

## ZNANSTVENO MIŠLJENJE

### O javno zdravstvenom riziku vezanom za konzumaciju sirovog mlijeka

Donositelj znanstvenog mišljenja (sukladno članku 7. st. 3.)

(Zahtjev HAH-Z-2015-2)

Usvojeno 08. studenog 2016.

### ČLANOVI ZNANSTVENOG ODBORA ZA BIOLOŠKE OPASNOSTI

Prof. dr. sc. Lidija Kozačinski, Veterinarski fakultet, Zagreb, predsjednica ZO

Dr. sc. Relja Beck, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, zamjenik predsjednice ZO

Doc. dr. sc. Andrea Humski, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

Dr. sc. Andrea Benussi Skukan, Centar za kontrolu namirnica-Prehrambeno biotehnološki fakultet, Zagreb

Dr. sc. Ivančica Kovaček, Nastavni zavod za javno zdravstvo „Andrija Štampar“, Zagreb

### Koordinatorica Odbora za biološke opasnosti

Dr. sc. Brigita Hengl, Hrvatska agencija za hranu

## SAŽETAK

Kupovina i konzumacija sirovog mlijeka iz mljekomata popularna je u zemljama Europe, Svijeta, ali i u Hrvatskoj, premda je trend povećanja broja mljekomata kod nas spor, i u cijeloj zemlji ih je tek oko 40.

Kako do sada u našoj zemlji nisu provedena slična istraživanja, ovo je istraživanje imalo za cilj utvrditi mikrobiološku i kemijsku sliku sirovog mlijeka iz mljekomata, te prisutnost ostataka antimikrobnih lijekova i mikotoksina. Osim toga, istovremeno s istraživanjem, provedena je i *on-line* anketa kako bi se utvrdili stavovi potrošača o sirovom mlijeku iz mljekomata te utvrdili motivi za njegovu kupnju, kao i postupci s tim mlijekom prije konzumacije.

Ovim istraživanjem bili su obuhvaćeni mljekomati u cijeloj RH. Istraživanje je trajalo godinu dana, a uzorkovanje je napravljeno u tri navrata: jesensko, zimsko i proljetno-ljetno. Kako bi se utvrdila mikrobiološka slika uzoraka sirovog mlijeka mikrobiološkom su pretragom obuhvaćeni slijedeći mikroorganizmi: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Escherichia coli* O157 (VTEC ili STEC), *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Coxiella burnetti* i virus enzooske leukoze goveda. Kemijski parametri koji su određeni u sirovom mlijeku su: udjel masti, bjelančevina, laktoze i suhe tvari i stupanj kiselosti po Soxlet Henkelu (°SH) u skladu s vrijednostima navedenima u Pravilniku o kakvoći svježeg sirovog mlijeka (NN 102/00,111/00, 74/08). Ostaci antimikrobnih lijekova u mlijeku određeni su brzim testom Twin sensor<sup>BT</sup>, te su određeni mikotoksini aflatoksin M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub>.

U uzorcima sirovog mlijeka nisu utvrđene bakterije *C. jejuni/coli*, *E. coli* O157 (VTEC ili STEC), *Salmonella* spp., *Y. enterocolitica*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* i virus enzooske leukoze goveda. Prema rezultatima mikrobioloških analiza mlijeko iz mljekomata bilo je najčešće kontaminirano s *L. monocytogenes*, *S. aureus* i *C. burnetti*, patogenim mikroorganizmima koji mogu dovesti do oboljenja ljudi. Model predviđanja rasta patogenih bakterija u sirovom mlijeku iz mljekomata prikazan je za *L. monocytogenes* i *S. aureus*, pri čemu je korišten software ComBase. Utvrđeno je da postoji mogućnost rasta *L. monocytogenes* u sirovom mlijeku, pa njezin broj do trenutka konzumacije naraste preko 100 cfu/ml, dok *S. aureus* niti u slučaju najveće utvrđene kontaminacije neće se namnožiti preko 10<sup>5</sup> cfu/ml, vrijednosti koja se smatra graničnom potrebnom za proizvodnju stafilokoknih enterotoksina u količini opasnoj za ljudsko zdravlje. Ne može se u potpunosti isključiti rizik za zdravlje ljudi zbog prisutnosti *C. burnetii* u mlijeku, iako su zabilježeni vrlo rijetki slučajevi sirovog mlijeka kao izvora zaraze s ovim patogenom.

Analizom sirovog mlijeka utvrđena je pozitivna reakcija na ostatke antimikrobnih lijekova u ukupno šest uzoraka (6,74 %). Međutim, kako je riječ o brzom testu, koji s obzirom na osjetljivost daje pozitivnu reakciju i u slučaju kada su vrijednosti za pojedine ostatke antimikrobnih lijekova niže od one propisane Uredbom komisije (EZ) br. 37/2010 od 22. prosinca 2009. o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla, ne može se napraviti procjena izloženosti ili usporedba s postojećim prihvatljivim dnevnim unosom (ADI) pa nije moguće niti procijeniti rizik za zdravlje ljudi. Ipak, dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost da je prisutnost nekih antimikrobnih lijekova bila i puno veća od one propisane Uredbom komisije, te se niti rizik ne može u potpunosti isključiti. Ovi rezultati trebaju se koristiti kao indikator mogućnosti pojave antimikrobnih lijekova u mlijeku unatoč propisanoj zabrani.

Niti u jednom uzorku nije utvrđena količina aflatoksina M<sub>1</sub> veća od 0,01 µg/kg.

Svi promatrani kemijski parametri u mlijeku iz mljekomata pokazuju prilično široki raspon praćenih vrijednosti te se može zaključiti kako su kroz godinu konzumenti izloženi neujednačenoj nutricionističkoj vrijednosti mlijeka.

Na temelju provedenog istraživanja rizik se u slučaju sirovog mlijeka iz mljekomata može okarakterizirati kvalitativno kao **zanemariv** u slučaju termičke obrade mlijeka prije pohrane u hladnjak odnosno prije konzumacije. Rizik je **umjeren** u slučaju konzumacije sirovog mlijeka bez prethodne termičke obrade za populaciju zdravih, odraslih osoba. No treba naglasiti da je rizik **visok** u slučaju konzumacije sirovog mlijeka bez prethodne termičke obrade za populaciju djece, starijih, trudnica i imunokompromitiranih osoba.

## KLJUČNE RIJEČI

sirovo mlijeko, mljekomati, sigurnost hrane, kemijski i mikrobiološki parametri, ostaci antimikrobnih lijekova, aflatoxin M<sub>1</sub>

## SUMMARY

The purchase and consumption of raw milk from milk vending machines become very popular in European countries, the World, but also in Croatia. The increase in the number of milk vending machines is running slow, and across the country there is about 40 of them.

This study aim was to determine the microbiological and chemical picture of raw milk from milk vending machines, and the presence of antimicrobial drug residues and mycotoxins, since no similar research was conducted in our country. In addition, while the research was conducted, an on-line survey was conducted to determine consumer attitudes about raw milk from milk vending machines and determine the motives for the purchase, as well as procedures at home with milk before consumption. This research covered all milk vending machines throughout Croatia. The study lasted one year, and the sampling is done on three occasions: in autumn, winter and spring-summer. In order to determine microbiological situation on raw milk, microbiological examination is covered by the following microorganisms: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Escherichia coli* O157 (VTEC or STEC), *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Coxiella burnetii* and enzootic bovine leukosis virus. The chemical parameters determined in raw milk are: fat, protein, lactose and solids, and degree of acidity after Soxhlet-Henkel (°SH), all in accordance with the values set out in the Ordinance on the quality of raw milk (OG 102 / 00, 111 / 00, 74 / 08). Residues of antibiotic drugs in milk are determined by rapid test Twin sensor BT, and finally mycotoxins aflatoxin M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> were determined. Pathogens *C. jejuni/coli*, *E. coli* O157 (VTEC or STEC), *Salmonella* spp., *Y. enterocolitica*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and enzootic bovine leukosis virus were not established in milk samples. According to the microbiological results milk from milk vending machines was contaminated with *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *C. burnetii*, pathogenic microorganisms that can cause diseases in humans. The model prediction of pathogenic bacteria growth in milk for *L. monocytogenes* and *S. aureus*, was done using the Combase software. It has been found that there is a possibility of *L. monocytogenes* in milk to rise above 100 cfu / ml before consumption, whereas number of *S. aureus* will not increase of more than 10<sup>5</sup> cfu / ml, a value that is regarded as the necessary limit for the production of staphylococcal enterotoxins in quantity harmful for human health. One cannot completely exclude the risk to human health due to the presence of *C. burnetii* in milk, although very rare cases of raw milk of infection were recorded. The analysis of raw milk was found positive for residues of antibiotic drugs in a total of six samples

(6.74 %). However, a positive reaction is present even when the values of certain residues of antimicrobials are lower than those prescribed by Commission Regulation (EC) No. 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Therefore, an estimate of exposure or comparison with existing acceptable daily intake (ADI) cannot be done, as well as risk assessment for adverse human health. On the other hand, the presence of some antibiotic drugs can be much higher than that prescribed by the Commission Regulation, and the risk cannot be ignored. These results should be used as an indicator of the potential presence for antibiotic drugs in milk despite the statutory prohibition.

Neither of the samples has the amount of aflatoxin M<sub>1</sub> above 0.01 mg/kg. All observed chemical parameters in milk from milk vending machines show quite a wide range of monitored values and it can be concluded that thru the year consumers are exposed to uneven nutritional value of milk.

Based on the research, pathogen exposure risk in the case of raw milk from milk vending machines can be characterized qualitatively as **negligible** in the case of consuming milk or storage milk in the refrigerator after heat treatment of milk. The risk is **moderate** for healthy adult's population in case of raw milk consumption without heat treatment. But it should be emphasized that the risk is **high** in the population of children, the elderly, pregnant women and immunocompromised individuals in the case of raw milk consumption without heat treatment.

#### KEY WORDS

Raw milk, milk vending machines, food safety, chemical and microbiological parameters, veterinary drug residue, aflatoxin M<sub>1</sub>

#### ZAHVALE

Hrvatska agencija za hranu zahvaljuje svim članovima Znanstvenog odbora na doprinosu u izradi ovog znanstvenog mišljenja.

Posebna zahvala djelatnicima Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta u Zagrebu, na kojem su se napravile sve kemijske i dio mikrobioloških analiza, posebno prof. dr. sc. Lidiji Kozačinski, izv. prof. dr. sc. Željki Cvrtila-Fleck i izv. prof. dr. sc. Vesni Dobranić.

Velika zahvala djelatnicima Laboratorija za bakterijske zoonoze i molekulske dijagnostiku bakterijskih bolesti, Odjelu za bakteriologiju i parazitologiju Hrvatskog veterinarskog instituta, posebno dr.sc. Silviju Špičiću.

Zahvala djelatnicima Laboratorija za serološku dijagnostiku virusnih bolesti, Odjela za virologiju Hrvatskog veterinarskog instituta, posebno dr. sc. Besi Roić.

Zahvala djelatnicima Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, u kojem su napravljene analize mikotoksina, posebno dr. sc. Jasni Bošnjir.

Zahvala ravnatelju Veterinarskog zavoda Split Hrvatskog veterinarskog instituta, dr. sc. Eddy Listeš, koji je omogućio dostavu uzoraka mlijeka iz tog dijela Hrvatske.

## SADRŽAJ

<b>SAŽETAK</b> .....	2
<b>KLJUČNE RIJEČI</b> .....	3
<b>SUMMARY</b> .....	3
<b>KEY WORDS</b> .....	4
<b>ZAHVALE</b> .....	4
<b>UVOD</b> .....	7
<b>POZADINA SLUČAJA</b> .....	7
<b>FIZIKALNI POKAZATELJI I KEMIJSKI SASTAV KRAVLJEG MLIJEKA</b> .....	9
<b>PROCJENA RIZIKA</b> .....	13
<b>IDENTIFIKACIJA OPASNOSTI</b> .....	13
Aflatoksin M <sub>1</sub> i M <sub>2</sub> u mlijeku .....	15
<b>KARAKTERIZACIJA OPASNOSTI</b> .....	15
<i>Listeria monocytogenes</i> .....	15
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
<i>Campylobacter</i> spp. ( <i>jejuni/coli</i> ).....	16
<i>Escherichia coli</i> O157 ( <i>VTEC</i> ili <i>STEC</i> ) .....	17
<i>Salmonella</i> spp.....	17
<i>Yersinia enterocolitica</i> .....	18
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> .....	18
<i>Coxiella burnetii</i> .....	19
Virus enzooske leukoze goveda .....	19
Ostaci antimikrobnih lijekova u mlijeku .....	20
Aflatoksin M <sub>1</sub> i M <sub>2</sub> u mlijeku .....	20
<b>Rezultati istraživanja</b> .....	21
Uzorkovanje mlijeka .....	21
<b>Analiza uzoraka</b> .....	22
Kemijske analize .....	22
Mikrobiološke analize.....	23
Analiza ostataka antimikrobnih lijekova .....	23
<b>Rezultati mikrobioloških analiza</b> .....	24
<b>Rezultati kemijskih analiza</b> .....	27
<b>Rezultati analiza na ostatke antimikrobnih lijekova</b> .....	28
<b>Rezultati analiza na mikotoksin AFM<sub>1</sub></b> .....	28

<b>Anketa o konzumaciji i postupanju s mlijekom iz mljekomata</b> .....	28
<b>Obrađeni rezultati ankete</b> .....	28
<b>PROCJENA IZLOŽENOSTI</b> .....	30
<b>KARAKTERIZACIJA RIZIKA</b> .....	32
<b>RASPRAVA</b> .....	33
<b>Mikrobiološki parametri u sirovom mlijeku iz mljekomata</b> .....	34
<b>Kemijski parametri u sirovom mlijeku iz mljekomata</b> .....	38
<b>Anketa</b> .....	39
<b>ZAKLJUČCI</b> .....	40
<b>PREPORUKE</b> .....	41
<b>LITERATURA (REFERENCE)</b> .....	41
<b>DODATAK</b> .....	52
<b>Dodatak 1.</b> .....	52
<b>Dodatak 2.</b> .....	54
<b>Dodatak 3.</b> .....	54
Sirovo mlijeko iz mljekomata u zemalja EU .....	56
<b>Dodatak 4.</b> .....	62
Grafički prikaz rasta bakterija u ComBase softweru .....	61
<b>Dodatak 5.</b> .....	66
Grafički prikaz netermičkog preživljavanja <i>L. monocytogenes</i> u ComBase softweru .....	66
<b>Dodatak 6.</b> .....	66

## UVOD

U Republici Hrvatskoj (RH) kao i u ostalim zemljama EU, svakodnevno se povećava broj ljudi koji konzumiraju sirovo mlijeko. Ljudi koji konzumiraju takvo mlijeko smatraju kako ono ima bolje nutritivne odlike, boljeg je okusa i ima veću dobrobit za ljudsko zdravlje. Međutim, sirovo mlijeko može biti kontaminirano s različitim patogenima, što potvrđuju mnoga istraživanja dokumentirana pojavama bolesti unazad nekoliko godina. U RH mlijeko se u mljekomatima prodaje unazad nekoliko godina, te do sada nije bilo podataka o njegovoj mikrobiološkoj i kemijskoj kakvoći. Stoga je Znanstveni odbor za biološke opasnosti Hrvatske agencije za hranu potaknuo istraživanje sirovog mlijeka iz mljekomata kako bi se utvrdio kemijski sastav (mliječna mast, bjelančevine, laktoza, suha tvar), ispitala mogućnost ostataka antimikrobnih lijekova, mikotoksina AFM<sub>1</sub>, te utvrdilo prisutstvo (ili odsustvo) slijedećih patogenih mikroorganizama: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Escherichia coli* O157 (VTEC ili STEC), *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Coxiella burnetti* i virus enzooske leukoze goveda. Osim toga, putem on - line ankete provedeno je istraživanje o motiviranosti građana za kupnju mlijeka iz mljekomata, te njihovom znanju o opasnostima nakon konzumacije ovakve vrste proizvoda i dobre higijenske prakse u vlastitom domaćinstvu, kako bi se smanjio rizik od izazivanja bolesti.

## POZADINA SLUČAJA

U RH se u zadnjih nekoliko godina pojavio trend prodaje mlijeka iz mljekomata koji su postavljeni uz velike trgovačke centre, gradske tržnice ili manje trgovine. Mlijeko koje se prodaje na taj način je sirovo mlijeko, dakle mlijeko koje nije podvrgnuto termičkom postupku tj. nije zagrijavano na temperaturu višu od 40 °C. Ovakav način prodaje temelji se na zakonskoj osnovi navedenoj u Pravilniku o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji (NN 110/10), čl. 11. *Sirovo mlijeko namijenjeno prodaji putem automata (mljekomati)*, i Pravilniku o registraciji subjekata te registraciji i odobravanju objekata u poslovanju s hranom (NN 84/15). Potonji Pravilnik stupio je na snagu krajem srpnja 2015. godine, što znači da je ovo istraživanje bilo završeno prije nego je Pravilnik stupio na snagu, te da nisu postojala dodatna pojašnjenja ili naputci koji bi subjekte u poslovanju s hranom obvezali na isticanje uputa potrošačima o postupanju s ovakvim mlijekom. U Europskoj uniji trenutno važeći mikrobiološki kriteriji za sirovo mlijeko iznose 100 000 cfu/ml mikroorganizama izbrojanih na ploči (na 30 °C) i 400 000 cfu/ml za somatske stanice, kako je navedeno u Uredbi (EZ) 853/2004 kojom su propisana posebna higijenska pravila za higijenu namirnica. Općenito gledano, sirovo mlijeko namijenjeno za konzumaciju ljudi mora udovoljiti zahtjevima navedenima u Zakonu o hrani (Uredba (EZ) 178/2002) i biti slobodno od patogena. Poboljšanja u higijeni kod proizvođača mlijeka, rezultirala su rutinskom proizvodnjom kravljeg mlijeka s manje od 20 000 cfu/ml (De Reu i sur., 2004), ali to ne predstavlja garanciju da je sirovo mlijeko bez patogena. Iste prosječne vrijednosti cfu/ml za kravlje mlijeko u RH postižu se od 2011. godine (Hrvatska poljoprivredna agencija, 2014).

Može se reći da su potrošači mlijeka iz mljekomata zbog nedostatka informacija, nespremni na ovakvu ponudu te često zaključuju kako se mlijeko iz mljekomata dodatno kontrolira, posebne je kakvoće i može se bez rizika za zdravlje konzumirati termički neobrađeno. Potrošači su bili izloženi dodatnoj zabuni jer se na mljekomatima nalazio naziv „svježe mlijeko“ koji se nalazi i na upakiranom mlijeku proizvedenom u mljekarama (**slika 1, 2**). Sličan problem primijećen je u Novom Zelandu, kada su potrošači bolje razumijevali oznaku na mljekomatu „nepasterizirano mlijeko“ umjesto „sirovo mlijeko“

(Anonimno, 2009). Nadalje, kemijska kvaliteta mlijeka iz mljekomata nije poznata tako da potrošači ne znaju kolike su vrijednosti mliječne masti, bjelančevina, laktoze i suhe tvari, jer ih proizvođači ne navode.



Slika 1 - Pasterizirano mlijeko u jediničnom pakiranju u trgovini nosi naziv „svježe mlijeko“



Slika 2 - Sirovo mlijeko koje se nudi iz mljekomata nosi naziv „svježe mlijeko“

Vrlo je teško procijeniti kolika je uistinu konzumacija sirovog mlijeka u urbanoj populaciji (Oliver i sur., 2009). U Hrvatskoj do sada nisu provedena specifična istraživanja mikrobiološke i kemijske kakvoće sirovog mlijeka iz mljekomata. Svi proizvođači mlijeka u RH, bez obzira na veličinu stada (dakle bilo da se radi o nekoliko krava ili velikim farmama s više stotina grla) i način plasmana sirovog mlijeka, obavezni su slati pojedinačni uzorak (takozvani „štalski uzorak“) svakog grla (krava, koza, ovca) na analizu u Središnji laboratorij za mlijeko u Križevcima. U tom se laboratoriju mlijeko analizira na somatske stanice i inhibitorne tvari barem jedanput mjesečno te na ukupni broj mikroorganizama barem dva puta mjesečno, u skladu s Pravilnikom o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji (NN 110/10). Iz ovoga se može zaključiti kako se mlijeko koje se prodaje kao sirovo mlijeko iz



mljekomata pregledava jednako kao i mlijeko koje će se naknadno u mljekarama podvrgnuti termičkom postupku pasterizacije ili sterilizacije.

Zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti, neutralnog pH i visokog aktiviteta vode, sirovo mlijeko predstavlja odličan medij za rast različitih mikroorganizama, čije namnažanje uglavnom ovisi o temperaturi i kompetitivnim mikroorganizmima i njihovim metaboličkim proizvodima u mlijeku (Claeys i sur., 2013). De Buyser i sur. (2001) navode kako mlijeko i mliječni proizvodi uzrokuju 1 - 5 % ukupnih bakterijskih epidemija povezanih s hranom u industrijski razvijenim zemljama, od čega 39,1 % uzrokuje mlijeko, 53,1 % sirevi, a 7,8 % odnosi se na ostale mliječne proizvode. Usprkos tome sirovo kravlje mlijeko je u vrlo malom broju slučajeva navedeno kao izvor epidemije u ljudi (Clayes i sur., 2013). To je najčešće pojašnjeno time što je jako mali broj ljudi u populaciji neke zemlje koji konzumira sirovo mlijeko pa je proporcionalno tome i broj povezanih slučajeva oboljenja manji. Ukoliko bi došlo do povećanja broja ljudi koji konzumiraju ovakvo mlijeko povećao bi se i broj epidemija, što je potvrđeno izvješćem Centra za kontrolu i prevenciju bolesti u SAD-u (CDC) prema kojem je nakon dozvole prodaje sirovog mlijeka u SAD-u ono postalo lako dostupno potrošačima i imalo značajan utjecaja na povećanje učestalosti epidemija (Langer i sur., 2012). Iz sirovog kravljeg mlijeka mogu se izolirati mnogi za ljude patogeni mikroorganizmi kao što su *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., verotoksikogena *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *S. aureus*, *M. bovis*, *Brucella* spp., *C. burnettii* i drugi. Neki od ovih patogena nalaze se na samim životinjama, na njihovoj koži ili u gastrointestinalnom traktu, ali isto tako i u njihovom okolišu, na farmi (Oliver i sur., 2009). Njihova prisutnost u mlijeku je različita, ali potvrđena u mnogim studijama (Viltrop i Roasto, 2013).

U Republici Češkoj provedena je slična studija nakon nagle pojave povećanja broja mljekomata i povećanog interesa stanovništva za sirovim mlijekom. Tom je prilikom utvrđeno kako je sirovo mlijeko kontaminirano sa *S. aureus* u 56 % slučajeva, *Campylobacter* spp. u 4,6 %, *Salmonella* spp. u 3,7 % i *L. monocytogenes* u 1,9 % slučajeva.

#### FIZIKALNI POKAZATELJI I KEMIJSKI SASTAV KRAVLJEG MLJEKA

Mlijeko se smatra emulzijom mliječne masti u vodi, u obliku globula masti dispergiranih u serumu. Membrana globula mliječne masti sadrži proteinski kompleks koji se sastoji od enzima, fosfolipida, triacilglicerola i nekih manje zastupljenih komponenti te je prirodni emulgator koji sprječava sjedinjavanje, aglomeraciju i enzimatsko djelovanje globula masti u mlijeku (Walstra i Jenness, 1984; Spreer, 1998; Tratnik, 1998).

Sastav mlijeka razlikuje se ovisno o vrsti životinja, te ovisi o stanju životinje (stadiju laktacije, bolesti vimena i sl.) i načinu ishrane (Chen i sur., 2014), a prema Claeysu i sur. (2014) sastav kravljeg mlijeka je slijedeći:

ukupna suha tvar (g/L)	bjelančevine (g/L)	odnos kazein/sirutka (g/L)	mast (g/L)	laktoza (g/L)	pepeo (g/L)	energija (kJ/L)
118-130	30-39	4,7	33-54	44-56	7-8	2709-2843

U Hrvatskoj se unazad nekoliko desetaka godina na tržištu nalazilo samo termički obrađeno, pasterizirano ili sterilizirano mlijeko. Stavljanjem u upotrebu mljekomata u kojima se prodaje sirovo mlijeko, te izostankom preporuke od strane proizvođača da se sirovo mlijeko mora termički obraditi

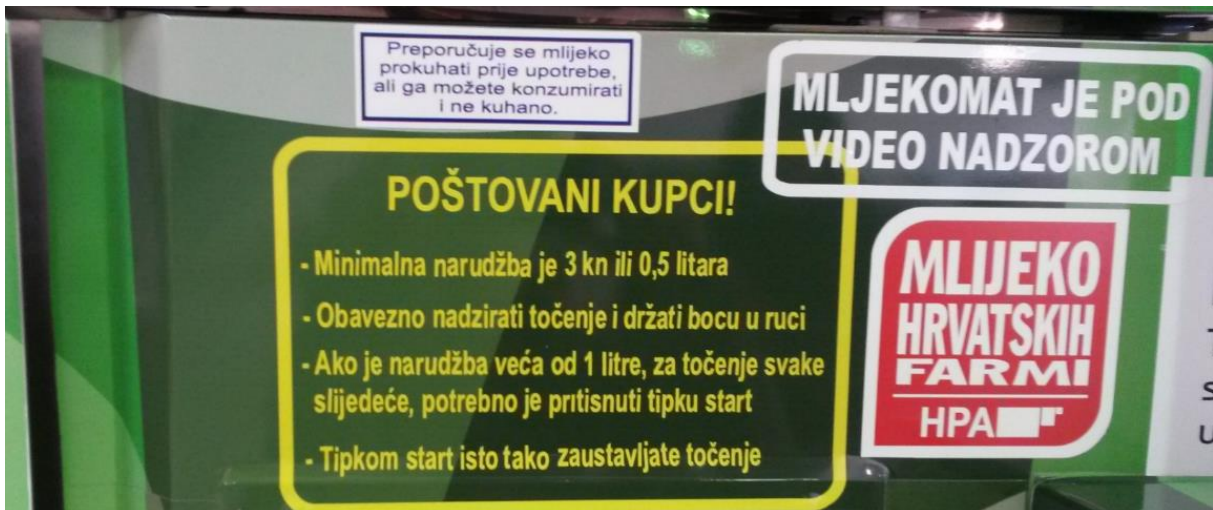
prije konzumacije pojavila se potencijalna opasnost za zdravlje ljudi koji konzumiraju ovo mlijeko (**slika 3 a),b),c)**). Stupanjem na snagu Pravilnika o registraciji subjekata te registraciji i odobravanju objekata u poslovanju s hranom (NN 84/2015) ovaj je pristup promijenjen jer je u Pravilniku navedeno da proizvođač mora potrošače upozoriti o mogućem štetnom utjecaju svog proizvoda na zdravlje određene kategorije ljudi i preporučiti toplinsku obradu mlijeka prije konzumacije (**slika 4 a), b)**). Kako se sa sličnom problematikom susreću i mnoge zemlje članice EU, Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) izdala je Znanstveno mišljenje o javno-zdravstvenom riziku vezanom za konzumaciju sirovog mlijeka za piće (EFSA, 2015).



Slika 3 a)



Slika 3 b)



Slika 3 c)



Slika 4 a)



Slika 4 b)

## PROCJENA RIZIKA

### 1. Identifikacija opasnosti

Mikrobiološke opasnosti, koje se mogu naći u sirovom kravljem mlijeku, posljedica su infekcija samih životinja ili naknadne fekalne kontaminacije i/ili kontaminacije iz okoliša. Identificiran je veliki broj patogena koji su se našli u kravljem mlijeku, ali rijetko ima dokaza da su doveli do štetnog utjecaja na zdravlje ljudi. Pregledom do sada objavljenih radova o epidemiološkim slučajevima u RH može se zaključiti kako je vrlo mali broj povezan s mlijekom kao izvorom infekcije. To je međutim i razumljivo ako se uvaži činjenica kako se, u skladu s našim prehranbenim navikama, konzumira isključivo pasterizirano ili sterilizirano mlijeko, dakle mlijeko koje je tijekom proizvodnog procesa toplinski obrađeno kako bi se u potpunosti eliminirali patogeni uzročnici u mlijeku. Davis i sur. (2014) navode kako je u Engleskoj i Walesu u razdoblju 1992-2002 od 27 epidemija čak 15 bilo uzorkovano konzumacijom nepasteriziranog mlijeka, uglavnom zbog nalaza *Salmonella* spp., *E. coli* VTEC O157 i *Campylobacter jejuni*. Nadalje, od ukupno 22 epidemije koje se povezuju s mlijekom, zabilježene u Francuskoj, SAD-u, Finskoj, Nizozemskoj, Velikoj Britaniji, Njemačkoj i Poljskoj, u deset se radilo o nepasteriziranom mlijeku. Isti autori smatraju kako je važno naglasiti razliku u odnosu konzumacije pasteriziranog i sirovog mlijeka. Dok je konzumacija sirovog mlijeka vrlo mala (u SAD-u ima svega 0,5-3,5 % konzumenata sirovog mlijeka), broj bolesti koji je uz nju povezan je vrlo velik.

Prema anketi koju je HAH provela o načinu konzumacije sirovog mlijeka, ispitanici su se u 19,9 % slučajeva izjasnili kako mlijeko koriste sirovo, ali uglavnom za proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda, dakle moguće je pretpostaviti kako su patogeni mikroorganizmi koji su se mogli zateći u mlijeku bili uništeni zbog niskog pH, koji se u fermentiranim proizvodima kreće od 3,5 do 4,3 (Tratnik, 1998), dok se vrijednost pH za preživljavanje patogenih mikroorganizama kreće od 4,2 do 11. Motivi za kupovinu sirovog mlijeka su raznovrsni, a među najznačajnijim objašnjenjima su kako se kupovinom takvog mlijeka, direktno podupiru proizvođači, kako je takvo mlijeko boljeg okusa, prirodnije i zdravije. Ovi potonji razlozi često su i navedeni na mljekomatima („100 % prirodno“; „Svježe, domaće, zdravo“). Također, konzumenti su izloženi informacijama na pojedinim web stranicama na kojima ljudi, koji se predstavljaju kao liječnici, preporučuju konzumaciju sirovog mlijeka zbog doprinosa poboljšanju vlastitog zdravlja (<http://www.drdeborahmd.com/health-benefits-raw-milk>, <http://draxe.com/raw-milk-benefits/>) ili se jednostavno radi web stranicama na kojima se promovira konzumacija sirovog mlijeka ([http://www.raw-milk-facts.com/raw\\_milk\\_health\\_benefits.html](http://www.raw-milk-facts.com/raw_milk_health_benefits.html)).

Prema rezultatima **Ankete o konzumaciji mlijeku iz mljekomata**, koju je provela Hrvatska agencija za hranu, glavni razlog za kupnju mlijeka iz mljekomata je mišljenje konzumenata kako je to mlijeko zdravije (38 %), na drugom je mjestu zadovoljstvo potrošača što se ovakvom kupovinom direktno pomažu proizvođači mlijeka/poljoprivrednici (29 %). 25 % ispitanika smatra kako je takvo mlijeko kvalitetnije i punijeg okusa, a 9 % je zadovoljno što se mlijeko može kupovati neprestano 24 sata. Ispitanici su ostavili komentare kako je to pravo mlijeko, ima okus mlijeka iz djetinjstva i smatraju ga hranjivijim.

Za potrebe ovog mišljenja, a prema rezultatima pregleda literature, konzultacijama koje su provedene u sklopu rada mreže za mikrobiološku procjenu rizika (MRA Network) u EFSA-i, epidemiološkim situacijama u stadima mliječnih krava u RH, na temelju mišljenja stručnjaka iz laboratorija u kojima se prati zdravlje životinja (Hrvatski veterinarski institut i Veterinarski fakultet), te na temelju sličnih studija

koje su već provedene u nekim drugim zemljama (Claeys i sur., 2013) patogeni mikroorganizmi kojima se bavilo u istraživanju koje je prethodilo ovom Znanstvenom mišljenju su slijedeći:

- *L. monocytogenes*,
- *S. aureus*,
- *C. jejuni/coli*,
- *E. coli O157 (VTEC ili STEC)*,
- *Salmonella* spp.,
- *Y. enterocolitica*,
- *M. avium* subsp. *paratuberculosis*,
- *C. burnetti*
- virus enzooske leukoze goveda.

Također, uzorci sirovog mlijeka bili su analizirani na kemijske parametre pri čemu su se kao referentne koristile vrijednosti navedene u Pravilniku o kakvoći svježeg sirovog mlijeka (NN 102/00, 111/00, 74/08) kojima mlijeko mora udovoljavati:

- da sadrži najmanje 3,2 % mliječne masti;
- da sadrži najmanje 3,0 % bjelančevina;
- da sadrži najmanje 8,5 % suhe tvari bez masti;
- da mu je gustoća od 1,028 do 1,034 g/cm na temperaturi od 200 °C;
- da mu je kiselinški stupanj od 6,6 do 6,80 °SH, a pH vrijednost od 6,5 do 6,7;
- da mu točka ledišta nije viša od -0,5170 °C;
- da mu je rezultat alkoholne probe sa 72 % etilnim alkoholom negativan.

Kemijska analiza mlijeka napravljena je iz razloga kako bi se mogla odrediti kakvoća mlijeka iz mljekomata na temelju udjela masti, bjelančevina, laktoze i suhe tvari, te stupnja kiselosti po Soxlet Henkelu (°SH). Iako ne postoji direktni utjecaj na zdravlje ljudi ukoliko dođe do odstupanja od pojedinih kemijskih parametara, kemijska kakvoća mlijeka može u slučaju njegovog korištenja za potrebe pojedinih institucija kao što su dječji vrtići, starački domovi, bolnica ili sličnih institucija dovesti do nutritivnih promjena kod dugotrajnijeg korištenja mlijeka kod kojega mliječna mast varira ili izostanka zadovoljavanja dnevnih potreba za nekim vitaminima i mineralima (poput vitamina D i Ca – u slučaju smanjene količine mliječne masti).

Mlijeko koje se nalazi na hrvatskom tržištu, a koje je termički obrađeno i upakirano obavezno ima na deklaraciji navedene vrijednosti za kemijske parametre poput udjela mliječne masti, bjelančevina, ugljikohidrata (laktoze), te vrijednosti vitamina i minerala ukoliko su dodani, kao i preporučene vrijednosti unosa (prema vitaminu D i kalciju). Proizvođači mlijeka, također, moraju proizvoditi sirovo mlijeko u skladu s vrijednostima navedenim u Pravilniku o kakvoći svježeg sirovog mlijeka (NN 102/00,111/00, 74/08).

Međutim, za sirovo mlijeko koje se može kupiti iz mljekomata, nisu propisani parametri kvalitete kojima bi ono moralo udovoljavati, već se na njega mogu primjenjivati samo važeći mikrobiološki kriteriji koji za sirovo mlijeko iznose 100 000 cfu/ml mikroorganizama izbrojanih na ploči (na 30 °C) i 400 000 cfu/ml za somatske stanice, kako je navedeno u Uredbi (EZ) 853/2004 kojom su propisana posebna higijenska pravila za higijenu namirnica u EU.

Prisutnost ostataka antimikrobnih lijekova u mlijeku određena je pregledom uzoraka mlijeka iz mljekomata brzim testom Twin sensor<sup>BT</sup>, proizvođača Unisensor iz Belgije. Test BT00660+ brzi je test za istovremenu detekciju prisustva molekula  $\beta$ -laktama i tetraciklina u uzorcima mlijeka. Pokriva sljedeće antibiotike i kemoterapeutike: penicilin-G, ampicilin, amoksicilin, kloksacilin, nafcilin, cefapirin, cefalonij, cefazolin, cefoperazon, ceftiofur, klortetraciklin, doksiciklin, oksiteraciklin i tetraciklin.

#### Aflatoksin M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub> u mlijeku

Aflatoksin M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub>, koji se mogu naći u mlijeku i mliječnim proizvodima, nastaju hidrosilacijom aflatoksina B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> u jetri (Knežević, 2007; Valpotić i Šerman, 2006). Ustanovljena je direktna povezanost u količini AFM<sub>1</sub> izlučenog u mlijeku s količinom AFB<sub>1</sub> unesenog u organizam preko hrane. Tako je utvrđeno da se otprilike 0,3–6,2 % AFB<sub>1</sub> kojeg unesu životinje transformira u AFM<sub>1</sub> koji se izluči u mlijeku, ali veličina pretvorbe razlikuje se ovisno o životinji, dobu dana i mužnji (Unusan, 2006; Ayar i sur., 2007). Aflatoksin M<sub>1</sub> utvrdio se u mlijeku već 12 sati nakon prvog unosa u organizam. Nakon uklanjanja kontaminiranog izvora, koncentracija AFM<sub>1</sub> u mlijeku opada te se nakon 72 h ne može niti detektirati (Sassahara i sur., 2005). Prema Prandiniju i sur. (2009) na količinu AFM<sub>1</sub> u mlijeku ne utječu procesi prerade poput toplinske obrade kao što su pasterizacija i sterilizacija, kao ni hlađenje i zamrzavanje mlijeka ili dodavanje starter kultura koje potiču fermentaciju (npr. proizvodnja jogurta).

## 2. Karakterizacija opasnosti

Patogeni mikroorganizmi koji su ispitani u ovom istraživanju, već su prije pronađeni u mlijeku i dokazana je njihova uloga u izazivanju bolesti u ljudi koji su se zarazili nakon konzumacije sirovog mlijeka.

#### *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* je Gram pozitivna aerobna ili fakultativno anaerobna, nesporogena bakterija koja se prenosi hranom, a nalazi se u različitom okolišu. Infekcije u ljudi, listerioze, mogu vrlo ozbiljno ugroziti zdravlje, a potencijalno i ugroziti ljudski život (Posfay-Barbe i Wald, 2004). Tijekom trudnoće, listerija može proći kroz placentu i inficirati plod, a do infekcije novorođenčeta može doći i tijekom poroda u porođajnom kanalu (Viltrop i Roasto, 2013). Svi pripadnici roda *Listeria* rasprostranjeni su u okolišu i izolirani iz tla, vegetacije, vode, otpadnih voda, hrane za životinje, svježeg i zamrznutog mesa, sirovog mlijeka, klaoničkog otpada i fecesa zdravih životinja. Upravo farmski držane životinje kao i njihov okoliš značajan su izvor kontaminacije hrane i infekcije ljudi. U literaturi se često spominju u proizvodima kao što su sirovo mlijeko, meki sirevi proizvedeni od sirovog mlijeka, proizvodi od sirovog mesa i salate (Jemmi & Stephan, 2006). Slaba higijena u klaonicama i objektima za preradu mlijeka glavni je razlog kontaminacije listerijom. Važan izvor kontaminacije iz okoliša i opreme je križna kontaminacija, posebno u preradi hrane. Listerije se mogu zadržati i preživjeti na različitim proizvodnim površinama, jedan od razloga za to je i mogućnost stvaranja biofilma koji ih štiti. Listerije rastu na temperaturama između 1 i 45 °C (dakle rastu na uobičajenim temperaturama u hladnjaku; do 8 °C), a optimalna im je temperatura 30-37 °C (Wemekamp-Kamphuis, 2004). Uništava ih temperatura od 64 °C za nešto manje od 10 minuta, a 70 °C za 2 minute (FDA, 2011). Dvije različite studije potvrdile su da pasterizirano

mlijeko u odnosu na nepasterizirano podržava njihov rast. Autori smatraju kako ti rezultati ukazuju da kompetitivna flora iz nepasteriziranog mlijeka može utjecati na njihov rast, te kako je važno prevenirati kontaminaciju poslije pasterizacije.

#### *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* jedan je od čestih uzročnika bakterijskog trovanja hranom. Taj prilagodljivi patogen u ljudi i životinja dovodi do različitih bolesnih stanja od lakših kožnih infekcija do teških oboljenja poput upale pluća ili septikemije. *S. aureus* najbolje raste i proizvodi enterotoksin uz prisustvo kisika, ali može rasti i u anaerobnim uvjetima. Odgovara mu temperatura 37 °C, (raspon 6-48 °C), pH 7-7,5 (raspon od 4,2 do 9,3). Dobro podnosi isušivanje tako da donja granica za aktivitet vode ( $a_w$ ) iznosi 0,85. Podnosi dodatak NaCl do 25 %, kao i zamrzavanje. Uništavaju ga uobičajene temperature kuhanja i pasterizacije. *S. aureus* proizvodi različite enterotoksine (A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R i U), vrlo često i nekoliko istodobno, ali u 95 % slučajeva radi se o A, B, C, D i E enterotoksinima (Pelisser i sur., 2009). To su termostabilni toksini čija se svojstva ne mijenjaju nakon termičke obrade hrane i nisu osjetljivi na gastrointestinalne proteaze poput pepsina (Pelisser i sur., 2009). Intoksikacija nastaje nakon unosa od 20 ng do >1 µg toksina (kad cfu *S. aureus* prijeđe 10<sup>5</sup>/g prisutnost toksina je u količini oko 1 µg). Simptomi se javljaju nakon nekoliko sati (1-6) od unosa kontaminirane hrane, što ovisi o unesenoj količini i individualnoj osjetljivosti. Simptomi koji se javljaju su mučnina, povraćanje, grčevi u želucu i proljev, koji traju 24-48 sati. Iako vrlo rijedak, u male djece i starijih moguć je i smrtni ishod (Normanno i sur., 2007). Mlijeko predstavlja dobar supstrat za rast *S. aureus*, kao i njegovi proizvodi, iz kojih ga se učestalo izolira (Pelisser i sur., 2009; Normanno i sur., 2007). Koža, mukozne membrane, vime i sise mliječnih životinja rezervoar su ovog patogena, osobito ukoliko u stadu postoji mastitis. Nadalje, trećina ljudi su asimptomatski nositelji, te se preko ruku (ranama ili ozljedama), kihanjem ili kašljanjem *S. aureus* može širiti. U slučaju neadekvatne higijene za vrijeme proizvodnog procesa, posebno u slučajevima neposrednog rukovanja s hranom u proizvodnji, otvaraju se mogućnosti za kontaminaciju s bakterijom *S. aureus*, te se ona može očekivati i u mliječnim proizvodima od pasteriziranog i nepasteriziranog mlijeka (Medvedova i sur., 2014).

#### *Campylobacter* spp. (*jejuni/coli*)

S nastankom bolesti, kampilobakterioze, najčešće su povezane vrste *C. jejuni* i *C. coli*. Vrste *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* i *C. upsaliensis* nazivaju se još i termotoleranim kampilobakterima, jer optimalno rastu pri temperaturama od 41 °C do 43 °C, no ne pokazuju odlike pravih termofilnih bakterija jer ne rastu pri temperaturama od 55 °C i višim (Mikulić i sur., 2016; Levin, 2007). *Campylobacter* spp. neće preživjeti pH niži od 4,9, a može rasti u rasponu 4,9-9,0, dok mu optimalni pH za rast iznosi 6,5-7,5 (Keener i sur., 2004). Za rast su mu potrebni mikroaerofilni uvjeti i bolje preživljava na nižim nego na višim temperaturama (15 puta dulje na 2 °C nego na 20 °C). Na rukama može preživjeti i do sat vremena, a zamrzavanjem mu se broj smanjuje. Uništava ga temperatura od 55 °C i više, a osjetljiv je i na koncentracije NaCl iznad 1 %. Nakon inkubacije koja može trajati od 1 do 10 dana (najčešće između 2 i 5 dana) nastupaju simptomi koje karakterizira bol u mišićima, glavobolja i groznica na koju se nadovezuje krvavi proljev, bol u stomaku i povraćanje, koji se zadržavaju do tjedan dana kada bolest samostalno i prestaje. Ponekad se situacija može zakomplicirati artritismom (Reiterov sindrom) ili postinfekcijskom kljenuti mišića (Guillian-Barréov sindrom). U tom slučaju mogući su i smrtni ishodi u 3-8 % slučajeva. Iako vrlo rijetki, zabilježeni su slučajevi fekalno - oralnog prijenosa među ljudima. Najznačajniji izvor zaraze je perad, odnosno njihovo meso, ali također i sirovo mlijeko, meso drugih



životinja, gljive, maslac, salate, plodovi mora i kontaminirana voda za piće. Najznačajniji put zaraze je križna kontaminacija koja nastaje kod ne pridržavanja dobre higijenske prakse.

#### *Escherichia coli O157 (VTEC ili STEC)*

*E. coli O157 (VTEC ili STEC)* patogeni je mikroorganizam koji je izoliran iz sirovog mlijeka. U njega dopijeva uslijed fekalne kontaminacije kao posljedica ne higijenske mužnje. Međutim, izoliran je i u mliječnim proizvodima od pasteriziranog mlijeka, koji su bili kontaminirani naknadno (Keene i sur., 1997). Osim u mlijeku, ovaj patogen kontaminira i goveđe meso (posebno mljeveno meso), drugu hranu poput salate, voća, sirovih sjemenki, vode, a zabilježen je i prijenos s kućnih ljubimaca na čovjeka i s čovjeka na čovjeka. Inkubacija traje 3-9 dana, a patogen, nakon što invadira crijeva započinje proizvodnju toksina (ne proizvodi ih u hrani). Bolesna stanja koja su posljedica infekcije s *E. coli O157:H7* obuhvaćaju asimptomatske infekcije (kliconoše), lakše oblike proljeva, krvavi proljev i hemolitički kolitis, hemolitičko uremijski sindrom povezan s proljevom i trombotičnu trombocitopeničnu purpuru (TTP) povezanu s proljevom, a u rjeđim slučajevima nastupa smrt kao posljedica zatajenja bubrega. Pretpostavlja se da *shiga* toksin kojeg proizvodi dolazi u interakciju sa stanicama endotela u bubrenim glomerulima (Murinda i sur., 2002). *E. coli* može rasti uz prisustvo ili bez kisika. Temperature zamrzavanja nemaju utjecaja na smanjivanje njezinog broja, a može rasti u temperaturnom rasponu od 8 do 46 °C, optimalna temperatura je 37 °C. Može preživjeti niski pH do 3,6, kao i isušivanje (minimalni  $a_w$  0,95). Visoke temperature je brzo uništavaju (npr. 70 °C za 2 minute). Mnogi autori su dokazali kako su mliječne krave rezervoari *E. coli O157:H7* u odnosu na ostala stada goveda, i da je ona prisutna i u slučajevima kada životinja ne pokazuje znakove bolesti. Čak štoviše, zaključeno je kako je infekcija individualne životinje prolazna, ali da se infekcija u stadu zadržava (Wells i sur., 1991). Alhelfi i sur. (2012) dokazali su kako u mlijeku kontaminiranim s *E. coli O157*, ukoliko se 2 sata nalazi na sobnoj temperaturi, dolazi do njezine proliferacije, kao i važnost pohrane mlijeka na temperaturi hladnjaka.

#### *Salmonella* spp.

Postoji preko 1400 serotipova *S. enterica* subsp. *enterica* koji mogu izazvati bolest u ljudi (Brenner i sur., 2000). Salmoneloze se ubrajaju u vodeće bolesti probavnog sustava čiji se simptomi kreću od blagih gastroenteritisa do sistemskih bolesti poput septikemija i drugih ozbiljnijih bolesti. Hrana životinjskog podrijetla (meso, jaja i mlijeko) smatra se važnim izvorom salmoneloza u ljudi. *Salmonella* spp. su Gram negativne mezofilne bakterije. Mogu rasti na temperaturi hladnjaka od 4° do 10°C, a dobro rastu na temperaturi od 25° do 43 °C, dok su osjetljive na temperaturu iznad 55 °C. Odgovara joj pH od 3,6 do 9,5, a najviše skoro neutralni pH (D'Aoust, 2001). U namirnicama s niskim  $a_w$  može preživjeti dulji vremenski period, npr. u orasima 32 tjedna ili u maslacu od kikirikija 24 tjedna. D'Aoust (2001) navodi kako *Salmonella* spp. raste pri  $a_w \geq 0,93$ , dok je optimalni  $a_w$  0,99. U prosjeku rast *Salmonella* spp. odvija se uz  $a_w$  0,93 i 0,96. Salmonele se prenose oralno - fekalnim putem, s osobe na osobu, putem hrane, vode i indirektno preko zaraženih životinja (Food standards Australia New Zealand, 2009). Simptomi bolesti mogu se podijeliti na enterokolitis i enteričku groznicu. Enterokolitis se javlja 8-72 sata nakon infekcije i ima samolimitirajući karakter, uz čestu remisiju nakon 4-5 dana. Karakterizira ga ozbiljna bol u abdomenu, proljev, povraćanje i groznica. Enteritična groznica je akutna gastrointestinalna bolest koja nastaje kao posljedica prodora *S. Typhi* ili *S. Paratyphi* u tkivo humanog nosioca. Od ostalih simptoma prisutni su još i vodenasti proljev, produžena i pulsirajuća groznica, abdominalna bol i povraćanje. U rjeđim slučajevima dolazi do težih oboljenja kao što su artritis, upala slijepog crijeva, upala žučnog mjehura, endokarditis, lokalnih apscesa, meningitisa, osteomijelitisa,

osteoartritis, perikarditis, upale pluća i mokraćnog mjehura (ICMSF, 1996). Na početku bolesti veliki broj *Salmonella* spp. se izlučuje fecesom, što može potrajati i do 5 tjedna, ali u smanjenoj količini. Otprilike 1 % oboljelih ostaju trajni kliconoše (Jay i sur., 2003). Velike su razlike u individualnoj osjetljivosti na salmonele koje ovise o već postojećem imunitetu, načinu prehrane, dobi, sposobnosti imunološkog odgovora, funkcionalnim i strukturalnim anomalijama u probavnom traktu, ili postojanju neke druge bolesti (Gerba i sur., 1996; Jay i sur., 2003). Iz tog je razloga vrlo teško utvrditi najmanji infektivnu dozu, koja je u pravilu niža kod nastanka epidemije nego što je doza u slučaju pokusnog hranjenja (D'Aoust, 1994). Ipak veći rizik od infekcije i razvoja težih oblika bolesti nakon izlaganja *Salmonella* spp. može se javiti kod jako mladih, starijih, trudnica i imunokompromitiranih osoba (transplantacija organa, osobe oboljele od raka i AIDS-a; Gerba i sur., 1996).

#### *Yersinia enterocolitica*

*Y. enterocolitica* je mali štapićasti Gram negativni psihrofilni crijevni kokobacil koji je izoliran iz okoliša, hrane i ljudskih kliničkih uzoraka (Lambertz i sur., 2008). Hrana životinjskog podrijetla predstavlja najveći rizik za nastanak gastrointestinalnih bolesti koje uzrokuje *Y. enterocolitica* u ljudi (Grahek-Ogden i sur., 2007; Arnold i sur., 2004). U nekoliko je studija navedeno kako je u mlijeku i mliječnim proizvodima pronađeno prisutstvo *Y. enterocolitica* (Jayarao i sur., 2006; Guven i sur., 2010). Ovaj patogen ima i javnozdravstveni značaj zbog mogućnosti rasta u sirovom mlijeku i sposobnosti zadržavanja vitalnosti dulje vrijeme na temperaturama hladnjaka. Konzumacija sirovog mlijeka povećava rizik od ovog patogena u ljudi. *Y. enterocolitica* raste na temperaturi 0-44 °C (optimum 28-29 °C), optimalni pH 7,2-7,4 (min. 4,2). Preživljava zamrzavanje, kao i temperaturu od 4 °C, a isušivanje zrakom znatno utječe na smanjivanje brojnosti. Uništava je temperatura pasterezacije (65 °C u 2 sekunde) i dodatak 5-7 % NaCl. Bolest kod ljudi uglavnom prolazi sama od sebe i traje u prosjeku 7 dana. Javljaju se simptomi poput bolova u trbuhu (slični kao kod upale slijepog crijeva), glavobolja, groznica, proljev (u djece vođeno-mukozni), mučnina i povraćanje. Češće obolijevaju muškarci, djeca do 4 godine i dobna skupina od 20 do 34 godine. U pravilu antibiotici ne utječu na ozbiljnost i trajanje bolesti, ali se primjenjuju ukoliko dođe do komplikacija, koje mogu biti višemjesečni enterokolitis, akutni upalni artritis, uretritis i bolne crvene lezije po koži (ICMSF *Yersinia*, 1996).

#### *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

*M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) uzročnik je bolesti goveda i drugih preživača koja se zove paratuberkuloza (poznata i kao Johnova bolest). Bolest je značajna zbog još uvijek nedovoljno istražene uloge ovog uzročnika u nastanku Kronove bolesti u ljudi (Chamberlin i sur., 2001), posebno jer prema nekim istraživanjima ova bakterija se može naći u mlijeku i nakon pasterezacije (Waddell i sur., 2008; Eltholth i sur., 2009). Grant i sur. (2005) smatraju kako je MAP više otporna na povišenu temperaturu od ostalih mikobakterija, ali da broj vitalnih stanica nakon pasterezacije ovisi i o inicijalnoj kontaminaciji te o njihovoj tendenciji da se grupiraju u velike nakupine stanica. MAP su Gram pozitivni, aerobni debeli štapići, 1-2 µm dugi, obligatno intracelularni. Sadrže tvar mikobaktin (*mycobactin*) za čiji je nastanak potrebno željezo te stoga mogu preživjeti samo u stanici dokle god im domaćim osigurava dovoljno željeza za rast. Ljudi se mogu inficirati MAP-om na nekoliko načina uključujući prijenos s čovjeka na čovjeka. Životinje predstavljaju primarni rezervoar ove bolesti i najčešći put prijenosa je sa životinje na čovjeka, a najveća populacija zaraženih životinja nalazi se među mliječnim govedima (Collins, 1997). Uzročnik se prvo izlučuje fecesom, zatim mlijekom, a u kasnijoj fazi može se pronaći u krvi, raznim unutrašnjim organima (jetra, slezena, pluća, bubrezi, maternica, mliječna žlijezda,

epididmis) i limfnim čvorovima. MAP je otporan na isušivanje i uobičajene dezinficijense, a može i dulje vrijeme preživjeti u vodi, tlu i fecesu. Njegova sposobnost ulaska, preživljavanja i namnažanja u domaćinu uvelike ovisi o sastavu i komponentama stanične stijenke (Rhoades i Ullrich, 2000).

#### *Coxiella burnetii*

*C. burnetii* uzročnik je Q-groznice i do nedavno je pripadala skupini rikecija. Premda se razmnožava samo u živim stanicama vrlo je otporna na nepovoljne uvjete okoline i brojne dezinficijense. Tvorbom spora na dulje vrijeme preživljava uvijete isušivanja, npr. u prašini. Inkubacija traje dva do tri tjedna, a ovisi o infektivnoj dozi. Klinički simptomi manifestiraju se kroz različite sindrome kao što su akutna bolest s povišenom temperaturom, upalom pluća, endokarditisom, hepatitisom, osteomijelitisom, infekcijom u djece, te infekcijom s dominantnom neurološkom manifestacijom. Iako je Q-groznicu primarno prirodno-žarišna zoonoza, adaptirala se na domaće životinje među kojima se danas trajno održava. Rezervoar bolesti su goveda, koze, ovce i druge životinje. Glavni put prijenosa sa životinja na ljude je udisanje aerosola. Poznat je i prijenos *C. burnetii* slamom i krznom životinje na veće udaljenosti, te konzumacijom sirovog mlijeka. *C. burnetii* je intracelularna bakterija, pleomorfnii kokobacil, stanične stijenke nalik onoj Gram negativnih bakterija i smještena je u  $\gamma$ -podskupinu *Proteobacteria* (ne rikecije). Visoko je rezistentna na fizikalne i kemijske utjecaje, dobro podnosi isušivanje i zračenje ultraljubičastim zrakama i zadržava sposobnost za život u vanjskoj sredini kroz nekoliko tjedana. Vrlo je infektivna i otporna na vanjsku sredinu. Pri temperaturi od 4 °C *C. burnetii* može preživjeti godinama na vuni, slami, prašini i sasušenom fecesu. Kronična infekcija Q-groznice u ljudi je rijetka, ali puno ozbiljnija. Smrtnost je visoka, čak i do 65 %. Smatra se da je infekcija kronična ako klinička slika bolesti traje duže od 6 mjeseci uz prisutnost IgG i IgA antigene faze *C. burnetii*. Endokarditis je najčešća manifestacija kronične Q-groznice i vrlo ozbiljna komplikacija, a postoje i druge kronične infekcije kao što su osteoartritis, osteomijelitis, inersticijska fibroza pluća, granulomatozni hepatitis te infekcija intravaskularnih proteza i aneurizama. Preboljenjem bolesti stvara se doživotni imunitet. Pojavljuje se tijekom cijele godine, ali najčešće u kasnu zimu i proljeće, što se većinom poklapa sa sezonom janjenja.

#### Virus enzooske leukoze goveda

Enzooska leukoza goveda (ELG) je kronična proliferativna bolest koju uzrokuje RNA virus enzooske leukoze goveda (VELG) (Miller i sur., 1969; Burny i sur., 1980; Murphy, 1999; Oroszlan i sur., 1984; Sagata i sur., 1984). VELG je svrstan u rod *Deltaretrovirus*, potporodicu *Orthoretrovirinae*, porodicu *Retroviridae*. Izvan stanice domaćina virus se može lako uništiti izlaganjem UV-zrakama, zagrijavanjem na 63 °C tijekom 15 minuta te postupcima zamrzavanja i otapanja. Na temperaturi hladnjaka (4 °C) virus preživljava 14 dana. Rezultati pojedinih istraživanja pokazali su da VELG može inficirati ljudske stanice *in vitro*, odnosno da je u DNA u dva klonu B stanica ljudi s mijelomom utvrđeno prisustvo proviralnih sekvenci (Slavikova i sur., 1987). Pojedini znanstvenici tvrde kako je još uvijek nejasno može li u prirodnim uvjetima doći do integracije VELG u ljudski genom (Nikbakht i sur., 2010). Epidemiološke studije pokazale su da konzumacija sirovog mlijeka koje potječe od goveda zaraženih VELG ne povećava učestalost leukemije u čovjeka (Perzova i sur., 2000; Burmeister i sur., 2007; Buehring i sur., 2003). Dakle, malo je vjerojatno da VELG inficira ljude te da se u njima replicira i uzrokuje rak, iako se ta mogućnost prema navodima Calattini i sur., (2006) ne može isključiti.

#### Ostaci antimikrobnih lijekova u mlijeku

Primjena antimikrobnih lijekova u stočarstvu dovela je do suzbijanja mnogih zaraznih bolesti, ali njihova upotreba stvorila je mnoge probleme u mljekarstvu. Antimikrobni lijekovi mogu dospjeti u mlijeko nakon terapije raznih oboljenja, ali i kao posljedica dodatka stočnoj hrani. Vrijeme njihovog izlučivanja varira kod pojedinih životinja, što pak ovisi o vrsti lijeka, unesenim količinama, načinu aplikacije, dobi životinje, zdravstvenom stanju, stadiju laktacije te individualnim osobinama životinja. Antimikrobni lijekovi najčešće se izlučuju iz organizma mlijekom nakon intramamarnе aplikacije lijeka kod liječenja upale mliječne žlijezde. Ukoliko se proizvođači ne pridržavaju vremena karence, rezidue antimikrobnih lijekova mogu dospjeti do potrošača (Havranek i Rupić, 1996; Hadžiosmanović, 2001, Pintić i sur., 2006). Na ozbiljnost nalaza ostataka antimikrobnih lijekova u mlijeku ukazuje i činjenica da oni ostaju aktivni i nakon toplinske obrade (pasterizacija) i prerade mlijeka (mogu se dokazati u siru, maslacu i drugim proizvodima). Na temperaturama iznad 100 °C dolazi do njihove djelomične razgradnje (Hadžiosmanović, 2001).

Inhibitori koji dopijuju u mlijeko, mogu izazvati smetnje u tehnološkim procesima proizvodnje mlijeka i mliječnih proizvoda i značajne gubitke kod fermentiranih proizvoda zbog inhibicije bakterijske fermentacije u proizvodnom procesu kod sireva ili jogurta (Molina i sur., 2003). Ujedno mogu i štetno djelovati na zdravlje potrošača mlijeka i mliječnih proizvoda. Antimikrobni lijekovi u mlijeku i mliječnim proizvodima mogu, ali vrlo rijetko, izazvati direktna toksična oštećenja. Opasnije i češće je indirektno djelovanje, koje se manifestira kao senzibilizacija ili kao alergija. Osim toga moguće je i njihovo štetno djelovanje na crijevnu mikrofloru (Dewdney i sur., 1991). Stoga utvrđivanje ostataka antimikrobnih lijekova u mlijeku i mliječnim proizvodima postaje nužnost, a ne samo obveza. Europska unija propisala je najveće dopuštene količine rezidua (MRL, maximum residue level) u Uredbi komisije (EZ) br. 37/2010 od 22. prosinca 2009. o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla.

#### Aflatoksin M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub> u mlijeku

Aflatoksin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) hidrosilirani je derivat AFB<sub>1</sub>, kojeg tvore s citokromom P450 povezani enzimi u jetri i koji se mliječnom žlijezdom životinja i čovjeka izlučuje u mlijeko, ukoliko se hranom unosi AFB<sub>1</sub> u organizam (Polychronaki i sur., 2007; Kamkar i sur., 2008; Fallah i sur., 2009; Gürbay i sur., 2010). Aflatoksin B<sub>1</sub> spada među najtoksičnije mikotoksine iz skupine aflatoksina (Domijan i Peraica, 2010). Ciljni organ toksičnoga djelovanja AFB<sub>1</sub>-a je jetra, a izraženost promjena ovisna je o dozi, dužini izloženosti, životinjskoj vrsti, uzgoju i uhranjenosti. Uz akutni i kronični toksični učinak, aflatoksini imaju imunosupresivno, mutageno, teratogeno i karcinogeno djelovanje. Međunarodna agencija za istraživanje raka (*International Agency for Research on Cancer – IARC*) ocijenila je da ima dovoljno dokaza da su aflatoksini B<sub>1</sub> iz prirodnih izvora karcinogeni i uvrstila ih je u 1. skupinu karcinogena (IARC 2002). Europska komisija od 2002. godine propisala je vrijednosti za najveće dopuštene razine određenih kontaminanata u hrani za životinje, a time je obuhvaćen i mikotoksin aflatoksin B<sub>1</sub>, a korištenje hrane i proizvoda za hranidbu životinja, koji imaju nepoželjne tvari u količinama većim od najviših dozvoljenih, su zabranjeni. Glavni razlog propisivanja najveće dopuštene granice za AFB<sub>1</sub> je zaštita stanovništva od izloženosti metabolitu ovog mikotoksina koji se nalazi u mlijeku, aflatoksinu M<sub>1</sub> (Hengl i sur., 2015).

Ustanovljena je direktna povezanost u količini AFM<sub>1</sub> izlučenom u mlijeku s količinom AFB<sub>1</sub> unesenom u organizam preko hrane. Tako je utvrđeno da se otprilike 0,3–6,2 % AFB<sub>1</sub> kojeg unesu životinje transformira u AFM<sub>1</sub> koji se izluči u mlijeku, ali veličina pretvorbe razlikuje se ovisno o životinji, dobu

dana i mužnji (Unusan, 2006; Ayar i sur., 2007). Visoko produktivne mliječne krave puno efikasnije konvertiraju AFB<sub>1</sub> u AFM<sub>1</sub> od slabije produktivnih krava (Frobish i sur., 1986; Masoero i sur., 2007). Aflatoksin M<sub>1</sub> utvrdio se u mlijeku već 12 sati nakon prvog unosa u organizam. Nakon uklanjanja kontaminiranog izvora, koncentracija AFM<sub>1</sub> u mlijeku opada te se nakon 72 h ne može niti detektirati (Sassahara i sur., 2005). Masoero i sur. (2007) utvrdili su kako je najveća koncentracija AFM<sub>1</sub> u mlijeku 8 sati nakon konzumacije hrane kontaminirane s AFB<sub>1</sub>, a ona već kod slijedeće mužnje padne za 80 %, a nakon 56 sati (peta mužnja) AFM<sub>1</sub> se u mlijeku više nije niti detektirao. Izračunato je da krave, koje unesu količinu AFB<sub>1</sub> nižu od 40 µg/jedinki/dnevno proizvedu mlijeko sa sadržajem AFM<sub>1</sub> nižim od 0,05 µg/kg. Međutim, Hoogenboom i sur. (2001) izračunali su da se ukupno od hranom unesenog AFB<sub>1</sub>, sintetizira oko 3 % AFM<sub>1</sub>, čime je dozvoljena koncentracija od 0,02 mg/kg hrane upitna.

Prema Prandiniju i sur. (2009) na količinu AFM<sub>1</sub> u mlijeku ne utječu procesi prerade poput toplinske obrade kao što su pasterezacija i sterilizacija, kao ni hlađenje i zamrzavanje mlijeka ili dodavanje starter kultura koje potiču fermentaciju (npr. proizvodnja jogurta). Evaporacija, koncentracija i isušivanje mlijeka djeluju na toksin na način da on postaje osjetljiviji na O<sub>2</sub>, svjetlost ili druge čimbenike koji ga mogu destabilizirati, te je u nekim studijama zabilježen veliki gubitak AFM<sub>1</sub>, dok u nekima ti oblici prerade nisu utjecali na njegovu količinu. S obzirom da je AFM<sub>1</sub> topljiv u vodi, njegova količina u vrhnju se smanjuje, a još više u maslacu (AFM<sub>1</sub> ostaje u sirutki nakon proizvodnje ovih proizvoda). Međutim, u mekim i tvrdim sirevima njegova se količina poveća 3-5 puta. To je vjerojatno posljedica njegovog vezanja za kazein, kojeg ostaje više u grušu nego u sirutki (Prandini i sur., 2009). Izloženost relativno malim količinama AFM<sub>1</sub> može narušiti ljudsko zdravlje, osobito djece koja su glavni konzumenti mlijeka i mliječnih proizvoda (Cavaliere i sur., 2006). Mikotoksin AFM<sub>1</sub> je od strane IARC klasificiran u Grupi 2B kao tvar s mogućim karcinogenim učinkom za ljude (IARC, 1993). Učestala prisutnost AFM<sub>1</sub> u mlijeku i mliječnim proizvodima, značajan unos ove vrste proizvoda, te moguća toksičnost i karcinogenost AFM<sub>1</sub> doveli su do uspostave najviših dozvoljenih koncentracija u mlijeku od strane Europske Komisije i Codex Alimentarius na razinu od 0,05 µg/kg (Codex Alimentarius Commission, 2001; European Commission Regulation, 2006).

## Rezultati istraživanja

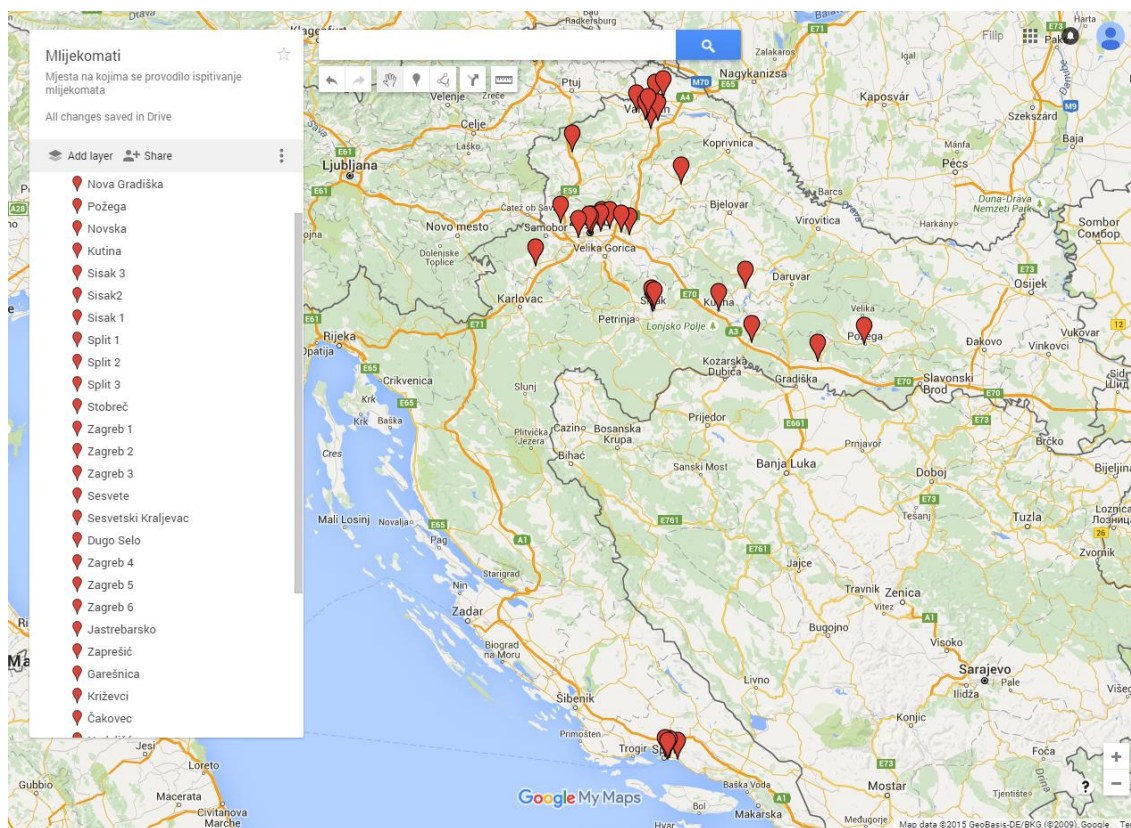
### Uzorkovanje mlijeka

Sirovo mlijeko uzorkovano je tijekom jeseni 2014. godine (od 20. listopada do 17. studenog; ukupno u razdoblju od 28 dana), zime 2015. (od 17. do 26. veljače; ukupno 9 dana) i u proljeće/ljeto 2015. (od 9. do 29. lipnja; ukupno 20 dana). U prvom uzorkovanju prikupljeno je ukupno 30 uzoraka sirovog mlijeka, u drugom 28, a u trećem 29 uzoraka (**slika 5**).

Od listopada 2014. do lipnja 2015. godine došlo je do promjene broja mljekomata, odnosno mjesta na kojima su mljekomati bili postavljeni. Iz tog razloga uzorci nisu uzeti sva tri puta na istim mjestima. Na ukupno 25 mljekomata uzet je uzorak sva tri puta, na 3 mljekomata dva puta, a na 6 mljekomata samo jedanput. Dodatni razlozi zbog kojih uzorci mlijeka nisu uzeti bili su kvar mljekomata i prazan spremnik s mlijekom u trenutku uzorkovanja.

Mlijeko je uzorkovano u količini od 1 L u sterilne staklene boce s poklopcem.

Nakon uzorkovanja boca je pohranjena u prienosne hladnjake s ulošcima za zamrzavanje, te je dostavljena u roku od nekoliko sati (najviše do 5 sati) u laboratorij. Iznimka od opisanog načina dostave odnosi se na uzorke iz područja Splita (ukupno 9 u sva tri uzorkovanja) koji su nakon prikupljanja spakirani u kutije s ledom i dostavljeni drugi dan u laboratorij (najdulje u roku od 24 sata od uzorkovanja).



Slika 3 - Zemljopisna karta s razmještajem mlijekomata u RH (označena sva mjesta na kojima je provedeno uzorkovanje barem jednom u sva tri navrata)

Naknadno je u prosincu 2015. godine uzorkovano mlijeko iz mlijekomata te su napravljene analize na prisutnost aflatoksina  $M_1$  u mlijeku. Tom prigodom prikupljeni su uzorci iz 30 mlijekomata.

### Analiza uzoraka

Analiza uzoraka na kemijske parametre (svježina mlijeka, voda (%), mliječna mast (%), bjelančevine (%), laktoza (%) i suha tvar bez masti), mikrobiološke parametre (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. jejuni/coli*, *E. coli* O157 (VTEC ili STEC), *Salmonella* spp., *Y. enterocolitica*) i rezidue antimikrobnih lijekova napravljena je u Laboratoriju Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. Analiza uzoraka na *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, i *C. burnetii* i virus enzooske leukoze, napravljena je na Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu, a analiza uzoraka na  $AFM_1$  na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“.

### Kemijske analize

Svježina mlijeka određena je titracijom mlijeka sa standardnom alkalnom otopinom NaOH uz prisutstvo fenolftaleina kao indikatora i izražena u stupnjevima Soxhlet-Henkela - °SH (Sabadoš, 1996).

Suha tvar određena je referentnom gravimetrijskom metodom ISO 6731:2010.

Količina bjelančevina određena je modificiranom metodom ISO 8969-1 koja se zasniva na Kjeldahl - ovom principu određivanja količine dušika prisutnog u uzorku.

Količina masti određena je metodom po Gerberu (Sabadoš, 1996) .

Količina laktoze određena je Loof-Schoorllovom titracijskom metodom (Sabadoš, 1996) .

#### Mikrobiološke analize

*L. monocytogenes* određena je metodom HRN EN ISO 11290-1:1999 HRN EN ISO 11290-1:1999/A1:2008 Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *Listeria monocytogenes* - Dio 1.: Metoda dokazivanja; i HRN EN ISO 11290-2:1999 HRN EN ISO 11290-2:1999/A1:2008 Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *Listeria monocytogenes* Dio 2.: Metoda određivanja broja.

*S. aureus* određen je metodom HRN EN ISO 6888-1:2004 Horizontalni postupak brojenja koagulaza pozitivnih stafilokoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste) – Dio 1.: Postupak primjene Baird-Parkerove hranjive podloge.

*Campylobacter jejuni/coli* određen je metodom HRN EN ISO 10272-1:2008 Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i brojenje *Campylobacter* spp. – Dio 1.: Metoda dokazivanja.

*E. coli* O157 (VTEC ili STEC) određena je metodom HRN ISO 16654:2003 Metoda brojenja beta-glukuronidaza pozitivne *Escherichia coli* – Dio 2.: Brojenje kolonija pri 44 °C uporabom 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide -

*Salmonella* spp. određena je metodom HRN EN ISO 6579:2003 HRN EN ISO 6579:2003/Ispr.1:2008 Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti *Salmonella* spp.

*Yersinia enterocolitica* određena je metodom HRN ISO 10273:2003 Horizontalna metoda dokazivanja suspektne patogene *Yersinia enterocolitica*.

Uzorci mlijeka prikupljeni u veljači i lipnju 2015. godine pretraženi su na *M. avium* subsp. *paratuberculosis* i *C. burnetii*. Korištena je metoda lančane reakcije polimerazom (konvencionalni PCR i Real –Time PCR) kojima se utvrđuje DNA *C. burnetii* (SOP Z-II-1-27 Revizija:00) i *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (SOP Z-II-1-26 Revizija:00).

Za enzootsku leukozu goveda korišten je imunoenzimni test ELIZA, SVANOVIR BLV gp51-Ab-screening, Lot No. P00827 na prisutnost protutijela za virus ELG. Oznaka metode: OIE Manual of standards for diagnostic tests and vaccines: 2012: chapter 2.4.11. SOP Z-III-3-21 Revizija:03. Analiza je napravljena na uzorcima sirovog mlijeka iz mljekomata koji su uzorkovani u veljači 2015. godine.

#### Analiza ostataka antimikrobnih lijekova

U svim uzorcima sirovog mlijeka napravljena je analiza na ostatke antimikrobnih lijekova,  $\beta$ -laktamaza (penicilina i cefalosporina) i tetraciklina brzim testom Twin sensor<sup>BT</sup>, proizvođača Unisensor iz Belgije; dobavljač Noack. Twinsensor<sup>BT</sup> BT00660+ brzi je test koji istovremeno detektira antimikrobne lijekove navedene u **tablici 1**. Osim granica detekcije, usporedbe radi u tablici su navedene najveće dopuštene količine (NDK) za svaki antimikrobni lijek. Spomenute vrijednosti propisane su Uredbom komisije (EZ) br. 37/2010 od 22. prosinca 2009. o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla.

Tablica 1 - granice detekcije za Twinsensor<sup>BT</sup> BT00660+ i najveće dopuštene količine propisane Uredbom 37/2010 za navedene antimikrobne lijekove

Naziv antimikrobnog lijeka	Granice detekcije – ppb (µg/L)	NDK za mlijeko po Uredbi komisije 37/2010 (µg/kg;L)
Penicilin-G	2-3	4*
Ampicilin	3-5	4
Amoksisilin	3-5	4
Kloksacilin	6-8	30
Nafcilin	30-40	30
Cefapirin	6-8	60
Cefalonij	3-5	20 (propisan samo za mlijeko)
Cefazolin	18-22	50 (propisan samo za mlijeko)
Cefoperazon	3-4	50 (propisan samo za mlijeko)
Ceftiofur	10-15	100
Klortetraciklin	62-75	100
Doksiciklin	25-50	Ne smije se primjenjivati za životinje čiji su mlijeko i jaja namijenjeni ljudskoj prehrani.
Oksitetraciklin	75-100	100
Tetraciklin	100-125	100

\*navedena je vrijednost za Benzilpenicilin, jer Penicilin G nije naveden u Uredbi

## Rezultati mikrobioloških analiza

Na temelju dobivenih rezultata mikrobioloških analiza (**tablica 2**) utvrđeno je kako niti jedan od 87 uzoraka sirovog mlijeka iz mljekomata nije bio pozitivan na *C. jejuni/coli*, *E. coli* O157 (VTEC ili STEC), *Salmonella* spp. i *Y. enterocolitica*. Niti jedan od 57 uzoraka nije bio pozitivan na *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, niti jedan od 28 uzoraka nije bio pozitivan na virus enzooske leukoze govoda.

Od 87 pretraženih uzoraka mlijeka na *L. monocytogenes* pozitivna su bila ukupno četiri uzorka. Dva uzorka bila su pozitivna kod uzorkovanja u listopadu, dva u veljači, dok u lipnju nije bilo pozitivnih nalaza. U prvom uzorkovanju radilo se o istom proizvođaču mlijeka koji je distribuirao svoje mlijeko preko dva mljekomata, a u drugom uzorkovanju isti je proizvođač ponovno bio pozitivan na *L. monocytogenes* (uzorak na njegovom drugom mljekomatu nije uzet - mljekomat je vjerojatno bio uklonjen). Ovaj nalaz dokaz je kako su kontaminacije s *L. monocytogenes* perzistentne te higijenske mjere koje se poduzimaju moraju biti temeljito provedene. Uzorci pozitivni na *L. monocytogenes* u prvom i drugom uzorkovanju slani su na potvrdu kontaminacije u Hrvatski veterinarski institut, koji je potvrdio prvotni nalaz, te je obaviještena sanitarna inspekcija.



Tablica 2 - Prikaz rezultata mikrobioloških analiza za sva tri uzorkovanja

Mikrobiološki parametar	Ukupno uzoraka	Pozitivni nalazi	Komentar
<i>Salmonella</i> spp. / 25 ml	87 (30; 28;29)*	-	
<i>Listeria monocytogenes</i> / 25 ml	87 (30; 28;29)*	4(2/2/0)**	Uzorkovanje u listopadu bilo je pozitivno u 2 uzorka, ali od istog proizvođača. Kako je u jednom uzorku potvrđeno 400 cfu/ml, obaviještena je sanitarna inspekcija. U uzorkovanju u veljači isti je proizvođač imao pozitivan nalaz na L.m. ali se radilo o 20 cfu/ml. Osim u ovom slučaju L.m utvrđena je kod još jednog proizvođača, ali < 10cfu/ml.
<i>Staphylococcus aureus</i> / ml	87 (30; 28;29)*	18 (5/13/15)**	Ovaj kriterij nije propisan Uredbom 2073/2005, već se koristila preporuka iz Vodiča za mikrobiološke kriterije S.a <100. Pozitivni nalazi odnose na >100 cfu /ml, a broj cfu se kreće u rasponu 200-6000.
<i>Yersinia enterocolitica</i> / 25ml	87 (30; 28;29)*	-	
<i>Campylobacter</i> spp. / ml	87 (30; 28;29)*	-	
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 /25 ml	87 (30; 28;29)*	-	
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	57 (28;29)*	-	Analiza na ove parametre planirana je u veljači i lipnju 2015. Stoga je broj uzoraka manji.
<i>Coxiella burnetti</i>	57 (28;29)*	10 (5/5)**	Analiza na ove parametre planirana je u veljači i lipnju 2015. Stoga je broj uzoraka manji. Od 5 pozitivnih 2 su od istog proizvođača mlijeka. Ovaj mikroorganizam nije propisan Uredbom 2073/2005, ali s obzirom da su zabilježeni slučajevi oboljenja od Q groznice u ljudi, nakon konzumacije kontaminiranog sirovog mlijeka obaviještena je sanitarna inspekcija, a kako se radi o bolesti koja se suzbija po zakonu obaviještena je i veterinarska inspekcija.
Virus enzooske leukoze goveda	28	-	Analiza na ove parametre planirana je u veljači i lipnju 2015. Stoga je broj uzoraka manji.
Antimikrobni lijekovi	87 (30; 28;29)*	6 (2/4/0)**	Kod uzorkovanja u listopadu 2 su uzorka, od istog proizvođača, bili pozitivni na nalaz antimikrobnih lijekova. Kod uzorkovanja u veljači sva 4 pozitivna uzorka su bila od različitih proizvođača.

\*Prvi se broj odnosi na broj uzoraka uzorkovanih u listopadu, drugi u veljači, a treći u lipnju

\*\*Prvi se broj odnosi na broj pozitivnih uzoraka u listopadu, drugi u veljači, a treći u lipnju

Ukoliko su proizvođači mlijeka isporučivali mlijeko na više mljekomata, u istom ciklusu uzorkovanja, u izračunu za prevalenciju njihovi su uzorci bilježeni kao jedan uzorak. Prevalencija u tom slučaju iznosi 4,55 % (ukupno 66 uzoraka od čega 3 pozitivna), dok bi prevalencija koja uzima u obzir broj mljekomata iznosila 4,60 % (ukupno 87 uzoraka i 4 pozitivna na *L. monocytogenes*). Prevalencija proizvođača bila bi 7,69 % (26 proizvođača mlijeka, kod dvojice pozitivni uzorci).

Od 87 uzoraka mlijeka, *S. aureus* (tablica 3) utvrđen je u broju većem od 10 cfu/ml u ukupno 33 uzorka. Uzorak s manjim brojem patogena od 10 cfu/ml mlijeka smatrali smo negativnim. Međutim, u slušaju kada smo računali prosječnu vrijednost kontaminacije mlijeka s bakterijom *S. aureus* za vrijednosti manje od 10 cfu/ml, uzimali smo vrijednost 9 cfu/ml. Te vrijednosti pretpostavljaju scenarij najgoreg slučaja, a s druge strane, razlike u rezultatu kad smo koristili vrijednosti manje od 9 cfu/ml bile su vrlo

male. Kod prvog uzorkovanja od ukupno 30 uzorka u 5 je bilo više od 10 cfu/ml, kod drugog od ukupno 28 uzoraka 13, a kod trećeg od ukupno 29 uzoraka 15 je bilo iznad 10 cfu/ml. Prevalencija svih uzoraka je 37,93 %, odnosno za prvo uzorkovanje 16,67 %, drugo 46,43 % i za treće 51,72 %.

Tablica 3 - Prosječne, najmanje i najveće vrijednosti kontaminacije sirovog mlijeka iz mljekomata sa bakterijom *S. aureus*

<i>S. aureus</i>	Uzorkovanje listopad	Uzorkovanje veljača	Uzorkovanje lipanj	Ukupno sva uzorkovanja
Prosječna kontaminacija (cfu/ml)	20	68	64	43
Najmanja kontaminacija (cfu/ml)	9*	9*	9*	9*
Najveća kontaminacija (cfu/ml)	6000	6000	2000	6000
Broj kontaminiranih uzoraka > 10 cfu (ukupan broj uzoraka)	5 (30)	13 (28)	15 (29)	33 (87)

\*za uzorke koji su imali rezultat <10 cfu kao vrijednost je uzeto 9 cfu/g. Na taj način izračunate vrijednosti predstavljaju rezultat uz pretpostavku najgoreg scenarija

Identifikacija *C. burnetti* provedena je na ukupno 57 uzoraka mlijeka prikupljenih u zimskom i ljetnom uzorkovanju. Korištenjem metode lančane reakcije polimerazom (konvencionalni PCR i Real-Time PCR) bilo je pozitivno 10 uzoraka (17,54 %), ili po pet u svakom uzorkovanju te je prevalencija u zimskom uzorkovanju iznosila 17,86 %, a u ljetnom 17,24 %. Pozitivni uzorci utvrđeni su kod ukupno 4 proizvođača mlijeka. U oba uzorkovanja kod tri proizvođača mlijeka, od kojih su dvojica distribuitala u isto mjesto, a treći u dva mljekomata u 2 različita mjesta. Jedan proizvođača imao je pozitivan uzorak samo u zimskom uzorkovanju, dok je u ljetnom (dakle nakon zimskog) od istog proizvođača uzorak bio negativan.

### Rezultati kemijskih analiza

Rezultati za svježinu mlijeka, količinu vode u mlijeku, mliječne masti, bjelančevina i laktoze u mlijeku prikazani su u **tablici 4**.

Kod pojedinih uzoraka mlijeka na istom mljekomatu, rezultati ukazuju na velika odstupanja između najmanjih i najvećih vrijednosti. Tako u slučaju svježine mlijeka najveće odstupanje iznosi čak 7 °SH, dok je najmanje 0,16 °SH, a prosječno 1,68 °SH. U slučaju količine vode u mlijeku, najveće odstupanje iznosi 3,23 %, dok je najmanje 0,37 %, a prosječno 1,22 %. Odstupanja za količinu mliječne masti kreću se od najmanje 0,10 %, do najviše 3% te u prosjeku 1,34 %. Odstupanja za količinu bjelančevina iznose

najmanje 0,23 %, najviše 1,70 %, u prosjeku 0,96 %, dok su razlike u količini laktoze 0,04 %, 2,11 % i 1,26%.

Tablica 4 - Prikaz analiziranih kemijskih parametara u mlijeku iz mljekomata prema vremenu uzorkovanja i ukupno, kroz najmanje, najveće i prosječne vrijednosti, te standardnu devijaciju i medijan

Kemijski parametar	Vrijeme uzorkovanja	min	max	$\bar{x}$	$\delta$	medijan
Svježina mlijeka °SH	jesen	6,76	11,54	8,76	1,26	8,65
	zima	7,00	15,00	8,84	1,68	8,60
	proljeće/ljeto	7,20	9,52	8,25	0,54	8,16
	cijela godina	8,25	15,00	8,62	1,26	8,40
Voda %	jesen	85,29	89,39	86,92	1,05	86,96
	zima	85,45	88,95	87,03	0,71	86,96
	proljeće/ljeto	85,15	89,60	87,10	0,87	87,17
	cijela godina	85,15	89,60	87,03	0,09	87,03
Mliječna mast %	jesen	1,20	5,00	3,34	1,07	3,50
	zima	1,20	4,70	3,81	0,77	4,00
	proljeće/ljeto	2,60	5,30	4,02	0,53	4,00
	cijela godina	1,20	5,30	3,19	0,87	4,00
Bjelančevine %	jesen	2,63	4,56	3,57	0,59	3,34
	zima	2,63	4,38	3,50	0,50	3,51
	proljeće/ljeto	2,86	4,46	3,66	0,42	3,57
	cijela godina	2,63	4,56	3,58	0,51	3,51
Laktoza u mlijeku %	jesen	3,25	4,88	4,00	0,30	4,00
	zima	4,23	6,19	5,18	0,46	5,07
	proljeće/ljeto	4,38	5,49	5,00	0,26	4,99
	cijela godina	3,25	6,19	4,73	0,63	4,88

$\bar{x}$  = aritmetička sredina;  $\delta$  = standardna devijacija; min = najmanja izmjerena količina; max = najveća izmjerena količina

## Rezultati analiza na ostatke antimikrobnih lijekova

Analizom je utvrđena pozitivna reakcija brzim testom TwinsensorBT BT00660+ u ukupno šest uzoraka (6,74 %). Ako se gleda po vremenu uzimanja u jesenskom uzorkovanju bila su dva (6,66 %) pozitivna uzorka, oba kod istog proizvođača koji prodaje mlijeko na dva odvojena mljekomata, ali u istom mjestu. U zimskom uzorkovanju bila su četiri pozitivna uzorka (14,28 %), svaki kod drugog proizvođača. U ljetnom uzorkovanju nije bilo pozitivnih uzoraka (od ukupno 29 uzoraka mlijeka). Pozitivna reakcija odnosi se na skupinu beta laktamskih antibiotika (penicilin G, cefalosporin, penicilin G, kloksacilin, cefapirin, cefalonij, cefazolin, cefoperazon i cetiofur) i klortetraciklin koji se nalaze na listi farmakološki

djelatnih tvari kojih ne smije biti u mlijeku; Uredba komisije (EZ) br. 37/2010 od 22. prosinca 2009. o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla). Kako je riječ o brzom testu koji ne govori o količini određene antimikrobnog lijeka, nije moguće uspoređivati podatke s prihvatljivim dnevnim unosom niti procijeniti rizik. Međutim, ovi podaci ukazuju na činjenicu da se ne može isključiti mogućnost prisutnosti ostataka antimikrobnih lijekova i u većim količinama, pa se rezultati trebaju koristiti kao upozorenje da je u mlijeku moguće utvrditi ostatke antimikrobnih lijekova bez obzira na zakonske propise o upotrebi farmakološki djelatnih tvari i poštivanju karencije.

### **Rezultati analiza na mikotoksin AFM<sub>1</sub>**

Ukupno 30 uzoraka mlijeka iz mljekomata analizirano je na mikotoksin aflatoksin M<sub>1</sub> u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“. Tom se prilikom koristila akreditirana metoda HRN EN ISO 14501:2008 (SOP-25-053) za određivanje aflatoksina M<sub>1</sub> u mlijeku.

U svih 30 uzoraka mlijeka iz mljekomata utvrđena količina aflatoksina M<sub>1</sub> bila je ispod 0,01 µg/kg.

### **Anketa o konzumaciji i postupanju s mlijekom iz mljekomata**

Anketa je provedena putem web stranice Hrvatske agencije za hranu. O anketi je poslana obavijest svim pretplatnicima stranice, u dva navrata, te je dodano poslana obavijest preko mailing liste institucijama i udrugama s kojima HAH surađuje, kao što su fakulteti i društva za zaštitu potrošača. Anketa je bila postavljena na web stranici HAH-a 2 mjeseca.

Pitanja postavljena u anketi nalaze se u Dodatku 2. ovog dokumenta.

### **Obrađeni rezultati ankete**

Ukupno je anketom bilo obuhvaćeno 89 subjekata. 39,33 % odgovorilo je da konzumira sirovo mlijeko, a 21,35 % bi konzumiralo kad bi imalo priliku da ga kupuje, preostali su odgovorili da ne konzumiraju sirovo mlijeko. Od konzumenata 25,71 % isključivo konzumira sirovo mlijeko, 54,28 % ponekad, a 20 % rijetko.

Prema rezultatima ankete potrošači konzumiraju mlijeko iz mljekomata u rasponu od 1 L do 60 L mjesečno, iz čega se dobila prosječna vrijednost od 11 L mjesečno. Za ovaj je izračun standardna devijacija iznosila 12,51. Vrijednost 1. kvartila (Q1) bila je 4 litre, 2. kvartila (medijan) 6 litara, a 3. kvartila (Q3) 15 litara.

Glavni razlog za kupnju mlijeka iz mljekomata mišljenje je konzumenata kako je to mlijeko zdravije (38 %), na drugom je mjestu zadovoljstvo potrošača što se ovakvom kupovinom direktno pomažu proizvođači mlijeka/poljoprivrednici (29 %). 25 % smatra kako je takvo mlijeko kvalitetnije i punijeg okusa, a 9 % je zadovoljno što se mlijeko može kupovati neprestano 24 sata. Ispitanici su ostavili komentare kako je to pravo mlijeko, ima okus mlijeka iz djetinjstva i smatraju da je nutritivno bogatije. U većini slučajeva 75 %, mlijeko se puni u vlastite boce, a manji dio u boce koje se kupuju na mljekomatima. Razlog tomu je raspoređenost modela mljekomata koji nemaju boce, te se mlijeko mora puniti isključivo u vlastitu ambalažu.

U 48,6 % slučajeva konzumenti mlijeko ne prokuhavaju. Od 51,4 % koji prokuhavaju, 50 % prokuha odmah nakon kupnje, 17 % drži u hladnjaku i prokuha svu količinu prije konzumacija, a 33 % prokuhava

dio po dio koji planira konzumirati. Oni koji mlijeko ne obrađuju termički najčešće od njega prave kefir (u 20 % slučajeva), te su pojasnili svoje postupanje, i korištenje mlijeka bez termičke obrade, rezultatima istraživanja koji se mogu naći u priznatim znanstvenim časopisima (npr. američkim i britanskim) da sirovo neprokuhano mlijeko u sebi sadrži čitav niz zaštitnih čimbenika koji ga čuvaju od kvarenja, kao i mnogo navoda o tome da takvo mlijeko ne podržava rast širokog spektra patogena. Jedna ispitivana osoba odgovorila je da od mlijeka često radi kefir i da zahvaljujući mikrobiološkom sastavu zdrave startne kulture i fermentaciji kao metodi biološkog konzerviranja, mogućnost infekcije pri konzumaciji svodi se na najmanju moguću.

Najviše ispitanika, gotovo 44 %, nakon 15 do 30 minuta od kupnje, mlijeko stavi u hladnjak, manje od 15 minuta treba 33 % ispitanika, 11 % treba do sat vremena, dok 8 % ispitanika mlijeko ne pohranjuje u hladnjak više sati.

Među komentarima se našao i prijedlog kako bi trebalo biti više mljekomata.

Mlijeko iz mljekomata najviše kupuju osobe mlađe srednje dobi od 30 do 44 godine (36 %) onda od 45 do 54 godine (28 %), 22 % od 18 do 29 godina, a najmanje u dobi 55 do 64 godine (13 %).

U anketi je sudjelovalo malo više žena (56 %) u odnosu na 44 % muškaraca. Gotovo 71 % ispitanika su završili visoku školu/fakultet, 13 % su s višom tj. bakalari i 16 % imaju završenu srednju školu. Ovako veliki broj sudionika s visokom spremom mogao se naslutiti već i iz odgovora o korištenju mlijeka, ali moglo bi se reći da je to i iz razloga što se može očekivati da je ta kategorija populacije najzahvalnija za on line ankete. Prosječan broj osoba u kućanstvu iznosio je 3,29, a kretao se od 1 do 6, a radilo se o kućanstvima s najviše 2 djece.

Najviše odgovora došlo je iz Zagreba i Zagrebačke županije, ukupno 56 %. Onda iz Osječko-baranjske (15 %), Splitsko-dalmatinske (8 %), Varaždinske (7 %), Međimurske (4 %), Primorsko-goranske (3 %) i Koprivničko-križevačke (2 %). Iz jedanaest županija nismo dobili niti jedan odgovor na anketu. U tim županijama nije niti evidentiran mljekomat, osim u Sisačko-moslavačkoj (imaju 3 mljekomata), a u Požeško-slavonskoj je mljekomat iz Požege u međuvremenu prestao s radom. Visoki postotak odgovora iz Osječko-baranjske županije najvjerojatnije je posljedica čak 5 mljekomata koji su bili u Osijeku, ali su prestali s radom u drugoj polovici 2014. godine.

### 3. PROCJENA IZLOŽENOSTI

U RH evidentirano je 30-ak mljekomata (u vrijeme provođenja ovog istraživanja, a službena evidencija na dan 3.5.2016. je 34 mljekomata). Prilikom tri provedena uzorkovanja njihov je broj varirao od 28 do 30. Neki su mljekomati u roku od nekoliko mjeseci, koliko je bio razmak između uzorkovanja, ugašeni, premješteni, bili u kvaru ili su otvoreni novi na istom ili drugom mjestu. Postojanost mljekomata neposredno prije uzorkovanja provjeravana je osobno telefonskim putem. Tako je utvrđeno kako na popisu neki navedeni mljekomati nisu u funkciji, bilo da je vlasnik odustao od ovakvog načina prodaje mlijeka, bilo da je uređaj u kvaru, ili se radilo o ishodovanju dozvole bez da je mljekomat ikada stavljan u funkciju, a u nekim slučajevima mljekomat je jednostavno bio uklonjen bez ikakvog objašnjenja. Kapacitet mljekomata kretao se otprilike od 100 do 200 L, što je procijenjeno na temelju veličine samog uređaja, iako se ne raspolaže sa stvarnim podacima s koliko je litara mlijeka dnevno punjen. U nekim mjestima nalazilo se više mljekomata na različitim lokacijama (Zagreb, Varaždin, Split), ponekad nekoliko od istog vlasnika (Zagreb, Sisak) ili se u jednom mjestu nalazio samo jedan mljekomat (Požega,

Kutina), a bilo je slučajeva kada je u više mjesta bi mljekomat od istog proizvođača (Nova Gradiška, Novska). Teško je procijeniti kolika je potrošnja sirovog mlijeka. Može se zaključiti kako će ljudi koji konzumiraju ovakvu vrstu mlijeka, ukoliko u tom naselju postoji samo jedan mljekomat trajno biti izloženi mikrobiološkim opasnostima samo od tog proizvođača. Ovakva se situacija može poistovjetiti s procjenom u slučaju kada su potrošači vjerni isključivo jednoj robnoj marki, što je već korišteno u izradi procjene rizika.

Na temelju provedene ankete može se pretpostaviti dnevna potrošnja sirovog mlijeka 0,36 L dnevno po osobi (koje ga konzumiraju). Obradom odgovora iz ankete došlo se do podatka o prosječnoj kupovini 11 L sirovog mlijeka mjesečno, a najmanja prijavljena količina mjesečno iznosila je 1 L, dok je najveća prijavljena količina iznosila je 60 L mjesečno. Otprilike petina ispitanika (19,1 %) konzumira mlijeko bez prethodne termičke obrade, dok ostali ili svo mlijeko termički obrade prije pohrane u hladnjak, ili termički obrađuju dio po dio prije konzumacije. Oko 42 % ispitanika treba do 15 minuta od trenutka kupovine mlijeka do dolaska kuća, nešto više od 45 % treba do 30 minuta, 11 % treba do sat vremena, a svega 8,5 % kupaca treba dulje od jednog sata.

Konzumenti sirovog mlijeka orijentirani su gotovo uvijek na isti mljekomat tj. na istog proizvođača. Osobito je to izraženo u manjim sredinama gdje se često i nalazi samo jedan mljekomat/proizvođač. Napraviti stoga procjenu rizika za cijelu zemlju nije realno jer kako se vidi iz rezultata mikrobioloških analiza, najčešće je mlijeko iz istog mljekomata kontaminirano nekim patogenom u svim uzorkovanjima bilo pozitivno na tog patogena (*L. monocytogenes*, *C. burnetii*). Odnosno, ne može se predvidjeti gdje će se i kada pojaviti patogeni u mlijeku, ali je izvjesno da do takve kontaminacije može doći, čak i slučajevima besprijekornog pridržavanja higijenskih načela kod proizvodnje mlijeka na farmama (Guh i sur., 2010).

S obzirom kako niti jedan pregledani uzorak sirovog mlijeka iz mljekomata nije bio pozitivan na bakteriju *C. jejuni/coli*, *E. coli* O157 (VTEC ili STEC), *Salmonella* spp., *Y. enterocolitica*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* i na virus enzootske leukoze goveda, za te patogene procjena izloženosti nije mogla biti napravljena.

Osim toga nismo raspolagali niti jednim epidemiološkim podatkom koji bi povezivao konzumaciju sirovog mlijeka s izazivanjem bolesti u ljudi.

Predviđanje rasta *L. monocytogenes* i *S. aureus* obavljeno je pomoću „Modela rasta“ (ComBase predictor Growth u ComBase softveru; ComBase, 2016). Kako je nedostajala vrijednost za pH mlijeka korišteni su navodi iz literature prema kojima pH iznosi 6,6 - 6,8. Za  $a_w$  mlijeka korištena je vrijednost 0,98 (Tratnik, 1998). Parametar koji je dodatno bio potreban za predviđanje rasta u ovom softveru je „početno fiziološko stanje“. Ta je vrijednost obilježena brojem između 0 i 1, kako bi se izrazilo fiziološko stanje stanica u njihovom okolišu. Ukoliko je vrijednost 0 neće doći do rasta, a ukoliko je vrijednost 1 rast će krenuti odmah, bez log faze. Na ovaj parametar utječu temperatura, pH, aktivitet vode, stres (toplinski, osmotski, kiselinski). Prilikom korištenja ComBase softvera teško je odrediti vrijednost za početno fiziološko stanje. Stoga je već postavljena tipična vrijednost za određeni mikroorganizam. (ComBase, 2016). Za inicijalnu kontaminaciju kod *L. monocytogenes* korištene su vrijednosti koje su pojedinačno bile uvrštene u uzorcima mlijeka, odnosno kontaminaciju od 9 cfu/ml u slučaju kada je rezultat analize bio manji od 10 cfu, te 300, 500 i 960 cfu/mL. Parametar koji je najviše mijenjan bila je temperatura. U slučaju povišenja na 5 °C, za udvostručavanje broja bakterija bilo bi potrebno više od 14 sati, u slučaju povišenja na 10 °C, za udvostručanje bi trebalo 5 i pol sati, a za povišenje temperatura na 20 °C, za udvostručanje bilo bi potrebno sat i 20 minuta, dok bi u slučaju povišenja temperature na 35 °C bilo potrebno svega pola sata kako bi se broj bakterija udvostručio. S obzirom da većini ispitanika

treba najviše 15, odnosno 30 minuta za dolazak kući (i pohranu mlijeka ponovno na temperaturu hladnjaka), to vrijeme nije dovoljno da povećanje temperature značajno utječe na povećanje broja *L. monocytogenes* ukoliko je inicijalni broj manji. Ukoliko je kontaminacija veća, kao u našem slučaju 300 i više cfu/mL, može se očekivati kako se zbog transporta mlijeka, pri čemu je ono izloženo temperaturi okoliša, koja u ljetnim mjesecima može iznositi do 40 °C, poaviti rizik za povećanjem broja listerija koje bi mogle imati štetni utjecaj na zdravlje, ukoliko se mlijeko termički ne obradi. Posebno se to odnosi na konzumente kojima je potrebno više od 30 minuta za transport mlijeka. U odnosu na sve izneseno svakako se preporučuje koristiti prijenosne hladnjake ili na sličan način osigurati što je moguće manji utjecaj vanjske temperature na sirovo mlijeko.

Za inicijalnu kontaminaciju *S. aureus* korištene su ukupno najniža utvrđena vrijednost od 9 cfu/mL, najveća od 6000 cfu/mL i prosječna od 20 cfu/mL. Prosječna vrijednost dobivena je na temelju izračuna kada su obuhvaćeni rezultati analiza svih uzoraka, a u slučaju da je uzorak bio negativan tj. <10cfu/mL, korištena je vrijednost 9 cfu/mL, kao primjer najgoreg scenarija. Vrijeme potrebno za udvostručenje broja mikroorganizama, izračunato uz pomoć ComBase softwera u slučaju povećanja temperature na 10 °C iznosilo je 13 sati i 10 minuta, u slučaju povišenja 20 °C jedan sat i 30 minuta, a u slučaju povećanja na 30 °C, za udvostručenje broja potrebno je svega 30 minuta. S obzirom da se proizvodnja stafilokoknog enterotoksina može očekivati nakon što se broj bakterije *S. aureus* poveća iznad 10<sup>5</sup>, u slučajevima kada je kontaminacija iznosila 10<sup>4</sup>, vrijeme od 30 minuta je dovoljno da se dostigne potreban broj bakterijskih stanica *S. aureus* sposobnih za proizvodnju stafilokoknog enterotoksina. Stoga je korištenje prijenosnih hladnjaka u ovom slučaju još neophodnije, kao i obvezna toplinska obrada mlijeka odmah nakon što se mlijeko donese kući. Svako odlaganje toplinske obrade povećava rizik nastanka termostabilnog enterotoksina, te kasnija primjena toplinske obrade, ne bi imala utjecala na njegovo smanjenje u mlijeku (Vidi dodatak 4.)

#### 4. KARAKTERIZACIJA RIZIKA

Prilično je teško precizno odrediti bakterijski rizik kod konzumacije sirovog mlijeka. Hoće li osoba nakon konzumacije sirovog mlijeka oboljeti ili ne ovisi o nekoliko čimbenika: virulenciji mikroorganizama (ili toksičnosti toksina) i njihovom broju, infektivnoj dozi te o zdravstvenom stanju same osobe (Lund i O'Brien, 2011). Giacometti i sur. (2012) pokušali su rizik odrediti u slučaju humanih kampilobakterioza i hemolitičkog uremijskog sindroma (HUS) uzrokovanog s verotoksičnom *E. coli*. Istraživanje je obuhvatilo kompletnu procjenu izloženosti, od mužnje do konzumacije, uključujući hlađenje, pohranu i zagrijavanje sirovog mlijeka. Istraživanje je rezultiralo izračunom rizika na godišnjoj razini od 1-2 slučaja kampilobakterioze i 0,01-0,02 slučaja HUS-a na 10000-20000 konzumenata.

Prema rezultatima mikrobioloških analiza, sirovo mlijeko iz mljekomata je bilo najviše kontaminirano s patogenima *L. monocytogenes*, *S. aureus* i *C. burnetti*, koji mogu dovesti do oboljenja ljudi.

Prilikom predviđenog izračuna moguće prisutnosti *L. monocytogenes* u mlijeku, utvrđeno je kako je moguće da se u slučaju kod kontaminacije s 300 i više cfu/ml, a pri transportu mlijeka od kupnje do kuće u vremenu dužem od 30 minuta i pri ljetnim visokim vanjskim temperaturama (do 40 °C) broj listerija povisi do broja koji može imati štetan utjecaj na zdravlje ljudi. Termička obrada mlijeka se stoga preporučuje prije pohrane u hladnjak, jer na *L. monocytogenes* ne utječe osobito temperatura hladnjaka (do 8 °C). S druge strane pH 4,4 i niži djeluje na prestanak rasta i smanjuje preživljavanje *L. monocytogenes*, što je slučaj prilikom korištenja ovakvog mlijeka za proizvodnju jogurta ili kiselog

mlijeka, ali broj listerija se postepeno smanjuje i prema Combase predictor, uz navedeni pH i temperaturu od 8 °C. D-vrijednost (vrijeme potrebno da se broj mikroorganizama smanji za 90 %) iznosi 186 sati, kod pH 4 pada na 93 sata, a kod pH 3,8 na 63 sata (dodatak 5.). Broj listerija bi mogao pasti za 1-2 dana (pH 3,8) ispod 100 što je gornja granica infektivne doza (s tendencijom daljnjeg smanjivanja). Međutim, ovisno o pH medija, ne možemo biti precizni oko broja listerija ili vremena koje je potrebno da bi se taj broj postigao, te se i u ovom slučaju ne može sa sigurnošću isključiti štetni utjecaj na zdravlje ljudi.

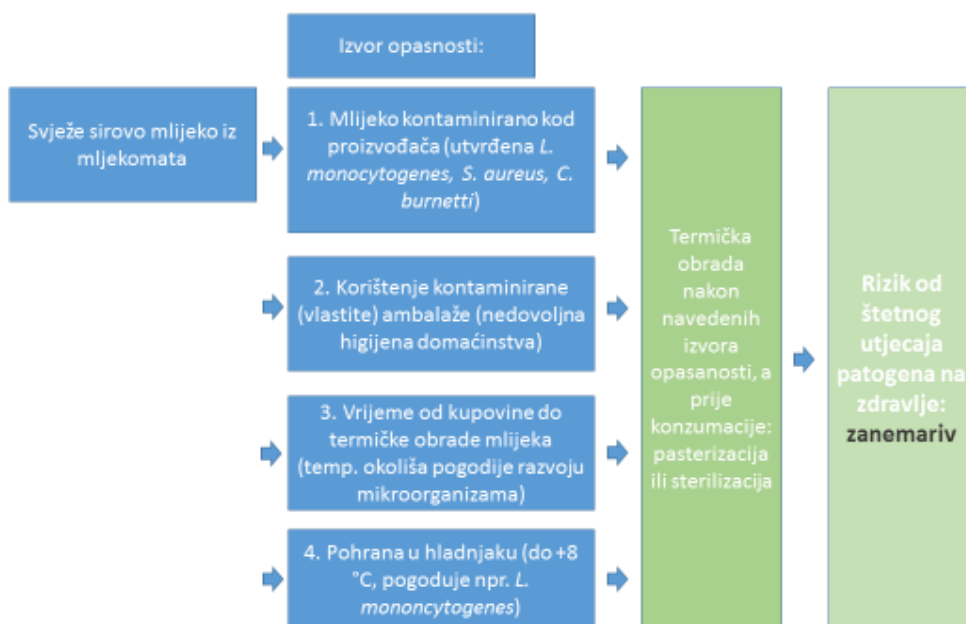
U slučaju kontaminacije s bakterijom *S. aureus*, vrijeme potrebno da se njihov broj udvostruči pri visokim temperaturama (npr. 30 °C) bilo je 30 minuta. Kod kontaminacije od 10<sup>4</sup> (analizom je utvrđena kontaminacija od 6000 cfu/mL) može očekivati udvostručenje ovog broja i prelazak broja bakterija *S. aureus* iznad 10<sup>5</sup> cfu/ml, što se smatra donjom granicom moguće proizvodnje stafilokoknog enterotoksina. Taj je toksin termostabilan, što znači da ga niti naknadna termička obrada neće uništiti. Valja ovdje razmišljati o korištenju prijenosnih hladnjaka kod kupovine sirovog mlijeka, ali i o termičkoj obradi mlijeka prije pohrane, kako bi se smanjio rizik od nastanka štetnog utjecaja na zdravlje. Izračun preživljavanja bakterije *S. aureus* nije moguć u Combase softveru tako da nije izračunata njegova sudbina u slučaju korištenja sirovog mlijeka za proizvodnju jogurta ili kiselog vrhnja. Ipak, *S. aureus* može podnijeti pH od 4,2, što znači da je velika mogućnost njegovog preživljavanja u proizvodima poput jogurta ili kiselog mlijeka.

Prisutnost *C. burnetii* u mlijeku predstavlja potencijalan rizik za zdravlje ljudi iako su zabilježeni rijetki slučajevi sirovog mlijeka kao izvora zaraze s ovim patogenom. Cobase softver nema mogućnost predviđanja rasta ili preživljavanja ovog mikroorganizma. Prisutnost *C. burnetii* u mlijeku vodi porijeklo iz stada, a ovog je uzročnika jako teško ukloniti kako iz stada tako i iz naknadno kontaminirane opreme ili uređaja preko kojeg se mlijeko distribuira (mljekomata), stoga je njegovo utvrđivanje bitno za daljnje veterinarsko higijenske mjere kako bi se njegovo širenje spriječilo. Ne može se niti u potpunosti isključiti mogućnost štetnog djelovanja *C. burnetii* na zdravlje ljudi.

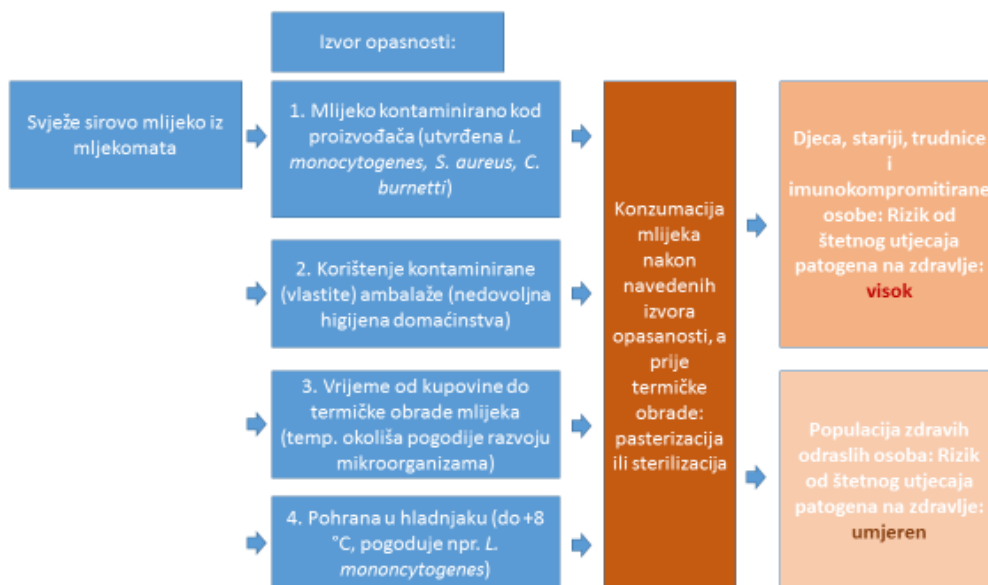
Na temelju izloženog rizik se u slučaju sirovog mlijeka iz mljekomata može okarakterizirati kvalitativno kao:

1. **Zanemariv** – u slučaju termičke obrade mlijeka prije pohrane u hladnjak odnosno prije konzumacije (**slika 6**);
2. **Umjeren** – u slučaju konzumacije sirovog mlijeka bez prethodne termičke obrade za populaciju zdravih odraslih (**slika 7**);
3. **Visok** - u slučaju konzumacije sirovog mlijeka bez prethodne termičke obrade za populaciju djece, starijih, trudnica i imunokompromitiranih osoba (**slika 7**).





Slika 4 - Scenarij rizika kod konzumacije mlijeka iz mljekomata nakon termičke obrade mlijeka



Slika 5 - Scenarij rizika kod konzumacije mlijeka iz mljekomata bez termičke obrade mlijeka

## RASPRAVA

### Mikrobiološki parametri u sirovom mlijeku iz mljekomata

Na prevalenciju različitih patogena u sirovom mlijeku utječe veći broj čimbenika, poput veličine stada, higijene, načina upravljanja farmom, zemljopisno područje i sezona, ali i način uzimanja uzorka te detekcijska metoda koja je korištena. Međutim unatoč svim ovim utjecajima, jasno je da je mlijeko izvor patogena koji se prenose hranom i koji su značajni za ljudsko zdravlje (Oliver i sur., 2005).

Valík i sur. (2011) određivali su mikrobiološku kakvoću mlijeka iz mljekomata u Slovačkoj, ali samo preko bakterija indikatora. Proučavano mlijeko zadovoljilo je u 80 % slučajeva kriterij za ukupan broj bakterija manji od 100.000 cfu/mL, a svi su uzorci bili komplementarni s kriterijem  $5 \times 10^4$  cfu/mL za psihotropne bakterije. Broj koagulaza pozitivnih stafilokoka kretao se oko  $2,9 \times 10^2$  cfu/mL, dok je prosječna kontaminacija *E. coli* iznosila  $4,34 \pm 0,42$  i  $3,25 \pm 0,83$  cfu/mL. Broj ovih mikroorganizama nije se povećao niti nakon pohrane mlijeka 24 sata na 6 °C, što autori objašnjavaju kao posljedicu prisutnosti mikroorganizama od fekalne kontaminacije, a ne njihovog rasta. Ipak prisutstvo indikator bakterija ne isključuje postojanje patogenih poput *Campylobacter* spp. i *Salmonella* spp., kao i drugih patogena, te iziskuje primjenu preventivnih mjera od strane upravitelja rizikom.

Oliver i sur. (2009) u preglednom radu ističu kako su *Salmonella* spp. i *L. monocytogenes* najučestaliji patogeni izolirani iz sirovog mlijeka, čiji je raspon iznosio kako slijedi od 0 do 11 % (u kolostrumu i 15 % veći stupanj izolacije) i od 2,8 do 7 %. Pored ova dva patogena mogu se naći podaci i o prisutnosti *C. jejuni* (2,0-9,2 %), *Y. enterocolitica* (1,2-6,1 %), STEC (0-0,75%) i *S. aureus* (27,4 – 37 %).

Kalmus i sur. (2015) pronašli su *L. monocytogenes* u 28,5 % uzoraka sirovog mlijeka iz spremnika u Estoniji, što je više od 18, 1 % u odnosu koliko je ranije u istoj zemlji naveo Karamarenko i sur. (2013), dok se prema podacima koji su godišnje prijavljeni EFSA-i vidi kako se njena prisutnost u mlijeku od 2007 do 2011 kreće 4,8 – 20 % (Viltrop i Roasto, 2013). Usporedbe radi, autori navode prevalenciju u Finskoj, Španjolskoj, Belgiji i Francuskoj gdje se kretala od 5,5 do 6,5 %. U našem istraživanju prevalencija *L. monocytogenes* iznosila je 4,6 %, što u odnosu na navedene prevalencije iz drugih europskih zemalja spada u niže prevalencije. U skladu s državnim programom nadzora u Estoniji uzorci sirovog mlijeka uzimaju se direktno od proizvođača na mjestu prodaje jedanput godišnje radi pregleda na *L. monocytogenes* (prema kriteriju odsustvo u 25 mL, n=1). Kalmus i sur. (2015) smatraju kako ova metoda nije dovoljno osjetljiva za listeriju, a da je frekvencija uzorkovanja premala da bi se mogle donijeti odluke o sigurnosti hrane.

*Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp. nisu utvrđeni u uzorcima mlijeka u Estoniji (Kalmus i sur., 2015), a takva je situacija bila i u Hrvatskoj. To se ne podudara s nalazima *Campylobacter* spp. u sjevernoj Italiji, Poljskoj, Velikoj Britaniji i Francuskoj, gdje je prevalencija iznosila 1,4 do 4,6 %, ali je u skladu s rezultatima iz Finske, Norveške i Švicarske. Razlog za izostanak nalaza kampilobaktera može biti nekorištenje medija za transport, jer je poznato da je ovaj patogen jako osjetljiv na isušivanje. U slučaju *Salmonella* spp., one nisu utvrđene niti u Finskoj, Belgiji i Švicarskoj, a u sjevernoj Italiji bilo je 1 % *Salmonella* spp. pozitivnih uzoraka. Konačno autori zaključuju kako kakvoća mlijeka u Estoniji koju su analizirali nije zadovoljavajuća, zbog prisutnosti patogena koji predstavljaju trajnu prijetnju proizvodnji mlijeka bilo da dolaze iz okoliša, bilo sa samih krava. Stoga se o sigurnoj konzumaciji sirovog mlijeka može govoriti tek nakon njegove termičke obrade. Ujedno niti mjere koje su u Estoniji trenutno na snazi nisu zadovoljavajuće da bi osigurale sigurnost sirovog mlijeka te se službeni kriteriji trebaju ažurirati i poboljšati (Kalmus i sur., 2015).

U istraživanju koje su proveli Grant i sur. (2002) u Velikoj Britaniji, utvrđeno je da su uzorci sirovog mlijeka u odnosu na uzorke pastereziranog mlijeka imali puno veću prevalenciju koliformnih bakterija, *E. coli* i *Listeria* spp., dok su neki od uzoraka sadržavali patogene mikroorganizme kao što su *E. coli* O157, *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp, kojih u pastereziranim uzorcima uopće nije bilo.

U istraživanju koje su Bianchi i sur. (2013) proveli u Italiji i koje je obuhvaćalo 131 mljekomat, utvrđena je prevalencija *Salmonella* spp. od 0,3 %, *E. coli* O:157 od 0,2 %, *Campylobacter* spp. 1,5 % i *L. monocytogenes* 1,6 %. Autori nisu primijetili nikakav utjecaj na pojavnost patogena s obzirom na godišnje doba, veličinu stada, mjesto uzorkovanja (stado ili mljekomat) ili mjesto gdje je smješten

mljekomat (trgovina, farma). Značajnu korelaciju su utvrdili u slučaju prisutnosti patogena u prijašnjem i ponovnom uzorkovanju, koja je iznosila nešto manje od 72 %. Njihov je zaključak kako je potrebno dodatno provoditi edukaciju o dobroj higijenskoj praksi za vlasnike stada mliječnih krava koji svoje mlijeko prodaju putem mljekomata. Posebno naglašavaju opravdanost preporuke Ministarstva poljoprivrede u Italiji o prokuhavanju mlijeka prije konzumacije jer smatraju kako je to jednostavan i efikasan način zaštite konzumenata, osobito djece, starijih i bolesnih, od opasnosti koje im prijete zbog konzumacije sirovog mlijeka. Giacometti i sur. (2013) su na temelju četverogodišnje studije mlijeka iz mljekomata u Italiji utvrdili kako se prevalencija *Salmonella* spp. kreće od 0 do 0,96 %, za *L. monocytogenes* od 0,21 do 1,63 %, za *E. coli* od 0 do 1,50 % i za *C. jejuni* od 0 do 2,22 %, ovisno o zemljopisnoj regiji. Isti autori utvrdili su kako za *L. monocytogenes* i *C. jejuni* postoji trend rasta u prevalenciji, dok je utvrđena i velika razlika kod izoliranja uzročnika uzgojem na hranjivoj podlozi u odnosu na korištenje RT-PCR metode. Korištenjem potonjeg u daleko se više slučajeva potvrdila prisutnost patogena u uzorku ( za *Salmonella* spp. 2,71 puta više, za *L. monocytogenes* 3,62 puta više, za *E. coli* O157:H7 8,55 puta više i za *C. jejuni* 9,40 puta više). Giacometti i sur. (2015) nisu primijetili bitnu razliku u prevalenciji *Salmonella* spp. i *L. monocytogenes* u sirovom mlijeku tijekom četiri godine. Smatraju kako je broj pozitivnih uzoraka mlijeka na ove bakterije nizak, ali konstantan.

Oliver i sur. (2009) u preglednom radu o prevalenciji sirovog mlijeka koja je utvrđena u uzorcima iz spremnika s mlijekom navode kako se ona za *L. monocytogenes* kreće od 2,8 do 7 %, za *Salmonella* spp. 2,6 do 11 %, za *C. jejuni* od 2 do 9,2 %, za *Yersinia enterocolitica* od 1,2 do 6,1 %, za *E. coli* O157:H7 od 0 do 0,75 %, a za *S. aureus* 27,4 do 37 %. Ipak autori smatraju kako se zadnjih godina kod epidemija povezanih sa sirovim mlijekom ili proizvodima od sirovog mlijeka najčešće navode četiri roda bakterija: *Campylobacter* spp., EHEC, *Salmonella* spp. i *L. monocytogenes*, što potvrđuju u pregledu epidemija od 2001. do 2008. koje navode u radu. Podaci o kontaminaciji sirovog mlijeka koje su u preglednom radu iznijeli Oliver i sur. (2005; 2009) i podaci iz Europskih zemalja koje navodi Desmaures i sur. (1997) za *Salmonella* spp. iznose 5,8 %, a za *L. monocytogenes* 2,9 %.

Patogen koji se često nalazi u mliječnoj žlijezdi i uzrokuje mastitis u mliječnim krava je *S. aureus*, osobito sojevi koji proizvode enterotoksin. Osim što se *S. aureus* često nalazi u sirovom mlijeku, prenosi se i u mliječne proizvode. Zabilježeno i više epidemija u ljudi (Oliver i sur., 2005), od kojih je veća zabilježena 2000. u Japanu, s preko 13000 slučajeva oboljelih u mjesec dana, i to prije svega osoba koje su često konzumirale mliječne proizvode. Procijenjeno je tada da je prosječan unos stafilokoknog enterotoksina A (SEA) iznosio 20-100 ng, što je manje od količine koja je bila procijenjena u nekim drugim slučajevima trovanja s SEA-om (Asao i sur., 2003). U istraživanju provedenom u Estoniji, *S. aureus* bio je prisutan u 51,7 % uzoraka sirovog mlijeka iz spremnika. Autori uspoređuju to s nešto više utvrđenom prevalencijom u Francuskoj (62 %), ali ipak više od 47,3 % u Norveškoj, 32,5 % u Poljskoj i 17 % u Nizozemskoj (Kalmus i sur., 2015). U Hrvatskoj je *S. aureus* bio prisutan u 37,93 % uzoraka sirovog mlijeka, ali prevalencija je varirala ovisno o dobu uzimanja uzoraka, iako se ne može zaključiti je li različita prevalencija posljedica vremenskih utjecaja, što bi se još moralo dodatno istražiti. Tako je za jesenje uzorkovanje iznosila 16,67 %, zimsko 46,43 % i proljetno-ljetno 51,72 %. S obzirom na godišnju prevalenciju ona je podjednaka sa prevalencijom u Poljskoj, a jedina niža je prevalencija u Nizozemskoj. U ostalim spomenutim europskim zemljama prevalencija *S. aureus* je veća. S obzirom da je u našem istraživanju sirovo mlijeko koje je imalo više od 10 cfu/mL smatrano kontaminiranim, treba istaći da je prosječna kontaminacija iznosila svega 43 cfu/mL, što je daleko manje od potrebnih 10<sup>5</sup> cfu/mL, koliko je najmanje potrebno za produkciju stafilokoknog enterotoksina.

Valík i sur. (2004) utvrdili su kako se prosječna kontaminacija sirovog mlijeka s bakterijom *S. aureus* kreće od 100 do 200 cfu/mL. Delbes i sur. (2006) smatraju kako se kod proizvodnje sira broj *S. aureus* može povećati za 5 log cfu i tako doseći vrijednost preko  $10^6$  cfu/mL, pri kojoj koncentraciji može započeti proizvodnja enterotoksina. Medvedova i sur. (2013) utvrdili su kako je prosječna kontaminacija sirovog mlijeka sa *S. aureus* u Slovačkoj  $3,9 \times 10^5$  u ljetnom, a  $5,3 \times 10^4$  u zimskom razdoblju. Na temelju tih mikrobioloških rezultata te procjene rasta *S. aureus* u sirevima koji su proizvedeni od sirovog mlijeka iz mljekomata autori su zaključili kako to mlijeko osim što nije pogodno za direktnu konzumaciju nije pogodno niti za korištenje u izradi sireva („lump cheese“) bez primjene toplinskog tretmana ili dodavanja primjerene starter kulture kojom se povisuje kiselost grušča.

Soltan-Dallal i sur. (2004) utvrdili su prevalenciju *Y. enterocolitica* u sirovom mlijeku u Iranu od 1,6 %, dok je nisu uopće pronašli u pasteuriziranom mlijeku.

Hipoteza da se konzumiranjem *C. burnetii* može izazvati Q groznica je kontraverzna i već se desetljećima proučava (Angelakis i Raoult, 2010). Marmion i Stoker (1958) otkrili su da je više osoba koje su konzumirale sirovo mlijeko u dva grada u blizini Kenta, Engleska, oboljelo od Q-groznice u odnosu na osobe iz kontrolne grupe. Beck i Bell (1949) istaknuli su da je 32 % od 300 slučajeva Q groznice u Los Angelesu bilo kod osoba koje su konzumirale sirovo mlijeko. Fishbein i Raoult (1992) opisali su izbijanje Q-groznice u psihijatrijskoj ustanovi na jugu Francuske, kada je stopa seropozitivnosti za *C. burnetii* bila značajno veća kod pacijenata koji su konzumirali nepasteurizirane mliječne proizvode. Tijekom izbijanja Q groznice u 2009. godini u Nizozemskoj, de Bruin i sur. (2012) pronašli su visoke razine DNA *C. burnetii* u uzorcima iz okoliša farmi koje su imale pozitivne skupne uzorke iz spremnika s mlijekom, a na 73 % tih farmi postojala je evidencija nedavnih slučajeva humanih oboljenja od Q-groznice. Eldin i sur. (2013) pronašli su podjednak broj mliječnih proizvoda od sirovog i pasteuriziranog mlijeka kontaminiranih s *C. burnetii*, ali je u proizvodima od nepasteuriziranog mlijeka značajno veći broj bio s većom kontaminacijom, koja je prelazila 3 log 10 kopija/mL. Tim su mlijekom naknadno hranili miševe, kod kojih su izostali znakovi bolesti. Autori su zaključili kako se pasteurizacijom ipak ne može ukloniti potencijalno štetan genski materijal *C. burnetii*, te da jogurt i sirevi iako kontaminirani, ne posjeduju vitalne kulture *C. burnetii* i ne predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi. Prema Viltropu i Roastu (2013) *C. burnetii* prisutna je u 25 % stada goveda u Estoniji.

RT-PCR metodom, kojom je utvrđena puno veća prevalencija patogena, detektirane su i mrtve stanice, međutim ta činjenica nema utjecaja na procjenu rizika kod konzumacije sirovog mlijeka iz mljekomata. U skladu s principom predostrožnosti, detekcija patogena, živih ili ne, značajan su čimbenik u modeliranju rizika ukoliko to mlijeko neće biti podvrgnuto naknadnom tretmanu koji ima antimikrobno djelovanje, jer su prisutni patogeni u mogućnosti preživjeti tijekom roka trajanja (Giacometti i sur., 2012). Izolacija *C. burnetii* konvencionalnom kulturijelnom metodom je teška i dugotrajna, tako da se često koriste serološki testovi poput fiksacije komplementa, indirektna imuno fluorescencije (indirect immunofluorescent assay-IFA) i ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), s nedostatkom što se u nekim slučajevima može javiti imunološka križna reakcija koja može štetno djelovati na osjetljivost testova. Stoga je RT-PCR metoda pouzdanija za određivanje *C. burnetii* u uzorcima mlijeka (Can i sur. 2015), te je korištena i u našoj studiji.

Različite prevalencije zabilježene su u Europskim zemljama. U Švicarskoj su Fretz i sur. (2007) naveli prevalenciju *C. burnetii* u sirovom mlijeku iz spremnika 4,7 %, u Francuskoj 24,4 % (Guatteo i sur., 2006), u južnoj Belgiji 30 % (Czaplicki i sur., 2012), u Nizozemskoj 50 % (Muskens i sur., 2011), a u SAD-u čak 94,3 % (Kim i sur., 2005). Međutim, na prisutnost *C. burnetii* ukazuju i drugi pokazatelji, kao npr. u Španjolskoj gdje nije utvrđena prevalencija u mlijeku, ali je zabilježena visoka seroprevalencija u

mlijeku iz spremnika od  $> 10^4$  *C. burnetii* u mL (Nogareda i sur., 2012), ili u Danskoj gdje je utvrđeno 59 % *C. burnetii* protutijela u mlijeku iz spremnika (Agger i sur., 2010). Prevalencija u našem istraživanju iznosila je 17,54 % i bila je podjednaka u zimskom i proljetno-ljetnom uzorkovanju. Takva situacija je lošija od situacije u Švicarskoj, ali je bolja od prevalencija u Francuskoj, južnoj Belgiji, Nizozemskoj i SAD-u. Bilo bi dobro usmjeriti napore na održavanje ovakve situacije i veterinarsko sanitarnim mjerama spriječiti daljnje širenje ovog patogena kao i naknadnu kontaminaciju mlijeka na putu s farme do potrošača.

Giacometti i sur. (2013) prilikom usporedbe RT-PCR i metode korištenja kultura ističu kako je osjetljivost RT-PCR 0,1 stanica u 25 mL (ili 1 stanica u 250 mL), dakle deset puta veća od 1 stanice u 25 mL. Nero i sur. (2009) utvrdili su da je stopa izolacije *L. monocytogenes* i *S. Enteritidis* u sirovom mlijeku pod velikim utjecajem ostale mikroflore kojom je mlijeko kontaminirano te da je moguća kada je razina patogena 2 log cfu/mL, a razina ostalih mezofilnih aeroba 4-5 cfu/mL (Giacometti, 2012a). Osjetljivost mikrobioloških metoda općenito je precijenjena i može dovesti do podcjenjivanja prave prevalencije uzoraka koji su pozitivni na patogene s posljedično nesigurnom procjenom rizika od bolesti.

Bilandžić i sur. (2011) pratili su pojavu antibiotika kloramfenikola, sulfonamida, tetraciklina, gentamicina, streptomocina, dihidrostreptomocina, flumekvina i enrofloksacina u sirovom mlijeku kod malih proizvođača u Hrvatskoj, ali niti u jednom uzorku njihova koncentracija nije bila veća od najveće dopuštene količine propisane EU i Hrvatskim propisima. Prema podacima iz 2004./2005. godine beta laktamski antibiotici i sulfonamidi utvrđeni su 1,17 % uzoraka (Pintić i sur., 2006). Za svoje analize koristili su brzi Delvo test. U našem istraživanju bilo je 6,74 % pozitivnih uzoraka, u jesenskom uzorkovanju 6,66 %, a u zimskom 14,28 %, dok u ljetnom nije bilo pozitivnih uzoraka. Korišteni test pokrivaio je veći broj antimikrobnih lijekova, te pozitivni rezultat testa ukazuje na prisutnost jednog ili više antimikrobnih lijekova, ali nije poznato koje niti u kojoj koncentraciji. Osim toga, za penicilin G, kloksacilin, cefapirin, cefalonij, cefazolin, cefoperazon, cetiofur i klortetraciklin najmanja koncentracija na koju je test reagirao niža je od one propisane Uredbom komisije (EZ) br. 37/2010 od 22. prosinca 2009. o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla. Stoga se nije niti moglo pristupiti estimaciji unosa antimikrobnih lijekova kod ljudi prilikom konzumacije sirovog mlijeka. Također, dobiveni rezultati nisu mogli biti upotrijebljeni za poduzimanje zakonom predviđenih mjera jer je moguće da je test reagirao na antimikrobni lijek čija je dozvoljena vrijednost, navedena u spomenutom propisu, veća od one na koju je test pozitivno reagirao. Ipak, zabrinjava činjenica da je uopće utvrđeno njihovo prisustvo, tim više što se pri otkupu mlijeka u mljekarama strogo pazi na prisutnost ostataka antimikrobnih lijekova u mlijeku, te se pregledava svaka pošiljka i pozitivne pošiljke se ne otkupljuju. Objašnjenje za ovakve rezultate s obzirom na ostatke antimikrobnih lijekova može se samo nagađati, ali se ne može isključiti mogućnost da proizvođači sirovog mlijeka ne primjenjuju dobru proizvođačku praksu postupanja s mlijekom u vrijeme karencije, nakon primjene terapije, te ga prodaju putem mljekomata za koje pretpostavljaju da neće biti ili će biti puno manje kontrolirani.

Međutim, s obzirom na osjetljivost testa i pozitivnu reakciju u slučaju vrijednosti koja je niža od one propisane Uredbom komisije (EZ) br. 37/2010 od 22. prosinca 2009. o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla, kao što je slučaj za penicilin G, kloksacilin, cefapirin, cefalonij, cefazolin, cefoperazon, cetiofur i klortetraciklin, te prikazivanje pozitivne reakcije i u slučaju prelaska samo jednog antimikrobnog lijeka preko praga osjetljivosti ne može se napraviti procjena izloženosti, kao niti usporedba s postojećim prihvatljivim dnevnim unosom (ADI) u slučaju kada je on uspostavljen za pojedine antimikrobne

lijekove, te niti procijeniti rizik za zdravlje ljudi. Ipak, nije isključeno kako je prisutnost nekih antimikrobnih lijekova bila i puno veća od one propisane Uredbom komisije, te samim time se niti rizik ne može u potpunosti isključiti. Ovi rezultati trebaju se koristiti kao indikator mogućnosti pojave ostataka antimikrobnih lijekova u mlijeku unatoč propisanoj zabrani. Bez obzira je li se namjerno nije poštivalo vrijeme karence ili se radi o izostanku dobre proizvođačke prakse zbog nepažnje/nebrige, može se zaključiti kako je potrebno na nacionalnoj razini planirati i provoditi kontrolu mlijeka iz mljekomata na ostatke antimikrobnih lijekova.

Oliver i Murinda (2012) smatraju kako se više koncentracije antimikrobnih lijekova mogu naći u sirovom mlijeku jer pasterizacija smanjuje njihovu koncentraciju.

Rastući problem za javno zdravstvo je i pojava povećanja antimikrobne rezistencije. Antimikrobni lijekovi koji se koriste kod terapija mastitisa kod mliječnih krava, koriste se i kod ljudi. Ako se gleda ukupni broj bakterija u mlijeku, viši stupanj antimikrobne rezistencije prema tetraciklinu bio je u sirovom nego u pasteriziranom mlijeku, dok je za oksacilin, vankomicin i meticilin situacija bila obrnuta (Manie i sur., 1999). Oliver i Murinda (2012) smatraju kako trenutno nije problem antimikrobna rezistencija iz mliječnih proizvoda, ali ukoliko bi došlo do njenog povećanja na farmama mliječnih krava, to bi bilo puno opasnije za ljude koji konzumiraju sirovo mlijeko.

Ostaci antimikrobnih lijekova u sirovom mlijeku utvrđeni su u Mađarskoj u 0,4 % slučajeva, a bilo je obuhvaćeno 21 mjesto prodaje mlijeka (Jancsó, 2015). U Rumunjskoj Šteţca i sur. (2014) nisu utvrdili ostatke veterinarskih lijekova niti u jednom od uzoraka sirovog mlijeka prikupljenih iz mljekomata i prodaje na trţnici.

### **Kemijski parametri u sirovom mlijeku iz mljekomata**

Stupanj kiselosti mlijeka, koji je Pravilnikom (NN 102/00, 111/00, 74/08) propisan u rasponu od 6,6 do 6,8 °SH, prema našim rezultatima kreće se od 6,76 do 15,00, a najmanji je raspon zabiljeţen u proljetno – ljetnom vremenu kada se kretao od 7,20 do 9,52. Ćak je i prosječna vrijednost za kiselinski stupanj (8,62) viša od one predviđene Pravilnikom. Ovi se rezultati razlikuju od rezultata koje je u istraţivanju mlijeka u Mađarskoj dobio Jancsó (2015) i koji su u prosjeku iznosili  $6,68 \pm 1,55$  °SH za 725 uzoraka, dok je svega 28 % bilo > 7,2 °SH. Isti autor povećanu kiselost pojašnjava mogućim oboljenjima vimena, kasnom fazom laktacije ili dodavanjem vode u mlijeko. Prema našem istraţivanju prosječan udio vode u mlijeku iznosio je 87,03 %, s rasponom 85,15 – 89,60 %, a prema Konte (1999) udio vode u kravljem mlijeku iznosi 87,2 %, te bi u slučaju udjela vode od 89,60 %, moglo ukazivati na mogućnost dodavanja vode u mlijeko. Razlike u krajnjim vrijednostima mliječne masti bile su velike u svim ispitivanim razdobljima i kretale su se 1,20 – 5,30 %, u prosjeku 3,72 %. Ovdje moţemo primijetiti i sezonske varijacije u prosječnoj koliĉini masti koja je bila najveća u proljetno – ljetnom uzorkovanju (4,02 %), onda 3,81 % u zimskom te 3,34 % u jesenskom uzorkovanju. Prosječne vrijednosti masti za godišnje ispitivano razdoblje u skladu su s vrijednostima koje su dobili Jancsó (2015) i Konte (1999), a iznose 3,75 % i 3,70 %, dok Claeys i sur. (2014) u preglednom radu navode raspon kretanja mliječne masti 3,3 – 5,4 %. Zabrinjava ipak ĉinjenica da su minimalne vrijednosti iznosile svega 1,20 %, a vrijednosti manje od 3,20 % mliječne masti javile su se u manje od 22 % slučajeva, te bi se za te uzorke moglo posumnjati da se radi o patvorenju mlijeka, ili dodavanjem vode ili obiranjem mliječne masti. Nešto veće prosječne vrijednosti dobili su u analizi mlijeka u Rumunjskoj kada je prosječna vrijednost iznosila 4,20 % m.m. (Šteţca i sur., 2014), ali u njihovom se slučaju radilo samo o uzorkovanju u svibnju i lipnju, što bi onda po rezultatima bilo sliĉnije našem proljetno - ljetnom uzorkovanju kada je prosječna m.m. iznosila 4,02

%). U Češkoj je prosječna vrijednost mliječne masti u mlijeku iznosila 4,25 % (Hanuš i sur., 2008), a zanimljivi su rezultati jednog drugog češkog istraživanja (Zajác i sur., 2015) kada se mliječna mast kretala 3,40-4,26 %, ali se nakon stajanja od 24 sata neznatno smanjila (3,35-4,20 %). Mliječna mast ima nutricionistička uloga u unosu energije (9 kcal/g), u izgradnji tijela, a rizik od štetnog utjecaja na zdravlje postoji samo kod pretjeranog unosa životinjskih masti. Ne smije se niti zanemariti unos esencijalnih vitamina A i D kojim je mliječna mast osobito bogata (Guetouache i sur., 2014). Bjelančevine u mlijeku kretale su se u prosjeku 3,58 %, u rasponu 2,63-4,56 %. Prosjek koji je dobio Jancsó (2015) je manji (3,24 %), najniža vrijednost bila je 2,8%. Međutim u njegovom slučaju rezultati točke ledišta upućivali su da je mlijeku bila dodana vode. Šteţca i sur. (2014) dobili su prosječnu vrijednost bjelančevina u mlijeku 3,10 % (2,82-3,30 %), a Zajác i sur. (2015) utvrdili su raspon 3,22-3,38 %, gotovo bez promjena nakon 24 satne pohrane, što je niže nego u našem istraživanju. Hanuš i sur. (2008) dobili su prosječnu vrijednost 3,52 %, a prema Konte (1999) prosječna količina bjelančevina u mlijeku iznosila 3,5 %, što je sličnije našim rezultatima. Guetouache i sur. (2014) ističu kako bjelančevine mlijeka sadrže sve esencijalne aminokiseline i elemente koje ljudski organizam ne može proizvoditi, te stoga imaju važnu nutricionističku ulogu. Laktoza se u našim uzorcima mlijeka kretala 3,25-6,19 %, a prosječna vrijednost bila je 4,73 %. Jancsó (2015) je dobio gotovo jednaku prosječnu vrijednost 4,75 %, Šteţca i sur. (2014) nešto manju 4,61 %, a Hanuš i sur. (2008) višu koja je iznosila 4,95 %. U slučaju laktoze i utjecaja vremena pohrane na nju, rezultati su gotovo nepromijenjeni kao i kod bjelančevina, a iznosili su od 4,65-4,80 % (Zajác i sur., 2015). Guetouache i sur. (2014) zaključuju kako koncentracija laktoze malo varira u mlijeku i kreće se u rasponu od 4,5-5,2 %, te na nju slabo utječe hranidba i uvjeti držanja krava. Velik je njezin značaj kod fermentacije mlijeka jer je bakterije mliječno-kiselog vrenja koriste kao supstrat, te o stadiju fermentacije može ovisiti i njezinu količinu u mlijeku.

### **Anketa**

Od 2008. godine u Italiji se na mljekomatima mora nalaziti poruka „mlijeko se može konzumirati nakon što se prokuha“ (Anonimno, 2008), ali usprkos tome 40 % konzumenata se toga ne pridržava (Giacometti i sur., 2012). U Italiji je 2011. godine u anketi sudjelovalo 100 ispitanika, konzumenata mlijeka iz mljekomata. Pitanja su se odnosila na korištenje termo vrećica/torbi kod kupnje mlijeka iz mljekomata, trajanje transporta do kuće, termičku obradu mlijeka prije konzumacije te veličinu obitelji i njezine članove. Prema rezultatima ankete 93 % ne koristi izolirane torbe za transport mlijeka, 3 % samo ljeti, a 4 % uvijek. Transport traje od nekoliko do 18 minuta, 37 % konzumenata ne prokuha mlijeko prije konzumacije. Iz odgovora o članovima obitelji zaključeno je kako su 5,57 % konzumenata djeca u dobi do 5 godina, a 6,69 % između 6 i 14 godina (Giacometti, i sur., 2013a).

Rezultati naše ankete o razlozima konzumacije mlijeka iz mljekomata u skladu su s razlozima koje navode Oliver i sur. (2009) prema kojima je povećani interes za konzumaciju ovog mlijeka posljedica namjere dijela ljudi da kupuju lokalno i hrane se prirodno, s neprocesuiranom hranom. Prema našoj anketi glavni razlog za kupnju mlijeka iz mljekomata je mišljenje konzumenata kako je to mlijeko zdravije (38 %), dok je na drugom mjestu zadovoljstvo potrošača što se ovakvom kupovinom direktno pomažu proizvođači mlijeka/poljoprivrednici (29 %). 25 % smatra kako je takvo mlijeko kvalitetnije i punijeg okusa, a 9 % je zadovoljno što se mlijeko može kupovati neprestano 24 sata. Ispitanici su ostavili komentare kako je to „pravo mlijeko“, „ima okus mlijeka iz djetinjstva“ ili smatraju da je nutritivno bogatije. Oliver i sur. (2009) navode kako dio stanovništva koji se zalaže za konzumaciju sirovog mlijeka ističe nutritivne karakteristike toga mlijeka, bolji okus te pozitivan utjecaj na zdravlje, iako su znanstvene činjenice kojima se to može potvrditi male ili ih uopće nema.

Zanimljivi su i podaci ankete koja je provedena među proizvođačima mlijeka u Sjedinjenim Američkim Državama prema kojoj veliki broj njih uopće nije svjestan postojanja patogenih bakterijskih kontaminanata u mlijeku. Tako npr. od 461 ispitanika u Ohio-u, 36 % nije znalo da *Salmonella* spp. izaziva bolest u ljudi, dok je 81 % i 91 % istaknulo kako *Listeria* spp. i *Campylobacter* spp. nisu povezani s obolijevanjem ljudi (LeJeune i Rajala-Schultz, 2009).

## ZAKLJUČCI

Dostupnost sirovog mlijeka iz mljekomata potrošačima posljedica je trenda prisutnog i u ostalim zemljama EU, ali i svijeta. S obzirom na situaciju u našoj zemlji, ovakav oblik ponude omogućava direktan plasman mlijeka potrošačima, dakle bez posredništva mljekare, te na neki način doprinosi materijalnom poboljšanju situacije kod proizvođača mlijeka jer mu osigurava izvor financijskih sredstava bez ovisnosti o nekom drugom. Stanovništvo u RH je to prepoznalo, a sudeći po provedenoj anketi i podržava ovakav način prodaje mlijeka.

Međutim, ne smije se ignorirati činjenica kako konzumacija sirovog mlijeka u usporedbi s pasteriziranim, povećava rizik od bolesti koje se prenose hranom. Iako u literaturi postoje zapisi o utjecaju konzumacije sirovog mlijeka na smanjivanje alergija (uglavnom se radovi odnose na djecu i mlade), nije postavljeno objašnjenje za te situacije, te se smatra kako nema dokaza da moguća dobrobit od konzumacije sirovog mlijeka nadmašuje poznate zdravstvene rizike (Davis i sur., 2014). Stoga sa stajališta procjene rizika ne može se poticati konzumacija sirovog mlijeka, a osobito je značajno da se o zdravstvenom riziku koji iz toga proizlazi jasno obavijesti javnost, posebno u slučaju kada se to odnosi na djecu, trudnice, starije osobe i osobe oslabljenog imunološkog sustava.

Svi promatrani kemijski parametri u mlijeku iz mljekomata pokazuju prilično široki raspon praćenih vrijednosti. Takvi rezultati mogu biti posljedica različitih utjecaja poput zdravlja vimena, hranidbe, godišnjeg doba, stadija laktacije, stadija fermentacije mlijeka, patvorenja mlijeka i slično, a zbog velikog broja različitih proizvođača mlijeka, teško je utvrditi koji je od ovih utjecaja imao najveću ulogu, te može li se zaključiti na koji način utjecati kako bi se postigla što veća ujednačenost mlijeka tijekom cijele godine, čemu će vjerojatno trebati individualni pristup. U ovom trenutku može se samo zaključiti kako su obilježja mlijeka iz mljekomata značajne varijacije u kemijskom sastavu koje kroz godinu dovode do izloženosti konzumenata neujednačenoj nutricionističkoj vrijednosti mlijeka, na što posebnu pažnju trebaju obratiti nutricionisti koji se bave izradom dnevnih menija, osobito ako od mlijeka u tom meniju očekuju izvor energije i proteina.

Primjena mnogo opsežnijih, učestalijih i strožih testiranja, mogla bi smanjiti rizik povezan s nepasteriziranim mlijekom, ali nikada se konzumentu ne bi moglo garantirati da je nepasterizirano mlijeko bez patogena. Ova činjenica ukazuje na potrebu pristupa samog konzumenta putem specifičnih edukativnih programa u kojima se prikazuje važnost prokuhavanja mlijeka prije konzumacija (Longenberger i sur., 2013). Međutim, postoje ograničavajući faktori za primjenu testiranja u svrhu sigurnosti, a to su: da kontaminacija mlijeka nastupa iznenada i povremeno, kontaminacija nije ravnomjerno raspoređena u mlijeku ili proizvodu, teško je utvrditi ekstremno male kontaminacije koje u mlijeku ili proizvodu tijekom vremenskog perioda mogu proliferirati u značajne količine (LeJeune i Rajala-Schultz, 2009).

Na temelju svih iznesenih činjenica i navoda iz drugih radova, te na temelju rezultata studije koja je provedena u Hrvatskoj, stav je Znanstvenog odbora kako se ne može preporučiti konzumacija sirovog



mlijeka iz mljekomata, posebice ne za djecu, trudnice i osobe starije dobi, a kod prodaje istog preporučuje se obavezno navoditi na uređajima (mljekomatima) kako je konzumacije sirovog mlijeka rizik za zdravlje te se preporučuje nakon prokuhavanja mlijeka.

## PREPORUKE

Važno je pripremiti i provoditi edukaciju stočara, djelatnika na obiteljskim gospodarstvima, proizvođača mlijeka i proizvoda od mlijeka te potrošača o mikrobiološkim opasnostima koje mogu biti prisutne u sirovom mlijeku.

Proizvođači mlijeka moraju biti upoznati s rizicima i odgovornostima povezanim s prodajom sirovog mlijeka.

Potrošači, također, moraju biti svjesni mogućih opasnosti koje su povezane s konzumacijom sirovog mlijeka.

Dodatno se treba potruditi da se stručna znanja primijene pri donošenju propisa kako bi odgovorne osobe i nadležna tijela uprave bili sigurni da će ti propisi biti primjenjivi, te postavili mikrobiološki standardi koji bi se primjenjivali za sirovo mlijeko.

Dok svi ovi napori ne donesu rezultate o smanjenju rizika kod konzumacije sirovog mlijeka, jedini način prevencije bolesti uzrokovanih patogenima iz mlijeka je konzumacija mlijeka nakon termičke obrade.

## LITERATURA (REFERENCE)

1. Agger JF, Christoffersen A, Rattenborg E, Nielsen J, Agerholm JS (2010): Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in Danish herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52:1-5.
2. Alhelfi NA, Lahmer RA, Jones DL, Williams AP (2012): Survival and metabolic activity of luxmarked *Escherichia coli* O157:H7 in different types of milk. *The Journal of dairy research*, 79:257-261.
3. Amagliani G, Petruzzelli A, Omiccioli E, Tonucci F, Magnani M, Brandi G (2012): Microbiological Surveillance of a Bovine Raw Milk Farm Through Multiplex Real-Time PCR. *Foodborne Pathogen Disease*, 9(5):406-411.
4. Angelakis E, Raoult D (2010): Q fever. *Veterinary Microbiology*, 140:297-309.
5. Italian Ministry of Health (2008): *Misure urgenti in materia di produzione, commercializzazione e vendita diretta di latte crudo per l'alimentazione umana*. Italian Ministry of Health, Rome.
6. NZFSA, New Zealand Food Safety Authority (2009): *Proposed regulatory framework for unpasteurized milk products*. Wellington, New Zealand.
7. Arnold T, Neubauer H, Nikolaou K, Roesler U, Hensel A (2004): Identification of *Yersinia enterocolitica* in minced meat: a comparative analysis of API 20E, *Yersinia* identification kit and a 16S rRNA-based PCR method. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 51(1):23-7.

8. Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H, Kozaki S (2003): An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology & Infection*, 130:33–40.
9. Ayar A, Sert D, Çon AH (2007): A study on the occurrence of aflatoxin in raw milk due to feeds. *Journal of Food Safety*, 27:199–207.
10. Beck MD, Bell JA (1949): Q fever studies in southern California; an epidemiological study of 300 cases. *Public Health Reports*, 64:41–56.
11. Bianchi DM, Barbaro A, Gallina S, Vitale N, Chiavacci L, Caramelli M, Decastelli L (2013): Monitoring of foodborne pathogenic bacteria in vending machine raw milk in Piedmont, Italy. *Food Control*, 32:435-439.
12. Bilandžić N, Kolanović BS, Varenina I, Jurković Z (2011): Concentrations of veterinary drug residues in milk from individual farms in Croatia. *Mljekarstvo*, 61(3):260-267.
13. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B (2000): *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7):2465-2467.
14. Buehring GC, Philpott SM, Choi KY (2003): Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 19:1105-1113.
15. Burmeister T, Schwartz S, Hummel M, Hoelzer D, Thiel E (2007): No genetic evidence for involvement of Deltaretroviruses in adult patients with precursor and mature T-cell neoplasms. *Retrovirology*, 4:11.
16. Burny A, Bruck C, Chantrenne H, Cleuter Y, Dekegel D, Kettmann R, Lecercq M, Leunen J, Mammerickx M, Porteetelle D (1980): Bovine leukemia virus: molecular biology and epidemiology. U: *Viral Oncology*. Raven Press, New York.
17. Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Afonso P, Froment A, Gessain A, Mahieux R (2006): Human T-cell lymphotropic virus type 3: complete nucleotide sequence and characterization of the human tax3 protein. *Journal of Virology*, 80:9876-9888.
18. Can HY, Elmalý M, Karagöz A (2015): Detection of *Coxiella burnetii* in cows', goats', and ewes' bulk milk samples using polymerase chain reaction (PCR). *Mljekarstvo*, 65(1):26-31.
19. Cavaliere C, Foglia P, Pastorini E, Samperi R, Lagana A (2006): Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk- Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources. *Journal of Chromatography A*, 1101(1-2):69-78.
20. Chamberlin W, Graham DY, Hulten K, El-Zimaity HM, Schwartz MR, Naser S (2001): Review article: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 15:337-346.
21. Chen B, Lewis MJ, Grandison AS (2014): Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. *Food Chemistry*, 158:216-223.

22. Claeys W, Cardoen S, Daube G, De Block J, Dewettinck K, Dierick K, De Zutter L, Huyghebaert A, Imberechts H, Thiange P, Vandenplas Y, Herman L (2013): Raw or heated cow milk consumption: review of risks and benefits. *Food Control*, 31(1):251-263.
23. Claeys WL, Verraes C, Cardoen S, De Block J, Huyghebaert A, Raes K, Dewettinck K, Herman L (2014): Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*, 42:188-201.
24. CAC, Codex Alimentarius Commission (2001): Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M1 in milk. Codex committee on food additives and contaminants 33rd session, Hague, The Netherlands.
25. Collins MT (1997): *Mycobacterium paratuberculosis*: A potential food-borne pathogen? *Journal of Dairy Science*, 80:3445-3448.
26. ComBase (2016): ComBase (računalni program). Dostupno na: <http://browser.combase.cc/Search.aspx> (28.07.2016.)
27. Czaplicki G, Houtain JY, Mullender C, Porter SR, Humblet MF, Manteca C, Saegerman C (2012): Apparent prevalence of antibodies *Coxiella burnetii* (Q fever) in bulk tank milk from dairy herds in southern Belgium. *The Veterinary Journal*, 192:529-531.
28. D'Aoust JY (2001): *Salmonella.U: Guide to Food-borne Pathogens*. Wiley, New York.
29. D'Aoust JY (1994): *Salmonella* and the international food trade. *International Journal of Food Microbiology*, 24(1-2):11-31.
30. Davis BJK, Li CX, Nachman KE (2014): *A literature review of the risk and benefits of consuming raw and pasteurised cow's milk*. Center for a Livable Future, Maryland.
31. De Bruin A, van der Plaats RQ, de Heer L, Paauwe R, Schimmer B, Vellema P, van Rotterdam BJ, van Duynhoven YT (2012): Detection of *Coxiella burnetii* DNA on small ruminant farms during a Q fever outbreak in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 78:1652-1657.
32. De Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V (2001): Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *The International Journal of Food Microbiology*, 67:1-17.
33. De Reu K, Grijspeerdt K, Herman L (2004): A Belgian survey of hygiene indicator bacteria and pathogenic bacteria in raw milk and direct marketing of raw milk farm products. *Journal of Food Safety*, 24:17-36.
34. Delbes C, Alomar J, Chougui N, Martin JF, Montel MC (2006) *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows' raw milk. *Journal of Food Protection*, 69(9):2161-2167.
35. Desmasures N, Bazin F, Gueguen M (1997): Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology*, 83:53-58.

36. Dewdney JM, Maes L, Raynaud JP, Blanc F, Scheid JP, Jackson T, Lens S, Verschueren C (1991): Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food-products with regard to their immunoallergic potential. *Food and Chemical Toxicology*, 29:477-483.
37. Domijan AM, Peraica M (2010): Carcinogenic mycotoxins. U: *Carcinogens*. Elsevier, Oxford Academic Press.
38. EFSA, European Food Safety Authority (2015): Scientific opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA Journal*, 13(1):3940-4035.
39. Eldin C, Angelakis E, Renvoise´ A, Raoult D (2013): *Coxiella burnetii* DNA, but not viable bacteria, in dairy products in France. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(4): 765-769.
40. Fallah AA, Jafari T, Fallah A, Rahnama M (2009): Determination of aflatoxin M1 levels in Iranian white and cream cheese. *Food and Chemical Toxicology*, 47:1872-1875.
41. FDA, Food and Drug Administration (2011): *Fish and fishery products hazards and controls guidance*. Food and Drug Administration, Department of health and human services public health service food and drug administration center for food safety and applied nutrition office of food safety, Florida Sea Grant, Gainesville.
42. Fishbein DB, Raoult D (1992): A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 47:35-40.
43. Food Standards Australia New Zealand (2009): *Microbiological Risk Assessment of Raw Cow Milk*. Food Standards Australia New Zealand.
44. Fretz R, Schaeren W, Tanner M, Baumgartner A (2007): Screening of various foodstuffs for occurrence of *Coxiella burnetii* in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*, 116:414-418.
45. Frobish RA, Bradley BD, Wagner DD, Long-Bradley PE, Hairston H (1986): Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grains. *Journal of Food Protection*, 10:768-830.
46. Gerba CP, Rose JB, Haas CN (1996): Sensitive populations: who is at the greatest risk? *International Journal of Food Microbiology*, 30(1-2):113-123.
47. Giacometti F, Bonilauri F, Serraino A, Peli AS, Amatiste S, Arrigoni N, Bianchi M, Bilei S, Cascone G, Comin D, Daminelli P, Decastelli L, Fustini M, Mion R, Petruzzelli A, Rosmini R, Rugna G, Tamba M, Tonucci F, Bolzoni G (2013): Four-Year Monitoring of Foodborne Pathogens in Raw Milk Sold by Vending Machines in Italy. *Journal of Food Protection*, 76(11):1902-1907.
48. Giacometti F, Serraino A, Bonilauri P, Ostanello F, Daminelli P, Finazzi G, Losio MN, Marchetti G, Liuzzo G, Zanoni RG, Rosmini R (2012): Quantitative risk assessment of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* 0157 and *Campylobacter jejuni* related to consumption of raw milk in a province in northern Italy. *Journal of Food Protection*, 75:2031-2038.

49. Giacometti F, Serraino A, Finazzi G, Daminelli P, Losio MN, Tamba M, Garigliani A, Mattioli R, Riu R, Zanoni RG (2012): Field handling conditions of raw milk sold in vending machines: experimental evaluation of the behaviour of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Campylobacter jejuni*. *Italian Journal of Animal Science*, 11:132-136.
50. Giacometti F, Serraino A, Finazzi G, Daminelli P, Losio MN, Arrigoni N, Piva S, Florio D, Riu R, Zanoni RG (2012a): Sale of raw milk in northern Italy: food safety implications and comparison of different analytical methodologies for detection of foodborne pathogens. *Foodborne Pathogen*, 9:293-297.
51. Giacometti F, Bonilauri P, Albonetti S, Amatiste S, Arrigoni N, Bianchi M, Bertasi B, Bilei S, Bolzoni G, Cascone G, Comin D, Daminelli P, Decastelli L, Meriardi G, Mioni R, Peli A, Petruzzelli A, Tonucci F, Bonerba E, Serraino A (2015): Quantitative Risk Assessment of Human Salmonellosis and Listeriosis Related to the Consumption of Raw Milk in Italy. *Journal of Food Protection*, 78(1):13-21.
52. Grahek-Ogden D, Schimmer B, Cudjoe KS, Nygard K, Kapperud G (2007): Outbreak of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:9 infection and processed pork, Norway. *Emerging Infectious Disease*, 13(5):754-756.
53. Grant IR, Williams AG, Rowe MT, Muir DD (2005): Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:2853-2861.
54. Grant IR, Ball HJ, Rowe MT (2002): Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the united kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:2428-2435.
55. Guatteo R, Beaudeau F, Berri M, Rodolakis A, Joly A, Seegers H (2006): Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Veterinary Research*, 37:827-833.
56. Guetouache M, Guessas B, Medjekal S (2014): Composition and nutritional value of raw milk. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2(10):115-122.
57. Guh A, Phan Q, Nelson R, Purviance K, Milardo E, Kinney S, Mshar P, Kasacek W, Cartter M (2010): Outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with raw milk, Connecticut, 2008. *Clinical Infectious Diseases*, 51(12):1411-1417.
58. Gürbay A, Sabuncuoglu SA, Girgin G, Sahin G, Yigit, S, Yurdakök M, Tekinalp G (2010): Exposure of newborns to aflatoxin M1 and B1 from mothers' breast milk in Ankara. *Food and Chemical Toxicology*, 48:314-319.
59. Guven A, Sezer C, Aydin BD, Oral NB, Vatansever L (2010): Incidence and Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* Isolates from Foods in Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16:S107-S112.

60. Hadžiosmanović M (2001): *Ocjena higijenske kakvoće mlijeka. Tečaj mastitisi. Projekt: Razvitak službi za potporu obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima*. Zagreb, 2001.
61. Hanuš O, Vegricht J, Frelich J, Macek A, Bjelka M, Louda F, Janů L (2008): Analysis of raw cow milk quality according to free fatty acid contents in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*, 53(1):17-30.
62. Havranek LJ, Rupić V (1996): *Mlijeko: dobivanje, čuvanje i kontrola*. Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva, Sektor poljoprivredne savjetodavne službe, Republika Hrvatska.
63. Hengl B, Gross-Bošković A, Šperanda M (2015): Količina aflatoksina u hrani za mliječne krave i pojavnost AFM1 u mlijeku. *Krmiva*, 56(4):169-177.
64. Hoogenboom LA, Tulliez J, Gautier JP, Coker RD, Melcion JP, Nagler MJ, Polman TH, Delort-Laval J (2001): Absorption, distribution and excretion of aflatoxin-derived ammoniation products in lactating cows. *Food Additives & Contaminants*, 18(1):47-58.
65. HPA, Hrvatska poljoprivredna agencija (2014): *Ispitivanje kvalitete poljoprivrednih proizvoda - godišnje izvješće*. Hrvatska poljoprivredna agencija, Križevci.
66. IARC, International Agency for Research on Cancer (1993): *Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. IARC, Lyon, France.
67. IARC, International Agency for Research on Cancer (2002): *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*. IARC, Lyon, France.
68. ICMSF, The International Commission on Microbiological Specification for Foods (1996): *Yersinia enterocolitica*. U: *Microorganisms in Foods 5. Microbiological Specifications for Pathogens*. Blackie Academic and Professional, London, UK.
69. ICMSF, The International Commission on Microbiological Specification for Foods (1996): The International Commission on Microbiological Specification of Food Pathogens: Salmonellae. U: *Microorganisms in foods 5: Microbiological specifications of food pathogens*. Blackie Academic and Professional, London, UK.
70. Jancsó A (2015): The practice of direct selling and the quality of directly sold. *Theses of doctoral (PhD) dissertation*. Raw bovine milk institute of food science faculty of agriculture and food sciences university of West Hungary, Mosonmagyaróvár.
71. Jay S, Davos D, Dundas M, Frankish E, Lightfoot D (2003): *Salmonella*. U: *Foodborne microorganisms of public health significance*. Australian Institute of Food Science and Technology, Food Microbiology Group, Waterloo.
72. Jayarao BM, Donaldson SC, Straley BA, Sawant AA, Hegde NV, Brown JL (2006): A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in pennsylvania. *Journal of Dairy Science*, 89(7):2451-2458.

73. Jemmi T, Stephan R (2006): *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties (Paris)*, 25(2):571-580.
74. Kalmus P, Kramarenko T, Roasto M, Meremäe K, Viltrop A (2015): Quality of raw milk intended for direct consumption in Estonia. *Food Control*, 51:135-139.
75. Kamkar A, Karim G, Aliabadi FS, Khaksar R (2008): Fate of aflatoxin M1 in Iranian white cheese processing. *Food and Chemical Toxicology*, 46:2236-2238.
76. Keene WE, Hedberg K, Herriott DE, Hancock DD, McKay RW, Barrett TJ, Fleming DW (1997): A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk. *The Journal of Infectious Diseases*, 176:815-818.
77. Keener KM, Bashor MP, Curtis PA, Sheldon BW, Kathariou S (2004): Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 3(2):105-116.
78. Kim SG, Kim EH, Lafferty CJ, Dubovi E (2005): *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 11:619-621.
79. Konte M (1999): Le lait et les produits laitiers. Développement de systèmes de productions intensives en Afrique de l'ouest. Université de Nouakchott (R.I.M) Faculté des Sciences et Technologies des aliments, B. P. 5026. ISRA/ URV – LNERV/FEVRIER : 2-25.
80. Lambertz ST, Nilsson C, Hallanvuo S, Lindblad M (2008): Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19):6060-6067.
81. Langer AJ, Ayers T, Grass J, Lynch M, Angulo FJ, Mahon BE (2012): Nonpasteurized dairy products, disease outbreaks, and state laws - United States, 1993-2006. *Emerging Infectious diseases*, 18:385-391.
82. Le Jeune JT, Rajala-Schultz PJ (2009): Unpasteurized Milk: A Continued Public Health Threat. *Clinical Infectious Diseases*, 48:93-100.
83. Levin RE (2007): *Campylobacter jejuni*: A Review of its characteristics, pathogenicity, ecology, distribution, subspecies characterization and molecular methods of detection. *Food Biotechnology*, 21:271-347.
84. Longenberger AH, Palumbo AJ, Chu AK, Moll ME, Weltman A, Ostroff SM (2013): *Campylobacter jejuni* infections associated with unpasteurized milk—multiple states, 2012. *Clinical Infectious Diseases*, 57:263-266.
85. Lund BM, O'Brien SJ (2011): The occurrence and prevention of foodborne disease in vulnerable people. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8:961-973.
86. Manie T, Brozel VS, Veith WJ, Gouws PA (1999): Antimicrobial resistance of bacterial flora associated with bovine products in south africa. *Journal of food protection*, 62:615-618.

87. Marmion BP, Stoker MG (1958): The epidemiology of Q fever in Great Britain; an analysis of the findings and some conclusions. *British Medical Journal*, 2:809-816.
88. Masoero F, Gallo A, Moschini M, Piva G, Diaz D (2007): Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal*, 1(9):1344-1350.
89. Medvedová A, Studeničová A, Valík L, Horváthová Z (2014): Prevalence and growth dynamics of enterotoxinogenic *Staphylococcus aureus* isolates in Slovakian dairy products. *Czech Journal of Food Sciences*, 32(4):337-341.
90. Medveiová A, Studenièová A, Valík L, Ladislav O (2013): Microbial and sensory quality of raw milk cheeses from the milk vending machines. *Acta Chimica Slovaca*, 6(1):49-54.
91. Mikulić M, Humski A, Njari B, Ostović M, Cvetnić Ž (2016): Termotolerantni *Campylobacter* spp. – Uzročnici kampilobakterioze (I. DIO). *Veterinarska stanica*, 47(4):447-454.
92. Miller JM, Miller LD, Olson C, Gillette KG (1969): Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 43:1297–1305.
93. Molina MP, Althausb RL, Molinac A, Fernández N (2003): Antimicrobial agent detection in ewes' milk by the microbial inhibitor test brilliant black reduction test - BRT AiM®. *International Dairy Journal*, 13:821-826.
94. Murinda SE, Nguyen LT, Ivey SJ, Gillespie BE, Almeida RA, Draughon FA, Oliver SP (2002): Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cull cows: A 12-month survey of dairy farms in east Tennessee. *Journal of Food Protection*, 65(5):752-759.
95. Murphy FA (1999): *Veterinary Virology*. 3<sup>rd</sup> edn, Academic Press, San Diego, California.
96. Muskens J, Van Maanen C, Mars MH (2011): Dairy cows with metritis: *Coxiella burnetii* test results in uterine, blood and bulk milk samples. *Veterinary Microbiology*, 147:186-189.
97. Nero LA, de Mattos MR, Barros MAF, Beloti, V, Franco BD (2009): Interference of raw milk autochthonous microbiota on the performance of conventional methodologies for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. detection. *Microbiological Research*, 164:529-535.
98. Nikbakht G, Rabbani M, Emam M, Rezatofghi E (2010): Serological and genomic detection of bovine leukemia virus in human and cattle samples. *International journal of veterinary research*, 4(4):253-258.
99. Nogareda C, Almeria S, Serrano B, Garcia-Ispuerto I, Lopez-Gatius F (2012): Dynamics of *Coxiella burnetii* antibodies and seroconversion in a dairy cow herd with endemic infection and excreting high numbers of the bacterium in the bulk tank milk. *Research in Veterinary Science*, 93:1211-1212.
100. Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A, Santagada G, Firinu A, Crisetti E, Celano GV (2007): Occurrence, characterization and antimicrobial



resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 115:290-296.

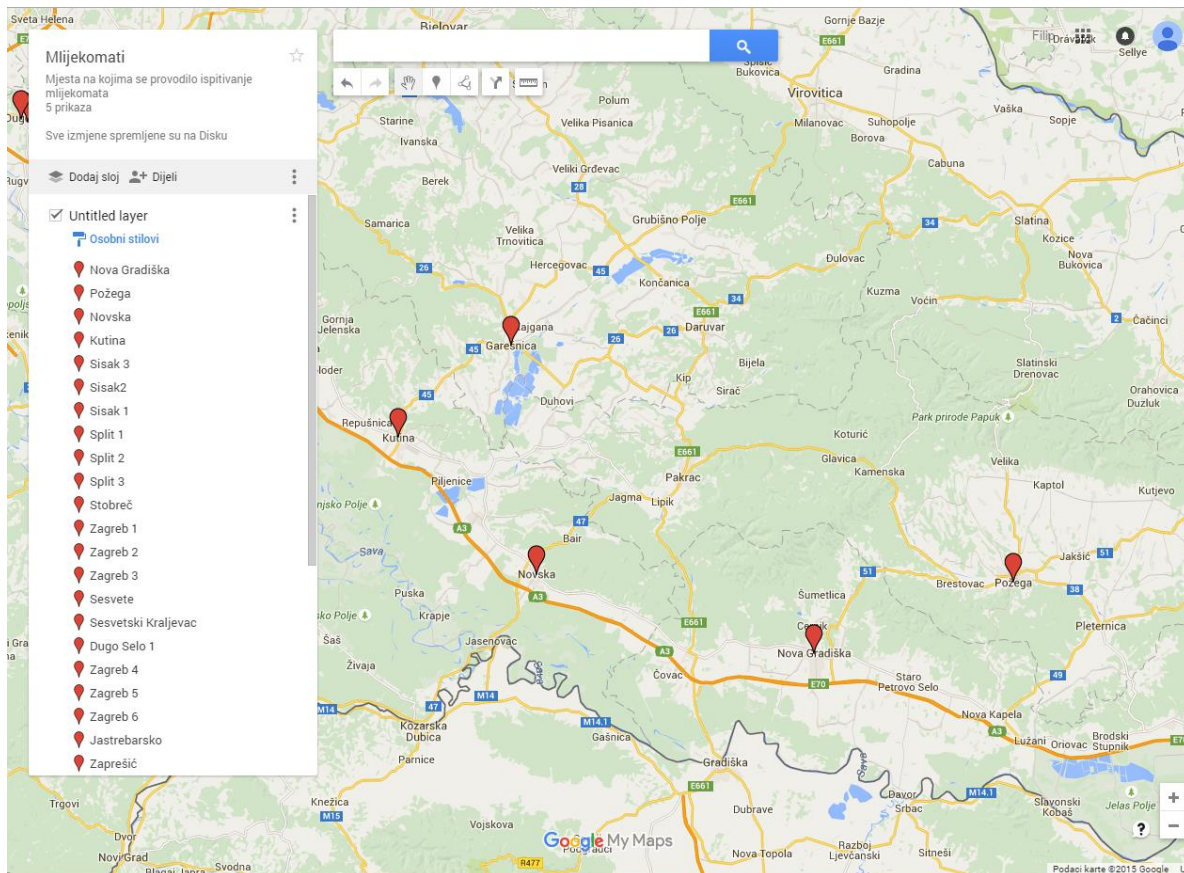
101. Oliver SP, Boor KJ, Murphy SC, Murinda SE (2009): Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7):792-806.
102. Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA (2005): Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2:115-129.
103. Oliver SP, Murinda SE (2012): Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *The Veterinary clinics of North America Food animal practice*, 28:165-185.
104. Oroszlan S, Copeland TD, Rice NR, Smythers GW, Tsai WP, Yoshinaka Y (1984): Structural and antigenic characterization of the proteins of human T-cell leukemia viruses and their relationships to the gene products of other retroviruses. *Princess Takamatsu Symposia*, 15: 147-157.
105. Pelisser MR, Klein CS, Ascoli KR, Zotti TR, Arsil ACM (2009): Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40:145-148.
106. Perzova RN, Loughran TP, Dube S, Ferrer J, Esteban E, Poiesz BJ (2000): Lack of BLV and PTLV DNA sequences in the majority of patients with large granular lymphocyte leukaemia. *British Journal of Haematology*, 109:64-70.
107. Pintić N, Dakić A, Poljak F, Stručić D, Tomše Đuranec V, Jelen T, Pintić V (2006): Incidence of antibiotics and other antibacterial substances in milk collected for the market. *Stočarstvo*, 60:83-95.
108. Polychronaki N, West RM, Turner PC, Amra H, Abdel-Wahhab M, Mykkanen H, El-Nezami H (2007): A Longitudinal assessment of aflatoxin M1 excretion in breast milk of selected Egyptian mothers. *Food and Chemical Toxicology*, 45:1210-1215.
109. Posfay-Barbe KM, Wald ER (2004): Listeriosis. *Pediatric Research*, 25:151-159.
110. Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G (2009): On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47:984-991.
111. Pravilnik o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji (2010). Narodne novine, br. 110/10.
112. Rhoades ER, Ullrich HJ (2000): How to establish a lasting relationship with your host: Lessons learned from *Mycobacterium* spp. *Immunology & Cell Biology*, 78:301-310.
113. Sabadoš D (1996): Kontrola i ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

114. Sagata N, Yasunaga T, Ohishi K, Tsuzuku-Kawamura J, Onuma M, Ikawa Y (1984): Comparison of the entire genomes of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia virus and characterization of their unidentified open reading frames. *The EMBO Journal*, 3:3231-3237.
115. Sassahara M, Netto DP, Yanaka EK (2005): Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the north of Parana state. *Food and Chemical Toxicology*, 43:981-984
116. Slavikova K, Kettmann R, Reinerova M, Zajac V, Portetelle D, Burny A (1987): Provirus integration of bovine leukemia virus into DNA of infected human myeloma cells. *Neoplasma*, 34:653-657.
117. Soltan-Dallal MM, Tabarraie A, Moez Ardalan K (2004): Comparison of four methods for isolation of *Yersinia enterocolitica* from raw and pasteurized milk from northern Iran. *International journal of food microbiology*, 94:87-91.
118. Şteţca G, Ilea A, Şuteu L, Coldea T (2014): Raw milk hygiene at local markets and automatic milk dispenser machines. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, 71(2):161-164.
119. Tratnik Lj (1998): *Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija*. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
120. Unusan N (2006): Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 44:1897-1900.
121. *Uredba 2002/178/EZ 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*. Official Journal of the European Union, L31/1.
122. *Uredba 2004/853/EZ Europskog parlamenta i vijeća od 29. travnja 2004. o utvrđivanju određenih higijenskih pravila za hranu životinjskog podrijetla*. Official Journal of the European Union, L139/55.
123. *Uredba 2006/1881/EZ Europskog parlamenta i vijeća od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani*. Official Journal of the European Union, L364/5.
124. *Uredba 2010/37/EZ Europskog parlamenta i vijeća od 22. prosinca 2009. o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla*. Official Journal of the European Union, L138/39.
125. Valík L, Görner F, Sonneveld K, Polka P (2004): Výsledky pøehlídek a sborník pøednášek semináře Mléko a sýry 2004. U: *Celostátní pøehlídky sýrù*. Èeská spoleènost chemická, Praha.
126. Valík L, Medveřová A, Bírošová L, Liptáková D, Ondruš L, Šnelcer J (2011): Contribution to the debate on the microbiological quality of raw milk from vending machines. *Potravinárstvo*, 3:38-43.

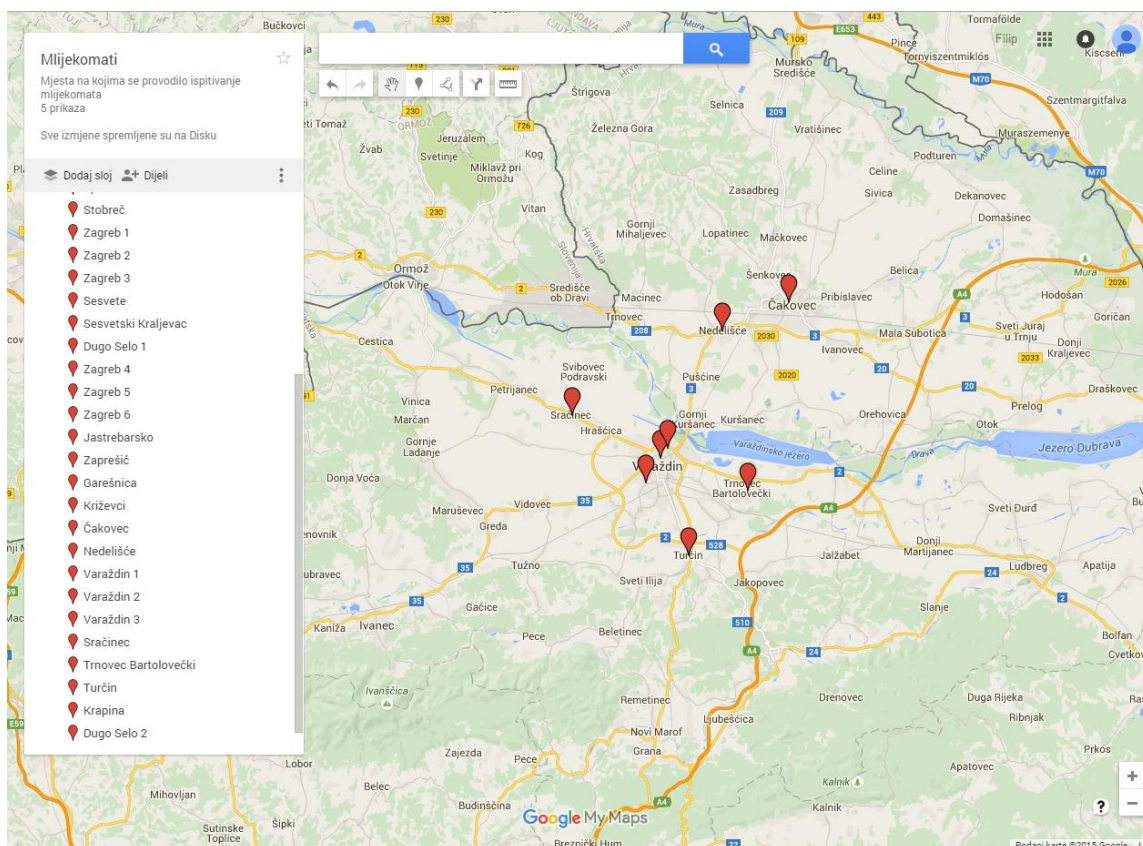
127. Viltrop A, Roasto M (2013): *Microbial risks to humans in Estonia in association with non-pasteurised milk consumption. Risk profile*. Estonian University of Life Sciences, Tartu.
128. Waddell LA, Rajic A, Sargeant J, Harris J, Amezcua R, Downey R, Read S, McEwen SA (2008): The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* spp. *Paratuberculosis*: A systematic review. *Canadian journal of public health*, 99:145-155.
129. Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, Cameron DN, Downes FP, Martin ML, Griffin PM, Ostroff SM, Potter ME, Tauxe RV, Wachsmuth IK (1991): Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(5):985-989.
130. Wemekamp-Kamphuis HH, Sleator RD, Wouters JA, Hill C, Abee T (2004): Molecular and physiological analysis of the role of osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2912-2918.
131. Zajác P, Čapla J, Vietoris V, Zubrická S, Čurlej J (2015): Effects of storage on the major constituents of raw milk. *Potravinarstvo*, 9(1):375-381.

## DODATAK

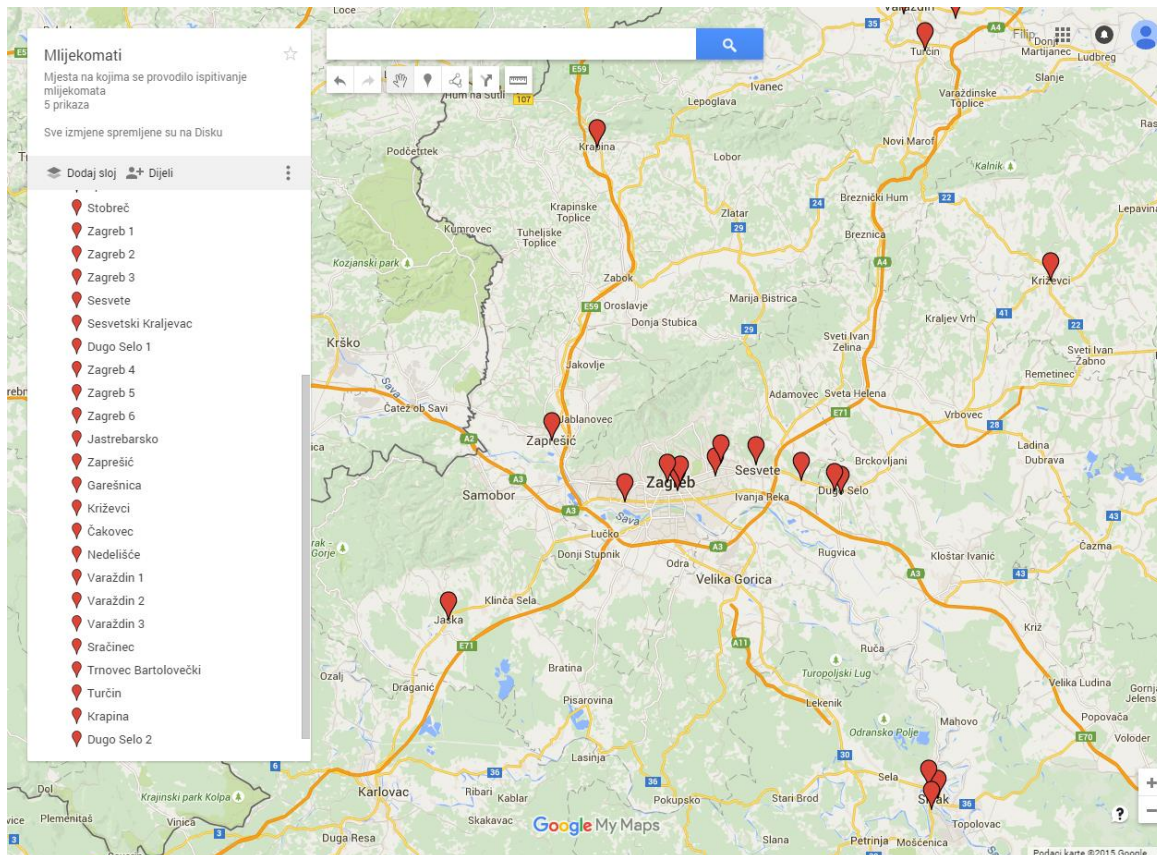
### Dodatak 1.



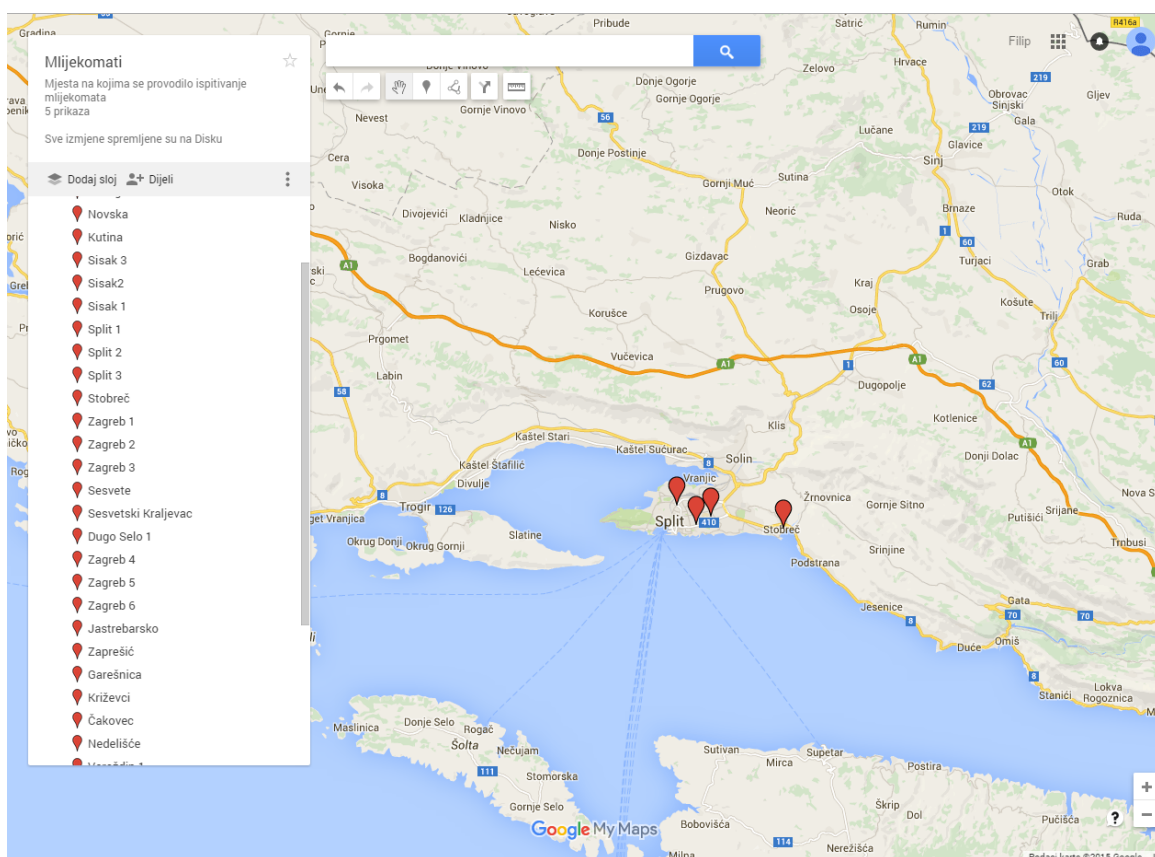
Slika 6 - Zemljopisni prikaz mlijekomata u istočnom dijelu RH



Slika 7 - Zemljopisni prikaz mljekomata u sjeverno-zapadnom dijelu RH



Slika 8 - Zemljopisni prikaz mljekomata u centralnom dijelu RH



Slika 9 - Zemljopisni prikaz mljekomata u južnom dijelu RH

## Dodatak 2.

Anketa vezana za konzumaciju mlijeka iz mljekomata

Poštovani,

ova anketa namijenjena je svim osobama između 18-64 godine koje konzumiraju (neovisno koliko učestalo) mlijeko s mljekomata. Ako odgovarate navedenom profilu, molim Vas da odvojite samo nekoliko minuta za ovu kratku anketu. Bili bismo Vam zahvalni da anketu i prosljedite ukoliko znate nekoga tko kupuje mlijeko iz mljekomata. Anketa se ne provodi u komercijalne svrhe, već isključivo u svrhu znanstvenog istraživanja. Hvala Vam unaprijed!

Konzumacija mlijeka iz mljekomata

1. Kupujete li i/ili konzumirate sirovo mlijeko iz mljekomata?
  - a) Da – molimo Vas nastavite s pitanjem br.2.!
  - b) Ne, jer ne bih htio. – molio Vas da popunite pitanja od broja 8 pa do kraja ankete!
  - c) Ne, ali kad bih imao priliku rado bih ga konzumirao – molimo Vas da odgovorite na pitanje broj 4, kao i pitanja broj 8 pa do kraja.
  
2. Mlijeko iz mljekomata kupujete/konzumirate:
  - a) Uvijek
  - b) Ponekad
  - c) Rijetko
  
3. Molimo Vas da napišite okvirnu količinu mlijeka koje kupujete u domaćinstvu iz mljekomata, izraženu u litrama, u mjesec dana. \_\_\_\_\_

4. Koji je/su Vaš/i motiv/i kupovine mlijeka iz mljekomata (moguće više odgovora). Ako postoji više motiva, molimo Vas da ih rangirate brojevima pokraj tvrdnje; gdje brojem 1. označite prvi motiv, br.2. drugi motiv itd.

- a) Takvo mlijeko je zdravije \_\_\_\_\_
- b) Takvo mlijeko je kvalitetnije \_\_\_\_\_
- c) Takvo mlijeko je punijeg okusa \_\_\_\_\_
- d) Na taj način se pomažu proizvođači mlijeka direktno \_\_\_\_\_
- e) Mogućnost kupovine 24 sata dnevno \_\_\_\_\_
- f) Navesti neki razlog koji nije spomenut \_\_\_\_\_
- g) Ne znam/ BO
- Postupanje s mlijekom iz mljekomata

5. Mlijeko punim u:

- a) Vlastite boce
- b) Boce koje se prodaju na mljekomatu
- c) Ne znam/Bez odgovora

6. Nakon kupnje, kada dođem kući, mlijeko:

- a) Odmah termički obradim (prokuham)
- b) Pohranim u frižider i prije konzumacije prokuham cijelu količinu (navesti okvirno vrijeme stajanja u frižideru prije prokuhavanja: \_\_\_\_\_)
- c) Pohranim u frižider i prokuham dio po dio prije svake upotrebe
- d) Pohranim u frižider i konzumiram neprokuhano

7. Od trenutka kupovine do dolaska kući najčešće prođe:

- a) Do 15 minuta
- b) Od 15 minuta do 30 minuta
- c) Od 30 minuta do jedan sat
- d) Više od jednog sata
- e) Nekoliko sati. Molim Vas navedite koliko: \_\_\_\_\_
- Demografija:

8. Starost:

- a) 18-29
- b) 30-44
- c) 45-54
- d) 55-64

9. Spol:

- a) Ženski
- b) Muški

10. Broj osoba u kućanstvu

11. Broj djece u obitelji

- a) Vrtičke dobi \_\_\_\_\_

- b) Osnovnoškolske dobi \_\_\_\_\_  
c) Srednjoškolske dobi \_\_\_\_\_  
12. Stručna sprema  
a) Osnovna škola  
b) Srednja škola  
c) Bakalar/viša  
d) Visoka  
14. Mjesto življenja : \_\_\_\_\_  
15. Županija: \_\_\_\_\_

### Dodatak 3.

Sirovo mlijeka iz mljekomata u zemalja EU

*(rezultati su dobiveni na temelju ankete provedene u sklopu rada Mreže za mikrobiološku procjenu rizika koja se nalazi u Europskoj agenciji za sigurnost hrane -MRA Network, EFSA; nakon 7. sastanak održanog 9/10.10.2012. u Parmi, Italija)*

Hrvatska agencija za hranu provela je putem mreže za mikrobiološku procjenu rizika, koja djeluje u sklopu Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA), anketu upućenu svim članicama EU, te Švicarskoj i Norveškoj, koja se sastojala od slijedećih pitanja:

- postoji li u zemlji mogućnost kupovine mlijeka iz mljekomata;
- postoji li nacionalna legislativa vezana za prodaju sirovog mlijeka te neka se navede;
- prodaje li se u mljekomatima pasteurizirano ili sirovo mlijeko;
- koje su institucije na državnoj razini odgovorne za kontroliranje prodaje u mljekomatima;
- je li zemlja provela ispitivanje koje se odnosi na mikrobiološku, kemijsku kvalitetu mlijeka ili načine kako s tim mlijekom postupaju potrošači;
- postoje li preporuke prodavačima ili potrošačima koje su oni obvezni slijediti;
- jesu li evidentirane epidemije ili pojedinačni slučajevi bolesti koje su povezane s konzumacijom sirovog mlijeka.

Zaprimljeni su odgovori 14 zemalja članica mreže, te podaci o **Irskoj**, koja je indirektno na pitanja odgovorila na 7. Sastanku MRA mreža koji je održan u Parmi 9. i 10.10.2012. g. Na anketu su odgovorile: **Austrija, Belgija, Bugarska, Češka, Engleska, Finska, Francuska, Grčka, Nizozemska, Norveška, Njemačka, Slovačka, Švedska i Švicarska.**

Mogućnost kupovine mlijeka iz mljekomata moguća je u 12 zemalja, s tim da se u **Irskoj** i **Švedskoj** može prodavati samo pasteurizirano mlijeko. U **Grčkoj, Norveškoj i Nizozemskoj** zakon ne dozvoljava prodaju, u **Finskoj** je prodaja dozvoljena, ali ne u mljekomatima već direktno s farme i u trgovinama, ali uz posebne dozvole, dok je u **Engleskoj** prodaja sirovog mlijeka iz mljekomata dozvoljena pod određenim uvjetima, ali ne u trgovinama.



Nacionalna legislativa vezana za prodaju sirovog mlijeka razlikuje se od zemlje do zemlje te osim nekih odredbi vezanih za primjenu higijenskih načela, broj somatskih stanica i ukupni broj mikroorganizama, potpuno različita. Tako u **Austriji** postoji propis „Rohmilchverordnung“ (Pravilnik o sirovom mlijeku) u čijem je članku 2. navedeno kako je zabranjeno prodavati sirovo mlijeko u dječje vrtiće i škole, te javne kuhinje, odnosno dozvoljeno je samo u slučaju ukoliko je mlijeko prethodno termički obrađeno (na način da se unište patogeni mikroorganizmi). Nisu propisani posebni mikrobiološki kriteriji osim onih propisanih u čl. 6. istog propisa, a odnose se na broj somatskih stanica ( $\leq 400\ 000/\text{ml}$ ) i ukupan broj mikroorganizama ( $\leq 50\ 000/\text{ml}$ ), kao i usklađenost s kriterijima iz Uredbe komisije (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu: za *Salmonella* spp. 0 u 25 g (u proizvodima s rokom trajnosti) i *L. monocytogenes* 0 u 25 g (u trenutku prodaje). U **Belgiji** je u izradi kraljevski dekret (**Draft Royal Decree on hygiene conditions relating to the direct supply of small quantities of certain foodstuffs of animal origin to the end consumer by an animal owner or other producer of primary products or hunter**) u kojem će biti detaljnije propisani uvjeti prodaje sirovog mlijeka i kolostruma. U **Bugarskoj** je na snazi pravilnik **Regulation No26/14.10.2010** pod nazivom **“Specific requirements about direct supply of small quantity of raw materials and foods of animal origin”**. Ovaj pravilnik propisuje posebne uvjete proizvodnje, pohrane i transporta sirovog mlijeka na tržište (u ovom slučaju mljekomata), mikrobiološke kriterije (broj somatskih stanica  $\leq 400\ 000/\text{ml}$  i ukupan broj mikroorganizama  $\leq 100\ 000/\text{ml}$ ), ne dozvoljava prisutnost ostataka veterinarskih rezidua u mlijeku, te specifične zahtjeve koji se odnose na čišćenje i dezinfekciju. Posebni zahtjevi namijenjeni potrošačima nalaze se na samim mljekomatima. U **Finskoj** je propisano da se godišnje najviše može prodati 2500 L sirovog mlijeka na farmi, a više je moguće uz dodatne zahtjeve. Mljekare moraju zadovoljavati određene uvjete vezane uz gradnju te imati vlastiti sustav kontrole sigurnosti, a time je obuhvaćen i monitoring mikroorganizama koji propisuje sam subjekt u poslovanju s hranom u suglasnosti s nadležnim tijelom. U **Slovačkoj** postoje vodiči koje izdaje državni servis za veterinarstvo i hranu (State Veterinary and Food Service) s naputcima o ukupnom broju mikroorganizama  $\leq 100\ 000/\text{ml}$ , o načinu hlađenja mlijeka, preporukom roka trajnosti do 48 sati te upozorenjem kako sirovo mlijeko nije za neposrednu konzumaciju već se mora prije termički obraditi. U **Engleskoj** postoji više zakonskih odrednica koje se primjenjuju različito ovisno radi li se o **Engleskoj, Sjevernoj Irskoj ili Walesu** gdje je dozvoljena prodaja sirovog mlijeka i vrhnja direktno s farmi ili iz kamiona ili brodova koji imaju status dućana. Za sirovo mlijeko drugih vrsta postoje druga pravila. U Škotskoj je prodaja sirovog mlijeka svih vrsta zabranjena. Sirovo mlijeko za konzumaciju mora udovoljavati slijedećim mikrobiološkim kriterijima: ukupan broj (plate count) na  $30^\circ\text{C}$  cfu /mL  $\leq 20\ 000$ , i koliformne cfu /mL  $< 100$ . U **Engleskoj i Sjevernoj Irskoj** na proizvodu od sirovog mlijeka i vrhnja mora se nalaziti informacija kako nije bilo termičke obrade te kako proizvod može sadržavati organizme štetne za zdravlje. U Walesu pored ovog mora se još nalaziti upozorenje za posebno osjetljivi dio populacije poput djece, trudnica, starijih ili osoba s kroničnim bolestima. Farme koje prodaju sirovo mlijeko podliježu inspekcijskom nadzoru svakih šest mjeseci kada se nadgleda njihova usklađenost s higijenskim standardima. U **Engleskoj i Walesu** sirovo mlijeko namijenjeno neposrednoj konzumaciji uzorkuje se i testira kvartalno u sklopu monitoringa za mikrobiološke kriterije. Sirovo mlijeko ostalih vrsta uzorkuje se prema učestalosti koju odredi Lokalni ured za hranu (Food Authority). U **Sjevernoj Irskoj** trenutno nije dozvoljena prodaja sirovog kravljeg mlijeka za ljudsku konzumaciju, a u sličnim

situacijama primjenjuje se kvartalno uzorkovanje i analiza. U **Češkoj** se primjenjuju nacionalni propisi na administrativnoj razini, dakle tko i gdje može prodavati mlijeko, bez posebnih propisa vezanih za posebne odredbe samo za sirovo mlijeko. U **Njemačkoj** prodaja sirovog mlijeka mora biti u skladu s „Verordnung über Anforderungen an die Hygiene beim Herstellen, Behandeln und Inverkehrbringen von bestimmten Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Tier-LMHV)“ prema kojoj proizvođač mora uz mjesto prodaje staviti jasnu informaciju: „prije konzumacije sirovo se mlijeko treba prokuhati“. Ukoliko se mlijeko prodaje upakirano na oznaci mora stajati rok uporabe (koji može biti najduže 96 sati od mužnje), kao i uvjeti pohrane (u hladnjaku do 8 °C), a propisani su i mikrobiološki kriteriji (navedeni u tablici ispod):

	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>n</b>	<b>c</b>
Ukupan broj bakterija/ml na 30°C (mlijeko krava, ovaca, koza i kobilica)	20.000	50.000	2	2
<i>Enterobacteriaceae</i> /ml na 30°C (mlijeko krava, ovaca, koza i kobilica)	10	100	5	2
Koagulaza pozitivni stafilokoki/ml (mlijeko krava, ovaca, koza i kobilica)	10	100	5	2
Broj somatskih stanica/ml (mlijeko krava i ovaca)	200.000	300.000	5	2
<i>Salmonella</i> u 25 g (mlijeko krava, ovaca, koza i kobilica)	0	0	5	0
U mlijeko krava, ovaca, koza i kobilica ne smiju se pronaći patogeni mikroorganizmi i njihovi toksini u količinama koje mogu biti štetne za ljude.				
U mlijeko kobilica hemolitički streptokoki ne smiju biti prisutni u 1 mL kod mjesečne kontrole.				
Mlijeko krava, ovaca, koza i kobilica ne smije prikazivati senzorna odstupanja.				
U mlijeko krava fosfataza test mora biti pozitivan.				

Zabranjena je prodaja mlijeka kuhinjama koje imaju veliki broj korisnika kao npr. bolnice, dječje vrtiće, staračke domove i sl. U **Švedskoj** je postojeća legislativa u reviziji, posebno iz razloga jer ne postoje propisani mikrobiološki kriteriji za sirovo mlijeko. Prema postojećoj subjekt u proizvodnji hrane može opskrbljivati s manjim količinama sirovog mlijeka krajnjeg potrošača, ali očekuje se kako će se donošenjem nove legislative to zabraniti ili barem zahtijevati dodatne mjere kao što je testiranje mlijeka te postavljanje dodatnih informacija za potrošače. U **Francuskoj** postoji zakonski akt „Order of July 13, 2012, laying down the conditions of production and placing on the market of raw milk of cattle, small ruminants and domestic solipeds“ u kojem su propisani uvjeti za proizvodnju i prodaju sirovog mlijeka (obuhvaćeni su i mljekomati) i postavljeni mikrobiološki kriteriji (sigurnosti i proizvodnog procesa) za sirovo mlijeko. U planu je izdavanje dekreta koji će se baviti označavanjem sirovog mlijeka. U **Švicarskoj** je sirovo mlijeko regulirano s nekoliko pravilnika. Tako je po definiciji sirovo mlijeko - mlijeko koje nije zagrijano na temperaturu višu od 40 °C i nije bilo predmetom prerade s nekim sličnim učinkom

(prema Art. 26(1), Ordinance on Food from Animal Origin; SR 817.022.108; available in German, French and Italian; [www.admin.ch/ch/d/sr/c817\\_022\\_108.html](http://www.admin.ch/ch/d/sr/c817_022_108.html)). Mlijeko se smatra „spremnim za konzumaciju“ kada je prošlo zadovoljavajuću pasterizaciju, pasterizaciju visokom temperaturom, UHT, sterilizaciju ili slični tretman kojim se postiže sličan efekt i odgovarajući rok trajanja (Art. 49, Ordinance on Hygiene; SR 817.024.1; available in German, French and Italian [www.admin.ch/ch/d/sr/c817\\_024\\_1.html](http://www.admin.ch/ch/d/sr/c817_024_1.html)). U tom se smislu sirovo mlijeko ne smatra „spremnim za konzumaciju“ te niti ne postoje posebni propisi koji bi se odnosili na mikrobiološke kriterije osim onih vezanih općenito za higijenu hrane. Sirovo mlijeko mora biti označeno kao takvo, a potrošače treba posebno upozoriti da takvo mlijeko nije za konzumaciju, odnosno da mora biti izloženo temperaturi od najmanje 70 °C prije konzumacije, kao i o uvjetima pohrane (Art. 32, Ordinance on Food from Animal Origin; SR 817.022.108). U **Mađarskoj** postoji nacionalna legislativa (**FVM Regulation 52/2010 of 30th April koja se tiče prodaje sirovog mlijeka malih proizvođača**). Kvaliteta ostalog mlijeka regulirana je s **FVM-SzMM Regulation 16/2008 of 15th February** u skladu sa zahtjevima **Regulation (EC) No 852/2004 i 853/2004 Europskog Parlamenta i Vijeća**. Uvjeti za male proizvođače koji prodaju sirovo mlijeko su: ograničena količina 200 L/dan, ograničena klijentela - direktna prodaja krajnjem potrošaču ili trgovini, javnom katering u bolnici u promjeru od 40 km (zabranjena je prodaja redistributerima); uvjeti prodaje: malog proizvođača mora registrirati nadležno tijelo, jedamput godišnje podliježe službenoj kontroli, mora imati uvjerenje kojim dokazuje kako je mliječno stado slobodno od tuberkuloze i bruceloze, te poštivati opće i posebne higijenske kriterije. Također, zahtjeva se da mlijeko koje se prodaje ima srednju geometrijsku vrijednost ukupnog broja mikroorganizama unazad zadnja 2 mjeseca ispod 100000 cfu/ml, na 30 °C s 2 uzorka mjesečno. Potrošači moraju biti pismeno obaviješteni za vrijeme prodaje da je konzumacija sirovog mlijeka dozvoljena samo nakon prokuhavanja.

U **Češkoj, Engleskoj, Austriji, Slovačkoj i Švicarskoj** u mljekomatima se prodaje i sirovo i pasterizirano mlijeko. Sirovo mlijeko prodaje se u mljekomatima u **Njemačkoj, Mađarskoj, Francuskoj i Bugarskoj**. U **Belgiji** se u mljekomatima može prodavati sirovo i pasterizirano mlijeko, ali za sada ima svega jedan mljekomat s pasteriziranim mlijekom (podaci iz prosinca 2012). U **Švedskoj i Irskoj** dozvoljena je prodaja samo pasteriziranog mlijeka u mljekomatima, dok u **Finskoj** za sada mljekomati nisu postavljeni.

Institucije koje su zadužene za nadzor, monitoring i/ili registraciju mljekomata su Ministarstvo za poljoprivredu u **Francuskoj, Češkoj** (Uprava za veterinarstvo) i **Slovačkoj** (Uprava za veterinarstvo i hranu), u **Belgiji** federalna agencija za sigurnost u lancu hrane (*Federal Agency for the Safety of the Food Chain*), u **Bugarskoj** Bugarska agencija za sigurnost hrane, u **Engleskoj i Walesu** Food Standards Agency (FSA), dok su za sirovo mlijeko drugih vrsta odgovorne lokalne vlasti nadležne za hranu. U **Sjevernoj Irskoj** to obavlja odjel za poljoprivredni i ruralni razvoj u ime FSA. U **Švicarskoj** nadzor sirovog mlijeka spada u kantonalnu nadležnost, dok je za mjerne vrijednosti i kalibraciju odgovoran Ured za mjeriteljsku kalibraciju i kontroli, a slično je i u **Švedskoj** gdje su za nadzor odgovorne lokalne vlasti, i u **Njemačkoj** - nadležna tijela za sigurnost hrane na federalnom nivou (*Länder*). U **Mađarskoj** mljekomati moraju biti registrirani, a nadzor nad njima imaju naizmjenice Županijski državni ured za sigurnost lanaca hrane i Uprava za zdravlje životinja. U **Austriji** sirovo mlijeko bez nekih posebnih osobitosti spada u nadležnost inspekcija koja i inače nadzire hranu na tržištu.

U **Francuskoj, Švedskoj, Austriji i Švicarskoj** nisu rađena istraživanja vezana za mikrobiološku i kemijsku kvalitetu sirovog mlijeka (u **Švicarskoj** rade na pasteriziranom mlijeku, jer sirovog nema u prodaji). U **Njemačkoj** se na godišnjoj razini provodi monitoring vezan za rezidue u mlijeku i ostatke pesticida te zoonoze sukladno direktivi 2003/99/EG koji se objavljuju u EFSA-inom godišnjem izvještaju. Povremeno se provode programi nadzora sirovog mlijeka u skladu s višegodišnjim planom kontrola (čl. 41 regulative (EC) No. 882/2002). U **Engleskoj** je u zadnjih 15 godina provedeno nekoliko istraživanja mikrobiološkog statusa sirovog mlijeka i vrhnja, ali se mora naglasiti kako je namjena sirovog mlijeka bila za termičku obradu, a ne konzumaciju. Sirovo mlijeko namijenjeno konzumaciji obuhvaćeno je monitoringom koji podrazumijeva uzorkovanje četiri puta godišnje i mora udovoljavati slijedećim kriterijima: ukupni broj bakterija na 30 °C (cfu/ml)  $\leq 20,000$  i  $<100$  koliformnih (cfu/ml). U **Bugarskoj** je napravljeno istraživanje sukladno Regulativi 853/2002 vezano za mikrobiološku i kemijsku kvalitetu mlijeka (dostupno samo na bugarskom jeziku). Istraživanje je provedeno i u **Belgiji**, na njihovom jeziku, **Češkoj** – isto, a ima sažetak na engleskom. U **Slovačkoj** je provedeno istraživanje na 15 uzoraka sirovog mlijeka uzorkovanih iz mljekomata. Mikrobiološke analize nisu rađene na patogene mikroorganizme koji mogu biti prisutni u mlijeku, već samo na bakterijske indikatore. Tako je uvjet  $\leq 100.000$  cfu/mL za ukupni broj mikroorganizama zadovoljilo 12 od 15 uzoraka (80%), dok su svi uzorci bili u skladu s kriterijem od  $5 \times 10^4$  psihotropnih mikroorganizama. Srednja vrijednost koagulaza pozitivnih stafilokoka kretala se oko  $2,9 \times 10^2$ , koliformnih 4,34 i *E. coli* 3,25 log cfu/ml, čime su dva potonja premašila vrijednosti prema prethodnim nacionalnim kriterijima. U istraživanju je potvrđeno da se broj bakterija nije se mijenjao tijekom pohrane 24 sata na 6 °C, te da je kontaminacija mlijeka posljedica fekalne kontaminacije, a ne rasta mikroorganizama nakon mužnje. Fekalna kontaminacija mlijeka otvara mogućnost prisustva *Campylobacter* spp. i *Salmonella* spp., te drugih patogena u mlijeku, a u skladu s tim potrebno je provesti preventivne mjere kako bi se smanjila ili izbjegla opasnost za ljudsko zdravlje. U **Finskoj** je u istraživanju mikrobiološke kakvoće sirovog mlijeka bilo obuhvaćeno nešto manje od 200 farmi u 2011. godini kada su uzorci sirovog mlijeka uzimani iz spremnika na farmama. U 5,5 % slučajeva detektirana je *L. monocytogenes* (prema kriteriju  $\leq 25$  cfu/ml). Analiza je rađena i za *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *E. coli*, Shiga toksin producirajuću *E. coli* (STEC), koagulaza pozitivne stafilokoke, *Arcobacter* spp., *Y. enterocolitica*, *Bacillus cereus* i ukupni broj, od čega *Salmonella* spp. i STEC nisu pronađeni, a ostali sporadično. U Mađarskoj nadležna tijela jedanput gošnje obavljaju nadzor malih proizvođača i dozvola za prodaju sirovog mlijeka im se produžuje samo u slučaju da zadovoljavaju uvjete (naprijed navedeni). O tome se vodi registar (na mađarskom jeziku).

U **Belgiji** postoji dokument koji je dostupan on- line, a u kojem su propisani higijenski uvjeti koje moraju zadovoljavati mljekomati (registracija mljekomata, uvjeti pohrane sirovog mlijeka, način transporta, konstrukcija mljekomata, neke tehničke karakteristike, mikrobiološki kriteriji i slično ([http://www.favv-afsca.fgov.be/tierproduktion/tierischeprodukte/milchprodukte/documents/2009-11-16\\_bijlageomzendbriefeisenmelkautomaten\\_DU.pdf](http://www.favv-afsca.fgov.be/tierproduktion/tierischeprodukte/milchprodukte/documents/2009-11-16_bijlageomzendbriefeisenmelkautomaten_DU.pdf))). U **Slovačkoj** proizvođači sami propisuju i pridržavaju se uvjeta. U **Bugarskoj** je na snazi *Regulativa No4/2008* kojom su kategorizirane farme te ujedno navedeni i specifični uvjeti. U **Engleskoj** se sirovo mlijeko prodaje uz upozorenje kako to mlijeko nije termički obrađeno te može sadržavati organizme koji mogu imati štetni učinak na zdravlje, a u Walesu se još dodatno mora napisati

upozorenje za osjetljive populacije poput djece, trudnica, starijih i ljudi koji boluju od kroničnih bolesti. U **Švicarskoj** sirovo mlijeko mora biti označeno kao takvo, a potrošače treba posebno upozoriti da takvo mlijeko nije za konzumaciju, odnosno da mora biti izloženo temperaturi od najmanje 70 °C prije konzumacije, kao i o uvjetima pohrane (Art. 32, Ordinance on Food from Animal Origin; SR 817.022.108). U **Austriji** su izdali letak namijenjen konzumentima sirovog mlijeka (*Merkblatt für den Konsum von Rohmilch*), kao i vodič za vlasnike mljekomata (*Richtlinie zur Ausstattung und Prüfung von Milchausgabeautomaten*) s detaljno razrađenim uputama. U **Francuskoj** je Ministarstvo poljoprivrede izdalo je naputke namijenjene za vlasnike mljekomata te označavanju sirovog mlijeka. U **Finskoj** su naputci u pripremi, u **Švedskoj** nemaju nikakve upute, a u **Češkoj** Uprava za veterinarstvo kontrolira i izdaje informacije vezane za mljekomate i sirovo mlijeko.

U **Francuskoj, Austriji, Mađarskoj, Belgiji i Bugarskoj** nisu imali službeno prijavljenih slučajeva oboljenja ljudi koji su nastali kao posljedica konzumacije sirovog mlijeka. U **Njemačkoj** imaju nekoliko slučajeva oboljenja nastalih kao posljedica infekcije s *Campylobacter* spp. i EHEC-om nakon posjete školaraca obiteljskim farmama. U **Engleskoj** je u vremenu od 1992. do 2002. bilo 24 prijavljena slučaja i oboljelo ukupno 255 ljudi. Od 2003. do danas nije bilo prijavljenih epidemija povezanih s konzumacijom sirovog mlijeka. Međutim, kao što je slučaj sa zaraznim enteritisima, epidemije često nisu prijavljene dok pojedinačni slučajevi mogu proći nezamijećeno. Ne postojanje službenih prijava ove bolesti djelomično može biti i posljedica smanjenja broja proizvođača sirovog mlijeka i vrhnja i posljedičnog smanjenja prodaje te vrste proizvoda. U **Švedskoj** je od 1994. do 2011. godine bilo 22 epidemije (9 kampilobakterioza, 1 salmoneloza, 12 VTEC) i oboljelo je oko 240 ljudi. U **Švicarskoj** su epidemije izazvane sirovim mlijekom rijetke, od 1993. do 2010. službeno je registrirano 5 manjih epidemija. Međutim, 1981. godine zabilježena je velika epidemija kojom je bilo obuhvaćeno oko 500 ljudi sudionika međunarodne utrke koji su oboljeli od kampilobakterioze (*C. jejuni*). Serotipizacijom uzročnik je utvrđen u fecesu samo jedne krave. Put prijenosa bio je napitak pripremljen sa sirovim mlijekom. U **Finskoj** je 2012. petero djece oboljelo od hemolitičko – uremijskog sindroma (HUS) nakon konzumacije mlijeka s jedne farme. U djece, životinja i u mlijeku utvrđen je isti tip EHEC bakterije. U prosincu 2012. Oboljelo je 14- ero školske djece od mlijeka koje je od kuće donio jedan učenik sa sumnjom na infekcija s *Campylobacter* spp.. U **Češkoj** kampilobakterioza porijeklom iz sirovog mlijeka je potvrđena u 2 pacijenta. U **Slovačkoj** je 2012. g. zabilježen slučaj oboljenja 2 djece koja žive s roditeljima Slovcima u Engleskoj, ali su se zarazili tijekom uskršnjih praznika koje su proveli u **Slovačkoj** i kojom su prilikom pili termički neobrađeno mlijeko iz mljekomata.

Amagliani i sur. (2012) navode kako je u Italiji na snazi propis kojim se dodatno regulira testiranje sirovog mlijeka koje se provodi 1-2 puta mjesečno. Ono mora zadovoljavati slijedeće mikrobiološke kriterije:

<i>Staphylococcus aureus</i>	n=50, m=500, M=2000, c=2
<i>Listeria monocytogenes</i>	odsutnost u 25 mL, n=5, c=0
<i>Salmonella</i> spp.	odsutnost u 25 mL, n=5, c=0
<i>Escherichia coli</i> O157	odsutnost u 25 mL, n=5, c=0
<i>Campylobacter</i> termotolerantni	odsutnost u 25 mL, n=5, c=0

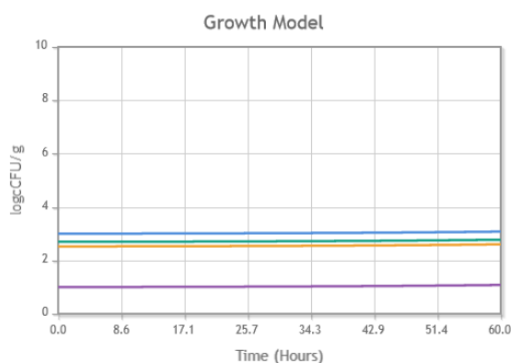
**Dodatak 4.**

Grafički prikaz rasta bakterija u ComBase softveru

Prikaz rasta za *L. monocytogenes* kod inicijalnih kontaminacija 9, 300, 500 i 960 cfu/g za

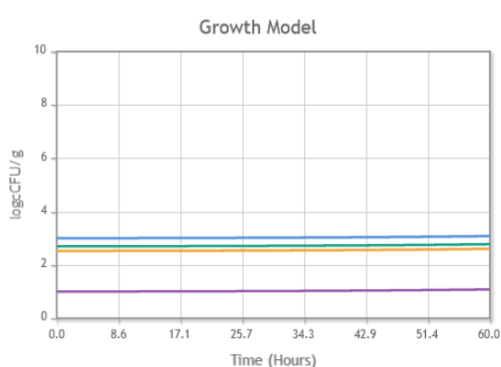
- a) pH 6,6 i 5 °C (slika 12 a)
- b) pH 6,6 i 10 °C (slika 12 b)
- c) pH 6,6 i 20 °C (slika 12 c)
- d) pH 6,6 i 35 °C (slika 12 d)
- e) pH 6,8 i 5 °C (slika 12 e)
- f) pH 6,8 i 10 °C (slika 12 f)
- g) pH 6,8 i 20 °C (slika 12 g)
- h) pH 6,8 i 35 °C (slika 12 h)

Phys. State (ili „initial physiological state“) je „početno fiziološko stanje“ koje je obilježeno brojem između 0 i 1, kako bi se izrazilo fiziološko stanje stanica u njihovom okolišu. Ukoliko je vrijednost 0 neće doći do rasta, a ukoliko je vrijednost 1 rast će krenuti odmah, bez log faze. Na ovaj parametar utječu temperatura, pH, aktivitet vode, stres (toplinski, osmotski, kiselinski). Prilikom korištenja ComBase softvera teško je odrediti vrijednost za početno fiziološko stanje. Stoga je već postavljena tipična vrijednost za određeni mikroorganizam. (ComBase, 2016).



— *Listeria monocytogenes/innocua*

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1	2.0e-2	5	6.6	0.98	0.017	17.432



— *Listeria monocytogenes/innocua*

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1	2.0e-2	5	6.8	0.98	0.017	17.23

— *Listeria monocytogenes/innocua*

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
2.5	2.0e-2	5	6.6	0.98	0.017	17.432

— *Listeria monocytogenes/innocua*

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
2.5	2.0e-2	5	6.8	0.98	0.017	17.23

— *Listeria monocytogenes/innocua*

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
2.7	2.0e-2	5	6.6	0.98	0.017	17.432

— *Listeria monocytogenes/innocua*

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
2.7	2.0e-2	5	6.8	0.98	0.017	17.23

— *Listeria monocytogenes/innocua*

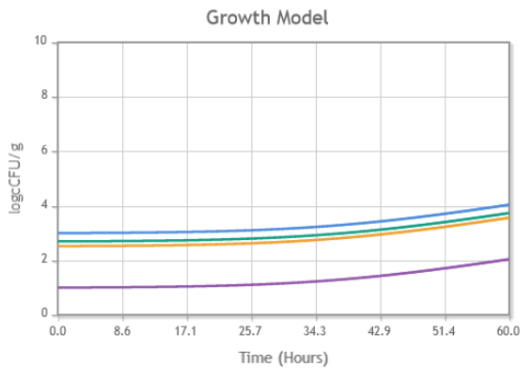
Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
3	2.0e-2	5	6.6	0.98	0.017	17.432

— *Listeria monocytogenes/innocua*

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
3	2.0e-2	5	6.8	0.98	0.017	17.23

Slika 12 a)

Slika 12 b)


 — *Listeria monocytogenes/innocua*

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1	2.0e-2	10	6.6	0.98	0.045	6.705

 — *Listeria monocytogenes/innocua*

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
2.5	2.0e-2	10	6.6	0.98	0.045	6.705

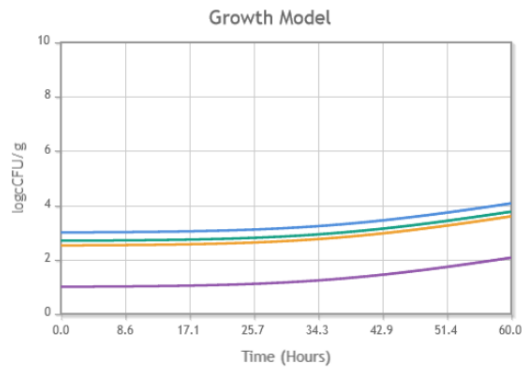
 — *Listeria monocytogenes/innocua*

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
2.7	2.0e-2	10	6.6	0.98	0.045	6.705

 — *Listeria monocytogenes/innocua*

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
3	2.0e-2	10	6.6	0.98	0.045	6.705

Slika 12 c)


 — *Listeria monocytogenes/innocua*

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1	2.0e-2	10	6.8	0.98	0.045	6.627

 — *Listeria monocytogenes/innocua*

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
2.5	2.0e-2	10	6.8	0.98	0.045	6.627

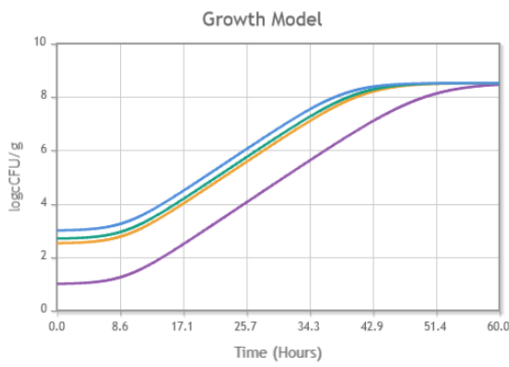
 — *Listeria monocytogenes/innocua*

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
2.7	2.0e-2	10	6.8	0.98	0.045	6.627

 — *Listeria monocytogenes/innocua*

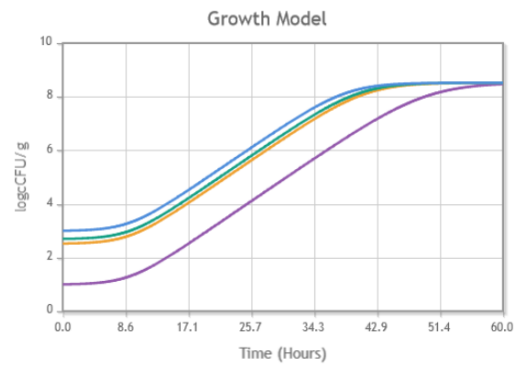
Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
3	2.0e-2	10	6.8	0.98	0.045	6.627

Slika 12 d)



— Listeria monocytogenes/innocua

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1	2.0e-2	20	6.6	0.98	0.184	1.632



— Listeria monocytogenes/innocua

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1	2.0e-2	20	6.8	0.98	0.187	1.613

— Listeria monocytogenes/innocua

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
2.5	2.0e-2	20	6.6	0.98	0.184	1.632

— Listeria monocytogenes/innocua

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
2.5	2.0e-2	20	6.8	0.98	0.187	1.613

— Listeria monocytogenes/innocua

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
2.7	2.0e-2	20	6.6	0.98	0.184	1.632

— Listeria monocytogenes/innocua

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
2.7	2.0e-2	20	6.8	0.98	0.187	1.613

— Listeria monocytogenes/innocua

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
3	2.0e-2	20	6.6	0.98	0.184	1.632

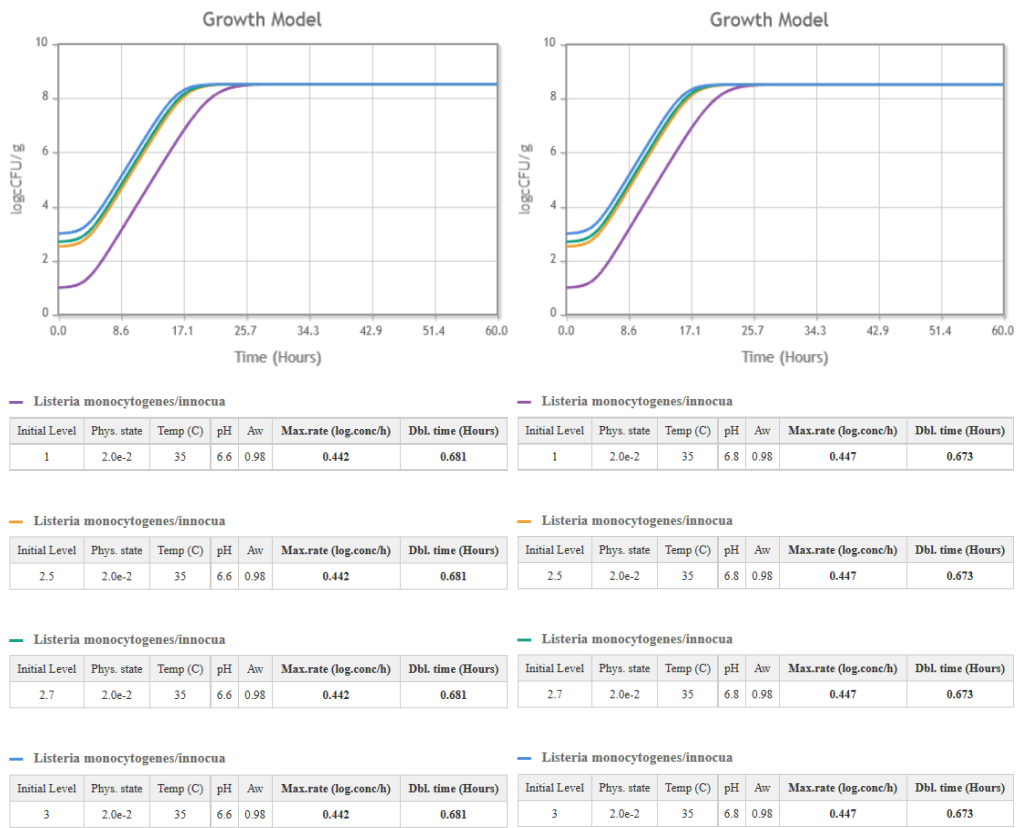
— Listeria monocytogenes/innocua

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
3	2.0e-2	20	6.8	0.98	0.187	1.613

Slika 12 e)

Slika 12 f)





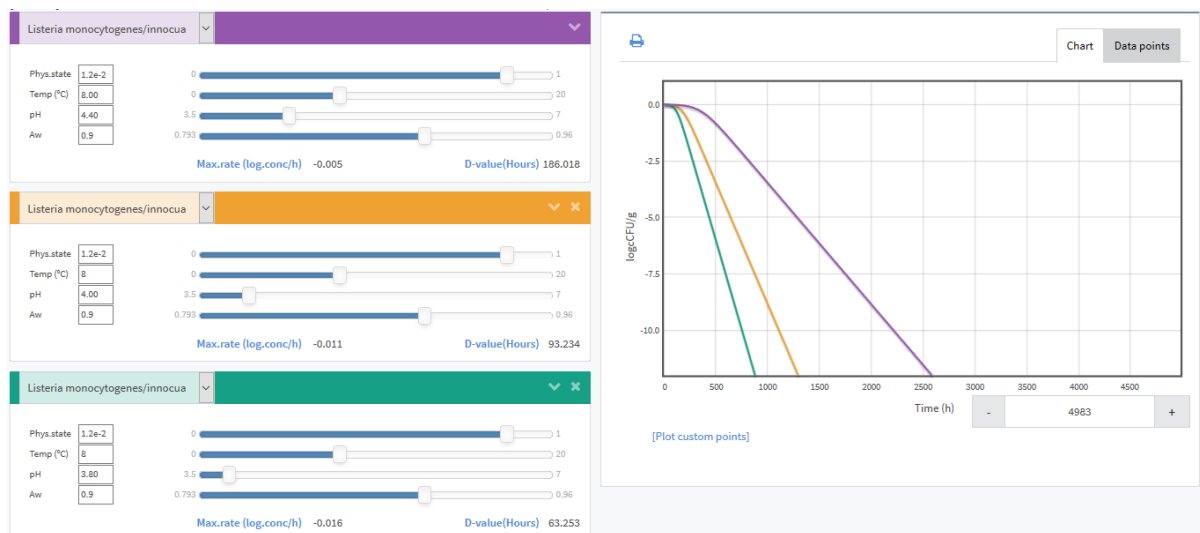
Slika 12 g)

Slika 12 h)

## Dodatak 5.

Grafički prikaz netermičkog preživljavanja *L. monocytogenes* u ComBase softveru

Prikaz je napravljen zbog pretpostavke promjene pH prilikom korištenja sirovog mlijeka bez prethodne termičke obrade za izradu joguta ili kiselog mlijeka kako bi se prikazao utjecaj smanjivanja pH na D-vrijednost (vrijeme potrebno da se broj mikroorganizama smanji za 90 %; **slika 13**).



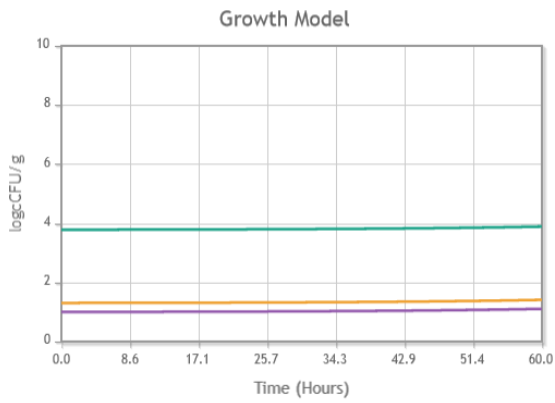
Slika 11 - Utjecaj pH na D-vrijednost kod *L. monocytogenes*

## Dodatak 6.

Prikaz rasta za *S. aureus* kod inicijalnih kontaminacija 9, 20 i 6000 cfu/g za

- pH 6,6 i 10 °C (**slika 14 a**)
- pH 6,6 i 20 °C (**slika 14 b**)
- pH 6,6 i 35 °C (**slika 14 c**)
- pH 6,8 i 10 °C (**slika 14 d**)
- pH 6,8 i 20 °C (**slika 14 e**)
- pH 6,8 i 35 °C (**slika 14 f**)

Phys. State (ili „initial physiological state“) je „početno fiziološko stanje“ koje je obilježeno brojem između 0 i 1, kako bi se izrazilo fiziološko stanje stanica u njihovom okolišu. Ukoliko je vrijednost 0 neće doći do rasta, a ukoliko je vrijednost 1 rast će krenuti odmah, bez log faze. Na ovaj parametar utječu temperatura, pH, aktivitet vode, stres (toplinski, osmotski, kiselinski). Prilikom korištenja ComBase softvera teško je odrediti vrijednost za početno fiziološko stanje. Stoga je već postavljena tipična vrijednost za određeni mikroorganizam. (ComBase, 2016).



— Staphylococcus aureus

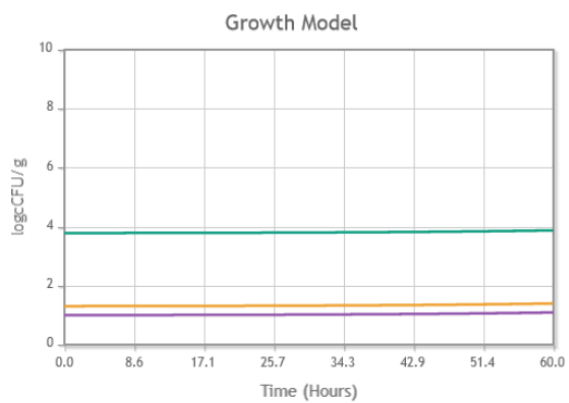
Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1	1.2e-2	10	6.6	0.98	0.023	13.241

— Staphylococcus aureus

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1.3	1.2e-2	10	6.6	0.98	0.023	13.241

— Staphylococcus aureus

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
3.8	1.2e-2	10	6.6	0.98	0.023	13.241



— Staphylococcus aureus

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1	1.2e-2	10	6.8	0.98	0.022	13.871

— Staphylococcus aureus

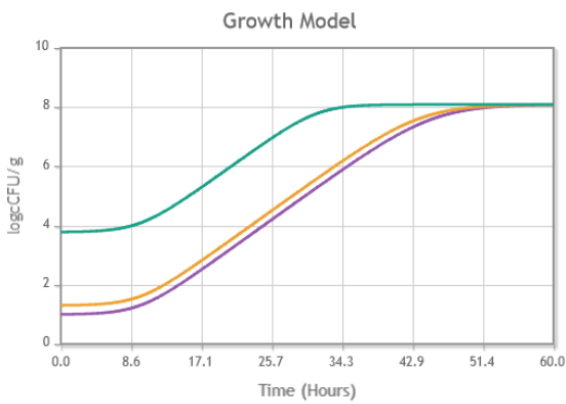
Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1.3	1.2e-2	10	6.8	0.98	0.022	13.871

— Staphylococcus aureus

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
3.8	1.2e-2	10	6.8	0.98	0.022	13.871

Slika 14 a)

Slika 14 b)



— Staphylococcus aureus

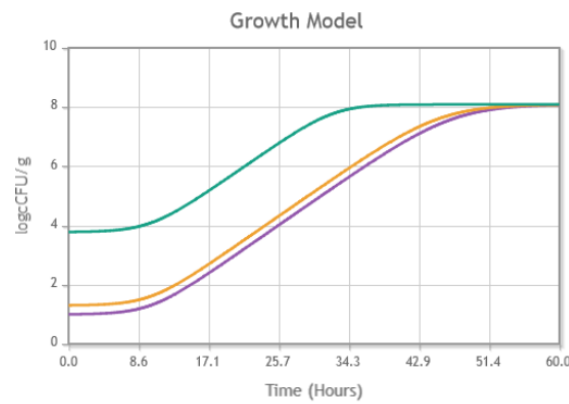
Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1	1.2e-2	20	6.6	0.98	0.199	1.514

— Staphylococcus aureus

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1.3	1.2e-2	20	6.6	0.98	0.199	1.514

— Staphylococcus aureus

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
3.8	1.2e-2	20	6.6	0.98	0.199	1.514



— Staphylococcus aureus

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1	1.2e-2	20	6.8	0.98	0.192	1.572

— Staphylococcus aureus

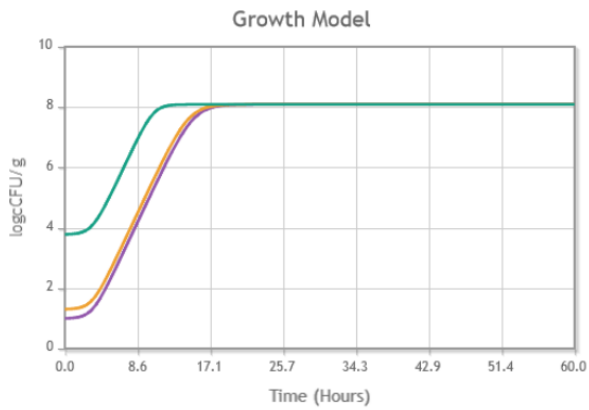
Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1.3	1.2e-2	20	6.8	0.98	0.192	1.572

— Staphylococcus aureus

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
3.8	1.2e-2	20	6.8	0.98	0.192	1.572

Slika 14 c)

Slika 14 d)



— Staphylococcus aureus

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1	1.2e-2	30	6.6	0.98	0.595	0.506

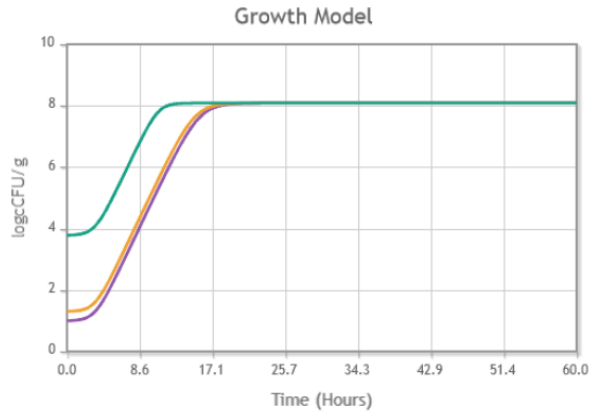
— Staphylococcus aureus

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1.3	1.2e-2	30	6.6	0.98	0.595	0.506

— Staphylococcus aureus

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
3.8	1.2e-2	30	6.6	0.98	0.595	0.506

Slika 14 e)



— Staphylococcus aureus

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1	1.2e-2	30	6.8	0.98	0.579	0.52

— Staphylococcus aureus

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
1.3	1.2e-2	30	6.8	0.98	0.579	0.52

— Staphylococcus aureus

Initial Level	Phys. state	Temp (C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl. time (Hours)
3.8	1.2e-2	30	6.8	0.98	0.579	0.52

Slika 14 f)