

Staphylococcus aureus u siru

Dubravka Samaržija, Sonja Damjanović, Tomislav Pogačić

Pregledni rad - Review

UDK: 637.354/579.861.2

Sažetak

Rast bakterije *Staphylococcus aureus* u siru tijekom proizvodnje i pohrane sira može uzrokovati stvaranje enterotoksina odgovornih za nastanak bolesti ljudi. Međutim, zbog specifičnih osobina te bakterije i složenosti sira kao medija za njihov rast, u praksi je često vrlo teško procijeniti stvarnu sposobnost preživljavanja tih patogenih bakterija u različitim vrstama sira. Osim toga, podatci iz literature o učestalosti kontaminacije i stupnju enterotoksičnosti sojeva *S. aureus* značajno se razlikuju. Radi objektivnije procjene potencijalnog mikrobiološkog rizika za čovjeka, zbog moguće prisutnosti bakterije *S. aureus* u siru, ovaj pregledni članak ukratko opisuje osnovne karakteristike bakterije *S. aureus* i njihov utjecaj na higijensku ispravnost sira. Također, u radu su prikazani vlastiti rezultati istraživanja prisutnosti *S. aureus* bakterija u tradicionalnim (autohtonim) tvrdim ovčjim sirevima proizvedenim od sirovog mlijeka.

Ključne riječi: *Staphylococcus aureus*, enterotoksini, sir, tradicionalni ovčji sirevi

Uvod

U odnosu na ostalu hranu sir je, radi prisutnosti *Staphylococcus aureus* bakterije i/ili stafilokoknih enterotoksina (SE), rijetko uzrokom bolesti ljudi (Fox i sur., 2000.; Cogan, 2003.b; Heggum, 2006.). Usprkos toj činjenici sposobnost rasta i preživljavanja bakterije *S. aureus* utvrđena je u mnogim vrstama sireva (Gomez-Lucia i sur., 1992.; Alterkruse i sur., 1998.; Vernozy-Rosand i sur., 1998.; De Buyser i sur., 2001.). Tim bakterijama sir se može kontaminirati mlijekom i/ili tijekom cijelog proizvodnog procesa (Walestra i sur., 1999.). Velik broj sojeva *S. aureus* ima sposobnost stvaranja ekstracelularnih termostabilnih enterotoksina, koji svoju biološku aktivnost zadržavaju i nakon toplinske obrade mlijeka i/ili sirnog gruša. (Fox i sur., 2000.). Međutim, direktna opasnost SE za zdravlje čovjeka je njihova rezistentnost na većinu proteolitičkih enzima probavnog sustava i nizak pH želuca (Gouloumes i sur., 1996.; Balaban i Rasooly,

2000.). Specifičnosti pojedinih sojeva *S. aureus* bakterija i složenost sira kao medija, razlogom su varijabilnih, a često puta i kontradiktornih rezultata koji se navode u literaturi (Le Loir i sur., 2003.). Osim toga, sustavi kontrole i izvori informacija o kontaminiranosti sira *S. aureus* bakterijama razlikuju se od zemlje do zemlje (cit. Rosec i sur., 1997.; De Byser i sur., 2001.). Iz tih razloga, za ljudsko zdravlje, vrlo je teško procijeniti i definirati stvarni mikrobiološki rizik od moguće prisutnosti bakterije *S. aureus* u siru.

Radi objektivnije procjene potencijalnog mikrobiološkog rizika za čovjeka ovaj pregledni članak ukratko opisuje: temeljne i nove spoznaje vezane na *S. aureus* i SE, mikrobiološke rizike, preventivne mjere u odnosu na kvalitetu sira - hlađenje, pasterizaciju, te važeću EU i nacionalnu legislativu. Također, u radu su prikazani vlastiti rezultati istraživanja prisutnosti *S. aureus* bakterija u tradicionalnim (autohtonim) tvrdim ovčjim sirevima proizvedenim od sirovog mlijeka.

Staphylococcus aureus

S. aureus je Gram-pozitivna, katalaza pozitivna, fakultativno anaerobna bakterija koja raste na temperaturi od 7 - 48 °C (optimum: 37 °C) i u uvjetima pH vrijednosti sredine između 4 - 10 (optimum: 6 - 7). U odnosu na sve druge bakterije, *S. aureus* podnosi najnižu količinu raspoložive vode (a_w minimum: 0,83 - 0,86) i vrlo visoke koncentracije soli (15 - 20 %). U siru *S. aureus* može biti humanog i animalnog podrijetla (Gilmour i Rowe, 1985.; Kloos i Schleifer, 1986.; Asperger i Zangerl, 2002.). Budući da je posljednjih desetak godina *S. aureus* najčešće izolirani uzročnik subkliničkog i kliničkog mastitisa muznih životinja (30 - 40 %), ta patogena bakterija u današnjim uvjetima proizvodnje mlijeka vrlo često kontaminira sirovo mlijeko (Abbar i sur., 1986.; Gilmour i Harvey, 1990.; Asperger, 1994.). Istovremeno, broj rezistentnih sojeva na primjenu antibiotika u liječenju mastitisa povećao se na približno 70 %. (Asperger i Zangerl, 2002.). Zbog toga mlijeko infektivnog vimena može sadržavati i do 10^8 bakterija/mL (cfu). U odnosu na ostale patogene bakterije koje mogu kontaminirati sir, za nastanak bolesti infektivni broj *S. aureus* bakterija relativno je velik ($\sim 10^5$ cfu/mL/g). Razlog tome je činjenica da uzročnik bolesti nije vegetativna stanica bakterije sama po sebi, već enterotoksin(i) koje stvara (Fox i sur., 2000.; Lindqvist i sur., 2002.). Naime, velik broj sojeva *S. aureus* sposoban je stvarati ekstracelularne termostabilne enterotoksine, koji svoju biološku aktivnost zadržavaju i nakon toplinske obrade mlijeka i/ili sirnog grušā (Walstra i sur., 1999.). U tom

smislu, sir je za čovjeka toksičan i kada vegetativna stanica bakterije više nije prisutna.

Stafilokokni enterotoksini (SE)

Svi stafilokokni enterotoksini (SE) su proteini relativno male molekularne mase od 26 900 do 29 600 Da. Do danas je identificirano i opisano 20 vrsta SE: SEA-SEE, SEG -SER, i SEU (cit. Jørgensen i sur., 2005.; cit. Hennekinne i sur., 2006.) Ovisno o pH vrijednosti sredine, vrsta SEC svrstava se u tri podvrste, SEC1, SEC2 i SEC3. Enterotoksini od SEI do SEU identificirani su na genetskoj razini, ali još nije u potpunosti potvrđena njihova ekspresija u siru (Cremonesi i sur., 2006.; Kérouanton i sur., 2007.) Uvjeti u kojima stanica stvara SE (a_w , temperatura, pH, prisustvo ili odsustvo kisika) razlikuju se od uvjeta rasta vegetativne stanice. Tako npr. vrste SEB i SEC stanica neće stvarati ukoliko je a_w manji od 0,93, iako *S. aureus* raste i u uvjetima a_w od 0,83. Mjerljivu količinu vrsta SEB i SEC stanica može stvoriti u aerobnim uvjetima kada je pH 5,1. Istovremeno, u anaerobnim uvjetima i pH sredini od $\leq 5,7$ stanica ne stvara mjerljivu količinu SE (Notermans i Heuvelman, 1983.). Neke vrste SE (npr. A i E) nastaju u vrijeme eksponencijalnog rasta stanice, dok druge vrste SE (npr. B i C) uglavnom nastaju u stacionarnoj fazi rasta stanice. Enterotoksični sojevi humanog podrijetla uglavnom stvaraju SE vrste A, C i D, dok enterotoksične sojeve animalnog podrijetla, u većini slučajeva, stvaraju vrste C i D (Hájek, 1978.; Smith i Bencivengo, 1985.). U odnosu na podrijetlo između 40 - 60 % enterotoksičnih sojeva *S. aureus* je humanog, a 5 - 30 % animalnog podrijetla. Sojevi izolirani iz toksičnih proizvoda u 75 % slučajeva pripadaju humanom serotipu SEA (Rosec i sur., 1997.; Normanno i sur., 2005.) Međutim, Kérouanton i sur. (2007.) u infektivnim sirevima po prvi su put uz humani (84 %) utvrdili i ovčji te domaćin nespecifični *S. aureus* biotip (16 %). Stafilokokni enterotoksini (SE) su soj specifični, a jedan soj istovremeno može stvarati jedan ili više enterotoksina (Bautista i sur., 1988.; Holečková i sur., 2002.; Le Loir i sur., 2003.; Cremonesi i sur., 2006.). Interesantno je istaknuti da *S. aureus* ne stvara uvijek SE, premda posjeduje gen za njihovo stvaranje.

Mikrobiološki rizici

Sir je, kao i drugi proizvodi koji sadrže veliku količinu proteina, dobar medij za rast bakterije *S. aureus*. Patogenom bakterijom *S. aureus* sir se može

kontaminirati mlijekom tijekom proizvodnog procesa i naknadnom kontaminacijom. Zbog svog sastava i svojstava sirovo mlijeko osigurava gotovo optimalne uvjete za rast bakterije *S. aureus*, tim više što je ta bakterija rezistentna na sve prirodne antimikrobne supstance mlijeka, laktoperoksidazni sustav, lizozim, laktoferin i dr. (Reiter, 1985.). U usporedbi s rastom u sirovom mlijeku *S. aureus* bolje raste u pasteriziranom mlijeku (Walker i Harmon, 1966.). Osim mlijeka, povećan mikrobiološki rizik za moguću prisutnost bakterije *S. aureus* u siru uvjetuje i neaktivna kultura. Zbog ostatka antibiotika u mlijeku, ili zbog kontaminacije kulture bakteriofagima, kultura gubi svoju aktivnost. Odnosno, stvaranje mliječne kiseline u mlijeku/grušu je usporeno i/ili potpuno zaustavljeno zbog čega izostaje inhibitorno djelovanja mliječne kiseline na rast bakterije *S. aureus* u siru (Fox, 2000.; Cogan, 2003.a)

Mikrobiološki rizik prisutnosti *S. aureus* i SE u siru predstavljaju i određeni tehnološki procesi koji se koriste u proizvodnji sira. Tako soljenje sirnog zrna, postupci koji se koriste u prvih sedam dana u proizvodnji većine polutvrdih i tvrdih sireva, te uvjeti zrenja karakteristični za sireve s rastom plijesni ili bakterija na površini sira, pogoduju rastu enterotoksičnih sojeva *S. aureus* (Sutherland, 2003.; Scott, 1998.b; Megrand i sur., 1999.; Muñoz i sur., 2006.) Nepromijenjena organoleptička svojstva sira, također predstavljaju moguću prisutnost *S. aureus* i SE, jer ta svojstva nisu u korelaciji s razinom kontaminiranosti sira tim bakterijama.

Međutim, najvećim mikrobiološkim rizikom smatraju se fizikalna i kemijska svojstva SE, prije svega termorezistentnost (100 °C / 30 min.) i rezistentnost na većinu proteolitičkih enzima probavnog trakta čovjeka i proteolitičkih enzima sira, te otpornost na nizak pH želuca čovjeka. Konzumacijom kontaminiranog sira, SE nepromijenjeni prolaze kroz želudac i crijeva, resorbiraju se u krvotok i uzrokuju bolest ljudi. Simptomi bolesti su mučnina, povraćanje, bolovi u želucu, dijareja. Zabilježeni su, ali rjeđe, glavobolja i snižavanje krvnog tlaka. Intoksikacija nastaje unutar 30 minuta do 8 sati nakon konzumacije sira, a bolest traje jedan dan. Temeljem epidemioloških studija, za čovjeka se navodi infektivna doza SE od <1 µg do 40 µg (Balaban i Rasooly, 2000.; Ikeda i sur., 2005.) Odnosno, tako velik raspon vrijednosti infektivne doze SE potrebne za nastanak bolesti može se objasniti činjenicom da korelacija između broja *S. aureus* i koncentracije SE u siru još uvijek nije potvrđena. Mnoga neodgovorena pitanja vezana za rast i preživljavanje *S. aureus* u siru uvjetuju i korištenje općeprihvaćenih preventivnih mjera koje se koriste u sprječavanju rasta većine patogenih

bakterija - hlađenje i pasterizacija mlijeka. Jedina specifična preventivna mjera u kontroli rasta bakterije *S. aureus* u siru je korištenje aktivne mikrobne kulture u odnosu na koju te bakterije pokazuju slabu kompetivnost (Mäyrä-Mäkinen i Bigret, 1998.; Rodríguez i sur., 2005.) Međutim, aktivna kultura ne djeluje na smanjenje koncentracije SE koja je nastala prethodnim rastom bakterije u mlijeku i/ili grušu. U mikrobiološki rizik ubrajaju se i različiti sustavi kontrole i izvori informacija u pojedinim europskim zemljama koji otežavaju objektivniju procjenu rizika (De Buyser i sur., 2001.). Također, za relevantno tumačenje pojave bolesti ljudi zbog prisutnosti *S. aureus* i/ili njegovih enterotoksina u siru, podatci su nepotpuni (Garbutt, 1997.). Naime, svi slučajevi bolesti nisu zabilježeni, a za zabilježene slučajeve vrlo često nije navedena vrsta mliječnog proizvoda.

***S. aureus* - rast u siru**

Istraživanja sposobnosti rasta i preživljavanja enterotoksičnih sojeva *S. aureus* provedena su za svježe, meke, polutvrde, tvrde, sireve s plemenitom plijesni u unutrašnjosti sira, pasta filata sireve, topljene i albuminske sireve. Sirevi su proizvedeni od sirovog i/ili pasteriziranog kravljeg, kozjeg ili ovčjeg mlijeka. Mlijeko je inokulirano bakterijama *S. aureus* u broju između 10^3 do 10^7 /mL, te je korištena aktivna i slabo aktivna kultura. Rezultati istraživanja objedinjeni su u Dokumentu EC (2003.) na osnovi kojih je procijenjena sposobnost rasta *S. aureus* u različitim vrstama sireva (tekst 1.1., 1.2., 1.3., 1.4., 1.5., 1.6.). Također, podatci o sposobnosti rasta bakterije u različitim vrstama sira dopunjeni su i rezultatima iz ostale dostupne literature.

1.1. Svježi sirevi

Neovisno je li u proizvodnji svježih sireva korišteno sirovo ili pasterizirano mlijeko, za te sireve nije utvrđen rast *S. aureus* niti nakon inokulacije mlijeka s 10^6 organizama/mL. Sposobnost rasta bakterije *S. aureus* u svježim sirevima inhibirana je brzim stvaranjem visoke koncentracije mliječne kiseline i posljedično tome niskom pH vrijednosti sira (<5). Zbog toga, visok postotak vlage (~55 %), a_w (0,95 - 0,97) i činjenica da ti sirevi ne zriju (održivost u uvjetima temperature hladnjaka je od 5 - 30 dana), ne utječu na sigurnost proizvoda. Jedino u slučaju neaktivne kulture i/ili niske koncentracije prirodne mikrobne populacije, pretpostavlja se, ti sirevi mogu sadržavati *S. aureus*.

1.2. Meki sirevi

U odnosu na sposobnost rasta i preživljavanja bakterije *S. aureus* u mekim sirevima treba razlikovati četiri različite podskupine tih sireva: meki sirevi za koje je karakteristična isključivo mliječna fermentacija, meki sirevi s plemenitom plijesni na površini sira, meki sirevi s mazom na površini sira te feta i ostali bijeli sirevi u salamuri (Scott, 1998.a). Kada mlijeko sadrži $\geq 10^3$ *S. aureus* bakterija/mL, od skupine mekih sireva jedino u sirevima s plijesni i mazom na površini sira, utvrđena je *S. aureus* i/ili SE (Meyrad i sur., 1998.). U odnosu na ostale meke sireve ti se sirevi razlikuju po većem postotku vlage (~50 %), a_w (0,97 - 0,98), pH (6,8 - 6,9) te tehnologiji proizvodnje (sporo stvaranje mliječne kiseline, niske temperature obrade gruša, temperature zrenja 12 - 16 °C) što ih čini gotovo idealnom sredinom za rast *S. aureus* bakterija (Johnson, 1998.). Prisutnost *S. aureus* i/ili enterotoksina u ostalim mekim sirevima može se utvrditi jedino ako se radi o tehnološkoj pogrešci (Vernozy-Rozand i sur., 1998.; Bintsis i Papademas, 2002.).

1.3. Sirevi s plemenitim plijesnima u unutrašnjosti sira

Usprkos činjenici da je pH vrijednost zrelih sireva s plemenitim plijesnima u unutrašnjosti sira 6,0 - 6,5, a tipični a_w 0,97 (Scott, 1998.a), izgleda da ti sirevi nisu ugodna sredina za rast i preživljavanje enterotoksičnih sojeva *S. aureus*. Istraživanja pokazuju da bakterija *S. aureus* nije preživjela u uvjetima sredine tih sireva, čak ni onda kada je u proizvodnji sira korištena slabo aktivna kultura i inokulum od 10^7 organizama/mL. Također, analizom nasumce uzetih 256 sireva iz trgovina u Francuskoj, utvrđeni broj *S. aureus* bakterija bio je manji od 100/g. za tu skupinu sireva (Boer de i Kuik, 1987.). Na preživljavanja *S. aureus* u tim sirevima značajan utjecaj može se pripisati kompetitivnom djelovanju *P. roqueforti*.

1.4. Polutvrđi i tvrdi sirevi

U odnosu na rast i preživljavanje bakterije *S. aureus* u polutvrđim i tvrdim sirevima značajno je da se njihov broj smanjuje tijekom zrenja. Najčešće nakon 30 dana zrenja sir više nije pozitivan na prisutnost *S. aureus*, neovisno o početnoj razini kontaminiranosti mlijeka i/ili sirnog gruša (Gomez- Lucia i sur., 1990.; Rodríguez i sur., 2005.). Međutim, zbog tehnoloških procesa ti su sirevi dobar medij za rast bakterije *S. aureus* u prvih sedam dana proizvodnje. Jednako tako, ako je broj bakterija bio visok, njezini enterotoksini mogu biti prisutni u siru na kraju zrenja u koncentraciji dovoljnoj za nastajanje bolesti ljudi (Gomez- Lucia i sur., 1990.; Cogan, 2003.b). Istovremeno, sposobnost rasta i preživljavanje enterotoksičnih sojeva *S.*

aureus nije utvrđeno u tim sirevima kada mlijeko i/ili sirni gruša sadrži do 10^3 bakterija/mL/g.

1.5. Pasta filata i topljeni sirevi

U tehnologiji proizvodnje pasta filata i topljenih sireva koriste se temperature obrade sirnog tijesta više od 80 °C koje potpuno inaktiviraju rast bakterije *S. aureus*. Iz tih razloga ti su sirevi, na prisutnost te bakterije, potpuno sigurni proizvodi.

1.6. Albuminski sirevi

Albuminski sirevi, u usporedbi s ostalim sirevima, zbog svog sastava i svojstava (pH > 6; aw 0,94 - 0,96) najbolji su medij za rast i preživljavanje bakterije *S. aureus*. Unutar 6 - 24 sata u tim sirevima broj bakterija *S. aureus* može biti veći od 10^6 /g i u slučajevima kada su bakterije u mlijeku prisutne u broju od 10^2 organizama/mL.

Hlađenje i pasterizacija mlijeka

Hlađenje i pasterizacija najčešće su općeprihvaćene preventivne mjere koje se koriste u kontroli rasta patogenih bakterija u mlijeku i mliječnim proizvodima (Walestra i sur., 1999.). Tako će uobičajene temperature hlađenja mlijeka ispod 10 °C zaustaviti rast te stvaranje enterotoksina enterotoksičnih sojeva *S. aureus* prisutnih u sirovom mlijeku. Također *S. aureus* neće preživjeti uobičajene temperature pasterizacije mlijeka koje se koriste u proizvodnji sira (63 - 65 °C/30 min.; 72 - 75 °C/15 - 30 s). Nažalost, neovisno o hlađenju i pasterizaciji mlijeka, kontaminacija sira tim bakterijama i prisutnost enterotoksina moguća je zbog ubikvitarnosti bakterije *S. aureus* i termostabilnosti njezinih enterotoksina (Otero i sur., 1993.; Le Loir i sur., 2003.). Iz tih razloga, općeprihvaćene preventivne mjere u kontroli rasta, *S. aureus* u siru nemaju veliko značenje. S druge strane, hlađenje mlijeka potiče rast psihrotrofne mikrobne populacije koja zbog svojih termostabilnih proteolitičkih i lipolitičkih enzima negativno utječe na kvalitetu sira (Suhren, 1989.; Rowe i sur., 1990.). Ti enzimi kataliziraju biokemijske reakcije koje povećavaju razinu slobodnih masnih kiselina koje su uzrokom stranog okusa sira. Osim toga, njihovim proteolitičkim djelovanjem dolazi do djelomične razgradnje β -kazeina s tendencijom napuštanja kazeinske micelle. Negativan utjecaj hlađenja mlijeka na kvalitetu sira još je naglašeniji za ovčje mlijeko budući da je udjel β -kazeina u odnosu na ukupni kazein gotovo 50 %. Zbog hlađenja izazvane promijenjene strukture kazeinskih micela mlijeka negativno

utječu na mikrostrukturu sira odgovornu za senzorna svojstva određene vrste sira (Tavaria i sur., 2006.). Pasterizacija, kao i hlađenje mlijeka, uz pozitivan ima i negativan utjecaj na kvalitetu sira, posebice na proces zrenja i senzorske karakteristike sira. Razlogom negativnog utjecaja na kvalitetu su ireverzibilne promjene određenih mikrobioloških, enzimatskih i fizikalnih karakteristika mlijeka važnih u proizvodnji i zrenju sira. Najznačajnije ireverzibilne promjene su aktivacija/inaktivacija prirodnih enzima i proenzima mlijeka i denaturacija sirutkinih proteina (Bachmann i sur., 1995.; Grapin i Beuvier, 1997.). Te fizikalne i kemijske promjene sastojaka mlijeka umanjuju prirodnu sposobnost mlijeka za sirenje. Potom uzročno-posljedično dolazi do modifikacija mikrobioloških i biokemijskih reakcija tijekom zrenja sira koje su odgovorne za senzorska svojstva sira.

Legislativa

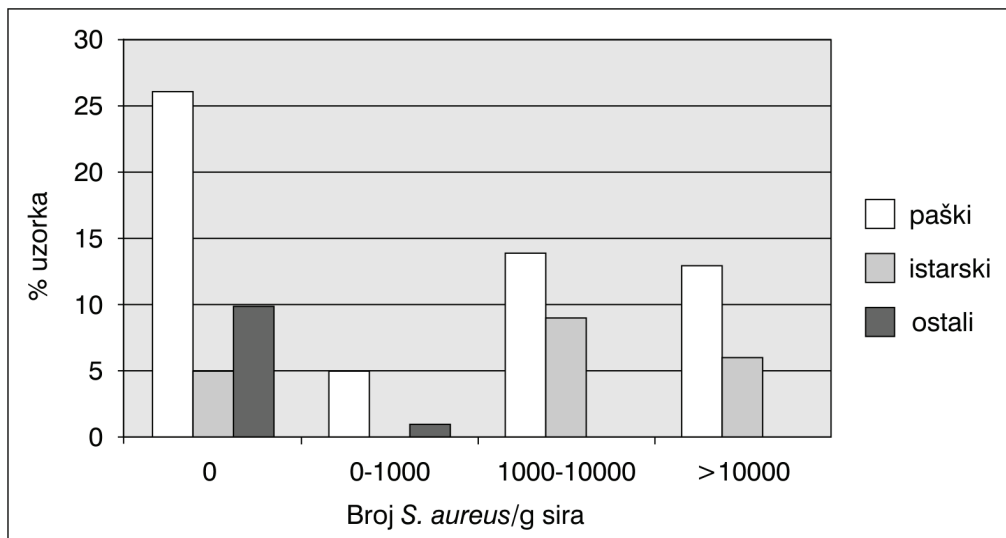
Dopuštena razina kontaminiranosti mlijeka i mliječnih proizvoda *S. aureus* bakterijama propisana je EU Uredbom Vijeća 92/46/EEC, te nacionalnim propisima sadržanim u Pravilniku o kakvoći svježeg sirovog mlijeka (NN46/94), Pravilniku o mikrobiološkim standardima za namirnice (NN102/00) i Zakonu o hrani (NN 117/03, 130/03,48/04). Svrha mikrobioloških kriterija općenito, pa tako i za prisutnost *S. aureus* u siru, je zaštita potrošača. Međutim, važećom legislativom propisan broj bakterija *S. aureus* u siru nije uvijek dobar indikator i jamstvo za potpuno siguran proizvod. Naime, odsustvo bakterije *S. aureus* ne mora značiti da sir ne sadrži SE. Suprotno, prisutnost tih bakterija u siru ne mora uvijek značiti da se radi o enterotoksičnim sojevima. Zbog toga je 2003. godine EU znanstveno vijeće za veterinarske postupke u javnom zdravstvu (Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health) predložilo na usvajanje nove mikrobiološke kriterije prisutnosti *S. aureus* bakterija u siru (EC Dokument, 2003.). Za mekane, polutvrde i tvrde sireve to znači da se važeći kriterij utvrđivanja samo prisutnog broja bakterije *S. aureus* smije koristiti unutar 72 sata od proizvodnje. Nakon 72 sata te skupine sireva treba analizirati na prisutnost SE. Alternativno, dopušta se preliminarno utvrđivanje enzima termonukleaze (TNase) u tim sirevima. Ako se utvrde pozitivni rezultati, analiza utvrđivanja SE u siru postaje obvezna. Utvrđivanje broja bakterije *S. aureus* u svježim i albuminskim sirevima dovoljno je za procjenu zdravstvene ispravnosti, te se taj kriterij ne mijenja.

S. aureus u tvrdim ovčjim sirevima - vlastiti rezultati

Posljednjih desetak godina u Hrvatskoj je porasla proizvodnja tradicionalnih (autohtonih) sireva zbog očuvanja tradicije vlastite proizvodnje, zaštite ruralnih područja i prepoznatljivosti tih sireva na svjetskom tržištu (Samaržija i sur., 2006.). Tradicionalni (autohtoni) sirevi u svim zemljama, pa tako i u Hrvatskoj, uglavnom se proizvode od sirovog mlijeka, te se okusom i teksturom značajno razlikuju od istih vrsta sireva proizvedenih od pasteriziranog mlijeka (Beuvier i sur., 1997.; Muir i sur., 1997.; Demarigny i sur., 1996., 1997.; Andrighetto i sur., 2002.; Samaržija i sur., 2004.). Međutim, često takvu proizvodnju prate lošiji higijenski uvjeti, pa ti sirevi predstavljaju veći mikrobiološki rizik za zdravlje ljudi, u odnosu na sireve proizvedene od pasteriziranog mlijeka (Ryser, 1998.; De Buyser i sur., 2001.).

Budući da u Hrvatskoj ima vrlo malo podataka o mikrobiološkoj kvaliteti naših tradicionalnih (autohtonih) sireva, svrha istraživanja bila je utvrditi prisutnost bakterije *S. aureus* u tvrdim ovčjim sirevima. Metodom izbora nasumce, u razdoblju od 2002. - 2006. godine, prikupljeno je i analizirano 89 sireva. Sirevi zrelosti 60 dana: paški (n=58), istarski (n=20), ostali (n=11) proizvedeni su na obiteljskim gospodarstvima od sirovog ovčjeg mlijeka. Zrelost sira od dva mjeseca izabrana je na osnovi činjenice da je nalaz bakterije *S. aureus* u polutvrdim i tvrdim sirevima najčešće negativan već nakon 30 dana zrenja (Fonteca i sur., 1990.; Johnson i sur., 1990.). Za tumačenje rezultata korištena je važeća EU Uredba vijeća 92/46/ EC. Prema Uredbi gornja dopuštena granica kontaminiranosti sira bakterijom *S. aureus* je 10 000/g budući se pretpostavlja da do te granice bakterija ne stvara toksične doze enterotoksina u siru (Garbutt, 1997.; Ryser, 1998.).

Od ukupno analiziranih sireva 54 % uzoraka bilo je pozitivno na prisutnost *S. aureus*. Međutim, kada se prema važećim propisima usporedi dopušteni broj tih bakterija u siru, jedino je 13 % paških i 7 % istarskih sireva (grafikon 1) sadržavalo više od 10 000 bakterija/g. Naime, broj *S. aureus* bakterija od 10 000/g je gornja dopuštena granica kontaminiranosti sira tim bakterijama jer se pretpostavlja da do te granice bakterijska stanica ne stvara toksične doze enterotoksina u siru. (Garbutt, 1997.; Ryser, 1998.).



Grafikon 1: Utvrđeni broj bakterije *S. aureus* u tradicionalnim (autohtonim) tvrdim ovčjim sirevima proizvedenim od sirovog mlijeka u razdoblju od 2002. - 2006. godine

Figure 1: The estimated number of *S. aureus* bacteria in autochthonous hard sheep cheese made from raw milk in period 2002 - 2006

Na osnovi tih i rezultata prethodnih istraživanja o potencijalnoj prisutnosti patogenih bakterija *S. aureus*, *L. monocytogenes* i *E. coli* O157:H7 u tvrdim ovčjim sirevima, može se zaključiti da ti sirevi nisu pogodan medij za rast patogenih bakterija (Samaržija i sur., 2003.). Od ukupno 38 analiziranih *S. aureus* utvrđen je samo u jednom siru u broju od 720 bakterija/g, dok je u ostalim sirevima njihov broj bio manji od 100/g. U tom smislu može se tvrditi da ta vrsta sireva sama po sebi ne predstavlja veću opasnost za ljudsko zdravlje u odnosu na istu vrstu sireva proizvedenih od pasteriziranog mlijeka.

Prisutnost bakterije *S. aureus* u nekim od analiziranih sireva može se objasniti relativno kratkim vremenom zrenja (potrebno vrijeme zrenja do pune zrelosti te skupine sireva je između 4 - 5 mjeseci). Za skupinu paških i istarskih sireva, u kojima je utvrđeni broj bakterija *S. aureus* bio > 10 000/g, korištenje mastičnog mlijeka u proizvodnji sira čini se glavnim, ako ne i jedinim, uzrokom prisutnosti bakterije. Vautor i sur. (2003.) također su u svojim istraživanjima potvrdili da je kontaminacija ovčjih sireva proizvedenih od sirovog mlijeka bakterijom *S. aureus* uzrokovana ponajprije infekcijom

vimena. Stoga je manje vjerojatno da su loši higijenski uvjeti proizvodnje uzrokom te kontaminacije i u našim istraživanim sirevima.

Zaključak

U svijetu se od sirovog mlijeka proizvodi 700 000 tona sira/godišnje (Grappin i Beuvier, 1997.). Posebice je takva proizvodnja značajna za sirarstvo Švicarske, Francuske i Italije te u proizvodnji zaštićenih sireva (PDO/PGI-Protected Denomination of Origin/Protected Geographical Indication). Međutim, radi zaštite zdravlja potrošača europska i nacionalna legislativa svake zemlje propisuje striktno mikrobiološke standarde koji vrijede za sve sireve na tržištu, neovisno o tome je li sir proizveden od sirovog ili pasteriziranog mlijeka. Razlog primjene striktnih mikrobioloških standarda je činjenica da su sirevi, kao i drugi proizvodi koji sadrže veliku količinu proteina, povoljan medij za rast većine patogenih bakterija. Osim toga, ni jedna tehnologija proizvodnje sira ne može garantirati potpuno siguran proizvod. (Fox i sur., 2000.). Međutim, prisutnost i preživljavanje *S. aureus* i svih ostalih patogenih bakterija u siru uvjetovano je nizom činitelja: početnom broju bakterija, prisutnosti drugih bakterijskih vrsta, fiziološkom statusu patogenih sojeva, koncentraciji mliječne kiseline (pH), biokemijskim promjenama tijekom zrenja, te vrstom i sastavom sira (Buchmann, 1995.). Dodatno, problem u procjeni stvarnog mikrobiološkog rizika uvjetovan je činjenicom da se egzaktano ne može utvrditi sposobnost preživljavanja tih bakterija u siru. Naime, u studijama rasta patogenih bakterija u siru općenito, mlijeko se gotovo uvijek inokulira patogenim bakterijama kojima je potom dopušten optimalan rast. Sposobnost rasta patogenih sojeva *S. aureus* u siru neće zato biti ista kao u optimalnim uvjetima koji se koriste u eksperimentalnim uvjetima laboratorija. Na temelju tako provedenih studija, hipotezu o sposobnosti preživljavanja određene patogene vrste u siru nije uvijek moguće potvrditi. Hipotezu je teško potvrditi i zbog činjenice što je prirodna kontaminacija mlijeka tim bakterijama znatno niža u odnosu na eksperimentalnu mikrobnu populaciju (Fox i sur. 2000.; Fox, 2003.). Istovremeno, prirodno kontaminirano mlijeko sadrži i drugu mikrobnu populaciju koja patogenim bakterijama može onemogućivati optimalan rast. Zbog tih činjenica i činjenice da je svaki sir poseban ekosustav, u higijenskoj proizvodnji sira, čini se, korištenje sirovog mlijeka nužno ne povećava mikrobiološki rizik kontaminacije sira bakterijom *S. aureus* u usporedbi s korištenjem pasteriziranog mlijeka. Odnosno, od momenta zgrušavanja mlijeka, svakim sljedećim tehnološkim postupkom u izradi sira mikrobna

populacija dinamički se, zbog promjena količine raspoložive vode (a_w) i biokemijskih reakcija, neprekidno mijenja (Cogan, 2003.a). Stoga je potencijalna opasnost od kontaminacije sira bakterijom *S. aureus* podjednaka za sireve proizvedene od sirovog ili pasteriziranog mlijeka. Zbog toga na preživljavanje *S. aureus* u siru značajnija je prisutnost drugih mikrobnih vrsta i fiziološki status same patogene bakterije. Ujedno ta je činjenica i glavnim razlogom relativno malog broja raspoloživih podataka o stvarnom rastu i sposobnosti preživljavanja patogenih bakterija u pojedinim vrstama sira (Lindqvist i sur., 2002.). Također prema podacima projekta koji je od 1993. - 1998. godine provela Svjetska zdravstvena organizacija (World Health Organisation, WHO) u slučajevima otrovanja ljudi mlijekom i mliječnim proizvodima bakterija *S. aureus* izolirana je tek u 2,3 % slučajeva (Anonymous, 2001.; Heggum, 2006.). Stoga za objektivniju procjenu stvarnog mikrobiološkog rizika, zbog moguće prisutnosti *S. aureus*/SE u siru, isključivo značenje ima vjerodostojnost metoda i/ili mikrobioloških testova koji potvrđuju ispravnost sira od proizvodnje do potrošača. Sirovo mlijeko može biti izvorom bakterije *S. aureus*, ali ono nije njezin prirodni izvor. Istovremeno, u proizvodnji sira pasterizacija mlijeka sama po sebi nije garancija sigurnosti proizvoda. U velikim sustavima proizvodnje (zbog zdravstvenih i higijenskih razloga) pasterizacija mlijeka, bez svake je sumnje potpuno opravdana. Potrebno je istaknuti da je za kvalitetu sira i njegovu higijensku ispravnost presudni činitelj proizvodnja sira od mlijeka zdravih životinja. Vlastiti rezultati istraživanja također su potvrdili da bakterija *S. aureus* bakterije nije utvrđena u tradicionalnim tvrdim ovčjim sirevima kada se u proizvodnji sireva koristilo mlijeko zdravih ovaca (Samaržija i sur., 2003.).

U proizvodnji za odsustvo bakterije *S. aureus* i/ili SE u siru, najznačajnijim činiteljem se pokazao djelotvoran program kontrole mastitisa muznih životinja, neovisno koristi li se sirovo ili pasterizirano mlijeko

STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN CHEESE

Summary

Growth of Staphylococcus aureus in cheese during production and storage can lead to production of enterotoxins responsible for human diseases. Due to specificity of those bacteria and complexity of cheese as a grown media, sometimes in the field it is very difficult to estimate an initial risk

assessment of the *S. aureus* surveying in different cheese varieties. Moreover, the literature data on frequency and proportion of enterotoxigenic strains that cause cheese contamination are significantly different. The purpose of the present review is to objectively assess the risk of the potential occurrences of *S. aureus* in cheese and significance with respect to safety. The basic characteristics of *Staphylococcus aureus*, their presence in cheese and its potential risk for health are briefly reviewed. The own results of study relating to the presence of *S. aureus* in traditional (autochthonous) hard sheep cheese made from raw milk are also discussed in this review.

Key words: *Staphylococcus aureus*, enterotoxins, cheese, traditional sheep cheese.

Literatura

- ABBAR, F. M., MOHAMMED, M. T., ARSLAIN, S. H. (1986): Selected biological properties of enterotoxigenic staphylococci isolated from milk. *Journal of Food Protection*, 49, 871-873.
- ALTEKRUSE, S. F., TIMBO, B. B., MOWBRAY, J. C., BEAN, N. H., POTTER, M. E. (1998): Cheese - associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protects consumers. *Journal of Food Protection*, 16, 1405-1407.
- ANDRIGHETTO, C., BORNEY, F., BARMAZ, A., STEFANON, B., LOMBARDI, A. (2002): Genetic diversity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian traditional cheeses. *International Dairy Journal, Special Issue*, 12, 141-144.
- ANONYMOUS (2001): U Schmidt, K., Tirado, C. (Eds), WHO Surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe 1993-1998. 7th report, FAO/WHO Collaboration Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses.
- ASPERGER, H. (1994): *Staphylococcus aureus*. In The significance of microorganisms on raw milk IDF, Bulletin 9405 (S.I.), Brisel, 24-42.
- ASPERGER, H., ZANGERL, P. (2002): *Staphylococcus aureus* *Encyclopedia od Dairy Science*, Vol. 4, Roginski, H., Fuquay W. J., Fox, F. P., 2563-2569.
- BACHMANN, H. P., SPAHR, U. (1995): The Fate of Potentially Pathogenic Bacteria in Swiss Hard and Semihard Cheeses Made from Raw Milk. *Journal of Dairy Science*, 78, 476-483.
- BALABAN, N., RASOOLY, A. (2000): Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 1-10.
- BAUTISTA, L., GAYA, P., MEDINA, M., NUÑEZ, M. (1988): A Quantitative Study of Enterotoxin Production by Sheep Milk Staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 566-569.

- BEUVIER, E., BERTHAUD, K., CEGARRA, S., DASEN, A., POCHET, S., BUCHIN, S., DUBOZ, G. (1997): Ripening and Quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurised or microfiltered milk. *International Dairy Journal*, 7, 311-323.
- BINTSIS, T., PAPADEMAS, P. (2002): Microbiological quality of white-brined cheeses: a review. *International Journal of Dairy Technology*, 55, 113-120.
- BOER, DE E., KUIK, D., (1987): A survey of the microbiological quality of blue veined cheese. *The Netherland Milk Dairy Journal*, 41, 227-237.
- COGAN, T. M. (2003a): Microbiology of Cheese. *Encyclopedia od Dairy Science*, Vol. 3, Roginski, H., Fuquay, W. J., Fox, F. P., 306-314.
- COGAN, T. M. (2003b): Public Health Aspects. *Encyclopedia od Dairy Science*, Vol. 3, Roginski, H., Fuquay, W. J., Fox, F. P., 314-320.
- CREMONESI, P., VIMERCATI, C., PISONI, G., CASTIGLIONI, B., LUZZANA, M., RUFFO, G., MORONI, P. (2006): Identification of Enterotoxin Genes in *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine and Caprine Milk. *Veterinary research Communications*, 30, (Suppl. 1) 241-243.
- DE BUYSER, M. L., DUFOUR, B., MAIRE, M., LAFARGE, V. (2001): Implication of milk products in foodborne disease in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 1-17.
- DEMARIGNY, Y., BEUVIER, DASEN, A., DUBOZ, G. (1996): Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. I. Evolution of microflora during ripening and characterization of facultatively heterofermentative lactobacilli. *Lait*, 76, 371-387.
- DEMARIGNY, Y., BEUVIER, E., BUCHIN, S., POCHET, S., GRAPPIN, R. (1997): Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses: II. Biochemical and sensory characteristics. *Lait*, 77, 157-167.
- EC (European Commission) Dokument (2003): Staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses, C2- management of scientific committees; scientific co-operation and networks, Brisel, prihvaćeno 26-27.03.2003.
- EU Uredba vijeća 92/46/ EC (1992): Council Directive 92/46 EEC laying down the health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat-treated milk and milk-based products. *Off. J. Eur. Commun. (L 268)*, 1-32.
- FONTECHA, J., PELÁEZ, C., JUÁREZ, M., REEQUENA, T., GÓMEZ, C., RAMOS, M. (1990): Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. *Journal of Dairy Science*, 73, 1150-1157.
- FOX, P. F., GUINEE, T. P., COGAN, T. M., MCSWEENEY, P. L. H. (2000): Pathogens and Food-Poisoning Bacteria in Cheese. U knjizi *Fundamentals of Cheese Science*, An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 484-501.
- FOX, P. F. (2003): Cheese /overview. *Encyclopedia od Dairy Science*, Vol. 3, Roginski, H., Fuquay, W. J., Fox, F. P., 261-253.

- GARBUTT, J. (1997): Factor affecting the growth of microorganisms. 54-86, *Essentials of Food Microbiology*, Garbutt, J., Arnold, London.
- GARBUTT, J. (1997): Food - borne disease and food poisoning. U knjizi *Essentials of Food Microbiology*, Garbutt, J., Arnold, London, 135-181.
- GILMOUR, A. HARVEY, J. (1990): Staphylococci in milk and milk products. *Journal of Applied Bacteriology*, Symp. Suppl., 19, 147S-66S.
- GILMOUR, A., ROWE, M. T. (1985): Micro-Organisms Associated with milk. U knjizi *Dairy Microbiology*, The microbiology of Milk Vol. 1. Edited by Robinson, R. K. Elsevier Applied Science Publishers, London, New York, 35-75.
- GOULOUMES, C., BES, M., RENAND, F., LINA, B., REVERDY, M. E., BRUN, Y., FLEURETTE, J. (1996): Phenotypic and genotypic (pulsed-field gel electrophoresis) characteristics enterotoxin A-producing *S.aureus* strains, *Research in Microbiology*, 147, 263-271.
- GOMEZ-LUCIA, E., GOYACHE, J., ORDEN, A. J., DOMENECH, A., JAVIER HERNANDEZ, F., RUIZ-SANTA QUITERIA, J. A., LOPEZ, B., BLANCO, J. L., SUAREZ, G. (1990): Growth of *Staphylococcus aureus* and Synthesis of Enterotoxin During Ripening of Experimental Manchego-Type Cheese, *Journal of Dairy Science*, 75, 19-26.
- GRAPPIN, R., BEUVIER, E. (1997): Possible implications of milk pasteurisation on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7, 751-761.
- HÁJEK, V. (1978): Identification of Enterotoxigenic Staphylococci from Sheep and sheep cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 35, 264-268.
- HEGGUM, C. (2006) Case study: *Staphylococcus aureus* in Cheese. Book of Abstracts (Hygiene and Food Safety) IDF 27 th International Congress and World Dairy Summit, Šangaj, Kina 20-23. listopada 2006.
- HENNEKINNE, J.-A., GUILLIER, F., PERELLE, S., DE BUYSER, M.-L., DRAGACCI, S., KRYS, S., LOMBARD, B. (2006): Interlaboratory validation according to the EN ISO 16 140 Standards of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. *Journal of Applied Microbiology*, 1-11.
- HOLEČKOVÁ, L., TESFAYE, A., MIKULA, I. (2002): Detection of the Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxin by PCR. *Acta Veterinaria Brno*, 72, 627-630.
- IKEADA, T., TAMATE, N., YAMAGUUCHY, K., MAKINO, S. (2005): Mass outbreaks of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H., *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2793-2795.
- JOHNSON, M. E. (1998): Cheese Products. U knjizi *Applied Dairy Microbiology*, Edited by Marth, E. H., Steele, J. L., Marcel Dekker, Inc., New York, 213-249.
- JØRGENSEN, H. J. MØRK, T., RØVIK L. M. (2005): The occurrence of *Staphylococcus aureus* on Farm with Small-Scale Production of Raw Milk Cheese. *Journal of Dairy Science*, 88, 3810-3817.

KÉROUANTON, A, HENNEKINNE, J. A., LETERTE, C., PETIT, L., CHESNEAU, O., BRISABOIS, A., DE BUYSER, M. L. (2007): Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*, doi: 10.1016/j.jfoodmicro.2006.10.050.

KLOOS, W. E., SCHLEIFER, K. H. (1986): Genus IV. *Staphylococcus*. U *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Edited by Sneath, Vol. 2., Williams and Wilkins, Baltimore, 1013-1035.

LE LOIR, Y., BARON, F., GAUTIER, M. (2003): *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2 (1), 63-76.

LINDQVIST, R., SYLVEN, S., VAGSHOLM, I. (2002): Quantitative microbial risk assesment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 155-170.

MÄYRÄ-MÄKINEN, A., BIGRET, B. (1998): Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria. U knjizi *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects*, Edited by Salminen, S., von Wright, A., Marcel Dekker, INC., New York, 73-102.

MEGRAND, A., ATRACHE, V., BAVAI, C., MONTET, M. P., VERNIZY-ROZAND, C. (1999): An automated method for the detection of staphylococcal heat stable deoxyribonuclease in dairy products. *Letters in Applied Microbiology* 29, 216-222.

MEYRAD, A. BOUTRAND-LOEI, S., REY-GUENIOT, S., MAZUY, C., GASPARD, C. E., JAUBERT, G., PERRIN, G., LAPEYRE, C., VERNIZY-ROZAND, C. (1998): Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert type cheeses from raw goats milk. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 537-544.

MUIR, D. D., BANKS, J. M., HUNTER, E. A. (1997): A Comparison of the Flavour and texture of Cheddar cheese of Factory of farmhouse Origin. *International Dairy Journal*, 7, 479-485.

MUÑOZ, A., ANANOUS, S., GÁLVEZ, A., MARTÍNEZ- BUENO, RODRÍGUEZ., A., MAQUADA, M., VALDIVIA, E. (2006): Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. *International Dairy Journal*, doi:10.1016/j.idairyj. 200609.006.

NORMANNO, G., FIRINU, A., VIRGILIO, S., MULA, G., DAMBROSIO, A., POGGIU, A., DECASTELLI, L., MIONI, R. (2005): Coagulase-positve staphylococci i *Staphylococcus aureus* in food products market in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 73-79.

NOTERMANS, S., HEUVELMAN, C. J. (1983): Combined effect of water activity, pH and sub-optimal temerature of growth and enterotoxin production. *Journal of Food Science*, 48, 1832-1840.

OTERO, A., GARCÍA, M. C., GARCÍA, M. L., SANTOS, J. A., MORENO, B. (1993): Behaviour of *Staphylococcus aureus* strains FRI 137 and FRI 361 during the manufacture and ripening of manchego cheese. *International Dairy Journal*, 3, 85-96.

PRAVILNIK O KAKVOĆI SVJEŽEG SIROVOG MLJEKA. NN46/94.

PRAVILNIK O MIKROBIOLOŠKIM STANDARDIMA ZA NAMIRNICE. NN.102/00.

REITER, B. (1985): The biological significance of the non-immunoglobulin protective protein in milk: lysozyme, lactoferrin, lactoperoxidase. U knjizi *Developments in Dairy Chemistry-3*, Edited by Fox, P.F., Elsevier Applied Science Publishers, London, 281-336.

RODRÍGUEZ, E., CALZADA, J., ARGUÉS, J. L., RODRÍGUEZ, J. M., NUÑEZ, M., MEDINA, M. (2005): Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal*, 15, 51-57.

ROSEC, J. P., GUIRAUD, J. P., DALET, C., RICHARD, N. (1997): Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *International Journal of Food Microbiology*, 35, 213-221.

ROWE, M. T., JOHANSTON, D. E., KILPATRICK, D. J., DUNSTALL, G., MURPHY, R. J. (1990): Growth and Extracellular Enzymes Production by Psychrotrophic Bacteria in Raw Milk Stored at Low Temperature. *Milchwissenschaft*, 45, 459-499.

RYSER, E. T. (1998): Public Health Concerns., u knjizi *Applied Dairy Microbiology*, edited by Marth, E. H., Steele, J. L., Marcel Dekker, Inc., New York, 263-404.

SAMARŽIJA, D., ANTUNAC, N., PECINA, M., HAVRANEK, J. (2003): Quality of the artisanal hard cheeses produced in Mediteean area of Croatia. *Milchwissenschaft*, 58, (1/2), 43-46.

SAMARŽIJA, D., ANTUNAC, N., HAVRANEK, J., PECINA, M., MIOČ, B., PAVIĆ, V., BARAČ, Z. (2004.): Autohtoni (tradicionalni) paški sir. Studija 1-48. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

SAMARŽIJA, D., ANTUNAC, N., HAVRANEK, J., PECINA, M. (2006.): Zaštita izvornosti sira. *Mljekarstvo*, 56 (1), 35-44.

SCOTT, R. (1998a): Cheese varieties u knjizi *Cheesemaking Practice* Scott, R., (third edition), Robinson, R. K., Wilbey, R. A., Kluwer Academic/plenium Publishers, New York 19-28.

SCOTT, R. (1998b): Selected cheese recipes. u knjizi *Cheesemaking Practice*, Scott, R., (third edition), Robinson, R. K., Wilbey, R. A., Kluwer Academic/plenium Publishers, New York, 327-437.

SMITH, J. L., BENCIVENGO, M. M. (1985): A review of methods for detection of staphylococcal enterotoxins and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay applied to foods. *Journal of food Safety*, 7, 83-100.

SUHREN, G. (1989): Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food. U knjizi *Producer Microorganisms*. Edited by McKellar, R.C CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida.

SUTHERLAND, B J. (2003): Salting of Cheese. *Encyclopedia od Dairy Science*, Vol. 3, Roginski, H., Fuquay W. J., Fox, F. P., 293-300.

VAUTOR, E., ABADIE, G., GUIBERT, J.-M., HUARD, C., PEPIN, M. (2003): Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis, *Veterinary Microbiology*, 96, 69-79.

TAVARIA, F. K., REIS, P. J. M., MALACATA, F. X. (2006): Effect of dairy farm and milk refrigeration on microbiological and microstructural characteristics of matured Serra de Estrela cheese. *International Dairy Journal*, 16, 895-902.

VERNOZY-ROZAND, C., MEYRAND, A., MAZUY, C., DELIGNETTE-MULLER, M-L., JAUBERT, G., PERRINS, G. (1998): behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goats' milk lactis cheeses. *Journal of Dairy Research*, 65, 273-281.

WALKER, G. C., HARMON, L. G. (1966): Thermal Resistance of *Staphylococcus aureus* in Milk Whey and Phosphate Buffer. *Applied Microbiology*, 14, 584-590.

WALESTRA, P., GEURTS, T. J., NOOMEN, A., JELLEMA, A., VAN BOEKEL, M. A. J. S. (1999): Microbiology of Milk. U knjizi *Dairy Technology*, Principles of Milk Properties and Processes, Marcel Dekker, Inc, New York, 149-170.

ZAKON O HRANI. NN 117/03, 130/03,48/04.

Adrese autora -Author's addresses:

Prof. dr. sc. Dubravka Samaržija
Sonja Damjanović, dipl. ing.
Tomislav Pogačić, dipl. ing.

Zavod za mljekarstvo
Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Svetošimunska 25, Zagreb

Prispjelo - Received: 10.02.2007.

Prihvaćeno - Accepted: 26.03.2007.