

Ispitivanje uzoraka mlijeka na prisutnost antibiotika

Žarinac Borko, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:365202>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Marina Žarinac Borko

ISPITIVANJE UZORAKA MLIJEKA NA PRISUTNOST ANTIBIOTIKA

Završni rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Marina Žarinac Borko

ISPITIVANJE UZORAKA MLIJEKA NA PRISUTNOST ANTIBIOTIKA

Završni rad

Rijeka, 2024.

Mentor rada: prof. dr. sc. Marina Šantić

Komentor rada: dr. sc. Ina Viduka

Završni rad obranjen je dana 16.09.2024.

na Sveučilištu u Rijeci, Medicinski fakultet,

pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Dijana Detel, predsjednica povjerenstva

2. Doc. dr. sc. Mirna Mihelčić

3. Prof. dr. sc. Marina Šantić

4. Dr. sc. Ina Viduka

Rad ima 38 stranica, 2 slike, 4 tablice, 17 literaturnih navoda.

ZAHVALA

Želim izraziti svoju iskrenu zahvalnost svima koji su na bilo koji način doprinijeli njegovom nastanku.

Prije svega, duboko zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Marini Šantić, na njejoj stručnosti i vodstvu tijekom cijelog procesa izrade ovog rada. Također, veliko hvala i mojoj komentorici, dr.sc. Ini Viduki, na njezinim korisnim savjetima, ohrabrenju i pomoći koja je značajno doprinijela kvaliteti ovog rada.

Neizmjerne sam zahvalna svojoj obitelji koja je uvijek bila uz mene, pružajući mi neizmjernu podršku i ljubav. Hvala što su uvijek vjerovali u mene, bodrili me i bili moj oslonac u svakom trenutku.

Posebnu zahvalu upućujem i svom suprugu, čija su ljubav, strpljenje i razumijevanje tijekom svih izazova s kojima sam se susretala bili moja najveća podrška.

Svima vama, od srca hvala. Bez vas, ovo sve ne bi bilo moguće.

SAŽETAK

Mlijeko je bogat izvor esencijalnih nutrijenata poput kalcija, proteina i vitamina, ključnih za rast i razvoj organizma. Antibiotici u mlijeku predstavljaju ozbiljan problem jer mogu dovesti do razvoja otpornosti bakterija na lijekove i predstavljati rizik za ljudsko zdravlje. Ostaci antibiotika u mlijeku mogu nastati uslijed nepravilne uporabe lijekova kod mliječnih krava ili nepoštivanja propisanih kareneci prije mužnje. Regulacija razina antibiotika u mlijeku u Republici Hrvatskoj uređena je kroz nekoliko zakona i pravilnika, uključujući Zakon o hrani, Zakon o veterinarstvu, Pravilnik o maksimalnim razinama ostataka pesticida, i Zakon o veterinarsko-medicinskim proizvodima. Ministarstvo poljoprivrede, HAPIH i Veterinarska inspekcija ključna su tijela koja nadziru provedbu ovih zakona. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati prisutnost antibiotika u uzorcima komercijalno dostupnih i domaćih sirovih mlijeka koristeći test TwinSensor. Korišteni uređaj, TwinSensor Plus, koristi se za brzo i precizno otkrivanje prisutnosti antibiotika u uzorcima mlijeka, čime se osigurava kvaliteta i zdravstvena ispravnost mliječnih proizvoda. Rezultati našeg ispitivanja pokazali su odsutnost antibiotika u ispitivanim uzorcima mlijeka, čime smo potvrdili njegovu zdravstvenu ispravnost i usklađenost s propisanim standardima kvalitete. Zaključno, redovito ispitivanje mlijeka na prisutnost antibiotika ključno je za očuvanje sigurnosti prehrambenog lanca i povjerenja potrošača.

Ključne riječi: *mlijeko, antibiotici, TwinSensor Plus, sigurnost*

SUMMARY

Milk is a rich source of essential nutrients such as calcium, protein, and vitamins, which are crucial for the growth and development of the organism. Antibiotics in milk are a significant concern because they can contribute to the development of antibiotic-resistant bacteria and pose health risks to consumers. Residues of antibiotics in milk can occur due to improper use of medications in dairy cows or failure to observe the required withdrawal periods before milking. The regulation of antibiotic levels in milk in the Republic of Croatia is governed by several laws and regulations, including the Food Act, the Veterinary Act, the Regulation on Maximum Residue Levels of Pesticides, and the Act on Veterinary-Medical Products. The Ministry of Agriculture, HAPIH, and the Veterinary Inspection are key bodies responsible for overseeing the implementation of these laws. We have addressed various aspects of antibiotic use in the dairy industry, including specific types of antibiotics such as tetracyclines, cephalosporins, and beta-lactam antibiotics, their mechanisms of action, and their use in treating cattle. The goal of testing milk samples for the presence of antibiotics is to ensure the milk's safety and protect consumers from potential harmful residues. The TwinSensor Plus device is used for the rapid and accurate detection of antibiotics in milk samples, ensuring the quality and safety of dairy products. Negative results for antibiotic presence in milk confirm its safety and compliance with established quality standards. In conclusion, regular testing of milk for antibiotics is crucial for maintaining the safety of the food chain and consumer trust.

Keywords: *milk, antibiotics, TwinSensor Plus, safety*

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Uloga kravljeg mlijeka u prehrani | 1 |
| 1.2. Kategorije mlijeka na tržištu..... | 1 |
| 1.3. Faze procesa stavljanja kravljeg mlijeka na tržište..... | 2 |
| 1.3.1. Toplinska obrada mlijeka..... | 3 |
| 1.3.2. Pakiranje..... | 4 |
| 1.3.3. Testiranje kvalitete mlijeka | 4 |
| 1.4. Upotreba antibiotika u stočarstvu | 4 |
| 1.4.1. Tetraciklini | 5 |
| 1.4.2. Beta-laktamski antibiotici | 6 |
| 1.5. Metode detekcije antibiotika u mlijeku | 7 |
| 1.5.1. Upotreba TwinSensor Plus uređaja u mliječnoj industriji | 8 |
| 1.6. Regulatorni standardi..... | 9 |
| 1.6.1. Zakon o hrani (NN 81/13, 14/14, 30/15, 115/18, 118/18, 42/20)..... | 10 |
| 1.6.2. Zakon o veterinarstvu (NN 82/13, 148/13, 115/18, 52/21)..... | 10 |
| 1.6.3. Pravilnik o maksimalnim razinama ostataka pesticida u ili na hrani i hrani za životinje (NN 148/08, 55/09, 25/10, 120/11, 36/13, 90/13)..... | 10 |
| 1.6.4. Pravilnik o službenim kontrolama hrane i hrane za životinje (NN 43/14, 69/14) .. | 10 |
| 1.6.5. Zakon o veterinarsko-medicinskim proizvodima (NN 84/08, 56/13)..... | 11 |
| 1.7. Regulatorna tijela..... | 11 |
| 2. CILJ RADA..... | 12 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 13 |
| 3.1 Uzorci mlijeka | 13 |
| 3.2. Uređaj TwinSensor Plus | 15 |

| | |
|------------------------|----|
| 3.3. Metoda rada | 15 |
| 4. REZULTATI..... | 19 |
| 5. RASPRAVA | 21 |
| 6. ZAKLJUČAK | 24 |
| 7. LITERATURA..... | 25 |
| 8. ŽIVOTOPIS | 27 |

1. UVOD

1.1. Uloga kravljeg mlijeka u prehrani

Kravlje mlijeko je jedan od najvažnijih prehrambenih proizvoda u ljudskoj ishrani, pružajući esencijalne nutrijente poput kalcija, proteina, i vitamina. Međutim, zbog sve češće upotrebe antibiotika u veterinarskoj medicini, posebno u liječenju mliječnih krava, sve se više pažnje posvećuje problemu ostataka antibiotika u mlijeku. Prisustvo ovih ostataka može imati značajne posljedice na javno zdravlje, uključujući rizik od alergijskih reakcija, promjena u crijevnoj mikroflori, te razvoj antimikrobne rezistencije (1,2).

1.2. Kategorije mlijeka na tržištu

Mlijeko koje se prodaje na tržištu može se podijeliti u dvije glavne kategorije: tržišno svježe mlijeko i trajno mlijeko. Razlika između tržišnog svježeg i trajnog mlijeka leži u načinu obrade, roku trajanja, uvjetima skladištenja i nekim razlikama u nutritivnoj vrijednosti i okusu. Svježe mlijeko je manje obrađeno, ima kraći rok trajanja i zahtijeva hlađenje, dok trajno mlijeko prolazi kroz intenzivniji proces obrade (engl. *Ultra High Temperature*; UHT), ima dulji rok trajanja i može se čuvati na sobnoj temperaturi prije otvaranja. Ove razlike omogućuju potrošačima da odaberu vrstu mlijeka koja najbolje odgovara njihovim potrebama i načinu života (3,4).

Tržišno svježe mlijeko, često jednostavno nazvano "svježe mlijeko", je mlijeko koje je minimalno obrađeno i ima kratak rok trajanja. Obično se pasterizira i homogenizira prije pakiranja i distribucije. Svježe mlijeko prolazi kroz proces pasterizacije, koji uključuje zagrijavanje mlijeka na temperaturu od oko 72 °C do 75 °C tijekom 15 do 20 sekundi, a zatim se brzo hladi na temperaturu ispod 4 °C. Pasterizacija uništava patogene bakterije i povećava sigurnost mlijeka, ali ne uklanja sve mikrobe, što rezultira kraćim rokom trajanja. Homogenizacija se koristi za ravnomjerno raspoređivanje masnoća unutar mlijeka, što sprječava taloženje vrhnja na površini. Ovaj proces također poboljšava teksturu i okus mlijeka. Svježe mlijeko ima relativno kratak rok trajanja, obično od 5 do 10 dana od datuma proizvodnje, pod uvjetom da se drži u hladnjaku na temperaturi od 4 °C. Mlijeko mora biti skladišteno i transportirano u hladnom lancu kako bi se održala njegova kvaliteta i spriječio razvoj bakterija. Svježe mlijeko zadržava većinu svojih prirodnih hranjivih tvari, uključujući kalcij, proteine, vitamine (poput B12) i minerale. Okus svježeg mlijeka često se smatra bogatijim i prirodnijim u usporedbi s trajnim mlijekom. Često se koristi u svakodnevnoj ishrani za piće, kao dodatak

kavi, u pripremi žitarica, kuhanju i pečenju. Njegova svježina i bogat okus čine ga popularnim izborom za mnoge potrošače.

Trajno mlijeko, također poznato kao UHT mlijeko, prolazi kroz intenzivniji proces obrade koji mu daje duži rok trajanja, čak i kada se ne drži u hladnjaku prije otvaranja. Trajno mlijeko se sterilizira primjenom UHT metode, koja uključuje zagrijavanje mlijeka na vrlo visoku temperaturu (oko 135 °C do 150 °C) tijekom nekoliko sekundi, nakon čega se mlijeko brzo hladi i pakira u sterilne posude. Ovaj proces ubija sve bakterije i spore, što rezultira sterilnim proizvodom. Trajno mlijeko se pakira u posebne sterilne posude, često u kartonske kutije s aluminijskom folijom, koje osiguravaju da mlijeko ostane sterilno i zaštićeno od vanjskih čimbenika. Trajno mlijeko ima znatno dulji rok trajanja u usporedbi sa svježim mlijekom, obično od 6 mjeseci do godinu dana, pod uvjetom da ostane neotvoreno i skladišteno na sobnoj temperaturi. Nakon otvaranja, trajno mlijeko treba držati u hladnjaku i konzumirati unutar nekoliko dana, slično kao svježe mlijeko. Zbog UHT obrade, trajno mlijeko može izgubiti dio svojih osjetljivih vitamina (poput vitamina B12) i promijeniti svoj okus, koji neki potrošači opisuju kao "kuhan" ili manje svjež u usporedbi sa svježim mlijekom. Međutim, trajno mlijeko zadržava većinu svojih osnovnih hranjivih tvari, uključujući proteine, kalcij i masti. Trajno mlijeko je idealno za kućanstva koja ne konzumiraju velike količine mlijeka svakodnevno ili za situacije gdje je skladištenje u hladnjaku ograničeno. Često se koristi u kuhanju, pečenju i kao piće, posebno u situacijama kada nije moguće osigurati stalan hladni lanac.

1.3. Faze procesa stavljanja kravljeg mlijeka na tržište

Proces stavljanja kravljeg mlijeka za ljudsku potrošnju na tržište složen je i obuhvaća nekoliko faza koje uključuju prikupljanje, obradu, testiranje, pakiranje i distribuciju mlijeka. Svaka faza mora biti pažljivo kontrolirana kako bi se osigurala sigurnost i kvaliteta mlijeka koje dolazi do potrošača. Mlijeko dolazi od krava koje se uzgajaju na mliječnim farmama. Kvaliteta mlijeka u velikoj mjeri ovisi o zdravlju krava, njihovoj prehrani i uvjetima u kojima se drže. Krave se hrane hranom bogatom nutrijentima kako bi se osigurala visoka kvaliteta mlijeka. Posebna pažnja posvećuje se uravnoteženju hranjivih tvari kako bi se optimizirala proizvodnja mlijeka. Krave se redovito pregledavaju i primaju potrebnu veterinarsku njegu. Ukoliko se krave liječe antibioticima, mlijeko tih krava ne koristi se za ljudsku potrošnju dok ne prođe propisani karencijski period. One se redovito muzu, obično dva puta dnevno, koristeći moderne

sustave za mužnju. Mužnja se obavlja pod strogim higijenskim uvjetima kako bi se spriječila kontaminacija mlijeka. Automatski sustavi za mužnju smanjuju rizik od onečišćenja i omogućuju brzo i učinkovito prikupljanje mlijeka. Mlijeko se odmah nakon mužnje hladi na temperaturu između 2 °C i 4 °C kako bi se spriječio rast bakterija. Ohlađeno mlijeko se pohranjuje u velike spremnike do transporta. Potom se ohlađeno mlijeko transportira u mljekare u specijaliziranim cisternama koje održavaju nisku temperaturu mlijeka tijekom transporta, jer on mora biti brz i siguran kako bi se očuvala kvaliteta mlijeka. Nakon dolaska u mljekaru, mlijeko se skladišti u velikim spremnicima gdje se i dalje održava na niskoj temperaturi. Prije obrade, mlijeko se testira na različite parametre kako bi se osigurala njegova kvaliteta.

1.3.1. Toplinska obrada mlijeka

Pasterizacija mlijeka je važan proces koji se koristi za uništavanje patogenih mikroorganizama i produženje roka trajanja mlijeka. Postoji nekoliko tipova pasterizacije, a svaka metoda ima svoje specifičnosti i primjene. Niska, dugotrajna pasterizacija (engl. *Low Temperature Long Time*; LTLT), provodi se na temperaturi od 63 °C (145 °F) tijekom 30 minuta. Ova metoda uključuje zagrijavanje mlijeka na nižu temperaturu tijekom dužeg vremena, što omogućava uništavanje većine patogenih mikroorganizama uz očuvanje hranljivih tvari i okusa mlijeka. Često se koristi za mlijeko koje se prodaje lokalno ili u manjim količinama.

Srednja, kratkotrajna pasterizacija (engl. *High Temperature Short Time*; HTST) je druga uobičajena metoda pasterizacije. Ova metoda podrazumijeva brzo zagrijavanje mlijeka na temperaturu od 72 °C (161 °F) tijekom 15 sekundi. HTST pasterizacija omogućava brzu destrukciju bakterija uz minimalno oštećenje hranjivih tvari, a mlijeko pasterizirano ovom metodom može se skladištiti do nekoliko tjedana. Ova metoda je najčešće korištena u industrijskoj proizvodnji mlijeka i mliječnih proizvoda.

Pasterizacija na ultra visokoj temperaturi (engl. *ultra high temperature*; UHT) uključuje zagrijavanje mlijeka na 135 °C i 150 °C (275-302 °F), tijekom samo 2 do 5 sekundi. Ova metoda uništava sve mikroorganizme i produžava rok trajanja mlijeka bez potrebe za hlađenjem. Mlijeko pasterizirano na UHT način može se skladištiti nekoliko mjeseci bez hlađenja, što je popularno za pakiranje mlijeka u tetrapak ambalaži.

Pasterizacija na niskoj temperaturi, koja se obično provodi na temperaturi od oko 60 °C (140 °F) tijekom 30 minuta. Ova metoda je slična LTLT pasterizaciji, ali se koristi za manju proizvodnju i često se primjenjuje u malim farmama ili lokalnim proizvodnim pogonima.

Pasterizacija na protoku podrazumijeva korištenje cijevi kroz koje mlijeko prolazi dok se zagrijava. Ova metoda, koja se obično provodi na temperaturama od 70 do 85 °C (158-185 °F), brzo i efikasno pasterizira mlijeko te se koristi u velikim industrijskim postrojenjima.

Sve ove metode toplinske obrade mlijeka prilagođene su potrebama tržišta i potrošača. Svi tipovi imaju zajednički cilj - osigurati sigurnost mlijeka, produžiti njegov rok trajanja i očuvati nutritivne vrijednosti. Odabir metode pasterizacije ovisi o različitim faktorima, uključujući vrstu mlijeka, željeni rok trajanja i dostupnu tehnologiju u proizvodnji (5).

1.3.2. Pakiranje

Nakon obrade, mlijeko se pakira u sterilne posude poput kartona, boca ili plastičnih vrećica. Pakiranje se obavlja u sterilnim uvjetima kako bi se spriječila ponovna kontaminacija mlijeka. Pakirano mlijeko se skladišti na hladnim mjestima dok ne bude spremno za distribuciju. Održavanje hladnog lanca je ključno tijekom cijelog procesa distribucije, uključujući transport do trgovina. Mlijeko se dostavlja u trgovine ili izravno potrošačima putem hladnih kamiona. Trgovine su odgovorne za održavanje mlijeka na odgovarajućoj temperaturi sve do trenutka prodaje.

1.3.3. Testiranje kvalitete mlijeka

Mlijeko se testira na osnovne parametre kao što su sadržaj masti, proteina, pH vrijednost, prisutnost antibiotika i drugih kemijskih tvari. Također se provode mikrobiološke analize kako bi se utvrdilo prisustvo štetnih bakterija poput *Escherichia coli*, *Salmonella* i *Listeria*. Testiranje na ostatke antibiotika provodi se kako bi se osiguralo da mlijeko ne sadrži nedopuštene razine veterinarskih lijekova. Testovi poput TwinSensor Plus i sličnih tehnologija koriste se za brzu detekciju ostataka antibiotika. U slučaju sumnje ili ako osnovna testiranja pokažu odstupanja, mlijeko može biti podvrgnuto dodatnim analizama u laboratorijima, uključujući visokoefikasnu tekućinsku kromatografiju (engl. *high performance liquid chromatography*; HPLC) i masenu spektrometriju, kako bi se dobili precizni rezultati.

1.4. Upotreba antibiotika u stočarstvu

Upotreba antibiotika u stočarstvu ima ključnu ulogu u održavanju zdravlja životinja i osiguravanju produktivnosti. Antibiotici se koriste za liječenje različitih bakterijskih infekcija, kao što su mastitis, metritis i respiratorne infekcije, koje mogu negativno utjecati na zdravlje krava i kvalitetu mlijeka. Iako su antibiotici neophodni za kontrolu bolesti i očuvanje dobrobiti

životinja, njihova nepravilna ili prekomjerna upotreba može dovesti do zaostajanja tragova tih lijekova u mlijeku. Karencijski periodi, koji definiraju vremenski interval između zadnje primjene antibiotika i trenutka kada je mlijeko ponovno sigurno za konzumaciju, od ključne su važnosti za smanjenje rizika od zaostajanja ostataka antibiotika. Međutim, neadekvatno pridržavanje ovih perioda, zajedno s nedostatkom rigoroznog nadzora i testiranja, može rezultirati prisutnošću antibiotika u mliječnim proizvodima.

Osim zdravstvenih rizika za potrošače, prisutnost ostataka antibiotika u mlijeku može imati i ekonomske posljedice. Mliječni proizvodi kontaminirani antibioticima mogu biti povučeni s tržišta, što uzrokuje financijske gubitke za proizvođače. Također, međunarodna trgovina mliječnim proizvodima može biti ugrožena zbog različitih regulatornih standarda i zahtjeva za sigurnost hrane. Znanstvena istraživanja i regulative usmjerene su na uspostavljanje sigurnosnih standarda za ostatke antibiotika u mlijeku, kao i na razvoj naprednih metoda za detekciju tih ostataka. Redovito testiranje mlijeka i mliječnih proizvoda na prisutnost antibiotika ključno je za osiguranje sigurnosti potrošača. Različite metode analize, kao što su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) i masena spektrometrija (MS), koriste se za precizno i pouzdano otkrivanje ostataka antibiotika u mlijeku (6).

1.4.1. Tetraciklini

Tetraciklini su skupina široko spektralnih antibiotika otkrivenih sredinom 20. stoljeća, s prvim tetraciklinom, klortetraciklinom, identificiranim 1948. godine iz kulture bakterije *Streptomyces aureofaciens*. Od tada, razvijeni su brojni derivati kao što su doksiciklin, oksitetraciklin i minociklin, koji su našli primjenu u medicini i veterinarskoj praksi. Djelujući na način da inhibiraju sintezu proteina u bakterijskim stanicama vežući se za 30S ribosomsku podjedinicu, tetraciklini blokiraju vezanje aminoacil-tRNA na ribosomski kompleks, što zaustavlja elongaciju peptidnog lanca tijekom translacije i time inhibira rast bakterija.

Kao antibiotici širokog spektra, tetraciklini su efikasni protiv velikog raspona bakterija, uključujući gram-pozitivne i gram-negativne, kao i neke intracelularne patogene poput *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Mycoplasma* i *Anaplasma*. Njihova široka primjena ih čini korisnima u liječenju raznih infekcija, no postoji zabrinutost zbog razvoja otpornosti bakterija na ove antibiotike.

U veterinarskoj medicini, tetraciklini su široko korišteni u liječenju bakterijskih infekcija kod goveda, posebno oksitetraciklin i doksiciklin. Primjenjuju se za liječenje respiratornih infekcija kao što su goveđa respiratorna bolest (engl. *bovine respiratory disease*; BRD), koje

uzrokuju patogeni poput *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* i *Mycoplasma bovis*. Oksitetraciklin je posebno učinkovit u smanjenju simptoma i sprječavanju širenja bolesti unutar stada. Također se koristi u liječenju mastitisa, upale mliječne žlijezde uzrokovane bakterijama poput *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, gdje se može primijeniti intramamarno ili sistemski. U liječenju metritisa, infekcije maternice koja se javlja nakon teljenja, i u kontroliranju anaplazmoze, bolesti uzrokovane protozoama koje prenose krpelji, tetraciklini su također pokazali efikasnost.

Metode primjene tetraciklina kod goveda variraju ovisno o vrsti infekcije i stanju životinje, uključujući intramuskularne i potkožne injekcije, oralnu primjenu kroz vodu za piće ili hranu, te intramamarnu primjenu za ciljano liječenje mastitisa. Svaka od ovih metoda omogućava efikasnu distribuciju lijeka kako bi se postigla optimalna terapijska koncentracija u tijelu životinje.

Uvođenje i pravilna primjena tetraciklina ključni su za održavanje zdravlja stada i osiguranje produktivnosti u mliječnoj industriji, ali zahtijevaju pažljivo doziranje i nadzor kako bi se spriječio razvoj rezistencije i osigurala sigurnost mliječnih i mesnih proizvoda. Strogo pridržavanje propisanih karencijskih perioda i redovito praćenje stanja životinja od esencijalne su važnosti za osiguranje učinkovitog i sigurnog liječenja.

1.4.2. Beta-laktamski antibiotici

Beta-laktamski antibiotici, koji uključuju peniciline, cefalosporine, karbapeneme i monobaktame, čine veliku i važnu grupu antibiotika korištenu široko u liječenju bakterijskih infekcija kod ljudi i životinja. Ovi antibiotici su poznati po svojoj beta-laktamskoj prstenastoj strukturi, ključnoj za njihovo antibakterijsko djelovanje. Penicilini, prva otkrivena skupina u ovoj kategoriji, primarno su učinkoviti protiv gram-pozitivnih bakterija, dok karbapenemi pružaju širok spektar djelovanja protiv otpornih sojeva. Beta-laktamski antibiotici djeluju inhibiranjem sinteze bakterijskog staničnog zida, čime bakterije postaju osjetljive na osmotski tlak i na kraju pucaju i umiru.

Ovi antibiotici koriste se za liječenje raznih stanja kod goveda, uključujući mastitis i digitalni dermatitis, te su ključni za očuvanje zdravlja i produktivnosti stada. Primjena beta-laktamskih antibiotika zahtijeva pažljivo doziranje i nadzor kako bi se spriječio razvoj rezistencije i osigurala sigurnost hrane, a uključuje različite metode primjene poput injekcija i oralne primjene putem hrane ili vode za piće. Strogo pridržavanje karencijskih perioda i kontinuirani nadzor zdravstvenog stanja stada su esencijalni za postizanje optimalnih rezultata liječenja.

Cefalosporini su grupa β -laktamskih antibiotika otkrivenih iz plijesni *Cephalosporium acremonium* tijekom 1940-ih godina. Srodni penicilinima, oni imaju širi spektar djelovanja i veću otpornost na bakterijske β -laktamaze, što ih čini izuzetno korisnim u liječenju raznih bakterijskih infekcija kod goveda, uključujući respiratorne infekcije, mastitis i metritis. Cefalosporini su podijeljeni u nekoliko generacija, svaka s određenim karakteristikama i spektrom djelovanja protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Ceftiofur, cefalosporin treće generacije, često se koristi u veterinarskoj medicini zbog svoje efikasnosti protiv glavnih patogena govede respiratorne bolesti (BRD), dok se cefkvinom, cefalosporin četvrte generacije, koristi za liječenje teških infekcija.

Cefalosporini djeluju inhibiranjem sinteze bakterijskog staničnog zida, vezujući se na penicilin-vezujuće proteine u bakterijskoj staničnoj membrani, što sprječava stvaranje peptidoglikana, ključne komponente staničnog zida. Ovaj mehanizam čini cefalosporine vrlo učinkovitim protiv aktivno rastućih bakterija. Načini primjene cefalosporina kod goveda variraju ovisno o potrebama i uključuju intramuskularne, intramamarne i subkutane injekcije, što osigurava brzo postizanje terapijske koncentracije lijeka.

1.5. Metode detekcije antibiotika u mlijeku

Postoje različite metode detekcije rezidua antibiotika u mlijeku, a one se mogu kategorizirati u brze skrining testove i detaljnije laboratorijske analize koje slijede kao potvrдна metoda za pozitivne rezultate. Brzi skrining testovi su jednostavni, ekonomični i mogu se provesti izravno na terenu ili unutar mliječnih pogona. Osim testa mikrobne inhibicije rasta na hranjivim podlogama, koriste se i enzimski testovi. Imunotestovi detektiraju antibiotike interakcijom između antitijela i antigena, a dijele se u izravne i neizravne metode. Prednosti enzimskih testova su veća specifičnost, jednostavnost i smanjeno vrijeme analize. U imunotestove spada ELISA test (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*).

S druge strane, laboratorijske analize omogućuju dobivanje detaljnijih informacija o prisutnosti i koncentraciji antibiotika. Kromatografske metode primjenjuju se za određivanje velikog broja ostataka veterinarskih lijekova u životinjskim proizvodima. Visokoeffikasna tekućinska kromatografija (HPLC) koristi se za separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju različitih antibiotika, pružajući visoku osjetljivost i preciznost. Osim nje, koristi se i tekućinska kromatografija ultra visoke učinkovitosti (engl. *ultra high performance liquid chromatography*; UHPLC). Masena spektrometrija (MS), često korištena u kombinaciji s HPLC-om (HPLC-MS), omogućuje precizno mjerenje mase molekula, što olakšava

identifikaciju specifičnih antibiotika. Gasna kromatografija (GC) se također koristi za analizu hlapljivih spojeva, i može se prilagoditi za detekciju nekih antibiotika uz prethodnu derivatizaciju uzorka. Ove napredne metode pružaju kvantitativne rezultate i koriste se za detaljniju analizu prisutnosti antibiotika u mlijeku zbog čega se koriste kao potvrdna metoda u pozitivnim uzorcima skrining testova

1.5.1. Upotreba TwinSensor Plus uređaja u mliječnoj industriji

TwinSensor Plus je dizajniran za široku primjenu u mliječnoj industriji, uključujući mliječne farme, mljekare i laboratorije za kontrolu kvalitete. Na mliječnim farmama, TwinSensor Plus se koristi za rutinsko testiranje mlijeka na prisutnost antibiotika prije nego što mlijeko bude pomuzeno ili transportirano u mljekaru. Ovo je posebno važno jer se antibiotici često koriste u liječenju raznih bolesti kod krava. Korištenje TwinSensor Plus uređaja pomaže osigurati da mlijeko ne sadrži ostatke lijekova koji bi mogli ući u lanac opskrbe. Mljekare koriste TwinSensor Plus za brzo testiranje mlijeka koje dolazi s različitih farmi. U slučaju da mlijeko sadrži ostatke antibiotika, mljekara može odmah reagirati i spriječiti daljnju obradu ili miješanje kontaminiranog mlijeka s drugim uzorcima. Ovo je ključno za osiguranje sigurnosti krajnjeg proizvoda, bilo da se radi o mlijeku za piće, siru, jogurtu ili drugim mliječnim proizvodima.

U laboratorijima za kontrolu kvalitete, TwinSensor Plus se koristi kao dio sveobuhvatnog programa testiranja mlijeka. Iako se često koriste sofisticiranije metode poput HPLC-a ili masene spektrometrije za kvantitativnu analizu, TwinSensor Plus pruža brzu i ekonomičnu metodu za inicijalno skrining testiranje. TwinSensor Plus uređaja u proizvodnom procesu pomaže u smanjenju rizika od povlačenja proizvoda s tržišta zbog prisutnosti antibiotika. Rano otkrivanje kontaminiranog mlijeka omogućuje poduzimanje korektivnih mjera prije nego što proizvodi stignu do potrošača, što je ključno za očuvanje ugleda tvrtke i izbjegavanje financijskih gubitaka.

Mnoge zemlje imaju stroge propise o dopuštenim razinama ostataka antibiotika u mlijeku i mliječnim proizvodima. Korištenje TwinSensor Plus uređaja pomaže proizvođačima mlijeka da se usklade s tim regulativama i osiguraju da njihovi proizvodi zadovoljavaju nacionalne i međunarodne standarde kvalitete.



Slika 1. TwinSensor Plus KIT106. Izvor: Unisensor [Internet]. Dostupno na: <https://unisensor.be/assets/326dc684-439f-43fd-aeef-a7e6165459e0/kit106-twinsensor-plus.pdf> [pristupljeno 02.09.2024.].

1.6. Regulatorni standardi

Različite zemlje imaju različite regulatorne standarde za maksimalne dopuštene razine (engl. *maximum residue limit*; MRL) antibiotika u mlijeku. Ti standardi su postavljeni kako bi se osigurala sigurnost potrošača. Primjerice, Europska unija, Sjedinjene Američke Države i druge zemlje imaju specifične regulative i protokole za testiranje mlijeka na prisutnost antibiotika. Europska unija: U EU, MRL antibiotika u mlijeku su definirane prema Uredbi (EZ) br. 37/2010. Svi mliječni proizvodi moraju biti testirani i zadovoljiti ove standarde prije nego što se plasiraju na tržište (5). Sjedinjene Američke Države: U SAD-u, Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*; FDA) postavlja standarde za MRL antibiotika u mlijeku. Nacionalni program za ostatke mliječnih proizvoda osigurava provođenje tih standarda kroz redovite inspekcije i testiranja.

Cijeli proces, od proizvodnje do stavljanja mlijeka na tržište, strogo je reguliran zakonima i pravilnicima, što u Hrvatskoj provode Ministarstvo poljoprivrede, Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu (HAPIH) i veterinarska inspekcija. Zakon o hrani, Zakon o veterinarstvu i Pravilnik o maksimalnim razinama ostataka pesticida u hrani ključni su propisi koji osiguravaju kvalitetu i sigurnost mlijeka. S obzirom da je Hrvatska članica Europske unije, svi zakoni i regulative usklađeni su s EU standardima. Cilj ovih zakona je osigurati sigurnost hrane, zaštitu zdravlja potrošača i usklađenost sa standardima kvalitete.

1.6.1. Zakon o hrani (NN 81/13, 14/14, 30/15, 115/18, 118/18, 42/20)

Zakon o hrani je temeljni zakon koji regulira opće uvjete sigurnosti hrane u Republici Hrvatskoj. Njime su definirani opći principi i zahtjevi za proizvodnju, preradu, distribuciju i stavljanje hrane na tržište. Zakon također obuhvaća sigurnost hrane za životinje, sustav službenih kontrola i ovlasti nadležnih tijela.

Ovaj zakon postavlja osnovne uvjete za sigurnost mlijeka i mliječnih proizvoda, uključujući kontrolu prisutnosti antibiotika u mlijeku. Mlijeko koje sadrži ostatke antibiotika iznad dopuštenih razina ne smije se staviti na tržište (7).

1.6.2. Zakon o veterinarstvu (NN 82/13, 148/13, 115/18, 52/21)

Zakon o veterinarstvu regulira uvjete i način provođenja veterinarskih mjera, uključujući upotrebu veterinarskih lijekova kao što su antibiotici. Zakon također uređuje nadzor nad proizvodnjom, prometom i primjenom veterinarskih lijekova kako bi se spriječilo zaostajanje tih lijekova u hrani životinjskog podrijetla.

Zakon propisuje da se mlijeko od krava koje su liječene antibioticima ne smije koristiti za ljudsku potrošnju dok ne istekne propisani karencijski period. Također se provode redovite inspekcije kako bi se osigurala usklađenost s ovim pravilima (8).

1.6.3. Pravilnik o maksimalnim razinama ostataka pesticida u ili na hrani i hrani za životinje (NN 148/08, 55/09, 25/10, 120/11, 36/13, 90/13)

Iako se prvenstveno odnosi na pesticide, ovaj pravilnik također sadrži odredbe o maksimalnim razinama ostataka veterinarskih lijekova, uključujući antibiotike, u hrani za životinje i hrani za ljudsku potrošnju.

Pravilnik definira maksimalne dopuštene razine (MRL) ostataka antibiotika u mlijeku koje ne smiju biti prekoračene. Te razine su usklađene s europskim standardima i redovito se kontroliraju kroz sustav službenih inspekcija (9).

1.6.4. Pravilnik o službenim kontrolama hrane i hrane za životinje (NN 43/14, 69/14)

Ovaj pravilnik uređuje način provođenja službenih kontrola hrane i hrane za životinje, uključujući kontrolu ostataka antibiotika u mlijeku. Pravilnikom su definirane metode

uzorkovanja, analize i postupanja u slučaju otkrivanja nepravilnosti. Pravilnik osigurava da se mlijeko redovito testira na prisutnost antibiotika, a svi uzorci koji ne zadovoljavaju propise podliježu dodatnoj kontroli ili povlačenju iz prodaje (10).

1.6.5. Zakon o veterinarsko-medicinskim proizvodima (NN 84/08, 56/13)

Ovaj zakon regulira proizvodnju, promet i primjenu veterinarsko-medicinskih proizvoda, uključujući antibiotike, u svrhu zaštite zdravlja životinja i sigurnosti hrane. Također definira uvjete pod kojima se veterinarski lijekovi mogu koristiti u liječenju životinja.

Zakon propisuje obvezu pridržavanja karenzijskih perioda nakon primjene antibiotika kod mliječnih krava kako bi se osiguralo da mlijeko ne sadrži štetne razine lijekova prije nego što bude plasirano na tržište (11).

1.7. Regulatorna tijela

Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske glavno je tijelo odgovorno za provođenje politika i regulacija u poljoprivredi, uključujući sigurnost hrane i veterinarske mjere. Ministarstvo također nadzire provedbu zakona i propisa vezanih uz mlijeko i mliječne proizvode (12).

Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu (HAPIH) provodi službene kontrole i analize hrane, uključujući testiranje mlijeka na prisutnost ostataka antibiotika. HAPIH također izdaje izvješća i smjernice za proizvođače hrane (13).

Veterinarska inspekcija unutar Ministarstva poljoprivrede odgovorna je za provedbu veterinarskog nadzora, uključujući kontrolu primjene antibiotika kod životinja i nadzor nad proizvodnjom mlijeka.

Regulacija razina antibiotika u mlijeku za ljudsku uporabu u Republici Hrvatskoj osigurana je kroz niz zakona i pravilnika koji su usklađeni s europskim standardima. Ova regulacija ima za cilj zaštitu zdravlja potrošača i osiguranje kvalitete mliječnih proizvoda. Ministarstvo poljoprivrede, HAPIH i Veterinarska inspekcija ključna su tijela koja nadziru provedbu ovih zakona i osiguravaju usklađenost s propisima (14).

2. CILJ RADA

Cilj rada bio je ispitati prisutnost antibiotika u uzorcima mlijeka korištenjem uređaja TwinSensor. Ispitivanje je usmjereno na identifikaciju i kvantifikaciju ostataka antibiotika, s posebnim naglaskom na metode detekcije i njihovu efikasnost u osiguravanju sigurnosti prehrambenih proizvoda. Rad također analizira relevantne propise i standarde vezane za prisutnost antibiotika u mlijeku te razmatra rezultate ispitivanja u kontekstu osiguravanja kvalitete i zdravstvene ispravnosti mliječnih proizvoda.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Uzorci mlijeka

U laboratorijskim eksperimentima korišteno je ukupno devet uzoraka kravljeg mlijeka. Četiri komercijalno pakirana mlijeka su nasumično odabrana iz velikih trgovina u Rijeci, od dva različita proizvođača. Uzorak iz mini mljekare u Rijeci, kao i četiri uzorka domaćeg svježeg sirovog mlijeka, prikupljeni su iz okolice Rijeke (grad Kastav i općina Klana) te okolice Siska (grad Sisak). Domaći uzorci su dobiveni s manjih farmi. Prvi uzorak predstavlja trajno sterilizirano mlijeko s 2,8% m.m. masti, drugi je sterilizirano homogenizirano mlijeko bez laktoze, također s 2,8% m.m., treće je sterilizirano homogenizirano trajno mlijeko sa 2,2% m.m. kao i kod prethodnih uzoraka, a četvrti je svježe pasterizirano mlijeko s 3.2% m.m. Peto svježe pasterizirano nehomogenizirano mlijeko s 3.2% m.m. nabavljeno je iz mini mljekare. Uzorci domaćih mlijeka uzeti su u sterilne boce na dan ispitivanja iz mjesta Studena i Kraljevac kod Rijeke, dok su uzorci iz Topolovca i Budaševa kod Siska uzeti tri dana prije laboratorijskih analiza, adekvatno transportirani do Rijeke i skladišteni u hladnjaku do dana analize radi očuvanja mikrobiološke kvalitete. Uzorci su pohranjeni u hladnjaku na 4°C u originalnoj ambalaži. Neposredno prije analize, uzorci su numerirani i stavljeni u epruvete od 50 mL s poklopcem, gdje su homogenizirani deset sekundi pomoću stolnog homogenizatora. Zbog zaštite povjerljivosti podataka nisu navedeni proizvođači komercijalnih industrijskih mlijeka. Podjela analiziranih uzoraka mlijeka prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Podjela uzoraka kravljeg mlijeka

| KOMERCIJALNO MLIJEKO | | | | | |
|------------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|------------------|------------------|
| | VRSTA MLIJEKA | POSTUPAK OBRADJE | UDIO MLIJEČNE MASTI (m.m.) | ISTEK ROKA | VOLUMEN AMBALAŽE |
| 1. | KOMERCIJALNO MLIJEKO br. 1 | sterilizirano | 2,8% | 17.03.2024. | 0,2 L |
| 2. | KOMERCIJALNO MLIJEKO br. 2 | sterilizirano, homogenizirano | 2,8% | 15.05.2024. | 0,2 L |
| 3. | KOMERCIJALNO MLIJEKO br. 3 | sterilizirano, homogenizirano | 2,8% | 25.06.2024. | 0,2 L |
| 4. | KOMERCIJALNO MLIJEKO br. 4 | pasterizirano | 3,2% | 06.03.2024. | 1,0 L |
| 5. | KOMERCIJALNO MLIJEKO br. 5 | pasterizirano, nehomogenizirano | 3,2% | 02.03.2024. | 1,0 L |
| SVJEŽE DOMAĆE MLIJEKO | | | | | |
| | LOKACIJA UZORKOVANJA | POSTUPAK OBRADJE | DATUM UZORKOVANJA | VOLUMEN AMBALAŽE | |
| 6. | STUDENA, KLANA, PGŽ | Sirovo, bez obrada | 28.02.2024. | 1,0 L | |
| 7. | TOPOLOVAC, SISAK, SMŽ | | 20.05.2024. | 0,5 L | |
| 8. | BUDAŠEVO, SISAK, SMŽ | | 20.05.2024. | 0,5 L | |
| 9. | KRALJEVAC, KASTAV, PGŽ | | 23.05.2024. | 1,0 L | |

3.2. Uređaj TwinSensor Plus

Kit za analizu ostataka antibiotika, KIT106_V01 za uređaj TwinSensor Plus, koristi se za detekciju specifičnih antibiotika u uzorcima kravljeg mlijeka. Postupak započinje pripremom uzorka koji mora biti tekuć i homogene konzistencije, pri čemu je idealna temperatura između 4°C i 10°C. Uređaj se postavlja na radnu temperaturu od 40°C, a kit se drži u hladnjaku radi očuvanja reagensa. Nakon dodavanja specifičnih reagensa, uzorak se miješa i inkubira na 40°C. Rezultati se očitavaju prema prisutnosti linija na test traci. Pozitivan rezultat ukazuje na prisutnost antibiotika, dok negativan rezultat pokazuje da je uzorak čist. Ako se dobije pozitivan rezultat, preporučuje se ponoviti test s dva nova uzorka radi potvrde. Također, važno je slijediti upute o rukovanju kako bi se osigurala točnost rezultata. Ovaj kit omogućuje brzo i pouzdano otkrivanje ostataka antibiotika u mlijeku, što je ključno za očuvanje kvalitete mlijeka i sigurnost potrošača. Za analizu prisutnosti antibiotika korišten je uređaj TwinSensor Plus. To je dijagnostički uređaj namijenjen brzom i pouzdanom otkrivanju ostataka antibiotika i sulfonamida u mlijeku. Ovaj uređaj koristi kombinirani testni sustav koji omogućuje simultano otkrivanje različitih grupa antibiotika, uključujući beta-laktame i tetracikline, kao i sulfonamide. Uređaj je posebno dizajniran za upotrebu u mliječnoj industriji, gdje je ključno osigurati da mlijeko i mliječni proizvodi ne sadrže ostatke ovih lijekova iznad dopuštenih razina.

3.3. Određivanje prisutnosti ostataka antibiotika u uzorcima mlijeka – TwinSensor Plus

TwinSensor Plus koristi princip lateralnog protoka (lateral flow assay) za detekciju ostataka antibiotika u mlijeku. Ovaj princip rada temelji se na imunokromatografskoj tehnologiji, koja kombinira specifičnost antitijela s jednostavnošću vizualnog očitavanja rezultata. Postupak rada s TwinSensor Plus uređajem vrlo je jednostavan, brz i efikasan. Za korištenje ovog testa s mjernom trakicom nije potrebna obrada, čišćenje ili ekstrakcija uzorka.

Proces traje 6 minuta na temperaturi od 40 °C, s tri minute namijenjene inkubaciji i tri minute za migraciju. Rezultate je moguće dobiti izravno kroz instrumentalno očitavanje upotrebom čitača ReadSensor 2. Prvi korak analize uključuje dodavanje 200 µL sirovog mlijeka u mikrojažicu reagensa. Mlijeko treba biti homogeno i na temperaturi između +4 °C i +10 °C. Potrebno je mlijeko resuspendirati šest puta do postizanja homogenosti. Nakon što se reagensi i mlijeko homogeniziraju u mikrojažici, reagensi tijekom prve tri minute inkubacije na 40 °C vežu specifične molekule antibiotika, ukoliko su prisutne. Kad se mjerna trakica umoči u

mlijeko, tekućina počinje migrirati okomito prema gore kroz mjernu trakicu koja sadrži specifična antitijela koja su konjugirana s kolorimetrijskim česticama. Mlijeko se, zbog kapilarnog djelovanja, kreće duž testne trake, pri čemu dolazi do interakcije između ostataka antibiotika u uzorku i antitijela na traci. Ako su prisutni antibiotici ili sulfonamidi u uzorku mlijeka, oni će se vezati na specifična antitijela, stvarajući kompleks koji uzrokuje promjenu boje na određenom dijelu trake. Ako se ta promjena boje dogodi, test je pozitivan i ukazuje na prisutnost ostataka antibiotika ili sulfonamida iznad dopuštenih razina. Rezultati se mogu vizualno očitati direktno na testnoj traci. Testne trake obično sadrže dvije linije – kontrolnu i testnu liniju. Ako je testna linija jasno vidljiva, rezultat je negativan. Ako testna linija izostane ili je vrlo slaba, rezultat je pozitivan, što znači da su ostaci antibiotika prisutni.

3.4. Analizirani antibiotici i njihove granične vrijednosti

Granične vrijednosti ostataka antibiotika u mlijeku ključne su za osiguranje sigurnosti hrane i zaštite potrošača. Ove vrijednosti određuju maksimalno dopuštene koncentracije određenih antibiotika u mlijeku, čime se žele spriječiti mogući štetni učinci na zdravlje ljudi. U nastavku su detaljno objašnjeni regulatorni okviri, vrste antibiotika koji se najčešće koriste, postavljene granične vrijednosti, metode testiranja i kontrola, kao i važnost tih graničnih vrijednosti. U Europskoj uniji regulative, poput Uredbe (EC) br. 470/2009, postavljaju maksimalno dozvoljene razine ostataka antibiotika (engl. *Maximum Residue Limit*; MRL). U Sjedinjenim Američkim Državama, FDA (engl. *Food and Drug Administration*) i USDA (engl. *United States Department of Agriculture*) određuju slične, no ponekad specifično različite granične vrijednosti. Antibiotici kao što su penicilini, tetraciklini, sulfamidni antibiotici, i kvarterni amonijevi spojevi imaju postavljene specifične granične vrijednosti. Ove se vrijednosti obično izražavaju u mikrogramima po litri ($\mu\text{g/L}$) mlijeka. Na primjer, granična vrijednost za peniciline je $4 \mu\text{g/L}$, dok je za tetracikline i sulfamidne antibiotike $100 \mu\text{g/L}$. Vrijednosti su utemeljene na znanstvenim istraživanjima i procjenama rizika koje analiziraju utjecaj na zdravlje ljudi. Granične vrijednosti antibiotika prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Detekcija ostataka antibiotika u mlijeku sa njihovim graničnim vrijednostima

| ANTIBIOTICI | GRANICE DETEKCIJE (PPB) | EU MRL |
|---------------------|--------------------------------|---------------|
| β-LAKTAMI | | |
| PENICILINI | | |
| Penicilin-G | 2 - 3 (KIT020) | 4 |
| Ampicilin | 3 - 4 (KIT020) | 4 |
| Amoksicilin | 3 - 4 (KIT020) | 4 |
| Oksacilin | 12 - 18 (KIT020) | 30 |
| Kloksacilin | 6 - 8 (KIT020) | 30 |
| Dikloksacilin | 6 - 8 (KIT020) | 30 |
| Nafcilin | 30 - 50 (KIT020) | 30 |
| Ceftiofur | 10 - 15 (KIT020) | 100 |
| Cefkinom | 20 - 30 (KIT020) | 20 |
| Cefazolin | 18 - 22 (KIT020) | 50 |
| Cefapirin | 6 - 8 (KIT020) | 60 |
| Cefacetil | 30 - 40 (KIT020) | 125 |
| Cefoperazon | 3 - 4 (KIT020) | 50 |
| Cefaleksin | >750 (KIT020) | 100 |
| Cefalonijum | 3 - 5 (KIT020) | 20 |
| TETRACIKLINI | | |
| Klorotetraciklin | 30 - 40 (KIT020) | 100 |
| Doksiciklin | 10 - 15 (KIT020) | 100 |
| Oksitetraciklin | 50 - 60 (KIT020) | 100 |
| Tetraciklin | 80 - 100 (KIT020) | 100 |

3.5. Interpretacija rezultata

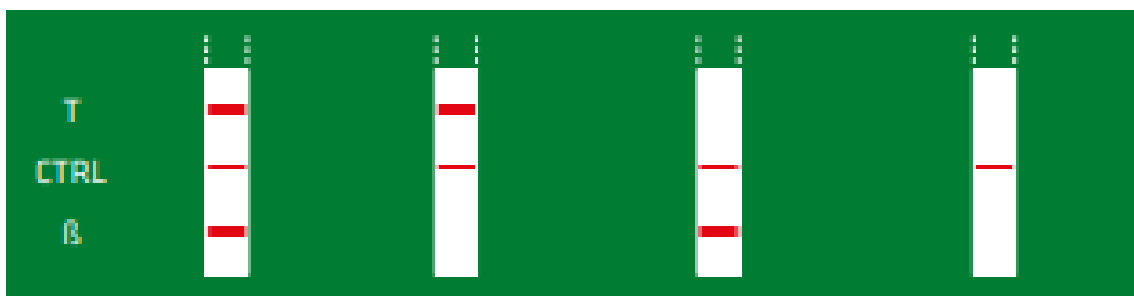
Osim rezultata koje da ReadSensor2 uređaj, testnu liniju i vizualno interpretiramo. Vizualna interpretacija rezultata dobivenih usporedbom intenziteta svake testne linije s kontrolnom (CTRL) linijom prikazana je na Slici 1.

Potpuno negativan rezultat ukazuje da u uzorku nema detektabilnih ostataka ni beta-laktama ni tetraciklina, što znači da je uzorak siguran prema EU standardima. Obje linije (T i B) su jednako intenzivne ili jače od kontrolne linije (CTRL), što ukazuje na odsutnost ostataka beta-laktama i tetraciklina u uzorku.

Pozitivan rezultat za beta-laktame znači da u uzorku postoje ostaci beta-laktama, te bi takav uzorak mogao biti nesiguran za konzumaciju. Linija B je slabija od kontrolne linije (CTRL), a linija T je jednaka ili jača od kontrolne linije, što ukazuje na prisutnost ostataka beta-laktama, ali ne i tetraciklina.

Pozitivan rezultat za tetracikline ukazuje na prisutnost ostataka tetraciklina u uzorku, što također može ukazivati na nesigurnost uzorka. Linija T je slabija od kontrolne linije (CTRL), a linija B je jednaka ili jača od kontrolne linije, što ukazuje na prisutnost ostataka tetraciklina, ali ne i beta-laktama.

Pozitivan rezultat za oba antibiotika (beta-laktame i tetracikline) znači da su prisutni ostaci oba antibiotika, što ukazuje na visoku razinu kontaminacije i uzorak bi bio nesiguran za upotrebu prema važećim standardima. Obje linije (T i B) su slabije od kontrolne linije (CTRL), što ukazuje na prisutnost ostataka i beta-laktama i tetraciklina u uzorku.



Slika 2. Interpretacija rezultata

4. REZULTATI

4.1. Količina ostataka antibiotika u uzorcima komercijalnih mlijeka

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da svi uzorci komercijalnog mlijeka imaju negativan rezultat na prisutnost antibiotika, što je izuzetno pozitivno i govori o tome da se u procesu proizvodnje i distribucije komercijalnog mlijeka strogo poštuju propisi o karencama i kontrolama kvalitete (Tablica 3). Vrijednosti omjera, te koncentracije tetraciklina, betalaktama i cefalosporina su relativno ujednačene među svim uzorcima, što ukazuje na konzistentnost i stabilnost u kvaliteti proizvoda. To sugerira da su standardi u proizvodnji komercijalnog mlijeka visoki, te da se osigurava ujednačenost kvalitete kroz čitav proces, od farmi do krajnjeg potrošača.

Tablica 3. Uzorci i pripadajući rezultati analize na prisutnost antibiotika

| UZORAK | PRISUTNOST ANTIBIOTIKA | OMJER | TETRA | BETA | CEFA |
|---------------------------|------------------------|-------|-------|------|------|
| KOMERCIJALNO MLJEKO br. 1 | NEG | 497.4 | 2.62 | 2.82 | 2.36 |
| KOMERCIJALNO MLJEKO br. 2 | NEG | 531.7 | 2.45 | 2.65 | 2.30 |
| KOMERCIJALNO MLJEKO br. 3 | NEG | 558.6 | 2.33 | 2.52 | 2.25 |
| KOMERCIJALNO MLJEKO br. 4 | NEG | 506.0 | 2.70 | 2.65 | 2.42 |
| KOMERCIJALNO MLJEKO br. 5 | NEG | 590.1 | 2.64 | 2.48 | 2.22 |

4.2. Količina ostataka antibiotika u uzorcima svježih domaćih mlijeka

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da kod svježih mlijeka također nije otkrivena prisutnost antibiotika, što ukazuje na to da se i u proizvodnji svježeg mlijeka pridržavaju propisi. Međutim, vrijednosti omjera i koncentracija tetraciklina, betalaktama i cefalosporina pokazuju veće varijacije između različitih uzoraka svježeg mlijeka, što može biti rezultat

različitih uvjeta na farmama, uključujući razlike u ishrani krava, načinu mužnje i skladištenju mlijeka (Tablica 4). Ove varijacije mogu ukazivati na manje standardizirane uvjete proizvodnje u usporedbi s komercijalnim mlijekom, što je i očekivano s obzirom na to da svježe mlijeko često dolazi iz manjih, lokalnih izvora gdje su uvjeti manje uniformirani.

Tablica 4. Uzorci svježeg mlijeka i pripadajući rezultati analize na prisutnost antibiotika

| UZORAK | PRISUTNOST ANTIBIOTIKA | OMJER | TETRA | BETA | CEFA |
|---|------------------------|-------|-------|------|------|
| SVJEŽE MLIJEKO Studena, Klana, PGŽ | NEG | 538.7 | 2.71 | 2.31 | 2.24 |
| SVJEŽE MLIJEKO Topolovac, Sisak, SMŽ | NEG | 704.3 | 2.30 | 2.09 | 2.11 |
| SVJEŽE MLIJEKO Budaševo, Sisak, SMŽ | NEG | 874.5 | 1.85 | 1.84 | 1.80 |
| SVJEŽE MLIJEKO Kraljevac, Kastav, PGŽ | NEG | 589.7 | 2.45 | 2.21 | 2.22 |

5. RASPRAVA

Primjena antibiotika u liječenju goveda uključuje brojne izazove i potencijalne probleme koji mogu utjecati na zdravlje životinja, kvalitetu mlijeka i širu javnozdravstvenu situaciju. Ovi izazovi obuhvaćaju razvoj otpornosti na antibiotike kod bakterija, što otežava liječenje infekcija u goveda i predstavlja opasnost za zdravlje ljudi. Otpornost se može prenijeti s životinja na ljude putem hrane ili okoliša, čime se smanjuje učinkovitost antibiotika u ljudskoj medicini. Rezistencija na antibiotike postala jedan od vodećih zdravstvenih problema današnjice što potvrđuje važnost razvoja učinkovitih analitičkih tehnika za određivanje prisutnosti antibiotika u proizvodima za životinje i prehrambenim proizvodima za ljudsku konzumaciju.

Dodatni problem predstavlja prisutnost ostataka antibiotika u mlijeku. Ako se mlijeko ne testira pravilno, to može rezultirati konzumacijom mlijeka s prekomjernim količinama antibiotika, što može imati štetne učinke na ljude. Stroge regulative koje određuju maksimalno dozvoljene razine antibiotika u mlijeku mogu dovesti do povlačenja proizvoda s tržišta i ekonomskih gubitaka za farmere.

Testiranje mlijeka na prisutnost antibiotika ključan je postupak za osiguranje sigurnosti mliječnih proizvoda i zaštitu javnog zdravlja. Ostaci antibiotika u mlijeku mogu imati ozbiljne posljedice, uključujući alergijske reakcije kod osjetljivih osoba, razvoj antimikrobne rezistencije i promjene u crijevnoj mikroflori. Zbog toga je neophodno provoditi redovite kontrole i testiranja mlijeka kako bi se osiguralo da ono ne sadrži tragove antibiotika iznad dopuštenih granica.

Testiranje pomoću TwinSensor Plus uređaja traje samo nekoliko minuta, što omogućuje brzo donošenje odluka na farmama i u mljekarama. Uređaj je jednostavan za korištenje i ne zahtijeva visoku razinu tehničkog znanja, što ga čini pristupačnim za korištenje na terenu. U usporedbi s laboratorijskim metodama, TwinSensor Plus je relativno jeftin alat za detekciju antibiotika, što je značajno za manje farme i mljekare.

TwinSensor Plus pruža kvalitativne rezultate (prisutan ili odsutan), ali ne daje kvantitativne podatke o koncentraciji antibiotika. Za precizno određivanje razina ostataka antibiotika potrebno je provesti dodatne laboratorijske testove. Iako je uređaj dizajniran za detekciju specifičnih antibiotika i sulfonamida, postoji mogućnost unakrsne reaktivnosti ili lažno pozitivnih rezultata, što zahtijeva dodatnu potvrdu rezultata. Iako TwinSensor Plus

detektira brojne antibiotike, ne pokriva sve moguće lijekove koji se koriste u veterinarskoj medicini. Za sveobuhvatno testiranje potrebno je kombinirati različite metode (15,16).

Prisutnosti ostataka antibiotika u mlijeku i mogućim posljedicama za javno zdravlje analizirano je u velikom broju članaka. Tondo EC et al su analizirali različite aspekte vezane za upotrebu antibiotika u stočarstvu, uključujući primjenu antibiotika za liječenje bolesti krava, karencijske periode potrebne za uklanjanje ostataka antibiotika iz mlijeka te metode testiranja zaostataka antibiotika u mlijeku. Autori su zaključili da prisutnost ostataka antibiotika u mlijeku predstavlja značajan rizik za javno zdravlje. Konzumacija mlijeka koje sadrži zaostale antibiotike može doprinijeti razvoju antimikrobne rezistencije kod ljudi što predstavlja ozbiljan problem u liječenju bakterijskih infekcija. Postoji potreba za strožim regulacijama i kontrolama u upotrebi antibiotika u mliječnoj industriji, uključujući rigorozno pridržavanje karencijskih perioda i redovito testiranje mlijeka na prisutnost ostataka antibiotika. Osim toga, vrlo je važno razvijati učinkovitije metode detekcije ostataka antibiotika u mlijeku, kako bi se osigurala sigurnost mliječnih proizvoda prije nego što dođu do potrošača. Edukacija farmaceuta, veterinara i proizvođača mlijeka o opasnostima koje zaostaci antibiotika predstavljaju za zdravlje ljudi i važnosti pridržavanja propisa je ključna za smanjenje ovog rizika. Odgovorna upotreba antibiotika neophodna je u stočarstvu kako bi se zaštitilo javno zdravlje i spriječila pojava antimikrobne rezistencije. (1)

Nadalje, Raies A et al su istaknuli zdravstvene rizike povezane s prisutnošću antibiotika u mliječnim proizvodima, uključujući alergijske reakcije, promjene u crijevnoj mikroflori i, najznačajnije, doprinos razvoju antimikrobne rezistencije. Glavni rizici uključuju pojavu alergijskih reakcija, osobito kod osjetljivih pojedinaca te disbiozu crijevne mikroflore što može utjecati na imunološki sustav i opće zdravlje. Također su kao jedan od najvažnijih zaključaka rada naglasili problem antimikrobne rezistencije. Ovo je globalni problem koji otežava liječenje bakterijskih infekcija i predstavlja prijetnju javnom zdravlju. Autori sugeriraju da bi države trebale usvojiti strože standarde i protokole za testiranje mlijeka na prisutnost antibiotika (2).

Iako mnoge države imaju stroge standarde, postoje razlike u metodama testiranja i graničnim vrijednostima (engl. MRL) koje su dopuštene, što može dovesti do nejednakih razina sigurnosti u globalnoj trgovini mliječnim proizvodima. Mitani M et al naglasili su da postoji potreba za harmonizacijom međunarodnih standarda i procedura kako bi se osigurala jednaka razina zaštite potrošača u svim zemljama. Globalni pristup regulaciji ostataka veterinarskih lijekova mogao bi poboljšati sigurnost mliječnih proizvoda i olakšati trgovinu. Autori su naglasili potrebu za uvođenjem novih tehnologija i kontinuiranom edukacijom

onih koji provode testiranja. U radu se naglašava važnost učinkovite provedbe regulacija, uključujući stroge kazne za kršenje propisa i redovito testiranje mliječnih proizvoda. Učinkoviti programi nadzora moraju biti podržani odgovarajućim resursima, uključujući laboratorije, obučeno osoblje i jasan pravni okvir.

U konačnici, primjena antibiotika u liječenju goveda zahtijeva pažljiv pristup kako bi se minimizirali potencijalni negativni učinci na zdravlje životinja, kvalitetu mlijeka i širu javnozdravstvenu situaciju. Edukacija farmera, pravilna upotreba antibiotika, redovno testiranje mlijeka i praćenje stanja otpornosti su ključni za održavanje sigurnosti i kvalitete mliječnih proizvoda (17).

6. ZAKLJUČAK

Razumijevanje i pravilna primjena antibiotika u veterinarskoj medicini ključni su za očuvanje zdravlja goveda i osiguranje sigurnosti mliječnih proizvoda. Uređaji poput TwinSensor Plus olakšavaju brzo otkrivanje ostataka antibiotika u mlijeku, čime se štite potrošači i osigurava usklađenost s regulatornim standardima. U Republici Hrvatskoj, zakonska regulativa i nadležna tijela igraju ključnu ulogu u kontroli kvalitete mlijeka, osiguravajući da mlijeko koje dolazi na tržište bude sigurno za ljudsku konzumaciju.

Testiranje uzoraka mlijeka na tragove antibiotika ključan je korak u osiguravanju sigurnosti mliječnih proizvoda i zaštiti javnog zdravlja. Različite metode detekcije, uključujući brze skrining testove i laboratorijske analize, omogućuju precizno otkrivanje i kvantifikaciju ostataka antibiotika. Regulatorni standardi postavljeni od strane međunarodnih i nacionalnih tijela osiguravaju da mlijeko koje dolazi do potrošača ne sadrži štetne razine antibiotika. Kontinuirana istraživanja i razvoj novih tehnika detekcije ključni su za unapređenje postojećih sustava nadzora i održavanje visoke razine sigurnosti hrane.

7. LITERATURA

1. Tondo EC, de Oliveira FA, Oliveira AP. Antibiotics Residues in Milk: A Public Health Hazard? *J Dairy Vet Anim Res.* 2016;3(3):68-70. doi: 10.15406/jdvar.2016.03.00079.
2. Raies A, Khameneh B, Panahi P, Fazly Bazzaz BS. Impact of antibiotic residues in milk on human health: a review. *Iran J Public Health.* 2016;45(7):984-985.
3. Oliviero, C., & Vitaglione, P. (2007). Nutritional and sensory aspects of ultra-high temperature treated milk: A comparison with fresh pasteurized milk. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(5), 369-380.
4. Silva, E. A., & Morais, H. A. (2013). UHT milk processing and its effects on milk proteins: A review. *Food Science and Technology*, 33(4), 637-645.
5. Tamime, A. Y. (Ed.). (2009). *Milk Processing and Quality Management.* Wiley-Blackwell
6. Mitani M, Yang Y, Allen L, Young J. Monitoring of veterinary drug residues in milk: review of regulatory programs. *J Food Prot.* 2016;79(9):1591-1601. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-442.
7. *Zakon o hrani.* Dostupno na: [Zakon o hrani \(nn.hr\)](#)
8. *Zakon o veterinarstvu.* Dostupno na: [https://www.zakon.hr/z/468/Zakon-o-veterinarstvu i Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o veterinarstvu \(nn.hr\)](https://www.zakon.hr/z/468/Zakon-o-veterinarstvu-i-Zakon-o-izmjenama-i-dopunama-Zakona-o-veterinarstvu)
9. *Pravilnik o maksimalnim razinama ostataka pesticida u hrani i hrani za životinje.* Dostupno na: [Pravilnik o maksimalnim razinama ostataka pesticida u hrani i hrani za životinje \(nn.hr\)](#)
10. *Zakon o službenim kontrolama hrane.* Dostupno na: [Zakon o službenim kontrolama i drugim službenim aktivnostima koje se provode sukladno propisima o hrani, hrani za životinje, o zdravlju i dobrobiti životinja, zdravlju bilja i sredstvima za zaštitu bilja \(nn.hr\)](#)
11. *Zakon o veterinarsko-medicinskim proizvodima.* Dostupno na: [Zakon o veterinarsko-medicinskim proizvodima \(nn.hr\) i Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o veterinarsko-medicinskim proizvodima \(nn.hr\)](#)
12. *Ministarstvo poljoprivrede.* Dostupno na: <https://poljoprivreda.gov.hr/>
13. *Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu (HAPIH).* Dostupno na: <https://www.hapih.hr/>
14. *Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane.* Dostupno na: [Uprava Veterinarstva \(veterinarstvo.hr\)](#)

15. *TwinSensor Plus*. Dostupno na: <https://noackgroup.com/>
16. *TwinSensor Plus - KIT106*. Dostupno na: <https://unisensor.be/en/catalog/twinsensor-plus-kit106~3370196b-a252-4c10-b80e-765468e84f86>
17. Mitchell JM, Griffiths MW, McEwen SA, McNab WB, Yee AJ. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *J Food Prot.* 1998;61(6):742-756.

8. ŽIVOTOPIS

Marina Žarinac Borko, rođena 5. svibnja 2000. godine u Zagrebu, svoju osnovnu i srednju naobrazbu stekla je u Sisku. Završila je Osnovnu školu Braća Ribar, a potom i Opću gimnaziju u Sisku, gdje je razvila interes za prirodne znanosti. Trenutno je studentica Sveučilišta u Rijeci, na Medicinskom fakultetu, gdje pohađa Sveučilišni Prijediplomski studij sanitarnog inženjerstva. Tijekom svog obrazovanja, stekla je čvrstu osnovu u zdravstvenim i tehničkim znanostima te pokazala odgovornost i predanost u izvršavanju zadataka. Marina se odlikuje dobrim komunikacijskim vještinama, što joj omogućava efikasno djelovanje u timskom okruženju. Također, tečno govori engleski i njemački jezik, što joj omogućava lakšu komunikaciju i pristup stranoj literaturi. Pored toga, posjeduje digitalne vještine, osobito u korištenju Microsoftovih aplikacija, što doprinosi njezinoj sposobnosti obavljanja radnih zadataka. Vlasnica je vozačke dozvole AM i B kategorije, što joj omogućava veću fleksibilnost u obavljanju obaveza. Marina je odgovorna i usmjerena prema postizanju visokih standarda u svom radu, s ciljem doprinosa javnom zdravlju i sanitarnoj struci.