

Istraživanje i značenje broja somatskih stanica u kozjem mlijeku

Lidija Kozačinski, T. Majić, Željka Cvrtila, M. Hadžiosmanović

Izvorni znanstveni rad – Original scientific paper

UDK: 637.12'639

Sažetak

Uzorci kozjeg mlijeka analizirani su na pojavu mastitisa upotrebom California-mastitis testa. Pri tome je 427 analiziranih uzoraka mlijeka (46,82 %) očitovale pozitivnu reakciju (1-3), dok je u preostalim 485 uzoraka (53,17 %) reakcija mastitis-testa bila negativna i nije upućivala na oboljenje mliječne žlijezde. Broj somatskih stanica utvrđen fluorooptičkom metodom prosječno je iznosio $1,3 \times 10^6$ /ml. Usporedba rezultata procjene mastitis-testa (CMT) s brojem somatskih stanica i nalazom uzročnika mastitisa u mlijeku pokazala je da povećani broj somatskih stanica nije isključiva indikacija bolesti mliječne žlijezde koza. Mastitis-testom može se isključiti upala mliječne žlijezde koza, dok svaku pozitivnu reakciju treba potvrditi ili isključiti bakteriološkom pretragom. Na osnovi navedenih rezultata istraživanja utvrdilo se da limit za broj somatskih stanica u kozjem mlijeku može iznositi više od 1 000 000/ml.

Ključne riječi: kozje mlijeko, broj somatskih stanica

Uvod

Kozje mlijeko sadrži sve sastojke koji su nužni za rast i razvoj mladunčeta, a značajna je namirnica animalnog podrijetla u prehrani ljudi. Posljednjih je godina i u Hrvatskoj došlo do značajnog oživljavanja uzgoja koza, koji je, zbog poznatih zakonskih zabrana iz 1954. godine, bio osiromašen. Poseban interes za unapređenje kozarstva pokazuje mljekarska industrija sa svrhom prerade kozjeg mlijeka u veoma vrijedne i tražene sireve. U svezi s time, kakvoća kozjeg mlijeka u pogledu higijensko-sanitarnih pokazatelja, postaje veoma značajnim čimbenikom unapređenja kozarske proizvodnje.

Kada se općenito govori o kakvoći mlijeka i njegovu sastavu, posljednjih godina sve se više ističe značaj broja somatskih stanica. Dok se na osnovi

broja somatskih stanica u krava može utvrditi upala vimena, u pogledu tumačenja broja somatskih stanica u kozjem mlijeku potreban je znatno oprezniji pristup. Mlijeko zdravih koza prosječno sadrži od 360.000 do 5.400.000 somatskih stanica u 1 ml. Prema podacima iz literature, kozje mlijeko koje sadrži više od 1.000.000 somatskih stanica u ml ne upućuje na upalu vimena ukoliko ne sadrži patogenih mikroorganizama (White i Hinckley, 1999.). Granične vrijednosti za broj somatskih stanica u kozjem mlijeku još uvijek, u većini zemalja, nisu propisane. Tako je u direktivi EU 92/46 od 01.01.1998. godine sadržana Uputa o uvođenju granične vrijednosti broja somatskih stanica za higijenski besprijekorno kozje mlijeko (Steffen, 1998.). Povrh toga, prema važećim propisima u SAD, kozje mlijeko ne smije sadržavati više od 1.000.000 somatskih stanica/ml (Hadžiosmanović, 1995.; Haenlien i Hinckley, 1995.; Wilson i sur., 1995.; Antunac i sur., 1997.). Usporedba utvrđenog broja somatskih stanica u kozjem mlijeku otežana je i zbog različitih upotrijebljenih metoda. No, jedinstveni su podaci u literaturi prema kojima je broj somatskih stanica u higijenski ispravnom kozjem mlijeku veći nego u kravljem (Steffen, 1998.).

Materijal i metode

Istraživanja su obavljena na uzorcima mlijeka dobivenim od 1.408 koza od kojih je zbog razlika u redu laktacije uzeto 912 pojedinačnih uzoraka. Uzorke mlijeka smo uzimali u sterilne bočice nakon uobičajene sanitacije vimena prije jutarnje mužnje.

Koze su držane u 36 domaćinstava koja se bave proizvodnjom kozjeg mlijeka. Bile su uglavnom alpina pasmine, osim u jednom domaćinstvu u kojem su zajedno s njima držane i sanske koze. Koze su bile u različitim stadijima laktacije, od 1.-7. (Tabl.1.).

Kako su sve životinje bile pod stalnim nadzorom veterinarske službe, sumnja na pojavu mastitisa postavljena je na osnovi općeg kliničkog pregleda i pregleda mliječne žlijezde. U našem smo istraživanju, uz to upotrijebili stajski postupak pregleda mlijeka, mastitis test (California mastitis-test; CMT). Taj su postupak opisali još Schalm i Noorlander (1957.), a u našem smo istraživanju koristili kao reagens "Zagrebački reagens" (Uhlík i Nevenka Orlić, 1958.), kojeg smo u količini od 2 ml dodavali istoj količini mlijeka i laganim pokretanjem promiješali. Očitane reakcije smo bilježili kao: negativna (0); 1; 1-2; 2; 2-3 i 3. Pri tome smo željeli utvrditi da li se CMT, kao

orijentacijski test u dijagnozi mastitisa može upotrijebiti i na uzorcima kozjeg mlijeka.

Tablica 1: Koze u istraživanju prema redu laktacija

Table 1.: Goats according the stage of lactation

Domaćinstvo red.broj Household number	Laktacija Lactation	Broj koza Number of goats	Broj uzoraka Samples
1.	5	27	25
2.	3	41	33
3.	4	39	34
4.	2	29	23
5.	3	37	28
6.	3	37	24
7.	6	38	5
8.	1	46	26
9.	6	49	22
10.	6	38	9
11.	4	35	26
12.	5	32	30
13.	1	61	52
14.	1	35	30
15.	7	29	24
16.	7	36	28
17.	7	40	28
18.	5	48	37
19.	5	37	36
20.	6	31	18
21.	6	49	30
22.	4	49	39
23.	5	35	25
24.	1	45	23
25.	6	38	31
26.	4	45	39
27.	4	31	36
28.	2	38	16
29.	1	40	17
30.	1	43	18
31.	6	37	17
32.	7	38	15
33.	1	45	13
34.	4	20	18
35.	3	58	16
36.	1	32	21
Sveukupno: 36 Total	-	1408	912

U uzorcima mlijeka odredili smo ukupan broj somatskih stanica fluoroptičkom metodom brojenja s aparatom Fossomatic A-5000 (FFOS Electric, Danska).

Uzorke mlijeka (n = 912) podvrgnuli smo i redovitim mikrobiološkim pretragama na nalaz uzročnika mastitisa. U bakteriološkoj pretrazi korištene su uobičajene hranjive i selektivne podloge, a izdvojene kolonije potencijalnih uzročnika mastitisa determinirane su uobičajenim potvrdnim testovima.

S obzirom da je mastitis test orijentacijski postupak kojim se neizravno može dobiti uvid u broj somatskih stanica, zanimala nas je usporedba rezultata dobivenih postupkom CMT i pomoću "Fossomatic" brojača. Uz to, kako se CMT koristi pri pregledu mlijeka krava, zanimalo nas je da li, zbog već navedenih fizioloških razloga, postoji mogućnost upotrebe testa i kod pregleda mlijeka koza, te da li se reakcija može očitavati na isti način, jer u pristupačnoj literaturi nismo našli dovoljno podataka o mogućnosti korištenja CMT u svrhu ocjene poremećene sekrecije vimena koza.

Rezultati i rasprava

Prema rezultatima analize uzoraka mlijeka mastitis testom 427 analiziranih uzoraka mlijeka (46,82%) je očitavalo reakcije od 1-3. Najveći broj analiziranih uzoraka, njih 192, pokazivalo je najslabiju reakciju (1), reakcija 2 uočena je u 136 uzoraka, reakcija 1-2 u 43 uzorka, reakcija 3 u 31 uzorku, a reakcija 2-3 u 25 uzoraka kozjeg mlijeka. U preostalim 485 uzoraka (53,18%) reakcija mastitis testa bila je negativna i nije upućivala na oboljenje mliječne žlijezde (tablica 3.).

Utvrđen broj somatskih stanica fluoroptičkom metodom brojenja statistički je obrađen a vrijednosti su prikazane u tablici 2.

U analiziranim uzorcima kozjeg mlijeka broj somatskih stanica bio je $2,0 \times 10^3/\text{ml}$ do $2,6 \times 10^7/\text{ml}$. Pri tome je srednja vrijednost broja stanica iznosila $1,3 \times 10^6/\text{ml}$, a geometrijska sredina $4,7 \times 10^5/\text{ml}$. Rezultati ukazuju na veći utvrđeni broj somatskih stanica u odnosu na rezultate drugih autora (Poutrell i Lerondelle, 1983.; Timms i Schulz, 1985.; Park i Humphrey, 1986.; Deutz i sur., 1990.; Lerondelle i sur., 1992.; Gajdušek i sur., 1996.; Zeng, 1996.). Međutim, mnogi su drugi autori utvrdili visoki prosječni broj somatskih stanica koji premašuje $1 \times 10^6/\text{ml}$ (Zeng i Escobar, 1995.) odnosno $2,8 \times 10^6/\text{ml}$ (Schuppel i Schwope, 1999.), pa čak $6,2 \times 10^6/\text{ml}$

(Park i Humphrey, 1986.). Istraživanja Sunga i sur. (1999.) također pokazuju u skupnim uzorcima mlijeka (79,8% uzoraka mlijeka alpina koza i 73,0% uzoraka mlijeka sanskih koza) više od milijun somatskih stanica. Poutrel i sur. (1997.) su u inficiranim polovicama vimena utvrdili izrazito visoki broj somatskih stanica koji se kretao od čak $9,3 \times 10^8$ /ml do $2,4 \times 10^9$ /ml što je daleko veći utvrđeni broj somatskih stanica nego u našem istraživanju. Droke i sur. (1993.) utvrdili su od $2,8 \times 10^5$ /ml do $7,7 \times 10^6$ /ml somatskih stanica (geometrijska sredina) u skupnim uzorcima mlijeka, što je više nego u našem istraživanju. Naši su rezultati u skladu s rezultatima istraživanja Fahra i sur. (1999.) koji su utvrdili ukupni prosječni broj somatskih stanica od $1,0 \times 10^6$ /ml, a iznosio je od >100.000 /ml do nekoliko milijuna u 1ml.

Tablica 2: Broj somatskih stanica u kozjem mlijeku ($n = 912$)

Table 2: Number of somatic cells in goat's milk ($n = 912$)

Pokazatelj Parameter	Obilježje Variable
	Broj somatskih stanica/ml Somatic cell count/ml
Srednja vrijednost Mean	1.352.330
Median	453.500
Geometrijska sredina Geometrical mean	472.514
Varijanca Sample variance	$7,17 \times 10^9$
Standardna devijacija Standard deviation	2.677.920
Standardna pogreška Standard error	88.674
Minimum	2.000
Maximum	26.775.000
Raspon Range	26.773.000

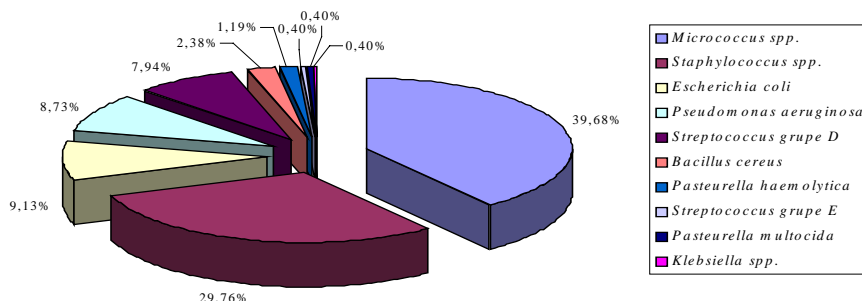
Mnogi autori smatraju da granična vrijednost broja somatskih stanica kod zdravih koza iznosi 1×10^6 /ml (Smith i Roguinsky, 1977.; Roguinsky i sur., 1980.; Gajdušek i sur., 1996.; Steffen i sur., 1998.). Ukoliko rezultate naših pretraga promatramo u svjetlu te norme, prosječni broj somatskih stanica od $1,3 \times 10^6$ /ml je nešto veći od granične vrijednosti.

Međutim, čak 643 (70,50%) uzoraka mlijeka sadržavalo je manje, a njih 269 ili 29,50% više od 10^6 somatskih stanica u 1 ml (Slika 1). Osim toga u 509 uzoraka (55,81%; $n = 912$) broj somatskih stanica bio je manji ili jednak $5,0 \times 10^5$ /ml, a u 134 analiziranih uzoraka (14,69%) iznosio je od $5,0 \times 10^5$ do $1,0 \times 10^6$ /ml. Broj somatskih stanica utvrđen u našem istraživanju manji je od rezultata Schuppela i Schwoppea (1999.), koji su u čak 51% analiziranih uzoraka mlijeka ($n = 1.328$) utvrdili da broj somatskih stanica iznosi od $1,0 \times 10^6$ /ml do $1,5 \times 10^6$ /ml, dok je u 49% uzoraka broj bio manji od $1,0 \times 10^6$ /ml. Autori su u svojim istraživanjima broj somatskih stanica također određivali fluorooptičkom metodom. Naši rezultati ukazuju na manji utvrđeni broj somatskih stanica u uzorcima mlijeka u odnosu na rezultate istraživanja Njarija i sur. (1993.), koji su u 23,7% analiziranih uzoraka kozjeg mlijeka ($n=93$) utvrdili broj somatskih stanica veći od $5,0 \times 10^5$ /ml.

Specifični uzročnici mastitisa utvrđeni su u 247 analiziranih uzoraka kozjeg mlijeka, odnosno 27,08%, dok u preostalim 665 analiziranih uzoraka (77,92%) specifični uzročnici mastitisa nisu utvrđeni. U nekim su uzorcima mlijeka izolirana i po dva različita uzročnika mastitisa. Struktura uzročnika mastitisa prikazana je na slici 2.

Slika 1: Broj somatskih stanica u kozjem mlijeku (n=912)

Figure 1: Number of somatic cells in goat's milk (n=912)



Slika 2: Struktura uzročnika mastitisa (n=252)

Figure 2: Mastitis agents (n=252)

U uzorcima mlijeka u kojima su utvrđeni potencijalni uzročnici mastitisa broj somatskih stanica nije nužno bio veći od $1,0 \times 10^6/\text{ml}$. Isto tako, u nekim uzorcima mlijeka s utvrđenim brojem somatskih stanica $>10^6/\text{ml}$ nalaz uzročnika mastitisa bio je negativan.

U tablici 3. prikazani su rezultati očitavanja u postupku CMT i usporedba s utvrđenim brojem somatskih stanica.

Tablica 3: Rezultati očitavanja u postupku CMT* i usporedba s utvrđenim brojem somatskih stanica

Table 3: Results of the CMT Test scores in comparison with mean "Fossomatic" counts

Očitanje Score	CMT*		"Fossomatic"
	N	%	(x)
rezultat 0	485	53,18	$3,1 \times 10^5$
rezultat 1	192	21,05	$9,2 \times 10^5$
rezultat 1-2	43	4,72	$1,3 \times 10^6$
rezultat 2	136	14,91	$3,1 \times 10^6$
rezultat 2-3	25	2,74	$6,1 \times 10^6$
rezultat 3	31	3,40	$8,9 \times 10^6$
Ukupno	912	100,00	-

* California mastitis test

Aritmetička sredina broja somatskih stanica u usporedbi s očitanjem rezultata mastitis testa (California mastitis test) iznosila je $3,1 \times 10^5$ (rezultat 0), $9,2 \times 10^5$ (rezultat 1), $1,3 \times 10^6$ (rezultat 1-2), $3,1 \times 10^6$ (rezultat 2), $6,1 \times 10^6$ (rezultat 2-3) i $8,9 \times 10^6$ (rezultat 3). U istraživanjima Contrerasa i sur. (1996.) broj somatskih stanica u pojedinim očitanjima bio je puno niži i iznosio najviše $4,9 \times 10^6$ kod rezultata 3. Kod rezultata 0, autori su utvrdili $3,1 \times 10^5$ somatskih stanica što je jednako našim rezultatima. Ukoliko je rezultat mastitis testa bio 0 a u pretraženom uzorku mlijeka nisu utvrđene bakterije, mogući uzročnici mastitisa, smatrali smo da je vime tih životinja zdravo. Prosječan broj somatskih stanica u tim uzorcima iznosio je $3,1 \times 10^5$ /ml, što je u skladu s rezultatima istraživanja Dulina i sur. (1982.) koji su utvrdili $2,8 \times 10^5$ /ml somatskih stanica u zdravom vimenu. Broj somatskih stanica u zdravom vimenu utvrđen u našem istraživanju podudara se s rezultatima istraživanja Poutrela i sur. (1997.) koji su u neinficiranim polovicama vimena utvrdili $2,7 \times 10^5$ stanica/ml. Međutim, već je rezultat 1-2 u našim istraživanjima ukazao na visoki prosječni broj somatskih stanica od $>10^6$ /ml, pa smatramo da on ne upućuje uvijek na upalu vimena ukoliko mlijeko ne sadrži patogene mikroorganizme, a mastitis testom se, kao orijentacijskim postupkom, može isključiti upala mliječne žlijezde koza.

Zaključak

Rezultati pretrage uzoraka mlijeka mastitis-testom (California mastitis test) pokazali su da je 427 analiziranih uzoraka mlijeka (46,82%) očitavalo pozitivnu reakciju od 1-3, te se po tome može smatrati da su bolovale od nekog oblika kliničkog ili subkliničkog mastitisa. Broj somatskih stanica određen pomoću "Fossomatic" brojača kretao se od $2,0 \times 10^3$ /ml do $2,6 \times 10^7$ /ml. Pri tome je srednja vrijednost broja stanica iznosila $1,3 \times 10^6$ /ml, a geometrijska sredina $4,7 \times 10^5$ /ml. Statističkom obradom utvrđene su značajne razlike u broju somatskih stanica u mlijeku koza pojedinih domaćinstava.

Usporedba rezultata procjene mastitis-testa (CMT) s brojem somatskih stanica i nalazom uzročnika mastitisa u mlijeku pokazala je da samo povećani broj somatskih stanica nije nužno pokazatelj bolesti mliječne žlijezde koza. Mastitis-testom se može isključiti upala mliječne žlijezde, a rezultati očitavanja reakcije od 1-3 ukazuju na mogućnost oboljenja koju svakako treba potvrditi ili isključiti bakteriološkom pretragom.

Na osnovi navedenih rezultata pokazalo se da kao higijenski kriterij u otkupu kozjeg mlijeka norma za broj somatskih stanica može biti veća od 1.000.000/ml.

NUMBER AND IMPORTANCE OF SOMATIC CELLS IN GOAT'S MILK

Summary

Goat's milk samples were examined on mastitis using stable procedure (California-mastitis test). 427 of the examined milk samples (46.82%) had positive reaction from 1 to 3 while other 485 samples (53.18%) had negative reaction on the mastitis test, indicating that no illness of mammary gland occurred. Number of somatic cells, counted using "Fossomatic" counter, was 1.3×10^6 /ml average. By comparing the results of mastitis-test evaluation (CMT) with the number of somatic cells and findings of mastitis agents in milk showed that higher number of somatic cells is not the only indication of goat's mammary gland illness. Mastitis-test is method that can exclude inflammation of goat's mammary gland, but every positive reaction should be confirmed or eliminate with bacteriological examination. Based on the results of this research, it has been shown that the limit for somatic cells number in goat's milk can be over 1 000 000/ml.

Key words: goat's milk, somatic cell count

Literatura

- ANTUNAC N., HAVRANEK JASMINA, SAMARŽIJA DUBRAVKA (1997): Somatske stanice u kozjem mlijeku. *Mljekarstvo* 47(2), 123-134.
- CONTRERAS, A., SIERRA D., CORRALES J.C., SANCHEZ A., MARCO J. (1996): Physiological threshold of somatic cell count and California mastitis test for diagnosis of caprine subclinical mastitis. *Small Ruminant Research* 21 (3), 259-264.
- DEUTZ, A., PERTNHANER A., SCHLERKA G., BAUMGARTNER W. (1990): Untersuchungen über Zellgehalt der Milch und die Verbreitung bakteriell bedingter Euterentzündungen in niederösterreichischen Schaf- und Ziegenherden. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 77, 70-77.
- DROKE, E.A., PAAPE M.J., DI CARLO A.L. (1993): Prevalence of high somatic cell counts in bulk tank goat milk. *J. Dairy Sci.* 76, 1035-1039.
- DULIN, A.M., PAPPE M.J., WERGIN W.A. (1982): Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. *J. Food Protection* 45 (5), 435-439.
- FAHR, R.D., SCHULZ J., FINN G., LENGERKEN G.V., WALTHER R. (1999): Zellgehalt und Differentialzellbild der Ziegenmilch – Variabilität und einflussfaktoren. *Tierärztl. Prax.* 27 (g), 99-106.
- GAJDUŠEK, S., JELINEK P., HAMPL A. (1996): Počty somatických bunek v kozím mlece a jejich vztah ke složení a vlastnostem mleka. *Živočišna výroba* 41, 25-31.

- HADŽIOSMANOVIĆ, M. (1995): Uvjeti kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda. U: Mlijeko – medicinski i prehrambeni problemi. (Urednici: R. Živković, M. Hadžiosmanović, V. Oberiter). HAMZ, Zagreb, 1995., 119-125.
- HAENLIEN, G.F.W., HINCKLEY L.S. (1995): Goat milk somatic cell count situation in USA. *International Journal of Animal Science* 10, 305-310.
- LERONDELLE, C., RICHARD Y., ISSARTIAL J.(1992): Factors affecting somatic cell counts in goat milk. *Small Ruminant Research* 8, 129-139.
- NJARI, B., MAJIĆ B., CATINELLI M., JAKOVAC M. (1993): Influence of goat udder health on milk hygienic quality. *Veterinarski arhiv* 63 (4), 191-198.
- PARK, Y.W., HUMPHREY R.D. (1986): Bacterial cell counts in goat milk and their correlations with somatic cell counts, percent fat and protein. *J. Dairy Sci.* 69 (1), 32-37.
- POUTREL B., LERONDELLE C. (1983): Cell content of goat milk: California Mastitis Test, Coulter Counter and Fossomatic for predicting half infection. *J. Dairy Sci* 66 (12), 2575-2579.
- POUTREL, B., DE CREMOUX R., DUCCELLIEZ M., VERNEAU D. (1997): Control of intramammary infections in goats: Impact on somatic cell count. *Journal of Animal Science.* 75 (2), 566-570.
- ROGUINSKY, M., POUTREL B., SECQ J.P., PILLET R. (1980): Étude cellulaire et bactériologique sur les laits de troupeau de chèvres. *Le Lait* 60, 27-32.
- SCHALM, O.W., NOORLANDER D.O. (1957): Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 130, 199-204.
- SCHUPPEL, H., SCHWOPE M. (1999): Content of somatic cells and microbiological quality of the milk of goats without evidence of clinical mastitis. *Milchwissenschaft* 54 (1), 13-17.
- SMITH, M.C., ROGUINSKY M.(1977): Mastitis and other diseases of the goat's udder. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171, 1241-1248.
- STEFFEN, V. (1998): Zytologische und chemisch-physikalische Untersuchungen von Milch afrikanischer Zwergziegen unter besonderer Berücksichtigung der subklinischen Mastitis. Inaugural - disertation. Freien Universität Berlin. Berlin, 1998. Journal - Nr. 2142
- SUNG, Y.Y., WU T.I., WANG P.H. (1999): Evaluation of milk quality of Alpine, Nubian, Saanen and Toggenburg breeds in Taiwan. *Small Ruminant Research* 33 (1), 17-23.
- TIMMS, L.L., SCHULTZ L. H. (1985): N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity and somatic cells in goat milk. *J. Dairy Sci.* 68, 3363-3366.
- UHLIK, B., ORLIĆ NEVENKA (1958): Novi reagens za otkrivanje poremetnji u sekreciji vimena krava. *Veterinarski glasnik*, 12, 963-967.
- WHITE, E.C., HINCKLEY L.S. (1999): Prevalence of mastitis pathogens in goat. *Small Ruminant Research* 33 (2), 117-121.
- WILSON, D.J., KEITH N.S., PHILIP M.S. (1995): Effects of stage of lactation, production, parity and season on somatic cell counts in infected and uninfected dairy goats. *Small Ruminant Research* 16, 165-169.
- ZENG, S.S., ESCOBAR E.N. (1995): Effect of parity and milk production on somatic cell count, standard plate count and composition of goat milk. *Small Ruminant Research*, 17, 269-274.
- ZENG, S.S. (1996): Comparison of goat milk standards with cow milk standards for analyses of somatic cell count, fat and protein in goat milk. *Small Ruminant Research* 21 (3), 221-225.

Adrese autora – Author's addresses:

Dr.sc. Lidija Kozačinski
Mr. Željka Cvrtila
Prof.dr.sc. M. Hadžiosmanović
Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Dr.sc.T. Majić
Veterinarska stanica grada Zagreba

Prispjelo – Received:

25. 05. 2001.

Prihvaćeno – Accepted:

27. 06. 2001.