

MEĐUNARODNA MLJEKARSKA FEDERACIJA FIL-IDF

Nastavak iz broja 4/94.

NOVE PUBLIKACIJE

Specijalno izdanje broj 9404

PRIROĐENI ANTIMIKROBIOLOŠKI AGENSI MLJEKA - NOVA OTKRIĆA**I: Antimikrobiološki mehanizmi****1. Aktivni peptidi laktoferina**

M. Tomita - Food Research and Development Laboratory, Morinaga Milk Industry Co Ltd, Japan

Proučavali smo antimikrobiološka svojstva peptida koji nastaju enzimatskom digestijom laktoferina nastojeći da identificiramo nove bioaktivne materijale koji potječu od bjelančevina mlijeka. Otkriven je potencijalno aktivni peptid nazvan "laktofericin" koji nastaje u području krajnjeg N molekule laktoferina. Provjeren je širok niz vrsta mikroorganizama koje ometaju i inaktiviraju ovaj prirodni peptid. Proučavanja vezanja stanice pokazala su da taj mehanizam djelovanja uključuje direktno međudjelovanje s mikrobiološkom površinom, a proučavanja elektronskim mikroskopom otkrila su da se time bitno oštećuje stanica. Ovi nalazi ukazuju na mogućnost da aktivni peptidi laktoferina mogu djelovati u obrani domaćina, na kome se nalaze, od bolesti izazvanih mikroorganizmima. Osim toga, ovaj novi materijal, nastao od laktoferina, može biti koristan kao prirodni antimikrobiološki agens za dodavanje različitim proizvodima.

2. Pasivni imunitet i raznovrsnost imunoglobulina

J. E. Butler - Department of Microbiology, University of Iowa Medical School, Iowa City, CA 52242, USA.

Ovaj pregled slijedi trag povijesti otkrića s područja pasivnog imuniteta potomaka, naglašavajući središnju ulogu mliječne žlijezde i njezina fiziološkog mehanizma. Prikaz sažima glavne PROŠLE doprinose, SADAŠNJE stanje naših saznanja te projicira BUDUĆU ulogu mliječne žlijezde naročito krava i svinja za imunoterapiju ljudi i životinja genetskom tehnikom.

Među važnijim sažetim temama nalaze se slijedeće: (a) heterogenost imunoglobulina te geni imunoglobulina goveda i svinje, (b) koncentracija glavnih imunoglobulina u mlijeku tih vrsta i njihova uloga u pasivnom imunitetu te (c) mehanizam transporta imunoglobulina kroz epitel u mlijeko i kolostrum. Osim toga raspravlja se o potrebi standardiziranja nomenklature i standardiziranja reagenasa

za animalne imunoglobuline, a opisuju se napori za izgradnju Međunarodnih priručnih centara pod upravom I.U.I.S.

Pozivaju se znanstveni radnici područja stočarstva i mljekarstva da koriste izvanredno velik proizvodni kapacitet stoke u gospodarskim dvorištima i tehniku antitijela za osiguranje ekonomski zdravog i medicinski učinkovitog oblika imunoterapije per os u zaštiti ljudi i životinja od patogenih mikroorganizama probavnog trakta.

3. Molekularna konstrukcija sekretornog IgA i dva sekrecijska sastojka kravljeg mlijeka

Ch. Kanno, N. Azuma, T. Hizono i N. Sinohara - Department of Applied Biochemistry, Utsunomiya University, Utsunomiya 321, Japan

Kromatografijom bakar-sekvestrat afiniteta izoliran je iz kravljeg mlijeka slobodni sekrecijski sastojak pa on sam podijeljen u dva sastojka SC-1 i SC-2. Iz SC-1 i SC-2 izoliran je različit specifičan peptid hidrolizon s lisilendopeptidazom. Specifičan peptid iz SC-2 obilovao je metioninom i cisteinom. Svojstva vezanja nejasnijeg IgA na dva sekrecijska sastojka protumačena su tako da se mogla oblikovati molekula sIgA (sekrecijski IgA). Slobodni sekrecijski sastojak vezan je na nejasniji IgS čovjeka te IgM. Osim toga humani nejasniji IgA vezan je na SC-2 bogatiji cisteinom od SC-1.

4. Limfocit mlijeka anti-ljepivi faktor i njegova anti-mikrobiotička uloga

L. R. Beck i J.P. Fuhrer - Stolle Research and Development Corporation 6954 Cornell Road, Cincinnati, OH 45242, USA

Proučavanjem Stolle Research and Development Corporation i različitih laboratorijskih suradnika iz prošle dekade utvrdilo se da mlijeko krava imuniziranih protiv vakcina ubijenih bakterija sadrži molekulu ne-peptida male molekularne mase, oralno aktivnog koji nije specifičan u odnosu na vrste te je biološki anti-inflamacijski potencijalno aktivan. Anti-inflamatorni faktor hiperimunog mlijeka priječi prianjanje limfocita koji se kreću malim venama iza kapilara i njihovo kasnije izdvajanje kroz endotelij i ograničava sudjelovanje neutrofila u upalnoj reakciji. Dokazano je da su hiperimuno mlijeko koje sadrži antiupalni faktor i polupročišćeni preparati antiupalnog faktora hiperimunog mlijeka učinkoviti u smanjenju upale primjenom slijedećih modela upale: edemi šape štakora izazvani karaginanom, infekcije mliječne žlijezde miša izazvane *Staphylococcus* vrstama, intradermalna i subkutana upala s *E. coli*, obrnuta pasivna Arthus reakcija, subkutani pokus sa spužvom za iseljenje neutrofila iz krvnih sudova, eksperimentalni pielonefritis štakora, intravitalna mikroskopija adhezije neutrofila na mezenterične sudove štakora. Priječenje adhezije limfocita različitim načinima davanja polupročišćenog antiupalnog faktora hiperimunog mlijeka u modelima infekcije bakterijama uvjetuje smanjenje upale i oštećenje tkiva. Proučavanja in vitro

potvrdila su da antiupalni faktor hiperimunog mlijeka priječi vezanje TPA-a stimuliranih stanica podređenih CD-18 na plohe obložene bjelančevinom. Netoksičan, oralno aktivni antiupalni faktor hiperimunog mlijeka pruža veliki potencijal za liječenje tkiva oštećenog posredovanjem neutrofila koji nastaje kao reakcija na kroničnu upalu povezanu s autoimunom bolesti, toksičkim šokom, ponovnim prelijevanjem organa, transplatacijom organa te infekcijama izazvanim bakterijama i virusima. O pojedinostima animalnih pokusa primjenjenih za definiranje biokemijskih svojstava antiupalnog faktora hiperimunog mlijeka i njegovog mehanizma djelovanja raspravljat će se naglašavanjem kako ovo biološko mlijeko može djelovati i neovisno i zajedno s antimikrobiološkim faktorima mlijeka u kontroli upala i oštećenja tkiva probavnog trakta izazvanih upalama bakteriološkog ili virusnog tipa.

II: Izoliranje i postupci pokusa

1. Kvantitativna analiza sastojaka sustava bovine laktoperoksidaze i djelovanja aktiviranog sustava na rast i preživljavanje bakterija

K. M. Pruitt¹ i D. N. Kamau² - University of Alabama at Birmingham, University Station, Birmingham, AL 35294-2010, USA ² Tuskegee University, 200E Capbell Building, Tuskegee, AL 36088 USA

Tijekom zadnje dvije dekade određena je iscrpna kemija sustava bovine laktoperoksidaze. Iako je enzim laktoperoksidaza u kravljem mlijeku zastupljen u znatnim koncentracijama, potrebni su dodatni sastojci da bi proizveli antibakterijske učinke. Svi sastojci sustava laktoperoksidaze sada su poznati uključivši i glavne proizvode odgovorne za antimikrobiološka djelovanja. Dostupne su točne analitičke metode za određivanje koncentracija tih sastojaka. Identificirane su glavne kemijske reakcije odgovorne za antimikrobiološke učinke sustava laktoperoksidaze. Razvijeni su matematički modeli za kvantitativno opisivanje tih antimikrobioloških učinaka. Ti se modeli mogu primjenjivati za eksperimentalne podatke korištenjem trgovačkih omota rutinskih programa računara (software) uvrštenih u vlastite računare. U ovom izvješću dajemo pregled biokemije sustava laktoperoksidaze. Navodimo sažetke metoda dostupnih za analizu sastojaka sustava te primjere primjene matematičkih modela za podatke o rastu i preživljavanju bakterija.

2. Pročišćavanje aktivnog imunoglobulina iz sirutke primjenom filtriranja iso-prosijavanjem

C. T. Cordle, R. L. Thomas, L. G. Criswell i P. H. Westfall Ross Laboratories and Clemson University, Columbus, OH, USA

Otkriven je postupak pročišćavanja aktivnog imunoglobulina (Ig) korištenjem metalnih membrana nastalih na mjestu na kremenastim cijevima od čelika koji

ne rda (SST). Postupak koristi isključivanje po veličini te manipuliranje nabojem bjelančevine oko izoelektričke točke Ig da bi selektivno odbacio ili propuštao bjelančevine u struju razdvajanja. Izdvajanje aktivira membrana metalnog oksida fizički nanijeta na unutarnju površinu SST. Specijalno SST ležište dozvoljava primjenu uvjeta postupka koji se ne mogu postići konvencionalnijim membranama organske ultrafiltracije. Ove uključuju radne pritiske veće od 150 atmosfera i tangencijalne protoke od 6 m/s. Visoke prosječne brzine su posebno važne za osiguranje burnog protoka na površini razdvajanja. Ovo smanjuje prljanje membrane i stvaranja sloja polariziranja. Volumen obnavljanja 95% (20X koncentracija) postiže se samo jednim filtriranjem bez gubitka sposobnosti frakcioniranja. Ovo veliko početno smanjenje volumena u male slijedeće volumene diafiltriranja umanjuje ukupne volumene postupka. Dodatne prednosti SST sustava uključuju: (1) membrane od metalnih oksida se lako kemijski zamjenjuju, (2) sustav se čisti lužinom/kiselinom a može se sterilizirati parom i (3) uređaj se može koristiti vrlo dugo, a njime se upravlja razmjerno jeftino.

Kontrolirati se može propusnost membrane metalnog oksida za bjelančevinu i to do određenog stupnja izmjenom sastava sastojaka metalnog oksida membrane. Osim toga, membrana je pozitivnog naboja. To dozvoljava učinkoviti obim permeabiliteta membrane koji se može mijenjati promjenom pH otopine razdvajanja iznad ili ispod izoelektrične točke željene bjelančevine. Princip izoprosijavanja je korišten za razvoj specifičnog postupka pročišćavanja bovinog Ig iz mlijeka ili sirutke kolostruma. Početni korak postupka je koncentriranje Ig uz pH 5,0 - 5,5. Pri tom pH Ig je čistog pozitivnog naboja i zadržava ga membrana dok druge bjelančevine sirutke (β -laktoglobulin, α -laktalbumin i u manjoj mjeri, BSA) prelaze u struju permeata. Poslije nešto diafiltriranja kako bi se dalje obogatio s Ig, pH retentata se povećao do iznad izoelektričke točke Ig (6,5 - 7,0) pa Ig prelazi u permeat. Ovi separati Ig formiraju agregate bjelančevina, fragmenata kazeina i većine bakterija (6-7 log redukcija). Uslijed velike čistoće proizvod ovog postupka je idealni početni materijal za daljnje pročišćavanje, ako su potrebne više razine obogaćivanja Ig, ili za steriliziranje primjenom dostupnih metoda mikrofiltriranja. Uvjeti postupka su razmjerno blagi i > 85% specifične antigene aktivnosti antitijela se ponovno nalazi u pročišćenoj frakciji imunoglobulina. Primjenom ovog postupka obogaćen je imunoglobulin iz sirutke kravljeg mlijeka od 5% do 20% ukupne bjelančevine sirutke uz 90% ponovnog nalaženja IgG. Proces se može koristiti s kolostralnom sirutkom kao početnim materijalom za proizvodnju proizvoda s > 80% Ig, a upješno se koristio za pročišćavanje Ig iz seruma jaja i krvi.

3. Ekstrahiranje laktoperoksidaze i laktoferina iz sirutke sira primjenom membrane izmjenjivača kationa
I. R. Mitchell¹, G. W. Smithers¹, D. A. Dionysius², P. A. Grieve²,
G. O. Register¹ i E. A. James² - ¹CSIRO Division of Food Science
and Technology, Dairy Research Laboratory, Highett, Vic. 3190, Australia

² International Food Institute of Queensland, Queensland Department of Primary Industries, Hamilton, Qld. 4007, Australia

Jake membrane izmjene kationa koje djeluju ili na kraju ogranka ili u konfiguracijama unakrsnog tijeka, mogu se primijeniti za dobivanje laktoperoksidaze i laktoferina iz sirutke sira. Prilikom izoliranja laktoperoksidaza i laktoferin su podjednakih kapaciteta vezanja ($1,3 \pm 0,14$ mg/cm² prva te $1,1 \pm 0,1$ mg/cm² drugi) na membrani. Ipak, sa smjesom čistih bjelančevina ili sa sirutkom sira bio je umanjen izmjereni kapacitet za laktoperoksidazu što ukazuje na veći afinitet membrane ionskog izmjenjivača prema laktoferinu. Prethodno mikrofiltriranje sirutke sira prije postupka povećalo je obim istjecanja i značajno skratilo trajanje postupka.

III: Medicinsko-prehrambeni aspekti

1. Fiziološka uloga laktoferina

L. Hambreus¹ i B. Lönnerdal² - ¹ Department of Nutrition, University of Uppsala, Uppsala, Sweden ² Department of Nutrition, University of California, Davis, CA, USA

Laktoferin je jedna od bjelančevina mlijeka vrlo zanimljivih i mnogostranih bioloških funkcija. Najprije se smatralo da je bitna u obrani protiv gastrointestinalnih upala izazvanih njezinim znatnim kapacitetom za vezanje željeza, a novija su brojna istraživanja pokazala da je laktoferin krajnji predstavnik specifičnih prehrambenih bjelančevina velikog potencijala za korištenje u funkcionalnoj hrani, to jest, u sivoj zoni između fiziologije ishrane i farmakologije. Tijekom posljednje dekade istraživanja laktoferina i njegove uloge u biološkom potencijalu beskrajno je porasla, što je završilo simpozijem o specifičnom laktoferinu održanom 1992. Povećani interes za ulogu formiranja slobodnog radikala i antioksidativnih sastojaka vjerojatno će poticati dalja proučavanja uloge laktoferina kao usklađivača rasta, regulatora metabolizma željeza, kao i utjecaja na stanja "stresa", na primjer, u reagiranju na upalu. Nedavna proizvodnja rekombinanta humanog laktoferina u transgenim životinjama dalje naglašava potencijal za korištenje laktoferina u velikom mjerilu i znatno olakšavanje mogućnosti ocjene potencijala bioloških aktivnosti laktoferina.

2. Antitijela iz mlijeka za priječenje i liječenje proljeva

L. P. Ruiz, Jr. - GalaGen Inc., 4001 Lexington Avenue North, Arden Hills, MN 55126, USA

Imunoglobulinska frakcija kravljeg mlijeka i kolostruma uvjetuje neka svojstva priječenja infekcija. Odavno je priznata vrijednost primjene kolostruma krave za suzbijanje proljeva različitih novorođenih domaćih životinja (prasadi, janjadi,

ždrijebadi). Znatna su bila istraživanja (poslije 1979.) procjena upotrebe imunoglobulina goveda za liječenje i priječenje nekih bolesti ljudi izazvanih patogenim mikroorganizmima: *H. pylori*, *C. parvum*, *E. coli*, *S. flexneri*, *C. difficile*, *V. cholerae* i rotavirusa. Ovo izvješće sažimlje informacije objavljene o više od 800 pacijenata, koji su liječeni različitim proizvodima imunoglobulina goveda (antitijela) protiv djelovanja navedenih patogenih mikroorganizama.

3. Odvajanje fragmenata tripsina iz laktoferina goveda i njihova sposobnost da se vežu na *Trypanosoma cruzi*
K. Shimazaki¹, T. Tanaka², I. Igarashi², A. Saito², H. Kanbara³
i N. Suzuki²

¹ Dairy Science Laboratory, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan

² Research Center for Protozoan Molecular Immunology, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Japan

³ Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University Nagasaki, Japan

Molekula laktoferina sastoji se od dva reznja (N- i C- reznja), a svaki se sastoji od dva područja. Kako bi se odredio položaj molekule laktoferina odgovorne za neke biološke funkcije, dobiveni su fragmenzi blagom hidrolizom laktoferina tripsinom. Aktivnost vezanja netaknutog laktoferina i njegovih fragmenata na *Trypanosoma cruzi*, parazita iz skupine Protozoa, utvrđena je uporedbom.

Fragment 43 kD uspješno je izdvojen iz laktoferin hidrolizata dobivenog pomoću tripsina i pročišćenog gel filtriranjem i kromatografijom izmjenom iona. Taj fragment je identificiran kao C-režanj na N-završetku i C-završetku određivanjem djelomičnog slijeda amino kiseline. C-režanj se sastoji od 340- 689 ostataka amino kiselina. Drugi dobiveni fragmenti bili su smjesa 34 i 51 kD fragmenata sastavljenih od 1 - 282 i 283 - 689 ostataka amino kiselina.

Pokusi vezanja na *Trypanosoma cruzi* u kulturi embrio fibroblasta provedeni su direktnim testom imunofluorescencije pomoću FITC-označenog anti-govedeg laktoferin antitijela (kunića). Apo- i holo-laktoferini i drugi fragmenti pokazali su sposobnost vezanja na *Trypanosoma cruzi*, a C- režanj nije. Ovi rezultati ukazuju da je mjesto vezanja laktoferina najvjerojatnije smješteno u N-režanj. Zanimljivo je napomenuti da vezanje laktoferina na *Trypanosoma cruzi* ne ovisi o vezanju laktoferina na željezo.

4. Antitijela goveda za *Helicobacter pylori* kao mogući lijek za ljude protiv gastritisa i bolesti čira izazvanog pepsinom
C.T. Cordle, J. P. Schaller i S. Krakowka
Ross Laboratories, Columbus, OH, USA

Mnoga novija izvješća odlučno navode da je *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) vjerojatno uzročnik patogeneze kronično aktivnog gastritisa i čira izazvanog

pepsinom. Studijska skupina Eurogast također je izvijestila o vezi između infekcije s *H. pylori* i raka želuca. Ocijenjene su poboljšane terapije za te uvjete širom svijeta. Ovi napori uključuju trostruku terapiju antibiotikom i istraživanja u namjeri da se otkriju vakcine za *H. pylori*. Niti jedan od tih pristupa nije bio posve zadovoljavajući. Ovdje se referira o rezultatima proučavanja postupka u modelu s prasetom koje nije sadržavalo mikroorganizama, planiranim da ocjenjuje sposobnost antitijela goveda protiv *H. pylori* da umanje ili isključe naseljavanje te bakterije u sluznici želuca.

5. Učinci postupka zagrijavanja na strukturu i sposobnost vezanja željeza govedeg laktoferina

K.D. Kussendrager - DMV International, Veghel, the Netherlands

Sve veće je zanimanje za primjenu govedeg laktoferina kao sastojka u funkcionalnoj hrani i formulama dječje hrane. Postupci grijanja tijekom obnavljanja i primjene laktoferina mogu oštetiti njegovo bioaktivno stanje i funkcionalnost što nameće potrebu dobrog sagledavanja stabilnosti laktoferina prema toplini kako bi njegova primjena mogla biti optimalna.

Utjecaji toplinskih postupaka na denaturiranje trgovačkog laktoferina kao i pripremljene tipove zasićene željezom i bez željeza, proučavani su u uvjetima temperature između 70 i 90°C.

U okviru kinetičkog pristupa analizirani su učinci zagrijavanja u obliku iznošenja na vidjelo kao određenih pomoću DSC i agregacije, nastale analizom radialne imunodifuzije.

Ovi su rezultati otkrili da kinetički pristup denaturiranju laktoferina zagrijavanjem osigurava informacije koje se mogu koristiti za predviđanje i kontrolu učinaka (industrijskih) postupaka zagrijavanja.

Zato što na toplinsku stabilnost laktoferina utječu uvjeti okoline kao pH, soli i bjelančevine (sirutke), kinetičke parametre toplinom izazvanog denaturiranja laktoferina valja odrediti pod uvjetima primjene.

6. Hiperimuni kravliji kolostrum: dvostruki slijepi klinički kontrolirani pokus s odojčadi i rotavirusom proljeva

A.K. Mitra, D. Mahalanabis, S. Tzipori, H. Ashraf, L. Unicom and R. Eckels

International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Dhaka, Bangladesh

Procjene Medicinskog instituta iz 1986. o rasprostranjenosti proljeva izazvanih rotavirusom pokazuju da oni dostižu 41 milijun slučajeva godišnje, a među njima je bilo 9 milijuna teških, dok je procijenjen broj smrtnih slučajeva bio nešto malo manji od jednog milijuna. Zbog toga je rotavirus proljeva glavni uzrok smrtnosti diljem svijeta, a u zemljama u razvoju je glavni uzrok smrtnosti dojenčadi i male djece. Obzirom na njegovu važnost za zdravlje, poduzete su opće inicijative kako

bi se razvila praktična vakcina protiv rotavirus proljeva koja bi mogla dopuniti program imuniziranja dojenčadi i male djece. Ipak, još smo daleko od učinkovite, jeftine i praktične vakcine. Uobičajeni postupak uključuje zamjenu tekućine i gubitke elektrolita većinom terapijom oralne ponovne hidracije i ranog prikladnog hranjenja kako bi se svele na najmanje posljedice hranjenja, naročito u zemljama u razvoju. Rezultati kliničkih pokusa s različitim takozvanim antisekrecijskim lijekovima su razočarale, a kako još nije dostupna prikladna rotavirus vakcina postoji li namjera za nove pristupe liječenju tog velikog zdravstvenog problema djece?

7. *Helicobacter pylori* - specifično antitijelo i baktericidna aktivnost u serumu, kolostrumu i mlijeku imuniziranih i neimuniziranih krava

H. Korhonen¹, E-L. Syväoja¹, H. Ahola-Luttilla¹, S. Sivelä¹, S. Kopola², J. Husu³ i T. Kosunen⁴

¹Valio Research and Development Centre, PO Box 390, FIN-00101 Helsinki, Finland

²Department of Food Technology, Dairy Section, University of Helsinki, FIN-00710 Helsinki, Finland

³Department of Bacteriology and Serology, National Veterinary and Food Institute, PO Box 368, FIN-00101 Helsinki, Finland

⁴Department of Bacteriology and Immunology, University of Helsinki, FIN-00290 Helsinki, Finland

Sustavna, serijska imunizacija bređih krava koje se nisu muzle s *Helicobacter pylori* NCTC 11637 završila je visokim, specifičnim titrima antitijela u serumu i kolostrumu. Razine serum titra ostale su visoke tijekom laktacije, ali su titri kolostruma brzo opadali i nisu otkriveni u mlijeku poslije kolostruma. Svi uzorci seruma i prvog kolostruma te 43% post-kolostralnog mlijeka imuniziranih krava bili su vrlo baktericidni za *H. pylori*. Slična je aktivnost zamijećena u serumu i kolostrumu neimuniziranih krava, ali ne i u postkolostralnom mlijeku. Baktericidan učinak je došao do izražaja većinom sustavom antitijelo-dopuna, kao što se pokazalo gubitkom aktivnosti tijekom postupka zagrijavanja ili njegovim poništenjem poslije dodavanja seruma embrionalnog teleta kao dodatnog izvora. Baktericidna su antitijela bila povezana u prvom redu s klasama IgG i IgM. Nije bilo direktne korelacije između baktericidne aktivnosti i titara antitijela.

8. Laktoperoksidaza stvara otpor anti-staphylococcalnoj aktivnosti stijenke stanice destabiliziranjem antibiotika

T. Ali-Vehmas, M. Vikerpuur i M. Sandholm - Department of Pharmacology and Toxicology, College of Veterinary Medicine, Hämeentie 57, 00580 Helsinki, Finland

Vrijednost minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) stijenke stanice koje destabiliziraju antibiotike cefalotin, oksacilin i vankomicin, kako je provjereno na

Staphylococcus aureus, obično su veće u sirutki mlijeka nego u izosenzitivnom tekućem supstratu (ISTS). Aktiviranje laktoperoksidaza-tiocianat- H_2O_2 sustava (LP) mlijeka sustavnom glukozom oksidaza - glukozom peroksidom povećalo je u MIK vrijednosti u sirutki. Pri visokim koncentracijama antibiotika aktiviranje LP sustava povećalo je preživljavanje bakterija. Zbog toga su antibiotici i aktivirani LP umanjili antagonizam kombinirane antibakterijske aktivnosti. Vjerojatno objašnjenje utjecaja LP na antibakterijske agense je da aktivni LP inaktivira stijenku stanice katabolizirajući prirodne autolitičke enzime bakterija te djeluje na bakterije tako da one postaju manje osjetljive prema tim antibakterijskim tvarima što djeluje na sintetički mehanizam zida stanice bakterije. Taj je mehanizam postao očit primjenom lizostafina kao enzima za lizu zida stanice *Staphylococcus* vrsta.

Uzorci sirutke iz četvrti vimena oboljelih od mastitisa bili su velikog kapaciteta redukcije i povećane količine slobodnih tiola. Kako se povećava kapacitet redukcije, mjereno pokusom redukcije resazurina, a umanjuje se aktivnost LP. Sa u kiselini topivim tiolima LP pokazuje paraboličan odnos najizrazitiji uz razinu (a-SH) 1mM a-SH razine.

IV: Dodavanja mlijeku za preradu

1. Stvarna i potencijalna dodavanja prirodnih antimikrobiološki aktivnih tvari mlijeka u mljekarskoj industriji

J. Stadhouders¹ i R.R. Beumer²

¹ NIZO, P.O. Box 20, 6710 BA Ede, the Netherlands

² Laboratory for Food Microbiology and Hygiene, Agricultural University, Bomenweg 2, 67P3 HD Wageningen, the Netherlands

Opseg u kojem prirodne antimikrobiološki aktivne tvari mlijeka doprinose ili mogu doprinijeti dobrom stanju i sposobnosti očuvanja kvalitete sirovog mlijeka, konzumnog mlijeka, sira i drugih srodnih proizvoda, dječjoj hrani, te stočnoj krmi predmet je rasprave. Obrađuju se dva aspekta: (a) djelovanja prirodnih antimikrobiološki aktivnih tvari koje se nalaze u sirovom mlijeku na spomenute mliječne proizvode, (b) djelovanje (izoliranih) prirodnih antimikrobiološki aktivnih tvari (poslije dodavanja/aktiviranja) u sirovo mlijeko i navedene mliječne proizvode. O drugim primjenama prirodnih antimikrobiološki aktivnih tvari također se izvještava sažeto.

Rad se ne osvrće na direktni učinak spomenutih agenasa na zdravlje ljudi i životinja. I legislativa je izvan područja ovog rada.

2. Djelovanje koncentrata bjelančevine sirutke kao zamjenice za kolostrum ili kao dodatak na imunitet, prirast, boležljivost i smrtnost teleta

J.F. Mee, K.J. O'Farrell, R. Mehra¹ i P. Reitsma²

Department of Dairy Husbandry, Teagasc, Moorepark Research Centre, Fermoy, Co. Cork, Ireland

¹ Department of Dairy Chemistry, Teagasc, National Dairy Products Research Centre, Fermoy, Co. Cork, Ireland

² Department of Animal Husbandry, Agricultural University, Zodiac, Marijkeweg 40, Wageningen, the Netherlands

Učinkovitost koncentrata bjelančevine sirutke (KBS) korištenog kao zamjenica ili dodatak kolostrumu ocijenjivana je u dva pokusa s četiri skupine po 29 teladi. U pokusu 1, telad je hranjena ili s 2 litre izmiješanog kolostruma (skupina A) ili s 500 g KBS (skupina B).

Prosječno ukupno 123,58 g imunoglobulina G (IgG) dodano je u obrok skupine A i 17,66 g skupini B ($P < 0,001$). Prosječni serum IgG, ukupne koncentracije bjelančevine i globulina te anti-*E. coli* K99 i anti-rotavirus Ig aktivnosti bile su signifikantno više u teladi iz skupine A stare 24-36 sati i tri tjedna. Prirast od rođenja do starosti 3 tjedna bio je signifikantno manji za telad skupine B. Pojava proljeva bila je znatna, ali nije bilo razlika između postupaka. Mortalitet (0-3 tjedna) je bio signifikantno viši u skupini B (27,6%) nego u skupini A (3,4%).

U pokusu 2 telad je hranjena ili s 2 l miješanog kolostruma (skupina C) ili otopinom od 1 litre miješanog kolostruma i 500 g KBS (skupina D). Ukupno prosječno 117,20 g IgG dobivala je telad skupine C, a 69,12 g telad skupine D ($P < 0,001$). Odnos apsorpcije IgG bio je signifikantno niži u teladi skupine D. Prosječni serum IgG, koncentracije ukupnih bjelančevina i globulina te anti-*E. coli* K99 i antirotavirus Ig aktivnosti bile su signifikantno više u teladi skupine C stare 24-36 sati i 3 tjedna. Omjer mortaliteta, prirast i pojava proljeva nisu se razlikovali među skupinama.

Autori su zaključili da hranjenje samo s 500 g KBS kao zamjenicom za kolostrum ili dodatak nije osiguralo odgovarajući imunitet smještenoj novorođenoj teladi.

3. Konzerviranje sirovog mlijeka sustavom laktoperoksidaze - zakonsko stanje.

L. Björck

Department of Food Science, Swedish University of Agricultural Sciences, S 750 07 Uppsala, Sweden

Učinkovitost sustava laktoperoksidaza /tiocianat/ vodikov superksid za konzerviranje sirovog mlijeka u uvjetima sobne temperature dokumentirali su brojni referati iz različitih zemalja. Usprkos očitoj prednosti i razumljivoj toksikološkoj ocjeni koju su proveli FAO/WHO stručnjaci Odbora za dodatke hrani te Komisije Codex Alimentarius "da se sustav laktoperoksidaze može preporučiti za primjenu kad se sirovo mlijeko ne može ispravno ohladiti" o tom se postupku za širu primjenu još uvijek raspravlja.

1. Reagirane goveđeg laktoferina na toplinu o odnosu na međureakcije bakterija i antibakteriološku aktivnost

M.A. Paulsson¹, U. Svensson², A.R. Kishore³ i A.S. Naidu⁴

¹ Department of Food Technology, University of Lund, S-221 00 Lund, Sweden

² SMR, Swedish Airies' Association, Research Park Ideon, S-223 70 Lund, Sweden

³ Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, S-214 21 Malmö, Sweden

⁴ Dental Research Center, School of Dentistry, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599-7455, USA

Diferencijalnom kalorimetrijom pomnog motrenja proučavane su toplinom izazvane promjene različitih oblika govedeg laktoferina. Dva prijelaza različitih termodinamičkih veličina pod stalnim pritiskom (entalpija) promatrana su u odnosu na status bjelančevine vezane na željezo. Laktoferin zasićen željezom bio je otporniji prema promjenama izazvanim toplinom od apo-laktoferina. Nativni je laktoferin pokazivao dva prijelazna vrha, a pasterezacija je djelovala samo na prijelazni vrh pri nižoj temperaturi. Željezom zasićeni laktoferin otkrivao je samo jedan prijelazni vrh otporan prema pasterezaciji. Ipak, oba su oblika bjelančevine bila potpuno denaturirana UHT postupkom zagrijavanja. Učinak pasterezacije i UHT postupka na kapacitet inter-reakcije bjelančevine s bakterijama proučen je s ¹²⁵I-označenim laktoferinom u pokusu vezanja inhibicije. Sposobnost nativnog i željezom zasićenog laktoferina da vežu sojeve *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurinum*, *Shigella flexneri*, *Aeromonas hydrophila* i *Staphylococcus aureus* nije bila oštećena pasterezacijom. Ipak, postupak zagrijavanja UHT umanjio je ovaj kapacitet interakcije. Nativni laktoferini, nezagrijavani i pasterezirani, bili su sličnih antibakterioloških svojstava i uvjetovali djelotvornu inhibiciju metabolizma s umjerenim kočenjem *Escherichia coli*. Poslije UHT zagrijavanja nativni oblik uvjetuje samo neznatno smanjenje metabolizma bakterija, ali ne uspijeva izazvati bakteriostazu. Konačno, željezom zasićeni laktoferin nije spriječio rast bakterija, a niti pasterezacija i UHT zagrijavanje nisu mogle izmijeniti to svojstvo. Ipak, čini se da UHT šteti strukturi kao i nekim biološkim svojstvima nativnog i željezom zasićenog bovinog laktoferina, a pasterezacija je moguć postupak za proizvode koji sadrže ovu bjelančevinu.

2. Određivanje kolostralnih imunoglobulina kromatografijom gel filtriranja

E.-L. Syväoja and H. Korhonen

Valio Ltd., Research and Development Centre, PO Box 390, FIN-00101 Helsinki, Finland

Za razdvajanje i određivanje količine imunoglobulina kravljeg kolostruma bila je otkrivena kromatografija gel filtriranja u proučavanjima nativnog i obrađenog kolostruma. Metoda je brza sa simultanim prethodnim razdvajanjem i karakteriziranjem kolostralnih imunoglobulina i drugih bjelančevina sirutke.

4. Titri specifičnih atitijela u imuniziranom i ne-imuniziranom kravljem kolostrumu; njihova upotreba u liječenju bolesnika s gastro-intestinalnim upalama

A. Janson¹, S. Nava¹, H. Brüssow², D. Mahalanabis³ and L. Hammarström¹

¹ Department of Clinical Immunology, Karolinska institute at Huddinge Hospital, Huddinge, Sweden

² Nestlé Research Centre, Nestec Ltd, Lausanne, Switzerland

³ International Centre for Diarrheal Research, Dhaka, Bangladesh

Kolostrum ne-imuniziranih krava je neograničen i jeftin izvor antitijela pa bi farmaceutsko korištenje tih antitijela moglo biti vrlo zanimljivo. Nekoliko kliničkih pokusa izvedeno je u namjeri da se ocijeni mogućnost upotrebe imunoglobulina ne-imuniziranih krava. U ovom su proučavanju razine specifičnih antitijela i funkcionalni kapacitet mjereni s ELISA. Utvrđeno je da je hemaglutinacija i neutraliziranje uzoraka mlijeka ne-imuniziranih krava bila 10 do 100 puta niža od uzoraka imuniziranih krava. Budući da su imunoglobulini imuniziranih krava korišteni u kliničkim pokusima od 1 do 10 g/dnevno, naši rezultati ukazuju da bi količine antitijela potrebne za liječenje ljudi, primjenom materijala neimuniziranih krava, mogli biti 100g/dnevno i prema tome neprikladni za farmaceutsku upotrebu.

3. Odnos između bakteriološke aktivnosti i vezanja laktoferina u *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurinum*

S.S. Naidu¹, U. Svensson², A.R. Kishore³ and A. S. Naidu¹

¹ Dental Research Center, School of Dentistry, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599-7455, USA

² SNR, Swedish Dairies' Association, Research Park Ideon, S-223 70 Lund, Sweden

³ Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, S-214 21 Malmö, Sweden

Utjecaj laktoferina (LF) na rast bakterija testiran je mjerenjem promjene provodljivosti u supstratima za uzgoj primjenom Malthus-AT sustava te je uspoređen s veličinom ¹²⁵I-označenog LF u 15 kliničkih izolata *Escherichia coli*. Sposobnost vezanja bila je u obratnom odnosu s promjenom prosječne brzine metabolizma bakterija ($r=0,91$), a bila je u direktnom odnosu sa stupnjem bakteriostaze ($r=0,79$). Veličina interakcije LF-bakterije nije bila u korelaciji s MIC LF, vjerojatno zbog činjenice što je LF nekih sojeva u supraoptimalnim razinama umanjio bakteriostatski učinak. Ipak, koncentracija LF u supstratima za uzgoj bila je kritična za antibakterijski učinak. Omoti stanice *Salmonella typhimurinum* 395 MS s glatkim lipopolisaharidom (LPS) i njezinih 5 izogenih grubih mutanata sadržali su svi 38-kDa bjelančevine koje mogu vezati peroksidaza-označenu LF-kom-

ponentu u Na dodecil sulfat-poliakrilamid gel elektroforezom iza koje je slijedila analiza Western mrlje. Ipak, u čitavom pokusu vezanja stanice, pokazao je srodan soj 395 MS vrlo malu interakciju sa ^{125}I -LF. S druge strane, interakcija LF postupno je bivala veća suglasno s opadanjem LPS polisaharid polovice izogenih grubih mutanata. Proučavanja mjerenja provodljivosti otkrila su da su LF-vezanja niske razine (nizak-LF-vez) soja 395 MS s mekim LPS bila relativno neosjetljiva prema LF, dok je visoko LF-vezani mutant Rd bio osjetljiviji prema LF. Ovi podaci ukazuju na korelaciju između LF-vezanja i antimikrobiološkog učinka posredstvom LF.

Navodi se da je polovina polisaharida zaštićena lipopolisaharidom iz interakcije LF i da je popratno umanjila antibakterijski učinak.

Specijalno izdanje broj 9405

VAŽNOST PATOGENIH MIKROORGANIZAMA U SIROVOM MLIJEKU
ISBN 92-9098-016-8 215 str. 1994. Samo na engleskom 2500 BEF

1. UVOD

Heeschen, W. H., Bundesanstalt für Milchforschung Postfach 6069,
D-24121 Kiel, Germany

Mlijeko je odličan supstrat za uzgoj i čuvanje nekih mikroorganizama, naročito patogenih bakterija čije razmnažanje većinom ovisi o temperaturi, mikroorganizmima s kojima se natječu te proizvodima njihovog metabolizma. Ipak neke se važne patogenene bakterije (*Mycobacterium tuberculosis*, sojevi *Brucella*) u mlijeku ne razmnažaju nesmetano, a virusi se uopće ne razmnažaju. Njihov kapacitet uvjetovanja pojava bolesti ovisi o početnoj zastupljenosti u mlijeku, o razrijeđivanju koje slijedi, postupku, razdoblju do potrošnje mlijeka i drugim činiocima. Temperature niže od 10 do 20°C ometaju razvoj većine patogenih mikroorganizama i zbog toga se mora hladiti mlijeko koje čeka na postupak zagrijavanja. U uvjetima temperatura koje pogoduju razmnažanju mikroorganizama, patogene mogu prerasti saprofiti, ali patogeni često prežive pa izazovu bolest ako ih nije uništila toplina. Mlijeko proizvedeno u lošim higijenskim uvjetima koje nije ohlađeno najčešće kontaminiraju proizvođači mliječne kiseline što je uzrokom brzog zakiseljavanja. Mliječna kiselina ne smeta razvoju patogenih bakterija, a pokazalo se da neki proizvođači kiseline *Streptococcus* vrste proizvode tvari slične antibioticima koje mogu djelimično zaštititi patogene. Ipak, na to se svojstvo ne može osloniti u proizvodnji zdravih mliječnih proizvoda. Mlijeko proizvedeno u izvrsnim uvjetima higijene može sadržati vrlo malo mikroorganizama koji proizvode kiselinu pa se u njemu izvanredno dobro razvijaju neki patogeni (*Salmonella* spp., *Staphylococci*), koji ne rastu dobro u sredini koja sadrži kiselinu, ako su temperature prikladne.

Patogeni mikroorganizmi u mlijeku potječu od same krave, ljudi koji barataju oko mlijeka ili iz okoline. Oni se mogu lučiti u mlijeko direktno kroz vime ili mogu potjecati s kože, sluzavih membrana životinje ili muzača te kontaminirati mlijeko i posude za mlijeko. Najvažniji od stranih izvora infekcije u gospodarskom dvorištu, a nekada i u odjelu za pasterizaciju, je kontaminirana voda. Kukci, glodari, nečistoća i gnoj mogu doprinijeti uvođenju patogenih mikroorganizama u mlijeko. Bolesti koje se mlijekom mogu prenijeti na čovjeka opisali su opširno Kaplan et al. 1962. (Diseases transmitted through milk in: Milk Hygiene - Hygiene in Milk Production, Processing and Distribution. World Health Organization, Geneva, Monograph Series No. 48). Tablica 1. pokazuje najbitnije mikroorganizme.

Posljednjih se godina na međunarodnoj razini postižu uspjesi u kontroli mnogih zoonoza. Iskorištenje su mnoge epidemije koje su nekada bile znatne, druge su opet gotovo nestale (antraks, tuberkuloza i bruceloza u mnogim zemljama). Osim kontrole bolesti životinja, a zbog čuvanja zdravlja ljudi, zakonom je propisano zagrijavanje mlijeka. To je toliko raspostranjeno da se bolesti izazvane mlijekom većinom još spominju u starijim knjigama. Program nadzora WHO za kontrolu infekcija hranom te intoksikacija u Europi (1990.) pokazao je da je uloga mlijeka u nastupima bolesti izazvanih hranom neznatna. Poslije zabrane prodaje sirovog mlijeka i vrhnja u Škotskoj 1983. slijedeće je godino bilo zabilježeno samo osam slučajeva bolesti izazvanih mlijekom i to manjih razmjera, a uzročnik je bila *Salmonella*. To se dogodilo na području na kome nije zabranjeno konzumiranje sirovog mlijeka. Od 1980. do 1982. pojavilo se 21 oboljenje i oboljelo ukupno 1090 osoba, a umrlo 8.

IDF se u prošlosti bavila potencijalnim opasnostima za zdravlje uvjetovanim patogenim mikroorganizmima u sirovom mlijeku. Tijekom Simpozija IDF o bakteriološkoj kvaliteti sirovog mlijeka održanog 1981. u Kielu konstatirano je da se pojava bolesti ne može pripisivati pasteriziranom mlijeku, ako

— je mlijeko propisno ohlađeno prije pasterizacije kako bi se spriječio razvoj toksina otpornih prema toplini

— uređaj za pasterizaciju funkcionira ispravno te

— nije došlo do rekontaminacije.

Zbog toga se preporučilo, da se zbog opasnosti po zdravlje konzumiranja sirovog mlijeka, svim zemljama da trebaju krenuti prema uvođenju zagrijavanja sveg mlijeka.

IDF skupina A10/A11 je 1986. procijenila je potencijalne opasnosti za zdravlje izazvane konzumiranjem sirovog mlijeka anketom čiji su rezultati jasno pokazali da konzumiranje sirovog mlijeka predstavlja potencijalnu opasnost po zdravlje i utvrdilo da IDF treba izdati preporuku o tome da se mlijeko ne smije nudati na prodaju ako nije bilo podvrgnuto postupku zagrijavanja (IDF: A-Doc 97. International Dairy Federation /1987/.)

Slijedeće je godine Skupina A10/A11 iznijela preporuku IDF o postupku grijanja mlijeka prije konzumiranja. Poslije rasprava unutar skupine te na godišnjim sastancima u Helsinkiju (1987.), Budimpešti (1988.) i Kopenhagenu (1989.)

sačinjena je slijedeće IDF preporuka (IDF: Anual Memento, Comision A. International Dairy Federation-1990.):

“Mlijeko namijenjeno prodaji kao tekuće mlijeko za konzum valja podvrgnuti odgovarajućem postupku zagrijavanja inteziteta jednakog pasteurizaciji, prije potrošnje. Kad se sirovo mlijeko ne može grijati prije direktne prodaje potrošaču, valja se pobrinuti o informaciji koja uključuje i zagrijavanje.”

Ova se informacija ne smatra prijedlogom za međunarodni propis i ne treba je podnositi FAO/WHO organizacijama.

Posljednjih je godina niz problema higijene, koji su posljedica patogenih bakterija u mlijeku i mliječnim proizvodima, pokrenuo mnoge rasprave u mljekarskoj industriji. U mnogo slučajeva nije se moglo isključiti sirovo mlijeko kao izvor kontaminiranja nekim patogenim mikroorganizmima (na primjer *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*) ova je okolnost dovela do dvije važne posljedice unutar IDF, to jest

(1) postavljanje zadataka “Higijena” IDF 1990.;

(2) izrade monografije o “Važnosti patogenih mikroorganizama u sirovom mlijeku (Skupina A10/A11).

Monografija o patogenim mikroorganizmima u sirovom mlijeku mora uključiti najvažnije mikroorganizme (bakterije, kvasce i gljive, te viruse) i kritički raspraviti o njihovim karakteristikama, postupcima izoliranja i identificiranja, mehanizmima kontaminiranja, njihovom značenju za ljude, te aspektima kontrole i priječenja njihovog razvoja. Postoji nada da bi takva monografija pomogla naporima mljekarske industrije da proizvode zdrave proizvode i da informiraju o mogućim opasnostima konzumiranja sirovog mlijeka.

Literatura:

- Heeschen, E. (1987): Sanitary and health aspects of milk. In: World Animal Science, Vol. 3, Dairy Cattle Production. Elsevier Science Publishers EV, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo.
- IDF Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk (1981): Summary reports and conclusions. International Dairy Federation, CE-Doc 4.
- IDF (1986): Questionnaire 1786/A. International Dairy Federation
- IDF (1987): A-Doc 97. International Dairy Federation.
- IDF (1990): Annual Memento. Comision A. International Dairy Federation
- Kaplan, M.M., Abdussalam, M. and Bijlenga, G. (1962): Diseases transmitted through milk. In: Milk Hygiene-Hygiene in Milk Production, Processing and Distribution. World Health Organization, Geneva, Monograph Series No. 48.
- (1990): WHO Surveillance Programme for the Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe, Fourth Report 1983/1984. Institute of Veterinary Medicine-Robert von Ostertag-Institute Berlin, ISSN 0938-1732, ISBN 3-89254-093-4.
- Tolle, A. (1984): Rohmilch-Gesundheitliche Risiken. Molkereizeitung Welt der Milch 38:961-965.

2. Uzimanje uzoraka

du Toit, J., South African National Committee of IDF
PO Box 72300 Lynwood Ridge 0040, South Africa

Svaki uzorak mlijeka namijenjen bakteriološkoj analizi mora odražavati bakteriološku kvalitetu tog mlijeka.

Uzorke moraju uzimati samo iskusne osobe, a uzorci moraju predstavljati masu mlijeka koje se analizira, uzeti sterilnim priborom, prenijeti u posude za uzorke nastojeći da ne dođe do kontaminiranja.

Ne smije se zaboraviti da je i najbolja metoda analize samo toliko dobra koliko su dobro uzeti uzorci.

1. ZBIRNO MLIJEKO

1.1. Pribor za uzimanje uzoraka

Pribor za uzimanje uzoraka zbirnog mlijeka mora biti od čelika koji ne rđa ili drugog prikladnog materijala odgovarajuće čvrstoće koja neće uvjetovati promjene uzorka o kojima bi ovisili rezultati kasnijih istraživanja.

Pribor mora biti temeljito čist i ako ne posve sterilan mora biti steriliziran jednom od slijedećih metoda:

(1) sterilizirati u autoklavu (120° C) najmanje 20 minuta

(2) izložiti 1 sat zasićenoj pari (ako će se koristiti unutar 24 sata)

(3) uroniti u vodu koja vri najmanje 1 minutu (ako se koriste odmah)

(4) uroniti u prikladnu otopinu dezinficijansa

(5) uroniti u 70 %-tni alkohol s opaljivanjem alkohola neposredno prije upotrebe

(6) izložiti prikladnom plamenu osiguravajući da sve radne površine dođu u dodir s plamenom.

1.1.1. Sprava za uzimanje uzorka

(1) Zajimača od čelika koji ne rđe odgovarajućeg kapaciteta (1)

(2) Metalna motka s nepokretnom štipaljkom za držanje sterilne bočice za uzorak

(3) Sterilne pipete odgovarajućeg kapaciteta

(4) Bočica za uzorak s čepom na vijak nepropusnim i otpornim na uvjete u autoklavu te uzicom (2)

(5) Automatizirane sprave

(6) Ugrađene sprave

1.1.2. Metode miješanja mlijeka u masi

(1) Miješalice: ručne ili mehaničke

(2) Zračni sustavi: Zrak za miješanje mora biti filtriran i bez mirisa

(3) Raspršivač za mlijeko

1.1.3. Bočice za uzorke

Bočice od polietilena ili drugog prikladnog netoksičnog materijala sterilizirane ranije, za jednokratnu upotrebu, cijevi ili vrećice odgovarajuće veličine ili staklene bočice za višekratno korištenje koje sadrže približno 50 ml.

Važno je označiti imenom proizvođača mlijeka svaku bočicu ili posudicu za uzimanje uzorka te navesti i druge potrebne podatke.

1.1.4. Posuda za uzorke

Za prijenos uzoraka mogu se koristiti različiti tipovi izoliranih posuda. Za držanje uzoraka u uvjetima temperature hlađenja u posudama može se koristiti slijedeće (pogledati također 3.1 /1-3/):

(1) Ranije smrznuti omoti čvrstih tvari stopljenim u uvjetima stalne temperature - Ako se koriste takvi omoti, valja provjeriti temperaturu uzoraka prilikom stizanja u laboratorij, to je apsolutno potrebno.

(2) Led - Smrvljen led je naročito djelotvoran agens hlađenja

(3) Jedinice za hlađenje - Djelovanje tih jedinica temelji na direktnoj ekspanziji.

1.2. Postupak uzimanja uzorka

Pokvarljivost mlijeka traži poseban postupak kako bi se spriječila direktna kontaminacija bakterijama i kasniji rast kontaminenata dospjelih u mlijeko prilikom uzimanja uzorka, prijevoza i skladištenja uzoraka prije analize.

1.2.1. Priprema za uzimanje uzorka mlijeka

(1) Prije uzimanja uzorka valja oprati i osušiti ruke i održati ih čistim tijekom postupka.

(2) Postupak ili uzimanje uzorka ručno.

(3) Sakupljanje reprezentativnih uzoraka iz zbirnog mlijeka u spremniku traži odgovarajuće miješanje. Trajanje miješanja mlijeka u spremniku dok ne postane homogeno ovisi o volumenu i obliku spremnika, količini mlijeka koje sadrži, te smještaju i snazi miješalice kao i dopuštenom trajanju izdvajanja vrhnja prije početka miješanja. Uzimlje li se uzorak iz uređaja za hlađenje mlijeka u gospodarskom dvorištu, mlijeko valja miješati bar 5 minuta neposredno prije uzimanja uzorka, ako je kapaciteta do 4000 l, a najmanje 10 minuta kad kapacitet prelazi 4000 l ili prema navodima za navedeni uređaj.

Ako se radi o kamionima, mlijeko se može miješati propuštanjem kroz cijev za prebacivanje mlijeka povezanu s crpkom za pražnjenje kroz rupu za ulaz. Mlijeko iz velikih spremnika u tvornici mora se miješati (mehanički ili primjenom filtriranog zraka) 30 do 60 minuta ovisno o specifičnostima spremnika.

(b) Uzorak uzeti znatno ispod površine i to neposredno poslije miješanja sterilnom zaimačom ili metalnom šipkom s pričvršćenom štipaljkom za držanje sterilne bočice za uzorak ili korištenjem sterilnih pipeta /1.1.1. (1-3)/. Kad se koristi sterilna zaimača ili sterilne pipete, valja poduzeti sve mjere predostrožnosti asepsa, kad se puni bočica za uzorak. Metalnom šipkom s nepokretnom štipaljkom smjesti

se sterilna bočica za uzorak u štipaljku i ukloni čep na vijak. Unutrašnjost čepa kao i vrpca bočice ne smiju se dodirnuti, a kad je uzorak uzet, čep se mora vratiti na mjesto spretno aseptički.

Ako je posude veliko s ispustom pri dnu, na mjestu ispuštanja, mogu se naći male količine mlijeka koje ne predstavljaju masu mlijeka čak niti poslije miješanja. Prema tome, uzorke valja uzimati na ispustu za pražnjenje, a da bi uzorak bio reprezentativan valja prethodno ispustiti dosta mlijeka.

Sterilne bočice za uzorke (Sl. 1.) s trakom /1.1.1./4/ posebno su prikladne za specifičnije bakteriološko istraživanje. Tim postupkom koristi se samo bočica za uzorak i isključuje potreba za drugim uređajima za uzimanje uzorka. Prema metodi čiste se bočice ostavljaju u autoklavu s otpuštenim čepovima na vijak pri 121° C (100 kPa) najmanje 20 minuta. Vrhovi se pričvrste poslije vađenja i hlađenja bočica. Duljina trake (približno 30 cm dužine i 1,5 mm promjera) se pričvrsti oko vrata bočice. Slobodan kraj trake vezan je u obliku petlje koja ne klizi i dovoljno je velika da se u nju može staviti srednji prst (Sl. 1B). Vrpca se tada uredno namota oko vrata bočice i petlja lako učvrsti na vrhu malim komadićem vrpce kako bi se spriječilo odmatanje (kako prikazuje Slika 1c).

Posuda za uzorke se smjesti na kvadrat ili drugi papir dovoljno širok da pokrije cijelu bočicu kad se četiri točke podignu od čepa na vijak (Slike 1D i E). Dva "krila" papira nastala dizanjem uglova uviju se u smjeru kretanja sata da bi osigurali uredno uvijen omot. Četiri točke papira koje vire iznad vrha čepa na vijak se obrežu škarama tako da su vrh čepa i petlja trake još vidljivi (Sl. 1F). Umotane bočice se opet stavljaju u autoklav pa suše (peć za sušenje pri 60° C) i umotaju u plastičnu vrećicu da se spriječi vlaženja papira za umatanje u bilo kojoj fazi prije uzimanje uzorka.

Za uzimanje uzorka izvadi se jedna bočica iz plastične vrećice. Ukloni se vrpca koja je osiguravala petlju trake na vrhu. Dok se u lijevoj ruci drži umotana bočica, vrpca oko bočice se posve ukloni (Sl. 2A). Čep se ukloni s bočice malim prstom desne ruke (Sl. 2B). Petlja trake se zakvači srednjim prstom iste ruke, traka odmota i potpuno izvuče i bočica za uzorak izvadi iz papirnatomg omota (Sl. 2C). U toj fazi bočica ne smije dodirnuti nikakvu površinu koja bi je mogla kontaminirati s vanjske strane. Bočica se odmah spusti u izmiješano mlijeko i napuni do oko 3/4 manjeg volumena. Puna se bočica izvadi iz mlijeka (Sl. 2d). Bočica koja se ljulja zahvati se lijevom rukom, a čep vješto i aseptički ponovno namjesti (Sl. 2E).

(3) Uzimanje proporcionalnog uzorka automatskim uređajem svodi na najmanju mjeru utjecaj neodgovarajućeg miješanja, ako se mlijeko skladišti u uređajima za hlađenje u gospodarskom dvorištu i nije propisno izmiješano. Mlijeko loše kvalitete može znatno povećati zastupljenost bakterija u slijedećem uzorku dobrog mlijeka. Zbog toga je važno poduzeti slijedeće mjere jer u drugom slučaju uređaji za automatsko uzimanje uzorka nisu prikladni za sakupljanje za bakteriološke analize (3)

(a) Razmak između dva sabiranja mlijeka ljeti ne smije biti dulji od 1/2 do 1 sat kako bi se spriječilo razmnažanje bakterija u zaostalom mlijeku.

(b) Varijacije broja bakterija dvije uzastopne isporuke mlijeka ne smiju biti veće od 100:1.

(c) Relativni utjecaj prijenosa (odnos volumena preostalog mlijeka od prethodne predaje i volumena sada preuzetog mlijeka) ne smije preći 0,2%.

(4) Neprikidno uzimanje uzorka: Instalacija od čelika koji ne rđa s udubinama u koje pristaju sterilne gumene kapice smještenim na prikladnom mjestu između spremnika za skladištenje i prvog odjela prerade, može se koristiti za sakupljanje reprezentativnog uzorka sirovog mlijeka iz silosa i drugih spremnika za zbirno mlijeko. Uzorci se sakupljaju raspoloživim, sterilnim, potkožnim štrcaljkama umetnutim kroz gumene kapice.

2. UZORCI IZ ČETVRTI VIMENA

2.1. Pripreme (4,5)

(1) Prvo mlijeko, bez prva dva pomuzena mlaza, mora se sakupljati individualno iz svake četvrti vimena.

Sterilne, bojom označene, raspoložive plastične epruvete preporučuju se za uzimanje uzoraka

(2) Vime iz kojeg će se uzimati uzorak valja čitavo temeljito oprati i na prikladan način dezinficirati, a zatim potpuno osušiti papirnatim ručnikom.

Najvažnija su područja za čišćenje i dezinfekciju vrh sise i vidljivi otvor sisnog kanala.

(3) Pristupiti kravi s njene desne strane pa čistiti sisu i otvor kanala, vrh sise i otvor sisnog kanala slijedećim redom: lijevu prednju (LP), lijevu stražnju (LS), desnu prednju (DP) i desnu stražnju (DS) četvrt. Kad se kravi pristupa s lijeve strane, primjenjuje se obratan redoslijed. Četvrti oboljele od mastitisa (klinički mastitis) moraju se uvijek čistiti zadnje.

(4) Nešto vate se ovlaži 70 %-tnim etilnim alkoholom ili denaturiranim alkoholom (Sl. 3A) i suvišna tekućina odlije (Sl. 3B). Uzeti sisu 10 mm iznad otvora između kažiprsta i palca lijeve ruke i lako pritisnuti rozetu Fürstenbera tako da se ispruži otvor kanala vanjske sise i neznatno otvori (Sl. 3C). Mlijeko ne treba istisnuti. Otvor i njegovu okolinu i prije uzimanja uzorka obrisati brzo s ovlaženom vatom etilnim ili denaturiranim alkoholom (Sl. 3D). Valja izbjegavati grub postupak u tom području. Ponoviti postupak na sve četiri sise. Valja pripaziti da se ne kontaminiraju već očišćena područja.

2.2. Uzimanje uzoraka iz pojedinih četvrti (4,5)

(1) Uzorak valja uzeti suhim, čistim rukama, koristeći označene, sterilne epruvete s brojem krave i položajem četvrti. Uzorke mlijeka valja uzimati slijedećim redom: desna prednja (DP), desna stražnja (DS), lijeva prednja (LP) i lijeva stražnja (LS).

(2) Uzeti DP sisu lijevom rukom izmumi 2-3 mlaza u posudicu za prve mlazove (Sl. 4A) Otpustiti sisu i spustiti čašicu.

(3) Uzeti raspoloživu sterilnu, plastičnu epruvetu u desnu ruku, skinuti čep malim prstom lijeve ruke (Sl. 4B). Skinut se čep smjesti vertikalno krajem koji viri na gornju površinu epruvete i tamo drži desnim palcem pritiskom na zatvoreni kraj poklopca (Sl. 4C). Za trajanja postupka prije uzimanja uzoraka otvor posude mora biti okrenut prema dolje, a paziti valja da se o otvor ne otaru kontaminirane površine.

(4) Uzeti sisu u lijevu ruku, vrhom okrenutim prema otvoru posude koji se drži oko 3 cm udaljen od sise pod uglom od 45° prema ravnom podu (Sl. 4D). Mlaz mlijeka se ubaci direktno u posudu, a najbolje je da se posuda napuni jednim mlazom (Sl. 4E). Otvor posude se ne smije držati usmjerenim na sve četiri sise.

(5) Sve četiri posude (Sl. 4F), uključujući prazne "mrtvih" četvrti, vezane su (Sl. 4G), označene brojem krave (Sl. 4H) i drže se u ledu u vertikalnom položaju. Svi se uzorci moraju držati pri 4 °C za sveg razdoblja između uzimanja uzorka i analize.

3. TRANSPORT I SKLADIŠTENJE UZORAKA

Opći je zahtjev uzimanja uzoraka da se uzorci mlijeka ohlade do ispod 5 °C i to što brže, da se drže ohlađeni i pošalju u laboratorij bez odlaganja. Poželjno je da se uzorci za bakteriološku analizu ne drže više od 24 sata prije analize. Kad je razdoblje između uzimanja uzorka i analize 36-48 sati, mora temperatura uzoraka bila između 0 i 2°C.

Općenito valja uzorke skladištiti u izoliranim kutijama za uzorke koji sadrže za trajanja prijevoza do laboratorija odgovarajuće prikladno sredstvo za hlađenje. Mogu se koristiti posude koje se same hlade bez rashlađivača.

3.1. Rashlađivači koji se mogu koristiti u izoliranim kutijama za uzorke

(1) Prethodno zamrznuti omot primjenom smjese dvije ili više tvari minimalnog tališta. Te omote valja provjeriti prije upotrebe kako bi se utvrdilo jesu li se sadržine stvarno zamrznute (nema naznake da je nešto otopljeno kad se potresaju). Ovi zamrznuti omoti će moći održavati temperaturu uzoraka mlijeka ispod 5 °C 20-24 sata u sredini temperature 25 °C, čak i kad se izolirana posuda otvara svakih pola sata i ostaje otvorena jednu minutu tijekom prvih 8 sati. Poslije 20 sati kapacitet hlađenja omota je istrošen pa temperatura naglo raste (6). Zbog navedenoga je važno da uzorci koji se hlade pomoću ovih omota prispiju do laboratorija unutar 20 sati poslije uzimanja uzorka, a i analiza mora započeti unutar tog razdoblja. Kad se uzorci hlade ovim omotima bitno je uzeti dva uzorka na prvoj točki puta, a na ostalim se točkama uzima samo jedan uzorak. Prvi uzorak djeluje kao kontrola temperature za cijelu pošiljku prilikom dolaska u laboratorij. Potrebno je također da uzorci ostanu u originalnoj posudi za uzorke i da se ne prenose u drugu posudu niti na jednoj točki tijekom prijevoza.

(2) Led - mnogo djelotvornije sredstvo za hlađenje od omota koji sadrže zamrznute materijale. Sve dok se led ne otopi temperatura uzoraka će ostati ispod 5° C. Razina leda u kutiji za uzorke će se radije držati nešto iznad razine mlijeka ako led dolazi direktno u dodir s držačem uzorka. Lück et al (6) je utvrdio da je poslije razdoblja skladištenja od 24 sata u ledu samo neznatno porastao broj bakterija. Poslije 48 sati porast je bio znatan pa zbog toga s analizom valja započeti unutar 30-36 sati poslije uzimanja uzorka.

(3) Posude koje se hlade same. Rezultati analiza uzoraka skladištenih u tim posudama slični su onima skladištenim u ledu, ali je hlađenje tih uzoraka relativno polagano. Brzina hlađenja se može popraviti dodavanjem u posudu nekoliko zamrznutih omota za rashlađivanje (6). Kada se posuda otvara redovito (svakih 1/2 sata po 1 minutu) temperatura uzorka ostaje nepromijenjena.

3.2. Primjena kemijskih konzervansa

Kad se uzorak ne može analizirati unutar 30-36 sati poslije uzimanja, mogu se koristiti kemijska sredstva za konzerviranje.

(1) Prema Heeschen et al. (7,8) lako topljiv preparat, sušen zamrzavanjem, koji sadrži 1,18 ml vodene otopine s 5% (m/v) ortoborne kiseline, 1% glicerola, 0,75% (m/v) Na-sorbata i nešto metilenskog modrila (0,5 ml 1%-tne otopine) kao indikatora, može se dodati na 10 ml mlijeka. Autori tvrde da se u uvjetima sličnim onima u kojima se uzorci predaju laboratoriju, konačni broj bakterija slagao s početnim brojem.

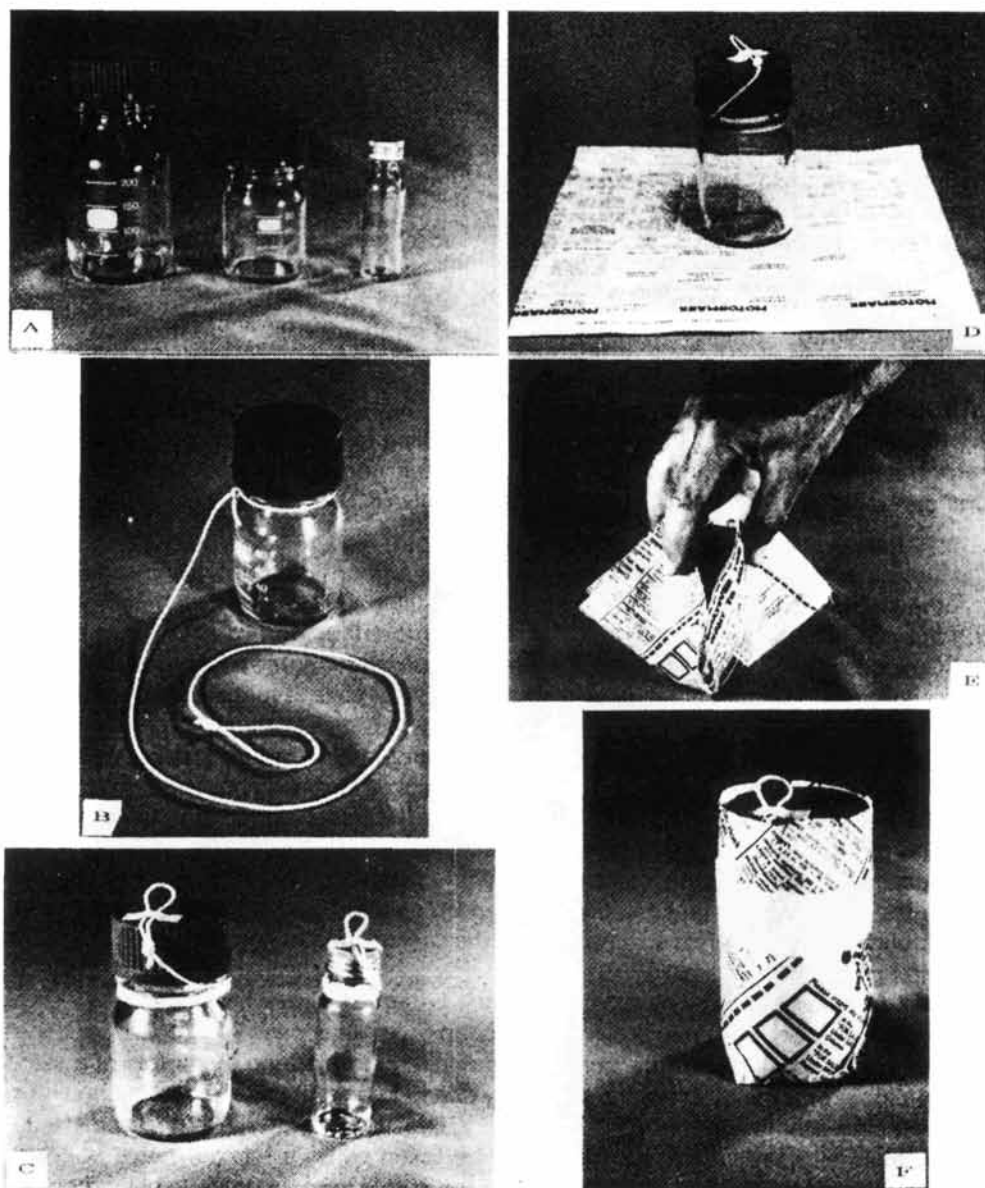
(2) Provjerena je djelotvornost i drugih smjesa, na primjer, vodenih otopina s 1% borne kiseline i 0,2% Na-azida (9) i otopine borne kiseline-glicerola (10).

(3) Lück et al. (11) su utvrdili da smjesa za konzerviranje koja se sastoji od 2 ml vodene otopine 5%-tne ortoborne kiseline i 1% glicerola, kada se dodaju u 10 ml uzorka mlijeka, može stabilizirati ukupan broj bakterija uzorka mlijeka do 48 sati pri 30° C. Iako je ova smjesa za konzerviranje mogla stabilizirati ukupan broj bakterija, uvjetovala je značajne promjene odnosa bakterija u uzorku mlijeka (12). Uzorci mlijeka konzervirani kemijskim sredstvima ne smiju se zbog tog koristiti za kritičku analizu ukupnih koliformnih *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, i *Pseudomas* spp.

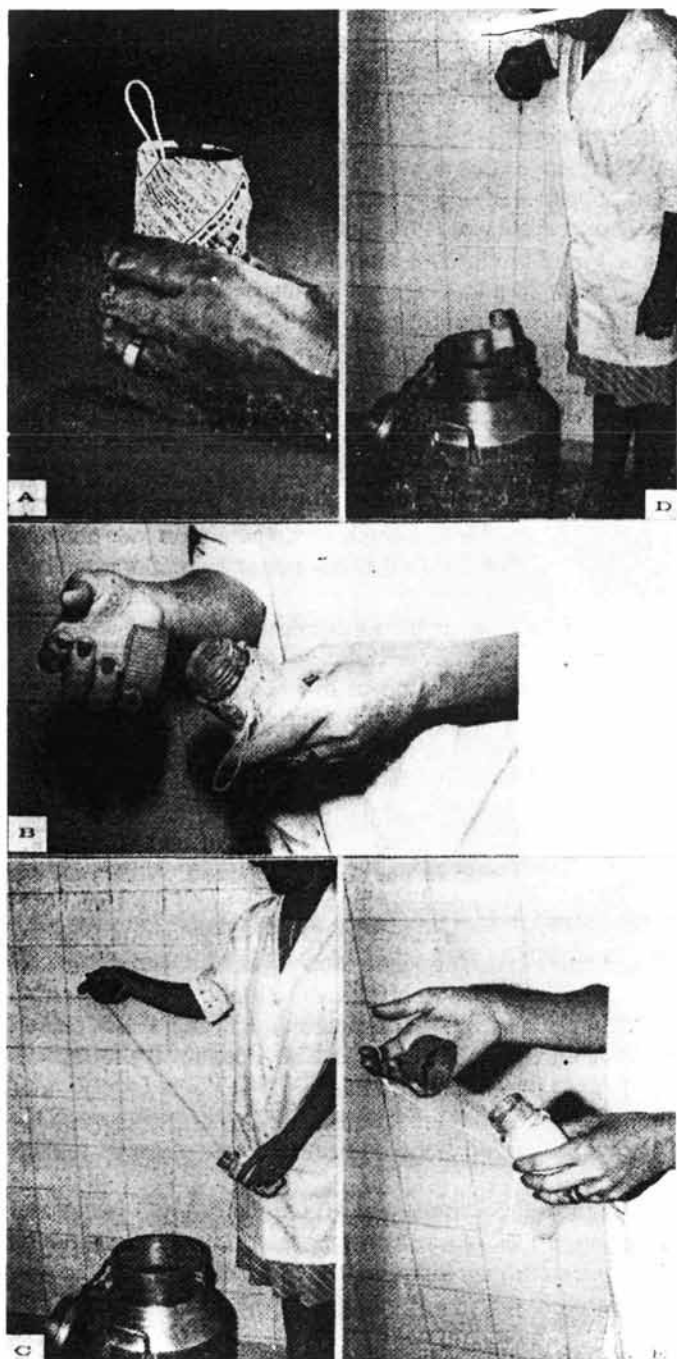
Zbog toga je zaključak da je najbolja metoda stabiliziranja bakterija u sirovom mlijeku, za razdoblje koje ne prelazi 36 sati, prijenos i skladištenje sirovog mlijeka u uvjetima temperature između 0 i 2° C.

LITERATURA

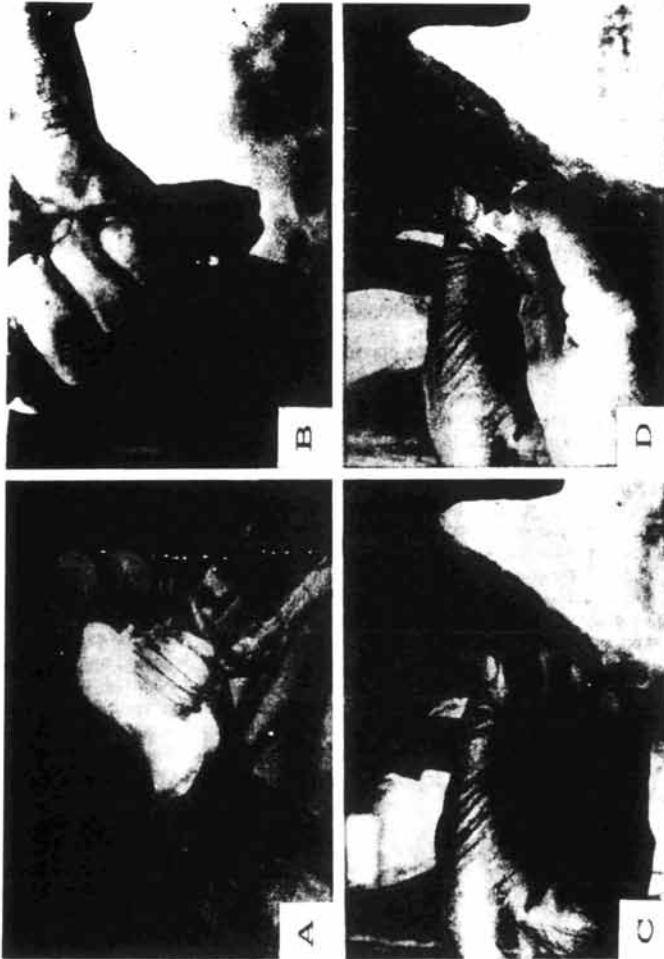
1. IDF. Milk and Milk Products, Methods of Sampling. International IDF Standard 50B (1985)
2. Jooste, P. J. and Britz, T.J. A technique and procedure for the aseptic sampling of milk for bacteriological analysis. **S. Afr. J. Dairy Technol.** 16:91-95 (1984)
3. Lück, H., Wathew, J. and Joubert, B. The suitability of five sampling devices used on road tanks for assessing the bacteriological quality of bulk milk. **S. Afr. J. Dairy Technol.** 10:3-10 (1978).
4. Giesecke, W.H. and van der Heever, L.W. A guide to the testing of stock remedies (Act 36/1947) for the treatment and control of septic mastitis cows. (Mastitis Remedies). Department of Agricultural Technical Services, Division of Agricultural Information, Private Bag X144, Pretoria, Rep. of South Africa. Technical Communication No. 123: 7-8 (1974).
5. Petrzer, I.-M., Giesecke, W.H. and Preez, J.H. Practical information regarding different aspects of udder health of dairy cattle. Part 12. The correct sampling of aseptic milk samples from individual udder quarters for laboratory diagnosis of mastitis. **Milk Producer** 6-7:12 (February 1987).
6. Lück, H. and Lategan, B. Temperature and bacteriological quality of milk samples as influenced by the time delay between sampling and testing. **S. Afr. J. Dairy Technol.** 16: 75-77 (1984).
7. Heeschen, W., Reichmuth, J., Tolle, A. and Zeidler, H. Die Konservierung von Milchproben zur bacteriologischen, zytologischen und hemmstoffbiologischen Untersuchungen. **Milchwissenschaft** 24: 729-734 (1969).
8. Heeschen, W., Reichmuth, J., Tolle, A. and Zeidler, H. Preservation of milk samples for bacteriological and cytological examination and detection of inhibitors. 18th Int. Dairy Congr. 1E: 662 (1970).
9. Leesment, H. Bacteriostat for keeping milk samples for bacteriological testing. **Svenska Mejeritidn** 63: 55-57 (1971).
10. Grove, H. H. Zur Konservierung von Milchproben für die bakteriologische Untersuchungen. **Dt. Milchwirt.** 28: 754 (1977).
11. Lück, H., Gavron, H. and Lategan, B. Preservation of milk samples for bacterial tests. **S. Afr. Dairy Technol.** 14:63-66 (1982).
12. Gavron, H. Preservation of milk samples for bacterial count test. Proc. of the Symposium on the Purchase of Milk on a Quality Basis, February 1983. ADSRI, Private Bag X2, Irene 1675 (1983).



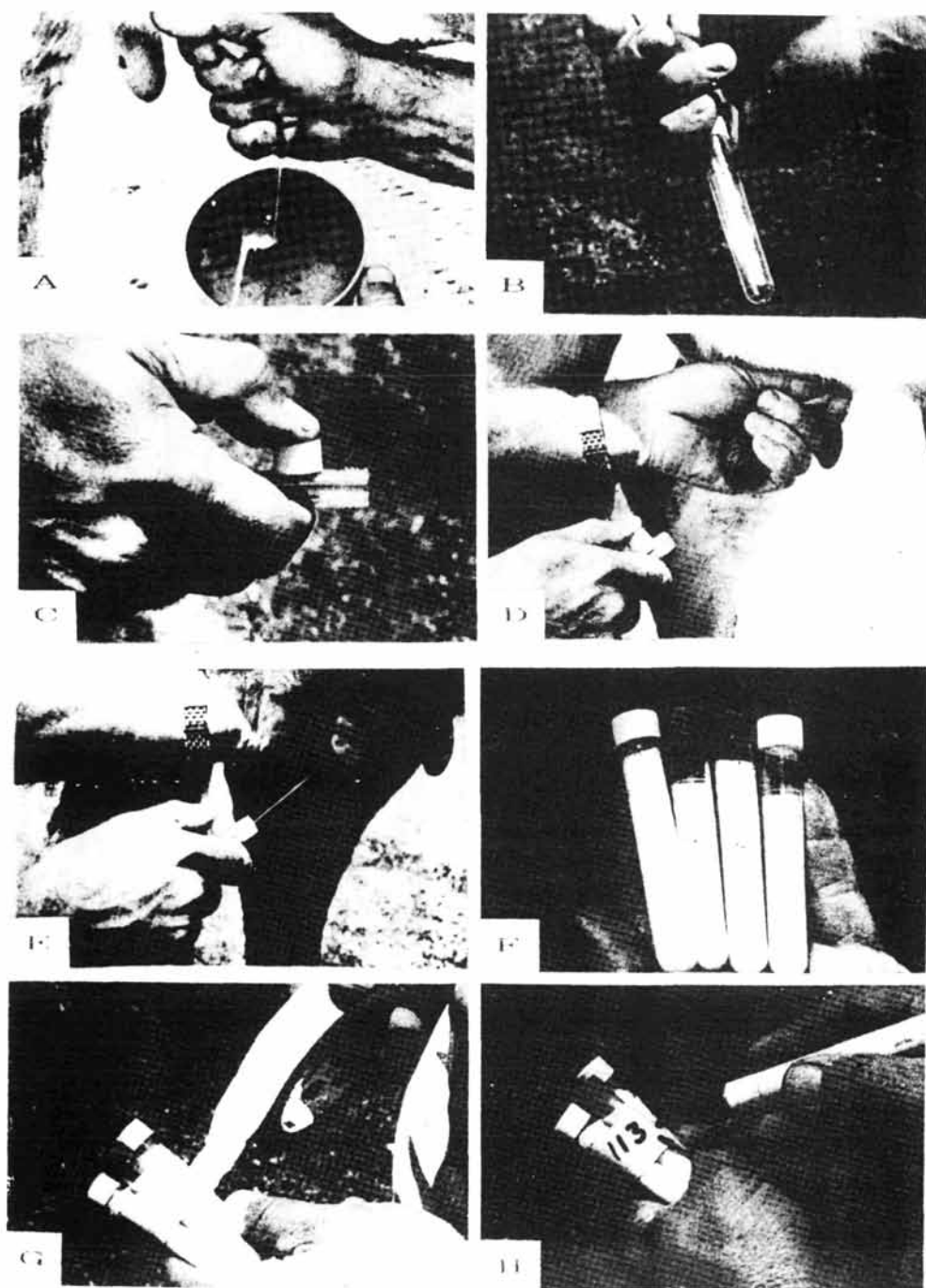
Slika 1: Pripremanje bočica za uzorke



Slika 2: Tehnika uzimanja uzorka



Slika 3: Pripremanje za uzimanje uzoraka iz četvrti



Slika 4: Uzimanje uzoraka iz pojedinih četvrti