

Listeria monocytogenes i drugi kontaminanti u svježem siru i vrhnju domaće proizvodnje s područja grada Zagreba

Ksenija Markov*, Jadranka Frece, Domagoj Čvek, Frane Delaš

Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica,
Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Pierottijeva 6, Zagreb

Prispjelo - Received: 02.04.2009.
Prihvaćeno - Accepted: 09.07.2009.

Sažetak

Svrha ovog rada bila je odrediti udovoljavaju li svježi sir i vrhnje koji se proizvode na tradicionalan način u kućanstvu i slobodno prodaju na zagrebačkim tržnicama mikrobiološkim standardima za namirnice (NN 46/94, 20/01, 40/01). Posebna pažnja posvećena je istraživanju prisutnosti bakterije *Listeria monocytogenes* u navedenim namirnicama, zbog njezine izrazite opasnosti po ljudsko zdravlje. Od ukupno 120 istraživanih uzoraka mliječnih proizvoda, većina - 64 (53 %) bila je kontaminirana patogenim mikroorganizmima, od čega 16 % otpada na svježi sir a 37 % na uzorke vrhnja. Čak 39 uzoraka sira i 50 uzoraka vrhnja nije udovoljilo uvjetima propisanim pravilnikom, primarno zbog kontaminacije kvascima i plijesnim. Od 10 uzoraka sira i vrhnja u kojima je dokazana *L. monocytogenes* klasičnim mikrobiološkim metodama, PCR-metodom u samo jednom uzorku potvrđena je *L. monocytogenes*, i to uzorku vrhnja.

Ključne riječi: *Listeria monocytogenes*, patogeni mikroorganizmi, PCR-metoda, svježi sir, vrhnje od sirovog mlijeka

Uvod

Mikrobiološka kakvoća domaćeg svježeg sira i vrhnja predstavlja značajan javnozdravstveni problem jer je riječ o rizičnoj skupini namirnica koje mogu biti izvor različitih uzročnika bolesti. Svježi domaći sir vjerojatno je najstarija i najpoznatija vrsta sira u kućanstvu. Tu vrstu sira karakterizira visok sadržaj vode, niski udjel mliječne masti i pojačana kiselost, kao i karakterističan okus, miris, boja i konzistencija.

Istraživani originalni, autohtoni svježi sir proizvodi se u kućanstvu od spontano ukiseljenog - zgrušanog mlijeka s kojeg se odvaja površinski sloj vrhnja, a gruš ocjeđuje u rahlu sirnu masu koja je odmah u svježem stanju prikladna za jelo. Bitno je istaknuti da se u proizvodnji može koristiti samo sirovo mlijeko potpuno zdravih krava, te da mora zadovoljiti zahtjeve propisane za fizikalno-kemijsku i mikrobiološku kakvoću (Tratnik, 1998.).

U nasumice odabranim uzorcima svježeg sira i vrhnja s područja grada Zagreba posebice je istraži-

vana moguća prisutnost bakterije *Listeria monocytogenes*, uzročnika mnogih infekcija u ljudi i životinja.

Zanimanje svjetske javnosti za tu bakteriju ne prestaje još od epidemije u Južnoj Kaliforniji 1985. godine, izazvane konzumacijom svježeg sira pripremljenog od neprikladno pasteriziranog mlijeka.

Listeria monocytogenes u približno je 1 % slučajeva uzročnik bolesti zbog trovanja hranom, pa je listerioza kao bolest koja se prenosi hranom podcijenjena u odnosu na salmoneloze i kampilobakterioze. Međutim, važno je istaknuti da se listerioza svrstava u bolesti s najčešćim smrtnim ishodom koji se procjenjuje na oko 30 % (Salamina, 1996.; Vazquez-Boland i sur., 2001.).

U istraživanjima provedenima na području Hrvatske, *L. monocytogenes* izolirana je u 4,27 % uzoraka kolača (Uhitil i sur., 2004.), 13,39 % uzoraka domaćih nepasteriziranih mliječnih proizvoda (Kožačinski i Hadžiosmanović, 2001.) i u 3,03 % uzoraka svježega i smrznutoga mesa peradi (Kožačinski i sur., 2006.).

*Dopisni autor/Corresponding author: Tel./Phone: +385 1 4605 045; E-mail: kmarko@pbf.hr

Najmanja infektivna doza *L. monocytogenes* za ljude je nepoznata jer ovisi o imunitetu domaćina i koncentraciji patogena u konzumiranoj namirnici. Podaci sakupljeni nakon nekoliko većih epidemija listerioze upućuju na vrijednosti od 10^7 do 10^{11} CFU po gramu namirnice (Dalton i sur., 1997.), ali je razvoj bolesti moguć i nakon unosa nižih infektivnih doza (Ooi i Lorber, 2005.).

U Pravilniku o mikrobiološkim standardima za namirnice (NN 46/94), koji je dopunjen Pravilnikom o izmjenama i dopunama Pravilnika o mikrobiološkim standardima za namirnice (NN 20/01), propisani su vrlo strogi standardi za ovu bakteriju - 0/25 g uzorka. Zbog ovako strogog standarda, metode za izolaciju *L. monocytogenes* uključuju stupanj revitalizacije i namnožavanja kako bi se oporavile eventualno prisutne subletalne oštećene bakterijske stanice i također kako bi se detektirale male količine bakterija (Twedt i Hitchins, 1994.).

Enterobakterije ili crijevne bakterije normalna su mikroflora probavnog sustava u ljudi i životinja. Patogenost enterobakterija uzrokovana je endotoksinima, egzotoksinima i mogućnošću da nadvlada obranu domaćina i da se razmnožava u krvi i tkivima (Panday i sur., 2000.). Prisutnost enterobakterija u namirnicama indikator je slabe higijene tijekom pripreme i čuvanja namirnica. Enterobakterije su izolirane iz 9,6 % uzoraka kolača i slastičarskih sladoleda (Musladin, 2007.) i najčešći su uzrok zdravstvene neispravnosti namirnica.

Escherichia coli kao najpoznatija bakterija ima široku primjenu u biološkim istraživanjima i smatra se dominantnom vrstom bakterija u probavnom sustavu. Prisutnost ove bakterije u vodi i hrani pouzdan je indikator fekalnog onečišćenja. Najpatogeniji soj *E. coli* u svijetu je *E. coli* O157:H7 koja je uzročnik hemolitičkoga uremičkog sindroma. Ova je bakterija u hrani posljedica kontaminacije sirovina kao što su meso, mlijeko, voće i povrće (Bolton i sur., 2000.). U istraživanjima nekih autora *E. coli* je u povećanom broju dokazana u uzorcima kiselog vrhnja (Jakšić, 1991.), a izolirana je iz gotovih jela kao i iz svježeg sira u 2,3 % uzoraka (Musladin, 2007.).

Staphylococcus aureus smatra se najopasnijim ljudskim patogenom, a ima sposobnost stvaranja enterotoksina. Zbog brze pojave simptoma i njihove jačine i težine, ovaj tip otrovanja podrijetlom iz hrane postao je vrlo značajan problem i za proizvo-

đače namirnica ali i za epidemiološke službe. Izvor *Staphylococcus aureus* u hrani je čovjek kliconoša, koji kapljičnim putem ili kontaminiranim rukama bakteriju prenosi dalje (Harvey i Gilmour, 2000.). U mlijeku i mliječnim proizvodima *S. aureus* prisutan je najčešće zbog toga što je ta bakterija u više od 90 % slučajeva uzročnik kliničkog i supkliničkog mastitisa muznih životinja. Vautor i sur. (2003.) u svojim su istraživanjima potvrdili kontaminaciju sireva proizvedenih od sirovog mlijeka bakterijom *S. aureus* zbog infekcije vimena. U istraživanjima Samaržije i sur. (2007.) 54 % uzoraka sireva bilo je pozitivno na prisutnost *S. aureus*, što autori objašnjavaju korištenjem mastitičnog mlijeka kao glavnim uzrokom prisutnosti te bakterije.

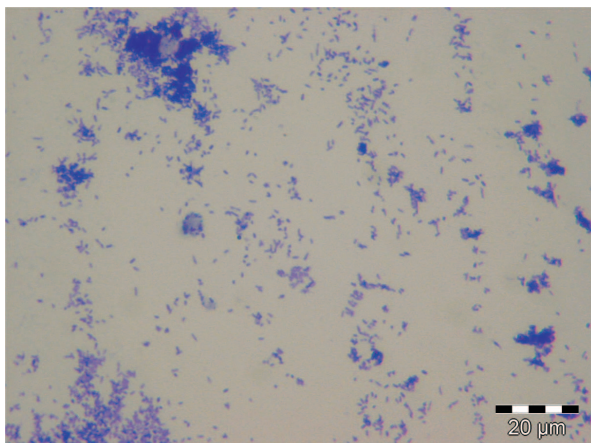
Salmonella sp. u ljudi uzrokuje tri tipa bolesti - enteralne groznice, septikemije i gastroenteritise. Gotovo svi predstavnici roda *Salmonella* potencijalni su patogeni, a njihovo prirodno stanište je probavni sustav životinja, naročito peradi i goveda. Oko 95 % salmonela prenosi se hranom, a izvor infekcija mogu biti voda, mlijeko i mliječni proizvodi, jaja, rakovi, školjke, mesni proizvodi, kliconoše. Meso i mlijeko mogu se kontaminirati tijekom klanja, prerade i rukovanja, stoga postoji opasnost od nedovoljno pečenog mesa, nepasteriziranog mlijeka, sladoleda i sira (Cox, 2000.).

U svezi s navedenim, cilj ovog rada bio je istražiti mikrobiološku ispravnost uzoraka svježeg sira i vrhnja s područja grada Zagreba i istražiti potencijalnu prisutnost bakterije *L. monocytogenes*, uzročnika mnogih infekcija u ljudi i životinja, te je dodatno potvrditi pomoću PCR metode.

Materijal i metode

Mikrobiološka kontrola svježeg sira i vrhnja provedena je u 120 uzoraka nasumice izabrana od privatnih proizvođača uzetih u 2008. godini s područja grada Zagreba. Sir i vrhnje nisu bili u originalnom pakiranju, a bili su izloženi na nezaštićenim policama bez hlađenja. Uzorci su uzorkovani sterilnim žlicama za uzorkovanje u sterilne posudice i analizirani prema Pravilniku o mikrobiološkim standardima za odabranu skupinu proizvoda.

Mikrobiološka ispravnost svježeg sira i vrhnja određena je prema Pravilniku o mikrobiološkim standardima za namirnice; čl.15. (NN 20/01) za meki (svježi) sir i čl.7. (NN 40/01) za vrhnje od siro-



Slika 1: Izolat bakterije *L. monocytogenes* iz vrhnja. Povećanje, 10x100 (Mjerna crta 20 μm)
Figure 1: Bacterial cells of *L. monocytogenes* isolates from cream. Magnification, 10x100 (Bars represent 20 μm)



Slika 2: Kolonije *L. monocytogenes* izolirane iz vrhnja od sirovog mlijeka, porasle na Palcam agaru
Figure 2: *L. monocytogenes* colonies on Palcam agar, isolated from raw milk cream

vog mlijeka. Prema navedenom pravilniku, propisani su ovi standardi:

- *Enterobacteriaceae* (E) i *Escherichia coli* (Ec), *Staphylococcus aureus* (Sa) u 1 g (mL) uzorka, te *Salmonella* sp. (S) i *Listeria monocytogenes* (Lm) u 25 g (mL) uzorka, kvasci i plijesni (KiP/g)

a) za meki (svježi) sir od sirovog mlijeka:

Sa 5×10^2 ; *Ec* 5×10^2 ; KiP 10^3 /g; *Lm* 0/25g

b) vrhnje od sirovog mlijeka: *Sa* $< 10^3$; *Ec* $< 10^3$; KiP 10^3 /g; *Lm* 0/25g

Priprema uzorka: 10 g uzorka i 90 mL sterilne fiziološke otopine (homogenizacija) \rightarrow temeljno razrjeđenje (10^{-1}). Iz temeljnog razrjeđenja načinit će se sva potrebna razrjeđenja.

Za izolaciju *S. aureus* uzorak određenog razrjeđenja (10^{-2}) nacijepi se na Baird-Parker agar i inkubira pri 37 °C/24-48 sati (HRN ISO 6888-1). Kao potvrdni test korišteno je bojanje prema Gramu.

Enterobacteriaceae su izolirane na VRBG (violet red bile agar) selektivnom agaru u skladu s ISO normama - HRN ISO 21528-2, bojenje prema Gramu.

Za izolaciju *Escherichia coli* uzorak (10^{-2}) se izravno nacijepi na selektivni agar Rapid' *E. coli* i stavi na inkubaciju pri 37 °C/24-48 sati i pri 44 °C/24-48 sati (HRN ISO 16140). Kao potvrdni testovi, za sumnjive kolonije porasle na Rapid agaru u ovom radu uključuju - bojenje prema Gramu, Kliglerov željezni agar, test na indol, Voges-Proskauerov

test, test na citrat, ureaza test.

Izolacija *Salmonella* sp. uključuje prednamnožavanje u puferiranoj peptonskoj vodi, zatim medij za selektivno namnožavanje Rappaport-Vassiliadis bujon (37 °C/24 h), a potom precjepljivanje na XLD (xylose-lysine-deoxycholate) agar (37 °C/24 h). Izolacija salmonela izvedena je prema ISO normi HRN ISO 6579/A1.

Za izolaciju *L. monocytogenes* upotrijebljen je UVM bujon za revitalizaciju i namnožavanje listerija, UVM bujon. Sljedeći stupanj selektivnog namnožavanja uključuje upotrebu drugoga selektivnog bujona - Fraser bujona. Rast prateće mikroflore inhibiran je dodatkom litijeva-klorida, nalidiksične kiseline i akri flavina. Svako zacrnjenje Fraserova bujona upozorava na moguću prisutnost listerije, te se precjepljuje na selektivnu podlogu, PALCAM agar. Porast listerija na ovom agaru očituje se kao porast sitnih maslinastozelenih kolonija sa crnim halo efektom, od kojih se svaka kolonija dodatno identificira. Identifikacija *L. monocytogenes* uključuje sljedeće potvrđne testove - bojenje prema Gramu (gram-pozitivan štapić koji često poprima oblik slova Y ili V, sl. 1) katalaza test (pozitivna), CAMP test (pozitivna sa *S. aureus*, negativna sa *R. equi*); iskorištavanje ugljikohidrata (iskorištava ramnozu, ksilozu ne) i test pokretljivosti (pokretna) (HRN ISO 11290-1).

Za identifikaciju i razlikovanje *L. monocytogenes* od ostalih bakterija koje mogu porasti na PALCAM agaru upotrijebljena je PCR-metoda (Polimeraze

Chain Reaction-Lančana Reakcija Polimerazom), gdje su korištene specifične početnice za prepoznavanje i umnožavanje listeriolysin gena (*hly* gena, 73 bp), opisanog kao faktor virulencije i specifičan za *L. monocytogenes* (Pozaić, 2008.).

Lančana reakcija polimeraze (PCR uvjeti)

Kolonije porasle na PALCAM agaru (sl. 2) koje su testovima za identifikaciju identificirane kao *L. monocytogenes*, dodatno su potvrđene pomoću PCR metode (sl. 3), gdje su korištene specifične početnice za *hly* gen.

Reakcijska smjesa volumena 50 μL bila je sljedećeg sastava: 4,0 ng/ μL kromosomske DNA (kromosomska DNA izolirana je prema Frece (2008.)), 50 pmol početnica (5'-CAT GGC ACC ACC AGC ATC T-3') i (5'-ATC CGC GTG TTT CTT TTC GA-3'), (Pozaić, 2008.), 10x pufer (5,0 μL), deok-

siribonukleozid-trifosfati (4x0,2 μM), Taq polimeraza (jedna jedinica). Reakcija je provedena u DNA-termobloku, Mastercycler personal, "Eppendorf". Prije dodavanja deoksiribonukleotida i Taq polimeraze reakcijska smjesa denaturirana je 5 minuta pri 94 °C, a reakcija je ponovljena 35 puta. Dvolančana DNA denaturirala se 30 sekundi pri 95 °C, a sinteza komplementarnih lanaca dvije minute pri 72 °C. Komplementarno sparivanje početnica s kalupom trajalo je 1 minutu pri 55 °C.

Nakon reakcije, 10 μL reakcijske smjese nanoseno je na 1 %-tni agarozni gel i elektroforeza je provedena u kadici pri naponu od 55 V tijekom 2 h. Nakon provedene elektroforeze gel je 30 min inkubiran u otopini etidijeva-bromida, a zatim osvijetljen ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru i fotografiran kroz crveni filtar.

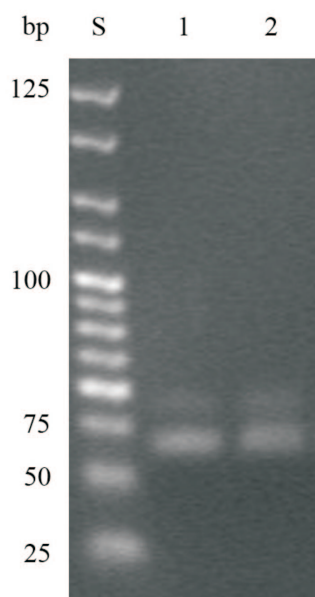
Rezultati i rasprava

Rezultati mikrobiološke analize istraživanih uzoraka mekoga svježeg sira i vrhnja od sirovog mlijeka prikazani su u tablicama 1 i 2.

Prema Pravilniku o mikrobiološkim standardima za namirnice (NN br. 46/94; 20/01; 40/01), kriterije mikrobiološke ispravnosti nije zadovoljilo 64 (53 %) od ukupno 120 analiziranih uzoraka, i to 16 % uzoraka svježeg mekog sira i 37 % uzoraka vrhnja od sirovog mlijeka. Iz rezultata je očito, od 60 analiziranih uzoraka sira 16,66 % bilo je kontaminirano bakterijom *S. aureus*, 16,66 % bakterijom *E. coli*, a 4 uzorka bila su pozitivna na rod *Listeria*.

Od 60 uzoraka vrhnja domaće proizvodnje, čak 40 (66,66 %) uzoraka bilo je kontaminirano enterobakterijama, iz 25 (41,66 %) uzoraka bila je izolirana bakterija *S. aureus*, a *Listeria* vrste bile su dokazane u 6 uzorka. *Salmonella* sp. nije bila dokazana ni u jednom istraživanom uzorku, ni sira ni vrhnja. Uzrok mikrobiološke neispravnosti istraživanih uzoraka prvenstveno je bio povećan broj enterobakterija (1×10^3 - 4×10^5 CFU/g) i *E. coli* ($> 5 \times 10^2$ - 2×10^3 CFU/g), kao indikatora loše higijene i propusta tijekom proizvodnje/čuvanja sira i vrhnja i bakterije *S. aureus* (10^3 - $2,4 \times 10^5$ CFU/g). Naime, nije svejedno sadržava li uzorak 10^2 ili 10^6 CFU/g.

Naime, količina *S. aureus* od 10^2 CFU/g predstavlja uzorak koji nije zadovoljio mikrobiološke standarde. Međutim, količina od 10^6 CFU/g već je potencijalno opasan uzorak, jer se pri tolikoj konta-



Slika 3: PCR produkti dobiveni sa specifičnim početnicama za gen *hly* *L. monocytogenes* (stupac S - standard 125 bp; stupac 1 - *L. monocytogenes* ATCC 2356; stupac 2 - izolat iz vrhnja od sirovog mlijeka)

Figure 3: PCR patterns obtained with specific primers for *hly* gene of *L. monocytogenes* (Lane S - 125 bp DNA ladder; Lane 1 - standard strain *L. monocytogenes* ATCC 2356; Lane 2 - isolate from raw milk cream)

Tablica 1: Mikrobiološka kakvoća svježeg sira
Table 1: Microbiological quality of fresh cheese

Mikroorganizmi Microorganisms	Neispravni uzorci Negative samples		Raspon vrijednosti Value CFU/g
	n/60	%	
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	16,66	5,2x10 ² -2,3x10 ³
<i>Escherichia coli</i>	10	16,66	5,4x10 ² -1,2x10 ⁵
<i>Listeria monocytogenes</i>	4	6,66	-
Kvasci i plijesni/Yeasts and moulds	39	65	1,3x10 ⁴ -8x10 ⁵

Tablica 2: Mikrobiološka kakvoća vrhnja od sirovog mlijeka
Table 2: Microbiological quality of raw milk cream

Mikroorganizmi Microorganisms	Neispravni uzorci Negative samples		Raspon vrijednosti Value CFU/g
	n/60	%	
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	41,66	1x10 ³ -8x10 ⁴
<i>Enterobacteriaceae</i>	40	66,66	1x10 ³ -4x10 ⁵
<i>Listeria monocytogenes</i>	6	10	-
Kvasci i plijesni/Yeasts and moulds	50	83,33	1x10 ⁴ -8x10 ⁶

minaciji mogu dokazati enterotoksini. Kako se kod domaće proizvodnje mekoga svježeg sira uvijek koristi sirovo mlijeko koje nije termički obrađeno, to je *S. aureus* u istraživanim uzorcima najvjerojatnije prisutan zbog upotrebe mastitičnog mlijeka ili infekcije vimena.

Rezultati naših istraživanja podudaraju se s istraživanjima mnogih autora koji navode da se mikrobiološka neispravnost mliječnih proizvoda odnosila na prisutnost enterobakterija, *E. coli* i *S. aureus* (Kožačinski i sur. 2003.; Prpić, 2003.; Kirin 2004.). U istraživanjima Kirina (2004.) broj neispravnih uzoraka autohtonog sira "kvargli", osnova za pripremu je svježi domaći sir od sirovog mlijeka, bio je 57,14 % za enterobakterije i 42,86 % za *E. coli*, dok *S. aureus* nije dokazana ni u jednom uzorku. Čak 45 % uzoraka krčkog sira, koji se proizvodi od sirovog, toplinski neobrađenog mlijeka, nije udovoljilo Pravilnikom propisane standarde zbog povećanog broja bakterija *S. aureus* i *E. coli* (Prpić, 2003.). U istraživanjima Kožačinski i sur. (2003.) 26,77 % mekih (svježih) sireva i 31,51 % kiselog vrhnja nije zadovoljilo krite-

rije mikrobiološke ispravnosti zbog povećanog broja enterobakterija, *E. coli*, *S. aureus*, kvasaca i plijesni, što autori objašnjavaju lošom higijenskom kakvoćom svježeg sirovog mlijeka. I u našim istraživanjima, pravilnikom propisane standarde nije zadovoljilo čak 65 % uzoraka svježeg sira i 83 % uzorka vrhnja, primarno zbog kontaminacije kvascima i plijesnima u rasponu vrijednosti od 10³-5x10⁶ CFU/g.

Od ukupno 120 analiziranih uzoraka svježeg sira i vrhnja, 26 (21,66 %) uzoraka bilo je istovremeno kontaminirano *S. aureus* i *E. coli*/enterobakterijama, a 4 (3,33%) uzorka *S. aureus*, *E. coli*/enterobakterijama i *L. monocytogenes*.

Od 60 uzoraka sira i 60 uzoraka vrhnja, 4 uzorka sira i 6 uzoraka vrhnja bilo je prividno pozitivno na rod *Listeria* na Palcam agaru (sl. 2) i CAMP-testu. Međutim, PCR metodom dokazana je

L. monocytogenes (sl. 3) samo u 1,66 % uzorka vrhnja, dok u prividno pozitivnim uzorcima sira *L. monocytogenes* nije dokazana. U istraživanjima Gouwsa i Liedemanna (2005.) PCR-metodom,

u različitim prehrambenim proizvodima (sir, sirovo meso, riblji proizvodi) dokazana je *L. monocytogenes* u samo 37 % uzoraka, dok su klasičnim metodama na Oxford i RAPID'L mono agaru čak 74 % uzorka bila vjerojatno pozitivna na rod *Listeria*.

Kako nije poznata infekcijska doza za ovu bakteriju, već i mali broj živih stanica predstavlja opasnost za ljude, posebno za rizičnu populaciju (djeca, starije osobe, bolesnici, trudnice). Ova bakterija raširena je posvuda u okolišu i njezin je glavni izvor u gotovoj hrani vanjska kontaminacija. Stoga u svrhu prevencije posebnu pažnju treba posvetiti održavanju higijene, opreme, pribora i prostorija u kojima se hrana proizvodi. Prema francuskom istraživanju kolača, *L. monocytogenes* izolirana je u 13,7 % uzoraka i utvrđeno je da prisutnost tog patogena ovisi o sastojcima na bazi vrhnja, što može potkrijepiti i objasniti i činjenica da rezultati provedenih istraživanja pokazuju da je u uzorcima vrhnja izolirana *L. monocytogenes* (Ferron i Michard, 1993.).

Da bi se očuvala mikrobiološka ispravnost svježeg sira i vrhnja, svježe, sirovo mlijeko treba sakupljati i čuvati u dobrim higijenskim uvjetima, čuvati ga u hladioniku ili podvrgnuti određenom postupku pasterezacije. Sirovo mlijeko mora se koristiti za tradicijski svježi sir i vrhnje, ali jedino u kontroliranim uvjetima i prema EU i hrvatskim kriterijima kojima mora udovoljavati kvaliteta sirovog mlijeka koja se koristiti za proizvodnju mliječnih proizvoda bez toplinske obrade mlijeka.

Zaključci

Kako uzorci svježeg sira i vrhnja domaće proizvodnje nisu bili u originalnom pakiranju a bili su izloženi na nezaštićenim policama bez hlađenja, ne zadovoljavaju mikrobiološke standarde propisane Pravilnikom o mikrobiološkim standardima za namirnice, i to u 53 % uzoraka od ukupno 120 analiziranih uzoraka.

Uzorci su mikrobiološki neispravni najviše zbog povećanog broja kvasaca i plijesni (65 % za sir i 83 % za vrhnje), bakterija *Staphylococcus aureus* (10 od 60 ili 16,66 %) i *E. coli* (10 od 60 ili 16,66 %) u siru, te *Staphylococcus aureus* (25 od 60 ili 41,66 %) i *Enterobacteriaceae* (40 od 60 ili 66,66 %) u vrhnju.

Od 10 uzoraka sira i vrhnja u kojima je klasičnim mikrobiološkim metodama dokazana *L. monocytogenes*, PCR-metodom u samo jednom uzorku

potvrđena je *L. monocytogenes*, i to uzorku vrhnja.

Da bi se u analizi prehrambenih proizvoda izbjegle prividno pozitivne reakcije na selektivnim podlogama, potrebno je u analize uvrstiti brze, nove molekularno-genetičke metode poput PCR-a, koje se moraju provoditi paralelno s klasičnim metodama jer još nisu zakonski priznate i propisane.

Listeria monocytogenes and other contaminants in fresh cheese and cream from Zagreb city area domestic production

Summary

The purpose of this research was to determine whether the cream cheese and cream that are produced in the traditional manner at home and are free to sale on Zagreb markets, meet microbiological requirements for foodstuffs (OG 46/94, 20/01, 40/01). Particular attention is given to research of bacteria *Listeria monocytogenes* presence in these foods, because of its exceptional hazards to human health. It was found that a majority of 64 (53 %) from a total of 120 studied dairy products samples were contaminated with microbial pathogens, of which 16 % are waste in the cream cheese, and 37 % in cream samples. 39 samples of cheese and 50 samples of cream did not fulfil the conditions prescribed by the Croatian Guidelines, primarily due to the contamination with yeasts and moulds. In 10 cheese and cream samples where *L. monocytogenes* is proven by classical microbiological methods, PCR method confirmed *L. monocytogenes* in only one cream sample.

Key words: *Listeria monocytogenes*, pathogens microorganisms, PCR method, cream of raw milk

Literatura

1. Bolton, F.J., Crozier, L., Wiliamson, J.K. (2000): Isolation of *Escherichia coli* O157 from raw meat products. *Let. Appl. Microbiol.* 23, 317-321.
2. Cox, J. (2000): *Salmonella*. U: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D. (ured.), Accademic Press, str. 1928-1937.
3. Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J. (1997): An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.* 336, 100-105.

4. Ferron, P., Michard, J. (1993): Distribution of *Listeria* spp. In confectioners pastries from western France: comparison of enrichment methods. *Int. J. Food Microbiol.* 18, 289-303.
5. Frece, J. (2007): Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3, Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
6. Gouws P.A., Liedemann I. (2005): Evaluation of Diagnostic PCR for the Detection of *L. monocytogenes* in Food Products. *Food Technol. Biotechnol.* 43 (2), 201-205.
7. Harvey, J., Gilmour, A. (2000): *Staphylococcus aureus*. U: *Encyclopedia of Food Microbiology*.
8. Jakšić, R. (1991): Higijenska ispravnost i ocjena kakvoće fermentiranih mliječnih proizvoda mljekare "Dukat", Zagreb. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
9. Kirin, S. (2004): Kvargli. *Mljekarstvo* 54 (4), 315-325.
10. Kozračinski, L., Cvrtila, Ž., Hadžiosmanović, M., Majnarić, D., Kukuruzović, B. (2003): Mikrobiološka ispravnost mlijeka i mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo* 53 (1), 17-22.
11. Kozračinski, L., Hadžiosmanović, M. (2001): The occurrence of *Listeria monocytogenes* in home-made dairy products. *Tierarzt Umsch.* 56, 590-594.
12. Kozračinski, L., Hadžiosmanović, M., Zdolec, N. (2006): Microbial quality of poultry meat on the Croatian market. *Vet. arhiv* 76, 305-313.
13. Ljevaković-Musladin, I. (2007): Prisutnost patogenih mikroorganizama u namirnicama u Dubrovačko-neretvanskoj županiji u razdoblju od 2002.-2006. godine. *HČJZ* 3 (10), 13-17.
14. Ooi, S.T., Lorber, B. (2005): Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clin. Infect. Dis.* 40, 1327-1332.
15. Panday, A., Joshi, V.K., Nigam, P., Soccol, C.R. (2000): *Enterobacteriaceae*, coliforms and *E. coli*. U: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D. (ured.), Accademic Press, str. 604-610.
16. Pozaić, S., (2008): Identification of different strains of *Listeria* spp. in foods and environment using conventional methods and PCR method, Magistarski završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
17. Pravilnik o dopuni i izmjenama Pravilnika o mikrobiološkim standardima za namirnice, Narodne novine (2001.), br. 20.
18. Pravilnik o dopuni i izmjenama Pravilnika o mikrobiološkim standardima za namirnice, Narodne novine (2001.), br. 40.
19. Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o mikrobiološkim standardima za namirnice, Narodne novine (2003.), br. 125.
20. Pravilnik o mikrobiološkim standardima za namirnice, Narodne novine (1994.), br.46.
21. Prpić, Z., Kalit, S., Lukač Havranek, J., Štimac, M., Jerković, S. (2003.): Krčki sir. *Mljekarstvo* 53 (3), 175-194.
22. Salamina, G. (1996): A foodborne gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiol. Infect.* 117, 429-436.
23. Samaržija, D., Damjanović, S., Pogačić, T. (2007): *Staphylococcus aureus* u siru. *Mljekarstvo* 57 (1), 31-48.
24. Tratnik, L.J. (1998): *Mlijeko-tehnologija, biokemija i mikrobiologija*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 193-201.
25. Twedt, R.M., Hitchins, A.D. (1994): Determination of the Presence of *L. monocytogenes* in Milk and Dairy Products: IDF Collaborative Study. *J. AOAC Int.* 77 (2), 395-402.
26. Uhitil, S., Jakšić, S., Petrak, T., Medić, H., Gumhalter-Karolyi, L. (2004): Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. in cakes in Croatia. *Food Control* 15, 213-216.
27. 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.
28. Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P. (2001): *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 584-640.