Pojavnost bakterije Listeria monocytogenes u sirovom mlijeku i siru

Petričko Pučar, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:571474

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

POJAVNOST BAKTERIJE *LISTERIA MONOCYTOGENES* U SIROVOM MLIJEKU I SIRU

DIPLOMSKI RAD

Petra Petričko Pučar

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Proizvodnja i prerada mlijeka

POJAVNOST BAKTERIJE *LISTERIA MONOCYTOGENES* U SIROVOM MLIJEKU I SIRU

DIPLOMSKI RAD

Petra Petričko Pučar

Mentor: prof. dr. sc. Dubravka Samaržija

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Petra Petričko Pučar**, JMBAG 005819744, rođena dana 20.08.1990. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

POJAVNOST BAKTERIJE *LISTERIA MONOCYTOGENES* U SIROVOM MLIJEKU I SIRU

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Petra Petričko Pučar**, JMBAG 005819744, naslova

POJAVNOST BAKTERIJE *LISTERIA MONOCYTOGENES* U SIROVOM MLIJEKU I SIRU

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	prof. dr. sc. Dubravka Samaržija	mentor	_____
2.	doc. dr. sc. Iva Dolenčić Špehar	član	_____
3.	prof. dr. sc. Sanja Sikora	član	_____

Zahvala

Ovime zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Dubravka Samaržija, na vodstvu, susretljivosti i dostupnosti kada god mi je to bilo potrebno tijekom studija, na velikoj pomoći tijekom odabira teme diplomskog rada i pri izradi rada, te korisnim sugestijama što je ovaj diplomski rad učinilo kvalitetnijim. Također zahvaljujem doc. dr. sc. Iva Dolenčić Špehar na utrošenom vremenu i pomoći pri izradi ovog rada koja je svojim korisnim savjetima neizmjerno doprinijela kvaliteti ovoga rada.

Ovime zahvaljujem svome ocu Zdenku i svojoj majci Štefici, i bratu Ivanu na bezuvjetnoj ljubavi i podršci koju su mi pružali sve ove godine i bez kojih moje studiranje ne bi bilo moguće! Hvala i mom suprugu na strpljenju i potpori. Hvala Vam od srca! Ovaj rad je posvećujem Vama!

Sadržaj

1. Uvod **1**

2. Pregled literature **2**

2.1. *Listeria monocytogenes* 2

2.2. Karakteristike bakterije *L. monocytogenes* 2

2.3. Metode određivanja bakterije *L. monocytogenes* 5

2.3.1. Klasične mikrobiološke metode 5

2.3.2. Molekularne metode 6

2.4. Bolest uzrokovana bakterijom *L.monocytogenes* - listerioza 7

2.5. Listerioza u muznih životinja 9

3. Mlijeko kao medij za pojavnost patogenih bakterija **11**

3.1. Pojavnost bakterije *L. monocytogenes* u sirovom mlijeku 15

4. Sir kao medij za pojavnost patogenih bakterija 18

4.1. Pojavnost *L. monocytogenes* u sirevima **21**

4.2. Preventivne mjere u cilju sprječavanja pojavnosti bakterije *L. monocytogenes* u mlijeku i siru 23

4.2.1. Sanitacija 24

5. Zaključak **26**

6. Literatura **27**

Elektronički izvori **31**

Životopis **32**

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Petra Petričko Pučar** naslova

POJAVNOST BAKTERIJE *LISTERIA MONOCYTOGENES* U SIROVOM MLIJEKU I SIRU

Mikrobiološka kvaliteta mlijeka i mliječnih proizvoda je vrlo važna budući da mlijeko i mliječni proizvodi pripadaju rizičnoj skupini namirnica koji mogu biti izvori različitih uzročnika bolesti. Prisutnost patogene bakterije *Listeria monocytogenes* u mlijeku i mliječnim proizvodima predstavlja velik javnozdravstveni problem. *L. monocytogenes* kao uzročnik listerioze javlja se puno rjeđe u odnosu na druge bolesti prenosive putem hrane, poput salmoneloze i kampilobakterioze, no ima izuzetno visoku stopu smrtnosti do 40%. Iako su u proizvodnji mlijeka i mliječnih proizvoda postavljeni vrlo visoki higijenski standardi u zadnjih nekoliko godina pojavnost *L. monocytogenes* je u porastu.

Ključne riječi: patogene bakterije, *Listeria monocytogenes*, listerioza

Summary

Of the master's thesis - student **Petra Petričko Pučar,** entitled

OCCURRENCE OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN RAW MILK AND CHEESE

The microbiological quality of milk and dairy products is very important since milk and dairy products belong to a risky group of foods that can be sources of various pathogens. The presence of the pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products is a major public health problem. *L. monocytogenes* as a causative agent of listeriosis occurs much less frequently in relation to other food-borne diseases, such as salmonella and campylobacteriosis, but has an extremely high mortality rate of up to 40%. Although high hygiene standards have been achieved in the production of milk and dairy products in last few year occurrence of *L. monocytogenes* is increasing.

Keywords: pathogenic bacteria, *Listeria monocytogenes*, listeriosis

1. Uvod

Britanski znanstvenik Everitt Murray 1926. godine po prvi puta opisuje bakteriju *Listeria monocytogenes* kao patogenu bakteriju koju je izolirao iz laboratorijskih kunića. Upravo zbog toga se dugi niz godina smatralo da se bakterija *L. monocytogenes* prenosi sa zaražene životinje na čovjeka izravnim kontaktom izazivajući bolest listeriozu. No, 1980. godine zabilježeno je nekoliko slučajeva pojave listerioze u ljudi koji su konzumirali sireve kontaminirane bakterijom *L. monocytogenes*. Listerioza je bolest koja se relativno rijetko javlja, svega 0,1 do 10 slučajeva na 1 milijun ljudi godišnje. Iako se javlja puno rjeđe u odnosu na druge bolesti prenosive putem hrane poput salmoneloze i kampilobakterioze, listerioza ima izuzetno visoku stopu smrtnosti do čak 40% što predstavlja velik javnozdravstveni problem.

Danas je poznato da bakterija *L. monocytogenes* može kontaminirati mlijeko i mliječne proizvode koji zbog svojeg prirodnog sastava i svojstava osiguravaju idealne uvjete za rast i razmnožavanje različitih vrsta mikroorganizama, zbog čega se mlijeko i mliječni proizvodi smatraju rizičnom skupinom proizvoda. Naime, kontaminacija mlijeka i mliječnih proizvoda bakterijom *L. monocytogenes* najčešće je posljedica loših higijenskih uvjeta proizvodnje. Prema Uredbi Komisije (EZ) br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu bakterija *L. monocytogenes* ne smije biti prisutna u broju većem od 100 cfu/g (engl. colony forming units), tijekom deklariranog roka održivosti proizvoda. Također, bakterija *L. monocytogenes* ne smije biti prisutna u 25 g proizvoda koji se stavlja na tržište . Unatoč postignutim visokim higijenskim standardima u proizvodnji i preradi mlijeka, pojavnost bakterije *L. monocytogenes* u mliječnim proizvodima u zadnjih nekoliko godina je u porastu.

U ovom radu pokušat će se na temelju znanstvenih istraživanja i epidemioloških studija prikazati pojavnost bakterije *L. monocytogenes* u sirovom mlijeku i siru. Također, na temelju novih spoznaja cilj rada je opisati i morfološke, fiziološke i virulentne karakteristike bakterije *L. monocytogenes*.

2. Pregled literature

2.1. *Listeria monocytogenes*

Bakterija *L. monocytogenes* je gram pozitivna bakterija iz roda *Listeria*. Široko je rasprostranjena, pa je dosad izolirana iz: tla, propadajuće vegetacije, vode, odvodnih cijevi, fecesa humanog i animalnog podrijetla. Upravo zbog svoje rasprostranjenosti i različitih uvjeta u kojima može rasti, kontaminacija ovom bakterijom predstavlja veliki problem pogotovo u prehrambenoj industriji.

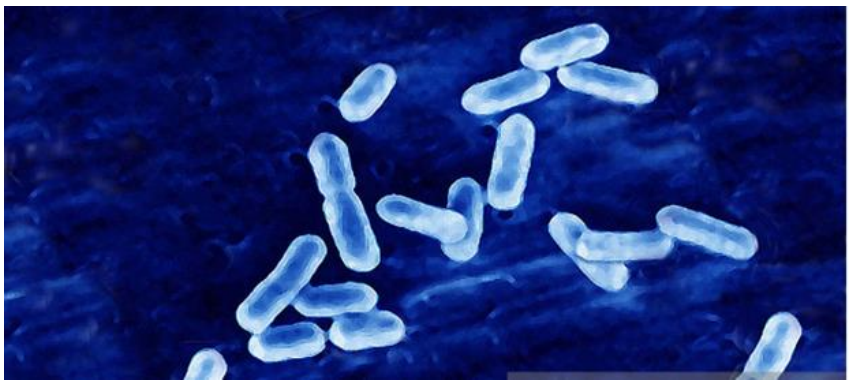
U mljekarskoj industriji, bakterija *L. monocytogenes* predstavlja značajan problem zbog rasta i razmnožavanja unutar širokog raspona pH vrijednosti (4,3-9,6) i temperature (-1,5-45 °C) te izrazite otpornosti prema visokim koncentracijama NaCl do 12% (Bubonja i sur. 2007.). Dortet i sur. 2009. navode da bakterija *L. monocytogenes* ima optimalan rast pri neutralnoj pH vrijednosti te koncentraciji NaCl od 0,5%. Ryser (2001.) navodi kako bakterija *L. monocytogenes* može preživjeti u ohlađenoj 25,5% otopini NaCl tijekom 4 mjeseca. Bakterija *L. monocytogenes* stvara biofilm što bi objasnilo njezinu sposobnost kolonizacije opreme u proizvodnji hrane (Kocor i Olszewska, 2017.). Magalhães i sur. (2014.) navode da se bakterija *L. monocytogenes* brzo prihvaća na površine izrađene od različitih materijala poput lijevanog željeza, nehrđajućeg čelika, najlona, teflona, poliesterskog podnog lijepila i stakla. Upravo zbog toga bakterija *L. monocytogenes* može opstati u različitim proizvodnim pogonima i do nekoliko mjeseci.

2.2. Karakteristike bakterije *L. monocytogenes*

Prvi opis ove bakterije 1926. godine daje Everitt Murray koji je naziva *Bacterium monocytogenes*, a Harvey Pirie 1927. godine istu bakteriju naziva *Listerella hepatolytica.* Iako 1939.godine Everitt Murray i Harvey Pirie predlažu naziv *Listerella monocytogens*, konačan naziv *L. monocytogenes* koji se zadržao do danas daje Harvey Pirie 1940. godine.

Rod *Listeria* trenutno uz bakteriju *L. monocytogenes* obuhvaća još 14 različitih vrsta: *L. ivanovii, L. welshimeri, L. innocua, L. seeligeri, L. grayi, L. marthii, L. rocourtiae, L. fleischmanni, L. weihensstephanesis, L. floridensis, L. aquatica, L. cornellensis, L. riparia i L. grandensis* (Kockot i Olszewska 2017.). Od navedenih vrsta, bakterija *L. monocytogenes* predstavlja najveću opasnost humanom zdravlju.

Bakterija *L. monocytogenes* je gram-pozitivna bakterija promjera stanice oko 0,5 µm, dužine od 0,5-2 µm. Štapićastog je oblika s lagano zaobljenim krajevima (slika 2.2.1). Uglavnom se nalazi kao zasebna stanica koja može oblikovati kratke lance koji često poprimaju oblik slova V ili Y. Ponekad stanice mogu biti i okruglog oblika, promjera oko 0,5 µm zbog čega se vrlo lako može zamijeniti sa streptokokima (Ryser i Marth 2007.).



Slika 2.2.1. Bakterija *Listeria monocytogenes*
Izvor: http://www.gettyimages.com/detail/news-photo/gram-positive-bacilli-that-causes-listeriosis-optical-news-photo/151042750#gram-positive-bacilli-that-causes-listeriosis-optical-microscope-picture-id151042750

Bakterija *L. monocytogenes* je fakultativno anaerobna što znači da može rasti u uvjetima sa ili bez prisutnosti kisika. Također, tolerira koncentraciju CO_2 do 20%, a koncentracije iznad 50% djeluju inhibitorno (Magalhães i sur. 2014.). Ne tvori spore ni kapsularni oblik. Raste pri temperaturama između -1,5 i 45 °C, a optimalna temperatura za rast i razmnožavanje je između 30 i 37 °C. Također, bakterija *L. monocytogenes* može rasti u mlijeku pri temperaturama hlađenja što je svrstava u psihrotrofnu skupinu mikroorganizama. *L. monocytogenes* je termolabilna bakterija što znači da je temperature niske (63-65 °C/30 min) i srednje pasterizacije (72-75 °C/15 s) inaktiviraju. Bakterija *L. monocytogenes* može

preživjeti proces proizvodnje i zrenja sireva proizvedenih od sirovog mlijeka (Bachmann i Spahr,1995.).

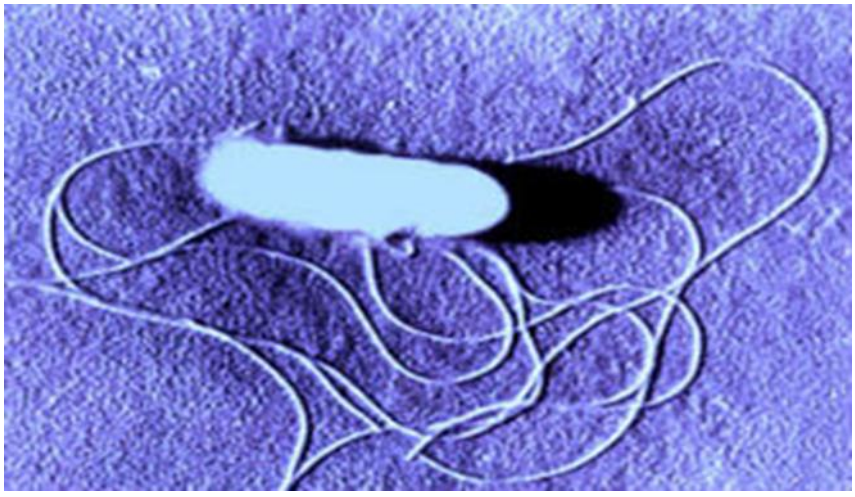
L. monocytogenes je katalaza-pozitivna i oksidaza-negativna kao i sve druge bakterije iz roda *Listeria*. Za razliku od drugih bakterijskih vrsta iz roda *Listeria*, bakterija *L. monocytogene*s ne fermentira manitol i ksilozu, no može fermentirati ramnozu i α-metil-D-manozid (tablica 2.1.).

Tablica 2.1. Biokemijsko razlikovanje *Listeria* vrsta

	L. monocytogenes	***L. innocua***	***L. ivanovii***	***L. seeligeri***	***L. welshimeri***	***L. grayi***
β-hemoliza	+	-	+	+	-	-
Katalaza	+	+	+	+	+	+
Oksidaza	-	-	-	-	-	-
Fermentacija:						
ramnoza	+	±	-	-	±	±
manitol	-	-	-	-	-	+
ksiloza	-	-	+	+	+	-
α-metil-D-manozid	+	+	-	-	+	+
riboza	-	-	±	-	-	±

Izvor: Doret i sur. 2009.

Kretanje bakterije *L. monocytogenes* omogućavaju lofotrihne flagele (jedna ili više flagela smještene su na jednom ili oba pola stanice) kada su temperature između 20 i 25 °C (slika 2.2.2.). Pri temperaturama izvan tog raspona kretanje ove bakterije nije toliko naglašeno, a ono ne postoji ukoliko je temperatura viša od 37 °C. Do smanjenja kretanja pri temperaturama ≥37 °C dolazi zbog nemogućnosti bakterijske stanice da sintetizira flagelin, protein potreban za normalno funkcioniranje flagela kojih najčešće ima od 1 do 5 po bakterijskoj stanici. Na temelju somatskih (O) i antigena flagela identificirano je 13 različitih serotipova bakterije *L. monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e i 7. Povezanost s epidemijom listerioze utvrđena je samo za tri serotipa, 1/2a, 1/2b i 4b. Prema Kocor i Olszewska (2017.), serotip 1/2a najčešće je izoliran iz hrane, dok je 4b uzročnik najvećih epidemija listerioze.



Slika 2.2.2. Lofotrihne flagele na bakterijskoj stanici *L. monocytogenes*
Izvor: https://medium.com/@MicrobeADay/listeria-monocytogenes-646c323d0039)

2.3. Metode određivanja bakterije *L. monocytogenes*

Mikrobiološki standardi su zakonski akti koji propisuju maksimalno dozvoljeni broj patogenih mikroorganizama u 1 g ili 1 ml odnosno u 25 g ili 25 ml proizvoda. Prema tim standardima u toplinski obrađenom mlijeku i mliječnim proizvodima, bakterija *L. monocytogenes* ne smije biti prisutna u 1g ili 1 ml proizvoda U mljekarstvu se osim mikrobiološke kontrole gotovih proizvoda provode i mikrobiološke kontrole sirovog mlijeka, kao i svih dodataka i materijala koji se koriste u proizvodnji mliječnih proizvoda. Osim toga, kontrolira se i pitka voda, higijena zaposlenih osoba te djelotvornost pranja i dezinfekcije objekata, strojeva i opreme (Sabadoš 1996.).

2.3.1. Klasične mikrobiološke metode

Klasične metode za izolaciju bakterije *L. monocytogenes* uključuju stupanj revitalizacije i umnožavanja kako bi se oporavile eventualno prisutne subletalno oštećene bakterijske stanice te kako bi se omogućilo detektiranje malog broja bakterija. U tu svrhu koristi se UVM bujon koji sadrži različite peptone i ekstrakte, soli i fosfatni pufer koji omogućavaju dobar rast bakterija iz roda *Listeria*. Selektivnost je ostvarena dodatkom nalidiksinske kiseline koja je inhibitor gram negativnih bakterija te akriflavina koji je selektivni agens za ostale gram pozitivne bakterije.

Sljedeći stupanj umnožavanja uključuje upotrebu drugog selektivnog medija Fraser-ovog bujona. Optimalni uvjeti za rast bakterija iz roda *Listeria* stvoreni su velikom koncentracijom hranjivih tvari i velikim pufernim kapacitetom medija. Rast ostalih mikrobnih vrsta inhibiran je dodatkom litij-klorida, nalidiksinske kiseline i akriflavina. Detekcija β-glukozidazne aktivnosti bakterija iz roda *Listeria* omogućena je dodatkom glukoza-eskulina i amonijevog željeznog citrata. Enzim β-glukozidaza cijepa glukoza-eskulin na eskuletin koji sa željeznim ionima stvara maslinastozeleni do crni kompleks. Zacrnjenost Fraser-ovog bujona ukazuje na moguću prisutnost bakterija iz roda *Listeria*, odnosno ukoliko nema promjene boje pretpostavlja se da bakterija nije prisutna. Fraser-ov bujon se zatim precjepljuje na čvrstu selektivnu podlogu i detektira bakteriju *L. monocytgenes*. Jedna od najselektivnijih podloga koja se za tu svrhu koristi je PALCAM selektivni agar. Selektivnost PALCAM agara omogućena je dodacima: polimiksin, akriflavin, ceftacidim i litij-klorid. Eskulin je osnovni sastojak koji omogućuje stvaranje maslinastozelenog kompleksa eskuletina i željeznog iona uslijed β-glukozidazne aktivnosti bakterije *L. monocytogenes*. Na ovoj hranjivoj podlozi rastu bakterije roda *Listeria* uz pojavu sitnih maslinastozelenih kolonija s crnim halo efektom. Ukoliko na agaru porastu sivo-zelene kolonije uz pojavu zacrnjenosti podloge, provodi se daljnja identifikacija standardnim mikrobiološkim metodama. Identifikacija bakterije *L. monocytogenes* klasičnim mikrobiološkim metodama uključuje: bojanje po Gram-u, katalaza test, oksidaza test, CAMP test, iskorištavanje ugljikohidrata i test pokretljivosti (Kolarec, 2009.)

Dokazivanje prisutnosti i određivanja broja bakterija *L. monocytogens* i drugih *Listeria spp*. provodi se prema međunarodnim standardnim metodama, ISO 11290-1:2017 i ISO 11290-2:2017.

2.3.2. Molekularne metode

Molekularne metode za identifikaciju i klasifikaciju mikroorganizama jednostavne su za primjenu, brze, pouzdane i ekonomski isplative, a temelje na analizi DNA (deoksiribonukleinske kiseline) molekule.

Metoda lančane reakcije polimerazom ili PCR (engl. Polymerase Chain Reaction) smatra se revolucionarnom metodom koja omogućava amplifikaciju specifične regije DNA u cilju dobivanja dovoljnog broja razlikovnih fragmenata DNA za ciljanu analizu.

Bakterije se između ostalog međusobno razlikuju i prema specifičnim genima u DNA molekuli. Kako bi se bakterija iz uzorka hrane mogla vrlo precizno i brzo detektirati potrebno ju je najprije umnožiti. PCR tehnologija omogućava vrlo učinkovito stvaranje milijuna kopija specifične DNA bakterije prisutne u uzorku hrane u vrlo kratkom vremenu. Metoda je visoko specifična, što znači da će usprkos prisutnosti drugih bakterija u uzorku umnožiti isključivo DNA bakterije od interesa. U usporedbi s klasičnim metodama nacjepljivanja uzoraka na agar (kultivacija) koji rezultate daju u roku 4-6 dana, PCR je neusporedivo brža metoda koja daje precizne rezultate unutar 24 sata. Od osnovne PCR metode razvile su se mnoge genotipske metode temeljene na DNA analizi, poput analize polimorfizama pomoću restrikcijskih fragmenata RFLP-PCR (engl. Restriction Fragment Lenght Polymorphisam [RFLP]), RAPD-PCR (engl. Random Amplified of Polymorpic DNA) ili analize polimorfizama pomoću dužine restrikcijskih fragmenata (engl. Amplified Fragment Lenght Polymorphisam [AFLP]). Zajedničko je tim metodama da su ovisne o uzgoju bakterija na hranjivim podlogama, a DNA se ekstrahira iz bakterijske kolonije narasle na hranilištu (Samaržija 2015.).

2.4. Bolest uzrokovana bakterijom *L. monocytogenes* - listerioza

Bolest koju uzrokuje patogena bakterija *L. monocytogenes* naziva se listerioza, a manifestira se preko različitih simptoma koji variraju ovisno o patogenezi uvjetovanoj mjestom ulaska uzročnika i zdravstvenom stanju domaćina. U svega 1% slučajeva trovanja hranom, bakterija *L. monocytogenes* se navodi kao uzročnik bolesti (Markov i sur. 2009.), i jedan je od tri uzročnika pojave bakterijskih meningitisa u svijetu. Iako se listerioza u odnosu na druge akutne infektivne bolesti koje se prenose putem hrane poput salmoneloze i kampilobakterioze javlja izuzetno rijetko, njezina javnozdravstvena važnost vrlo je često podcijenjena. Naime, od infekcija koje se prenose hranom, listerioza je bolest s najčešćim smrtnim ishodom. Stopa smrtnosti listerioze iznosi od 20 do 40% (Bubonja i sur. 2007.; Ryser 2011.;Havranek i sur. 2014.; Mansouri-Najad i sur. 2015.).

Infektivna doza za bakteriju *L. monocytogenes* nije definirana budući da ona ovisi o inicijalnom broju u konzumiranoj namirnici, o patogenosti unesenog serotipa i zdravstvenom stanju osobe. Infekciji su više podložne trudnice, novorođenčad, osobe starije životne dobi kao i imunokompromitirane osobe (oboljeli od AIDS-a, oboljeli od različitih vrsta karcinoma, dijabetičari, bubrežni bolesnici, astmatičari i dr.).

Prema podacima, prisutnost bakterije *L. monocytogenes* od 10^7 do 10^9 cfu/g u zdravih osoba mogu uzrokovati bolest listeriozu, a razvoj bolesti moguć je i nakon unosa 10^2 do 10^3 cfu/g namirnice. Od 13 poznatih serotipova *L. monocytogenes*, kao uzročnici bolesti najčešće se izoliraju samo 3 serotipa: 1/2a, 1/2b i 4/b. Pretpostavlja se da čovjek tijekom svog života hranom više puta unese *L. monocytogenes* u probavni sustav, kolonizira crijeva domaćina, a prema istraživanjima u 5% populacije *L. monocytogenes* čini prolaznu mikrobnu populaciju probavnog sustava (Bubonja i sur. 2007.).

Listerioza se javlja u dva oblika koji se razlikuju po intenzitetu, simptomima i inkubacijskom periodu, a razlikujemo nekoliko kliničkih sindroma. Simptomi bolesti se razlikuju, a najčešće su to blaži oblici bolesti slični prehladi ili gripi praćeni bolovima u mišićima, temperaturom, dijarejom i povraćanjem. Često, zbog neprepoznatih ali i nespecifičnih simptoma, može doći do razvoja menigitisa, encefalitisa i septikemije, te pobačaja kod trudnica. Uspješnost liječenja listerioze ovisi o brzini postavljanja točne dijagnoze i samom početku adekvatnog liječenja. Kao najčešća terapija primjenjuju se antibiotici, primjerice ampicilin kojemu se zbog sinergističkog učinka nerijetko dodaje i gentamicin dok se sulfametoksazol – trimetoprim koristi kao alternativa za pacijente alergične na penicilin. Bez obzira na primijenjenu terapiju, stopa smrtnosti u liječenih pacijenata je između 20 i 30%, a u neliječenih osoba postotak je veći. Pretpostavlja se da trudnice predstavljaju 60% svih infekcija bakterijom *L. monocyotogenes*. No, s obzirom da se bakterija *L. monocytogenes* rutinski ne dokazuje u posteljici i spontano pobačenim fetusima, zapravo nije poznato koliko se ukupnih slučajeva pobačaja može pripisati infekciji ovom bakterijom. Također, prisutnost bakterije *L. monocytogenes* se ne pretražuje rutinski u stolici pa nije poznat niti ukupan broj slučajeva gastroenteritisa uzrokovanih *L. monocytogenes* (Bubonja i sur 2007.).

Mehanizam kojim bakterija *L. monocytogenes* uzrokuje gastroenteritis nije poznat, ali smatra se da je bolest posljedica direktne invazije crijevnog epitela budući da nije utvrđeno da *L. monocytogenes* proizvodi enterotoksin (Bubonja i sur. 2007.). Jednom kad bakterija prodre u monocite domaćina ili u polimorfonuklearne leukocite, bolest postaje septikemijska. *L. monocytogenes* je intracelularna bakterija koja se nalazi u fagocitnim stanicama domaćina i omogućen joj je prodor u mozak i prodor kroz posteljicu do fetusa u trudnica. Patogeneza listerioze se najvećim dijelom temelji na činjenici da uzročnik prodire u fagocite domaćina i u njima se umnaža (Marinculić i sur. 2009.).

Ryser (2001.) navodi da osim bakterije *L. monocytogenes*, i bakterije *L. ivanovii* i *L. seeligeri* mogu biti uzročnici bolesti listerioze koja se javlja kod ljudi i životinja. Simptomi listerioze su vrlo često neprepoznati i nedijagnosticirani, a bolest se može manifestirati vrlo teškom kliničkom slikom oboljele osobe. Infekcija se zbiva nakon konzumacije hrane kontaminirane bakterijom *L. monocytogenes*, iako postoje zabilježeni rijetki slučajevi listerioze koja je nastupila nakon direktnog kontakta sa životinjom zaraženom ovom bakterijom (Hunjak i Pešić 2013.).

2.5. Listerioza u muznih životinja

Listerioza je zarazna bolest utvrđena u velikom broju različitih vrsta domaćih životinja, a za mljekarstvo su najznačajnije ovce, koze i krave. Bakterijske vrste *L. monocytogenes* i *L. ivanovii* uzrokuju hemolizu (raspadanje eritrocita) i patogene su za životinje i čovjeka, dok *L. innocua* može izazvati meningoencefalitis u ovaca (Sukalić i sur. 2016.). Nastanku bolesti pogoduje loša hranidba, prenaseljenost nastambe, visoka gravidnost, porođaj, loša opća higijena te stajski način držanja životinja. Bolest se u životinja obično pojavljuje unutar jednog uzgoja i sporo se širi, pretežno zajedničkim boravkom zdravih životinja s bolesnim u istom prostoru te onečišćenom hranom, prvenstveno silažom i sjenažom loše kvalitete i vodom, no mogu je prenijeti i kukci. U jednom uzgoju može oboljeti 5-10% životinja, a jednom unijeta zaraza zadržava se 2 do 3 godine (Rupić 2009.).

Bakterija *L. monocytogenes* ulazi u organizam hranom koja je kontaminirana, kroz povrede na koži, zrakom, spolnim načinom, a mladunčad obolijeva odmah nakon poroda prolaskom bakterije kroz pupčanu vrpcu i druge sluznice. Unašanjem kontaminirane hrane, bakterija *L. monocytogenes* ulazi u organizam, a bolest se može javiti nakon prolaska intestinalne crijevne barijere ovisno o interakciji između bakterijskog površinskog proteina internalina A i proteina domaćina E-kadherina (Sukalić i sur. 2016.). Nakon toga, bakterije se mogu lokalizirati na crijevnoj stijenci, produženoj moždini i posteljici. Listerioza u preživača manifestira se prvenstveno sa kliničkim znakovima kao što su encefalitis, pobačaj i smrt ubrzo nakon partusa, meningoencefalitis u odraslih preživača te septikemija u neonatalnih preživača i monogastričnih životinja. Pobačaji su sporadični, a mogu pogoditi 10-20% životinja u stadu, najčešće u zadnjoj trećini graviditeta (Sukalić i sur. 2016.).

U muznih životinja (krava, koza, ovca), utvrđena je pojava listerioznog mastitisa odnosno mastitisa uzrokovanog bakterijom *L. monocytogenes.*

Kod krava se manifestira kao subklinički oblik mastitisa (bez vidljivih promjena na vimenu). Listeriozni subklinički mastitis utvrđen je nakon izolacije bakterije *L. monocytogenes* iz mlijeka izmuzenog iz jedne četvrti vimena pri čemu je broj bakterija bio 280 cfu/ml (Hunt i sur.,2012.). Unatoč provedenoj terapiji antibioticima, životinja nije izliječena. Naime, bakteriji *L. monocytogenes* je potrebno i do nekoliko mjeseci nakon provedene terapije da se izluči iz organizma stoga je preporuka ukloniti takvu životinju iz uzgoja.

3. Mlijeko kao medij za pojavnost patogenih bakterija

Zahvaljujući svom kemijskom sastavu i fizikalnim osobinama (tablica 3.1.), mlijeko osigurava dobre uvjete za rast različitih vrsta bakterija, kvasaca i plijesni koji pripadaju uzročnicima kvarenja ili patogenim mikroorganizmima. Pogodnost mlijeka za rast i razmnožavanje mikroorganizama dodatno se povećava ako oni rastu u mješovitim populacijama, i ovisi o metaboličkim produktima prisutnih mikroorganizama koje stvaraju u mlijeku. Međutim, brzina razmnožavanja pojedinih mikrobnih vrsta ne ovisi o sastojcima nego je ovisna o antimikrobnim ili inhibitornim svojstvima mlijeka te vanjskim uvjetima od kojih je od najveće važnosti temperatura. Poput druge hrane, mlijeko držano na sobnoj temperaturi brzo će se pokvariti neovisno o sastavu prisutne mikroflore. Pohrana mlijeka na niskim temperaturama (≤4 °C) osigurava produživanje roka održivosti, zbog čega se brojnim pravilnicima o kakvoći sirovog mlijeka pripisuje obavezno hlađenje mlijeka na odgovarajuću propisanu temperaturu najkasnije dva sata nakon mužnje. Pravilnikom o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN, 2017.) propisano je da se sirovo mlijeko odmah po mužnji mora ohladiti na ≤8 °C ukoliko se vrši svakodnevna otprema mlijeka, odnosno ≤6 °C ako nije svakodnevna otprema mlijeka, osim ako će se mlijeko prerađivati u roku od dva sata od mužnje ili je za proizvodnju određenih mliječnih proizvoda potrebna viša temperatura.

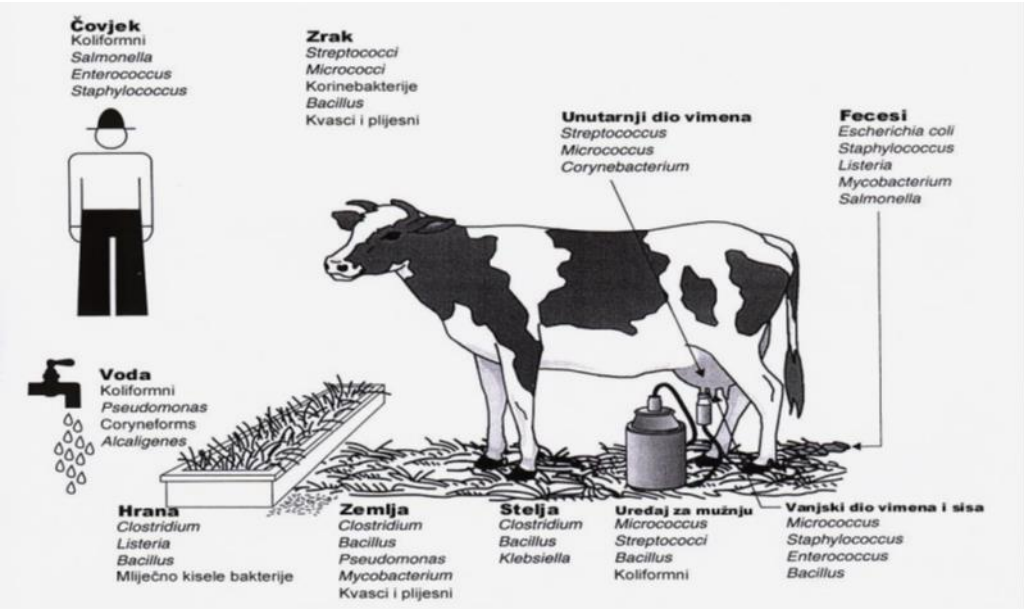
Iako je sirovo mlijeko nakon lučenja u vimenu praktički sterilno, pod uvjetom da je dobiveno od zdrave životinje i pomuzeno na higijenski način. Nakon prolaska kroz sisu, mlijeko sadržava od 100-1000 mikroorganizama/ml, a neposredno nakon mužnje mlijeko uvijek sadrži manje od 5000 mikroorganizama/ml.

Napuštanjem vimena, mlijeko se neizbježno bakteriološki kontaminira preko dva glavna izvora: vanjskog dijela vimena i sise, te preko pribora za mužnju i tijekom pohrane mlijeka do trenutka prerade (slika 3.2.). Samaržija i sur. (2007.) navode da je broj i vrsta mikroorganizama prisutnih u sirovom mlijeku određen sezonom, higijenskim uvjetima proizvodnje, hranidbom i sustavom hlađenja, a ovisno o čimbenicima ukupan broj mikroorganizama u svježe pomuzenom mlijeku može biti od svega nekoliko tisuća do više od 10^6 mikroorganizama/ml.

Tablica 3.1. Raspoloživi sastojci kravljeg mlijeka potrebni za mikrobni rast

Sastojak	Prosječna koncentracija (100g)	Mikroorganizam
IZVOR UGLJIKA		
Glukoza	U tragovima	Sve vrste
Galaktoza	U tragovima	Sve vrste
Laktoza	47 g	Bakterije mliječne kiseline, koliformne bakterije
Mliječna mast	36 g	Vrste koje tvore lipaze
Aminokiseline (ukupno)	0,02 g	Sve vrste
Protein	32 g	Vrste koje tvore proteaze
Citrat	0,002 g	*Leuconostoc spp.*
IZVOR DUŠIKA		
Aminokiseline ukupno	0,02 g	Sve vrste, esencijalne za neke vrste
Amonijak	9 mg	Sve vrste
Urea	142mg	Vrste koje tvore ureazu
Proteini	32 g	Vrste koje tvore proteaze
Makroelementi (Ca, P, Mg, K, Na, Cl)	Ovisno o elementu 9-178 mg	Sve vrste
Mikroelementi (Fe, Cu, Cr, Mn, Zn, J, Se, Ni, Mo, B, Br, Al)	Ovisno o elementu 1-293 µg	Sve vrste
Vitamini B skupine	Ovisno o vitaminu 0,04-0,34 mg; 0,35-5,30 µg	Sve vrste
Purini i pirimidini	Prisutni	Sve vrste

Izvor: Samaržija D., 2014.



Slika 3.2. Mogući izvori kontaminacije na mliječnoj farmi

Izvor: Frenk i Hassan (2003.)

Broj mikroorganizama u mlijeku neposredno nakon mužnje predstavlja početnu mikrobnu populaciju sirovog mlijeka. Najčešće su to vrste rodova: *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* i *Corynebacterium*, te zanemariv broj ostalih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (tablica 3.2.). Primarnim izvorom patogenih bakterija u mlijeku i mliječnim proizvodima navode se: bolesna muzna životinja, infektivno vime i bolestan čovjek. U proizvodnji i preradi mlijeka i mliječnih proizvoda kontaminacija je uvijek posljedica nedovoljne higijene, neznanja ili nesavjesnosti radnika i najčešće se događa preko opreme i općeg okruženja nakon što je hrana bila obrađena, tzv. križnom kontaminacijom (Havranek i sur. 2014. Magalhães i sur. 2014.).

Tablica 3.2. Pojava glavnih mikrobnih skupina u sirovom mlijeku koje sadrži <5000 cfu/ml

Mikrobne skupine	**%**
Micrococcus	30-99
Streptococcus	0-50
Ostali gram-negativni rodovi	<10
Ostali gram-pozitivni rodovi (uključujući koliforme)	<10

Izvor: Havranek i sur., 2014.

Patogeni mikroorganizmi povezani s mlijekom i mliječnim proizvodima najčešće su bakterije koje se uglavnom svrstavaju u dvije skupine. Prvu skupinu čine bakterijske vrste rodova *Listeria*, *Yersinia*, *Campylobacter*, te patogeni sojevi bakterije *Escerichia coli*. Drugu skupinu čine određene vrste bakterija rodova *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Clostridium* i *Bacillus* koje smatramo patogenim zbog sposobnosti stvaranja bakterijskih toksina. Iako listerioza nije toliko učestala kao ostale bolesti koje se prenose putem hrane, od ranije navedenih bakterija, listerioza ima najveću stopu smrtnosti do 40% te najveću stopu hospitalizacije oboljelih od približno 90% (Rowe i Donaghy 2011.). Naravno, da bi patogene bakterije rasle moraju biti zadovoljeni uvjeti za njihov rast (tablica 3.3.).

Budući da postoji trend konzumacije sirovog mlijeka zbog percepcije potrošača da sirovo mlijeko ima bolja senzorna i nutritivna svojstva u odnosu na pasterizirano mlijeko, raste i opasnost od zaraze patogenim mikroorganizmima. Kako sirovo mlijeko može biti izvorom različitih bolesti, proizvođači mlijeka moraju voditi računa o mikrobiološkoj kvaliteti sirovog mlijeka. Osim što sirovo mlijeko može biti izvorom različitih bolesti, treba imati na umu da o

mikrobiološkoj kvaliteti sirovog mlijeka ovisi i kvaliteta konzumnog mlijeka i svih mliječnih proizvoda (Kozačinski i sur. 2003.).

U Republici Hrvatskoj mikrobiološka kakvoća hrane, pa tako i mlijeka i mliječnih proizvoda, regulirana je odgovarajućim propisima. Zbog toga, sva hrana ne smije sadržavati mikroorganizme ili njihove toksine ili metabolite u količinama koji predstavljaju neprihvatljiv rizik za zdravlje ljudi. Prema važećem Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN, 2017.) koji prati Uredbu (EZ) br. 853/2004 Europskog parlamenta o utvrđivanju higijenskih pravila za hranu životinjskog podrijetla, ukupan broj mikroorganizama i somatskih stanica u mlijeku, parametri su koji se koriste za razvrstavanje sirovog kravljeg, ovčjeg i kozjeg mlijeka u razrede kvalitete. Prema Uredbi (EZ) br. 853/2004, mikrobiološki kriterij za sirovo mlijeko je 100 000 cfu/ml mikroorganizama i 400 000 somatskih stanica/ml. Općenito, sirovo mlijeko koje je namijenjeno za konzumaciju ljudi mora zadovoljavati uvjete propisane Zakonom o hrani (Uredba (EZ) br. 178/2002) i ne smije sadržavati patogene mikroorganizme.

Tablica 3.3. Uvjeti potrebni za rast patogenih mikroorganizama u mlijeku

Patogen	**Minimalni aktivitet vode (a_w)**	**pH vrijednost**	**Temperatura (°C)**	**Sol (%)**	**Potrebe za kisikom**
L. monocytogenes	0,92	4,3-9,3	4-55	10	Fakultativni anaerob
Y. enterolitica	0,945	4,2-10	-1,3-42	7	Fakultativni anaerob
C. jejuni	0,987	4,9-9,5	30-45	1,7	mikroaerofil
E. coli	0,95	4-10	6,5-49,4	6,5	Fakultativni anaerob
***S. aureus* - rast**	0,83	4-10	7-50	20	Fakultativni anaerob
***S. aureus* – tvorba toksina**	0,85	4-9,8	10-48	10	Fakultativni anaerob
Salmonella spp.	0,94	3,7-9,5	5,2-46,2	8	Fakultativni anaerob
***C. botulinum* – tip A**	0,935	4,6-9	10-48	10	Anaerob
B. cereus	0,92	4,3-9,3	4-55	10	Fakultativni anaerob

Izvor: https://www.fda.gov/downloads/food/guidanceregulation/ucm252447.pdf

Prema istraživanjima Europske agencije za sigurnost hrane – EFSA (engl. European Food Safety Autority) provedenim na području EU (2015.) o javnozdravstvenom riziku konzumacije sirovog mlijeka, najčešće prisutne bakterije u mlijeku i one prisutne u populaciji životinja su: *Campylobacter spp*., *Salmonella spp*., *E. coli* (STEC), *B. cereus*, *B. abortus*, *B. melitensis*, *L. monocytogenes, M. bovis*, *S. aureus*, Y*. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus suis* subsp. *zooepidemicus*. Prema podacima, između 2007. i 2012. godine, evidentirano je tek 27 slučajeva pojave bolesti na području EU, a koje se povezuju uz konzumaciju sirovog kozjeg i kravljeg mlijeka. Pri tome su iz mlijeka izolirani: *Campylobacter jejuni* (21 slučaj), *Salmonella typhimurium* (1 slučaj), 2 slučaja prisutnosti *E. coli* (STEC) i 3 slučaja prisutnosti virusa krpeljnog encefalitisa (TBEV). Četiri od 27 zabilježena slučaja bolesti bila su povezana sa konzumacijom sirovog kozjeg mlijeka.

Nadalje, istraživanja Hrvatske agencije za hranu (2016.) provedena na 87 uzoraka sirovog mlijeka iz mljekomata, nisu pokazala prisutnost *C. jejuni/co*li, *E. coli* O157 (VTEC ili STEC), *Salmonella spp*. i *Y. enterocolitica*. Zdolec i sur. (2016.) utvrdili su u uzorcima mlijeka (181) iz mljekomata prisutnost 61 pozitivnog uzorka (33,15 %) na *E. coli* u prosječnom broju od 350 cfu/ml.

3.1. Pojavnost bakterije *L. monocytogenes* u sirovom mlijeku

Primjena postupka pasterizacije mlijeka u Europi započinje 1880. godine u cilju smanjenja rizika od kontaminacije različitih vrsta mikroorganizama. Današnji trend konzumacije sirovog mlijeka povećava i mogućnost zaraze bakterijom *L. monocytogenes* koja ima sposobnost rasta i razmnožavanja u sirovom mlijeku. Na razini Europske unije prodaja sirovog mlijeka je moguća ukoliko sirovo mlijeko zadovoljava higijenske kriterije propisane Uredbom Komisije (EZ) br. 853/2004. i Zakona o hrani NN 81/2013 (Uredba Komisije (EZ) 178/2002) te mikrobiološke kriterije propisane Uredbom komisije (EZ) br. 2073/2005.

Kontaminacija mlijeka bakterijom *L. monocytogenes* najčešće se događa putem: vimena i sisnog kanala, životinja oboljelih od mastitisa, opreme za mužnju, vode, zaposlenika i okoliša.

King i sur. (2014.) na temelju rezultata četiri studije utvrdili su da *L. monocytogenes* može rasti u sirovom kravljem mlijeku pohranjenom na 4 °C. U tim uvjetima lag-faza i brzina

rasta mogu varirati, što ovisi o razlikama između sojeva *L. monocytogenes*, fiziološkom stanju inokuluma i karakteristikama sirovog mlijeka. Pri 4 °C potrebno je najmanje 5 dana da se broj bakterije *L. monocytogenes* poveća za 1 $\log_{10}$ cfu/ml. Rast bakterije *L. monocytogenes* je intenzivniji pri temperaturama višim od 4 °C čak i tijekom kratkog vremenskog perioda.

Tako su Castro i sur. (2017.) istraživali rast bakterije *L. monocytogenes* u sirovom mlijeku pakiranom u boce (105 uzoraka), mlijeku iz rashladnog spremnika (115 uzoraka), na filteru mljekovoda (23 uzorka) i iz okoliša pakiranja (50 uzoraka). Također su proučavali rast inokulirane bakterije *L. monocytogenes* u sirovo mlijeko pohranjeno u dvije vrste ambalaže (plastična ambalaža i plastične vrećice u kartonu) pri različitim temperaturama od 6,8 i 10 °C.

Rezultati su pokazali da je prisutnost bakterije *L. monocytogenes* bila veća za 4,8% u sirovom mlijeku pakiranom u boce u odnosu na mlijeko uzeto iz rashladnog spremnika gdje je prisutnost bakterije *L. monocytogenes* iznosila 1,7%. Utvrđeni broj bakterije *L. monocytogenes* u bocama sa sirovim mlijekom bio je <13 cfu/ml, a u rashladnom spremniku ≤1 cfu/ml. U okolišu za pakiranje nije utvrđena prisutnost bakterije *L. monocytogenes*, dok je na filterima mljekovoda dokazana visoka prisutnost od čak 39%. Sirovo mlijeko inokulirano bakterijom *L. monocytogenes* na razini 1-2 cfu/ml, dosegne razinu ≥100 cfu/ml (22% uzoraka) u manje od 7 dana pohrane pri 6 °C, ali pri pohrani od 8 °C, 100% uzoraka dosegne razinu ≥100 cfu/ml u manje od 7 dana. Rast bakterije *L. monocytogenes* u sirovom mlijeku ciljano inokuliranom na razinu 2-20 cfu/ml bio je nešto brži u mlijeku pakiranom u plastične vrećice u kartonu.

Tahoun i sur. (2017.) proveli su istraživanje o prisutnosti bakterije *Listeria* spp. u 300 uzoraka sirovog mlijeka, opreme za mužnju i brisova ruku radnika prikupljenih sa 4 različite mliječne farme. Rezultati analiza pokazali su da je *Listeria spp*. izolirana iz 79 uzoraka (26,3%), od toga iz 29 uzoraka mlijeka (36,7%), 32 uzorka sa opreme za mužnju (40,5%) i 18 briseva ruku (22,8%). Pri tom je najčešće izolirana vrsta sa pojavom od 87,3% bila upravo bakterija *L. monocytogenes*.

Dalzini i sur. (2016.) istraživali su pojavnost i sezonu pojave (godišnje doba) bakterije *L. monocytogenes* u sirovom kravljem mlijeku. Istraživanje je trajalo od 2010. do 2013. godine tijekom kojeg je prikupljeno 8716 uzoraka sirovog mlijeka sa 942 različite farme. Prikupljeni uzorci mlijeka bili su namijenjeni za proizvodnju sira (5897 uzoraka) ili za prodaju putem mljekomata (2819 uzoraka). Analizom je utvrđena prisutnost bakterije *L. monocytogenes* u 145 uzoraka sirovog mlijeka. Pojavnost je varirala od 0,52% u 2012. do 2,73% u 2013. gledajući ukupne uzorke, no nije utvrđen značajniji trend porasta vjerojatnosti tijekom 4 godine

istraživanja. Uzorci mlijeka namijeni za proizvodnju sireva u 2,22% (131/5897) uzoraka utvrđena je prisutnost bakterije *L. monocytogenes*, tijekom 4. godine, a pojavnost je varirala od 0,68% u 2012. do 4,44% u 2013. Uzorci mlijeka namijenjenog prodaji putem mljekomata utvrđena je niska stopa pojave bakterije *L. monocytogenes* koja je detektirana u samo 0,50% uzoraka (14/2819), a pojavnost je bila od 0% u 2010. do 1,57% u 2011.

Nadalje, uzorci mlijeka prikupljeni tijekom proljeća i jeseni imali su veću stopu pojave bakterije *L. monocytogenes*. Učestalost pojave bakterije *L. monocytogenes* u zimskim uzorcima iznosila je 0,8%, u proljetnim uzorcima 3,04%, u ljetnim uzorcima 1,91% dok je u jesenskim uzorcima iznosila 2,33%.

Ovi rezultati potvrđuju da je sirovo mlijeko moguć izvor bakterije *L. monocytogenes*, pri čemu je više od 80% kontaminiranih uzoraka sadržavalo manje od 10 cfu/ml mlijeka. Slično navode Mansouri- Najand i sur. (2016.) koji su istraživali pojavnost bakterije *L. monocytogenes* u 100 uzoraka sirovog mlijeka uzetih iz rashladnih spremnika. Utvrđena je prisutnost bakterije *L. monocytogenes* u 5% uzoraka što se navodi kao niska stopa pojavnosti. Zdolec i sur. (2016.) proveli su analizu mikrobiološke kvalitete mlijeka iz mljekomata. Analizirano je 184 uzoraka sirovog mlijeka od kojih je 12 bilo pozitivno na prisutnost bakterije *L. monocytogenes* (6,52%).

Jamali i sur. (2013.) proveli su istraživanje na 446 uzoraka sirovog mlijeka uzorkovanih sa više različitih farmi kako bi utvrdili prisutnost *Listeria* vrsta. Izolirali su *Listeria spp.* iz 83 od 446 uzoraka (18,6%). Najveća pojavnost *Listeria spp.* utvrđena je u uzorcima sirovog kravljeg mlijeka (22,5%), sirovog ovčjeg mlijeka (16,4%) te u sirovom kozjem mlijeku (4,9%). Najčešće izolirane vrste bile su: *L. innocua* (57,8%), *L. monocytogenes* (21,7%), *L. welshimeri* (12%) i *L. seeligeri* (8,4%).

4. Sir kao medij za pojavnost patogenih bakterija

Sirevi su jedna od najsigurnijih vrsta hrane po pitanju njihove mikrobiološke ispravnosti (Kousta i sur., 2010.). No, unatoč činjenici da su sirevi rijetko uzrokom bolesti koje se prenose putem hrane, postoje podaci o većem broju epidemija u svijetu s velikim brojem oboljelih te smrtnim ishodima.

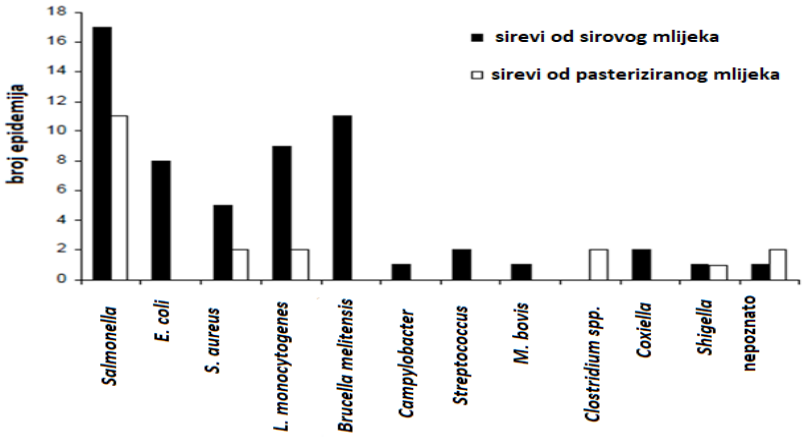
Sirevi su poput drugih prehrambenih proizvoda koji sadrže veliku količinu proteina dobar medij za rast patogenih bakterija. Patogenim bakterijama sir se može kontaminirati izravno putem sirovog mlijeka, tijekom cijeloga procesa proizvodnje te naknadnom kontaminacijom. Prisutnost i preživljavanje patogenih bakterija uvjetovani su brojnim čimbenicima:

- Mikrobnom vrstom/sojem
- Početnim brojem patogenih bakterija
- Prisutnošću drugih mikrobnih vrsta
- Fiziološkim statusom patogenih sojeva
- Koncentracijom mliječne kiseline
- Biokemijskim promjenama tijekom zrenja
- Vrstom i sastavom sira

Na temelju dosadašnjih istraživanja, tvrdnju o sposobnosti preživljavanja određene patogene vrste u siru vrlo je teško potvrditi. Naime, prirodna kontaminacija mlijeka tim bakterijama je znatno niža, istodobno, prirodno kontaminirano mlijeko sadrži i drugu mikrobnu populaciju koja patogenim bakterijama može onemogućiti optimalan rast. Zbog toga, u higijenskoj proizvodnji sira korištenje sirovog mlijeka nema veći mikrobiološki rizik od pojave tih bakterija u siru u odnosu na korištenje pasteriziranog mlijeka. Prema tome, svaka vrsta sira prikladna je za rast patogenih bakterija, premda se sadržajem vode, soli, pH vrijednosti i ostalim sastojcima međusobno razlikuju (Havranek i sur. 2014.). U odnosu na patogene bakterije koje potencijalno mogu biti prisutne u siru, *S. aureus*, *Salmonella spp*., *L. monocytogenes* i *E. coli* se u literaturi navode kao najčešće izolirane vrste iz sireva. Pojava ovih bakterija veća je u sirevima proizvedenih od toplinski neobrađenog mlijeka (slika 4.1.)

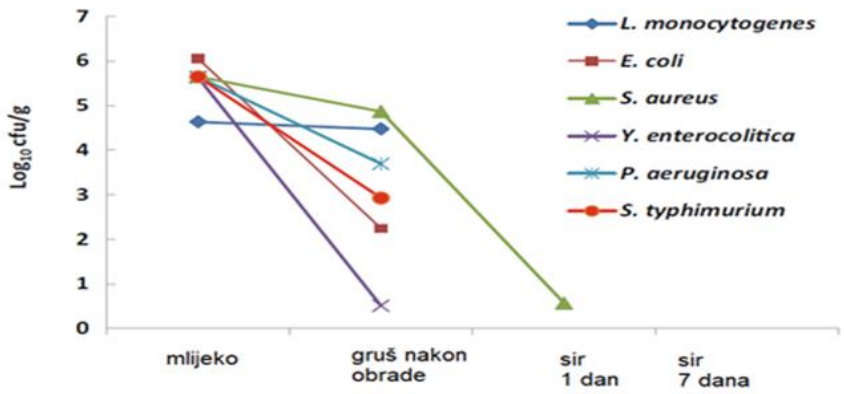
Rast mikroorganizama u siru (mljekarske kulture, patogeni) moguće je kontrolirati: snižavanjem pH vrijednosti i udjela vode, primjenom visokih temperatura pri zagrijavanju gruša u proizvodnji tvrdih sireva te povećanjem udjela soli. Iako je poznato da je za smanjenje

patogenih mikroorganizama u siru zaslužan postupak pasterizacije, danas se velika količina sireva proizvodi i od sirovog nepasteriziranog mlijeka. Yoon i sur. (2016.) navode da je u SAD-u zabilježeno 65 epidemija povezanih s konzumacijom sireva u razdoblju između 1993 i 2006. godine. Epidemije povezane sa konzumacijom sireva proizvedenih od sirovog mlijeka činile su 45%, dok je njih 58,5% bilo povezano sa konzumacijom sireva proizvedenih od pasteriziranog mlijeka.

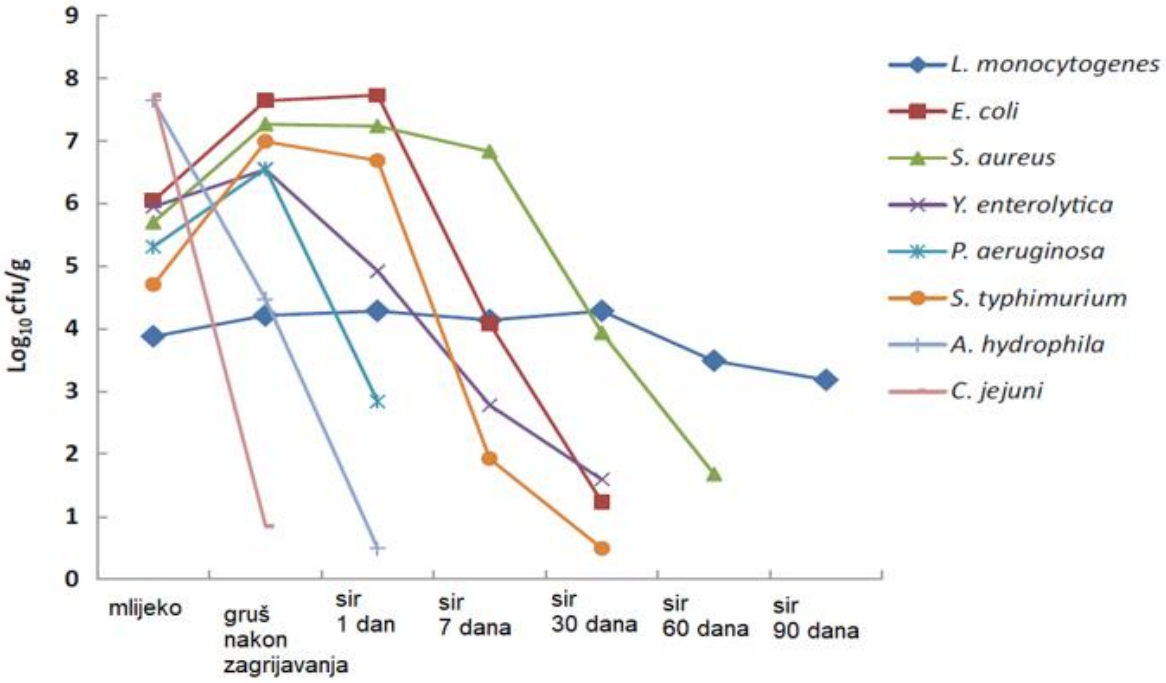


Slika 4.1. Najčešći uzročnici trovanja sirom (1973.-2006.)
Izvor: Condron i sur. 2009.

Meki sirevi u odnosu na druge vrste sira predstavljaju veći rizik za rast i preživljavanje patogenih bakterija jer imaju visoki sadržaj vode i soli te višu pH vrijednost. Proizvodnja mekih sireva ne uključuje visoke temperaturu obrade gruša (oko 35 °C) zbog čega su i uvjeti za preživljavanje patogenih bakterija povoljniji. Dodatak mljekarske mikrobne kulture doprinosi snižavanju pH vrijednosti mlijeka čime se usporava i onemogućava rast nepoželjne mikrobne populacije i patogenih mikroorganizama. Primjerice, u proizvodnji polutvrdih i tvrdih sireva koji duže zriju, mogućnost za preživljavanje patogenih mikroorganizama se smanjuje (slike 4.2. i 4.3.).



Slika 4.2. Preživljavanje bakterija *L. monocytogenes, E. coli, S. aureus, Y. enterocolitica, P. aeruginosa i S. typhimurium* na primjeru Ementalca tijekom zrenja pri 12 °C.
Izvor: Fox i sur. 2017.



Slika 4.3. *Rast* bakterija *L. monocytogenes, E. coli, S. aureus, Y. enterocolitica, P. aeruginosa i S. typhimurium*, *A. hydrophila i C. jejuni* u siru Tilzit tijekom zrenja pri temperaturi od 12 °C.
Izvor: Fox i sur. 2017.

4.1. Pojavnost bakterije *L. monocytogenes* u sirevima

U usporedbi s polutvrdim i tvrdim sirevima, moguća kontaminacija sira bakterijom *L. monocytogenes* znatno je veća za meke sireve koji sadrže visoki postotak vode, koriste se razmjerno niske temperature obrade gruša (30-35 °C), a pH vrijednost tijekom zrenja približava se neutralnoj (>6). Zbog toga, početna kontaminacija bakterijom *L. monocytogenes* u ovim vrstama sireva može biti veća i do 10 puta. Neovisno o općeprihvaćenom stavu da bakterija *L. monocytogenes* nije sposobna rasti u fermentiranim proizvodima s pH vrijednošću nižom od 5, ova bakterija u polutvrdim i tvrdim sirevima može preživjeti mjesecima i zadržati svoju patogenost. Bakterija *L. monocytogenes* može rasti na površini sira i pri temperatura pohrane sira ≥2,5°C (Havranek i sur. 2014.), a sposobnost njenog preživljavanja neovisno o vrsti sira može biti između 0,5 i 10% (tablica 4.1).

Tablica 4.1. Preživljavanje bakterije *L. monocytogenes* u različitim vrstama sireva tijekom zrenja i pohrane

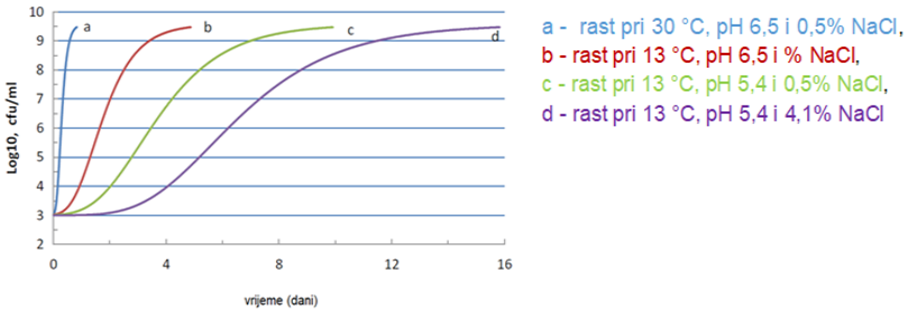
***L. monocytogenes* (log 10 cfu/g ili ml)**							
Vrsta sira	pH		Temperatura zrenja (°C)	Mlijeko	Sir		Preživljavanje (dani)
	početni	završni			Maksimum	Završni	
Cheddar	5,1	5,1	13	2,5 - 3,0	3,0 - 3,7	<1,0-1,5	70 - 440
Gauda	5,5	5,5	13	2,5	4,2	3,2	>42
Kozji sirevi	5,5	6,2	12	5 – 6	6,9	6,2	>126
Colby	5,1	5,1	4	2,5 -3	3,6 - 4,6	2,3-4,1	>140
Mozzarela	5,2	5,2	5	4 -5	<10	<10	<1
Parmesan	5,1	5,1	13	4-5	3,3 -4,3	<10	14 - 112

Izvor: Havranek i sur. 2014.

Rowe i Donaghy (2011.) navode da bakterija *L. monocytogenes* može preživjeti više od 90 dana u siru trapistu (pH 4,7-5,2) i feti (pH 4,6). Tijekom proizvodnje Mocarele, rastezanje gruša pri 66 °C kroz 5 minuta, ili pri 77 °C kroz 1 minutu može biti djelotvoran postupak kontrole pojave bakterije *L. monocytogens*.

Fox i sur. (2017.) navode da tvrdi sirevi poput Ementalca nisu pogodni za rast patogenih bakterija pa tako ni za bakteriju *L. monocytogenes* (slika 4.2.). Suprotno tome, patogene bakterije mogu preživjeti proces proizvodnje polutvrdih sireva. Tako se u siru Tilzitu, broj svih

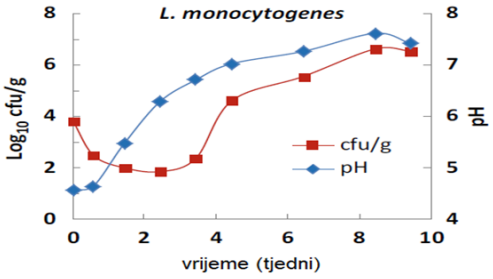
testiranih patogena (slika 4.3.) osim bakterije *L. monocytogenes*, smanjio tijekom zrenja pri 12 °C tijekom 30 dana. Stabilnost bakterije *L. monocytogenes* u siru Tilzitu može se pripisati niskim temperaturama (42 °C kroz 15 minuta) koje djeluju više bakteriostatski nego bakteriocidno. Rast bakterije *L. monocytogenes* utvrđen je na primjeru proizvodnje sira s mazom na površini primjenom različitih kombinacija temperature, pH vrijednosti i koncentracije soli (slika 4.1.1.). Rezultati analiza pokazali su da bakterija *L. monocytogenes* može rasti u sirevima s mazom na površini budući da tijekom zrenja sireva pH vrijednost raste što rezultira smanjenjem generacijskog vremena i lag-faze.



Slika 4.1.1. Rast bakterije *L. monocytogenes* pod uvjetima koji simuliraju zrenje sira s mazom na površini

Izvor: Fox i sur. 2017

Također, bakterija *L. monocytogenes* može preživjeti proces proizvodnje sira Kamamber, a najveći rast zabilježen je između 6 i 8 tjedna proizvodnje kada je pH vrijednost gotovo neutralna (slika 4.1.2.).



Slika 4.1.2. Rast bakterije *L. monocytogenes* i porast pH vrijednosti tijekom zrenja sira Kamambera

Izvor: Fox i sur. 2017.

4.2. *Preventivne mjere u cilju sprječavanja pojavnosti bakterije L. monocytogenes u mlijeku i siru*

Primjenom sustava analize opasnosti i kontrole kritičkih točaka – HACCP (engl. Hazard Analysis and Critical Control Points) s dobrom proizvođačkom i higijenskom praksom u proizvodnji sira u potpunosti nije moguće spriječiti prisutnost patogenih bakterija u siru. U smislu zdravstvene kontrole i sprječavanja kontaminacije sira patogenim bakterijama postoje brojne preventivne mjere, od kojih se ni jedna ne smije izostaviti. U slučaju *L. monocytogenes* pasterizacija mlijeka je najučinkovitija zdravstvena mjera u sprječavanju moguće infekcije. Međutim, od trenutka zgrušavanja mlijeka svakim tehnološkim postupkom u izradi sira, zbog ubikvitarne prirode ove bakterije, moguća je kontaminacija ovom bakterijom. Preživljavanje *L. monocytogenes* u siru izravno je uvjetovano tehnološkim postupcima za pojedinu vrstu sira. Zbog toga preventivne mjere obuhvaćaju kontrolu brzine i količine stvorene mliječne kiseline, temperature obrade gruša i zrenja sira, aktiviteta vode, koncentracije soli i pH vrijednosti sira. U nekim je zemljama zbog toga obavezno zrenje sira proizvedenog od sirovog mlijeka najmanje 60 dana (Havranek i sur. 2014.). Uvođenjem HACCP sustava kao načina kontrole procesa proizvodnje smanjen je rizik kontaminacije proizvoda bakterijom *L. monocytogenes*. Uz provođenje HACCP sustava važno je odrediti učestalost uzorkovanja proizvoda i opreme korištene u proizvodnji na prisutnost bakterije *L. monocytogenes*.

Općenito, za proizvodnju kvalitetnog mlijeka potrebno je:

- higijenski provesti mužnju
- ohladiti mlijeko na što nižu temperaturu
- osigurati zatvoren sustav rukovanja mlijekom
- osigurati što kraće hladno skladištenje mlijeka (4°C i niže)
- osigurati što kraći transport mlijeka uz obavezno hlađenje
- omogućiti čistoću svih uređaja, aparature i opreme
- mlijeko što prije toplinski obraditi (pasterizacija ili sterilizacija)
- mlijeko što prije preraditi.

4.2.1. Sanitacija

Svaka mljekara mora imati plan učestalosti sanitacije koja uključuje precizne rasporede pranja i dezinfekcije opreme, uređaja, podova, zidova, mljekovoda, rashladnih spremnika itd. Od velike važnosti je odabir adekvatnih preparata za čišćenje i dezinfekciju koje je potrebno redovito mijenjati kako bi se prevenirala mogućnost stvaranja rezistencije bakterije *L. monocytogenes* na određene preparate. Najučinkovitijim kemijskim sredstvima protiv bakterije *L. monocytogenes* u procesu sanitacije mljekarske opreme navode se jodoform, kvaterni amonijevi spojevi, peroctena kiselina i otopine bazirane na klorovom dioksidu. Preparate bazirani na jodoformu preporuča se koristiti u mljekarstvu budući da njihove rezidue ne inaktiviraju mljekarske kulture. Doza od 200 ppm jodoforma koja djeluje 10-20 minuta smatra se učinkovitom za uklanjanje bakterije *L. monocytogenes* sa opreme i ostalih površina. Efikasnost jodoforma se smanjuje pri temperaturi <4 °C, a pri visokim temperaturama je nestabilan. Kvaterni amonijevi spojevi nisu preporučeni za direktnu uporabu na površinama koje su u direktnom kontaktu za hranom budući da i najmanje rezidue kvaternih amonijevih spojeva inaktiviraju mljekarske kulture. Vrlo su efikasni za pranje podova, odvoda i zidova. Peroctena kiselina koristi se bez ograničenja i restrikcija na svim površinama i opremi. Dokazano djeluju na mogućnost stvaranja biofilma. Otopine na bazi klorovog dioksida su efikasne za dezinfekciju nekorodirajućih površina. Para se može koristiti kao alternativa kemijskim dezinfekcijskim sredstvima. Upotreba pare trebala bi biti ograničena na opremu koja se teško pere i čisti i zatvorene sustave, budući da dolazi do stvaranja aerosola i kondenzata na opremi. Vruća voda (>82 °C) može se kombinirati sa dezinficijensima ukoliko proizvođač dopušta pripremu u toploj vodi i na ovaj način dolazi do povećanja efikasnosti dezinficijensa. Kada se koriste kemijski dezinficijensi, tvrdoća vode se mora uzeti u obzir, a koncentracija sredstva utvrđena od strane proizvođača se mora poštovati. Upotreba detergenata i dezinficijensa u kombinaciji se ne preporuča jer dezinficijensi zahtijevaju određeno vrijeme u kontaktu sa opremom ili površinom kako bi bili učinkoviti. U sanitacijskim procesima optimalnije je zasebno korištenje dezinficijensa i detergenata. Podovi i odvodi se ne bi trebali čistiti vodom pod visokim tlakom da bi se spriječilo stvaranje kontaminiranih aerosola u pogonu, što lako može dovesti do kontaminacije proizvoda. Oprema koja se koristi za čišćenje nakon upotrebe se mora oprati i dezinficirati kvaternim amonijevim spojevima

(600-1000 ppm). Nakon provedenih sanitacijskih procesa poželjno je da sve površine i oprema budu suhe (Kasalica i sur. 2011.).

5. Zaključak

Na temelju proučene literature može se zaključiti:

- Bakterija *L. monocytogenes* je uzročnik listerioze, bolesti sa izuzetno visokom stopom smrtnosti do čak 40%.
- Zbog svoje sposobnosti rasta i razmnožavanja u različitim uvjetima tijekom proizvodnog procesa, predstavlja izuzetno veliku opasnost u prehrambenoj industriji.
- Može kontaminirati mlijeko i mliječne proizvode ali s obzirom da je termolabilna, pasterizacija može biti učinkovit postupak za smanjenje njene pojavnosti.
- Preživljavanje u siru izravno je uvjetovano tehnološkim postupcima za određenu vrstu sira. U usporedbi s polutvrdim i tvrdim sirevima, moguća kontaminacija sira *L. monocytogenes* znatno je veća za meke sireve je sadrže više vode te kraće ili uopće ne zriju.

6. Literatura

1. Antunac N., Havranek J. (2013). Higijenska kvaliteta mlijeka. Mlijeko- kemija, fizika i mikrobiologija. Sveučilišni udžbenik u e-izdanju. Zagreb. 157-191.

2. Tahoun A. B.. M. B., Abou Elez R. M. M., Abdelfatah E.N., Elsohaby I., El-Gedawy A.A., Elmoslemany A.M. (2017). Listeria monocytogenes in raw milk, milking equipment and dairy workers: Molecular characterization and antimicrobial resistance patterns. Journal of global antimicrobal resistance. Vol 10: 264-270.

3. Bachman 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 (3): 476-483.

4. Bačić G. (2010). Uzročnici mastitisa. Mljekarski list 7. Zagreb. 10-11.

5. Barun G., Dobranić V., Filipović I., Severin K., Grbavac J., Zdolec N. (2016). Sastav mikroflore mekih, polutvrdih i tvrdih sireva na hrvatskom tržištu. Hrvatski veterinarski vjesnik. 24/2016., 7-8: 80-85.

6. Bernini V., Bottari B., Dalzini E., Sgarbi E., Lazzi C., Neviani E., Gatti M. (2013). The presence, genetic diversity and behaviour of Listeria monocytogenes in blue-veined cheese rinds during the shelf life. Food Control. Volume 34. Issue 2: 323-330.

7. Božanić R., Jeličić I., Bilušić T. (2010). Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda. Plejada, Zagreb.

8. Bubonja M., Vučković D., Rubeša-Mihaljević R., Abram M. (2007). Činitelji bakterije i domaćina u patogenezi listerioze. Medicina. 43: 15-20.

9. Buchanan R. L., Gorris L. G., Hayman M. M., Jackson T. C., Whiting R. C. (2017). A review of Listeria monocytogenes. An update on outbraks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. Food Control. 75: 1-13.

10. Castro H., Ruusunen M., Lindsröm M. (2017). Occurrence and growth of Listeria monocytogenes in packaged raw milk. International Journal of Food Microbiology. 261: 1-10.

11. Choi K-H, Lee H., Lee S., Kim S, Yoon Y. (2016). Cheese Microbial Risk Assessments- A review. Asian- Australasian Journal of Animal Sciences. Vol. 29. No.3: 307-314.

12. Condron, R., Desmarchelier, P., Dyson, R., Eddy, D., Hammond, L., Kirk, M., MacBean, R., O´Regan, J., Rice, S., Robertson, J.,Willman, N., Oakley, L. (2009). Microbiological Risk Assessment of Raw Milk Cheese. Food Standards Australia and New Zeland. 1-264.

13. Dalzini E., Bernini V., Bertasi B., Daminelli P., Losio M-N., Varisco G (2016). Survey of prevalence and sesonal variabilty of Listeria monocyogenes in raw cow milk from Northern Italy. Food Control 60: 466-470.

14. Donnelly C.W. (2004). Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese. U: Cheese: Chemistry, physics and microbiology. Third Edition (Fox P. F., McSweeney P. L. H., Cogan T. H., Guinee T. P., ur.) Vol.1., Elsevier Academic Press, 541-559.

15. Doret L., Veiga-Chacon E., Cossart P. (2009). Listeria monocytogenes. U: Encyclopedia of microbiology, Third edition (Baldauf S. L., Baross, J. A., Baulcombe D. C., Fierer J., Haselkorn R., Hopwood D. A., Ingraham J. L., Laskin A. I., Levin B. R., Schmidt T. M., Summers W. C., White J. F., ur.). Elsevier Inc.,182-198.

16. European Food Safety Autority: EFSA Panel on Biological Hazards (2015). Scientific Opinion on the public health risks related to consumpsion of raw drinking milk. EFSA Journal 13 (1): 3940.

17. Fox P. F, Guinee T. P., Cogan T. M., McSweeny P. L. H. (2000). Pathogens in Food-Poisoning Bacteria in Cheese. U: Fundaments of Cheese science (Fox P. F, Guinee T. P., Cogan T. M., McSweeny P. L. H., ur.). Aspen Publishers Inc. 484-512.

18. Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M., McSweeny P. L. H. (2017). Pathogens in Cheese and Foodborne Illnesses. U: Fundamentals of cheese science. Second edition (Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M., McSweeny P. L. H., ur.). Springer, New York. 681-713.

19. Fox P.F., Guinee T.P., Cogan T.M., McSweeny P.L.H. (2017). Bacteriology of Cheese Milk. U: Fundamentals of cheese science. Second edition (Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M., McSweeny P. L. H., ur.). Springer, New York. 105-120.

20. Frenk J. F., Hasan A.N. (2002). Microorganisms associated with milk. U: Encyclopedia of Dairy Science. First edition (Fuquay J. W., Fox P. F.). Vol 3, Academic Press. 1786-1796.

21. Havranek J., Kalit S., Antunac N., Samaržija D. (2014). Sirarstvo. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb.

22. Havranek J., Rupić V. (2003). MLIJEKO od farme do mljekare. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

23. Hunt K., Drummond N., Murphy M., Butler F., Buckley J., Jordan K. (2012). A case of bovine raw milk contamination with Listeria monocytogenes. Irish Veterinary Journal, 65:13.

24. Hunjak B., Pešić Z. (2013). Značaj infekcije listerijom u trudnica i novorođenčadi, Hrvatski časopois za javno zdravstvo, Vol. 9, broj 36, 127- 137.

25. Jamali H., Radmehr B., Thong K.L. (2013). Prevalence, characterisation, and antimicrobal resistance of Listeria species and Listeria monocytogenes isolates from raw milk in farm bulk tanks. Food Control 34: 121-125.

26. Kasalica A., Vuković V., Vranješ A., Memiši N. (2011). Listeria monocytogenes IN MILK AND DAIRY PRODUCTS. Biotechnology and Animal Husbandry. 27 (3): 1067-1082.

27. King N., Lake R., Cresey P. (2014). Risk profile: Listeria monocytogenes in raw mlik. Client report FW13052: 1-71.

28. Kirin S. (2016). Sirarski priručnik. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb. 1-197.

29. Kockot A. M., Olszewska M. A. (2017). Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by Listeria monocytogenes in a food processing context. LWT – Food Science and Technology, 84. 47-57.

30. Kolarec K. (2009). Usporedba klasičnih mikrobioloških i molekularnih metoda u rutinskoj potvrdi bakterije Listeria monocytogenes iz tradicionalno mliječnih proizvoda s područja grada Zagreba. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

31. Kousta M., Mataragas M., Skandamis, Drosinos E.H. (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. Food Control 21: 805-815.

32. Kozačinski L., Cvrtila Ž., Hadžiosmanović M., Majnarić D., Kukuruzović B. (2003). Mikrobiološka ispravnost mlijeka i mliječnih proizvoda. Mljekarstvo 53 (1): 17-22.

33. Magadalenić B. (1993). Značaj nalaza Listeria monocytogenes u mlijeku i mliječnim proizvodima. Mljekarstvo 43 (1) 11-21.

34. Magalhães R., Mena C., Ferreira V., Silva J., Almeida G., Gibbs P., Teixera P. (2014). Listeria monocytogenes,. U: Encyclopedia of food saftey. First edition. Vol. 1., Elsevier Inc., 450-461.

35. Mansouri-Najand L., Kianpour M., Sami M., Jajarmi M (2015). Prevalence of Listeria monocytogenes in raw milk in Kerman, Iran. Veterinary Research Forum, 6 (3): 223-226.

36. Markov K., Frece J., Čvek D., Delaš F. (2009). Listeria monocytogenes i drugi kontaminanti u svježem siru i vrhnju domaće proizvodnje s područja grada Zagreba. Mljekarstvo 59 (3), 225-231.

37. Paulin S., King N., Lake R., Cresey P. (2015). Risk profile update: Listeria monocytogenes in cheese. Client report FW13049: 1-119.

38. Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2008). Narodne novine broj 74.

39. Pravilnik o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji (2016). Narodne novine broj 84.

40. Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (2017). Narodne novine broj 27.

41. Prentice G.A. (1997). Značaj patogenih mikroorganizama u sirovom mlijeku. Mljekarstvo 47 (2) 147-162.

42. Rowe M., Donaghy J. (2011). Microbiological Aspects of Dairy Ingredients. U: Dairy Ingredients for Food Processing. First Edition (Ramesh C. C., Kilara A., ur.) Blackwell Publishing Ltd. Chapter 3: 59-101.

43. Rupić V. (2009). Zaštita zdravlja domaćih životinja – zarazne i parazitske (nametničke) bolesti, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

44. Ryser E. T. (2011). Listeria monocytogenes. U: Encyclopedia of dairy sciences. Second edition (Foquay J. W., Fox P. F., Mc.Sweeney P. L. H., ur.). Vol 4: 81-86.

45. Ryser, E.T. (2001). Public Health Concerns U: Applied Dairy Microbiology. Second Edition (Marth E.H., Steele J.L., ur.). Marcel Dekker Inc., New York. 458-465.

46. Sabadoš D. (1996). Kontrola i ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda. Udžbenik Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

47. Samaržija D. (2014). Biološki kontaminanti mlijeka i mliječnih proizvoda. U: Sigurnost hrane (Havranek J., Tudor Kalit M., ur.). M.E.P., Zagreb, 148-160.

48. Samaržija D. (2014). Interna skripta iz modula Mljekarska mikrobiologija. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet.

49. Samaržija D. (2015). Klasične i molekularne metode U: Fermentirana mlijeka (Samaržija D). Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb. 32-33.

50. Samaržija D., Podoreški M., Sikora S., Skelin A., Pogačić T. (2007). Mikroorganizmi – uzročnici kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda. Mljekarstvo 57 (4): 251-273.

51. Sukalić T., Končurat A., Pavljak I., Jurmanović J., Lohman Janković I. (2016). Bakteriološke metode detekcije Listeria spp. i prevalencija Listeria monocytogenes iz uzoraka dostavljenih po pobačaju domaćih papkara u razdoblju 2008. – 2016. Zbornik radova 6. veterinarskog kongresa (Harapin I., ur.), Opatija. 219-227.

52. Todd E. C. D., Notermans S. (2011). Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, Listeria monocytogenes. Food Control. Volume 22: 1484-1490.

53. Uredba (EZ) br. 178/2002 Europskog parlamenta i Vijeća od 28. siječnja 2002. o utvrđivanju općih načela i uvjeta zakona o hrani, osnivanju Europske agencije za sigurnost hrane te utvrđivanju postupaka u područjima sigurnosti hrane.

54. Uredba (EZ) br. 853/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o utvrđivanju određenih higijenskih pravila za hranu životinjskog podrijetla.

55. Uredba komisije (EZ) br. 2073/2005 od 15.studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu.

56. Yoon Y., Lee S., Choi K-H. (2016). Microbial benefits and risks of raw milk cheese. Food Control 63: 201-215.

57. Zakon o hrani (2013). Narodne novine broj 81.

58. Zdolec N., Dobranić V., Filipović I., Krga M., Mikulec N. (2016). Nalaz patogenih bakterija i bakterija kvarenja u mlijeku iz mljekomata. Zbornik radova 6. veterinarskog kongresa (Harapin I., ur.), Opatija. 155-160.

Elektronički izvori

1. http://veterina.com.hr/?p=7273 pristupljeno 30.11.2017.

2. http://www.msdvetmanual.com/generalized-conditions/listeriosis/overview-of-listeriosis#v4736338 pristupljeno 30.11.2017.

3. https://www.fda.gov/downloads/food/guidanceregulation/ucm252447.pdf pristupljeno 20.5.2017

4. https://www.hah.hr/wp-content/uploads/2015/10/ZM-o-mikrobioloskim-opasnostima-u-svjezim-i-polutvrdim-sirevima.pdf pristupljeno 8.6.2018.

5. https://www.hah.hr/wp-content/uploads/2015/10/znanstveno-misljenje-o-javno-zdravstvenom-riziku-vezanom-za-konzumaciju-sirovog-mlijeka-novo.pdf pristupljeno 26.05.2017.

Životopis

Petra Petričko Pučar rođena je 20. kolovoza 1990. godine u Zagrebu. Završila je osnovnu školu u Svetoj Nedjelji i X. gimnaziju „Ivan Supek“ u Zagrebu. Godine 2009. upisala je preddiplomski studij Nutricionizma na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu, s kojeg odlazi na preddiplomski stručni studij Prehrambene tehnologije na Veleučilištu u Karlovcu 2013. godine, a završila ga je 2015. godine obranom teme završnog rada „Fizikalno-kemijski parametri cvjetnog meda kontinentalne Hrvatske“ pod vodstvom dipl. ing. Ines Cindrić. Godine 2015. upisala je diplomski studij „Proizvodnja i prerada mlijeka“ na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.