Potencijal rasta bakterije Listeria monocytogenes u mekim sirevima

Dodić, Dina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:766040

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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



Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Dina Dodić

POTENCIJAL RASTA BAKTERIJE *Listeria monocytogenes* U MEKIM SIREVIMA

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2017.

VETERINARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
ZAVOD ZA HIGIJENU, TEHNOLOGIJU I SIGURNOST HRANE

Predstojnica:

Izv. prof. dr. sc. Vesna Dobranić

Mentor :

Doc. dr. sc. Nevijo Zdolec

Članovi povjerenstva :

1. **Izv.prof.dr.sc. Vesna Dobranić**
2. **Prof.dr.sc. Lidija Kozačinski**
3. **Doc.dr.sc. Nevijo Zdolec**
4. **Doc.dr.sc. Suzana Hađina (zamjena)**

Zahvala

Zahvaljujem se mentoru, dr.sc. Neviju Zdolecu na cjelokupnoj pomoći, podršci i znanju koje mi je pružio u izradi ovog diplomskog rada.

Najveće hvala mojim roditeljima bez kojih moja obrazovna avantura na veterinarskom fakultetu ne bi bila moguća. Roditelji, sestre, Stela, Roni i rodbina pružali su mi ljubav i podršku tokom cijelog studija i na taj način mi pomogli da uspješno prijeđem sve stepenice do ostvarenja snova. Također, zahvaljujem se svojim prijateljima zbog kojih će mi godine provedene na studiju u Zagrebu ostati u predivnom sjećanju.

Rad posvećujem noni Marici koja je imala iste snove, ali nije imala mogućnosti da ih ostvari.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA 3
2.2. Karakteristike mekih sireva 4
2.2.1. Proizvodnja mekih sireva 5
2.2.2. Škripavac 5
2.3. Nalaz bakterije L. monocytogenes u mlijeku i mliječnim proizvodima 9
2.4. Sukladnost gotove hrane s kriterijima za bakteriju L. monocytogenes 11
2.4.1. Mikrobiološki kriteriji: L. monocytogenes – kriteriji sigurnosti hrane 11
2.4.2. Mikrobiološki kriteriji u odnosu na higijenske zahtjeve i HACCP 12
2.4.3. Ispitivanje roka trajanja 12
2.4.4. Karakteristike proizvoda i znanstvena literatura 13
2.4.5. Historical data ili prethodno dobiveni rezultati 14
2.4.6. Mikrobiološko matematičko modeliranje 14
2.4.7. Specifična laboratorijska istraživanja 14
3. MATERIJAL I METODE 16
3.1. Uzorkovanje 16
3.2. Laboratorijska ispitivanja 16
3.2.1. Test trajnosti 16
3.2.2. Challenge test 16
4. REZULTATI 18
4.1. Test trajnosti 18
4.2. Challenge test 21
5. RASPRAVA 25
6. ZAKLJUČCI 28
7. LITERATURA 29
8. SAŽETAK 32
9. SUMMARY 33
10. ŽIVOTOPIS 34

1. UVOD

Istraživanje sposobnosti rasta bakterije *Listeria monocytogenes* važno je u hrani koja pogoduje njenom rastu, poput mekih sireva, zbog predviđanja sigurnosti proizvoda u zadanom roku trajanja i uvjetima pohrane. Sir je općenito vrlo cijenjena namirnica u prehrani ljudi, čemu svjedoči podatak FAOSTAT-a (eng. *Food and agriculture Organization of the United Nations*) o svjetskoj proizvodnji sira koja je u 2016. godini iznosila 22 937 tona. U Hrvatskoj postoji stoljetna tradicija proizvodnje sira koja je u odnosu na svjetsku proizvodnju relativno malog obujma, ali iznimne kvalitete. Primjerice, u 2016. godini ukupna proizvodnja sira u Hrvatskoj iznosila je 35, 670 tona (ANON., 2016a.).

Bakterija *L. monocytogenes* je patogeni, ubikvitaran, prilagodljiv i otporan mikroorganizam rasprostranjen širom svijeta. Naznačajnija je u rodu *Listeria* a prenosi se uglavnom hranom (CRESSEY i LAKE, 2007.). Izvor kontaminacije sirovog mlijeka sa L. monocytogenes može biti onečišćeno vime i oprema za mužnju, te životinje koje boluju od listerijskog mastitisa. Iako je njegova pojava rijetka, listerijski mastitis može rezultirati visokom koncentracijom bakterije u mlijeku. Postoje izvještaji o prisutnosti ove bakterije u sirevima od nepasteriziranog mlijeka gdje je izvor zagađenja bila životinja sa subkliničkim listerijskim mastitisom (PAULIN i sur., 2015.).

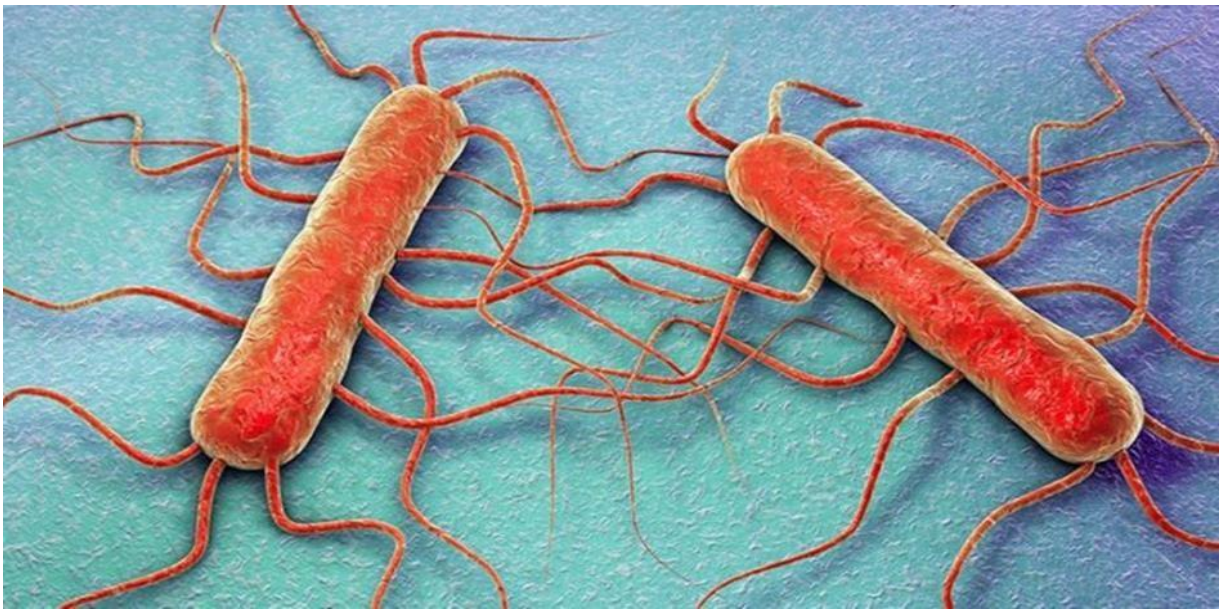
Najčešće kontaminirane namirnice su meso, mlijeko, sir, riba, povrće. Bakterija uzrokuje listeriozu, bolest životinja i ljudi (zoonoza). Veliki obujam proizvodnje mlijeka i mliječnih proizvoda predstavlja značajan rizik širenja ove bakterije te je važno spriječiti potencijalni rizik za zdravlje konzumenata. Upravo zato je potrebno kontrolirati mikrobiološku kakvoću mlijeka kao sirovine za samu proizvodnju, te sirarskih proizvoda. U usporedbi s drugim trovanjima, broj oboljelih od listerioze je nizak, ali ono što predstavlja problem je visoka smrtnost, čak 30%. Ova bakterija je u mikrobiologiji sira najvažniji hranom prenosivi patogen, uglavnom u fazi nakon proizvodnje. Preživljavanje i patogenost u sirevima ovisi uglavnom o različitim uvjetima proizvodnje, zrenja i uskladištenja sireva. Među važnim čimbenicima za rast *L. monocytogenes* u hrani su pH i aktivitet vode, temperatura i način pakiranja (VRDOLJAK i sur., 2016.).

S obzirom na navedeno, cilj ovog rada je utvrditi kako unutarnji (karakteristike hrane) i vanjski čimbenici (uvjeti proizvodnje, pakiranja i skladištenja) djeluju na rast bakterije *L. monocytogenes* u siru škripavcu kao predstavniku skupine hrvatskih mekih sireva.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Općenito o bakteriji *Listeria monocytogenes*

Bakteriju *Listeria monocytogenes* je 1926. godine Murray izolirao iz kunića te je prvi puta detaljno opisana. To je gram-pozitivna, kratka štapićasta bakterija koja ne stvara spore. Za njen rast optimalna je temperatura 30-37 ˚C (1-45˚C), može rasti uz pH 5.0-9.0, aerobna je do fakultativno anaerobna. Sol je ne uništava, pa tako može preživjeti u salamuri.



Slika 1. *Listeria monocytogenes*

Izvor: http://www.biocote.com/wp-content/uploads/bfi_thumb/Listeria-monocytogenes_img-mxciptzyaixmqunmm5bdhguucj0siw75z6y48dmfv0.jpg (30.5.2017.)

Listeria monocytogenes je za životinje i ljude patogeni mikroorganizam koji se prenosi hranom, ubikvitaran, prilagodljiv i otporan, preživljava temperaturu hladnjaka. Ako se trudnica zarazi ovom bakterijom, moguć je transplacentalni prijenos uzročnika na fetus i posljedično oštećenje embrija, pobačaj ili smrt fetusa. Inače, kod ljudi može zahvaćati gornji dio dišnog sustava, što uključuje i limfne žlijezde (MAGDALENIĆ, 1993.).

Većina zdravih ljudi nakon konzumacije neće pokazati neke ozbiljnije simptome od febrilnog gastroenteritisa, ali kod onih sa oslabljenim imunološkim sustavom, trudnica,

novorođenčadi i starijih osoba listerioza može uzrokovati meningitis, infekciju mozga i ozbiljne krvožilne infekcije. Ukoliko se listerioza klinički manifestira, može se liječiti produljenom primjenom antibiotika, ali je prognoza loša za ozbiljne, invazivne infekcije (ANON., 2016b.). Od životinja najčešće pogađa goveda te kod njih uzrokuje encefalitis, mastitis i pobačaj.



Slika 2. Kolonije *L. monocytogenes*

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/51589087_fig1_Figure-1-HBA-plate-streaked-with-Listeria-A-sterile-inoculating-loop-was-used-to (30.5.2017.)

2.2. Karakteristike mekih sireva

Sirevi su svježi proizvodi ili proizvodi s različitim stupnjem zrelosti koji se proizvode odvajanjem sirutke nakon koagulacije mlijeka (kravljeg, ovčjeg, kozjeg, bivoljeg mlijeka i/ili njihovih mješavina), obranog ili djelomično obranog mlijeka, vrhnja, sirutke, ili kombinacijom navedenih sirovina. U proizvodnji sireva dozvoljeno je upotreba starter kultura, sirila i/ili drugih odgovarajućih koagulacijskih enzima i/ili dozvoljenih kiselina za koagulaciju, natrij-klorid, pitka voda i odgovarajući neškodljivi enzimi koji doprinose razvitku okusa.

Meki sirevi u bezmasnoj tvari sira sadrže više od 67% vode, a minimalan period zrenja mekih sireva je sedam dana. Zrenje mekih sireva se može provoditi:

- djelovanjem plemenitih plijesni na površini i/ili unutrašnjosti sira,

- djelovanjem bakterija na površini sira,
- u salamuri.

2.2.1. Proizvodnja mekih sireva

Proizvodnja mekih sireva odvija se u nekoliko tehnoloških faza:

1. ZRENJE MLIJEKA - obratiti pažnju na temperaturu, trajanje, količinu mljekarske kulture
2. DODAVANJE SIRILA, KOAGULACIJA - koristiti čistu opremu, između dvije upotrebe odlagati pomagala tako da ne dođe u dodir sa tlom potrebno je provjeravati kvalitetu sirila, savladati tehniku izuzimanja
3. SOLJENJE, STAVLJANJE U KALUPE - mora se koristiti visokokvalitetna sol i čuvati je u suhom i čistom prostoru, koristiti čiste kalupe i uvijek održavati higijenu ruku
4. CIJEĐENJE/OKRETANJE - čista oprema, higijena ruku, primjerena temperatura tokom cijeđenja
5. VAĐENJE IZ KALUPA - iznimno važna higijena ruku
6. SUŠENJE - odgovarajuća temperatura i relativna vlaga
7. PAKIRANJE - čisto skladište za ambalažu
8. ČUVANJE I SKLADIŠTENJE - nakon pakiranja proizvod što prije staviti u hladnjak
9. TRANSPORT I PRODAJA - proizvodi se smiju transportirati u termo-izoliranim kutijama, s time da su prethodno rashlađeni u hladnjači ili hladnjaku na 4-8 °C

2.2.2. Škripavac

Sir škripavac je autohtoni hrvatski punomasni meki sir koji se proizvodi na području Like i Korduna, na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima (MAGDIĆ i sur., 2006.). Škripavac je meki sir koji se proizvodi bez zrenja, koagulacijom pasteriziranog ili sirovog

mlijeka uz pomoć sirila ili neke zamjene za sirilo uz izdvajanje sirutke. Svoje specifično svojstvo škripavosti zadržava 7-14 dana od proizvodnje, stoga se preporuča konzumacija u tom periodu od proizvodnje.

Škripavac ima pravilni cilindrični oblik, prosječna masa iznosi 1200±240 grama, prosječni promjer iznosi 13 cm, visine 4-7 cm. Po površini je bijele, mliječne boje bez kore, na presjeku zatvoren sa manjim brojem mehaničkih otvora koji su nastali zadržavanjem sirutke u toku prešanja, konzistencija gumasta i škripi prilikom konzumiranja, a okus je mliječnoslatkast i umjereno slan.



Slika 3. Škripavac

Izvor: http://narodni.net/wp-content/uploads/2012/01/licki-sir-skripavac.jpg (10.5.2017.)

Prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sira (NN br. 20/09; ANON., 2009.) pripada skupini punomasnih, mekih sireva koji sadrži najmanje 45% masti u suhoj tvari sira i prosječno 70,25% vode u bezmasnoj tvari sira, odnosno manje od 67% vode u bezmasnoj tvari sira te manje od 50% suhe tvari. Slabo je izražene slanosti s prosječnim sadržajem soli od 1,16% soli u siru i slatkastomliječnog okusa gdje je prosječna pH vrijednost sira 5,86 pH jedinica. Rezultati analiza kemijskog sastava prikazani u tablici 1 (KALIT, 2010.) pokazuju značajna variranja u kemijskom sastavu sira iz čega je jasno da je standardizacija tehnologije nužna kako bi se smanjila spomenuta varijabilnost.

Tablica 1. Prosječni kemijski sastav sira škripavca (KALIT, 2010.)

Mjerljivi kemijski parametri	N	$\bar{x}$	sd
Mast (%)	15	24,67	± 4,38
Proteini (%)	15	17,20	± 1,45
Suha tvar (%)	15	47,10	± 4,94
Mast u suhoj tvari (%)	15	52,87	± 6,00
Sol (%)	15	1,16	± 0,64
pH	15	5,86	± 0,50

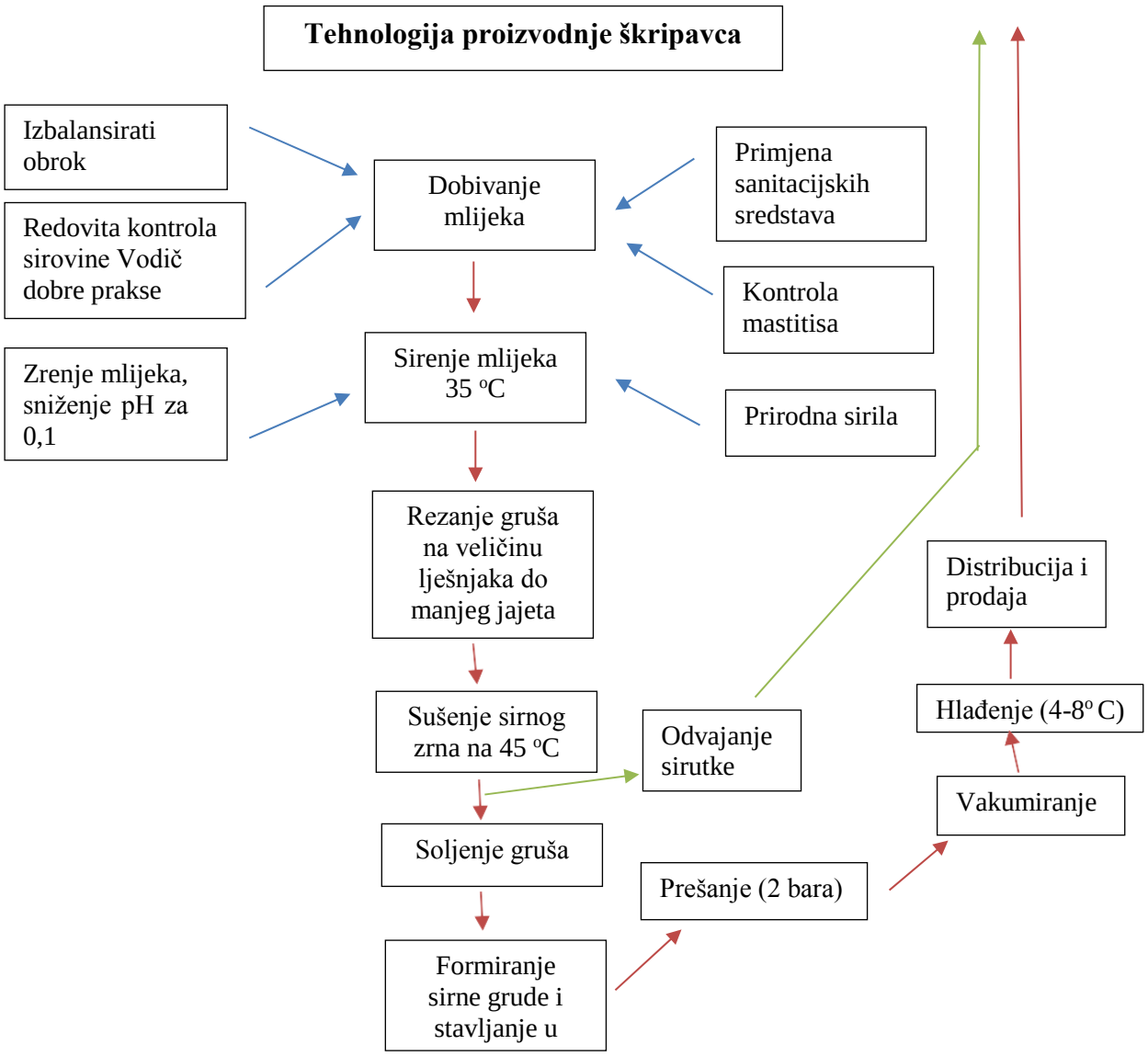
Za proizvodnju sira škripavca koristi se svježe pomuženo i procijeđeno mlijeko jutarnje ili večernje mužnje koje se obično siri sirovo neposredno poslije mužnje ili nakon kraćeg zrenja mlijeka na sobnoj temperaturi. U industrijskim uvjetima mlijeko za sirenje podvrgava se postupku niske i srednje pasterizacije, pri čemu se koristi mlijeko jutarnje i večernje mužnje. Mlijeko za sirenje ponekad se soli s oko 2% soli te se temperira na 32-34 °C.

U zagrijano mlijeko dodaje se prirodno sirilo najčešće u obliku granula. Sirilo u prahu prethodno se aktivira kroz 15 minuta u mlakoj vodi (15-25°C). Sirilo se dodaje postepeno uz stalno miješanje u trajanju od minute, a zatim se mlijeko pokriva i ostavlja mirovati. Sirenje traje 30 minuta s varijacijama od 25 do 40 minuta. Kakvoća gruša provjerava se „prstnom probom“ pri čemu gruševina pod prstima puca poput porculana, a izdvojena sirutka ima zelenu boju. Zatim se sirni gruš reže na veličinu manjeg oraha do lješnjaka.

Gruš se ostavlja u sirutci do 10 minuta pri čemu se lagano miješa (ručno ili automatskim mješalicama) uz podizanje temperature do 45°C. Kada se postigne zadana temperatura gruš stoji još 10 minuta pokriven, iza čega se izdvaja dio sirutke. U gruš se dodaje oko 2% te se formira sirna gruda (uglavnom rukom laganim pritiskivanjem u trajanju od 10-15 minuta). U tople kalupe, u koje se stavlja sirna marama srednje gustog tkanja (ili specijalni gusta mreža sastavljena od mikroperforacija, a koja zamjenjuje kalupe), slaže se sirna gruda.

Formirani sir u kalupu umjereno se preša režimom od 2 bara ili 3-5 kg po siru. Prešanje traje od 1 do 2 sata. Nakon prešanja sir se vadi iz kalupa, vakumira, označava te se čuva u hladnjaku na temperaturi od 4 °C do 8 °C do prodaje ili konzumira.

Obično se sir škripavac konzumira unutar tjedan dana, jer samo u tom vremenu zadržava svoje karakteristično svojstvo – škripi pod zubima. Za proizvodnju 1 kg sira škripavca potrebno je prosječno 7 litara mlijeka, s varijacijama od 6 do 9,5 L.



Slika 4. Shematski prikaz proizvodnje sira škripavac (KALIT, 2010.)

2.3. Nalaz bakterije *L. monocytogenes* u mlijeku i mliječnim proizvodima

Tijekom proizvodnje mlijeka i mliječnih proizvoda prisutnost bakterije je u najvećem broju slučajeva posljedica onečišćenja nakon pasterizacije. S obzirom da se može razmnožavati na niskim temperaturama te preživljavati na temperaturama zamrzavanja, ukoliko je prisutna u mlijeku, siru, sladoledu i ostalim mliječnim proizvodima, za zdravlje potrošača predstavlja opasnost (KASALICA i sur., 2011.).

Brojni autori istraživali su mikrobiološku kvalitetu mlijeka i mliječnih proizvoda na tržištu, a s obzirom na uvjete i način proizvodnje (domaćinstvo: industrija). KOZAČINSKI i sur. (2003.) su proveli mikrobiološku analizu 802 uzorka konzumnog mlijeka i mliječnih proizvoda s križevačkog tržišta, od 11 proizvođača s područja sjeverozapadne Hrvatske. Ukupno 147 (18,33%) uzoraka nije zadovoljilo mikrobiološke standarde, i to 42,86% kozjih mlijeka, 36,36% voćnih jogurta, 33,33% slatkog vrhnja, 31,51% kiselog vrhnja, 26,77% mekih (svježih) sireva, 20,51% konzumnog mlijeka, 20,00% sirnih namaza, 15,00% polutvrdih sireva, 2,63% maslaca, 1,72% topljenih sireva i 1,16% jogurta. Međutim, iako priličan broj analiziranih uzoraka nije bio mikrobiološki zadovoljavajuć, niti u jednom nije pronađena *L. monocytogenes.* S druge strane MARKOV i sur. (2009) su pretražili 120 uzoraka sira i vrhnja na zagrebačkim tržnicama od čega je 10 uzoraka bilo pozitivno na *L. monocytogenes,* što je dokazano klasičnim mikrobiološkim metodama, zatim je PCR-metodom bakterija potvrđena u samo jednom uzorku vrhnja. DORNAI (2012.) je pretraživanjem 36 uzoraka mlijeka i proizvoda na bazi mlijeka izvjestila o 6 (16,67%) pozitivnih na *L. monocytogenes,* od čega 10% otpada na sirovo mlijeko i svježi sir, 30 % na uzorke domaćeg vrhnja, a 16,67% na kremaste kolače.

EFSA-ino izvješće iz 2013. godine kaže da se uzorkovanje neke gotove hrane provelo između siječnja 2010. i siječnja 2012.godine, sveukupno 3452 uzoraka mekih i polumekih sireva iz 26 zemalja EU i Norveške. Prevalencija *L. monocytogenes* u sirevima na kraju roka trajanja je bila 0,47%, a u 0,6% uzoraka je broj bakterije prešao graničnu vrijednost od 100 cfu/g. Većina uzorkovanja se provela u supermarketima i malim dućanima. Prosječna temperatura pohrane je bila 4,1°C sa standardnom devijacijom od 1,8°C, a nakon transporta u laboratorij prosječna temperatura pohrane je bila 5,1°C (ANON., 2013.a).

Izvješće za 2014.godinu provedeno u 32 europske zemlje, od čega 28 članica EU i 4 zemlje koje nisu članice. Sveukupno 2,161 prijavljeni slučaj listerioze u 27 zemalja članica, brojka koja predstavlja porast od 30% u odnosu na 2013.godinu. Te je godine zabilježen najviši mortalitet od 2009.godine, sveukupno 17 zemalja je prijavilo 210 smrtnih slučajeva. Vodeće zemlje u tom smislu bile su Danska, Švedska, Finska, Španjolska. Po prvi puta su hospitalizaciju oboljelih te godine prijavile Hrvatska (prijavljeno 5, potvrđeno 4 slučaja), Češka i Španjolska. Također je bilo nekoliko prijavljenih slučajeva listerioze kod životinja, a najčešće kod ovaca, koza, svinja i kopitara (ANON., 2015.)

Europski stručnjaci su zabilježili porast listerioze kod ljudi od 2008. godine sa naglaskom da se broj oboljelih stabilizira između 2014.-2015.godine, a najčešće su pogođene osobe starije od 64 godine. Bolest je pogodila oko 2,200 ljudi 2015. godine, od čega je 270 osoba umrlo, što je ujedno i najviši zabilježen mortalitet u EU uzrokovan ovom bakterijom (ANON, 2016b.)

Hrvatska agencija za hranu (HAH) je 2016. godine objavila znanstveno mišljenje na temelju istraživanja o svježim i polutvrdim sirevima. Istraživanje se provodilo kako bi se mogao dobiti uvid u mikrobiološku sliku tradicionalno proizvedenih sireva koji se prodaju na tržnicama velikih gradova u RH (Zagreb, Rijeka, Split i Osijek). Po pitanju *L.monocytogenes* rezultati su potvrdili da ni jedan uzorak sira nije bio kontaminiran (ANON., 2016.c).

Zemlje kao što je Šri Lanka, u odnosu na razvijenije zemlje, imaju veći postotak uzoraka koji su kontaminirani s *L. monocytogenes*. Tako su JAYAMANNE i SAMARAJEEWA (2011.) ispitivali prisutnost bakterije u mlijeku i mliječnim proizvodima Šri Lanke (n=265) i utvrdili 39 (15%) pozitivnih nalaza. Kontaminirani su bili kravlje mlijeko (29%), kozje mlijeko (27%), pasterizirano mlijeko (17%) i sir (33%), a u steriliziranom mlijeku, mlijeku koje je obrađeno visokom temperaturom, skuti i jogurtu bakterija nije pronađena. EL MARNISSI i sur. (2013.) su slična ispitivanja proveli u Maroku. Cilj je bio odrediti prevalenciju *L. monocytogenes* u sirovom mlijeku i dva tradicionalna mliječna proizvoda, Lben (tradicionalno fermentirano obrano mlijeko) i Jben (tradicionalni svježi sir). Autori su u periodu listopad 2009. - rujan 2010. godine prikupili 288 uzoraka, podijeljenih na 3 jednaka dijela po zastupljenosti (1/3 sirovo mlijeko, 1/3 Lben, 1/3 Jben) od 8 tradicionalnih mljekara iz 4 gradske četvrti. Ukupna prevalencija je bila 5,90%. Pozitivnih je bilo 8 uzoraka sirovog mlijeka, 5 Lben i 4 Jben uzoraka. Rezultati otkrivaju varijaciju onečišćenja iz jednog sektora u drugi s višom kontaminacijom u uzorcima prikupljenim u jesen i zimu.

2.4. Sukladnost gotove hrane s kriterijima za bakteriju L. monocytogenes

Od ključne je važnosti da svi proizvođači gotove hrane (hrana koja je namijenjena prehrani ljudi bez obrade kojom bi se mikroorganizmi uklonili ili smanjili na prihvatljivu razinu) spriječe mogućnost kontaminacije i rasta bakterije *L. monocytogenes* u proizvodu do isteka roka trajanja, uz pomoć raznih mjera.

2.4.1. Mikrobiološki kriteriji: *L. monocytogenes* – kriteriji sigurnosti hrane

Kriteriji sigurnosti hrane (kriteriji uz čiju pomoć se utvrđuje prihvatljivost jednog proizvoda ili serije proizvoda i vrijedi za one proizvode koji su stavljeni na tržište) za bakteriju *L. monocytogenes* propisani su Uredbom o mikrobiološkim kriterijima za hranu (EC 2073/2005; ANON., 2005.). Uredba određuje da SPH mora osigurati sukladnost hrane sa navedenim kriterijima te provoditi istraživanja za utvrđivanje sukladnosti. U pogledu bakterije *L. monocytogenes*, SPH koji proizvode gotovu hranu kao dio svog plana uzorkovanja, moraju uzimati uzorke s opreme i radnih odnosno proizvodnih površina kako bi utvrdili ili isključili prisutnost te bakterije.

Istraživanja koja su SPH dužni provoditi s ciljem utvrđivanja sukladnosti s kriterijima do isteka roka trajanja proizvoda, moraju uključivati: 1) fizikalno-kemijska svojstva proizvoda (pH, aktivitet vode, sadržaj soli, vrsta i način pakiranja, koncentracija konzervansa)- uzeti u obzir te povezati sa uvjetima proizvodnje i skladištenja, mogućnosti kontaminacije i predviđeni rok trajanja proizvoda; 2) podatke koji su poznati i dostupni u znanstvenoj literaturi i raznim istraživanjima o rastu i preživljavanju mikroorganizma.

Ako se uz pomoć ovih istraživanja ne dobiju vjerodostojni i pouzdani rezultati o sigurnosti proizvoda, SPH mora istraživanje proširiti sa dodatnim metodama: *mikrobiološko matematičko modeliranje, testovi trajnosti ili prethodno dobiveni podaci, challenge test.*

2.4.2. Mikrobiološki kriteriji u odnosu na higijenske zahtjeve i HACCP

Prema Zakonu o hrani (NN br, 81/2013; ANON., 2013b.), SPH mora uspostaviti higijenske mjere i sustav samokotrole koji se temelji na principima HACCP (Hazard analysis critical control points) sustava te ih provoditi od početka do kraja proizvodnje i poslovanja s hranom, s obzirom da je mikrobiološka opasnost jedan od najvažnijih izvora bolesti koje se prenose hranom.

Uzimanje uzoraka mora biti sastavni dio sustava samokontrole koji se temelji na načelima dobre proizvodne prakse i HACCP sustava. Mikrobiološki kriteriji nisu pogodni za praćenje kritičnih točaka definiranih unutar HACCP sustava (ANON., 2011.). Trebalo bi kontinuirano pratiti fizikalne i kemijske faktore (pH, akivitet, temperatura) da bi se na vrijeme otkrio nedostatak, odnosno gubitak kontrole u kritičnim točkama, a zatim pravodobno poduzele korektivne mjere čiji je konačni cilj vraćanje sustava pod kontrolu.

2.4.3. Ispitivanje roka trajanja

Rok trajanja hrane definiran je kao datum do kojega hrana zadržava svoja karakteristična svojstva kod adekvatnog čuvanja. Označava se riječima „najbolje upotrijebiti do...″ i „najbolje upotrijebiti do kraja...″. Nužno je rok trajanja konstantno pratiti i verificirati kako bi se moglo potvrditi da je proizvod održiv unutar definiranog roka (ANON., 2011.).

Veoma je važno znati da postoje situacije u kojima je potrebno ponovno ispitati rok trajanja i provoditi reviziju HACCP plana, dakle, ne govorimo o jednokratnom ispitivanju već o konstantnom nadzoru i radu na tom području. To su slijedeći slučajevi: razvoj novog ili izmijenjenog proizvoda, razvoj novog procesa ili modifikacija procesa, razvoj nove pakovine, bilo koja značajna promjena sastojaka ili pakovine proizvoda, promjene mjesta proizvodnje ili proizvodne opreme, također ako ranije nisu bila provedena ispitivanja roka trajanja.

Kada govorimo o istraživanju roka trajanja vezano za bakteriju *L. monocytogenes*, cilj je utvrditi i dokazati da je gotova hrana zadovoljavajuća s obzirom na granične vrijednosti koje su propisane kao kriteriji sigurnosti tijekom roka trajanja. Može se provoditi na nekoliko načina, za početak se uspoređuju karakteristike proizvoda sa informacijama iz znanstvene

literature, a ukoliko ta metoda nije dostatna za poduprijeti procjenu roka trajanja, koriste se dodatne metode što uključuje mikrobiološko matematičko modeliranje, prethodno dobivene podatke i laboratorijska istraživanja (testovi trajnosti ili „challenge" testovi), a po potrebi se mogu kombinirati (ANON., 2011.).

2.4.4. Karakteristike proizvoda i znanstvena literatura

Ako su poznate karakteristike proizvoda te uvjeti proizvodnje, pakiranja i skladištenja, može se odrediti mogućnost preživljavanja i rasta bakterije *L. monocytogenes* u tom proizvodu. Zatim se te informacije uspoređuju s već postojećim podacima u znanstvenoj literaturi.

Tablica 2. Odabrani čimbenici koji utječu na rast i preživljavanje bakterije *L. monocytogenes*

Čimbenik	**Može rasti[b]**			**Može preživjeti (ali ne rasti)[c]**
	Donja granica rasta	Optimalno	Gornja granica rasta	
Temperatura	-1,5 do +3,0	30.0 do 37,0	45,0	-18,0
Ph	4,2 do 4.3	7,0	9,4 do 9,5	3,3 do 4,2
Aktivitet vode (a_w)	0,90 do 0,93	0,99	> 0,99	< 0,90
Koncentracija soli (%)[e]	< 0,5	0,7	12 do 16	≥ 20
Atmosfera	Fakultativni anaerobi (može rasti u pristutnosti ili odsutnosti kisika, npr. u vakuumu ili modificiranoj atmosferi pakiranja).			
Toplinska obrada tijekom proizvodnog procesa	Kombinacija temperature/vremena npr. 70^o i 2 min je potrebno za D-6 (10^6) redukciju broja stanica bakterije *L. monocytogenes.* Druge kombinacije temperature/vremena mogu omogućiti istu redukciju.			

Izvor: izradila autorica prema Guidance document on Listeria monocytogenes shelf-life studies for ready to eat foods, under Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs

2.4.5. Historical data ili prethodno dobiveni rezultati

Subjekt u poslovanju s hranom (SPH) vodi zapisnik svakodnevnog poslovanja, a prethodno dobiveni podaci su njegov sastavni dio. U pogledu ovoga rada najvažniji su podaci koji ukazuju na razinu kontaminacije bakterijom *L. monocytogenes* u proizvodnom objektu, sirovini i proizvedenoj gotovoj hrani kako na početku tako i na kraju roka trajanja. SPH mora čuvati zapisnik i dužan je osobi ovlaštenoj za provođenje službene kontrole pokazati prethodno dobivene podatke i na temelju njih dokazati da granična vrijednost od 100 cfu/g tijekom roka trajanja neće biti prijeđena.

2.4.6. Mikrobiološko matematičko modeliranje

Cilj ove metode je predvidjeti kako će se mikroorganizam ponašati u hrani tokom proizvodnje ili skladištenja, čuvanja. Neki modeli mogu predvidjeti ponašanje mikroorganizama kada su poznate fizikalno-kemijske karakteristike hrane i uvjeti skladištenja/čuvanja, a neki drugi modeli to rade bez obzira jesu li poznati prethodno navedeni parametri. To su dva glavna pristupa koja imaju svoje prednosti i nedostatke, a kao pokušaj da se uklone nedostaci razvijeni su i među-pristupi.

Ova metoda je korisna za predvidjeti rast bakterija pod različitim uvjetima, predvidjeti kolika je vjerojatnost da će mikroorganizmi rasti u hrani, da bi se utvrdila razina kontaminacije hrane za bilo koji pojedinačni dan unutar roka trajanja, ispitati kolika je varijabilnost između dvije serije, osigurati najbolju stabilnost tako što se optimizira formulacija (sol, pH, aditivi), procjenu što će se dogoditi ako se prekine hladni lanac, procjenu koji je način skladištenja najbolji i najsigurniji te je od velike pomoći kada se identificiraju kritične kontrolne točke procesa.

2.4.7. Specifična laboratorijska istraživanja

Pod specifičnim laboratorijskim istraživanjima roka trajanja u funkciji ispitivanja sukladnosti s kriterijima za bakteriju *L. monocytogenes* podrazumijevamo testove trajnosti i „challenge" testove.

a) Testovi trajnosti

Testovi trajnosti procjenjuju rast bakterije *L. monocytogenes* u prirodno kontaminiranoj hrani za vrijeme skladištenja pri realno predvidivim uvjetima (ANON., 2011.) Pošto je kontaminacija prirodna ovaj test je realniji od „challenge ″ testa, ali tumačenje rezultata testa može biti kompleksno ako je relativno nizak broj jedinica prehrambenih proizvoda koji su kontaminirani, također nizak inicijalni broj i ako je bakterija neravnomjerno raspodijeljena u hrani.

b) „Challenge″ testovi

Cilj „challenge″ testova je dobivanje informacija o karakteristikama rasta bakterije *L. monocytogenes* nakon umjetne inokulacije u hranu prije skladištenja/čuvanja pod danim uvjetima (ANON., 2011.). Ovi testovi uzimaju u obzir specifičnu kontaminaciju hrane i različitost uzoraka hrane. Dijelimo ih na one koji određuju potencijal rasta(δ) i one koji određuju maksimalnu brzinu rasta (μmax).

Mikrobiološki „challenge″ testovi koji određuju potencijal rasta se koriste da bi se hrana mogla klasificirati na onu u kojoj može doći do rasta *L. monocytogenes* i na onu u kojoj do toga neće doći, također se prati rast bakterije u hrani tako što se određuje broj bakterije na kraju roka trajanja u odnosu na inicijalni broj ili se određuje broj bakterije na početku roka u odnosu na graničnu vrijednost od 100cfu/g na kraju roka trajanja.

Uz mikrobiološke „challenge″ testove koji određuju maksimalnu brzinu rasta se može odrediti broj *L. monocytogenes* na određeni dan tijekom roka trajanja (poznat inicijalni broj) i odrediti maksimalni broj koji može biti prisutan u fazi procesa proizvodnje.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uzorkovanje

Uzorkovanje 30 sireva škripavca obavljeno je na 10 poljoprivrednih gospodarstava, u razdoblju od 11. do 16. ožujka 2015. godine. Uzorci su dostavljani u originalnom pakiranju u prijenosnom hladnjaku na + 4 ºC u laboratorij Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta.

3.2. Laboratorijska ispitivanja

3.2.1. Test trajnosti

Testovi trajnosti kao oblik istraživanja sukladnosti gotove hrane tijekom roka trajanja podrazumijeva prirodnu kontaminaciju ciljane bakterije (prisutnost *L. monocytogenes*) u siru te praćenje njenog broja i fizikalno-kemijskih parametara tijekom roka trajanja sira. Sirevi su bili pohranjeni u laboratorijskom hladnjaku na 6 ºC ± 1 ºC tijekom 7 dana, s obzirom na deklarirane uvjete čuvanja (od + 4 do + 8 ºC) i roka trajanja (7 dana).

Tablica 3. Određivani parametri tijekom promatranog razdoblja

Parametar	**Metoda**
Aktivitet vode (a_w)	Aw-metar
Ph	pH-metar
Broj i prisutnost *L. monocytogenes*	HRN EN ISO 11290-1 i 2
Broj bakterija mliječne kiseline/g	ISO 15214:1998

3.2.2. Challenge test

Sirevi (n=18) su inokulirani bakterijom *L. monocytogenes* na početku istraživanja kako bi se utvrdio potencijal rasta tijekom pohrane od 7 dana. Challenge test proveden je sukladno Vodiču za provođenje istraživanja o sukladnosti s kriterijima za bakteriju *Listeria*

monocytogenes u gotovoj hrani do isteka roka trajanja (ANON., 2011.), odnosno prema „Technical guidance document on shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods (EU Community reference laboratory for *Listeria monocytogenes*).

Za provođenje challenge testa korišten je koktel tri soja *L. monocytogenes*; 2 izolata *L. monocytogenes* porijeklom iz sira (laboratorijska kolekcija) te *L. monocytogenes* ATCC 7644. Sojevi su višekratno namnažani u BHI bujonu 24 h na 37 ºC. Jedan ml aktivnih kultura centrifugiran je na 10000 *g* tijekom 10 minuta na 4 ºC. Potom je odvojen nadtalog, a stanice isprane fiziološkom otopinom. Stanice su potom otopljene u 1 ml sterilne destilirane vode, te su razrijeđene do 10^{-8}. Broj stanica *L. monocytogenes* određivan je nasađivanjem 0,1 ml određenih razrjeđenja na Palcam i ALOA agar, inkubiranjem na 37 ºC 24-48 sati. Broj *L. monocytogenes* u 1 ml aktivnih kultura kretao se od 10^7-10^8 cfu/ml.

Odabirom određenih razrjeđenja načinjena je inokulacija sireva škripavca kako bi se dobio početni broj *L. monocytogenes* od približno 30-50 cfu/g. Inokulacija je provedena u triplikatu (na sirevima triju proizvodnih serija istog proizvođača). Nakon inokulacije provedeno je brojenje *L. monocytogenes* u 1 g sira (nulti dan). Istovjetna inokulacija ponovljena je na sirevima iste šarže radi određivanja potencijala rasta bakterije tijekom roka trajanja u uvjetima držanja na 6 ºC ± 1 ºC. Broj *L. monocytogenes* određivan je i 3., 5. i 7. dana pohrane. U sirevima je također određivana prateća mikroflora, pH i aktivitet vode na početku i kraju roka trajanja (neinokulirani dijelovi sira, držani u istim uvjetima).

4. REZULTATI

4.1. Test trajnosti

Broj *L. monocytogenes*, bakterija mliječne kiseline, pH i aktivitet vode

Tablica 4. *L. monocytogenes* tijekom roka trajanja

Proizvođač*	Uzorak	*L.monocytogenes/g***	
		0.dan	7.dan
I	1	<10	<10
	2	<10	<10
	3	<10	<10
II	1	<10	<10
	2	<10	<10
	3	<10	<10
III	1	<10	<10
	2	<10	<10
	3	<10	<10
IV	1	<10	<10
	2	<10	<10
	3	<10	<10
V	1	<10	<10
	2	<10	<10
	3	<10	<10
VI	1	<10	<10
	2	<10	<10
	3	<10	<10
VII	1	<10	<10
	2	<10	<10
	3	<10	<10
VIII	1	<10	<10
	2	<10	<10
	3	<10	<10
IX	1	<10	<10
	2	<10	<10
	3	<10	<10
X	1	<10	<10
	2	<10	<10
	3	<10	<10

*Sirevi proizvođača I-V i X korišteni su u challenge testu

** korišten je postupak za određivanje malog broja bakterija, odnosno nasađivanje 1 ml osnovnog razrjeđenja u 3 ploče ALOA agara

U tablici 4 prikazani su rezultati određivanja broja *L. monocytogenes* u škripavcu na početku i kraju promatranog razdoblja. Razvidno je da je broj *L. monocytogenes* bio ispod granice detekcije metode brojanja *L. monocytogenes* (<10/g), odnosno u okviru je propisanih kriterija tijekom roka trajanja (<100/g).

Tablica 5. pH i aktivitet vode tijekom roka trajanja škripavca

Proizvođač*	**Uzorak**	**pH**		**a_w**	
		0.dan	**7.dan**	**0.dan**	**7.dan**
I	1	6,78	6,66	0,982	0,959
	2	6,6	6,54	0,978	0,950
	3	6,82	6,72	0,980	0,948
II	1	6,55	6,24	0,984	0,959
	2	6,58	6,2	0,975	0,959
	3	6,67	6,35	0,982	0,952
III	1	6,6	6,5	0,988	0,961
	2	6,62	6,48	0,992	0,960
	3	6,58	6,4	0,985	0,958
IV	1	6,62	6,49	0,970	0,954
	2	6,6	6,4	0,973	0,950
	3	6,52	6,38	0,981	0,962
V	1	6,5	5,7	0,990	0,947
	2	6,6	5,82	0,982	0,948
	3	6,61	5,75	0,988	0,942
VI	1	5,41	5,4	0,995	0,981
	2	5,48	5,32	0,990	0,980
	3	5,4	5,35	0,988	0,977
VII	1	6,64	6,53	0,988	0,973
	2	6,6	6,42	0,991	0,975
	3	6,7	6,45	0,982	0,980
VIII	1	6,52	6,44	0,986	0,960
	2	6,5	6,39	0,986	0,962
	3	6,62	6,59	0,992	0,964
IX	1	6,88	6,48	0,988	0,964
	2	6,68	6,48	0,992	0,960
	3	6,74	6,39	0,990	0,966
X	1	6,52	6,14	0,990	0,962
	2	6,54	6,10	0,985	0,968
	3	6,52	6,08	0,985	0,960
X ± SD		**6,50±0,36**	**6,23±0,38**	**0,985±0,005**	**0,961±0,010**

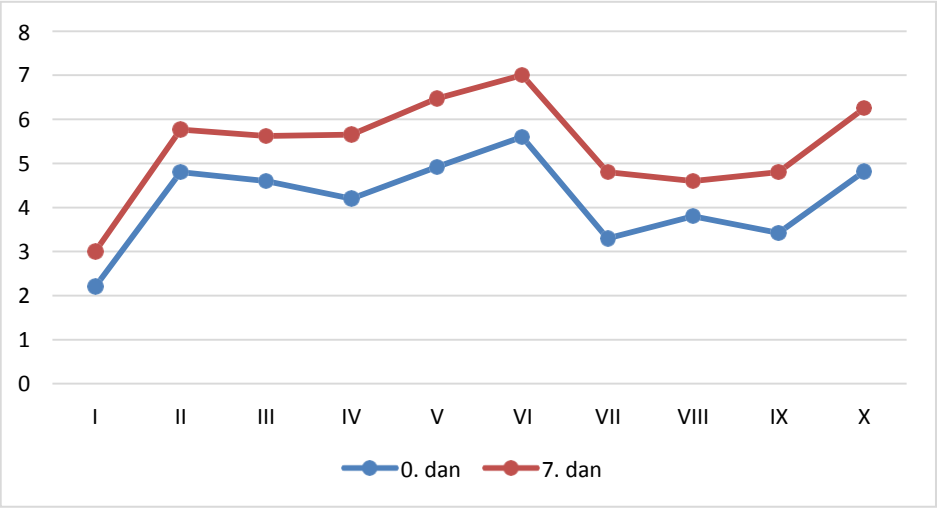
*Sirevi proizvođača I-V, X korišteni su u challenge testu

U tablici 5 prikazani su rezultati određivanja pH i aktiviteta vode tijekom roka trajanja škripavca. Utvrđene vrijednosti nisu ograničavajući faktor za rast bakterije *L. monocytogenes*, odnosno sukladno dobivenim vrijednostima može se očekivati porast bakterije u slučaju kontaminacije. Temeljem toga, meki sir škripavac pogoduje rastu bakterije *L. monocytogenes.* Pored broja *L. monocytogenes,* određivana je i prisutnost *L. monocytogenes* u 25 grama uzorka nultog i sedmog dana te je utvrđena njena odsutnost na početku i kraju roka trajanja škripavaca.

Tijekom roka trajanja (7 dana) i nakon isteka roka trajanja određivan je broj bakterija mliječne kiseline (tablica 6).

Tablica 6. Broj (log_{10} cfu/g) bakterija mliječne kiseline u škripavcu

Proizvođač	**Bakterije mliječne kiseline**	
	0.dan	**7.dan**
I	2,2	3
II	4,8	5,77
III	4,6	5,62
IV	4,2	5,65
V	4,92	6,47
VI	5,6	7
VII	3,3	4,8
VIII	3,8	4,6
IX	3,42	4,8
X	4,82	6,25
X ± SD	**4,16±0,94**	**5,39±1,08**



Grafikon 1. Broj bakterija mliječne kiseline u škripavcu prema proizvođačima i danima

4.2. Challenge test

Nakon provedene inokulacije *L. monocytogenes* u škripavce (6 proizvođača, po tri šarže) provedeno je brojanje bakterije nultog dana i zadnjeg dana roka trajanja (7. dana) radi izračuna potencijala rasta (**δ**). U tablicama 7-12 prikazani su rezultati challenge testa, odnosno potencijal rasta *L. monocytogenes* u siru škripavcu odabranih proizvođača.

Tablica 7. Potencijal rasta (**δ)** bakterije *L. monocytogenes* u škripavcu (proizvođač I)

Uzorak	Broj L.M. (log cfu/g) Nulti dan	Broj L.M Kraj roka trajanja (7. dan)	Razlika medijana koncentracija bakterije 0. i 7. dana	Potencijal rasta **δ**
1a 1b 1c	1,77 1,60 1,69	1,95 1,60 2,04	**0,35**	**0,35**
2a 2b 2c	1,47 1,60 1,69	1,90 1,77 2,14	**0,30**	
3a 3b 3c	1,77 1,60 1,69	1,95 1,60 2,04	**0,35**	

Tablica 8. Potencijal rasta (**δ)** bakterije *L. monocytogenes* u škripavcu (proizvođač II)

Uzorak	Broj L.M (log cfu/g) Nulti dan	Broj L.M Kraj roka trajanja (7. dan)	Razlika medijana koncentracija bakterije 0. i 7. dana	Potencijal rasta **δ**
1a 1b 1c	1,69 1,47 1,60	1,90 1,95 1,84	**0,30**	**0,43**
2a 2b 2c	1,30 1,60 1,47	2,00 1,90 1,84	**0,43**	
3a 3b 3c	1,69 1,77 1,60	2,07 1,90 1,77	**0,21**	

Tablica 9. Potencijal rasta (**δ)** bakterije *L. monocytogenes* u škripavcu (proizvođač III)

Uzorak	Broj L.M (log cfu/g) Nulti dan	Broj L.M Kraj roka trajanja (7.dan)	Razlika medijana koncentracija bakterije 0. i 7. dana	Potencijal rasta **δ**
1a 1b 1c	1,39 1,47 1,17	1,60 2,00 1,87	**0,48**	
2a 2b 2c	1,30 1,47 1,60	2,11 1,90 1,47	**0,43**	**0,48**
3a 3b 3c	1,47 1,47 1,30	1,77 1,87 2,00	**0,40**	

Tablica 10. Potencijal rasta (**δ)** bakterije *L. monocytogenes* u škripavcu (proizvođač IV)

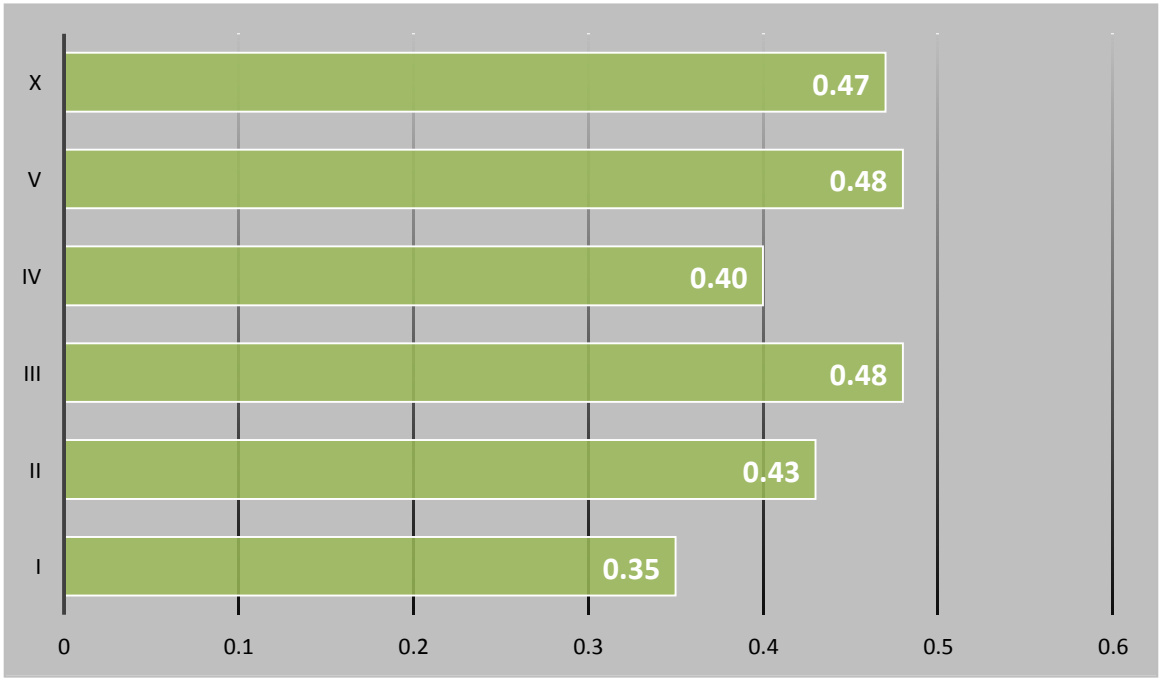
Uzorak	Broj L.M (log cfu/g) Nulti dan	Broj L.M Kraj roka trajanja (7.dan)	Razlika medijana koncentracija bakterije 0. i 7. dana	Potencijal rasta **δ**
1a 1b 1c	1,69 1,60 1,47	2,00 1,95 1,95	**0,35**	
2a 2b 2c	1,69 1,60 1,69	2,07 2,00 1,95	**0,40**	**0,40**
3a 3b 3c	1,47 1,60 1,47	2,04 1,84 1,84	**0,37**	

Tablica 11. Potencijal rasta (**δ)** bakterije *L. monocytogenes* u škripavcu (proizvođač V)

Uzorak	Broj L.M (log cfu/g) Nulti dan	Broj L.M Kraj roka trajanja (7.dan)	Razlika medijana koncentracija bakterije 0. i 7. dana	Potencijal rasta **δ**
1a	1,47	1,95		
1b	1,47	2,07	**0,48**	
1c	1,47	1,47		
2a	1,60	1,84		
2b	1,47	2,04	**0,37**	**0,48**
2c	1,30	1,69		
3a	1,47	2,00		
3b	1,30	1,87	**0,40**	
3c	1,47	1,77		

Tablica 12. Potencijal rasta (**δ)** bakterije *L. monocytogenes* u škripavcu (proizvođač X)

Uzorak	Broj L.M (log cfu/g) Nulti dan	Broj L.M Kraj roka trajanja (7.dan)	Razlika medijana koncentracija bakterije 0. i 7. dana	Potencijal rasta **δ**
1a	1,69	1,90		
1b	1,60	1,84	**0,30**	
1c	1,47	1,95		
2a	1,69	1,77		
2b	1,30	2,00	**0,47**	**0,47**
2c	1,30	1,69		
3a	1,00	1,77		
3b	1,47	1,84	**0,37**	
3c	1,69	1,95		



Grafikon 2. Prikaz vrijednosti potencijala rasta *L. monocytogenes* prema proizvođačima

5. RASPRAVA

Listeria monocytogenes je patogena bakterija i sukladno propisima njezine granične vrijednosti su **100 cfu/g uzorka** ili **odsutnost u 25 g uzorka**. Kriterij od 100 cfu/g primjenjuje se ako proizvođač može dokazati nadležnom tijelu i/ili drugim tijelima nadležnim za provođenje inspekcije da proizvod ne prelazi granicu od 100 cfu/g tijekom roka trajanja, dok se kriterij „odsutnost u 25 g“ primjenjuje prilikom kontrole proizvoda prije stavljanja na tržište, kada subjekt ne može dokazati nadležnom tijelu i/ili drugim tijelima nadležnim za provođenje inspekcije da proizvod neće prijeći granicu od 100 cfu/g tijekom roka trajanja. Ukoliko se utvrdi prisutnost listerije u mliječnom proizvodu serija iz koje je uzet uzorak se povlači, obavještava se nadležna veterinarska služba i poduzimaju se potrebni koraci uz stručnu pomoć. Analizu je potrebno ponoviti za potvrdu učinkovitosti popravnih postupaka.

Kriteriji sigurnosti hrane (Uredba EZ 2073/2005, Prilog I, Poglavlje 1) u pogledu *L. monocytogenes* odnose se na gotovu hranu koja pogoduje rastu *L. monocytogenes* (točka 1.2.) i gotovu hranu koja ne pogoduje rastu *L. monocytogenes* (1.3.). Gotovom hranom koja ne pogoduje rastu *L. monocytogenes* smatra se hrana s pH $\leq$4,4 ili $a_w \leq$0,92 ili hrana s pH $\leq$5,0 i $a_w \leq$0,94. Na tu vrstu proizvoda primjenjuje se granična vrijednost za *L. monocytogenes* od 100 cfu/g tijekom njihovog roka trajanja.

Sirevi su namirnice koje spadaju u gotovu hranu, što znači da se konzumiraju u stanju u kojem su proizvedeni, odnosno nema nikakvih dodatnih postupaka obrade. Zbog navedenog iznimno je važno da se izabere kvalitetna sirovina a higijena proizvodnje bude na visokoj razini (VRDOLJAK i sur., 2016.) U pogledu patogene bakterije *L. monocytogenes* najvažniji je period nakon proizvodnje jer je tada moguća naknadna kontaminacija u procesima pakiranja, pohrane, distribucije.

Prema zahtjevima Zakona o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 81/2013; ANON., 2013c.), odnosno Uredbe (EZ) 2073/2005, u ovom radu uzorkovano je 30 sireva škripavca s 10 poljoprivrednih gospodarstava (mini sirane) u kojima je istražena prisutnost *L. monocytogenes* te praćen njen broj i fizikalno-kemijski parametri tijekom roka trajanja (testovi trajnosti). Sirevi su bili pohranjeni u laboratorijskom hladnjaku na 6ºC ± 1 ºC tijekom 7 dana, s obzirom na deklarirane uvjete čuvanja (od + 4 do + 8 ºC) i roka trajanja (7

dana). Također je određivan potencijal rasta bakterije *L.monocytogenes* u mekim sirevima (challenge test).

Ustanovili smo da je broj *L. monocytogenes* u okviru propisanih kriterija tijekom roka trajanja (<100/g). Sukladno dobivenim vrijednostima pH i aktiviteta vode moguć je porast bakterije u slučaju kontaminacije. Pored broja, određivana je i prisutnost bakterije u 25 grama uzorka nultog i sedmog dana te je utvrđena njena odsutnost na početku i kraju roka trajanja škripavaca. Kod određivanja broja bakterija mliječne kiseline kao prateće mikroflore utvrdili smo prosječnu vrijednost u 10 proizvođača za nulti dan 4,16±0,94 i za 7.dan 5,39±1,08 (log_{10} cfu/g). Da bismo odredili potencijal rasta bakterije morali smo provesti inokulaciju *L. monocytogenes* u škripavce (6 proizvođača, po tri šarže), zatim ih brojati nultog dana i zadnjeg dana roka trajanja (7. dana), prilikom čega smo ustanovili da se potencijal rasta kreće od 0,35 do 0,48 log cfu/g. Meki sirevi mogu biti izvor alimentarne listerioze ljudi što je poznato više desetljeća (NEUMANN i sur. 1991.; PINTO i sur., 1992.). Nedavno su VRDOLJAK i sur. (2016.) određivali broj *L. monocytogenes* u mekim, polutvrdim i tvrdim sirevima tijekom roka trajanja, a „challenge test" je proveden na mekom siru skuti. Svi pretraživani sirevi su bili sukladni sa mikrobiološkim kriterijima tijekom roka trajanja. U mekim sirevima ustanovili su povišenje od 1.2-2.6 log bakterija mliječne kiseline, dok je u polutvrdim i tvrdim sirevima ustanovljen pad od 1.6 i 5.2 log. Kao i u našem istraživanju, dokazano je da meki sirevi podržavaju rast *L. monocytogenes* s obzirom na utvrđene vrijednosti pH (5.8-6.5), aktivitet vode (0.99-0.94) i sadržaj NaCl-a (0.3-1.2%). Potencijal rasta bakterije u mekom siru skuti bio je 0.43 log_{10} cfu/g tijekom 8 dana na 4°C. U polutvrdim i tvrdim sirevima aktivitet vode je bio ograničavajući faktor za rast *L. monocytogenes.* Svi pretraženi sirevi su tijekom roka trajanja bili mikrobiološki stabilni, odnosno nisu predstavljali opasnost po zdravlje konzumenata. Autori su donijeli zaključak kako su dobra proizvodna i higijenska praksa temelj proizvodnje mekih sireva kao hrane koja podržava rast *L. monocytogenes* te je važno fokusirati se na prevenciju (re)kontaminacije.

Rezultati istraživanja koje su u Hrvatskoj proveli BARUN i sur. (2016.) bili su zadovoljavajući u pogledu *L. monocytogenes* čiji je broj bio ispod 100 cfu/g u svim uzorcima sireva na tržištu, ali je nalaz bakterija koje su indikatori onečišćenja ukazivao da su učinjeni propusti na području higijenske proizvodne prakse ili distribucije. Istražena je mikrobiološka kvaliteta mekih, polutvrdih i tvrdih sireva na hrvatskom tržištu, podrijetlom iz uvoza i domaće proizvodnje.

LAHOU i UYTTENDAELE (2017.) su također proučavali potencijal rasta ove bakterije u mekim, polumekim i polutvrdim sirevima u smislu naknadne kontaminacije nakon proizvodnje. Uzorkovano je 60 uzoraka mekih, polumekih i polutvrdih sireva iz maloprodaje te je u 1 uzorku pronađen velik broj bakterije što predstavlja veliku opasnost od pojave listerioze. U toj studiji na različitim vrstama sireva su provedeni „challenge" testovi čiji su rezultati pokazali da postoji širok raspon potencijala rasta listerije, ako npr. nakon obrade dođe do naknadne kontaminacije u maloprodajnim objektima. Važno je imati na umu varijabilnost između i unutar serije u procjeni potencijala rasta listerije, pa je preporučljiva revizija dokumenata od strane EFSA-e, također tu varijabilnost uzeti u obzir kod „challenge" testova kako bi se povećala sigurnost da u proizvodu broj bakterije neće prijeći 100 cfu/g tijekom roka trajanja. Prema ovom istraživanju opravdano je meke, polumeke i polutvrde sireve klasificirati kao rizične namirnice za pojavu listerioze.

6. ZAKLJUČCI

Ovim istraživanjem provedenim na mekanom siru škripavcu pokazali smo da:

→Meki sir škripavac pripada skupini proizvoda koji **pogoduju** rastu bakterije *L. monocytogenes* s obzirom na utvrđene fizikalno-kemijske pokazatelje u proizvodu tijekom roka trajanja od 7 dana

→Tijekom roka trajanja proizvoda granična vrijednost za *L. monocytogenes* (100 cfu/g) nije nadmašena ni u jednom uzorku (test trajnosti)

→Popratna, kompetitivna mikrobna populacija (bakterije mliječne kiseline) je stabilna i potencijalno može imati antimikrobno djelovanje na *L. monocytogenes*

→Challenge testom provedenim na siru škripavcu pokazano je da tijekom roka trajanja od 7 dana, u slučaju kontaminacije na razini do 50 cfu/g, *L. monocytogenes* neće rasti iznad dozvoljene granice od 100 cfu/g budući da je potencijal rasta bio manji od 0,5 log cfu/g. Potencijal rasta kretao se od 0,35 do 0,48 log cfu/g.

→Sukladno dobivenim rezultatima, na meke sireve treba primjenjivati kriterij od 100 cfu/g tijekom roka trajanja

7. LITERATURA

1. ANONIMNO (2013a): European Food Safety Authority; 2013. Analysis of the baseline survey on the prevalence of Listeria monocytogenes in certain ready-to-eat (RTE) foods in the EU, 2010-2011 Part A: Listeria monocytogenes prevalence estimates. EFSA Journal 2013;11(6):3241, 75 pp. doi:10.2903/j.efsa.2013.3241
2. ANONIMNO (2015): EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA Journal 2015;13(12):4329, 190 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4329
3. ANONIMNO (2016b): EFSA, Zoonoses report: Listeria infections stable but frequently reported among the elderly, 2016. https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/161216
4. ANONIMNO (2016a): OECD (2016), Table 3.A1.5. World dairy projections: Butter and cheese, in OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025, OECD Publishing, Paris
5. ANONIMNO (2009): Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva (NN broj 20/09 i 141/13)
6. ANONIMNO (2005): Uredba (EZ) br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Službeni list Europske Unije
7. ANONIMNO (2011): Vodič za provođenje istraživanja o sukladnosti s kriterijima za bakteriju Listeria monocytogenes u gotovoj hrani do isteka roka trajanja, Ministarstvo poljoprivrede.
8. ANONIMNO (2013c): Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 081/2013)
9. ANONIMNO (2013b): Zakon o hrani (NN 081/2013)
10. ANONIMNO (2016c): ZNANSTVENO MIŠLJENJE O mikrobiološkim opasnostima u svježim i polutvrdim sirevima na tržnicama RH i njihovim kemijskim parametrima, Donositelj znanstvenog mišljenja (sukladno članku 7. st. 3. Pravilnika o sadržaju, obrazloženju i objavi znanstvenih mišljenja HAH-a) (Zahtjev HAH-Z-2016-1) Usvojeno 08. studenog 2016
11. BARUN, G., V. DOBRANIĆ, I. FILIPOVIĆ, K. SEVERIN, J. GRBAVAC, N. ZDOLEC (2016): Mikrobiološka kakvoća sireva na hrvatskom tržištu. Hrvatski veterinarski vjesnik, 24/2016., 7-8

12. CRESSEY, P., R. LAKE (2007): Risk ranking: Estimates of the burden of foodborne disease for New Zealand. ESR Client Report FW0724. Christchurch: ESR
13. DORNAI, J. (2012): Listeria monocytogenes u mlijeku i proizvodima na bazi mlijeka, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
14. EL MARNISSI, B., L. BENNANI, N. COHEN, A. EL OUALI LALAMI, R. BELKHOU (2013.): Presence of Listeria monocytogenes in raw milk and traditional dairy products marketed in the north-central region of Morocco. Afr. J. Food Sci. 7(5), 87-91.
15. JAYAMANNE, V.S., U. SAMARAJEEWA (2011): Incidence and Detection of Listeria monocytogenes in Milk and Milk Products of Sri Lanka. Tropical Agricultural Research 13, 42-50.
16. KALIT, S. (2010): Unapređenje kvalitete i razvoj tehnologije proizvodnje robne marke sira škripavac kao osnova za izradu studije zaštite zemljopisnog podrijetla. Agronomski fakultet
17. KASALICA, A., V. VUKOVIĆ, A. VRANJEŠ, N. MEMIŠI (2011.): Listeria monocytogenes u mleku i mlečnim proizvodima. Biotechnology in Animal Husbandry 27, 3, 1067-1082.
18. KOZAČINSKI, L., Ž. CVRTILA, M. HADŽIOSMANOVIĆ, D. MAJNARIĆ, B. KUKURUZOVIĆ (2003): Mikrobiološka ispravnost mlijeka i mliječnih proizvoda, Mljekarstvo 53, 17-22.
19. LAHOU, E., M. UYTTENDAELE (2017) Growth potential of Listeria monocytogenes in soft, semi-soft and semi-hard artisanal cheeses after post-processing contamination in deli retail establishments, Food Control, doi: 10.1016/j.foodcont.2016.12.033
20. MAGDIĆ, V., S. KALIT, J. HAVRANEK (2006.): Sir škripavac – tehnologija i kvaliteta. Stočarstvo 60, 121-124
21. MAGDALENIĆ B. (1993): Značaj nalaza Listeria monocytogenes u mlijeku i mliječnim proizvodima, Mljekarstvo 43 (l) 11 —21.
22. MARKOV, K., J. FRECE, D. ČVEK, F. DELAŠ (2009): Listeria monocytogenes i drugi kontaminanti u svježem siru i vrhnju domaće proizvodnje s područja grada Zagreba. Mljekarstvo 59, 225-231.
23. NEUMANN, H., H. KONERMANN, E.H. ABDEL-HAKEIM (1991.): Zum Vorkmmen von Listeria-Serovaren in Kase. Archiv fur Lebensmittelhygiene XLII, 77-100.

24. PINTO, B., S. ROSATI, D. REALI (1992): Listeria monocytogenes in Italian soft cheese: detection and incidence. 3rd World Congress Foodborne Infections and Intoxications 16-19. April. Berlin, Germany, 107-111.
25. VRDOLJAK J., DOBRANIĆ V., FILIPOVIĆ I., ZDOLEC N. (2016.): Microbiological quality of soft, semi-hard and hard cheeses during the shelf-life. Macedonian veterinary review 39(1), 59-64.
26. PAULIN, S., N. KING, R. LAKE, P. CRESSEY (2015): Risk profile: Listeria monocytogenes in cheese, Prepared for the Ministry for Primary Industries under project MRP/10/01 - Microbiological Risk Profiles, as part of an overall contract for scientific services, Client Report FW13049, Institute of Environmental Science & Research Limited Christchurch Science Centre.

8. SAŽETAK

U ovom radu uzorkovano je 30 sireva škripavca sa 10 poljoprivrednih gospodarstava u kojima je istražena prisutnost *L. monocytogenes* te praćen njen broj i fizikalno-kemijski parametri tijekom roka trajanja. Sirevi su bili pohranjeni u laboratorijskom hladnjaku na 6ºC ± 1 ºC tijekom 7 dana, s obzirom na deklarirane uvjete čuvanja (od + 4 do + 8 ºC) i roka trajanja (7 dana). Također je određivan potencijal rasta bakterije *L. monocytogenes* u odabranim uzorcima škripavca. Utvrđeno je da sir škripavac pogoduje rastu bakterije *L. monocytogenes* s obzirom na utvrđene kemijske pokazatelje u proizvodu. Tijekom roka trajanja proizvoda granična vrijednost za *L. monocytogenes* (100 cfu/g) nije nadmašena ni u jednom uzorku. Challenge testom provedenim na škripavcima pokazano je da tijekom roka trajanja od 7 dana, u slučaju kontaminacije na razini do 50 cfu/g, *L. monocytogenes* neće rasti iznad dozvoljene granice od 100 cfu/g budući se potencijal rasta kretao od 0,35 do 0,48 log cfu/g. Sukladno dobivenim rezultatima, na sir škripavac treba primjenjivati kriterij od 100 cfu/g tijekom roka trajanja

Ključne riječi: *Listeria monocytogenes*, potencijal rasta, meki sirevi

9. SUMMARY

THE GROWTH POTENTIAL OF LISTERIA MONOCYTOGENES IN SOFT CHEESES

In this study, 30 autochthonous Croatian cheeses *škripavac* were sampled from 10 farms. It was investigated the presence of *L. monocytogenes,* also their number and physico-chemical parameters were monitored during shelf-life. Cheeses were stored in a laboratory refrigerator at 6ºC ± 1ºC for 7 days, given the declared storage conditions (from + 4 to + 8 ºC) and the shelf life (7 days). Growth potential of *L. monocytogenes* was tested in selected cheese samples. Cheese *škripavac* support the growth of *L. monocytogenes* according to physical- chemical characteristics measured. Throughout the shelf-life of the product, the limit value for

L. monocytogenes (100 cfu / g) was not exceeded in any single sample. Challenge test showed that during a period of 7 days, in the case of contamination at the level bellow 50 cfu/g, *L. monocytogenes* will not grow above the allowed 100 cfu/g as the growth potential ranged from 0.35 to 0.48 log.

Key words: *Listeria monocytogenes,* growth potential, soft cheeses

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 27.08.1990. godine u Rijeci. Prvih četiri razreda pohađala sam talijansku osnovnu školu „ San Nicolo ″, a zatim nastavila u osnovnoj školi „ Eugen Kumičić ″. Aktivno se služim engleskim i talijanskim jezikom. Godine 2005. upisala sam srednju Medicinsku školu u Rijeci, smjer veterinarski tehničar. Nakon mature 2009. godine upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, gdje mi se u potpunosti razvila ljubav prema životinjama i općenito veterini. Tijekom studija aktivno sam sudjelovala u radu studentske udruge Equus, a kao dio njene funkcije također svake godine bila organizator i volonter edukativne izložbe REPTILOMANIJA+, također dobila posebnu Rektorovu nagradu. Radila razne studentske poslove. Posljednjih 6 mjeseci studija volontirala sam u ambulanti privatne prakse „ Kućni ljubimci ″ u Rijeci.