas laialt levinud ja neid leidub kõikjal keskkonnas. Neid on isoleeritud nii puhta soolase merevee pindmistest ja süvakihtidest kui ka lahtede vetest, järve- ja jõeveest ning olme- ja tööstusheitveest. Bakterit on isoleeritud erinevatest pinnastest, nt haritud põllu- ja karjamaalt, kultiveerimata maalt ning metsamullast. Mullas domineerivad *L. monocytogenes* serotüübid 1/2b ja 4b, harvem 1/2a. 10 cm sügavuselt võetud proovidest leiti oluliselt vähem *Listeria* spp. kui pinnakihi võetud proovidest. Üldiselt *Listeria* spp. arvukus suureneb inimeste ja loomade tegevuse aktiivsuse kasvuga (Liu, 2008; Wiedmann ja Sauders, 2007). Mullast ja veest pärit bakterid satuvad taimedesse ja loomasööta. Sellega seletub fakt, et äärmiselt palju loomi, linde, kalasid jt on selle bakteri kandjateks ilma haiguse nähtavate sümptomideta (McLauchlin, 2006; Wiedman ja Sauders, 2007). Hinnanguliselt kuni 10% inimestest võivad olla *L. monocytogenes* kandjad (Warriner ja Namvar, 2009).

Selline lai levik rõhutab *Listeria* bakterite võimet vastu panna ebasoodsatest keskkonnatingimustest põhjustatud stressidele.

1.1.3 Kasvuparameetrid

Põhilised mikroorganismide arvukuse kasvu mõjutavad keskkonna tegurid on temperatuur, pH, vee aktiivsus ja hapniku ning toitainete olemasolu. Kõige rohkem on uuritud bakteri *L. monocytogenes* kasvuparameetreid, kuid üldiselt ollakse arvamusele, et kõik *Listeria* perekonna liigid on stressitaluvuse poolest sarnased (Wiedman ja Sauders, 2007).

L. monocytogenes suudab säilitada eluvõime üsna karmides keskkonnatingimustes. Bakter kuulub psührotroofide hulka ja võib paljuneda küllaltki laias temperatuuri vahemikus: -1,5 °C kuni 45 °C, kusjuures optimaalne kasvutemperatuur on vahemikus 30-37 °C (Magalhães et al., 2014). Keskkonna temperatuurist sõltub ka bakteri liikuvus: temperatuuril 20-25 °C tekivad viburid, temperatuuril 37 °C pole vibureid (Wagner ja McLauchlin, 2008).

L. monocytogenes võib kasvada ja paljuneda pH vahemikus 5,2 kuni 9,0. Madalamal pH väärtusel tema eluvõime järsult väheneb, kuid bakter ei hävi. *L. monocytogenes* talub kuni 10%-st keedusoola (NaCl) sisaldust ja veeaktiivsust >0,92 (Wagner ja McLauchlin, 2008).

Bakteri *L. monocytogenes* tüved taluvad külmutamist ning säilitavad elu nii kuivades kui ka niisketes tingimustes pika aja jooksul. Bakter ei ole termoresistentne ja hävib pastöriseerimisel temperatuuril 60 °C 1,3 kuni 16,7 min jooksul ning temperatuuril 70 °C 0,06 kuni 0,2 min jooksul olenevalt toiduainest (Wagner ja McLauchlin, 2008).

1.1.4 Biokile

Bakteri *L. monocytogenes* võime tekitada biokilet peetakse peamiseks põhjuseks, miks ta on nii elujõuline, kuna selline mikroorganismide kooslus on vastupidavam pesu- ning desoainete toimele. Bakteri tõhusate kõrvaldamise strateegiate väljatöötamiseks on äärmiselt oluline aru saada biokile tekke- ja arengumehhanismist (Hanna ja Wang, 2007). Biokile moodustamine algab sellega, et mitu bakterirakku kiiresti (3-5 sekundi jooksul) ja ebahühtlaselt kinnituvad pinnale. Viburite olemasolu ei oma selles algetapis erilist tähtsust, kuna bakterirakud on võimelised kinnituma pinnale ka temperatuuril 37 °C kui vibureid pole ning erinevatel temperatuuridel saadud moodustiste kogumid tasanduvad juba mõne tunni pärast. Edasisel arenemisel tütararakud ei eraldu emarakust, vaid moodustavad mikrokolooniaid. Lõpuks saadakse kargstruktuuriga sarnane biokile (foto 1) (Hanna ja Wang, 2007).

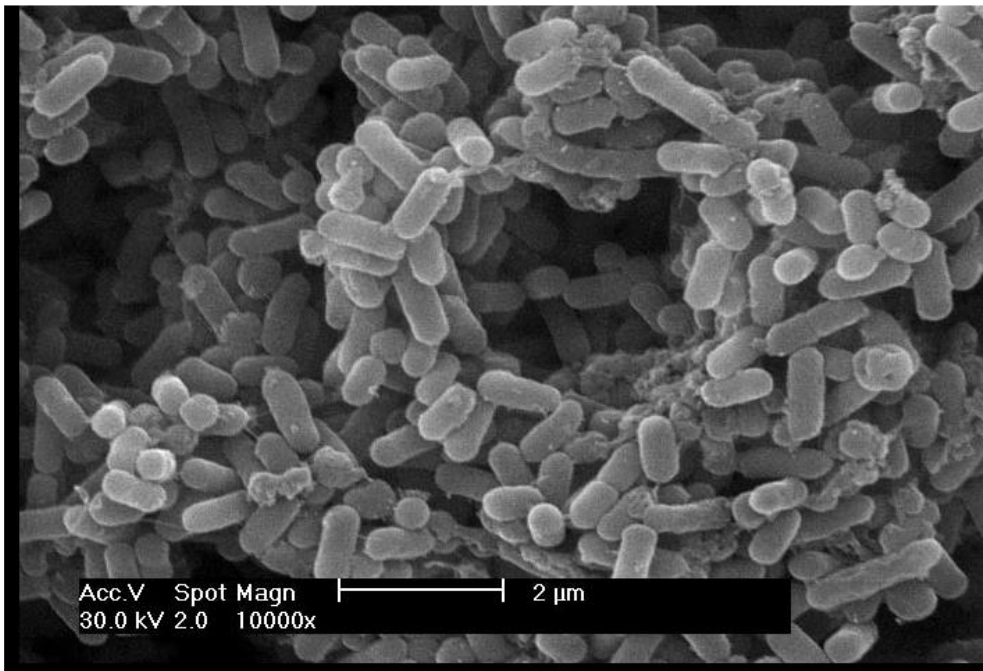


Foto 1 Bakteri *Listeria monocytogenes* kargstruktuurine biokile (Hanna ja Wang, 2007)

L. monocytogenes on võimeline moodustama biokile nii hüdrofoobsetele (polüstüreen) kui ka hüdrofiilsetele (klaas ja roostevaba teras) pindadele erinevatel temperatuuridel (Bonsaglia et al., 2014).

Hansen ja Vogel (2011) leidsid, et biokillesse koondunud bakterid taluvad kuivatamist paremini kui tavalised kolooniad: roostevabast terasest valmistatud pinnal elavad bakterid jäid elujõulisteks isegi peale pikaajalist veepuudust (kuni 10 päeva). See veelkord tõestab

biokile kaitsvat toimet ja väidet, et kõige levinumaks toidu ristsaastumise viisiks on kontakt saastunud pinnaga.

1.2 Listerioos

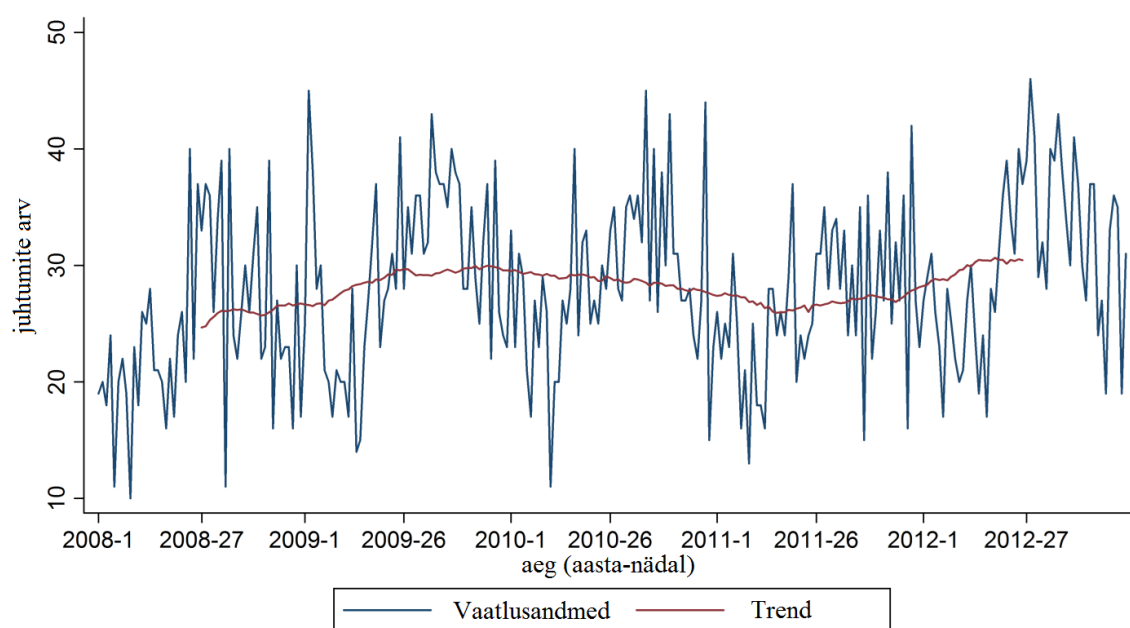
L. monocytogenes peetakse peamiseks inimese listerioosi tekitajaks, harvadel juhtudel on teatatud ka *L. innocua*, *L. ivanovii* ja *L. seeligeri* poolt põhjustatud infektsioonidest (Magalhães et al., 2014). Inimese listerioos jäi suhteliselt tundmatuks ja ebaselgeks haiguseks kuni 1980-ndateni, äratades vähest huvi. Seejärel leidsid aset suured listerioosi puhangud nii Euroopas kui Põhja-Ameerikas, mis lõpuks juhtisid inimeste tähelepanu haigustekitajale, tema haigustunnustele ning avastamise ja isoleerimise meetoditele. Tänapäeval on listerioosi juhtumite arv langenud võrreldes tolle ajaga (McLauchlin, 2006). Euroopa Toiduohutusameti (EFSA) andmetel teatasid 26 Euroopa Liidu liikmesriiki 1624 kinnitatud inimeste listerioosi juhtumitest 2012. aastal – 10,5%-line kasv võrreldes 2011. aastaga. Statistilist kasvutendentsi täheldati ka Soomes, Saksamaal ja Poolas (tabel 1) (EFSA ja ECDC, 2014).

Tabelist 1 nähtub, et Eestis oli 2012. aastal 3 listerioosi juhtumit (0,22 juhtumit 100 000 elaniku kohta), mis on suhteliselt väike arv võrreldes Põhja-Euroopa ning teiste Euroopa riikidega. Põhja-Euroopas oli kõige suurem teatamiste määr Soomes – 61 kinnitatud listerioosi juhtumit (1,13 juhtumit 100 000 elaniku kohta) 2012. aastal.

Tabel 1 Inimeste listerioosi teatatud juhtumid aastatel 2008-2012 Euroopa Liidus ja juhtumite määr 100 000 elaniku kohta (EFSA ja ECDC, 2014)

Riik	2012			2011	2010	2009	2008
	Juhtumite arv	Kinnitatud juhtumid	Kinnitatud juhtumid/ 100 000	Kinnitatud juhtumid			
Eesti	3	3	0,22	3	5	3	8
Soome	62	61	1,13	43	71	34	40
Läti	6	6	0,29	7	7	4	5
Leedu	8	8	0,27	6	5	5	7
Saksamaa	427	412	0,50	330	377	394	306
Suurbritannia	183	183	0,30	164	176	235	206
Norra	30	30	0,60	21	22	31	34
Rootsi	72	72	0,76	56	63	73	60
Poola	54	54	0,14	62	59	32	33
Hispaania	107	107	0,93	91	129	121	88
Prantsusmaa	348	348	0,53	282	312	328	276

Hooajalised tendentsid on esitatud joonisel 1.



Joonis 1 Inimeste listerioosi teatatud ja kinnitatud juhtumite tendents Euroopa Liidus, 2008-2012 (EFSA, 2014)

On näha, et vaadeldud aja jooksul eriti järske hüppeid ei täheldatud ning keskmine väärtus kõigub kitsas vahemikus. Üldiselt haigestumiste intensiivsus ei sõltu aastaajast.

1.2.1 Sümptomid

Saastunud toidu tarbimisest põhjustatud listerioos võib ilmned a inimesel kahel kujul: febrilne gastroenteriit või palju tõsisem invasiivne süsteemne haigus. Febrilse gastroenteriidi sümptomiteks on palavik, iiveldus, oksendamine, diarröa, dehüdratsioon. Invasiivse infektsiooni vormideks on sepsis, kesknärvisüsteemi kahjustus, nurisünnitus ja surnultsünd (Magalhães et al., 2014).

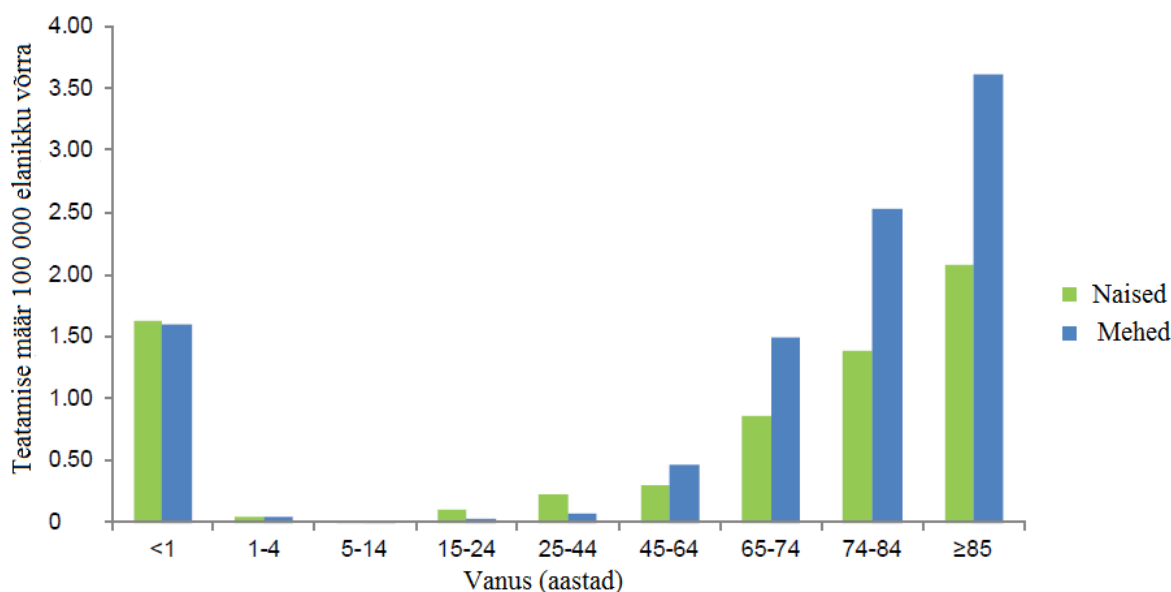
Haiguse iseloom on kolmest faktorist: bakterite arv, tüve virulentsus ja organismi immuunsüsteemi seisund. Minimaalne infitseeriv doos (MID) tervele inimesele on $>10^3$ CFU/g (Lawley et al., 2012). Inkubatsiooniaeg kestab 24-48 tundi gastroenteriiti juhul (Liu, 2008) ja 5-70 päeva süsteemse haiguse korral (Magalhães et al., 2014). Viimasel juhul nii pikk võimalik inkubatsiooniaeg raskendab haiguse põhjuste väljaselgitamist ja patsiendi toitumisajaloo ennistamist.

1.2.2 Riskirühmad

Teatud inimeste rühmad on nakkuse suhtes vastuvõtlikumad kui teised, need on nimelt ravimite või teiste haiguste tagajärjel nõrgendatud immuunsusega inimesed (nt siirdatud

organitega, vähihaiged, diabeetikud, HIV-infitseeritud inimesed), rasedad naised, looted/vastsündinud ning eakad inimesed. Nende riskirühmade puhul võib suremus ulatuda 40%-ni (Magalhães et al., 2014).

2012. aastal registreeriti kõige rohkem listerioosi juhtumeid alla 1- ja üle 65-aasta vanuste inimeste seas Euroopa Liidus (joonis 2). Esimeses rühmas 79% juhtudest on seotud raseduse ajal edastatud haigusega. Vanuserühmades 15-24 ja 24-44 domineerivad naised – 71,3% juhtudest on seotud rasedusega. Vanemates vanuserühmades domineerivad mehed (EFSA, 2014).



Joonis 2 Teatamise määrad Euroopa Liidus vanuse ja soo järgi, 2012 a. (EFSA, 2014)

Demograafilised muutused ja meditsiini areng on kaasa toonud teatud riskirühmade suuruse kasvu (eakad inimesed ja immuunsüsteemi puudulikkusega isikud). Seega suureneb ka nende rühmade nakatumise tõenäosus (Magalhães et al., 2014) nagu nähtub joonisel 2.

1.3 *Listeria* esinemine toidus

1.3.1 Piirnormid

Kuigi tegemist on suhteliselt harva esineva, kuid ohtlikku toiduinfektsiooni põhjustava bakteriga, on Euroopa Komisjon kehtestanud bakteri arvukuse piirnormid teatud toodetes. Toiduainete mikrobioloogilised kriteeriumid on sätestatud Euroopa Komisjoni määrusega (EÜ) nr 2073/2005, mis võeti vastu 15. novembril 2005 ja kohaldati alates 1. jaanuarist

2006. a. Selle määruse järgi bakter *Listeria monocytogenes* ei tohi esineda 25 g-s valmistootes, piirnorm säilivusaja lõpus on 100 CFU/g (Lisa 1, tabel 1).

Antud määrus sätestab, et valmistoidu tootjad peavad proovivõtukava osana kindlasti võtma käitlemiskeskonnalt bakteri *Listeria monocytogenes* proovid (European Commission, 2005).

1.3.2 Kriitilised toidud

L. monocytogenes tuntakse eelkõige toidu kaudu leviva patogeense mikroorganismina. Bakterit on isoleeritud väga paljudest toiduainetest, sealhulgas töötlemata ja töödeldud lihast, piimatoodetest, köögiviljadest, mereandidest, nendest valmistatud toitudest (McLauchlin, 2006).

L. monocytogenes suudab areneda madalatel temperatuuridel ja taluda säilitusaineid, millega tekitab probleeme valmistoidu tootjatele, kuna üldjuhul valmistoitu täiendavalt ei kuumtöödelda enne tarbimist. Selliste toodete hulga kuulub ka külmsuitsu lõhefilee.

Kirjandusallikate põhjal on kinnitatud listerioosi juhtumid põhjustatud järgmiste toiduainete poolt: lihatooted (kuumtöödeldud kana, vorstid, pasteet, seakeel, hot-dogid, sink, salaami, kana wrapid), kalatooted (krevetid, suitsutatud kala, teod, rannakarbid), köögiviljad (kapsasalatid, seller, riisisalatid), piimatooted (piim, pehmed juustud) ja muud tooted, nt võileivad (Magalhães et al., 2014).

Kramarenko et al. (2013) uuringus esitatud andmed annavad ülevaate *L. monocytogenes* sisaldusest Eesti toiduainetes. Uuringus esitatud andmed põhinevad Eesti Veterinaar- ja Toidulaboratooriumi (VTL) poolt aastatel 2008-2010 teostatud analüüside tulemustel. Analüüsitavad proovid esindasid nii Eesti toiduettevõtete enesekontrolli kui ka riikliku seireprogrammi raames võetud proove.

Vastavalt nimetatud uuringule oli 2,6% (554 toiduainet 21574-st) uuritud proovidest saastunud bakteriga *L. monocytogenes* (tabel 2). Bakterit leiti sagedamini toorlihast ja toorest liha sisaldavatest toitudest (18,7%), segasalatitest (18,5%) ning toorpiimast (18,1%).

Tabel 2 *Listeria monocytogenes* esinemine erinevates Eesti toitudes aastatel 2008-2010 (Kramarenko et al., 2013)

Toiduaine	Positiivsed	Kokku	Positiivsed, %
Tooted puu- ja köögiviljadest	15	717	2,1
Kastmed	0	67	0
Pagaritooted	15	663	2,3
Taimse päritoluga tooted v.a. pagaritooted	0	109	0
Kulinaarsed tooted (valmistoit)	13	4328	0,3
Segasalatid	102	550	18,5
Toores kala (värske ja külmutatud)	28	317	8,8
Kalatooted (valmistoit)	112	2075	5,4
Toorpiim	19	105	18,1
Piimatooted (valmistoit)	13	4901	0,3
Toorliha ja toorest lihast tooted	98	525	18,7
Lihatooted (valmistoit)	135	6746	2,0
Valmistoit jaekaubandusest	4	471	0,8
Kokku	554	21 574	2,6

Tabelis 3 on esitatud samad näitajad kalast valmistoitude kohta. Külmsuitsu kalatoodete positiivsete tulemuste arv oli palju suurem kui teistel toitudel selles rühmas – 32,9%. Teisel kohal paiknevad külmtöödeldud kalatooted – 12% positiivseid tulemusi.

Tabel 3 *Listeria monocytogenes* esinemine kala valmistoitutes Eestis aastatel 2008-2010 (Kramarenko et al., 2013)

Toiduaine	Positiivsed	Kokku	Positiivsed, %
Külmsuitsu kalatooted	23	70	32,9
Kuumsuitsu kalatooted	11	197	5,6
Suitsutatud kala	7	296	2,4
Kuumtöödeldud kalatooted (mitte suitsutatud)	0	111	0
Külm-töödeldud kalatooted	6	50	12,0
Kuivatatud kala	0	89	0
Soolatud kalatooted	38	391	9,7
Kuumtöödeldud kalapreservid	2	136	1,5
Kuumtöötlemata kalapreservid	9	299	3,0
Kalamari	0	44	0
Kokku	96	1683	5,7

Samas tuleb mainida, et 98,4% positiivsete toiduproovide ja 96,3% positiivsete kala valmistoitude puhul jäid bakteri *Listeria monocytogenes* sisaldused alla Euroopa Liidu kehtestatud piirnõrmi. Kõigi uuritud proovide kvantitatiivsed analüüsid viidi läbi säilivusaja viimasel kuupäeval (Kramarenko et al., 2013).

Enamik isoleeritud tüvedest kuulusid serotüübile 1/2a (73,6%), vähem esines serotüüpe 1/2b (7,4%), 1/2c (7,4%), 4b (7,7%) ja 4d (3,5%) (Kramarenko et al., 2013).

1.4 *Listeria* kalas

1.4.1 *Listeria* toores kalas

Toorkala mikrofloora sõltub kõigepealt tema päritolukohast ehk akvakultuuride puhul farmist. Soomes teostatud kolmeaastane uuring näitas, et aastaaeg ja ilmastikuolud avaldavad kõige tugevamat mõju *Listeria* spp. esinemisele kalafarmi keskkonnas. Saastunud proovide arv oli tavaliselt suurem peale vihmast aastaaega ehk sügisel ja vähenes kuival perioodil suvel ning talvel, kui temperatuur langes alla 0 °C (Miettinen ja Wirtanen, 2006). Kevad on tavaliselt suhteliselt kuiv hooaeg, kuid mõned farmid olid saastunud ka sel ajal. See võib olla tingitud sellest, et palju orgaanilist materjali satub lumesulamisveega nendesse veekogudesse, kus farmid paiknevad (Miettinen ja Wirtanen, 2005).

Ojad, jõed ja muud veekogud, mis on otseselt seotud sademete ning ilmastikutingimustega, omavad suurt rolli farmi mikrobioloogilises seisundis. *Listeria* spp. esinemine merepõhja setetes oleneb vee sügavusest: kaldalähedalt sügavuselt 0,1 m kuni 1,5 m võetud proovid olid positiivsed, sügavamatel merealadel (5 m kuni 20 m) *Listeria* spp. ei leitud (Miettinen ja Wirtanen, 2006). Seega rannalähedased kalafarmid on tavaliselt rohkem saastunud kui kaldast kaugemal paiknevad farmid (Miettinen ja Wirtanen, 2005).

Uurijad leidsid, et kasvatatud kala on saastunud ainult siis, kui ka veekeskkond on tugevalt saastunud. Samas leiab aset kala ja vee järkjärguline puhastumine bakteritest, mille kestvus on mitu kuud. See viib järeldusele, et kalafarmid pole *Listeria* spp. algallikaks, kui kõik puhastusmeetmed on efektiivselt rakendunud, vaid vastupidi, nad kannatavad ise välise saastumise allikate tõttu (Miettinen ja Wirtanen, 2006).

Kalas leidub kõige rohkem mikroorganisme lõpustes (tabel 4). See on loogiline, kuna lõpuseid läbivad suured kogused saastunud vett iga päev. *Listeria* spp. leiti kõige rohkem lõpustes (16,1%), vähem nahal (2,7%) ja sisikonna proovides (0,2%). *L. monocytogenes* leiti samuti kõige rohkem lõpustes (8,4%), naha ja sisikonna proovides aga võrdselt 0,2% (Miettinen ja Wirtanen, 2005).

Tabel 4 *Listeria monocytogenes* ja *Listeria* spp. levimus toorkalas (510 kala) vastavalt paiknemisele (Miettinen ja Wirtanen, 2005)

	Lõpused	Nahk	Sisikond
<i>Listeria</i> spp.	82 (16,1%)	14 (2,7%)	1 (0,2%)
<i>Listeria monocytogenes</i>	43 (8,4%)	1 (0,2%)	1 (0,2%)

1.4.2 *Listeria* külmsuitsutatud lõhes

Euroopa kalatööstus on äärmiselt fragmenteeritud ja koosneb rohkem kui 4000-st peamiselt väiksest ettevõttest. Enamik suurematest ettevõtetest tegeleb atlandi lõhe töötlemisega: valmistatakse suitsukala, külmutatud tooteid ja erinevaid valmistooteid. Suitsutatud lõhe on üks populaarsemaid lõhetooteid Euroopa Liidus. 2012. aastal moodustas suitsulõhe osakaal Euroopa turul 32% kõigist lõhetoodetest. Suurimateks tarbijateks on Prantsusmaa ja Saksamaa ning tootjateks Poolas, Balti riikides, Prantsusmaal, Inglismaal ja Hollandis paiknevad ettevõtted (The Marine Harvest Salmon Industry Handbook, 2013).

L. monocytogenes esinemist ja sisaldust suitsulõhes on uuritud mitmes Euroopa riigis. Belgias aastatel 2005-2007 kogutud andmete järgi oli 19% suitsukala proovidest saastunud patogeeniga, saastumisaste oli enamasti alla 100 CFU/g (Uyttendaele et al., 2009). Hispaanias läbi viidud uuringu järgi oli 4,8% uuritud proovidest saastunud. Seejuures oli huvitav fakt, et 80% positiivsetest proovidest kuulusid ühele ettevõttele (González et al., 2013). Poolas toodetud vaakumpakendatud külmsuitsulõhe oli saastunud 61,3% juhtudel, kusjuures toorlõhe ainult 4,3% (Mędrala et al., 2003). Soomes oli 17% valmistoodangu proovidest saastunud, kusjuures toorkalas bakterit ei esinenud (Johansson et al., 1999). See viib järeldusele, et toode saastus tootmise ajal, ning töötlemata kala polnud *L. monocytogenes* allikaks.

1.4.3 *Listeria* kalatoodete tootmisel

Kuna *Listeria* perekond on looduses laialt levinud, siis tootmiskeskonda võimalikke sattumise teid on ka palju.

Vastvalminud tootmisettevõttes USA-s viidi läbi uuring, mille eesmärgiks oli selgitada välja bakteri *L. monocytogenes* potentsiaalsed allikad. 21 kuu jooksul võeti proove äravoolutrappidest põrandatelt kogu tootmiskeskonnas, toorainest, õhufiltritelt, valmistoodangult, töötajate jalatsitelt, põrandatelt erinevates ruumides (näiteks töötajate sissepääs, riietusruumi põrand jne). Uuriti ka muid tehases ja tehases väljaspool asuvaid kohtasid: kohviku müügiautomaadid, vihmaveetorud, lähedalasuv oja jne. Projekti alguses olid kõik trappidelt võetud proovid negatiivsed. Kuu aja möödudes isoleeriti *L. monocytogenes* esmakordselt trappidest tootmise ajal enne tootmiskeskonna pesu teostamist. Viie kuu möödudes isoleeriti bakter juba nii enne, kui ka peale pesemist ja desinfitseerimist ning edaspidi teatud trappidest korduvalt. Tooraine ruumis leidis üks kindel püsiv bakteri alatüüp ja valmistoodangu ruumist isoleeriti teine alatüüp. Peale

tooraine, valmistoodangu, trappide ja lähedalasuva oja andsid kõik teised proovivõtukohtad negatiivseid tulemusi. Toorainest ning valmistoodangust isoleeritud alatüübid langesid kokku trappidest isoleeritud alatüüpidega, aga mitte ojast isoleeritud alatüübiga (Berrang et al., 2010). Põhinedes selle uuringu tulemustele võib teha järelduse, et suure tõenäosusega satub *L. monocytogenes* esmakordselt tootmisse ikkagi toorainega.

Mõned uuringud viitavad sellele, et päris tihti esineb tootmises ristsaastumist. Paljudel juhtudel täheldati saastunud – mustade, ebapiisavalt või ebatõhusalt pestud – tootega kokkupuutuvate pindade esinemist. Bakterit isoleeriti nahastajatelt, soolamis- ja viilutamismasinatelt, töölauadelt ning konveierlintidelt (Johansson et al., 1999; Garrido et al., 2009; Di Ciccio et al., 2012; Thisted Lambertz et al., 2012). Lisaks eelmainitud kohtadele leiti *L. monocytogenes* ka tootega mittekokkupuutuvatelt pindadelt: põrandatelt ja trappidest (Gudmundsdóttir et al., 2005; Thisted Lambertz et al., 2012). Kõik need uuringute tulemused rõhutavad veelkord tõhusa ja pideva pesu ning desinfitseerimise tähtsust, mis koos hea hügieenitava reeglite rakendamisega aitavad lahendada saastumise probleeme. Selle tõenduseks on näiteks Dauphin et al. (2001) poolt läbiviidud uuring, mille käigus ei leitud ühtegi bakteri *L. monocytogenes* tüve tootmiskeskonnast, kusjuures tooraine saastatuse aste ulatus 87%-ni.

Nendes toidutööstuse ettevõtetes, kus ikkagi *L. monocytogenes* leidub, on tootmises üldjuhul koloniseerunud üks teatud bakteri serotüüp või on see rõhuvas enamikus. Soome kalatööstustes oli valitsevaks serotüübiks 1/2a (Johansson et al., 1999). Itaalias, Hispaanias ja Prantsusmaal erinevatel aastatel domineeris samuti 1/2a, vähem esines 1/2b, 1/2c ning 4b serotüüpe (Di Ciccio et al., 2012; Garrido et al., 2009; Dauphin et al., 2001). Seega serotüüpi 1/2a võib pidada tootmiskeskonnas eriti kohanemisvõimeliseks.

1.4.4 Tootmisetappide mõju bakteri *Listeria monocytogenes* arvukuse kasvule

Külmsuitsu lõhefilee valmistamisel kasutatakse korraka mitut bakterite kasvu pidurdamise meetodit: soolamine, kuivatamine ja suitsutamine.

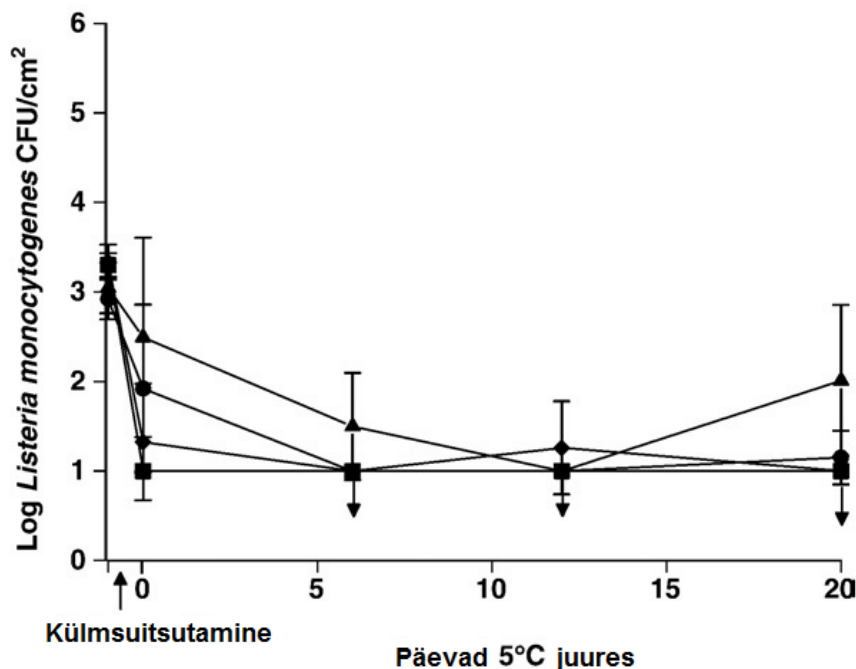
Soolamisel toimub kalakoe vedeliku asendamine soolalahusega, samal ajal see on kohustuslik eeletapp kuivatamise ja suitsutamise protsessidele. Eristatakse kolme soolamise viisi: kuivsoolamine (kalad pannakse kihina, soola raputatakse peale), märgsoolamine (kalad pannakse soolalahusesse või pritsitakse seda kaladesse) ja kombineeritud meetod (Derrick, 2009).

Kuivatamisel toimub niiskuse aurustamine, järelikult ka veeaktiivsuse vähenemine, mis pidurdab bakterite kasvu (Derrick, 2009). Selleks hoitakse kala teatud temperatuuril, mis külmsuitsu lõhe puhul ei tohi ületada 25-30 °C.

Suitsutatakse eelsoolatud ja kuivatatud kala kas puidu või saepuru põletamisel. Peamine külm- ja kuumsuitsutamise erinevus seisneb töötlemistemperatuuris. Külmsuitsutamise ajal jääb kalatöötlemise temperatuur alla 30 °C, et vältida valkude koaguleerumist (Derrick, 2009).

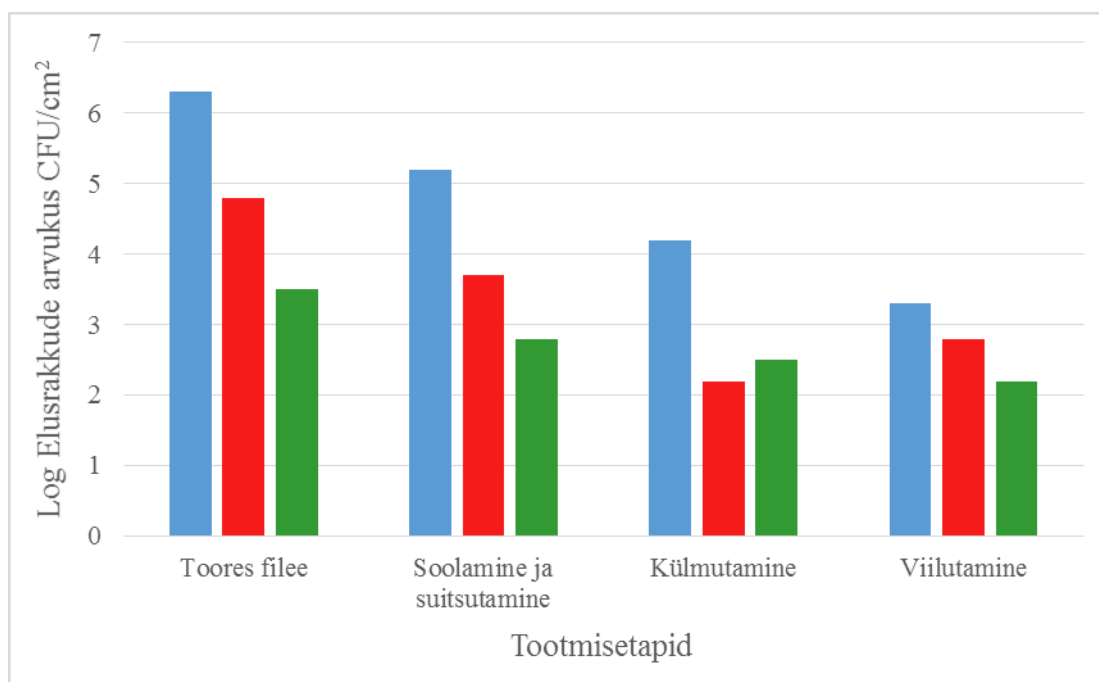
Varesematel aegadel käsitleti suitsutamist kui toidu säilitamise meetodit. Kaasajal hinnatakse rohkem suitsutamise sensorset mõju. Suitsutamise ajal toimub niiskuse eraldumine ja suitsus leiduvate fenoolsete ühendite lisamine, mis omavad bakteritsiidset toimet. Need muutused põhimõtteliselt võiksid pärssida bakterite kasvu (Rørvik, 2000).

Taani teadlased Porsby et al. (2008) viisid läbi eksperimendi, milles inokuleeriti *L. monocytogenes* lõhefileesse koguses 10^3 CFU/cm² enne külmsuitsutamist. Analüüsiks võeti nii toores, kui erineval viisil soolatud lõhe. Kala säilitati temperatuuril 5 °C ehk külmkapi temperatuuril ja määrati bakterirakkude arv mõne päevaste vahedega 20 päeva jooksul. Tulemuseks saadi, et säilitamisel bakterite arvukus langes tasemeni $10 \cdot 10^2$ CFU/cm² kõikides proovides (joonis 3).



Joonis 3 *Listeria monocytogenes* arvukuse muutused külmsuitsutatud vaakumpakendatud lõhe valmistamisel ja säilitamisel temperatuuril 5 °C. Katse 1: toores (■) ja soolalahusega süstitud lõhe (●); katse 2: soolalahusega süstitud (▲) ja kuivsoolatud lõhe (◆) (Porsby et al., 2008)

Samas uuringus vaadeldi ka kogu valmistamise protsessi mõju bakterite arvukusele. Leiti, et kõikide tootmisetappide kombinatsioon – soolamine, suitsutamine, külmutamine ja viilutamine – vähendas elusrakkude arvukust (joonis 4).



Joonis 4 Elusrakkude arvukuse langus külmsuitsu lõhefilee valmistamise ajal. Toorkala säilitamine enne töötlemist: 10 päeva (sinine tulp), 6 päeva (punane tulp), 5 päeva (roheline tulp) (Porsby et al., 2008)

Ei ole teada põhjus, miks elusrakkude arvukus langeb külmutamise ja viilutamise ajal, kuid oletatakse, et see võib olla tingitud stressist, mis tekib bakteritel peale soolamist, kuivatamist ja suitsutamist. Mikroorganismid võitlevad välistingimustega, et säilitada energiabilanssi ja metabolismi, ning lõpuks muutuvad jõetuks (Porsby et al., 2008). Samas mõned tüved on võimelised taastuma ja jätkavad paljunemist säilitamise ajal (Rørvik, 2000).

Suitsulõhe valmistamine koosneb mitmetest etappidest ning nõuab palju käsitlemist ja keeruliste seadmete kasutamist. Kuna suitsutamise tingimused pole standardiseeritud, siis selle toime bakteritele muutub olenevalt tootjast. Kuid üldiselt külmsuitsutamine ei ole võimeline hävitama baktereid nagu seda teeb kuumsuitsutamine. Külmsuitsutamine pärsib nende arvukuse kasvu (Rørvik, 2000).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Materjalid ja meetodid

Listeria spp. ja *Listeria monocytogenes* allikate ja levikuteede välja selgitamiseks analüüsiti toorkala, vee, õhu ja käitlemiskeskonna pindade mikrobioloogilist puhtust ning võeti proove personali tööriivastelt ja kinnastelt. Proovid pindade võimaliku mikrobioloogilise saastumise määramiseks võeti nii kalaga kokkupuutuvatelt kui ka kalaga mittekokkupuutuvatelt pindadelt. Tootmises esineva *L. monocytogenes* võimalike erinevate serotüüpide kindlaks tegemiseks võeti käitlemiskeskonna erinevatest kohtadest ja personalilt kokku 14 proovi.

Kõik analüüsid, välja arvatud serotüübi määramine, teostati ettevõtte laboratooriumis, mis omab luba käsitleda patogeenseid mikroorganisme. Kõik laboritööd teostati vastavalt standardile EVS-EN ISO 7218:2008 „Toiduainete ja loomasöötade mikrobioloogia. Üldjuhend mikrobioloogilisteks uuringuteks“. Katseproovid valmistati vastavalt standardile EVS-EN ISO 6887-3:2003 „Toiduainete ja loomasöötade mikrobioloogia. Katseproovide, algsuspensiooni ja kümnendlahjenduste valmistamiseks. Osa 3: Spetsiifilised eeskirjad kala ja kalatoodete valmistamiseks“.

Serotüübi määramine teostati Veterinaar- ja Toidulaboratooriumis Tartus.

2.1.1 Tehnoloogiline skeem

Joonisel 5 on kujutatud ettevõttes kasutatav külmsuitsutatud lõhefilee tootmise tehnoloogiline skeem. Antud lihtsustatud skeemil on esitatud ainult need etapid, kus toode on pakendamata ning kus esineb keskkonnast pärineva mikrobioloogilise saastumise oht.

Skeemil on erinevad tootmisetapid ümbritsetud erinevat värvi raamidega. Üks värvilise raamiga riskülik võrdub ühe ruumiga tootmises. Skeemil paremal pool esitatud ruumide nimetused on kasutusel töös ka edaspidi.



Joonis 5 Külmsuitsu lõhefilee tootmise tehnoloogiline skeem

2.1.2 Proovide võtmine pindade, õhu ja vee mikrobioloogilise puhtuse määramiseks

2.1.2.1 Proovide võtmine pindade mikrobioloogilise puhtuse määramiseks

Pindade mikrobioloogilise puhtuse uurimiseks *Listeria* spp. suhtes kasutati proovide võtmiseks abrasiivseid käsnu Hydra-Sponge (3M, USA). Käsna on niisutatud puhverdatud peptoonlahusega. Komplekti kuuluvad ka steriilsed kindad.

Proovid võeti vastavalt Euroopa Liidu referentlabori poolt väljatöötatud juhendile (EURL Lm, 2012). Kõigepealt pandi kätte steriilsed kindad, avati plastikkott käsna, võeti käsn ja hõõruti sellega uuritavat pinda vähemalt 1000 cm² ulatuses või niipalju kui võimaldab uuritava koha suurus. Käsn pandi tagasi kotti, lisati 90 ml puljongit ½ Fraser Broth, töödeldi homogenisaatoris ja asetati inkubaatorisse temperatuurile 30±1 °C 24 tunniks.

Proovid pindade mikrobioloogilise puhtuse määramiseks võeti kalatöötlemispindadelt, seadmetelt ja personali tööriistadelt (põlled, kindad). Proove võeti 13 kuu jooksul ajavahemikus aprill 2013 kuni mai 2014. Kokku võeti 324 proovi (tabel 5), nendest 148 proovi hommikuti enne tööd ja 176 proovi töö ajal.

Tabel 5 Analüüside arv vastavalt asukohale ja proovivõtuajale

Proovivõtu koht	Hommikul	Päeval	Kokku
Etteandmine	4	0	4
Fileerimine/ Soolamine	89	105	194
Suitsuahjude ruum	3	1	4
Jahutuskambriid	6	0	6
Pakkimine	43	40	83
Sisenemine	3	0	3
Töötajad	0	30	30
Kokku	148	176	324

Etteandmise ruumist, jahutuskambritest ja sisenemisest võeti vastavalt 4, 6 ja 3 proovi ainult hommikuti. Fileerimise/soolamise ruumist võeti 89 proovi enne tööd ja 105 tööpäeva keskel (kokku 194), suitsuahjude ruumist 3 proovi hommikul ja 1 päeva jooksul (kokku 4), pakkimisest vastavalt 43 ja 40 proovi (kokku 83). Lähtuvalt sellest, et töötajad panevad selga puhtad põlled ja kätte puhtad kindad igal hommikul, võeti nende hügieeni kontrolliks proove ainult tööpäeva keskel.

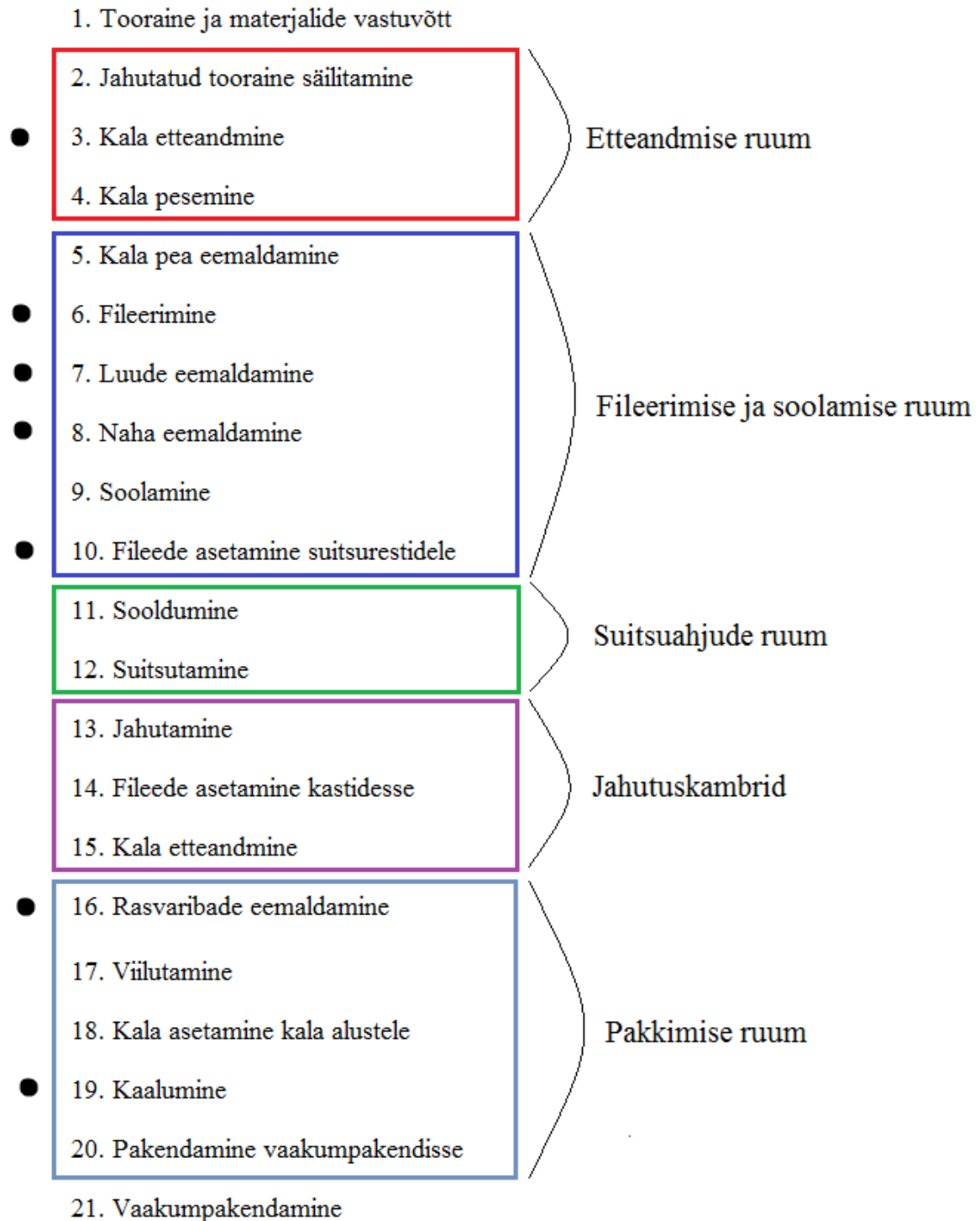
2.1.2.2 Toorkalast proovide võtmine

Proovid toorkala analüüsiks võeti peale kala pesemist ja peade äralõikamist. Toorkala proovid pandi steriilsesse kotti ja toimetati laborisse edasiseks analüüsiks.

Proovide võtmine teostati ajavahemikus juuni 2013 kuni juuni 2014. Kokku võeti 256 toorkala proovi, millest 88 proovi pärinesid sabaosast (proovid võeti ajavahemikul 06.2013 – 11.2013), ülejäänud 168 proovi võeti pea juures olevast fileest (proovid võeti ajavahemikul 11.2013 – 06.2014).

2.1.2.3 Proovide võtmine *Listeria monocytogenes* serotüüpide määramiseks

Tootmises esineva *L. monocytogenes* võimalike erinevate serotüüpide kindlaks tegemiseks võeti 14 proovi. Proovivõtukohtad on toodud joonisel 6 esitatud tehnoloogilisel skeemil. Proovid võeti etteandmise ja pakkimise ruumide trappidest, selgroogude ja nahkade äravedamise ning luude eemaldamise transportööridelt fileerimise/soolamise ruumis. Fileerimise/soolamise ruumi töötajatest kontrolliti fileerijat, luude eemaldajat ning peale injektorit seisvat töölist, kes lisab fileedele soola ja paneb neid kärudele. Pakkimise ruumist kontrolliti kaalujat/pakkijat ja rasvaribade eemaldamisega tegelevat töölist. *L. monocytogenes* serotüpeerimine teostati ka kahe toorkala proovi puhul.



Joonis 6 Külmsuitsu lõhefilee tootmise tehnoloogiline skeem.

- -*Listeria monocytogenes* serotüpeerimiseks saadetud proovide asukohad

2.1.2.4 Õhu proovide võtmine

Tootmisruumide õhu mikrobioloogilise puhtuse hindamiseks võeti kokku 13 proovi ajavahemikus veebruar 2013 kuni mai 2014. Fileerimise ja soolamise ruumist võeti 7

õhuproovi ajavahemikus 02.2013 – 05.2014 ja pakkimise ruumist võeti 6 õhuproovi ajavahemikus 04.2013 – 05.2014.

2.1.2.5 Vee proovide võtmine

Tootmises kasutatava vee mikrobioloogilise puhtuse hindamiseks võeti ajavahemikus veebruar 2013 kuni mai 2014 kokku 19 veeproovi viiest erinevast tootmisruumist:

- Pesuruum, kastide ja abivahendite pesuvesi – 5 proovi,
- Fileerimise/soolamise ruum, kalapeade lõikamine, loputusvesi – 5 proovi,
- Suitsuahjude ruumi eesruum, pesuvesi – 4 proovi,
- Vesi soolvee valmistamiseks – 4 proovi,
- Külmsuitsu pakkimine, viilutajate loputusvesi – 1 proov.

Veeproovi võtmiseks pühiti kraan puhtaks, lasti 1-2 minutit veel voolata. Kraan steriliseeriti leegiga ning veel lasti voolata 1-2 minutit. Avati steriilne pudel. Pudel täideti, vältides korgi saastumist. Täidetud pudel suleti ja viidi laborisse. Analüüsiti 12 tunni jooksul alates pudelisse villimisest, veeproovid säilitati temperatuuril 5 ± 3 °C.

19-s veeproovis määrati kultiveeritavate mikroorganismide arvukus temperatuuridel 36 ± 2 °C ja 22 ± 2 °C ning 2 veeproovis *Listeria* spp. esinemine/mitteesinemine.

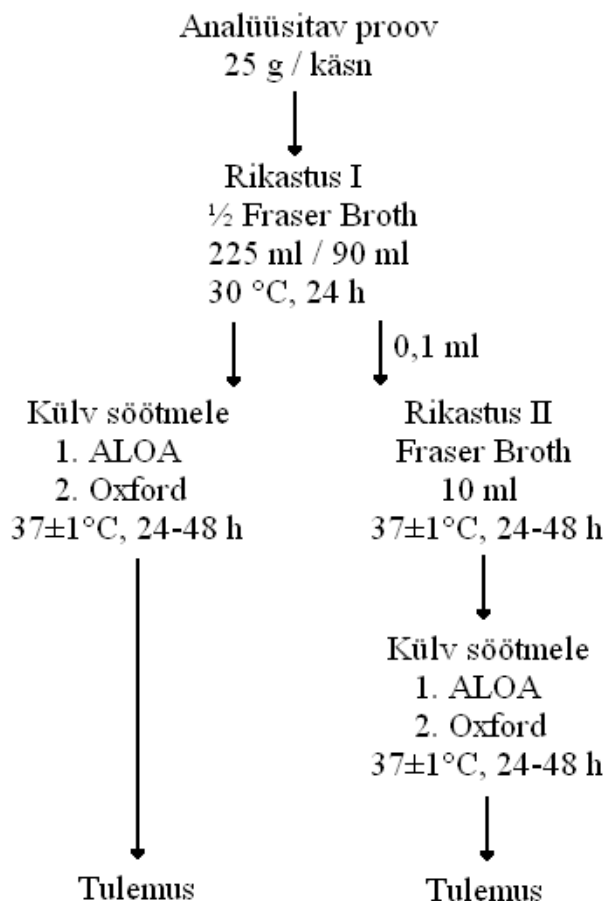
2.1.3 Mikrobioloogilised analüüsid

2.1.3.1 *Listeria* spp. määramine

Listeria spp. toorkalas, vees ja käitlemiskeskkonna pindadel määrati standardmeetodiga EVS-EN ISO 11290-1:2000/A1:2004. Meetod koosneb järgmistest etappidest:

1. Proovi rikastamine $\frac{1}{2}$ Fraser Broth puljongis temperatuuril 30 ± 1 °C 24 tundi.
2. Ümberkülvamine selektiivsele söötmele (ALOA, Oxford) ja inkubeerimine temperatuuril 37 ± 1 °C 24-48 tundi (monokultuuri isoleerimise etapp).
3. Samast rikastusest viiakse proov Fraser Broth puljongisse, järgneb inkubeerimine temperatuuril 37 ± 1 °C 24-48 tundi.
4. Teisest rikastusest külvamine selektiivsele agarile (ALOA, Oxford). Inkubeerimine temperatuuril 37 ± 1 °C 24-48 tundi.

Meetod on skemaatiliselt kujutatud joonisel 7.



Joonis 7 *Listeria* spp. määramise skeem

ALOA agaril välja kasvatud *Listeria* kolooniad on ümmargused, sinakas-rohelise värvusega (foto 2). Oxfordi agaril välja kasvatud *Listeria* moodustab musta värvi kolooniad, mis on ümbritsetud musta tsooniga. Tulemus antakse vormis esineb/ei esine.

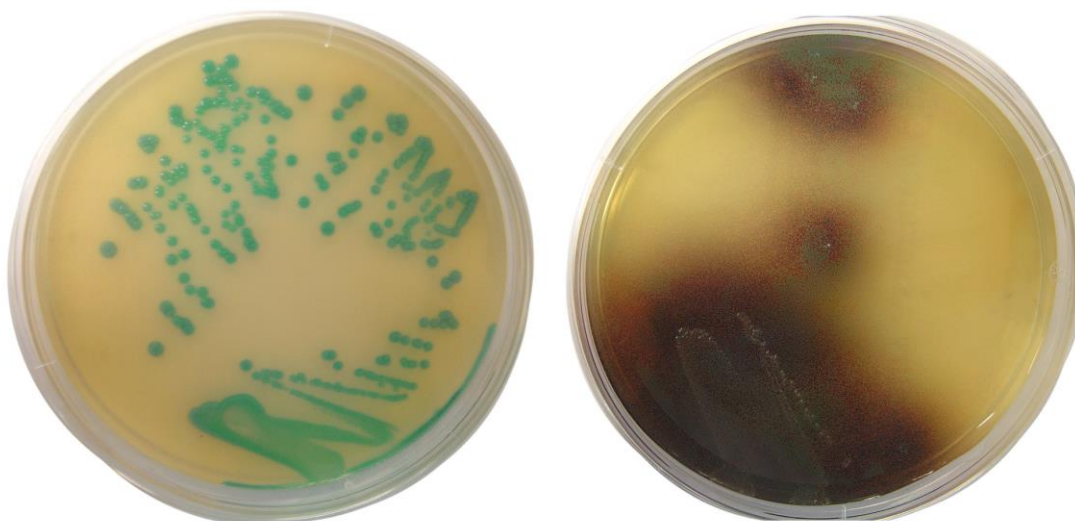


Foto 2 *Listeria* spp. kasv ALOA (vasakul) ja Oxford (paremal) agarsöötmel

2.1.3.2 *Listeria monocytogenes* serotüübi määramine

Serotüübi määramiseks kasutati Euroopa Liidu referentlabori poolt väljatöötatud meetodit AFSSA LERQAP (2009) „*Listeria monocytogenes* agglutination serotyping, In house method, Revision 2“. Meetod viiakse läbi *in vitro* vastavalt antiseerumi tootja juhendile.

Kasutatud antiseerum (Denka Seiken Co., Ltd., Jaapan) on saadud küülikute verest ja sisaldab O- ja H-antigeenidele vastavaid aglutiniine. Komplekt sisaldab 12 viaali individuaalsete antiseerumitega: 8 O-antiseerumi tüüpi (I/II, I, IV, V/VI, VI, VII, VIII ja IX) ja 4 H-antiseerumi tüüpi (A, AB, C ja D), mille erinevad kombinatsioonid moodustavad 13 erinevat serotüüpi (tabel 6).

Tabel 6 *L. monocytogenes* serotüüpide antigeenne struktuur (Denka Seiken Co., Ltd.)

Serotüüp	O-antigeen	B-antigeen
1/2a	I, II	AB
1/2b	I, II	ABC
1/2c	I, II	BD
3a	I, II	BD
3b	II, IV	AB
3c	II, IV	BD
4a	VII, IX	ABC
4ab	V, VI, VII, IX	ABC
4b	V, VI	ABC
4c	V, VI	ABC
4d	VI, VIII	ABC
4e	V, VI	ABC
7	XII, XIII	ABC

O-antigeeni määramine: eelkõige valmistatakse bakteri antigeenide suspensioon - ALOA agarilt isoleeritud puhaskultuur kasvatatakse BHI (Brain Heart Infusion) agaril lisades naatriumkloriidi, kuumutatakse 121 °C juures 30 minutit ja tsentrifuugitakse kiirusel 3000 rpm 20 minuti jooksul, saadud sade resuspendeeritakse naatriumkloriidi lisades. Klaasplaadile pannakse O-antiseerumi tilk ja kontrolliks füsioloogilise lahuse tilk. Mõlemale tilgale lisatakse antigeenide suspensioon, segatakse plaati kallutades ja täheldatakse aglutinatsiooni. Positiivseks tulemuseks võib pidada ainult tugevat aglutinatsiooni, mis on tekkinud 1 minuti jooksul.

H-antigeeni määramine: analüüs teostatakse katseklaasides. Kuna *L. monocytogenes* omab ainult 1-4 viburit, soovitatakse eelkõige suurendada bakterite liikuvust lastes neid läbi poolvedela BHI agari. Antigeenide suspensiooni valmistamiseks kasvatatakse poolvedela agari läbinud rakud vedelas BHI agaris temperatuuril 30 °C üleöö. Puhtasse katseklaasi

lisatakse 2 H-antiseerumi tilka ja 0,5 ml rakkude suspensiooni, kontrolliks kasutatakse katseklaasi, mis ei sisalda antiseerumit. Peale segamist hoitakse katseklaase vesivannis temperatuuril 50-52 °C tund aega ja hinnatakse aglutinatsiooni.

Lõpptulemuse saamiseks uuritakse kahe määratud tegurite kombinatsiooni (tabel 6).

Listeria monocytogenes serotüübi määramine teostati VTL-s Tartus, kuhu saadeti ettevõtte laboris ALOA agaril kasvatatud proovid.

2.1.3.3 Õhu mikrobioloogiline analüüs

Õhu mikrobioloogiliseks analüüsiks kasutati sedimentatsioonimeetodit.

Petri tassidesse valatakse aseptiliselt 15 ml PCA agarsöödet, lastakse tarduda. Seejärel asetatakse tassid avatult 30 minutiks proovivõtu kohtadesse tootmiskeskonda. Seejärel inkubeeritakse tase temperatuuril 30±1 °C 48 tundi. Väljakasvanud kolooniad loendatakse, tulemus esitatakse kolooniate arvuna 1 m³ õhus.

2.1.3.4 Vee mikrobioloogiline analüüs

Vee mikrobioloogilise puhtuse määramiseks kasutati standardmeetodit EVS-EN ISO 6222:2001, mis võimaldab määrata vees olevate mikroorganismide arvukust kolooniate loendamise, mis moodustasid inkubeerimisel temperatuuridel 36±2 °C ja 22±2 °C.

Määramise käik: kahte Petri tassi külvatakse 1 ml proovi, lisatakse PCA sööde, segatakse. Üks tassidest inkubeeritakse temperatuuril 36±2 °C 44±4 tundi ja teine temperatuuril 22±2 °C 68±4 tundi. Peale inkubeerimist loendatakse väljakasvanud kolooniad. Arvutatakse kolooniaid moodustavate ühikute arv milliliitris proovis lähtudes tassil kasvanud kolooniate arvust.

Vastavalt määrusele nr 82, 31.07.01 „Joogivee kvaliteedi- ja kontrollinõuded ning analüüsimeetodid“ on uuritud näitajate piirnormid vastavalt temperatuuril 22 °C – 100 CFU/ml ja temperatuuril 36 °C – 20 CFU/ml.

Listeria spp. määramiseks kasutati meetodit EVS-EN ISO 11290-1:2000/A1:2004.

2.1.4 Kasutatud materjalid, seadmed ja töövahendid

Antud magistritöö raames läbi viidud analüüside teostamiseks kasutati järgmisi materjale (tabel 7) ja seadmeid ning töövahendeid (tabel 8).

Tabel 7 Kasutatud materjalid

Materjal	Tootja
Plate Count Agar	Lab M Limited, United Kingdom
Fraser Broth Base	Lab M Limited, United Kingdom
Harlequin™ Listeria Chromogenic Agar (ISO)	Lab M Limited, United Kingdom
Listeria Isolation Medium (Oxford Formulation) LAB122	Lab M Limited, United Kingdom
Half Fraser Supplement X164	Lab M Limited, United Kingdom
Fraser Supplement X165	Lab M Limited, United Kingdom
Listeria Selective Diagnostic Supplement with Cycloheximide X010	Lab M Limited, United Kingdom
Polymyxin B, Ceftazimide Supplement X072	Lab M Limited, United Kingdom
Listeria Oxford Supplement CCNAF	Abtek Biologicals Ltd, United Kingdom
50%-line metanool	Lach-Ner, Tšehhi
Destilleeritud vesi	

Tabel 8 Kasutatud seadmed ja töövahendid

Seadmed ja töövahendid
Stomacheri tüüpi homogenisaator
Inkubaator, 30±1 °C
Inkubaator, 37±1 °C
Vesivann, 47±2 °C
Autoklaav, 121±1 °C
Külmkapp, 5±3 °C
Elektripliit
Gaasipõleti
Vortex loksuti
Käsnad Hydra-Sponge (3M, USA)
Steriilsed külviaasad diameetriga 3 mm
Pipetid 10 ml, 1 ml ja 0,1 ml; steriilsed pipetiotsikud
Petri tassid diameetriga 90 mm
Pudelid söötmete steriliseerimiseks ja hoidmiseks
Steriilsed pudelid veeprovide võtmiseks
Katseklaasid

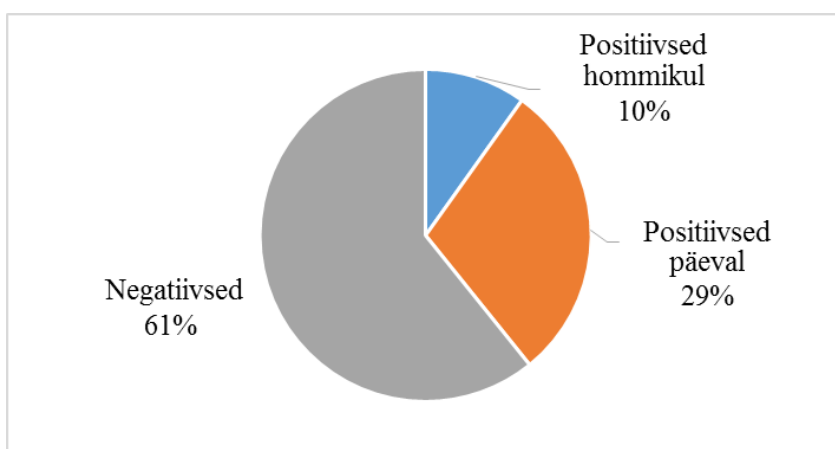
2.1.5 Statistilised analüüsid

Katseandmete töötlemiseks kasutati programmi MS Excel 2013 (Microsoft Corporation).

2.2 Tulemused ja arutelu

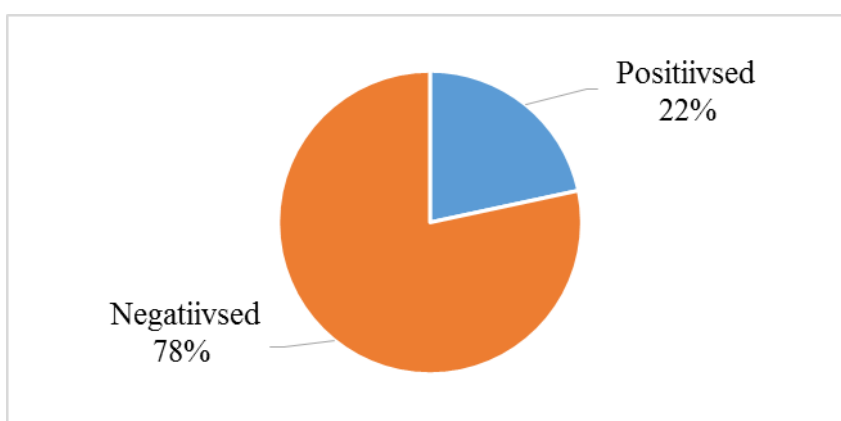
2.2.1 *Listeria* spp. ja *Listeria monocytogenes* käitlemiskeskonnas

Proovid *Listeria* spp. ja *Listeria monocytogenes* esinemise määramiseks käitlemiskeskonnas võeti nii tootega kokkupuutuvatelt kui ka mittekokkupuutuvatelt pindadelt nii enne tööpäeva algust kui ka tööpäeva keskel. Kokku võeti 324 proovi (tabel 5), millest 39% andsid positiivse tulemuse (joonis 8). Tuginedes erinevate uuringute andmetele, oli käitlemiskeskonnast võetud proovidest saastunud vastavalt 16%, 64% ja 84% (Di Ciccio et al., 2012; Thisted Lambertz et al., 2012; Dauphin et al., 2001).



Joonis 8 Käitlemiskeskonnast kogu võetud proovide negatiivsete ja positiivsete tulemuste arv ning protsendiline jaotus

Hommikul enne tööpäeva algust puhastatud pindadelt võetud proovidest olid positiivsed 22% (joonis 9).

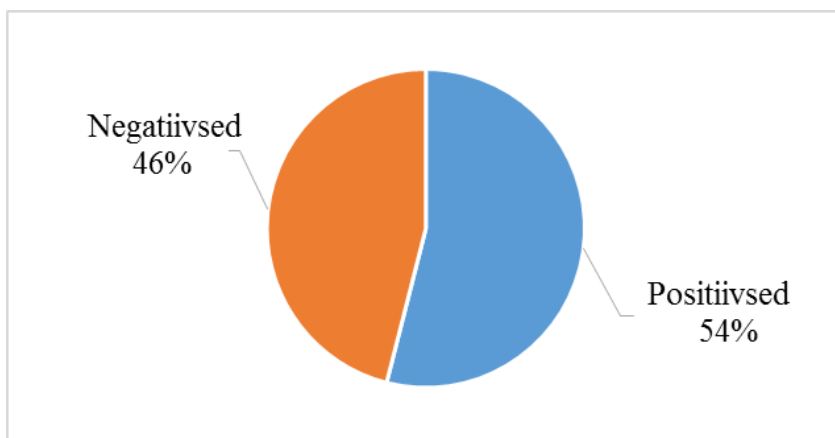


Joonis 9 Hommikul võetud proovide negatiivsete ja positiivsete tulemuste arv ning protsendiline jaotus

Käitlemiskeskonna saastumine bakteriga *Listeria* spp. enne tööpäeva algust oli erinevates tootmisruumides erinev. Suitsuahjude ruumist võetud proovid olid negatiivsed. Kõige

saastunud olid etteandmise ja töötajate sisenemise ruumid, kus positiivsete proovide hulk oli vastavalt 75% ja 67% (tabel 9).

Tööpäeva keskel tööpindadelt võetud proovidest olid positiivsed 54% (joonis 10).



Joonis 10 Päeva keskel võetud proovide negatiivsete ja positiivsete tulemuste arv ning protsendiline jaotus

On märkimisväärne, et ruumide saastumine *Listeria* spp. oli kasvanud võrreldes enne tööpäeva algust võetud proovidega. Saastumine tööpäeva keskel oli erinevates tootmisruumides erinev. Suitsuahjude ruumist bakterit ei leitud. Kõige saastunumateks kohtadeks olid fileerimise/soolamise ja pakendamise ruumid, kus positiivsete proovide hulk oli vastavalt 31% ja 22% (tabel 9). Saastumise tase võrreldes hommikuga oli kasvanud mõlemas ruumis. Fileerimise/soolamise ruumis oli positiivsete proovide hulk hommikul 10,3% ja päeval 30,9% ning pakendamise ruumis vastavalt 6,0% ja 21,7%.

Tööpäeva keskel töötajate kinnastelt ja põlledelt võetud proovidest olid 56,7% positiivsed.

Tabel 9 *Listeria* spp. positiivsete proovide arv tootmisruumides

Proovivõtu koht	Hommikul Arv (%)	Päeval Arv (%)	Kokku
Etteandmine	3 (75,0)	-	4
Fileerimine/ Soolamine	20 (10,3)	60 (30,9)	194
Suitsuahjude ruum	0 (0,0)	0 (0,0)	4
Jahutuskambrid	2 (33,3)	-	6
Pakkimine	5 (6,0)	18 (21,7)	83
Sisenemine	2 (66,7)	-	3
Töötajad	-	17 (56,7)	30

Hommikul enne tööd võetud proovide positiivsed tulemused viitavad sellele, et pinnad, kust need proovid võeti, olid ebapiisavalt või mitte nõuetekohaselt koristatud ja/või desinfitseeritud. Tootmisprotsessi teatud seadmed ei võimalda korralikku pesu ja deso teostada. Kirjandsandmetel (Johansson et al., 1999; Garrido et al., 2009; Di Ciccio et al.,

2012; Thisted Lambertz et al., 2012) on kõige kriitilisemateks etappideks viilutamine ja soolamine. Ebapiisava pesu või deso korral võib töötlemispindadele, seadmetele moodustuda biokile. Biokile tekkest tingituna võib aset leida pidev toote saastumine. Seetõttu peaks kasutatavad seadmed olema sellise disainiga, mille puhul ristsaastumise oht on minimaalne. Pinnakatte materjalid siledad, ilma mehaaniliste igastusteta.

Fileerimise/soolamise ja pakkimise ruumid olid tööpäeva keskel saastunud kui hommikul enne töö algust, mida mõningal määral võib põhjendada ka töötajate liikumisega seoses tööülesannetega erinevate tootmisruumide vahel. Tuginedes kirjandusallikatele (Rørvik, 2000; Gudmundsdóttir et al., 2005) on töötajate liikumine valmistoote saastumise riskifaktoriks ja seda eriti juhtudel, kui saastumise vältimiseks ei ole kohaldatud abinõusid või on need mittetõhusad.

Eriti tuleks tähelepanu pöörata sisenemise ruumi puhtusele, kuna seda läbivad kõik töötajad hoolimata töökohast.

Rääkides konkreetsetest kohtadest, siis tooraine etteandmise ruumist leiti *Listeria* spp. ainult trapist (tabel 10), ülejäänud kohad andsid negatiivseid tulemusi. Tuginedes kirjandusandmetele (Gudmundsdóttir et al., 2005; Thisted Lambertz et al., 2012) on *Listeria* spp. sh *Listeria monocytogenes* kõige sagedamini isoleeritud just käitlemiskeskonna põrandatelt ja trappidest. Ollakse seisukohal, et need kohad võivad olla *Listeria* allikaks tootmises. Seega on iga päev vajalik nimetatud kohtade hoolikas puhastamine, pesemine ja desinfitseerimine.

Tabel 10 Etteandmise ruumist võetud *Listeria* spp. proovide tulemused

Proovivõtu koht	Positiivne (%)	Negatiivne	Kokku
Kalapesumasin	0 (0,0)	1	1
Etteandmise aken, kardin	0 (0,0)	2	2
Trapp	3 (100,0)	0	3

Fileerimise ja soolamise ruumi proovivõtukohtade ja tulemused on toodud tabelis 11. Peade eemaldamise laualt, millega algab tootmisahel antud ruumis, ja selgroo eemaldamise seadmelt ei leitud ühtegi positiivset proovi. Selgroo äravedamise transportöörilt leiti 7 positiivset proovi 10-st (70%). Edasi fileerimise lindilt 10 positiivset proovi 37-st (27%). *Listeria* spp. ei leitud fileerija abivahenditelt nagu dušš, millega loputatakse tööpinda, nuga ja nugadehoidja. Samas fileerija lõikelaud oli saastunud – 2 positiivset proovi 5-st (40%).

Tabel 11 Fileerimise/soolamise ruumist võetud *Listeria* spp. proovide tulemused

Proovivõtu koht	Positiivne (%)	Negatiivne	Kokku
Peade eemaldamise laud	0 (0,0)	7	7
Selgroo eemaldaja	0 (0,0)	10	10
Transportöör: selgroo äravedamine	7 (70,0)	3	10
Fileerimise lint	10 (27,0)	27	37
Fileerija löikelaud	2 (40,0)	3	5
Fileeria dušš	0 (0,0)	1	1
Fileerija nuga	0 (0,0)	2	2
Nugade hoidja	0 (0,0)	1	1
Luude eemaldaja (lint, kilp, alus)	9 (34,6)	17	26
Luude eemaldamise transportöör	14 (63,6)	8	22
Nahastaja linnid	8 (53,3)	7	15
Transportöör: naha äravedamine	3 (100,0)	0	3
Transportöör (nahastaja ja injektori vahel)	4 (57,1)	3	7
Injektor (lint, nõelad, vann)	7 (38,9)	11	18
Käru restid	6 (60,0)	4	10
Seinad	0 (0,0)	2	2
Uksed	1 (25,0)	3	4
Trapp	9 (75,0)	3	12

Kolmandik luude eemaldamise masinalt võetud proovidest on positiivsed: 9 proovi 26-st (34,6%), kusjuures transportöörilt, kus töötajad eemaldavad fileesse jäänud luid käsitsi, leiti *Listeria* spp. 63,6%-st proovidest (14 proovi 22-st). Nahastaja linnid andsid 53,3% positiivseid tulemusi: 8 proovi 15-st. Transportöörilt, mis veab eemaldatud nahkasid ära, tuvastati 3 positiivset proovi 3-st. Järgmiselt transportöörilt, mille abil nahata filee liigub edasi soolalahuse pritsimismasinasse, leiti 4 positiivset proovi 7-st (57,1%), injektorist 7 proovi 18-st (38,9%), käru restidelt 6 proovi 10-st (60,0%), seintelt ei leitud, uste pealt 1 proov 4-st (25%) ja trappidest 9 positiivset proovi 12-st (75%). Oletatavasti algab filee saastumine alates selgroo eemaldamise etapist. Tõenäoliselt on see tingitud seadmete disainist, aga ka ebamugavast paigutusest ruumis, mis tekitab raskusi pesemisel ja desinfitseerimisel.

Suitsuahjude ruumi proovivõtukoht ja tulemused on toodud tabelis 12.

Tabel 12 Suitsuahjude ruumist võetud *Listeria* spp. proovide tulemused

Proovivõtu koht	Positiivne (%)	Negatiivne	Kokku
Suitsutaja töölaud	0 (0,0)	1	1
Ruumi põrand	0 (0,0)	1	1
Suitsuahju põrand	0 (0,0)	1	1
Trapp	0 (0,0)	1	1

Kõik sellest ruumist võetud proovid olid negatiivsed. Üheks põhjuseks võib olla töötajate piiratud liikumine selles tootmistsoonis.

Jahutuskambritest võetud proovide asukohad ja tulemused on esitatud tabelis 13.

Tabel 13 Jahutuskambritest võetud *Listeria* spp. proovide tulemused

Proovivõtu koht	Positiivne (%)	Negatiivne	Kokku
Kondensaat laes	0 (0,0)	1	1
Sein	0 (0,0)	1	1
Põrand	2 (66,7)	1	3
Ukselink	0 (0,0)	1	1

Laest, seinalt ja ukselingilt võetud proovid olid negatiivsed. 66,7% põrandalt võetud proovidest olid positiivsed (2 proovi 3-st).

Pakkimise ruumi proovivõtukoht ja tulemused on esitatud tabelis 14.

Tabel 14 Pakkimise ruumist võetud *Listeria* spp. proovide tulemused

Proovivõtu koht	Positiivne (%)	Negatiivne	Kokku
Etteandmise aken	0 (0,0)	2	2
Rasvaribade eemaldamise laud	2 (15,4)	11	13
Lõikelaud	2 (66,7)	1	3
Viilutajad	11 (28,2)	28	39
Pakkimise laud	2 (18,2)	9	11
Kaal	0 (0,0)	2	2
Transportöör	0 (0,0)	1	1
Vaakumlaud	0 (0,0)	1	1
Tool	1 (100,0)	0	1
Nugade hoidja	0 (0,0)	2	2
Trapp	5 (83,3)	1	6
Hügieeniväravad	0 (0,0)	2	2

Listeria spp. leiti: rasvaribade eemaldamise laualt (2 proovi 13-st), lõikelaualt (2 proovi 3-st), viilutajatelt (11 proovi 39-st), pakkimise laualt (2 proovi 11-st), tooli pealt (1 proov 1-st) ja trapist (5 proovi 6-st). Pakkimise ruumi ülejäänud kohad ei olnud saastunud.

Tõenäoliselt saastas tooli töötaja. Pakkimise ruumi kõige saastunumateks kohtadeks võib pidada lõikelauda (66,7%), viilutajaid (28,2%) ja trappi (83,3%). 2012. a Di Ciccio et al. poolt avaldatud tulemuste põhjal, mis saadi Itaalias läbiviidud uuringus, olid kõige saastunumad kohad tootmises viilutajad ja töölaudad, saadud positiivsete proovide hulk vastavalt 37% ja 43%. Põhjusteks võivad olla viilutajate keeruline disain, mis raskendab nende pesemist, ning töölaudade kahjustatud pinnad.

Sisenemise juures olevast trapist võetud proovid andsid 2 positiivset tulemust 3-st, mis moodustab 66,7% (tabel 15).

Tabel 15 Sisenemiselt võetud *Listeria* spp. proovide tulemused

Proovivõtu koht	Positiivne (%)	Negatiivne	Kokku
Trapp	2 (66,7)	1	3

Töötajate tööriivastelt ja kinnastelt võetud proovide tulemused on esitatud vastavalt nende töökohale tabelis 16.

Tabel 16 Töötajatelt võetud *Listeria* spp. proovide tulemused

Proovivõtu koht	Positiivne (%)	Negatiivne	Kokku	
Fileerimise/ soolamise ruum	Kalapesumasin	0 (0,0)	1	1
	Peade eemaldamise laud	0 (0,0)	1	1
	Selgroo eemaldaja	0 (0,0)	2	2
	Fileerimise lint	5 (62,5)	3	8
	Luude eemaldamise transporttöör	4 (100,0)	0	4
	Enne injektorit	2 (100,0)	0	2
	Peale injektorit	2 (50,0)	2	4
Pakkimise ruum	Rasvaribade eemaldamine	2 (100,0)	0	2
	Viilutaja	0 (0,0)	1	1
	Pakkimislauad	2 (40,0)	3	5

Tabelist 16 nähtub, et kalade pesija, kalapeade ja selgroogude eemaldajate tööriivastelt võetud proovid olid negatiivsed. *Listeria* spp. suhtes positiivsed proovid leiti alates fileerimise lindi juures töötava töötaja tööriivastelt. Ka kalade soolamisega tegelevate töötajate tööriivad ja kindad olid saastunud. Toodangu pakkimise ruumis võeti proovid kalafilee rasvaribade eemaldajalt, viilutamise tegelevatelt töötajatelt ja pakkijatelt. Nii kalafileelt rasvaribasid eemaldava töötaja kui ka pakkijate tööriivastelt võetud proovid olid positiivsed.

2.2.2 Toorkala analüüs

Tabelis 17 on toodud toorlõhe analüüside tulemused *Listeria* spp. suhtes.

Tabel 17 *Listeria* spp. toorlõhes

	Positiivne (%)	Negatiivne (%)
Fileest sabaosa juures	7 (7,9)	81 (92,1)
Fileest pea juures	6 (3,6)	162 (96,4)

Analüüsi tulemused kinnitavad kirjandusallikatest saadud andmeid, et kala erinevate osade saastumine on erinev (Miettinen ja Wirtanen, 2005). Sabaosa filees leiti 7 positiivset proovi (7,9%), filees pea juures 6 (3,6%). Analüüsitud toorlõhe proovidest oli 5,1% saastunud *Listeria* spp. Poolas läbiviidud uuringu tulemusel oli saastunud 4,3% toorlõhe proovidest (Mędrala et al., 2003).

Antud töö tulemuste põhjal on *Listeria* spp. allikaks uuritavas ettevõttes sissetulev saastunud toorlõhe. Tuginedes kirjandusallikatele (Di Ciccio et al., 2012; Berrang et al., 2010) on toorkala üheks peamiseks *Listeria* spp. ja *L. monocytogenes* allikaks kalatoodete tootmisel. Siiski on osa uurijatest teisel seisukohal, väites, et töödeldava kala saastumine toimub ristsaastumisel läbi saastunud tootmispindade ja seadmete ning käitlemiskeskkonnas levinud *L. monocytogenes* alatüübid muutuvad domineerivaks tooraine mikroflooras tootmise ajal (Rørvik, 2000; Gudmundsdóttir et al., 2005; Mędrala et al., 2003). Mõningast selgust antud probleemi lahendamisel annab bakteri *Listeria monocytogenes* tüpiseerimine.

2.2.3 Serotüübi määramine

Tootmiskeskonna erinevatest ruumidest (joonis 6) võeti serotüpeerimiseks 14 proovi (tabel 18).

Tabel 18 Bakteri *Listeria monocytogenes* serotüübi määramise tulemused

Ruum	Koht	Serotüüp
Etteandmine	Trapp	1/2a
Fileerimine ja soolamine	Transportöör: selgrood	1/2a
	Fileerimise lint	1/2a
	Luude emaldamise transportöör	1/2a
	Transportöör: nahk	1/2a
	Transportöör: nahk	1/2a
Pakkimine	Trapp	1/2a
Töötajad	Fileerimine	-
	Luude eemaldamine	1/2a
	Peale injektorit	-
	Rasvaribade eemaldamine	1/2a
	Kaalumine/ pakkimine	1/2a
Toorkala		1/2a
		1/2a

Kõik 14 *Listeria* spp. suhtes positiivset proovi analüüsiti edasi *Listeria monocytogenes* tuvastamiseks. Analüüsi tulemusena selgus, et kaks proovi ei sisaldanud bakterit *L. monocytogenes*. Need proovid võeti fileerijalt ja peale injektori seisva töölise kinnastelt ja põlledelt. Tulemuste põhjal järeldub, et valdav osa (86%) *Listeria* spp. positiivsetest proovidest sisaldavad bakterit *L. monocytogenes*. Islandil läbiviidud analoogse uurimuse tulemuseks oli 75% (Gudmundsdóttir et al., 2005).

Analüüsi käigus isoleeriti ainult üks *L. monocytogenes* serotüüp, milleks oli 1/2a. Kirjandusandmetel (Johansson et al., 1999; Di Ciccio et al., 2012; Garrido et al., 2009; Dauphin et al., 2001) domineerib antud serotüüp paljude kalatööstusettevõtete tootmiskeskondades moodustades 46-100%.

Antud töö tulemused võimaldavad järeldada, et tooraine on üheks oluliseks *L. monocytogenes* allikaks ning uuritava ettevõtte käitlemiskeskkonnas on koloniseerunud üks teatud kindel serotüüp – *L. monocytogenes* 1/2a.

2.2.4 Õhu analüüs

Käitlemiskeskonna õhu mikrobioloogilise analüüsi tulemused on esitatud tabelis 19.

Tabel 19 Käitlemiskeskonna õhu mikrobioloogilise analüüsi tulemused

Proovivõtu koht	Proovivõtu aeg	Tulemus, CFU/m ³
Fileerimise ja soolamise ruum	02.2013	79
	04.2013	0
		105
	08.2013	210
	11.2013	445
	02.2014	262
	05.2014	131
Pakkimise ruum	04.2013	0
		0
	08.2013	131
	11.2013	26
	02.2014	26
	05.2014	0

Antud ettevõtte puhta õhu kriteeriumiks on 655 CFU/m³ nii fileerimise/soolamise kui pakkimise ruumides. Saadud tulemused ei ületa lubatud piirnormi. Õhk pakkimise ruumis on tulemuste järgi puhtam, kuna, nagu oli juba öeldud, töötajate liikumine on seal piiratud. Aeroobsete bakterite hulk õhus suurenes augustis ja novembris 2013 ning veebruaris 2014

mõlemas ruumis. Tulemuste suurt varieeruvust võib põhjendada erineva töö intensiivsusega erineval ajal.

Õhu mikrobioloogilist puhtust mõjub ka töötajate jaotus ruumis. Aprillis 2013 võeti paralleelselt kaks õhuproovi erinevatest fileerimise/soolamise ja pakkimise ruumide aladest. Fileerimise ja soolamise ruumist saadi erinevad tulemused – väiksema inimeste arvuga alal tuli 0 CFU/m³, suurema inimeste arvuga aga 105 CFU/m³. Pakkimise ruumist saadud tulemused olid mõlemad 0 CFU/m³, kuna inimeste töökohad on seal ühtlaselt jaotatud.

Ilmselt pole võimalik öelda, kas sadenenud bakterid kuuluvad *Listeria* perekonda, kas õhk võiks olla oluliseks saastumise allikaks ja *L. monocytogenes* levikuteeks või mitte, kuid tuginedes kirjandusallikatele (Rørvik, 2000) *Listeria* bakteritega saastatud õhk ei avalda mõju käitlemiskeskonnale.

2.2.5 Vee analüüs

Tootmises kasutatava vee mikrobioloogilise puhtuse hindamiseks võeti veeproovid pesuruumist, fileerimise/soolamise ja pakkimise ruumidest, suitsuahjude ruumi eesruumist ning soolvee valmistamiseks kasutatavast veest. Vee proovivõtukohtad ja analüüsitulemused on esitatud tabelis 20.

Tabel 20 Kultiveeritavad mikroorganismid ja *Listeria* spp. käitlemiskeskonnas kasutatavas vees

Proovivõtu koht	22 °C, CFU/ml	36 °C, CFU/ml	<i>Listeria</i> spp.
Pesuruum	0	0	
	0	1	
	0	0	
	0	0	
	0	0	
Fileerimise/ soolamise ruum	0	0	
	0	0	
	1	65	
	0	140	
	0	0	
Suitsuahjude ruumi eesruum	0	0	
	13	0	
	0	1	
	0	0	
Vesi soolvee valmistamiseks	>300	>300	
	>300	>300	
	>300	35	
	36	0	neg
Pakkimise ruum	31	0	neg

Ettevõttes kasutatavale veele kehtestatud kriteeriumid on vastavuses määrusega nr 82, 31.07.01 „Joogivee kvaliteedi- ja kontrollinõuded ning analüüsimeetodid“ kehtestatud näitajate piirnormidega – vastavalt temperatuuril 22 °C – 100 CFU/ml ja temperatuuril 36 °C – 20 CFU/ml. Nagu tabelis 20 esitatud andmetest nähtub, vastasid pakkimise ruumist võetud veeproovid kehtestatud kriteeriumidele. Kultiveeritavate mikroorganismide arvukus temperatuuril 22 °C ja 36 °C oli vastavalt 31 ja 0. Pakkimisruumi vees ei esinenud *Listeria* spp. Ka pesuruumist, fileerimise/soolamise ruumist ja suitsuahjude ruumi eesruumist võetud veeproovid vastasid nõuetele. Erandiks oli fileerimise/soolamise ruumist võetud kaks loputusvee proovi, mille puhul temperatuuril 36 °C kultiveeritavate mikroorganismide sisaldus oli mitu korda kõrgem lubatud normist. Veeproovide võtmise koht asub peade ärälõikamise laua ja selgroo eemaldamise seadme kõrval.

Soolalahuse valmistamiseks kasutatava vee kõrged tulemused olid tõenäoliselt tingitud vana ja saastunud veevooliku kasutamisest. Pärast vana vooliku väljavahetamist uue vastu, vastas soolvee valmistamiseks kasutatav vesi kehtestatud nõuetele. Soolvee valmistamiseks kasutatavas vees ei esinenud *Listeria* spp. Seega soolvett ei saa pidada võimalikuks *Listeria* bakterite allikaks ega levikuteeks.

2.3 Järeldused

Teostatud uuringu käigus analüüsiti *Listeria* spp. ja *L. monocytogenes* võimalikke saastumise allikaid ja levikuteid külmsuitsu lõhefilee tootmisel: õhku, vett, inimesi, toorainet ja erinevaid tootmispindasid ja -seadmeid.

Tulemused näitavad, et tooraine on *Listeria* spp. ja *L. monocytogenes* allikaks. Kuna analüüsiti ainult fileed, ja ülejäänud kalaosad jäid arvestamata, võib eeldada, et tegelik toorlõhe saastatusaste on veelgi suurem. Seda kinnitavad tootmispindade analüüside tulemused: selgroogude ja nahkade äravedamise transportöörid andsid palju positiivseid tulemusi.

Üldiselt langesid tootmispindade ning -seadmete analüüside tulemused kokku kirjanduse allikatest saadud andmetega: peamisteks saastunud kohtadeks on kalaga otseselt kokkupuutuvad pinnad nagu nahastaja, soolamis- ja viilutamismasinad, konveierlindid, samuti mittekokkupuutuvad pinnad nagu trapid ja põrand. Fileerimise ja soolamise ruumis toimub saastumine läbi erinevate lintide ja transportööride, pakkimise ruumis läbi saastunud viilutajate. Positiivsete tulemuste olemasolu viitab sellele, et rakendatavad pesu- ja desinfitseerimise meetmed pole tõhusad.

Saadud tulemuste alusel võib järeldada, et suure tõenäosusega õhk ja vesi ei ole *Listeria* spp. ja *L. monocytogenes* allikateks ega levikuteedeks.

On ülimalt tõenäoline, et töötajad põhjustavad bakteri levikut. Sellele viitab fakt, et rohkem kui pooled töötajatest kannavad *Listeria* spp. oma tööriiete peal juba mõni tund peale töö alustamist. Serotüpeerimise käigus selgus, et tegemist on *L. monocytogenes* 1/2a. Seega töötajad kannavad kahjulikke mikroorganisme nii seadmelt seadmele kui ruumist ruumi.

Serotüpeerimise tulemused langesid kokku kirjanduse allikatest saadud andmetega – tootmiskeskonnast leiti serotüüpi 1/2a, mida peetakse eriti kohanemisvõimeliseks bakteri *L. monocytogenes* serotüübiks. Kuna antud serotüüpi leiti nii töötajatelt kui tootmispindadelt kogu tootmisahela vältel, võib eeldada, et on tegemist koloniseeritud tootmisega.

3. SOOVITUSED

Tekkinud olukorra lahendamiseks soovitan tootmise ajutiselt peatada. Töötada välja tõhus puhastamisprogramm, määrates kindlaks pesu ja deso sageduse tootmise kõigis ruumides ja kõigi seadmete puhul. Kasutada sobivaid puhastusaineid. Puhastusainete valikul tuleb lähtuda antud tootmisprotsessist ja tootmises kasutusel olevatest pinnakatte materjalidest. Vajadusel vahetada välja seni kasutusel olnud pesuained, kuna bakterid võivad olla muutunud resistentseteks pikka aega kasutusel olnud pesuainete suhtes. Puhastamisprogrammi tõhusust hinnata mikrobioloogiliste analüüside tulemuste põhjal. Vajadusel vahetada välja seadmete, tootmispindade pinnakattematerjalid. Viia läbi kõigile töötajatele toiduhügieenikoolitus kuna hügieenireeglite hea teadmine ja nende järgimine omab olulist tähtsust tootmishügieeni tagamisel.

4. KOKKUVÕTE

Listeria monocytogenes on looduses laialt levinud toidupatogeen, mis põhjustab inimestel listerioosi – haigust, millesse suremus võib ulatuda 40%-ni. Sageli haigestutakse tarbimisvalmis toodete söömise tagajärjel. Haiguse ennetamiseks ja toiduohutuse tagamiseks peab toidukäitleja kontrollima hügieeninõuete täitmist igas tootmisetapis.

Antud magistritöös uuriti bakterite *Listeria* spp. ja *Listeria monocytogenes* võimalikke allikaid ja levikuteid külmsuitsu lõhefilee tootmisel. *Listeria* spp. ja *Listeria monocytogenes* allikate ja levikuteede välja selgitamiseks analüüsiti toorkala, vee, õhu ja käitlemiskeskonna pindade mikrobioloogilist puhtust ning võeti proove personali tööriivastelt ja kinnastelt. Proovid pindade võimaliku mikrobioloogilise saastumise määramiseks võeti nii kalaga kokkupuutuvatelt kui ka kalaga mittekokkupuutuvatelt pindadelt. Tootmises esineva *L. monocytogenes* võimalike erinevate serotüüpide kindlaks tegemiseks võeti proove käitlemiskeskonna erinevatest kohtadest ja personalilt.

Töö tulemusena leiti, et õhk ja vesi ei ole *Listeria* bakterite allikateks ega levikuteedeks. Töötajad muutuvad tootmise ajal bakteri kandjateks ja edaspidi osalevad *Listeria* spp. ning *L. monocytogenes* levikus. Tooraine on bakteri *L. monocytogenes* allikaks – positiivsed proovid moodustavad 5,1% kogu proovidest, aga tegelik toorlõhe saastatusaste on arvatavasti suurem, kuna analüüsiti ainult kalafileed. *Listeria* spp. leiti paljudelt seadmetelt: soolamis- ja viilutamismasinatelt, transportööridelt, nahastajalt, samuti tootega mittekokkupuutuvatelt pindadelt nagu trapid ja põrandad. Seega on ristsaastumise võimalikkus suur. Serotüübi määramise käigus selgus, et tootmises on levinud serotüüp 1/2a, seda leiti kontakteeruvatel ja mittekontakteeruvatel tootmispindadel ja seadmetel, personalil ning toorlõhes. Seega ettevõtte tootmiskeskond on koloniseeritud ühe kindla *L. monocytogenes* serotüübiga.

Tuginedes antud uuringu tulemustele soovitatakse tootmine ajutiselt peatada ning rakendada asjakohaseid korrigeerivaid meetmeid nagu kahjustatud tööpindade/pinnakatte materjalide vahetamine, tõhusa puhastusprogrammi väljatöötamine ja rakendamine, uute sobivate pesuainete kasutamine, töötajate hügieenikoolituse kordamine.

5. SUMMARY

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen that is widely distributed in the environment and can cause a serious disease called listeriosis, with a mortality rate about 40%. Most cases of human listeriosis are associated with consumption of contaminated ready-to-eat foods. That can be prevented by applying control measures at all stages in the production system.

In this thesis, the potential sources and contamination routes of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in cold-smoked salmon processing plant were investigated during the microbiological testing of air, water, raw material, workers' clothes, food contact and non-food contact surfaces in processing environment. Samples were also taken from processing environment and employees' work clothes to determine the serotypes of *L. monocytogenes* isolates.

The results showed that air and water are not original sources neither contamination routes of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes*. Employees become *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* carriers during the processing, what increases the risk of spreading the bacteria. Raw salmon was found to be the source of the bacteria: 5,1% of tested samples were positive for *Listeria* spp. The prevalence of bacteria was observed only in the fillet, so perhaps actual contamination rate of raw salmon is higher. *Listeria* spp. were found in the processing equipment such as conveyer belts, salting, skinning and slicing machines, also non-food contact surfaces such as floor and floor drains. Thus, there is a high risk of cross-contamination. All the *L. monocytogenes* strains isolated from food contact and non-food contact surfaces, equipment, employees' work clothes and raw salmon belonged to serotype 1/2a.

Based on the results it could be recommended to temporarily suspend production and implement corrective measures such as replacement of damaged surfaces, the development and implementation of efficient cleaning program, the use of new cleaning chemicals and additional personnel training on hygiene.

6. KASUTATUD KIRJANDUS

- The Marine Harvest Salmon Industry Handbook. (2013). p. 1–72. [WWW] <http://www.marineharvest.com/en/investor1/Industry-Handbook/> (11.03.2014)
- Berrang, M.E., Meinersmann, R.J., Frank, J.F., Ladely, S.R. (2010). Colonization of newly constructed commercial chicken further processing plant with *Listeria monocytogenes*. – *J. Food Prot.*, 73(2), 286-291 [Online] ScienceDirect (05.03.2014)
- Bonsaglia, E.C.R., Silva, N.C.C., Fernandes Júnior, A., Araújo Júnior, J.P., Tsunemi, M.H., Rall, V.L.M. (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. – *Food Control*, 35, 386-391 [Online] ScienceDirect (21.02.2014)
- Chen, Y., Knabel, J.S. (2008). Strain Typing. / Handbook of *Listeria Monocytogenes*. Ed. D. Liu. Boca Raton : Taylor and Francis, p. 203-240 [Online] EBL (08.08.2014)
- Dauphin, G., Ragimbeau, C., Malle, P. (2001). Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. – *Int. J. Food Microbiol.*, 64, 51-61 [Online] ScienceDirect (28.02.2014)
- Denka Seiken Co., Ltd. Other products guide. [WWW] http://denka-seiken.jp/english/pdf/Other_product_guide.pdf (01.08.2014)
- Derrick, S. (2009). Cured, smoked and dried fish. / Microbiology Handbook – Fish and Seafood (2nd ed.). Ed. R. Fernandes. Cambridge : The Royal Society of Chemistry, p. 93-122 [Online] Knovel (28.02.2014)
- Di Ciccio, P., Meloni, D., Festino, A.R., Conter, M., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara, A., Mazzette, R., Ianieri, A. (2012). Longitudinal study on the sources of *Listeria monocytogenes* contamination in cold-smoked salmon and its processing environment in Italy. – *Int. J. Food Microbiol.*, 158, 79-84 [Online] ScienceDirect (5.02.2014)
- EFSA, ECDC. (2014). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. – *EFSA Journal* 2014, 12(2):3547, 1-312 [WWW] <http://www.efsa.europa.eu/en/publications/efsajournal.htm> (21.02.2014)
- European Commission. (2005). Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. – *Official Journal of the European Union*, L 322, p. 12-29 [WWW] <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv:OJ.L .2007.322.01.0012.01.ENG> (19.02.2014)
- EURL Lm. (2012). Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of *Listeria monocytogenes*. p. 1–15. [WWW] <https://pro.anses.fr/eurl-listeria/Documents/LIS-Cr-201213D1.pdf> (12.03.2014)
- Garrido, V., Vitas, A.I., García-Jalón, I. (2009). Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: Prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. – *Food Control*, 20, 986-991 [Online] ScienceDirect (05.02.2014)
- González, D., Vitas, A.I., Díez-Leturia, M., García-Jalón, I. (2013). *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood in Spain: Study of prevalence and temperatures at retail. – *Food Microbiology*, 36, 374-378 [Online] ScienceDirect (05.02.2014)

- Gram, L. (2004). How to meet an FSO – Control of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish industry. – *Mitt. Lebensm. Hyg.*, 95, 59-67 [WWW] http://www.icmsf.org/pdf/059-067_Gram.pdf (11.12.2014)
- Gudmundsdóttir, S., Gudbjörnsdóttir, B., Lauzon, H.L., Einarsson, H., Kristinsson, K.G., Kristjánsson, M. (2005). Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. – *Int. J. Food Microbiol.*, 101, 41-51 [Online] ScienceDirect (28.02.2014)
- Hanna, S.E., Wang, H.H. (2007). Biofilm development by *Listeria monocytogenes*. / *Biofilms in the food environment* (1 ed.). Eds. H. P. Blaschek, H. H. Wang, M. E. Agle. Oxford : Blackwell Publishing, p. 47-71 [Online] Knovel (26.03.2014)
- Hansen, L.T., Vogel, B.F. (2011). Desiccation of adhering and biofilm *Listeria monocytogenes* on stainless steel: Survival and transfer to salmon products. – *Int. J. Food Microbiol.*, 146, 88-93 [Online] ScienceDirect (21.02.2014)
- Johansson, T., Rantala, L., Palmu, L., Honkanen-Buzalski, T. (1999). Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and in a production plant. – *Int. J. Food Microbiol.*, 47, 111-119 [Online] ScienceDirect (21.02.2014)
- Kramarenko, T., Roasto, M., Meremäe, K., Kuningas, M., Pölsama, P., Elias, T. (2013). *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. – *Food Control*, 30, 24-29 [Online] ScienceDirect (28.02.2014)
- Lawley, R., Curtis, L., Davis, J. (2012). *Listeria*. / *The Food Safety Hazard Guidebook*, 2nd Edition. Cambridge : The Royal Society of Chemistry, p. 67-73
- Liu, D. (2008). Epidemiology. / *Handbook of Listeria Monocytogenes*. Ed. D. Liu. Boca Raton : Taylor and Francis. p. 27-60 [Online] EBL (08.08.2014)
- Magalhães, R., Mena, C., Ferreira, V., Silva, J., Almeida, G., Gibbs, P., Teixeira, P. (2014). *Listeria monocytogenes*. / *Encyclopedia of Food Safety*, Volume 1. Eds. Y. Motarjemi, G. Moy, E. Todd. Oxford [etc.] : Elsevier, p. 450-461 [Online] Knovel (26.03.2014)
- McLauchlin, J. (2006). *Listeria*. / *Emerging Foodborne Pathogens*. Eds. Y. Motarjemi, M. Adams. Cambridge : Woodhead Publishing Limited, p. 406-428 [Online] Knovel (28.02.2014)
- Mędrała, D., Dąbrowski, W., Czekajło-Kołodziej, U., Dackowska-Kozon, E., Koronkiewicz, A., Augustynowicz, E., Manzano, M. (2003). Persistence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from products in a Polish fish-processing plant over a 1-year period. – *Food Microbiology*, 20, 715-724 [Online] ScienceDirect (05.02.2014)
- Miettinen, H., Wirtanen, G. (2006). Ecology of *Listeria* spp. in a fish farm and molecular typing of *Listeria monocytogenes* from fish farming and processing companies. – *Int. J. Food Microbiol.*, 112, 138-146 [Online] ScienceDirect (21.02.2014)
- Miettinen, H., Wirtanen, G. (2005). Prevalence and location of *Listeria monocytogenes* in farmed rainbow trout. – *Int. J. Food Microbiol.*, 104, 135-143 [Online] ScienceDirect (21.02.2014)
- Porsby, C.H., Vogel, B.F., Mohr, M., Gram, L. (2008). Influence of processing steps in cold-smoked salmon production on survival and growth of persistent and presumed non-persistent *Listeria monocytogenes*. – *Int. J. Food Microbiol.*, 122, 287-295 [Online] ScienceDirect (19.02.2014)

- Rørvik, L.M. (2000). *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. – *Int. J. Food Microbiol.*, 62, 183-190 [Online] ScienceDirect (05.02.2014)
- Thisted Lambertz, S., Nilsson, C., Brådenmark, A., Sylvén, S., Johansson, A., Jansson, L.-M., Lindblad, M. (2012). Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010. – *Int. J. Food Microbiol.*, 160, 24-31 [Online] ScienceDirect (19.02.2014)
- Toiduainete ja loomasööda mikrobioloogia. (2004). EVS-EN ISO 11290-1:2000/A1:2004 Horisontaalmeetod *Listeria monocytogenes*'e tuvastamiseks ja loendamiseks. Osa 1: Tuvastamismeetod. Tallinn : Standardiamet
- Toiduainete ja loomasöötade mikrobioloogia. (2003). EVS-EN ISO 6887-3:2003 Katseproovide, algsuspensiooni ja kümnendlahjenduste valmistamiseks. Osa 3: Spetsiifilised eeskirjad kala ja kalatoodete valmistamiseks. Tallinn : Standardiamet
- Toiduainete ja loomasöötade mikrobioloogia. (2008). EVS-EN ISO 7218:2008 Üldjuhend mikrobioloogilisteks uuringuteks. Tallinn : Standardiamet
- Uyttendaele, M., Busschaert, P., Valero, A., Geeraerd, A.H., Vermeulen, A., Jacxsens, L., Goh, K.K., De Loy, A., Van Impe, J.F., Devlieghere, F. (2009). Prevalence and challenge tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian produces and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. – *Int. J. Food Microbiol.*, 133, 94-104 [Online] ScienceDirect (19.02.2014)
- Vee kvaliteet. (2001). EVS-EN ISO 6222:2001 Kultiveeritavate mikroorganismide loendamine. Kolooniate arv toiteagarsöötmesse külvil. Tallinn : Standardiamet
- Wagner, M., McLauchlin, J. (2008). Biology. / Handbook of *Listeria Monocytogenes*. Ed. D. Liu. Boca Raton : Taylor and Francis, p. 3-26 [Online] EBL (08.08.2014)
- Warriner, K., Namvar, A. (2009). What is the hysteria with *Listeria*? – *Trends in Food Science & Technology*, 20, 245-254 [Online] ScienceDirect (21.02.2014)
- Wiedmann, M., Saunders, B.D. (2007). Ecology of *Listeria* Species and *L. monocytogenes* in the Natural Environment. / *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition. Eds. E.T. Ryser, E.H. Marth. Boca Raton : CRC press, p. 21-54 [Online] CRCnetBASE (04.10.2014)

LISA 1 Toiduohutuse mikrobioloogilised kriteeriumid bakteri *Listeria monocytogenes* kohta

Tabel 1 Toiduohutuse mikrobioloogilised kriteeriumid bakteri *Listeria monocytogenes* kohta (European Commission, 2005)

Toiduliik	Piirmäärad	Analüütiline standard-meetod	Kriteeriumi kohaldamise etapp
Imikute valmistoit ja valmistoit meditsiiniliseks eriotstarbeks	Puudub 25 g-s	EN/ISO 11290-1	Kõlblikkusajal turule viidud tooted
Muud valmistoidud kui imikutele ja meditsiiniliseks eriotstarbeks ettenähtud valmistoidud, milles võib paljuneda <i>L.monocytogenes</i>	100 PMÜ/g	EN/ISO 11290-2	Kõlblikkusajal turule viidud tooted
	Puudub 25 g-s	EN/ISO 11290-1	Enne, kui toit on viidud selle tootnud toidukäitleja vahetu kontrolli alt välja
Muud valmistoidud kui imikutele ja meditsiiniliseks eriotstarbeks ettenähtud valmistoidud, milles ei paljune <i>L.monocytogenes</i>	100 PMÜ/g	EN/ISO 11290-2	Kõlblikkusajal turule viidud tooted