

# Kierunki i zasady pobierania próbek mleka surowego w łańcuchu mlecznym

ELŻBIETA BEDNARKO-MŁYNARCZYK, JOANNA SZTEYN,  
AGNIESZKA WISZNIEWSKA-ŁASZCZYCH, KATARZYNA LIEDTKE

Katedra Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 14, 10-718 Olsztyn

Otrzymano 20.01.2014

Zaakceptowano 28.01.2014

Bednarko-Młynarczyk E., Szteyn J., Wiszniewska-Łaszczych A., Liedtke K.  
**Directions and principles of sampling raw milk in the dairy chain**

## Summary

Examination of raw milk samples provides important information to breeders, free practice veterinarians, inspectors, and processing facilities. Milk samples are collected at different stages of the dairy chain. The paper discusses most of the directions in which raw milk samples are tested at the stages of milk collection and storage. In order to standardize the proceedings prior to laboratory analysis, the paper cites regulations and guidelines specifying the appropriate sampling of milk, as well as the transport and storage of samples. Each sample collected for testing should be accompanied by a document that identifies the sample and the batch from which it was collected. Proper pre-analytical procedures are an important factor influencing the results of laboratory tests.

**Keywords:** milk, samples, guidelines

Spełnienie określonych kryteriów i potwierdzenie jakości mleka surowego wymaga przeprowadzenia wielu badań. Dla uzyskania wiarygodnych wyników badań niezbędne jest prawidłowe pobieranie próbek. Jest to czynność wykonywana zarówno przez próbkobiorców reprezentujących różne podmioty związane z przemysłem mleczarskim, lekarzy wolnej praktyki weterynaryjnej, hodowców, jak i pracowników inspekcji. Zasady, procedury i przewodniki omawiające temat pobierania próbek mleka zostały opracowane przez różne organizacje zarówno międzynarodowe (International Organization for Standardization, Parlament Europejski i Rada, Komisja Europejska), jak i krajowe (Główny Lekarz Weterynarii, niezależne laboratoria). Różnorodność kierunków badań mleka surowego powoduje, że próbki pobierane są na różnych etapach łańcucha mlecznego i w różnych warunkach, co może być powodem błędów przedanalizacyjnych.

Pierwszym miejscem pobrania są gospodarstwa produkcyjne. Z gospodarstw hodowlanych będących pod kontrolą użytkowości bydła mlecznego, zgodnie z decyzją Komisji 2006/427/WE (3), cyklicznie pobierane są próbki mleka wymieniowego i zbiorczego. Laboratoria Polskiej Federacji Hodowców Bydła i Producentów Mleka (PFHBiPM) określają w nich zawartość składników: białka, tłuszczu, laktozy, mocznika, suchej masy oraz liczbę komórek somatycznych

(LKS). W trakcie próbnych udojów stosowane są metody: A4, A8 i AT4, które różnią się między sobą minimalną liczbą próbnych udojów wykonanych w ciągu roku oraz liczbą dojów ocenianych w ciągu doby. O wyborze metody stosowanej w gospodarstwie decyduje producent mleka.

Skład podstawowy mleka jest też przedmiotem badania w zakładach przetwórczych, które skupują mleko. Próbkbiorcy, reprezentujący zakład mleczarki, pobierają próbki mleka na terenie gospodarstwa. Zakładowe laboratoria, oprócz zawartości białka, tłuszczu, suchej masy mleka – parametrów mających wpływ na cenę surowca i wydajność gotowych wyrobów – określają także punkt zamrażania mleka, będący wskaźnikiem zafałszowania wodą. Na życzenie spółdzielców będących członkami spółdzielni mleczarskich badana jest w mleku oborowym zawartość mocznika wskazującego na prawidłowość żywienia zwierząt. Laboratoria zakładów produkujących sery oznaczają także zawartość kazeiny określającą przydatność surowca do przetwórstwa.

W przypadku, kiedy producent dowozi mleko do punktu skupu, próbki pobierane są w momencie dostarczenia surowca. Wówczas ze wszystkich dostarczonych pojemników pobierana jest reprezentatywna próbka zbiorcza. Objętość próbki powinna być wprost proporcjonalna do objętości mleka w pojemnikach.

W Polsce liczba punktów skupu każdego roku zmniejsza się. Powszechny staje się odbiór mleka bezpośrednio z gospodarstwa. W tej sytuacji pobranie reprezentatywnej próbki mleka zbiorczego oborowego przebiega automatycznie w czasie przepompowywania mleka ze zbiornika do cysterny. Większość obecnie używanych cystern transportowych posiada systemy automatyczne, które pobierają próbkę mleka surowego do pojemników znajdujących się w chłodzonych kasetkach. Przed kolejnym pobraniem, zanim zostanie pobrana kolejna próbka, układ pobierania jest przedmuchiwany powietrzem i przepłukiwany mlekiem następnego dostawcy (13).

W sytuacjach spornych, gdy wyniki badań mleka wzbudzają podejrzenie organów kontroli lub kiedy producent ma zastrzeżenia co do oceny, może być pobierana próbka oborowa (autentyczna). Jej definicja zawarta była w nieobowiązującej już Dyrektywie Rady Europy 92/46 (4). Określone były też warunki wstępne dla jej pobrania. Próbka ta, miała reprezentować mleko z jednego pełnego udoju rannego lub wieczornego, przeprowadzonego pod nadzorem i odbywającego się nie wcześniej niż jedenaste i nie później niż trzynaste godzin po poprzednim udoju.

Obowiązkowo, w każdym przypadku wprowadzenia mleka do obrotu musi ono spełniać określone kryteria jakości higienicznej. Próbki mleka zbiorczego-oborowego, pobierane są wówczas w celu zbadania ogólnej liczby drobnoustrojów (OLD) oraz liczby komórek somatycznych (LKS), przy czym, zgodnie z obowiązującymi przepisami prawnymi, mleko w kierunku OLD powinno być badane przynajmniej dwa razy w miesiącu, a LKS raz w miesiącu (16). Wyniki oznaczeń są podstawą do obliczenia wartości średnich geometrycznych, odpowiednio, z dwóch (OLD) i trzech (LKS) miesięcy oraz porównania ich z maksymalnymi dopuszczalnymi wartościami.

Przekroczenie dopuszczalnego poziomu LKS w mleku oborowym świadczy o wystąpieniu zaburzeń zdrowotnych zwierząt. Jednym z najczęstszych zaburzeń są stany zapalne wymienia. Do wstępnego wytypowania zwierząt podejrzanych o *mastitis* najczęściej mleko wymieniowe badane jest przy pomocy terenowego odczynu komórkowego (TOK). Nawet wynik wątpliwy testu informuje o LKS powyżej 500 tys/ml. Dodatni bądź wątpliwy wynik TOK jest wskazaniem do pobrania próbek mleka w celu izolacji i identyfikacji czynnika etiologicznego zapalenia. Pobieranie próbek mleka ćwiartkowego czy też wymieniowego do badań mikrobiologicznych powinno być poprzedzone umyciem wymienia ciepłą wodą z mydłem, opłukaniem i wysuszeniem czystym ręcznikiem. Strzyki, a szczególnie ich końce powinny zostać zdezynfekowane przy użyciu jednorazowej chusteczki nasączonej 70% roztworem alkoholu z zachowaniem odpowiedniej kolejności – najpierw strzyki dalsze, a później bliższe. Czynności te należy wykonać przed rozpoczęciem doju właściwego, a kolejność pobierania próbek mle-

ka z ćwiartek powinna być odwrotna niż dezynfekcja strzyków. Brak przestrzegania tej reguły może skutkować przypadkowym zanieczyszczeniem wcześniej zdezynfekowanych strzyków. Ze względu na większą wartość diagnostyczną zalecane jest, aby jedną próbkę mleka pobierać z jednej zmienionej zapalnie ćwiartki wymienia. Przygotowane przed pobieraniem pojemniki należy oznaczyć numerem krowy oraz symbolem ćwiartki, A – prawa przednia, B – prawa tylna, C – lewa przednia, D – lewa tylna, co ułatwia postępowanie. Dla właściwej izolacji i prawidłowej identyfikacji czynnika etiologicznego *mastitis* istotny jest jak najkrótszy czas pobrania próbek od momentu wystąpienia objawów lub stwierdzenia zbyt dużej LKS.

Mleko surowe objęte jest badaniem w ramach „Krajowego programu badań kontrolnych substancji niedozwolonych, pozostałości chemicznych, biologicznych i produktów leczniczych u zwierząt, w produktach pochodzenia zwierzęcego oraz w wodzie przeznaczonej do pojenia zwierząt i pasz”. Sposób pobierania próbek z wytypowanych gospodarstw został opisany w Instrukcji Głównego Lekarza Weterynarii wydanej dla ujednoczenia postępowania organów Inspekcji Weterynaryjnej (8). Instrukcja określa, między innymi, wielkość próbek mleka, która powinna mieć objętość 500 mililitrów, z wyjątkiem próbki kierowanej do badania obecności antybiotyków, 50 mililitrów.

Zakłady przetwarzające mleko pobierają próbki surowca do badań laboratoryjnych w momencie dostarczenia partii do zakładu, jeszcze przed opróżnieniem cysterny, na rampie. W zależności od wyposażenia zakładu mogą one być pobierane automatycznie, w trakcie przepompowywania lub ręcznie (13). Jednym z kierunków badań na tym etapie jest oznaczenie OLD. Jeżeli mleko zawiera ponad 300 tys. drobnoustrojów nie powinno być przetwarzane na cele spożywcze. Na tym samym etapie pobierane są również próbki do badania obecności substancji hamujących (sh). Etap ten jest krytycznym punktem kontrolnym. W przypadku stwierdzenia obecności sh podejmowane są działania korygujące. Mleko takie nie nadaje się na cele spożywcze i stanowi materiał ryzyka kategorii 2 (15). Po zidentyfikowaniu dostawcy mleka zawierającego sh jest on obciążany kosztami utylizacji, a zakład ma obowiązek zgłosić fakt wykrycia powiatowemu lekarzowi weterynarii.

Bez względu na kierunek, w jakim będą badane próbki mleka i miejsce pobrania, należy dążyć do uzyskania reprezentatywnej próbki. W mleku jako mieszaninie wieloskładnikowej istnieje tendencja do nierównomiernego rozkładu poszczególnych składników w objętości. Dzięki właściwości podstojowej lżejszy od wody tłuszcz mleczny wynoszony jest pod powierzchnię mleka. Pod kuleczkami tłuszczu lokuje się zazwyczaj część drobnoustrojów. Natomiast cięższe cząstki występujące w mleku (np. komórki somatyczne czy przetrwalniki) osadzają się na dnie

zbiornika. Ważne jest więc ujednoczenie partii mleka przed pobraniem próbek, co można osiągnąć, dokładnie je mieszając. Większość zbiorników schładzania i przechowywania mleka jest zaopatrzona w automatyczne mieszadła, ułatwia to przeprowadzenie tej czynności.

Transport do laboratorium, jeśli jest konieczny, powinien odbywać się w czasie jak najkrótszym od momentu pobrania próbek. Zapewnienie wiarygodnego wyniku, uznanego zarówno przez służby inspekcyjne, jak i przetwórców wymaga przeprowadzenia badań w laboratoriach niezależnych, posiadających akredytację i znajdujących się na liście Głównego Inspektoratu Weterynarii. Wiąże się to często z przesyłaniem próbek na duże odległości i wydłużeniem czasu transportu. W zależności od stosowanych procedur oraz kierunków badań do próbek mleka mogą być dodawane środki konserwujące. Obecnie najczęściej stosowanym konserwantem, nie zmieniającym istotnie wyników badań, jest azidiol, dodawany zarówno do próbek badanych w kierunku zawartości podstawowych składników, jak i LKS oraz wykrywania sh (1, 10). Konserwanty nie powinny być dodawane do próbek mleka poddawanych badaniu w kierunku OLD metodą odwoławczą oraz do próbek pobieranych w celu izolacji i identyfikacji czynnika etiologicznego *mastitis* klasycznymi metodami hodowlanymi. Jeżeli próbki mogą być poddane badaniu w czasie krótszym niż 2 godziny od udoju, należy wziąć pod uwagę naturalne zjawisko zahamowania wzrostu drobnoustrojów w mleku. Obecność takich składników, jak: aglutyniny, immunoglobuliny, laktoferry, system laktoperoksydaz, lizozym i rybonukleaza nie pozwala na szybki rozwój bakterii. Czas ten może ulec skróceniu w przypadku, kiedy liczba drobnoustrojów jest duża, czyli zazwyczaj wówczas, gdy występuje zapalenie wymienia na tle bakteryjnym. Najlepszym sposobem na zahamowanie lub ograniczenie wzrostu bakterii w próbce mleka transportowanego do laboratorium jest zapewnienie warunków chłodniczych. Próbki, uwzględniając temperaturowe minimum bakterii mezofilnych – dominującej grupy drobnoustrojów w mleku – powinny być przewożone w temperaturze poniżej 4°C. W wyjątkowych przypadkach w laboratoriach próbki mleka przed wykonaniem oznaczenia mogą być mrożone. Badania dowiodły, że mrożenie próbek mleka nie powoduje obniżenia w nim liczby *Staphylococcus aureus* ani gronkowców koagulazoujemnych (11, 12). Nie zostało to jednak potwierdzone w innych badaniach, w których wykazano wzrost liczby wymienionych bakterii w mleku przechowywanym w -20°C (7, 17). Autorzy tłumaczą to zjawisko pękaniem makroflagów i neutrofilii obecnych w mleku w trakcie jego zamrażania, skutkiem czego dochodzi do uwalniania komórek gronkowca złocistego. Dodatkowo mrożenie mleka powoduje rozszczepienie agregatów komórkowych wytworzonych przez *S. aureus* (5, 19). Odwrotne zjawisko, tj. zmniejsze-

nie liczby drobnoustrojów podczas przechowywania próbek mleka w -20°C, zaobserwowano w przypadku bakterii z grupy coli oraz psychrotrofowych (7). W celu zapobieżenia obniżaniu liczby bakterii w mrożonych próbkach zalecane jest dodawanie gliceryny. Dodatek w stosunku 1: 9 lub 3: 7 do mleka korzystnie wpływa również na przeżywalność mykoplazm, które coraz częściej rozpoznawane są jako czynnik etiologiczny *mastitis* (2, 6, 9, 14, 18).

W każdym przypadku dostarczenia do laboratorium próbki powinny być zaopatrzone w dokument pozwalający na identyfikację próbki i partii mleka, z którego była pobrana oraz pismo przewodnie. Zawarte w nim informacje, dotyczące rodzaju przesyłanego materiału, miejsca i daty pobrania próbki, liczby próbek przesyłanych do badań, próbkobiorcy/zleceniodawcy, kierunku badania, klienta/właściciela, płatnika (dane do faktury), adresata wyników, informacji dodatkowych (np. numer telefonu kontaktowego czy adres e-mail) ułatwiają pracę w laboratorium, ale także mogą przyspieszyć otrzymanie wstępnych wyników. Zlecenia takie muszą zostać zaopatrzone w podpis zleceniodawcy. W przypadku korzystania z usług laboratoriów zewnętrznych część z nich wymaga wypełnienia i podpisania umowy na wykonanie badań (świadczenia jednorazowego). Zakład Fizjopatologii Rozrodu i Gruczołu Mlekowego stanowiący integralną część Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach opublikował na swoich stronach internetowych wzór, który może być pomocny w przygotowaniu takiej umowy.

W przypadku, kiedy próbki mleka pobierane są przez Inspekcję Weterynaryjną w ramach krajowego programu badań kontrolnych, powinny być sporządzane dwa protokoły. Pierwszym jest protokół pobrania (pojedynczej) próbki, kolejnym – protokół kontroli pozostałości chemicznych, biologicznych i produktów, w którym znajdują się informacje charakteryzujące gospodarstwo prowadzące hodowlę bydła, wydajność mleczną zwierząt oraz ich żywienie (8).

Wyniki analiz laboratoryjnych mleka tylko wówczas będą dla zlecającego źródłem rzetelnych informacji, jeśli w trakcie pobierania, opisanie i przesyłania próbek zostaną uwzględnione wszystkie zasady dobrej praktyki towarzyszące tym czynnościom.

## Piśmiennictwo

1. Barcina Y., Zorraquino M. A., Pedauye J., Ros G., Rincon F.: Azidiol as preservative for milk samples. An. Vet. 1987, 3, 65-69.
2. Boonyayatra S., Fox L. K., Besler T. E., Sawant A., Gay J. M.: Effects of storage methods on the recovery Mycoplasma species from milk samples. Vet. Microbiol. 2010, 144, 210-213.
3. Decyzja Komisji 2006/427/WE z dn. 20 czerwca 2006 r. ustanawiająca metody oceny wartości użytkowej i metody oceny wartości genetycznej zwierząt hodowlanych czysto rasowych z gatunku bydła – Dz. U. L 169 z 22.06.2006, str. 56-59.
4. Dyrektywa Rady 92/46/EWG z dn. 16 czerwca 1992 r. ustanawiająca przepisy zdrowotne dla produkcji i wprowadzania do obrotu surowego mleka, mleka poddanego obróbce cieplnej i produktów na bazie mleka – Dz. U. L 268 z 14.09.1992 r., str. 1.
5. Godden S. M., Jansen J. T., Leslie K. E., Smart N. L., Kelton D. F.: The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus*

- aureus in milk from quarters with subclinical mastitis. *Can. Vet. J.* 2002, 43, 38-42.
6. Higuchi H., Iwano H., Kawai K., Ohta T., Obayashi T., Hirose K., Ito N., Yokota H., Tamura Y., Nagahata H.: A simplified PCR assay for fast and easy mycoplasma mastitis screening in dairy cattle. *J. Vet. Sci.* 2011, 2, 191-193.
  7. Hubáčková M., Rysánek D.: Effects of freezing milk samples on the recovery of alimentary pathogens and indicator microorganisms. *Acta Vet. Brno* 2007, 76, 301-307.
  8. Instrukcja Głównego Lekarza Weterynarii Nr GIWlab 830-9/13 z dn. 15 marca 2013 r. w sprawie zakresu i sposobu realizacji krajowego programu badań kontrolnych substancji niedozwolonych, pozostałości chemicznych, biologicznych, produktów leczniczych u zwierząt, w produktach pochodzenia zwierzęcego oraz w wodzie przeznaczonej do pojenia zwierząt i pasz.
  9. Kauf A. C. W., Rosenbusch R. F., Paape M. J., Bannerman D. D.: Innate immune response to intramammary *Mycoplasma bovis* infection. *J. Dairy Sci.* 2007, 90, 3336-3348.
  10. Llopis M. B., Marugón M. R., Althaus R. L., Pons M. P.: Effect of storage and preservation of milk samples on the response of microbial inhibitor tests. *J. Dairy Res.* 2013, 80, 475-484.
  11. Lueddecke L. O., Forster T. L., Williams K., Hillers J. K.: Effect of freezing and storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  on survival of mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 1972, 55, 417-418.
  12. Murdough P. A., Deitz K. E., Pankey J. W.: Effects of Freezing on the Viability of Nine Pathogens from Quarters with Subclinical Mastitis. *J. Dairy Sci.* 1996, 79, 334-336.
  13. PN-A-86040 Mleko surowe do skupu – Pobieranie próbek.
  14. Radaelli E., Castiglioni V., Losa M., Benedetti V., Piccinini R., Nicholas R. A., Scanziani E., Luini M.: Outbreak of bovine clinical mastitis caused by *Mycoplasma bovis* in a North Italian herd. *Res. Vet. Sci.* 2011, 2, 251-253.
  15. Rozporządzenie nr 1069/2009 Parlamentu Europejskiego i Rady z dn. 21 października 2009 r. określające przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi i uchylające Rozporządzenie (WE) 1774/2002 – Dz. U. L 300 z 14.11.2009.
  16. Rozporządzenie nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dn. 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczegółowe przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego – Dz. U. L 139 z 30.04.2004.
  17. Schukken Y. H., Smit J. A. H., Grommers F. J., Vandegeer D., Brand A.: Effect of Freezing on Bacteriologic Culturing of Mastitis Milk Samples. *J. Dairy Sci.* 1989, 72, 1900-1906.
  18. Taponen S., Salmikivi L., Simojoki H., Koskinen M. T., Pyörälä S.: Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J. Dairy Sci.* 2009, 92, 2610-2617.
  19. Villanueva M. R., Tyler J. W., Thurmond M. C.: Recovery of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* from fresh and frozen bovine milk. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1991, 198, 1398-1400.

**Adres autora:** lek. wet. Elżbieta Bednarko-Młynarczyk, ul. Oczapowskiego 14, 10-718 Olsztyn; e-mail: elabednarko@wp.pl