

Značaj patogenih mikroorganizama u sirovom mlijeku

Poglavlje 9.

G. A. Prentice, Gramplan Food Technology Centre, Greenburn Road, Bucksburn, Aberdeen AB2 9S B, United Kingdom

LISTERIA MONOCYTOGENES

1. Uvod

Poslije otkrića *Listeriae monocytogenes* 1926. utvrdilo se da je ona vrlo raširena u prirodi. *L. monocytogenes* je bila izolirana iz ribe, bilja, vode, riječne vode, otpadne vode, divljih životinja, kukaca, hrane te okoliša u kom se hrana proizvodi. Izvještavalo se da mikroorganizam izlučuje do 77% zdravih odraslih (1-3). Značaj mikroorganizama u mljekarskoj industriji sastoji se u tome što se često navodi kao uzročnik trovanja hranom pa ta industrija mora poduzimati mjere kako bi osigurala proizvodnju mliječnih proizvoda koji ne sadrže *L. monocytogenes*, a te su mjere skupe. Bilo je više preglednih radova, koji ukazuju na pojavu, značaj i metode otkrivanja te identificiranja *L. monocytogenes* (4, 5). Ovo će se poglavlje osvrnuti na aspekte povezane sa zastupljenosti u sirovom mlijeku.

2. Karakteristike

2.1. Rast *Listeriae monocytogenes*

Sposobnost rasta u znatnom nizu uvjeta uzgoja važna je karakteristika *L. monocytogenes*. Seeliger i Jones (6) konstatiraju da je raspon temperatura pri kojima se razvija *L. monocytogenes* od 1°C do 45°C, a optimalna temperatura rasta između 30°C i 37°C. O sličnim nalazima izvještavaju i drugi. Juntilla et al. (7) su promatrali rast *L. monocytogenes* nešto ispod 1°C u 35% istraživanih sojeva. Wilkins et al. (8) smatrao je minimalnom temperaturom rasta 3°C, temperaturu pri kojoj su Juntilla et al. (7) utvrdili da rast naglo opada. Također se smatralo da proučavanje rasta mikroorganizama tijekom duljih vremenskih razdoblja može pokazati

da je minimalna temperatura rasta mikroorganizama čak niža od prikazanih. Walker et al. (9) su promatrali rast pri $-0,4^{\circ}\text{C}$. Feresu i Jones (10) su pokazali niz sojeva koji rastu pri 50°C i čini se da je gornja granica rasta u tom području. Optimalni pH za rast *L. monocytogenes* je neutralan ili neznatno alkaličan. Seeliger i Jones (6) tvrde da je raspon pH rasta 6-9. Ipak, Conner et al. (11) su uzgajali *L. monocytogenes* u soku zelja pri pH 5,0, a George et al. (12) su bili u stanju da taj mikroorganizam uzgoje u optimalnim uvjetima uz pH vrijednost 4,4.

Faber (13) izvještava o neznatnom broju informacija o utjecaju različitih a_w razina na rast *L. monocytogenes*. Ipak, Feresu i Jones (10) su promatrali rast u 10%-tnoj otopini NaCl što je ekvivalent vrijednosti a_w 0,935. Shaham et al. (14) našli su neke sojeve *L. monocytogenes* koje su preživjele bar 132 dana pri 4°C skladištene u 25,5% NaCl.

2.2. Biokemijske karakteristike

Biokemijske karakteristike *L. monocytogenes* u preglednim su radovima opširno opisali Gray i Killinger (15) te Seeliger i Jones (6).

To je Gram-pozitivan, kratak štapić sa zaokruženim krajevima. Neke su stanice svinute i pojavljuju se pojedinačno, u paraleli ili u V oblicima. Nekada mikroorganizmi iz inficiranog materijala stvaraju diploidne oblike ili čak koke. Promjer stanica je $0,4-0,5\ \mu\text{m}$, dugačke su $0,5 - 2,0\ \mu\text{m}$, a u drugim se kulturama mogu zapaziti vlaknaste stanice dugačke $6-20\ \mu\text{m}$. Mikroorganizam je pokretan s peritrihnim bičevima kad izrastu pri $25-30^{\circ}\text{C}$. Pokretnost je manje naglašena pri drugim temperaturama.

Na hranjivom su agaru kolonije okrugle, providne, niske i konveksne fino granulirane teksture na površini. Pod normalnim osvjetljenjem djeluju vodenasto plavo-sivo, ali pokazuju karakteristiku pojave opalescentne boje pačjeg jajeta kad se promatraju osvjetljene odozdo pri 45°C (tehnika Henry).

Tablica 1. prikazuje glavne karakteristike koje se koriste za razlikovanje mikroorganizama roda *Listeria* od drugih bakterija a Tablica 2. navodi karakteristike koje se primjenjuju pri diferenciranju različitih sojeva unutar roda. *L. monocytogenes* proizvodi kiselinu od glukoze, α -metil D-manozida i ramnoza, ali ne od ksiloze ili manitola. Ne reducira nitrat i pokazuje β -hemolizu s crvenim krvnim stanicama ovce i pozitivno CAMP reagira sa *Staphylococcus aureus*, a negativno CAMP s *Rhodococcus equi*.

Tablica 1. Fiziološke karakteristike *Listeria* spp.

Izgled kolonija	
Okrugle, prozirne, nisko konveksne kolonije, promjera 0,5-1,5 mm	
Izgled kapi rose	
Površina fine teksture, granulirana	
Izgled vodenast, modro-siv	
Karakteristična modra boja kad se promatra tehnikom Henry	
Makroskopski izgled	
Gram-pozitivne	
Pravilni kratki štapići zaokruženih krajeva	
Promjer 0,4-0,5 μm	
Duljina 0,5-2,0 μm	
Karakteristike rasta	
Optimalna temperatura	30-37°C
Raspon temperature	1-45°C
Optimalni pH	Neutralno do nešto alkalično
Raspon pH	5-9
Fiziološka svojstva	
Katalaza-pozitivna	
Oksidaza-negativna	
Nije otporna prema kiselinu	
Aerobna i fakultativno anaerobna	
Bez čahure	
Pokretna pomoću peritrihnih bičeva pri 20-25°C	
H ₂ S - negativna ^a	
Iz glukoze proizvodi kiselinu	
Pozitivna prema metil-crvenoj boji	
Voges Proskauer-pozitivna	
Indol-negativna	
Citrat-negativna	
Ureaza-negativna	

^a Neki sojevi *L. grayi* i *L. murray* su pozitivni metodom s olovnom acetatom. Supstrati za diagnostičko izoliranje *Listeria* spp. upotrebljavaju neke od tih karakteristika.

2. 3. Serologija

Seeliger i Jones (6) kratko opisuju serologiju roda *Listeria*, podijeljenog u 16 serovara, u prvom redu na temelju O antigena i u drugom redu na temelju H antigena. *L. monocytogenes* sadrži serovare 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e i 7. U studiji provedenoj u US Centru za kontrolu bolesti u Atlanti, nađena su samo tri serotipa (4b, 1/2b i 1/2a) povezana s listeriozom /16/. Zbog toga se serologija malo koristi u proučavanju epidemija, a koriste se dodatna sredstva za diferencijaciju među sojevima, na primjer određivanje tipa faga. Serologija se također ne koristi mnogo za identificiranje mikroorganizama unutar roda *Listeria* jer nema mnogo veze između serologije i sojeva.

3. Patogenost

L. monocytogenes je poznati uzročnik oboljenja čovjeka i životinja o čemu postoje razumljivi prikazi koje su sačinili Gray i Killinger /15/, Seeliger /18/ i Gitter /19/.

3.1. Listerioza u životinja

Bolest se životinja može ispoljiti samo na slijedeće načine:

(1) Infekcijom bređeg uterusa iza kojeg slijedi pobačaj, mrtvorodenčad ili smrt novorođenog. Ovo većinom napada govedo i ovcu.

(2) Interne ili septikemijske infekcije. To se većinom događa novoj janjadi iako može oboljeti i telad.

(3) Encefalitis preživača. To je najčešći oblik bolesti i napada ovce, koze i goveda. Mikroorganizam napada mozak i može uzrokovati paralizu i hodanje u krugovima ("bolest kruženja").

(4) Mastitis goveda. To je rjeđe nego što bi razine *L. monocytogenes* u okolišu mogle navijestiti. Ipak, kad se jednom kronični mastitis izazvan s *L. monocytogenes* učvrsti, mikroorganizam se može izlučivati u mlijeko do kraja života krave ili dok se uspješno ne izliječi.

U početku se mislilo da je bolest životinja zoonoza, ali to više nije tako. Širenje bolesti sa životinje na životinju kontaktom je iznimka. Sada postoji mnogo dokaza koji ukazuju da se listerioza stječe oralno kontaminiranjem iz okoliša posredstvom životinja koje izlučuju mikroorganizme, a Seeliger et al. (20) predlažu ciklus infekcije:

Inficirana životinja: izlučuje *L. monocytogenes* s izmetkom i mokraćom; kontaminirani gnoj, tlo; rast u povoljnim uvjetima, na primjer u lošoj silaži, infekcija konzumiranjem kontaminirane krme.

3.2. Patogenost za čovjeka

3.2.1. Simptomi bolesti

L. monocytogenes je originalno izolirana iz bolesnika koji su bolovali od infekciozne mononukleoze (36). To je navelo na zaključak da je *L. monocytogenes* uzrokovala mononukleozu iako se sada zna da to nije tako. Gray i Killinger (15) daju popis poremetnji s kojima se povezivala *L. monocytogenes*:

Meningo-encefalitis (inficiran je centralni nervni sistem i mozak), to je najobičnije za novorođene i odrasle starije od 40 godina.

Septikemija prerano rođenih beba

Septikemija poput gripe u pobačajima

Infekciozni sindrom poput mononukleoze

Septikemija odraslih - često nametnuta na druge smetnje kao otitis media, faringitis, tonzilitis, sinusitis

Upala pluća

Endokarditis

Lokalizirani abscesi - eksterni i interni

Rane na koži - jednostavne ili s prištevima

Konjuktivitis

Obični pobačaj

Mentalna zaostalost (naročito djece)

Psihoza odraslih

Gellin i Broome (16) opisuju običnija klinička očitovanja listerioze.

3.2.2 Listerioza tijekom gravidnosti

To se obično dogodi poput bolesti slične influenci s groznicom i glavoboljom, a gravidne žene vrlo rijetko obole od meningitisa. Bolest se obično ograniči sama izlučenjem zaraženog materijala s pobačenim fetusom.

3.2.3 Listeria novorođenih

Pojavljuje se u dva oblika kao rani i kasni napad. S ranim nastupom listerioze novorođenčeta, fetus je zaražen u uterusu, zarazila ga je bolesna majka i simptomi se pojave ili prilikom poroda ili par prvih dana poslije poroda - oštećenja se javljaju u jetri i placenti, a mogu se naći i u mozgu, adrenalnim žlijezdama, slezeni, bubregu, plućima i gastrointestinalnom traktu. O kasnom se nastupu listerioze novorođenčeta smatra da je do infekcije došlo prilikom prolaza zaraženih porođnim kanalom, a bolest se manifestira kao meningitis uz prosječni nastup simptoma pri starosti 14,3 dana.

Listerioza negravidnih odraslih i djece najčešće poprima oblik meningitisa. Najskloniji su listeriozi pojedinci čija je imunost na neki način ugrožena, na primjer rakom, lijekovima koji potiskuju imunitet ili alkoholizam. Fatalnost je visoka, oko 30%.

4. Izoliranje i identifikiranje

Prentice i Neaves (4) su diskutirali o izoliranju *L. monocytogenes* iz hrane. Postupci obogaćivanja obično uključuju razdoblje skladištenja na hladnome "hladno obogaćivanje" koje može uključiti inkubaciju uzorka pri 2-5°C tijekom 10-12 tjedana i tada inokuliranje u dekstroza-triptonski tekući supstrat tijekom daljnjih 4-6 tjedana. Bez obzira na efikasnost ova se metoda ne koristi mnogo u industrijskim mikrobiološkim laboratorijima koji trebaju brzi rezultat na kojem se temelje odluke.

Tablica 2. Biokemijsko razlikovanje *Listeriae* spp.

Vrsta	β-hemoliza	CAMP reakcija		Kiselina od					Redukcija nitrata
		Staph. aureus	Rhod. equi	Glu-koze	α-metil D-manozida	Ram-noze	Ksi-loze	Mani-tola	
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-	+	+	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	++	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>L. seeligeri</i>	(+)	(+)	-	+	V	-	+	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	+	+	V	+	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	+	NS	-	-	+	-
<i>L. murrayi</i>	-	-	-	+	NS	V	-	+	+

(+) = Weak reaction - reakcija slaba

NS = Not stated - nije primijećena

V = Different strains give different reactions - različiti sojevi reagiraju različito

Različiti su selektivni tekući supstrati za obogaćivanje bili otkriveni. Oni su omogućili obogaćivanje pri višim temperaturama za kraćeg trajanja upotrebom inhibitora u supstratima. Najprikladniji je bio nalidiksinska kiselina.

Čini se da se sada najčešće koristi kao supstrat za obogaćivanje supstrat Univerziteta u Vermontu (21) ili Lovett i Hitchins (22) koji preporučuje Administracija za lijekove i hranu SAD (USFDA).

Tradicionalni supstrat za izoliranje *L. monocytogenes* među supstratima za obogaćivanje bio je modificirani McBrideov supstrat (23), a mnogo je informacija o pojavi *L. monocytogenes* u hrani dobiveno korištenjem tog supstrata. Ipak, u posljednje se vrijeme tražilo nove supstrate za lijevanje na ploče i uspješno se koristilo u proizvodnji supstrata i mislilo se da je bolji od

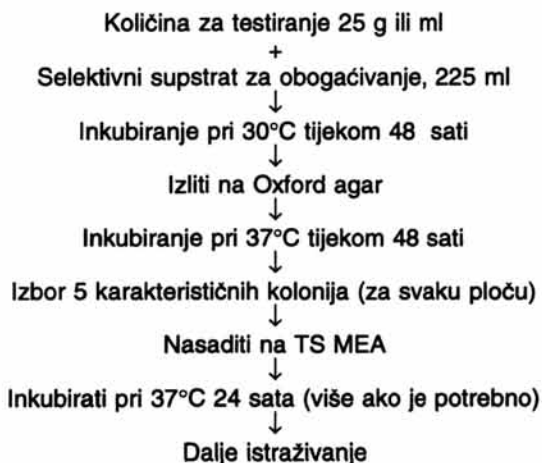
McBridovog. Dva od tih supstrata su Oxford agar 24 i PALCAM agar (25). S ta dva se supstrata postiže bolje ponovno dobivanje *L. monocytogenes* iz kultura za obogaćivanje, naročito ako je visoka razina kontaminenata. Povećana osjetljivost selektivnih supstrata za obogaćivanje poput Oxford i PALCAM agara pokazala je da je pojava *L. monocytogenes* u hrani znatno veća no što se ranije zamišljalo.

Početno identificiranje *L. monocytogenes* proučavanjem ploča sa selektivnim supstratima za tipične kolonije. Moderni su supstrati vrlo selektivni za *Listeriae* i zbog toga kolonije poslije reagiraju tipično, a broj je drugih karakteristika koje valja proučiti relativno malen. To su obično katalaza, pokretljivost, reakcija Henry, hemoliza, CAMP reakcija, proizvodnja kiseline (ali ne plina) iz L-ramnoze i α -metil D-manozida.

IDF je pažljivo pregledao niz različitih metoda izoliranja i identificiranja *L. monocytogenes* iz svih tipova mliječnih proizvoda od sira što zri pod plijesnima do mlijeka u prahu. Od svih sustava iskušanih kombiniranja uglavili su jedan, koji je sada IDF privremeni standard (26).

Slika 1. daje diagramski prikaz metode.

Slika 1: IDF privremena standardna metoda za otkrivanje L. monocytogenes u mlijeku i mliječnim proizvodima



Za ovu se metodu utvrdilo da dobro otkriva *L. monocytogenes* u mliječnim proizvodima iako standard preporuča da proizvodi sadrže vjerojatno mnogo mikroorganizama koji provode kiselinu, na primjer sirovo mlijeko, tekući supstrat za obogaćivanje se uzgaja poslije 24 sata.

5. Putevi kontaminiranja

L. monocytogenes mogu u mlijeko izlučivati krave što boluju od mastitisa (27). Ipak, to se ne događa često (B. Url, obavijestio lično 1991.), a najčešći je izvor kontaminiranja s *L. monocytogenes* iz okoliša.

L. monocytogenes se nalazi svuda, a izolirana je iz velikog niza izvora. Husu (28) primjećuje da izmet može biti važan izvor kontaminiranja sirovog mlijeka. Omjer stada koja izlučuju *Listeria* spp. dostiže i 52%, a Husu smatra da bi to mogao biti rezultat kontaminiranja površina sise i zbog toga kontaminiranja sirovog mlijeka.

Kao znatan izvor *Listeria* navodi se i krma za stoku. Pojava *L. monocytogenes* može biti znatna naročito kad je loša kvaliteta silaže (29). To se naročito odnosi na "velike bale" silaže u kojima se često ne proizvede dovoljno kiseline koja bi spriječila rast *Listeriae*.

Osim direktnog kontaminiranja mlijeka krmom, kontaminirane tvari krme mogu zaraziti kravu a ona tada izlučuje mikroorganizme u izmet.

Husu (28) je našao *Listeriae* i u drugoj hrani iako su razine mikroorganizama u silaži bile niske ($<10^2/g$) pa se navodi da se one mogu razmnažati u okolišu mužnje i zatim kontaminirati mlijeko.

Direktna kontaminacija priborom za mužnju također je izvor *L. monocytogenes* u sirovom mlijeku.

6. Pojavljivanje

Krave izlučuju *L. monocytogenes* iz zaraženog vimena vrlo rijetko. Ne postoje noviji izvještaji o zaraženim četvrtima, ali ipak je B. Url (lična informacija) na Univerzitetu u Beču 1991. analizirao 425 uzoraka aseptički pomuzenih krava koje su bolovale od mastitisa ili su ga upravo dobile. *L. innocua* nađena je u jednom uzorku (0,2%), a *L. monocytogenes* nije otkrivena niti u jednom analiziranom uzorku. Husu (28) je analizirao sastavljene uzorke mlijeka iz vimena koja su prije uzimanja uzorka oprana. Od 59 analiziranih uzoraka *L. monocytogenes* je bila izolirana samo u jednom slučaju (1,7%).

Greenwood et al. (30) analizirao je uzorke mlijeka 51 pojedinačne muzare zajedno sa zbirnim negrijanim mlijekom iz koga su izolirane *L. monocytogenes*. *Listeria* spp. su izolirane iz 17 krava od kojih je 15 bilo *L. innocua*, a 2 su bile *L. monocytogenes*.

Iako su vrlo oskudne informacije o *L. monocytogenes* u mlijeku izlučenom iz pojedine četvrti vimena ili čak skupnih uzoraka uzetih direktno

od krave, u Danskoj je analizirano (od 1985. do 1990.) ukupno 1 227 053 krava, a *L. monocytogenes* izolirana iz 278 (0,22%) od njih (P. S. M a d s e n, usmena obavijest, 1993). Ipak postoji mnogo informacija o pojavljivanju *L. monocytogenes* u skupnom mlijeku bilo na farmi ili u spremnicima s mlijekom sakupljenim direktno na farmi.

U Škotskoj su F e n l o n i W i l s o n (31) analizirali 180 sabirnih mlijeka u tri različita slučaja. *L. monocytogenes* nije bilo mnogo, a ovisilo je o razdoblju godine, s više pozitivnih za ljetnih mjeseci nego u jesen ili zimi. L i e w e n i P l a n t z (32) su analizirali mlijeko sa 100 američkih farmi u veljači i ponovno u srpnju 1986; 9% (18/200) svih uzoraka sirovog mlijeka sadržalo je *Listeria* spp., a 4% od njih bili su *L. monocytogenes*. U pokusu provedenom u veljači 6% (6/100) su sadržali *L. monocytogenes* dok je u pokusu provedenom u listopadu 2% (2/100) sadržalo *L. monocytogenes*.

Za pojave trovanja hranom u Massachusettsu tragovi su vodili konzumiranju pasteriziranog mlijeka. H a y e s et al. (33) su analizirali 121 uzorak sirovog mlijeka našli *L. monocytogenes* u 15% uzoraka. M a r t h (34) izvještava da je analiza 650 uzoraka provedena u USFDA 1984. i 1985. utvrdila *L. monocytogenes* u 27 (4,2%) uzoraka. Razine su, čini se, najviše u proljeće što bi podržalo hipotezu o silaži kao glavnom izvoru mikroorganizama u mlijeku. T. W. H o l z i n g e r (lična obavijest, 1990), zaključuje, na temelju mnogih proučavanja u različitim dijelovima SAD, da je u 3-7% uzoraka nađena *L. monocytogenes*.

U šest laboratorija u različitim predjelima Finske godine 1988. - 1989. nađena je *L. monocytogenes* u 1386 uzoraka sirovog mlijeka. Mikroorganizam je izoliran iz 2-4% uzoraka sabranih iz 738 kotlova na farmama i iz 5,2% od 256 uzoraka uzetih tijekom prijevoza mlijeka s farmi u mljekare. Najviše je prevladavala od listopada do prosinca (28).

U drugoj studiji o zastupljenosti *L. monocytogenes* u mlijeku iz spremnika za prijevoz F e d i o i J a c k s o n (35) analizirali su mlijeko iz 36 spremnika u Alberti, Kanadi, u dva odvojena slučaja i odredili 2,3% i 11,1% istim redom. U istom proučavanju o pojavi *L. monocytogenes* u 426 uzoraka iz spremnika na farmi pojavila se u 1,9% slučajeva. U Kanadi (Ontario) analizirali su S l a d e et. al. (17) uzorke sirovog mlijeka prosijavanjem tijekom jednogodišnjeg razdoblja i utvrdili da 36 od 315 analiziranih uzoraka (11,4%) sadrži *Listeria* spp., od čega je 17 (5,4%) sadržalo *L. monocytogenes*. Nisu primjećene sezonske promjene.

D. W e s s e l s (lična obavijest, 1990.) izvještava da je u Južnoj Africi 1989. našao *L. monocytogenes* u 67 uzoraka sirovog mlijeka, od ukupno 982

(6,3%). U Engleskoj su Greenwood et al. (30) izolirali *L. monocytogenes* iz 13 od 361 uzoraka iz spremnika na farmi (3,6%) između XI 1988. i listopada 1989. U sličnom proučavanju u Republici Irskoj, uzorci su uzimani na 70 farmi između lipnja 1989. i srpnja 1990. Od analiziranih 589 uzoraka sirovog mlijeka *Listeria* spp. su izolirane iz 8,3%, a *L. monocytogenes* iz 4,9%. Najviše su se pojavljivali između prosinca i ranog travnja, a izolirane su u rasponu od 25 do 31%.

7. Epidemiologija

Listerioza se originalno povezivala sa životinjama i smatrala se zoonozom. Smatralo se da je ta bolest ljudi rijetka i do 1950. nije identificirano više od 70 slučajeva (18). Sada se zna da se ta bolest dešava ljudima češće nego što se vjerovalo pa je 1988. u UK prijavljen Centru za nadzor prenosivih bolesti 291 slučaj, a od 1986. je naglo porastao (37).

Kontaminirana hrana se dugo smatrala izvorom infekcije ljudi. Ipak, 1981. je u primorskim provincijama Kanade "dokazan" prvi slučaj listerioze izazvane hranom. Dokazano je da je to bila posljedica konzumiranja kontaminirane salate od zelja (38). Od tada su često bili uplitani mliječni proizvodi. Meki sir se smatrao odgovornim za pojavu trovanja hranom u Švicarskoj (39), USA (40) i UK (41,42). Kontaminirano pasterizirano mlijeko smatralo se odgovornim za trovanje 1983. u Massachussetsu (43).

8. Terapija

Gelli i Broome (16) utvrđuju da nije pronađena optimalna antimikrobiološka terapija u kontroliranim kliničkim pokusima i da o tome još valja diskutirati. U Tablici 3. su navedeni postupci koji se predlažu.

Tablica 3.: Intravenozni antibiotici koji se predlažu za liječenje *Listeria*: doziranje i intervali davanja (16)

Antibiotik	Doza/dan	Interval
Ampicilin	200-300 mg/kg	Svaka 4 sata
Penicilin B	240 000-480 000 U/kg	Svaka 4 sata
Gentamicin	5,6 mg/kg	Svakih 6-8 sti
Eritromicin	40-60 mg/kg	Svakih 6-8 sati
Tetraciklin	15 mg	Svakih 6-8 sati
Doksiciklin	3 mg/kg intravenozno tada dati 1,5 mg/kg	Svakih 12 sati
Sulfametoksazol i trimetoprim	15 i 17 mh/kg	Svakih 8 sati

Antibiotička osjetljivost *Listeria* nije dobro definirana, ali antibiotici što se biraju za liječenje ljudi prema tvrdnji Carjala et al. (44) su penicilin G ili ampicilin u velikim dozama. Postoje neke sugestije da je pogodno dodavanje aminoglikozida ali to nije općenito prihvaćeno.

9. Kontrola i sprečavanja

9.1. Opća higijena

Iako se mnogo doprinijelo poznavanju *L. monocytogenes* u sirovom mlijeku, malo se zna o značenju higijene u postupku mužnje ili kontaminiranju tog sirovog mlijeka s *L. monocytogenes*.

Fenlon i Wilson (31), prilikom istraživanja pojave *L. monocytogenes* u zbirnom mlijeku s farmi u Sjeverno-istočnoj Škotskoj nisu uočili vezu između izoliranja *L. monocytogenes* i razine higijene na farmi. Oni su ipak komentirali ulogu loše kvalitete silaže u kojoj je *L. monocytogenes* rasla i lako preživljavala.

U Finskoj su ipak Husu i sur. (45) istraživali okoliš procesa mužnje da bi utvrdili *L. monocytogenes* i utvrdili široki niz varijanti između farmi. U jednoj od proučavanih farmi je *Listeria* bila vrlo raširena, a u drugim je otkrivena samo na nekim mjestima (na primjer prolazima za hranu i podovima). U istom je proučavanju otkrivena *L. monocytogenes* na neopranim sisama, na polovini analiziranih farmi (2/4) a niti jedna nije izolirana sa sisa poslije pranja. Husu zaključuje da je dobro održavanje higijene tijekom mužnje i okolišu mužnje važno u ograničavanju kontaminiranja sirovog mlijeka s *L. monocytogenes*.

9.2. Dezinfekcija

Proučavana je učinkovitost 6 sredstava za sanitaciju *L. monocytogenes*. (Lopez, 46). Dva su sredstva bila anionske kiseline, jedno je temeljilo na aktivnom jodu, a dva su sadržavala aktivni klor. Učinkovitije koncentracije za *L. monocytogenes* bile su: sredstva za sanitaciju na osnovi klora sadržala su 100 ppm dostupnog klora: sredstva na osovi joda sadržala su 12,5 ppm joda koji se mogao titrirati; sredstva na osnovi anionske kiseline, 200 ppm aktivnog agensa, sredstva na osnovi kvarternog amonija 100 ppm aktivnog sastojka.

Za sredstva s jodom i ona s kvarternim amonijem učinkovite razine protiv *L. monocytogenes* bile su iste kao i za *S. typhimurium*.

El-Kest i Marth (47) te Brackett (48) diskutiraju o učinku klora na *L. monocytogenes*. Koncentracije klora veće od 50 ppm razaraju *L. monocytogenes*, a učinak se kontrolira količinom prisutnog organskog materijala i stanjem stanica.

Klor i ostali dezinficijensi koji se obično koriste protiv *L. monocytogenes* i mikroorganizama nisu otporniji prema njima od bilo kojeg nesporotvornog mikroorganizma.

Domínguez et al. (49) utvrdili su da je *L. monocytogenes* otpornija prema vodikovom superoksidu od normalne mikroflore mlijeka i predložio da bi vodikov superoksid mogao dodavati u ohlađeno mlijeko i čak proizvesti sredinu u kojoj je obogaćen rast *Listeria* spp.

9.3. Hlađenje

Seeliger i Jones (6) u Bergeyevom priručniku tvrde da je minimalna temperatura rasta *L. monocytogenes* 1°C. Nedavno su Walker et al. (9) proučavali rast tri soja *L. monocytogenes* u mlijeku i utvrdili da minimalna temperatura rasta varira u rasponu od -0,1°C do -0,4°C. Također su utvrdili da je obim i veličina rasta bila određena temperaturom inkubacije mikroorganizama prije proučavanja minimalnih parametara rasta, kulture izrasle pri 4°C umanjile su lag fazu u poređenju s kulturama koje su se prije razvijale pri 30°C. Lag faze su varirale od 1 do 3 d i od 3 do >34 d pri 5°C i 0°C, istim redom. Odgovarajuća trajanja generacija bila su 13-24 h i 62-131 h.

Juntilla et al. (7) proučavali su 100 sojeva *Listeria* i utvrdili da je minimalna temperatura rasta bila $1,1^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ za *L. monocytogenes* i $1,7 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ za nehomolitičke listerije. Nije primjećena razlika među sojevima iz različitih izvora.

Od provale listerioze u pasteriziranom mlijeku iz Massachusettsa 1983. (43), provedeno je mnogo proučavanja kako bi se utvrdilo da li pasterizacija uništava *L. monocytogenes*. Obiger (50) je dokazao da su svi sojevi uništeni Njemačkim propisom HTST temperatura pasterizacije. Bradshaw et al. (51) pokazali su da unutar pH vrijednosti 5 i 9 punomasno mlijeko sadrži *L. monocytogenes* u razinama 10^5 ml imalo je D-vrijednost 0,95 pri 71,7°C i zaključio je da *L. monocytogenes* nije preživjela pasterizaciju. Drugi su istraživači ipak pokazali da temperature zagrijavanja normalno povezane s pasterizacijom nisu uvijek garancija destrukcije *L. monocytogenes*. Bears

i Girard (52) su mikroorganizme pronašli na razinama većim od 5×10^4 /ml preživjevši pasterizaciju tipa Holder, a Stajner (53) je pokazao da mlijeko koje sadrži 5×10^8 stanica/ml može sadržavati preživjele *L. monocytogenes* poslije zagrijavanja pri 74°C tijekom 42 s, što je znatno jači toplinski postupak od HTST pasterizacije. Doyle et al. (54) otkrili su da *L. monocytogenes* preživljava minimalnu toplinsku obradu koju traže tekući standardi pasterizacije mesa. Barza (55) je zahtijevao da *L. monocytogenes* izdrži pasterizaciju kad je progutaju leukociti - što još nije bilo prikazano.

U Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) proučavani su podaci o otpornosti prema toplini *L. monocytogenes* i zaključili da pasterizacija mlijeka ubija *L. monocytogenes* i taj se zaključak općenito prihvaća.

10. Zaključak

L. monocytogenes je u prirodi vrlo raširena i često se nalazi u mlijeku s farmi. To mogu izazvati zaražene životinje ili češće sredina u kojoj se mlijeko proizvodi. Dobra higijenska praksa tijekom mužnje i pravilna praksa čišćenja mogu ograničiti broj *L. monocytogenes* u mlijeku jer nije posebno otporna prema materijalu za čišćenje koji se obično koristi.

Mikroorganizam raste u mlijeku pri temperaturama hlađenja. Ipak, pri 5°C trajanje generacije je 13-24 h i zbog toga njen rast u sirovom mlijeku u normalnim uvjetima skladištenja ne bi trebao biti znan.

Iako je *L. monocytogenes* nepoželjna u sirovom mlijeku, njezin je značaj ograničen. Mora se očekivati da sirovi animalni proizvodi sadrže patogene mikroorganizme pa tako i *L. monocytogenes*. Istraživanja otpornosti prema toplini sada su pokazala da *L. monocytogenes* i sve *Listeria* spp. razara temeljito provedena pasterizacija. Zato su problemi *Listeria* spp. u mlijeku ograničeni kontaminacijom poslije pasterizacije.

Literatura

- 1 Kampelmacher, E.H. & van Noorle Jansen, L.M. Stuart's medium voor transport van material verdacht van aanwezigheid van *Listeria monocytogenes*. Tijdschr. Diergeneeskde. 93: 1297-1299 (1968).
- 2 Kampelmacher, E.H. & van Noorle Jansen, L.M. *Listeria monocytogenes* vit faeces van klinische gezonde mensen endieren. Ned. Tijdschr. Geneeskde. 113: 1533-1536 (1969).
- 3 Kampelmacher, E.H. & van Noorle Jansen, L.M. Further studies of the isolation of *Listeria monocytogenes* in clinically healthy individuals. Zentralbl. Bacteriol. Mikrobiol. Hyg. Abt. 1. Originale A, 221: 70-77 (1972).

- 4 Prentice, G.A. & Neaves, P. *Listeria monocytogenes* in food: its significance and methods for its detection. *Bull. Int. Dairy Fed.* 223 (1988).
- 5 Griffiths, M.W. *Listeria monocytogenes*: its importance in the dairy industry. *J. Sci. Food Agric.* 47: 133-158 (1989).
- 6 Seeliger, H.P.R. & Jones, D. In: P.H.A. Sneath, N.S. Maine, M.E. Sharpe & J.G. Holt (Editors), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1235-1245 (1986).
- 7 Juntilla, J.R., Niamelä, S.I. & Hirn, J. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic listeria. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 321-327 (1988).
- 8 Wilkins, P.O., Bourgeois, R. & Murray, G.E. Psychrotrophic properties of *Listeria monocytogenes*. *Can J. Microbiol.* 18: 543-551 (1972).
- 9 Walker, S.J., Archer, P. & Banks, J.G. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 157-162 (1990).
- 10 Feresu, S.B. & Jones, D. Taxonomic studies on *Brochothrix*, *Erysipelothrix*, *Listeria* and atypical lactobacilli. *J. Gen. Microbiol.* 134(5): 1165-1184 (1988).
- 11 Conner, D.E., Brackett, R.E. & Beuchat, L.R. Effect of temperature, sodium chloride and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (1): 59-63 (1986).
- 12 George, S.M., Lund, B.M. & Brocklehurst, T.F. The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 6: 153-156 (1988).
- 13 Farker, J.M. Physical and chemical effects damaging *Listeria*. *Acta Microbiol. Hung.* 36 (2-3): 245-247 (1989).
- 14 Shahamat, M., Seaman, A. & Woodbine, M. Influence of sodium chloride, pH and temperature on the inhibitory activity of sodium nitrite on *Listeria monocytogenes*. *Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser. No. 15*: 227-237 (1980).
- 15 Gray, M.L. & Killinger, A.H. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.* 30 (2): 309-382 (1966).
- 16 Gellin, G.G. & Broome, C.V. Listeriosis. *J. Am. Med. Assoc.* 261 (9): 1313-1320 (1989).
- 17 Slade, P.J., Collins-Thompson, D.L. & Fletcher, F. Incidence of *Listeria* species in Ontario raw milk. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 21 (4): 425-429 (1988).
- 18 Seeliger, H.P.R. New outlook on the epidemiology and epizootology of listeriosis. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 19: 273-286 (1972).
- 19 Gitter, M. Listeriosis in farm animals in Great Britain. In: C.H. Collins (Editor), *Isolation and Identification of Microorganisms of Medical and Veterinary Importance*. Society for Applied Bacteriology, pp. 191-200 (1985).
- 20 Seeliger, H.P.R., Winkhaus-Schindl, I., Andries, L. & Viebahn, A. Die Isolierung von *Listeria monocytogenes* aus Stuhl-Klarschlamm und Erdproblem Schweiz. *Schweizerische Zeitschrift für Pathologie und Mikrobiologie* 28: 590-601 (1965).
- 21 Donnelly, C.W. & Baigent, G.J. Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 689-695 (1986).
- 22 Lovett, J. & Hitchins, A.D. *Listeria* isolation. In: Second printing of Supplement to the US Food and Drug Administration's *Bacteriological Analytical Manual*, 6th edition, Chapter 29. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA (1989).

- 23 McBride, M.E. & Girard, K.F. Procedure for the selective isolation of *Listeria monocytogenes*. J. Lab. Clin. Med. St. Louis 55: 153-157 (1960).
- 24 Curtis, G.D.W., Mitchell, R.G., King, A.F. & Griffin, E.J. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 8: 95-98 (1989).
- 25 van Netten, P., van Gaal, B. & Mossel, D.A.A. Selection, differentiation and counting of haemolytic *Listeria* spp. on PALCAM medium. Lett. Appl. Microbiol. 12: 20-22 (1991).
- 26 International Dairy Federation. Detection of *Listeria monocytogenes*. IDF Provisional Standard 143 (1990).
- 27 Gitter, M., Bradley, R. Blampied, P.H. *Listeria monocytogenes* infection in bovine mastitis. Vet. Rec. 107: 390-393 (1980).
- 28 Husu, J. Epidemiological and experimental studies of *Listeria* infection. Academic Dissertation, College of Veterinary Medicine, Helsinki (1990).
- 29 Gray, M.L. Isolation of *Listeria monocytogenes* from oat silage. Science 132: 1767-1769 (1960).
- 30 Greenwood, M.H., Roberts, D. & Burden, P. The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: a national survey in England and Wales. Int. J. Food Microbiol. 12: 197-206 (1991).
- 31 Fenlon, D.R. & Wilson, J. The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk from farm bulk tanks in North-East Scotland. J. Appl. Bacteriol. 66: 191-196 (1989).
- 32 Liewen, M.B. & Plantz, M.W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Nebraska. J. Food Prot. 51 (11): 840-841 (1988).
- 33 Hayes, P.S., Feeley, J.C., Graves, L.M., Ajello, G.W. & Fleming, D.W. Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. Appl. Environ. Microbiol. 51 (2): 438-440 (1986).
- 34 Marth, E.H. *Listeria* in dairy foods. Chicago and south Western Wisconsin Dairy Technology Societies Meeting, Reported in Cheese Reporter 111 (15): 1 (1986).
- 35 Fedio, W.H. & Jackson, H. Incidence of *Listeria monocytogenes* in raw bulk milk in Alberta. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 23 (4/5): 236:238 (1990).
- 36 Nyfeldt, A. Etiologie de la mononucleose infectieuse. C.R. Soc. Biol. 101: 590-591 (1929).
- 37 Gilbert, R.J., Hall, S. M. & Taylor, A.J. Listeriosis update. PHLS Microbiol. Digest 6: 33-37 (1989).
- 38 Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, A.E.V., Wort, A.T., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S. & Broome, C.V. Epidemic listeriosis - evidence for transmission by food. N. Engl. J. Med. 308: 203-206 (1983).
- 39 Bille, J. & Glauser, M.P. Zur Listeriose Situation in der Schweiz. Bull. Bundesantes Gesundheitweisen 3: 28-29 (1988).
- 40 James, S.M., Fannin, S.L., Agree, B.A., Hall, B., Parker, E., Vogt, J., Run, G., Williams, J., Lieb, L., Salminen, C., Prendergast, T, Werner, S.B. & Chin, J. Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese - California. Morbidity Mortality Weekly Rep. 34: 359 (1985).
- 41 Bannister, B.A. *Listeria monocytogenes* meningitis associated with eating soft cheese. J. Infect. 15: 165-168 (1987).
- 42 Azadian, B.S., Finnerty, G.T. & Pearson, A.D. Cheese-borne listeria meningitis in immunocompetent patients. Lancet i: 322-323 (1989).

- 43 Flemming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S. Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V. & Reingold, A.L. Pasteurized milk as a vehicle for infection in an outbreak of listeriosis. *N. Engl. J. Med.* 312: 404-402 (1985).
- 44 Carvajal, A., Samuelsson, S., Rothgardt, N.P. & Frederiksen, W. The treatment of *Listeria monocytogenes* infections in the central nervous system. *Acta Microbiol. Hung.* 36 (2-3): 159-163 (1989).
- 45 Husu, J.R., Seppanen, J.T., Sivela, S.K. & Rautamaa, A.L. Contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* on dairy farms. *J. Vet. Med. B* 37: 268-275 (1990).
- 46 Lopes, J.A. Evaluation of dairy and food plant sanitizers against *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.* 69: 2791-2796 (1986).
- 47 El-Kest, S.E. & Marth, E.H. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by chlorine. *J. Food Prot.* 51: 520-524 (1988).
- 48 Brackett, R.E. Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 50: 999-1003 (1987).
- 49 Dominguez, L., Garayzabal, J.F.F., Ferri, E.R., Vazquez, J.A., Gomez-Lucia, E., Ambrosio, C. & Suarez, G. Viability of *Listeria monocytogenes* in milk treated with hydrogen peroxide. *J. Food Prot.* 50: 636-639 (1987).
- 50 Obiger, G. Studies of heat resistance of important pathogens during milk pasteurisation. *Arch. Lebensmittelhyg.* 27 (4): 137-144 (1976).
- 51 Bradshaw, J.G., Peeler, J.T., Corwin, J.J. Hunt, J.M., Tierney, J.T., Larkin, EP. & Twedt, R.M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. *J. Food Prot.* 48(9): 743-745 (1985).
- 52 Bearn, R.E. & Girard, K.F. The effect of pasteurisation on *Listeria monocytogenes*. *Can. J. Microbiol.* 4: 55-61 (1958).
- 53 Stajner, B. Determination of *Listeria* in milk of infected cows. Thesis Belgrade (1971).
- 54 Doyle, M.P., Glass, K.A., Beery, J.T., Garcia, G.A., Pollard, D.J. & Schultz, R.D. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurisation. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1433-1438 (1987).
- 55 Barza, M. Listeriosis in milk. *N. Engl. J. Med.* 312 (7): 438-440 (1985).