

Rasprostranjenost i kontrola bakterije *Listeria monocytogenes* u proizvodnji hrane



M. Kiš*, S. Furmeg, V. Jaki Tkalec, J. Sokolović, K. Sokolić i Ž. Cvetnić

Sažetak

Zbog svoje široke rasprostranjenosti i otpornosti na različite nepovoljne uvjete rasta i razvoja, bakterija *L. monocytogenes* smatra se jednim od najznačajnijih patogena prenosivih hranom. Tijekom naših istraživanja bakteriološkom pretragom *L. monocytogenes* dokazana je u 28 (2,48 %) od 1129 pretraženih uzoraka hrane i okoliša proizvodnih pogona. Izdvojena je iz 8 (3,48 %) uzoraka mesa i mesnih prerađevina, iz 4 (9,30 %) mlijeka i mliječnih prerađevina, iz 2 (9,52 %) uzorka povrća, voća i proizvoda od voća i povrća i iz 14 (1,68 %) uzoraka okoliša proizvodnih pogona. Svi izdvojeni izolati (28 izolata) i 14 bakterijskih kultura dostavljenih na potvrdu, nakon provedene identifikacije poraslih kolonija primarnim identifikacijskim

testovima, potvrđeni su VITEK2 sustavom i real-time PCR metodom. U rutinskoj mikrobiološkoj analizi hrane za određivanje prisutnosti patogena koriste se priznati standardizirani protokoli uz propisane hranjive podloge. Prednosti primjene brzih metoda za identifikaciju *L. monocytogenes* kao što je real-time PCR metoda su dobivanje brzih i pouzdanih rezultata koji omogućuju subjektima u poslovanju s hranom brzu i učinkovitu reakciju u slučaju onečišćenja. Dobiveni rezultati našeg istraživanja pokazuju kako se molekularne metode poput real-time PCR-a mogu primjenjivati u analizi patogena iz različitih vrsta uzoraka.

Ključne riječi: *Listeria monocytogenes*, rasprostranjenost, hrana, real-time PCR

Uvod

Mikroorganizmi koji se prenose hranom stalna su prijetnja za zdravlje ljudi širom svijeta. Među zoonozama koje se prenose hranom, listerioza se ističe kao bolest s najčešćim smrtnim ishodom. Prouzročena je vrstom *Listeria*

(*L.*) *monocytogenes*, javlja se u četrdesetak vrsta domaćih i divljih životinja, a u ljudi najčešće obolijevaju djeca, trudnice i osobe s oslabljenim imunološkim sustavom. Infekcije se najčešće prenose onečišćenom hranom, nedovoljno

Maja KIŠ*, mag. ing. bioproc., mag. ing. agr., (dopisni autor, e-mail: kis.vzk@veinst.hr), stručna suradnica, Sanja FURMEG, dipl. sanit. ing., stručna suradnica, dr. sc. Vesna JAKI TKALEC, dr. med. vet., znanstvena suradnica, Veterinarski zavod Križevci, Hrvatski veterinarski institut, Hrvatska; Jadranka SOKOLOVIĆ, dr. med. vet., stručna suradnica, Hrvatska; Krunoslav SOKOLIC, dr. med. vet., MM Mesna industrija d.o.o., Krašić, Hrvatska; dr. sc. Željko CVETNIĆ, dr. med. vet., akademik, Veterinarski zavod Križevci, Hrvatski veterinarski institut, Hrvatska

pasteriziranim mlijekom, mekanim sirevima, fermentiranim kobasicama, sirovim povrćem, a rijetko i izravno od oboljelih životinja (Naglić i sur., 2005., Pouillot i sur., 2016.). Rod *Listeria* se prema novoj klasifikaciji sastoji od 17 vrsta, od čega je 11 vrsta izdvojeno nakon 2009. godine (Locatelli i sur., 2017.).

Vrsta *L. monocytogenes* široko je rasprostranjena u okolišu i ubraja se među najotpornije nesporogene bakterije. Raste u širokom temperaturnom rasponu od 4 do 45 °C, a otporna je na različite nepovoljne uvjete rasta i razvoja (niske vrijednosti pH i visoke koncentracije NaCl) (Čaklović i sur., 2011., Cvetnić i sur., 2013.). *L. monocytogenes* potvrđena je u različitim vrstama hrane životinjskog podrijetla. Proizvodi koji su bili najpodložniji onečišćenju ovom bakterijom bili su svježa piletina (60,0 %), svježe meso (17,7 %), sirovo mlijeko (16,7 %), svježa riba (12,0 %), brašno (18,5 %) i zamrznuto povrće (12,9 %) (Mena i sur., 2004.). Kao ubikvitarna bakterija, jednom kada listerija dospije u proizvodni pogon, može se zadržavati u strojevima za preradu, na radnim površinama, pokretnim trakama, podovima ili u odvodima. Redovitim mjerama čišćenja, pranja i dezinfekcije te mjerama mikrobiološke čistoće u okviru samokontrole može se prekinuti lanac onečišćenja i spriječiti nastanak onečišćenja hrane (Norrung i sur., 2009., Rožman i sur., 2016.).

Cilj našeg istraživanja je ustvrditi rasprostranjenost *L. monocytogenes* u različitim uzorcima hrane (mesa i mesnih prerađevina, mlijeka i mliječnih prerađevina, voća i povrća te okoliša proizvodnih pogona). Identifikacija izolata *L. monocytogenes* provedena je klasičnim mikrobiološkim metodama, VITEK2 sustavom i molekularnom metodom lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (real-time PCR) uz usporedbu primijenjenih metoda te uvođenje molekularnih metoda za

brzu detekciju patogena u rutinsku dijagnostiku.

Materijali i metode

Materijal

U ovom je radu s ciljem utvrđivanja prisutnosti *L. monocytogenes* pretraženo ukupno 1129 uzoraka različitih kategorija hrane (230 uzoraka mesa i mesnih prerađevina, 43 uzorka mlijeka i mliječnih proizvoda, 21 uzorak povrća, voća i proizvoda od voća i povrća, 831 uzorak okoliša proizvodnih pogona), podrijetlom iz sjeverne Hrvatske. Na identifikaciju su dostavljene kulture 14 bakterijskih izolata na potvrdu identifikacije klasičnim i molekularnim metodama. Uzorci su nakon uzorkovanja u prijenosnim hladnjacima dopremljeni do Laboratorija za mikrobiologiju hrane i hrane za životinje Veterinarskog zavoda Križevci gdje je odmah započeta analiza.

Izdvajanje *L. monocytogenes*

Za izdvajanje *L. monocytogenes* u uzorcima korištena je metoda prema ISO 11290-1:2017. Za revitalizaciju i prednamnažanje listerija korišten je bujon sa smanjenom koncentracijom inhibitora, Fraserov bujon 1/2 (Biokar, Francuska). Sljedeći stupanj selektivnog namnažanja uključuje uporabu Fraserovog bujona 1/1 (Biokar, Francuska) s punom koncentracijom selektivnih inhibitora. Iz inkubiranih bujonskih kultura nacjepljuje se površina ALOA (*Listeria Selective Agar Base according to Ottaviani and Agosti*) (Biokar, Francuska) i PALCAM agara (Biokar, Francuska) postupkom razrjeđenja kako bi se dobile pojedinačne odvojene kolonije. Nakon inkubacije 24 h pri 37 °C listerije na PALCAM agaru izrastu kao sitne sivkaste kolonije s uvučnim središtem, a obrubljene crnom aureolom. Kolonije nakon 48 h inkubacije postaju tamnije i imaju maslinasto zeleni sjaj, dok su na ALOA agaru nakon 48 h inkubacije zeleno-plave boje, okružene

neprozirnom aureolom (ISO 11290-1:2017). Kolonije porasle na ALOA ili PALCAM agaru precijepljene su na Tsyee (engl. *Tryptone Soya Yeast Extract Agar*) i krvni agar koji je korišten u daljnjoj identifikaciji *L. monocytogenes*.

Primarna identifikacija bakterija

Potvrđni testovi korišteni u identifikaciji *L. monocytogenes* su: određivanje tvorbe katalaze (pozitivna), bojanje po Gramu (Gram-pozitivan štapić), ramnoza (pozitivna), hemoliza (β -hemoliza na krvnom agaru) i CAMP test (pozitivna sa *Staphylococcus aureus* i negativna s *Rhodococcus equi*).

Biokemijska identifikacija VITEK2 sustavom

Čista kultura uzgojena na krvnom agaru je sterilnim brisom prebačena u sterilnu otopinu (0,45 % do 0,50 % NaCl, pH 4,5-7,0) kako bi se dobila bakterijska suspenzija optičke gustoće od 0,50 do 0,63 prema McFarlandu. Za identifikaciju *L. monocytogenes* korištene su kolorimetrijske kartice za određivanje Gram-pozitivnih bakterija (bioMerieux, Francuska) koje sadrže testove prikazane na slici 1.

Identifikacija *L. monocytogenes* real-time PCR metodom

Ušica čiste kulture s krvnog agara prebačena je u 50 μ L destilirane vode. DNK je iz istraživanih uzoraka izolirana uporabom BACGene *Listeria*

monocytogenes kita (Eurofins, Njemačka) koji uključuje i reagente za izolaciju. U 70 μ L Lysis Buffera koji sadrži proteinazu K, lizozime i lysis buffer L dodaje se 30 μ L uzorka. Nakon zagrijavanja smjese na 37 °C kroz 20 min, smjesa se grije još 10 min na 95 °C. Ukupni volumen reakcijske mješavine za real-time PCR reakciju iznosio je 25 μ L. Reakcijska se mješavina za svaki uzorak sastojala od 20 μ L otopine Master Mixa i 5 μ L lizata uzorka, a osnovni sastojci kao što su MgCl₂, pufer, sva četiri deoksiribonukleotida nalazili su se u koncentracijama propisanim od strane proizvođača. Umnožavanje je provedeno pomoću Aria MX real-time PCR-a (Agilent, Francuska) prema programu predloženom od strane proizvođača kita.

Određivanje prisutnosti ili odsutnosti DNK patogena provodi se na temelju amplifikacije ciljane sekvence. Pozitivan rezultat prikazuje se u software-u amplifikacijskom krivuljom u sigmoidalnom obliku uz granični ciklus (engl. *threshold cycle*) C_t<35. Vrijednost graničnog ciklusa određuje se iz ciklusa gdje krivulja amplifikacije presijeca graničnu liniju postavljenu tamo gdje je fluorescencijski signal znatno iznad razine šuma.

Rezultati

Bakteriološkom pretragom *L. monocytogenes* izdvojena je iz 28 (2,48 %) uzoraka hrane i okoliša, iz 8 (3,48 %)

Biochemical Details																	
2	AMY	+	4	PIPLC	+	5	dXYL	-	8	ADH1	-	9	BGAL	-	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	+	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	+	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	-	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	+	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	-
38	dRIB	-	39	ILATk	-	42	LAC	-	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	-	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	+	60	SAC	-	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

Slika 1. Prikaz biokemijskih testova VITEK2 sustava u slučaju utvrđene prisutnosti *L. monocytogenes*

uzoraka mesa i mesnih prerađevina, iz 4 (9,30 %) uzorka mlijeka i mliječnih prerađevina, 2 (9,52 %) uzorka povrća, voća i proizvoda od voća i povrća i iz 14 (1,68 %) uzoraka okoliša proizvodnih pogona (Tabela 1.). Kod svih izdvojenih izolata (28 izolata) kao i 14 dostavljenih bakterijskih kultura, nakon provedene identifikacije poraslih kolonija primarnim identifikacijskim testovima i VITEK2 sustavom, prisutnost *L. monocytogenes* je potvrđena i real-time PCR-om.

Rasprava

Listerije su ubikvitarni organizmi, vrlo rašireni u okolišu, osobito u biljnom materijalu, zemlji, krmivima i površinskoj vodi. Glavni put prijenosa zaraze na ljude jest konzumacija onečišćene hrane. Bakterije možemo pronaći u sirovoj hrani pa i u obrađenoj hrani koja je onečišćena tijekom ili nakon obrade. Budući da bakterija može kontaminirati mnogo različitih prehrambenih artikala (mlijeko i mliječni proizvodi, sirovo meso i mesni proizvodi, povrće, ribe, mekušci, hrana namijenjena za neposrednu prehranu), mnogo je ljudi relativno često izloženo malom broju *L. monocytogenes*, a bez razvoja ikakvih simptoma bolesti. Listerioza, koju u ljudi gotovo uvijek prouzroči vrsta *L. monocytogenes*, relativno je rijetka, ali ozbiljna alimentarna zoonoza s velikom smrtnošću (30 %), osobito u

osjetljivim populacijama poput trudnica, novorođenčadi, staraca, imunokompromitiranih bolesnika (Pate i Ocepek, 2015., Pouillot i sur., 2016.).

Tijekom našeg istraživanja od ukupno 1143 različitih uzoraka hrane, okoliša i bakterijskih kultura, *L. monocytogenes* je izdvojena i identificirana u 2,48 % istraženih uzoraka. Od toga u 3,48 % uzoraka mesa i mesnih prerađevina, u 9,30 % uzoraka mlijeka i mliječnih prerađevina, zatim u 9,52 % uzoraka voća i povrća te 1,68 % okolišnih uzoraka proizvodnih pogona. U ranijim istraživanjima provedenima na području Republike Hrvatske, *L. monocytogenes* je izdvojena u 3,03 % uzoraka svježeg i smrznutog mesa peradi (Kožačinski i sur., 2006.) te u 13,39 % uzoraka domaćih nepasteriziranih mliječnih proizvoda (Kožačinski i Hadžiosmanović, 2001.). Markov i sur. (2009.) u istraživanju uzoraka svježeg mekog sira i vrhnja su izdvojili *L. monocytogenes* u 4 (6,66 %) uzorka mekog sira i 6 (10 %) uzoraka vrhnja s područja grada Zagreba, dok je u sličnom istraživanju Humski i sur. (2011.) *Listeria* spp. određena u 10 % uzoraka svježeg kravljeg sira. Prema istraživanju Uhitil i sur. (2004.), *L. monocytogenes* je izdvojena iz 4,27 % uzoraka kolača. Kovačević i sur. (2013.) su analizirali 100 uzoraka gotovog povrća na prisustvo *Listeria* spp. i *L. monocytogenes*. *Listeria* vrste pronađene su u 20 uzoraka (20 %),

Tabela 1. Rezultati bakterioloških pretraga uzoraka hrane i okoliša na *L. monocytogenes*

Vrsta uzorka	Količina	Izdvojena <i>L. monocytogenes</i>	%
Kategorija hrane	Meso i mesne prerađevine	230	3,48
	Mlijeko i mliječni proizvodi	43	9,30
	Povrće, voće i proizvodi od voća i povrća	21	9,52
Okolišni uzorci	835	14	1,68
Ukupno uzoraka hrane i okoliša	1129	28	2,48
Bakterijske kulture dostavljene na potvrdu	14	14	100

dok je *L. monocytogenes* otkrivena u samo jednom uzorku (1 %) rezanog crvenog kupusa. Nadalje, dokazana je u 1,3 % uzoraka sira i 12,6 % proizvoda podrijetlom iz riba (Denny i McLauchlin, 2008.).

Mikrobiološki kriteriji u Europskoj uniji (EU) koji omogućuju ograničenje razine ove bakterije u hrani uvedeni su 2005., a već u izvješću 2006. godine navodi se da je *L. monocytogenes* dokazana u gotovim proizvodima od goveđeg mesa u 2,4 %, od svinjskog mesa u 3,9 %, u mesu peradi 2,7 % i u 2,7 % drugog ili nespecificiranog mesa. Obzirom da ove namirnice idu na daljnju obradu koja najčešće obuhvaća termičko tretiranje, potvrđeno prisutstvo *L. monocytogenes* ne može se smatrati konačnim. Ipak, ustvrđeno je da preživljavanje *L. monocytogenes* u mesnim prerađevinama tijekom toplinske obrade direktno ovisi o inicijalnom broju mikroorganizama, a duže skladištenje nakon toplinske obrade pri 65 °C povoljno djeluje na njezin oporavak (Čaklovića i sur., 2011.).

Jedna zanimljiva studija o pojavnosti ove bakterije je nalaz u hrani oduzetoj iz prtljage u zračnim lukama u EU. Oduzeto je 600 uzoraka hrane, a bakterije koje se prenose hranom dokazane su u 5 % uzoraka (Schroeder i sur., 2015.). *L. monocytogenes* dokazana je u 10 % uzoraka hrane oduzete u Zračnoj luci Bilbao (Španjolska) te u 1,4 % ilegalno uvezene hrane u dvije njemačke zračne luke (Frankfurt i Berlin). Isto tako, dokazana je i u 7,5 % hrane koja se ilegalno prodaje na granici između Rumunjske i Republike Moldavije (Rychli i sur., 2018.). Globalizacija, međunarodna trgovina i sve veći protok roba i ljudi omogućuju životinjskim bolestima i zoonotskim patogenima širenje širom svijeta. Tako su najčešće otkriveni patogeni u proizvodima ilegalno uvezenog mesa i mesnih prerađevina *L. monocytogenes* (5 %) i *Staphylococcus aureus* (4,3 %),

kao i *S. aureus* u mlijeku i mliječnim proizvodima (7,4 %). Najvjerojatniji izvor tih zoonotskih patogena u ilegalno uvezenoj hrani je kontaminacija i nepravilne higijenske mjere tijekom rukovanja, obrade i skladištenja (Jansen i sur., 2019.). Beno i sur. (2016.) proveli su mikrobiološku kontrolu okoliša u različitim postrojenjima za proizvodnju hrane, a u okviru tog programa bila je i kontrola postrojenja za preradu sira uključujući i objekte na farmama. *Listeria* spp. je dokazana u svim objektima, a *L. monocytogenes* u 6,03 % od 4430 obrađenih uzoraka okoliša. Ustvrđeno je kako *L. monocytogenes* ima sposobnost vezanja na dodirne površine tijekom pripreme hrane i raste u zaštitnim biofilmovima, koji općenito štite bakterijske stanice od antimikrobnog djelovanja tijekom procesa čišćenja i sterilizacije (Kocot i Olszewska, 2017.). Međutim, nedavno je dokazano da niske koncentracije (<10 µg/mL) paenibacterina sprječavaju rast *L. monocytogenes* unutar biofilmske matrice te smanjuju formiranje biofilma u okolišu (Li i sur., 2018.).

Među zoonozama koje se prenose hranom, listerioza se ističe kao bolest s najčešćim smrtnim ishodom (Pouillot i sur., 2016.). Prema dostupnim podatcima Europske agencije za hranu (EFSA) (engl. *European Food Safety Agency*) u 2017. godini države članice EU prijavile su 2480 slučajeva listerioze. U razdoblju od 2013.-2017. zabilježen je uzlazni trend pojavnosti listerioze na području EU, a u 16 država članica zabilježeno je 227 smrtnih ishoda. Prisutnost *L. monocytogenes* u hrani najčešće se povezuje s hranom spremnom za konzumaciju (engl. *ready to eat*) koja ima produženu održivost na temperaturi hladnjaka. Tako je u 2017. godini zabilježena značajna pojavnost u ribama i ribljim proizvodima, mesu, mesnim prerađevinama i siru, a državama članicama je preporučeno pojačano uzorkovanje voća i povrća (EFSA, 2018.).

Tijekom naših istraživanja, nakon porasta tipičnih kolonija na selektivnom agaru, *L. monocytogenes* je potvrđena pomoću postupaka identifikacije. VITEK2 sustav za biokemijsku identifikaciju očitava biokemijske reakcije, a identifikacija se provodi pomoću računalne baze podataka uz očitavanje rezultata već nakon nekoliko sati (Habrun, 2014.). Nedostatak mu je što ne sadrži ramnozu, test koji omogućuje razlikovanje *L. monocytogenes* od drugih pripadnika roda *Listeria* (ISO 11290-1:2017) pa je test za ramnozu potrebno provesti odvojeno. Real-time PCR ima veliku praktičnu primjenu, a omogućuje brzu detekciju mikroorganizma u stvarnom vremenu. Do sada je razvijen znatan broj real-time PCR protokola za detekciju *L. monocytogenes* iz dijagnostičkog materijala, hrane i okolišnih uzoraka (Le Monnier i sur., 2011., Dalmaso i sur., 2014., Kim i sur., 2014.). Za razliku od klasične mikrobiološke metode namnažanja čiji postupak određivanja prisutnosti *L. monocytogenes* traje pet dana, real-time PCR metoda može dati prve rezultate već za nekoliko sati. Kao glavni nedostatak PCR metodologije treba istaknuti nemogućnost razlikovanja živih od mrtvih stanica. Upravo zbog toga razvijene su metode koje su usmjerene otkrivanju RNK, kao što je lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja RT-PCR (engl. *Reverse transcription - polymerase chain reaction*) (Werbrouck i sur., 2007.).

Zaključak

Zbog svoje široke rasprostranjenosti i otpornosti na različite nepovoljne uvjete rasta i razvoja, bakterija *L. monocytogenes* smatra se jednim od najznačajnijih patogena prenosivih hranom. U rutinskoj mikrobiološkoj analizi hrane za određivanje prisutnosti patogena koriste se priznati standardizirani protokoli uz propisane visoko selektivne tekuće i krute hranjive podloge. Prednosti primjene brzih metoda za identifikaciju

L. monocytogenes kao što je real-time PCR metoda su dobivanje brzih i pouzdanih rezultata koji omogućuju subjektima u poslovanju s hranom brzu i učinkovitu reakciju u slučaju onečišćenja. Dobiveni rezultati pokazuju kako se brze molekularne metode poput real-time PCR-a mogu primjenjivati u analizi patogena iz različitih vrsta uzoraka. Rezultati pretrage okolišnih uzoraka i uzoraka hrane ukazuju na stalnu potrebu za kontrolom mikrobiološke čistoće u objektima i zdravstvene ispravnosti gotovih proizvoda.

Literatura

1. CVETNIĆ, Ž., M. OSTOJIĆ i A. KVESIĆ (2013): Mikrobiologija i parazitologija. Mostar: Sveučilište u Mostaru.
2. BENO, S. M., M. J. STASIEWICZ, A. D. ANDRUS, R. D. RALYEA, D. J. KENT, N. H. MARTIN, M. WIEDMANN and K. J. BOOR (2016): Development and validation of pathogen environmental monitoring programs for small cheese processing facilities. *J. Food Protect.* 79, 2095-2106.
3. ČAKLOVICA, K., M. SMAJLOVIĆ, F. ČAKLOVICA, D. ALAGIĆ i E. ČLANJAK (2011): Utjecaj toplinske obrade barenjem i skladištenja na održivost bakterije *Listeria monocytogenes* u hrenovkama. *Meso XIII*, 148-154.
4. DALMASSO, M., A. S. BOLOCON, M. HERNANDEZ, A. E. KAPETANAKOU, T. KUČHTA, S. G. MANIOS, B. MELERO, J. MINAROVIČOVA, M. MUHTEREM, A. I. NICOLAU, J. ROVIRA, P. N. SKANDAMIS, B. STESSL, M. WAGNER, K. JORDAN and D. RODRIGUEZ-LAZARO (2014): Comparison of polymerase chain reaction methods and plating for analysis of enriched cultures of *Listeria monocytogenes* when using the ISO11290-1 method. *J. Microbiol. Methods* 98, 8-14.
5. DENNY, J. and J. MCLAUCHLIN (2008): Human *Listeria monocytogenes* infection in Europe - an opportunity for improved European surveillance. *Eurosurveillance* 13, 1-5.
6. EFSA (2018): EU Summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2017. *EFSA Journal* 16, 67-85.
7. HABRUN, B. (2014): Klinička veterinarska bakteriologija. Zagreb: Medicinska naklada i Hrvatski veterinarski institut.
8. HUMSKI, A., M. MIKULIĆ, M. KLARIĆ i T. HAVRDA (2011): *Listeria monocytogenes* u svježem kravljem siru. *Vet. stn.* 42, 317-321.
9. ISO 11290-1:2017 Horizontalna metoda za dokazivanje *Listeria monocytogenes*.

10. JANSEN, W., A. MÜLLER, N. T. GRABOWSKI, C. KEHRENBARGER, B. MUYLKENS and S. AL DAHOUK (2019): Foodborne diseases do not respect borders: Zoonotic pathogens and antimicrobial resistant bacteria in food products of animal origin illegally imported into the European Union. *Vet J.* 244, 75-82.
11. KIM, D. H., J. W. CHON, H. KIM, H. S. KIM, D. CHOI, Y. J. KIM, J. H. YIM, J. S. MOON and K. H. SEO (2014): Comparison of Culture, Conventional and Real-time PCR Methods for *Listeria monocytogenes* in Foods. *Korean J. Food Sci. Anim.* 34, 665-673.
12. KOCOT, A. M. and M. A. OLSZEWSKA (2017): Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food-processing context. *LWT - Food Sci. Technol.* 84, 47-57.
13. KOZAČINSKI, L. and M. HADŽIOSMANOVIĆ (2001): The occurrence of *Listeria monocytogenes* in home-made dairy products. *Tieraerztl. Umsch.* 56, 590-594.
14. KOZAČINSKI, L., M. HADŽIOSMANOVIĆ and N. ZDOLEC (2006): Microbial quality of poultry meat on the Croatian market. *Vet. arhiv* 76, 305-313.
15. KOVAČEVIĆ, M., J. BURAZIN, H. PAVLOVIĆ, M. KOPJAR and V. PILIŽOTA (2013): Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* sp. in ready-to-eat minimally processed and refrigerated vegetables. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 707-712.
16. LE MONNIER, A., E. ABACHIN, J. L. BERETTI, P. BERCHE, S. KAYAL (2011): Diagnosis of *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis by real-time PCR for the hly gene. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3917-3923.
17. LI, R., W. DU, J. YANG, Z. LIU and A. E. YOUSEF (2018): Control of *Listeria monocytogenes* biofilm by paenibacterin, a natural antimicrobial lipopeptide. *Food Control.* 84, 529-535.
18. LOCATELLI, A., M. A. LEWIS and M. J. ROTHROCK (2017): The Distribution of *Listeria* in Pasture-Raised Broiler Farm Soils Is Potentially Related to University of Vermont Medium Enrichment Bias toward *Listeria innocua* over *Listeria monocytogenes*. *Front. Vet. Sci.* 4, 1-11.
19. MARKOV, K., J. FRECE, D. ČVEK i F. DELAŠ (2009): *Listeria monocytogenes* i drugi kontaminanti u svježem siru i vrhnju domaće proizvodnje s područja grada Zagreba. *Mljekarstvo* 59, 225-231.
20. MENA, C., G. ALMEIDA, L. CARNEIRO, P. TEIXEIRA, T. HOGG and P. A. GIBBS (2004): Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiol.* 21, 213-216.
21. NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ i LJ. PINTER (2005): Veterinarska mikrobiologija-specijalna bakteriologija i mikologija. Čakovec: Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu i Hrvatsko mikrobiološko društvo.
22. NORRUNG, B., J. K. ANDERSEN and S. BUNČIĆ (2009): Main Concerns of Pathogenic Microorganisms in Meat. In: Toldra, F.: Food microbiology and food safety - Safety of meat and processed meat. New York: Springer (3-29).
23. PATE, M. i M. OCEPEK (2015): Bakterijske zoonoze koje se prenose hranom. (Znanstveno - stručni simpozij: "Klasične bakterijske i parazitarne zoonoze- što nas očekuje?", HAZU, Zagreb, 22. listopada 2015.).
24. POUILLOT, R., K. C. KLONTZ, Y. CHEN, L. S. BURALL, D. MACARISIN, M. DOYLE, K. M. BALLY, E. STRAIN, T. S. HAMMACK and J. M. VAN DOREN (2016): Infectious Dose of *Listeria monocytogenes* in Outbreak Linked to Ice Cream, United States, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 2113-2119.
25. ROŽMAN, J., B. NJARI i L. KOZAČINSKI (2016): Nalaz bakterije *Listeria monocytogenes* u ribi i ribljim proizvodima. *Meso XVIII*, 61-65.
26. RYCHLI, K., B. STESSL, K. SZAMARY-BRÄNDLE, A. STRAUß, M. WAGNER, D. SCHODER (2018): *Listeria monocytogenes* Isolated from illegally imported food products into the European Union harbor different virulence factor variants. *Genes (Basel)* 9, 428. doi: 10.3390/genes9090428.
27. SCHRODER, D., A. STRAUS, K. SZAKMARY-BRANDLE, B. STESSL, S. SCHLANGE and M. WAGNER (2015): Prevalence of major foodborne pathogens in food confiscated from air passenger luggage. *Int. J. Food Microbiol.* 209, 3-12.
28. UHITIL, S., S. JAKŠIĆ, T. PETRAK, T., H. MEDIĆ and L. GUMHALTER-KAROLYI (2004): Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. in cakes in Croatia. *Food Control* 15, 213-216.
29. WERBROUCK, H., N. BOTTELDOORN, M. UYTENDAELE, L. HERMAN and E. VAN COILLIE (2007): Quantification of gene expression of *Listeria monocytogenes* by real-time reverse transcription PCR: optimization, evaluation and pitfalls. *J. Microbiol. Methods* 69, 306-314.

Prevalence and control of *Listeria monocytogenes* in food production

Maja KIŠ, Mag. Ing. Bioproc., Mag. Ing. Agr., Expert Associate, Sanja FURMEG, Dipl. Sanit. Ing., Expert Associate, Vesna JAKI TKALEC, DVM, PhD, Scientific Associate, Croatian Veterinary Institute, Veterinary Department Križevci, Križevci, Croatia; Jadranka SOKOLOVIĆ, DVM, Expert Associate, Croatia; Krunoslav SOKOLIĆ, DVM, MM Meat Industry d.o.o., Krašić, Croatia; Željko CVETNIĆ, DVM, PhD, Academician, Croatian Veterinary Institute, Veterinary Department Križevci, Križevci, Croatia

Listeria monocytogenes is a widespread bacterial species resistant to a wide range of unfavourable growth conditions, and therefore is considered to be one of the most important food-borne pathogens transmitted to humans. In this study, *L. monocytogenes* was detected in 28 (2.48%) of 1129 analysed food and environmental samples: 8 (3.48%) samples of meat and meat products, 4 (9.30%) samples of milk and dairy products, 2 (9.52%) samples of fruits, vegetables or fruit- or vegetable-based products, and in 14 (1.68%) environmental samples from food processing facilities. After conducting identification of growth colonies using primary identification tests, all isolates (28 samples) and 14 samples of bacterial cultures delivered for confirmation were

confirmed for the presence of *L. monocytogenes* using the VITEK2 system and real-time PCR method. During routine microbiological analysis of food, pathogen detection is tested using the accepted standard protocols with the prescribed culture media. Fast methods for the detection of *L. monocytogenes*, such as real-time PCR, provide quick and reliable results, allowing food business operators to make a quick and efficient reaction in the case where contamination is detected during self-monitoring. The study results indicate that molecular methods, such as real-time PCR, are applicable for pathogen detection in different types of samples.

Key words: *Listeria monocytogenes*; prevalence; food; real-time PCR