

Utvrđivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku metodom protočne citometrije

Dubravka Samaržija, Neven Antunac, Tomislav Pogačić, Sanja Sikora

Revijalni prikaz – Review

UDK: 637.136

Sažetak

Instrumentalna metoda protočne citometrije prihvaćena je u Hrvatskoj kao rutinska metoda procjenjivanja ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku. U odnosu na referentnu metodu utvrđivanja ukupnog broja bakterija, metoda protočne citometrije značajno se razlikuje u iskazivanju rezultata. Dosadašnja iskustva u primjeni protočne citometrije u mljekarskim laboratorijima - detaljno su opisana. Istaknuti su principi rada, metodološki detalji i čimbenici koji utječu na rezultate analiza. Da bismo spriječili nesukladnosti u tumačenju rezultata ukupnog broja bakterija u mlijeku, objašnjena je transformacija rezultata procijenjenih protočnom citometrijom u rezultate utvrđene referentnom metodom. Transformacija rezultata jedne u drugu metodu, uvjetovana je hrvatskom legislativom.

Ključne riječi: ukupan broj bakterija, protočna citometrija, točnost metode, referentna metoda.

Uvod

Ukupnu kvalitetu sirovog mlijeka određuju kemijski sastav i higijenska kvaliteta. U procjeni higijenske kvalitete sirovog mlijeka dogovoreni su parametri ukupnog broja bakterija i broja somatskih stanica. U zdravom vimenu životinje mlijeko sadrži zanemariv broj bakterija što se smatra prirodnom bakterijskom populacijom (Mutukumira i sur., 1996.). Pravilnom i higijenski ispravnom mužnjom u proizvodnim uvjetima, mlijeko sadrži u 1 mL između 100 i 5000 bakterija i manje od 250000 somatskih stanica (Heeschen, 1996.; Desmasures i sur., 1997.). Suprotno, nehigijenskom mužnjom i nehigijenskim postupcima s mlijekom nakon mužnje i u slučajevima bakterijske upale vimena, ukupan broj bakterija u mlijeku može biti i veći od 10^7 /mL (Poutrel i sur., 1996.; Slaghuis, 1996.; Ariznabareta i sur., 2002.). Bakterijska upala vimena, istovremeno, uzrokuje značajno povećanje broja somatskih stanica iznad fiziološke granice, a nastaje zbog imunološkog odgovora organizma na upalni proces (Antunac i sur., 1997.). U postizanju higijenskih standarda u proizvodnji, čuvanju te pogodnostima

mlijeka za preradu i proizvodnju visokokvalitetnih mliječnih proizvoda, kontrola higijenske kvalitete mlijeka nije samo obveza, već je i nužnost.

Za prosuđivanje razine kontaminiranosti mlijeka bakterijama koriste se različite direktne i indirektno bakteriološke metode. Jedna od brzih, rutinskih metoda u prosuđivanju velikog broja uzoraka mlijeka je i automatizirana metoda protočne citometrije. Svrha ovoga rada bila je prikazati karakteristike instrumentalne metode protočne citometrije u određivanju ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku u odnosu na referentnu metodu.

Značaj određivanja higijenske kvalitete mlijeka

Svaka bakterijska kontaminacija mlijeka i broj somatskih stanica iznad fiziološke granice, mijenja kemijski sastav i fizikalna svojstva mlijeka (Kitchen, 1981.; Muir, 1996.). Ovisno o veličini nastalih promjena proporcionalno se mijenjaju i tehnološke osobine i prehrambena vrijednost mlijeka. Većina zemalja članica IDF organizacije (Heeschen, 1996.; FIL-IDF Bulletin, 348, 2000.) prosuđuje higijensku kvalitetu mlijeka svrstavajući mlijeko u različite higijenske razrede radi formiranja cijene mlijeka.

Prema Pravilniku o kakvoći svježeg sirovog mlijeka (N.N. 102/2000.), koji se u Republici Hrvatskoj primjenjuje od 1.1.2003., mlijeko svakog proizvođača također se procjenjuje na osnovu higijenske kvalitete. Za svrstavanje mlijeka svakog pojedinog proizvođača u higijenski razred, ekstra (E), prvi (I), drugi (II) ili treći (III), uzima se za broj somatskih stanica geometrijska sredina rezultata analiza u posljednja tri mjeseca, a za ukupni broj bakterija geometrijska sredina rezultata analiza u posljednja dva mjeseca. U odnosu na Hrvatsku, pojedine europske države, svrstavajući mlijeko u ekstra razred, primjenjuju strože kriterije. Švicarska, Belgija i Švedska, primjerice, uz ukupni broj bakterija i broj somatskih stanica, dodatno propisuju i prisutnost sporotvornih i koliformnih bakterija u mlijeku (Bertilsson i sur., 1996.; Regula i sur., 2002.; Rombaut i sur.; 2002.). Ne primjenjuju ni jednake kriterije za svrstavanje mlijeka u određeni higijenski razred. Postoje razlike i u propisanoj učestalosti analiza higijenske kvalitete mlijeka (tablice 1 i 2).

Tablica 1: Higijenski razredi za ukupni broj bakterija u sirovom mlijeku ($10^3/\text{mL}$)

Table 1: Hygienic criteria for total bacterial count ($10^3/\text{mL}$)

Država Country	Higijenski razredi Quality classes				Učestalost analiza/mjesec Test frequency/month
	E	I	II	III	
Hrvatska	<80	<100	<400	>400	1
Austrija	<50	50-100	>100		2
Argentina	<25	25-50	50-100	100-150	
Belgija	<100				1-2
Danska	<30	30-100	100-300	>300	4
Francuska	<50	50-100	100-300	>300	3
Njemačka	<100	100-400	>400		2
Mađarska	<100	100-300	300-800	800-1000	3
Švicarska	<90				>1

Izvor: Modificirano prema Bulletin FIL-IDF (2000.) i Pravilniku o kakvoći svježeg sirovog mlijeka (2000.)

Tablica 2: Higijenski razredi za broj somatskih stanica u sirovom mlijeku ($10^3/\text{mL}$)

Table 2: Hygienic criteria for somatic cell count ($10^3/\text{mL}$)

Država Country	Higijenski razredi Quality classes				Učestalost analiza/mjesec Test frequency/month
	E	I	II	III	
Hrvatska	<400	>400	<600	>600	2
Austrija	<250	250-400	>400		2
Argentina	<200	200-400	400-500	>500	3
Belgija	<400				4
Danska	<300	300-400	400-750		4
Francuska	<50	<200	250-300	300-400	
Njemačka	<400				1
Mađarska	<400	400-500	500-700	700-1000	3
Švicarska	<350				>1

Izvor: Modificirano prema Bulletin FIL-IDF (2000.) i Pravilniku o kakvoći svježeg sirovog mlijeka (2000.)

Metode utvrđivanja ukupnog broja bakterija u mlijeku

Utvrđivanje ukupnog broja bakterija u mlijeku utvrđuju se direktnim ili indirektnim metodama. Direktne metode su brojanje bakterija na čvrstom hranilištu i mikroskopske metode. Klasičnom metodom i modifikacijama klasične metode "plate-loop", "roll tube" i Petrifilm, utvrđuje se broj kolonija. Suprotno, mikroskopskim metodama - direktno brojanje bakterija pod mikroskopom, DEFT (Direct epifluorescence filter technique), automatskom epifluorescentnom mikroskopijom i protočnom citometrijom - utvrđuju se pojedinačni organizmi (Fernandez-Astorga i sur.1995.; Golc-Teger, 1995.; Reichmuth i sur., 1996.; Reybroeck, 1996.; Suhren i Walte, 1997.).

Metode za utvrđivanje bakterija u mlijeku često se dijele i na kvalitativne i kvantitativne. Kvalitativnim metodama dokazuje se samo prisustvo određenih bakterijskih vrsta, a direktnim kvantitativnim metodama utvrđuje se broj prisutnih bakterija. Za razliku od direktnih, indirektnim kvantitativnim metodama prosuđuje se broj bakterija na osnovi njihovih metaboličkih produkata. Prosuđivanje broja bakterija utvrđuje se najčešće mjerenjem količine ATP-a, piruvata, enzima ili toksina (Waites, 1997.; Golc-Teger, 2001.; Samkuty i sur., 2001.).

Klasična metoda

Pojam klasična metoda podrazumijeva prosuđivanje broja bakterija na standardnom čvrstom hranilištu u Petrijevim zdjelicama nakon inkubacije uzoraka na temperaturi od 30°C kroz 72 sata (FIL-IDF, 100B:1991.). Svaka porasla kolonija može se razviti ili iz pojedinačne bakterijske stanice ili iz nakupine pojedinačnih bakterijskih stanica. Radi usporedivosti rezultata, dogovorom je usvojeno da svaka kolonija predstavlja jednu bakterijsku stanicu. Tako se broj bakterija u uzorku izračunava na osnovi broja poraslih kolonija prema formuli:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d}$$

gdje je:

N = broj bakterija u mililitru ispitivanog uzorka

$\sum C$ = suma svih poraslih kolonija na svim izbrojivim Petrijevim zdjelicama

n_1 = broj Petrijevih zdjelica u prvom izbrojivom razrjeđenju

n_2 = broj Petrijevih zdjelica u drugom izbrojivom razrjeđenju

d = prvo izbrojivo razrjeđenje

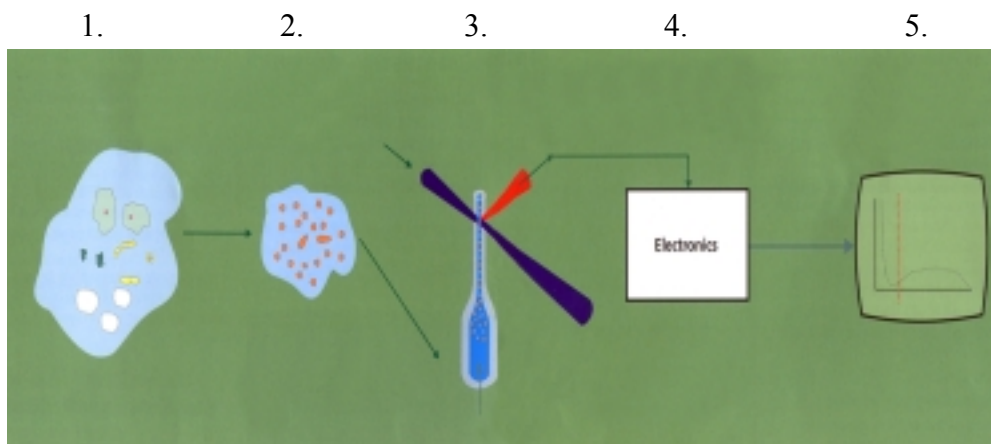
Klasična metoda, u gotovo svim državama, smatra se referentnom metodom za određivanje ukupnog broja bakterija u mlijeku i mliječnim proizvodima (Suhren i sur. 1992.; Suhren i Reichmuth, 2000.). Zbog statusa referentne metode, klasičnom metodom procjenjuje se točnost i svih ostalih metoda za utvrđivanje ukupnog broja bakterija. Glavni nedostaci klasične metode su izrazito dugo vrijeme potrebno za dobivanje rezultata i neprikladnost metode u analizi velikog broja uzoraka mlijeka.

Protočna citometrija

Metoda protočne citometrije koristi se u bakteriologiji od 1960. godine, a prvi su je prihvatili imunolozi i citolozi. Prehrambenim mikrobiolozima trebalo je mnogo više vremena za prihvaćanje i primjenu ove metode (Steen, 2000.). Prva generacija instrumenata za rutinsko utvrđivanje ukupnog broja bakterija u mlijeku primjenjuje se od 1980. a treća od 2000. godine. Princip rada instrumenata baziranih na metodi protočne citometrije zasniva se na:

- a) filtriranju uzorka mlijeka
- b) miješanju filtriranog mlijeka sa specifičnim inkubacijskim reagensom (pufer, enzim, boja) pomoću kojega se iz mlijeka izdvajaju sve komponente osim bakterijskih stanica
- c) proticanju uzorka u obliku tanke niti kroz cijev koju osvjetljava laserski izvor svjetlosti
- d) fluorescenciji deoksiribonukleinske kiseline (DNK) obojenih bakterijskih stanica
- e) detektorskom očitavanju fluorescentnih svjetlosnih impulsa
- f) na osnovu jednadžbe linearne regresije ukupnog izračunatog broja bakterija u mlijeku (slika 1).

Cijeli postupak je automatiziran pa je u jednom satu moguće analizirati 150 uzoraka (Suhren i Walte, 2000.; Bolzoni i sur., 2001.). Metoda je, dakle, prikladna za analizu velikog broja uzoraka mlijeka. Prije početka bakteriološke analize mlijeka protočnom citometrijom, instrument se kontrolira standardom poznate vrijednosti radi provjere gornjeg i donjeg praga detekcije, stabilnosti instrumenta i utjecaja stabilnosti instrumenta na rezultat sljedećeg uzorka. Prema specifikaciji proizvođača potrebna je i slijepa proba



Slika 1: Određivanje ukupnog broja bakterija protočnom citometrijom

Figure 1: Total bacterial count estimated by flow cytometry

1. Mehaničko razbijanje svih komponenata mlijeka osim bakterija
2. Bojenje pojedinačnih bakterijskih stanica
3. Brojanje bakterijskih stanica u protoku i emitiranje crvenog svjetla
4. Registriranje svjetlosnog impulsa
5. Ispis rezultata na monitoru

Izvor: Materijali Foss Electric (2002.)

koja mora pokazivati manje od 3 detektirana impulsa. Mjerno područje instrumenta iznosi od <math><10</math> impulsa do >70000 impulsa, što je izraženo u jedinici klasične metode 2900 do 32 milijuna bakterija u 1 mL mlijeka (Suhren i Walte, 2000.; Bolzoni i sur., 2001.).

Obojene bakterije u analiziranom uzorku broje se kao impulsi i predstavljaju pojedinačnu bakterijsku stanicu (eng. IBC-Individual Bacterial Count). Prema međunarodnom standardu (FIL-IDF, 100B:1991.), ukupan broj bakterija u mlijeku izražava se kao broj kolonija utvrđen klasičnom metodom (eng. CFU- Colony Forming Units). Zbog toga se, analizom linearne regresije, rezultati ukupnog broja bakterija utvrđenih metodom protočne citometrije preračunavaju u jedinicu klasične metode (Suhren i Walte, 2000.; Suhren i sur., 2001.). Izražavanje rezultata analize jedne metode u jedinicu druge metode naziva se konverzija rezultata.

Točnost metode

Parametri kojima se u kvantitativnoj bakteriologiji izražava točnost instrumentalne metode protočne citometrije su ponovljivost (r), reproducibilnost (R) i standardna devijacija koeficijenta regresije ($S_{Y,X}$) (Golc-Teger, 2001.). Ponovljivost (r) označava analizu jednog uzorka najmanje dva puta u nizu i mora iznositi od 0,05 do 0,08 \log_{10} . Reproducibilnost (R) označava analizu istog uzorka na nekoliko instrumenata u različitim laboratorijima zbog međusobne kontrole točnosti. Dopušteno odstupanje za ukupan broj bakterija je od 0,06 do 0,12 \log_{10} . Standardna devijacija koeficijenta regresije ($S_{Y,X}$) označava odstupanje svake pojedine analize od izračunate konverzijske vrijednosti i za cijelo mjerno područje mora biti manja od 0,25 \log_{10} .

Metodom protočne citometrije ukupan broj bakterija utvrđen u mlijeku nije apsolutno točan jer ni jedna metoda ne može dati "potpunu sliku" bakteriološke kvalitete (Suhren i Reichmuth, 2000.; Suhren i Walte, 2000.; Bolzoni i sur., 2001.; Suhren i sur., 2001.). Međutim, na osnovi vlastitih (nepubliciranih rezultata) i iskustva drugih autora, jednom zadovoljeni uvjeti metode osiguravaju njenu točnost i pouzdanost.

Konverzija rezultata

Za konverziju rezultata analiza ukupnog broja bakterija u mlijeku utvrđenih metodom protočne citometrije u jedinicu klasične metode, potrebno je najprije provesti oko 2000 usporednih analiza mlijeka i jednom i drugim metodom. Dobivene vrijednosti analiza koriste se za izračun koeficijenta linearne regresije ($y=bx+a$) na temelju kojega se registrirani impulsi pojedinačnih bakterijskih stanica transformiraju u broj kolonija. Impulsi predstavljaju nezavisnu (x), a broj kolonija zavisnu varijablu (y). Iz rezultata dobivenih metodom protočne citometrije (x), moguće je direktno izračunati vrijednost klasične metode (y). Dobivene rezultate analiza potrebno je prije izračunavanja logaritmirati (\log_{10}) te izostaviti 1% najviših i 1% najnižih vrijednosti za oba parametra koji bi mogli negativno utjecati na konverziju rezultata. Područje, godišnje doba, pasmina, stadij i redosljed laktacije, hlađenje, konzerviranje, uvjeti proizvodnje, ljudski faktor i drugi brojni čimbenici - utječu na bakteriološku kvalitetu (Lunder i Brenne, 1996.; Suhren i Reichmuth 2000., Suhren i sur., 2001.). Zbog toga se osnovna konverzija rezultata jedanput tjedno nadopunjuje rezultatima novih usporednih analiza.

Pogrješke koje utječu na rezultat

Usprkos standardizaciji većine bakterioloških metoda za utvrđivanje ukupnog broja bakterija u mlijeku, niz čimbenika može nepovoljno utjecati na dobivene rezultate. Prema dostupnoj literaturi, o uzrocima koji mogu utjecati na rezultat instrumentalne automatizirane metode protočne citometrije, istraživan je utjecaj somatskih stanica, stadija laktacije, konzervansa i temperature hladnog čuvanja uzoraka.

Somatske stanice u fiziološkim granicama od 50-200000/mL ne utječu na rezultat bakteriološke analize utvrđen metodom protočne citometrije. Na rezultat analiza negativno utječe jedino broj somatskih stanica >1 milijuna/mL, što je potvrđeno polimyxinom B induciranim povećanjem broja somatskih stanica u mlijeku zdravih životinja (Suhren i Walte, 2000.).

Nespecifično povećanje ukupnog broja bakterija utvrđeno je samo metodom protočne citometrije u pojedinačnim uzorcima mlijeka krava kasne laktacije. Mlijeko krava kasne laktacije sadrži specifične proteinske čestice koje se koncentriraju tijekom skladištenja uzoraka, pa ih instrument detektira kao bakterijske stanice. Povećanje ukupnog broja bakterija klasičnom metodom za iste analizirane uzorke, nije utvrđeno (Zangerl i sur., 1992.).

Standardni konzervans, koji se koristi u konzerviranju uzoraka mlijeka za bakteriološke analize, je azidiol. Korištenjem azidiola ne mijenja se kemijski sastav, ni mikrobna populacija. Broj bakterija, naprotiv, može se smanjiti ako se mlijeko analizira drugog ili trećeg dana od dana uzimanja uzorka (Zangerl i sur., 1992.). Suprotno tome, našim su istraživanjima utvrđene nesigifikantne promjene broja bakterija u uzorcima mlijeka konzerviranih azidiolom i držanih na temperaturi od 4°C i 20°C/12, 24, 48 i 72 sata (nepublicirani rezultati). Mješavina tekuće borne kiseline, koja se također koristi za konzerviranje, i temperatura od 4-6°C za hladno čuvanje nekonzerviranih uzoraka mlijeka nakon 24 i 48 sati, nije utjecala na promjenu rezultata (Suhren i Walte, 2000.).

Rasprava

U većini zemalja određivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku, provodi se u prvom redu radi svrstavanja mlijeka u određeni bakteriološki razred, na osnovi kojega se korigiraju cijene mlijeka. Bakterije u sirovom mlijeku, za potrebe vlastitog metabolizma, razgrađuju pojedine i/ili istovremeno više sastojaka mlijeka. Na taj način umanjena je nutritivna

i tehnološka vrijednost mlijeka ili je, u ekstremnim slučajevima, sirovo mlijeko u potpunosti neiskoristivo za daljnju preradu (Heeschen, 1996.). Unutrašnjost vimena može biti značajniji izvor bakterijske kontaminacije mlijeka samo u slučajevima infekcije vimena. Bolesno vime sadrži patogene bakterije koje mogu direktno ili indirektno ugroziti zdravlje čovjeka (Vujičić, 1985.; Slaghuis, 1996.). Direktno kao bakterijske stanice u mliječnim proizvodima proizvedenim iz sirovog mlijeka, a indirektno kao termostabilni organizmi, enzimi i/ili njihovi metabolički produkti (npr. toksini) koji su prisutni i u proizvodima iz pasteuriziranog mlijeka (Hahn, 1996.; Pirhonen i sur., 1996.; Sanaa i sur. 1996.; Regula i sur., 2002). Bakteriološka kontaminacija mlijeka (s vanjskog dijela vimena i sisa, opreme za mužnju, tankova za skladištenje i hlađenje, cisterni za prijevoz mlijeka i uvjeta tijekom prijevoza) može značajno povećati ukupan broj bakterija i na taj način umanjiti vrijednost "prirodno najsavršenije hrane" (Slaghuis, 1996.; Slaghuis i Jepsen, 2001.). Upravo zbog tih činjenica, ali i novo nastalih gospodarskih promjena u Hrvatskoj, od 1. siječnja 2003. godine primjenjuje se sustav za utvrđivanje cijene sirovog mlijeka i na osnovi higijenske kvalitete. Novi, u odnosu na prijašnji sustav, propisuje ukupan broj bakterija i broj somatskih stanica za osnovne parametre kvalitete. U praksi to znači, da sirovo mlijeko ne može biti svrstano u ekstra ili prvi razred samo zato jer sadrži natprosječnu količinu mliječne masti i bjelančevina. Svrstavanje mlijeka u ekstra ili prvi plativi razred ovisi ponajprije o ukupnom broju bakterija (pokazatelj higijene proizvodnje) i broju somatskih stanica (pokazatelj zdravlja vimena).

Kontrolu kvalitete sirovog mlijeka u Hrvatskoj, za oko 65000 proizvođača, provodi Središnji laboratorij u Križevcima koji je u sastavu Hrvatskog stočarskog centra. Kvalitetu rada Središnjeg laboratorija u izvođenju analiza kontrolira Referentni laboratorij Zavoda za mljekarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Oba laboratorija, radi vjerodostojnosti rezultata, obvezno provode interne i eksterne kontrole točnosti rada instrumenata. Interna kontrola svakodnevno obuhvaća: slijepu probu, kalibraciju instrumenata kontrolnim uzorcima, provjeru ponovljivosti rezultata mjerenja, stabilnost mjerenja i mjerenje donjeg i gornjeg praga detekcije. Eksterna kontrola podrazumijeva jedanput mjesečno utvrđivanje podudarnosti rezultata analiza za iste uzorke mlijeka među neovisnim laboratorijima radi međusobne kontrole i "dogovorene točnosti" (Suhren i Walte, 2000.; Bolzoni i sur., 2001.; Golc-Teger, 2001.).

Hrvatska je upravo zbog velikog broja proizvođača, za utvrđivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku, izabrala metodu protočne citometrije. Novom generacijom instrumenata može se u jednom satu analizirati 150 uzoraka mlijeka. Klasična metoda (FIL-IDF, 100B:1991.) - kao standard i službena metoda - koristi se za kontrolu točnosti, razinu odstupanja rezultata, kalibraciju instrumenta i međulaboratorijske kontrole. Razlike između klasične i metode protočne citometrije je u izražavanju rezultata. Rezultati utvrđeni protočnom citometrijom izražavaju se brojem pojedinačnih bakterijskih stanica (eng. IBC-Individual Bacterial Count). Klasičnom metodom utvrđeni rezultat predstavlja broj kolonija (eng. CFU-Colony Forming Units). Zbog toga je potrebna konverzija rezultata u jedinicu klasične metode, jer se tako dobiva podatak koji je danas općeprihvaćeni standard za određivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku (Suhren i sur., 2001.). Međutim, kada se raspravlja o bakteriološkoj kvaliteti sirovog mlijeka, važno je naglasiti da se pojam bakteriološke kvalitete ne smije promatrati u strogim okvirima određenog rezultata. Točnost rezultata određena je brojnim čimbenicima koji u većoj ili manjoj mjeri utječu na rezultat. Saznanja o karakteristikama pojedinih bakterijskih vrsta, njihovim međusobnim antagonističkim ili sinergističkim odnosima, djelovanju na mlijeko ili pojedine sastojke mlijeka, stalno se nadopunjuju, a ponekad i mijenjaju (Suhren i Reichmuth, 2000.). Tako se na osnovi uvijek novih saznanja prihvaćaju i dopunjuju svi međunarodni standardi kojima se u određenim okvirima, regulira bakteriološka kvaliteta važna za sigurnost proizvoda i za zdravlje potrošača. Na isti način, za procjenu bakteriološke kvalitete mlijeka bilo kojom od raspoloživih bakterioloških metoda, dogovorno je usvojeno iskazivanje rezultata u jedinici klasične metode i predstavlja tzv. "dogovorenu točnost".

DETERMINATION OF TOTAL BACTERIAL COUNT IN RAW MILK BY FLOW CYTOMETRY

Summary

The automatic flow cytometry as routine method for total bacterial count determination of raw ex-farm milk has recently been accepted in Croatia. This method significantly differs from the reference method (Standard Plate Count) mostly in the presentation of the results obtained. Therefore, this paper summarized experiences in the application of flow cytometry in the dairy

laboratories practice. The principle and the practice of the method, methodological details and factors influencing the results were described. In order to avoid problems regarding the interpretation of the results, which are general problems of the quantitative microbiology, this article try to explain an appropriate conversion of the results with regards to SPC/ml, as an official method for the bacteriological quality proposal by the national legislation.

Key words: total bacterial count, flow cytometry, accuracy of the method, reference method

Literatura

- ANTUNAC, N., LUKAČ-HAVRANEK, J., SAMARŽIJA, D. (1997.): Somatske stanice i njihov utjecaj na kakvoću i preradu mlijeka. *Mljekarstvo*, 47 (3), 183-193.
- ARIZNABARETA, A., GONZALO, C., SAN PRIMITIVO, F. (2002.): Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk with Special Reference to Staphylococci. *Journal of Dairy Science*, 85 (6), 1370-1375.
- BERTILLSON, J., GYLLENDWARD, M., LINGVALL, P. (1996.): Factors affecting the contamination of bulk milk with clostridia spores. *Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk*, Wolfpassing, Austria, 1996., Abstract 4.
- BOLZONI, G., MARCOLLINI, A., VARISCO, G. (2001.): Evaluation of Bactoscan FC. 2. Stability, repeatability, carry-over and linearity. *Milchwissenschaft*, 56 (6), 318-321.
- BULLETIN OF IDF (2000.): Payment Systems for Ex-Farm Milk. 348, 24-27.
- 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.
- FERNANDEZ-ASTORGA, A., JOSE HIJARRUBIA, M., LAZZARO, B., BARCINA, I. (1995.): A useful and rapid method to recover bacterial cells from milk samples for microscopic count. *Journal of Microbiological Methods*, 24, 111-115.
- FIL-IDF (1991.): Milk and Milk Products - Enumeration of microorganisms, colony count technique at 30 °C. 100B.
- FOSS ELECTRIC (2002.): Materijali
- GOLC-TEGER, S. (1995.): Primjerenost automatske epifluorescentne mikroskopije za određivanje bakteriološke kvalitete sirovog mlijeka. *Mljekarstvo*, 45 (1), 3-9.
- GOLC-TEGER, S. (2001.): Microbiological examination and proficiency testing in dairy laboratories. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 52 (1), 61-67.
- HAHN, G. (1996.): Pathogenic bacteria in raw milk - Situation and significance. *Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk*. Wolfpassing, Austria. Abstracts, 10.

- HEESCHEN, W.H. (1996.): Bacteriological quality of raw milk: Legal requirements and payment systems. Situation in the EU and IDF member countries. *Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk*. Wolfpassing, Austria. Proceedings, 1-17.
- KITCHEN, B.J. (1981.): Review of the progress of Dairy Science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*, 48 167-188.
- LUNDER, T., BRENNER, E. (1996.): Factors in the farm production affecting bacterial content in raw milk. *Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk*. Wolfpassing, Austria. Proceedings, 103-107.
- MUIR, D.D. (1996.): The shelf-life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. *Journal of the Society of Dairy Technology* 49 (1) 24-32.
- MUTUKUMIRA, A.N., FERESU, S.B., NARVHUS, J.A., ABRAHAMSEN, R.K. (1996.): Chemical and Microbiological Quality of Raw Milk Produced by Smallholders Farmers in Zimbabwe. *Journal of Food Protection*, 59 (9), 984-987.
- PIRHONEN, T., LAITALA, T., HONKANEN-BULZASKI, T. (1996.): Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in homemade cheese. *Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk*. Wolfpassing, Austria. Abstracts, 35.
- POUTREL, X., SERIEYS, F., SARRADIN, P. (1996.): An experimental protocol for evaluation of efficacy of premilking teat disinfectants in reducing contamination of milk by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk*. Wolfpassing, Austria. Abstracts, 36.
- PRAVILNIK O KAKVOĆI SVJEŽEG SIROVOG MLIJEKA (2000.): *Narodne novine*, broj 102 od 17. listopada 2000.
- REGULA, G., BADERTSCHER, R., SCHAEREN, W., DALLA TORRE, M., DANUSER, J. (2002.): The effect of animal friendly housing systems on milk quality. *Milchwissenschaft*, 57 (8), 428-431.
- REICHMUTH, J., SUHREN, G., HEESCHEN, W. (1996.): Evaluation on routine methods for assessment the bacteriological quality of ex-farm milk-the IDF approach. *Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk*. Wolfpassing, Austria. Proceedings, 119-130.
- REYBROECK, W. (1996.): Modern methods for bacteriological quality control of raw milk. *Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk*. Wolfpassing, Austria. Proceedings, 131-140.
- ROMBAUT, R., DEWETNICK, K., DE MANGELAERE, G., VAN VOOREN, L., HUYGHEBAERT, A. (2002.): Raw milk microbial quality and production scale of Belgian dairy farms. *Milchwissenschaft*, 57 (11/12), 625-628.
- SAMKUTY, J.P., GOUGH, H.R., ADKINSON, R.W., MCGREW, P. (2001.): Rapid Assessment of the Bacteriological Quality of Raw Milk Using ATP Bioluminescence. *Journal of Food Protection*, 64 (2), 208-212.

SANAA, M., MENARD, J.L., AUDUIRER, A., POUTREL, B. (1996.): Origin of Contamination of Raw Milk by *Listeria monocytogenes*. *Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk*. Wolfpassing, Austria. Abstracts, 13.

SLAGHUIS, B. (1996.): Sources and significance of contamination on different levels of raw milk production. *Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk*. Wolfpassing, Austria. Abstracts, 2.

SLAGHUIS, B., JEPSEN, L. (2001.): Hygiene management for microbiological milk quality on the farm. Report on progress. Code of Practice for the Hygienic Production of Milk. *Agenda Item 5.4*

STEEN, B.H. (2000.): Flow cytometry of bacteria: glimpses from the past with a view to the future. *Journal of Microbiological Methods*, 42, 65-74.

SUHREN, G., REICHMUTH, J., HEESCHEN, W. (1992.): Relative detection of pure cultures by various methods relating to macrocolony as reference method. *Milchwissenschaft*, 47 (4), 231-236.

SUHREN, G., WALTE, H.G. (1997.): Bactoscan 8000: Results of an interlaboratory study. *Milchwissenschaft*, 52 (2), 67-71.

SUHREN, G., REICHMUTH, J. (2000.): Interpretation of quantitative microbiological results. *Milchwissenschaft*, 55 (1), 18-22.

SUHREN, G., WALTE, H.G. (2000.): First Experience With Automatic Flow Cytometric Determination of Total Bacterial Count In Raw Milk. *Bulletin of IDF* 358, 36-47.

SUHREN, G., REICHMUTH, J., WALTE, H.-G. (2001.): Bacteriological quality of raw milk: Conversion of Bactoscan FC counts onto the scale of the official method. *Milchwissenschaft*, 56 (7), 380-384.

VUJIČIĆ, I. (1985.): Mlekarstvo, *Naučna knjiga*, Beograd.

WAITES, W. (1997.): Principles of rapid testing and a look to the future. *International Journal of Dairy Technology*, 50 (2), 57-60.

ZANGERL, P., GINZINGER, W., KAEREBY, F. (1992.): Unspecific increase in Bactoscan counts during the storage of milk samples. *Milchwissenschaft*, 47 (12), 773-776.

Adresa autora - Author's addresses:

Prof. dr. sc. Dubravka Samaržija

Prof. dr. sc. Neven Antunac

Prof. dr. sc. Sanja Sikora

Agronomski fakultet

Sveučilišta u Zagrebu

Svetošimunska 25, 10000 Zagreb

Prispjelo - Received: 11. 12. 2003.

Prihvaćeno - Accepted: 12. 02. 2004.

Dipl. inž. Tomislav Pogačić

Vučjak 67a, 47000 Karlovac