

Prisutnost *Coxiella burnetii* u sirovom mlijeku iz mljekomata u Republici Hrvatskoj

Brigita Hengl^{*}, S. Špičić, Sanja Duvnjak, Irena Reil, Lidija Kozačinski, Andrea Humski, Ivančica Kovaček i Andrea Benussi Skukan



Uvod

C. burnetii uzročnik je Q-groznice i do nedavno je pripadala skupini rikecija. Premda se razmnožava samo u živim stanicama vrlo je otporna na nepovoljne uvjete okoline i brojne dezinficijense. Tvorbom spora na dulje vrijeme preživljava uvijete isušivanja, npr. u prašini. Inkubacija traje dva do tri tjedna, a ovisi o infektivnoj dozi. Klinički simptomi u ljudi manifestiraju se kroz različite sindrome kao što su akutna bolest s povišenom temperaturom, upalom pluća te infekcijom s dominantnom neurološkom manifestacijom (Dželalija, 2008.). Dominantni simptom bolesti u životinja je pobačaj u terminalnoj fazi graviditeta. Za bolest su najprimljiviji preživai, posebice ovce i koze (EFSA, 2010.). Iako je Q-groznica primarno prirodno-žarišna zoonoza, adaptirala se na domaće životinje među kojima se danas trajno održava. Rezervoar bolesti

su: goveda, koze, ovce i druge životinje. Glavni put prijenosa sa životinja na ljude je udisanje aerosola. Poznat je i prijenos *C. burnetii* slamom i krznom životinje na veće udaljenosti te konzumacijom sirovog mlijeka i proizvoda od sirovog mlijeka. *C. burnetii* je intracelularna bakterija, pleomorfnikokobacil, stanične stjenke nalik onoj Gram negativnih bakterija i smještena je u y-podskupinu *Proteobacteria* (ne rikecije) (Sep-Ševerdija, 2009.). Nakon što *C. burnetii* jednom dođe u okoliš, ona u njemu ostaje (Kersh i sur., 2013.). U vanjskoj sredini s nepovoljnim uvjetima, u sasušanim životinjskim ekskretima, *C. burnetii* poprima oblik spora i više mjeseci preživljava na vuni, u mlijeku, vodi ili u prašini. Otporna je prema djelovanju 1%-tnog formalina i 1%-tnog fenola u tijeku 24 sata, ali je inaktiviraju 0,05%-tni hipoklorit i 1%-tni lizol. Grijanje pri 63 °C samo djelomično

Dr. sc. Brigita HENGL^{*}, dr. med. vet., (dopisni autor, e-mail: bhengl@hah.hr), Hrvatska agencija za hranu, Osijek, Hrvatska; dr. sc. Silvio ŠPIČIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, dr. sc. Sanja DUVNJAK, mag. ing. mol. biolog., postdoktorandica, Irena REIL, dr. med. vet., dr. sc. Andrea HUMSKI, dr. med. vet., docentica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Lidija KOZAČINSKI, dr. med. vet., redovita profesorica, Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; dr. sc. Ivančica KOVAČEK, dr. med. spec. med. mikr., Nastavni zavod za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Andrea BENUSSI SKUKAN, dipl. ing. preh. teh. i bioteh., Centar za kontrolu namirnica, Zagreb, Hrvatska

uništava *C. burnetii* te je za sigurno uništenje u mlijeku potrebna pasterizacija 15 sekundi pri 71,5 °C (Dželalija, 2008.).

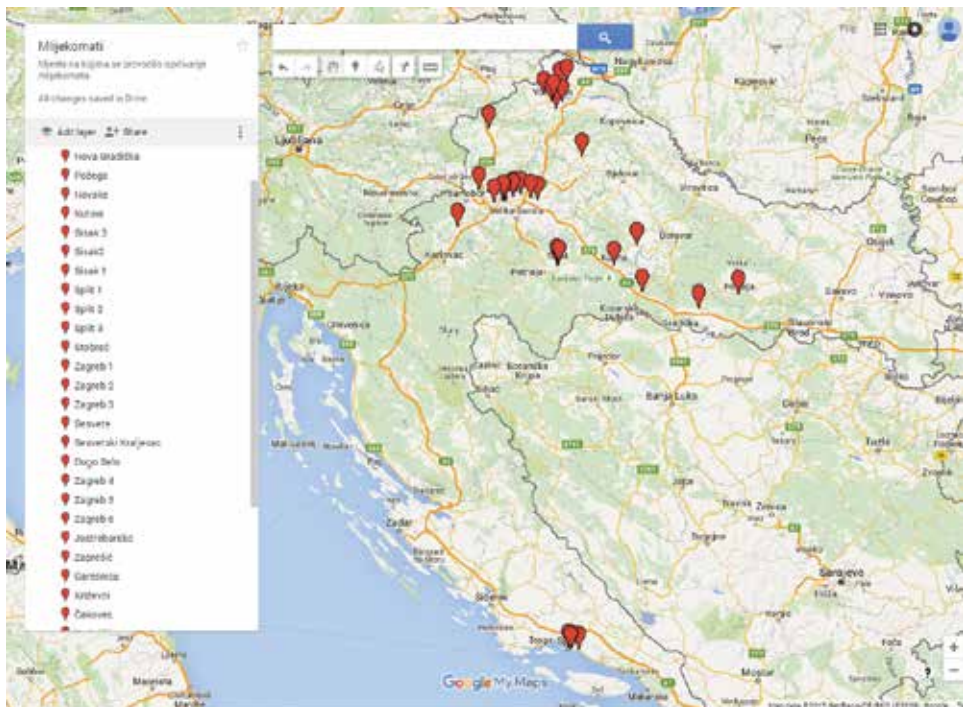
Humani slučajevi Q-groznice koji se prijavljuju obično su akutni, jer oko 60% infekcija prođe asimptomatski (Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005.). Obično prevladavaju nespecifični simptomi, poput gripe s visokom temperaturom, glavoboljom i kašljem, atipična pneumonija ili hepatitis, ali i drugi poput crvenila na koži, miokarditisa, perikarditisa, menigoencefalitisa, pankreatitisa i pobačaja (Delsing i sur., 2009.). U 0,5 do 5% slučajeva akutni oblik prelazi u kronični (Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005., Tissot-Dupont i sur., 2007.). Kod kroničnih slučajeva Q-groznice uobičajeni simptomi povezuju se sa srcem i krvožilnim sustavom (endokarditis u 60-70% slučajeva), zglobno-koštanim infekcijama i kroničnim plućnim infekcijama (EFSA, 2010.). Preboljenjem bolesti

stvara se dugotrajna imunost. Izražena je sezonalnost pojave bolesti, najčešće u kasnu zimu i proljeće, što se većinom poklapa sa sezonom janjenja (Sep-Ševerdija, 2009.).

Materijali i metode

Sirovo mlijeko uzorkovano je tijekom zime 2015. (veljača) i u proljeće/ljeto 2015. (lipanj) na gotovo svim dostupnim mljekomatima u čitavoj Hrvatskoj (slika 1). U zimskom uzorkovanju prikupljeno je ukupno 28 uzoraka sirovog mlijeka, a u proljetno/ljetnom 29 uzoraka.

Mlijeko je uzorkovano u količini od 1 L u sterilne staklene boce s poklopcem. Nakon uzorkovanja boca je pohranjena u prijenosne hladnjake s ulošcima za zamrzavanje te je dostavljena u roku od nekoliko sati (najviše do 5 sati) u laboratorij. Iznimka od opisanog načina dostave odnosi se na uzorke iz područja



Slika 1. Zemljopisna karta s razmještajem mljekomata u RH koji su bili obuhvaćeni uzorkovanjem

Splita (ukupno 6 u oba uzorkovanja) koji su nakon prikupljanja spakirani u kutije s ledom i dostavljeni drugi dan u laboratorij (najdulje u roku od 24 sata od uzorkovanja).

Za određivanje *Coxiella burnetii* korištena je metoda lančane reakcije polimerazom (konvencionalni PCR i Real-Time PCR) kojima se utvrđuje uzročnik Q-groznice (Berri i sur., 2000.).

Rezultati

Identifikacija *C. burnetii* provedena je na ukupno 57 uzoraka mlijeka prikupljenih u uzorkovanju u veljači i lipnju. Korištenjem metode lančane reakcije polimerazom (konvencionalni PCR i Real-Time PCR) bilo je pozitivno 10 uzoraka (17,54%), ili po pet u svakom uzorkovanju te je prevalencija u zimskom uzorkovanju iznosila 17,86%, a u ljetnom 17,24%. Pozitivni uzorci utvrđeni su kod ukupno 4 proizvođača mlijeka, a kod tri proizvođača mlijeka u oba uzorkovanja. Jedan proizvođač imao je pozitivan uzorak samo u zimskom uzorkovanju, dok je u ljetnom (dakle nakon zimskog) od istog proizvođača uzorak bio negativan.

Rasprava

Mogućnost štetnog djelovanja *C. burnetii* na zdravlje ljudi ne može se u potpunosti isključiti. Ipak, hipoteza da se konzumiranjem *C. burnetii* može izazvati Q groznica je kontraverzna i već se desetljećima proučava (Angelakis i Raoult, 2010.). Marmion i Stoker (1958.) otkrili su da je više osoba koje su konzumirale sirovo mlijeko u dva grada u blizini Kenta, Engleska, oboljelo od Q-groznice u odnosu na osobe iz kontrolne grupe. Beck i Bell (1949.) istaknuli su da je 32% od 300 slučajeva Q groznice u Los Angelesu bilo u osoba koje su konzumirale sirovo mlijeko. Fishbein i Raoult (1992.) opisali su izbijanje Q-groznice u psihijatrijskoj

ustanovi na jugu Francuske kada je stopa seropozitivnosti za *C. burnetii* bila značajno veća kod pacijenata koji su konzumirali nepasterizirane mliječne proizvode. Tijekom izbijanja Q groznice u 2009. godini u Nizozemskoj, De Bruin i sur. (2012.) pronašli su visoke razine *C. burnetii* DNK u uzorcima iz okoliša farmi koje su imale pozitivne skupne uzorke iz tankova s mlijekom. Na 73% tih farmi postojala je evidencija nedavnih slučajeva oboljenja od Q-groznice u ljudi. Eldin i sur. (2013.) pronašli su podjednak broj mliječnih proizvoda od sirovog i pasteriziranog mlijeka kontaminiranih s *C. burnetii*, ali je u proizvodima od nepasteriziranog mlijeka značajno veći broj bio s većom kontaminacijom, koja je prelazila 3 log 10 kopija/mL. Tim su mlijekom naknadno hranili miševе u kojih su izostali znaci bolesti. Autori su zaključili kako se pasterizacijom ipak ne može ukloniti potencijalno štetan genski materijal *C. burnetii* te da jogurt i sirevi, iako kontaminirani, ne posjeduju vitalne kulture *C. burnetii* i ne predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi. Prema Viltrop i Roast (2013.) *C. burnetii* prisutna je u 25% stada goveda u Estoniji.

RT-PCR metodom, kojom je utvrđena puno veća prevalencija patogena, detektirane su i mrtve stanice. Međutim, ta činjenica nema utjecaja na procjenu rizika kod konzumacije svježeg sirovog mlijeka iz mljekomata. U skladu s principom predostrožnosti, detekcija patogena, živih ili ne, značajan su čimbenik u modeliranju rizika, ukoliko to mlijeko neće biti podvrgnuto naknadnom tretmanu kojima se pospješuje antimikrobno djelovanje, jer su prisutni patogeni u mogućnosti preživjeti tijekom roka trajanja (Giacometti i sur., 2012.). Izolacija *C. burnetii* konvencionalnom kulturijelnom metodom je teška i dugotrajna, tako da se često koriste serološki testovi poput fiksacije komplemента, indirektnе imuno fluorescencije (indirect immunofluorescent assay-IFA) i ELISA (Engl. enzyme-linked immunosor-

bent assay), s nedostatkom što se u nekim slučajevima može javiti imunološka križna reakcija koja može štetno djelovati na osjetljivost testova. Stoga je RT-PCR metoda pouzdanija za određivanje *C. burnetii* u uzorcima mlijeka (Can i sur., 2015.) te je korištena i u našoj studiji.

Različite prevalencije zabilježene su u europskim zemljama. U Švicarskoj su Fretz i sur. (2007.) naveli prevalenciju *C. burnetii* u sirovom mlijeku iz tankova 4,7%, u Francuskoj 24,4% (Guatteo i sur., 2006.), u južnoj Belgiji 30% (Czaplicki i sur., 2012.), u Nizozemskoj 50% (Muskens i sur., 2011.), u Turskoj 20% (Can i sur., 2015.), a u SAD-u čak 94,3% (Kim i sur., 2005.). Međutim, na prisutnost *C. burnetii* ukazuju i drugi pokazatelji, kao npr. u Španjolskoj gdje nije utvrđena prevalencija u mlijeku, ali je zabilježena visoka seroprevalencija u mlijeku iz tankova od $> 10^4$ *C. burnetii* u mL (Nogareda i sur., 2012.), ili u Danskoj gdje je utvrđeno 59% *C. burnetii* protutijela u mlijeku iz tankova (Agger i sur., 2010.). U Hrvatskoj do ovog istraživanja nije utvrđena prisutnost *C. burnetii* u sirovom mlijeku iz mljekomata korištenjem molekularne metode. Prema rezultatima iz našeg istraživanja prevalencija *C. burnetii* u mlijeku iznosila je 17,54% i bila je podjednaka u zimskom i proljetno-ljetnom uzorkovanju. Takva situacija je lošija od situacije u Švicarskoj, ali je bolja od prevalencija u Francuskoj, južnoj Belgiji, Nizozemskoj, SAD-u i Turskoj. Od četiri proizvođača mlijeka kod kojih je *C. burnetii* utvrđena u zimsko/jesenskom uzorkovanju, kod tri je proizvođača ponovno utvrđena i u proljetno/ljetnom uzorkovanju. Iako se radi o malom broju uzoraka, ponovljena prisutnost ovog patogena u 75% slučajeva potvrđuje činjenicu kako je njegova prisutnost u stadu pa posljedično i u mlijeku, dugotrajna i teško otkloniva.

Zaključak

Prisutnost *C. burnetii* u mlijeku predstavlja potencijalan rizik za zdravlje ljudi, iako su zabilježeni rijetki slučajevi svježeg sirovog mlijeka kao izvora zaraze s ovim patogenom. Njezina prisutnost u mlijeku vodi podrijetlo iz stada. Ovog je uzročnika jako teško ukloniti kako iz stada tako i iz kontaminirane opreme za mužnju ili uređaja preko kojeg se mlijeko distribuira (mljekomata). Stoga je kontinuirana kontrola sirovog mlijeka namijenjenog za javnu potrošnju bitna za daljnje veterinarsko higijenske mjere koje se mogu poduzeti u slučaju utvrđivanja prisutnosti *C. burnetii* s ciljem zaustavljanja i sprječavanja daljnjeg širenja. Osobito treba usmjeriti napore na kontinuirano nadziranje situacije u stadima i provođenje preventivnih veterinarsko sanitarnih mjera prilikom zbirnog prikupljanja mlijeka i pašnog držanja krava s različitih farmi.

Sažetak

C. burnetii uzročnik je Q-groznice u ljudi i predstavlja patogen od javno zdravstvenog značenja. Rezervoar bolesti su goveda, koze, ovce i druge životinje. Mlijeko iz mljekomata predstavlja jedan od mogućih izvora ovog patogena posebice u slučajevima kada se ono konzumira bez prethodne toplinske obrade. U nedostatku podataka o prisutnosti *C. burnetii* u sirovom mlijeku provedeno je prvo istraživanje prisutnosti ovog uzročnika u uzorcima sirovog mlijeka iz mljekomata u Hrvatskoj te je po prvi put uzročnik dokazan primjenom molekularne metode. Istraživanje je provedeno u dva ciklusa u veljači i lipnju te je utvrđena prevalencija od 17,54% (17,86 i 17,24%) uzoraka mlijeka, a kod tri proizvođača mlijeka ponovljeno u ovim uzorcima uzorkovanim u vremenskom razmaku od četiri mjeseca. Preporučuje se provoditi kontinuirani monitoring ovog patogena u stadima i provođenje preventivnih veterinarsko sanitarnih mjera prilikom mužnje, prerade i prodaje sirovog mlijeka s ciljem zadržavanja ove relativno niske prevalencije te sprječavanja širenja ovog

patogena koji se kad jednom dospije u stado teško uklanja.

Ključne riječi: sirovo mlijeko, mljekomat, *Coxiella burnetii*

Literatura

1. AGGER, J. F., A. CHRISTOFFERSEN, E. RATTENBORG, J. NIELSEN and J. S. AGERHOLM (2010): Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in Danish herds. *Acta Vet. Scand.* 52, 1-5.
2. ANGELAKIS, E. and D. RAOULT (2010): Q fever. *Vet. Microbiol.* 140, 297-309.
3. ARRICAU-BOUVERY, N. and A. RODOLAKIS (2005): Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet. Res.* 36, 327-349.
4. BECK, M. D. and J. A. BELL (1949): Q fever studies in southern California; an epidemiological study of 300 cases. *Public Health Rep.* 64, 41-56.
5. CAN, H. Y., M. ELMALÝ and A. KARAGÖZ (2015): Detection of *Coxiella burnetii* in cows', goats', and ewes' bulk milk samples using polymerase chain reaction (PCR). *Mljekarstvo* 65, 26-31.
6. CZAPLICKI, G., J. Y. HOUTAIN, C. MULLENDER, S. R. PORTER, M. F. HUMBLET, C. MANTECA and C. SAEGERMAN (2012): Apparent prevalence of antibodies *Coxiella burnetii* (Q fever) in bulk tank milk from dairy herds in southern Belgium. *Vet. J.* 192, 529-531.
7. BERRI, M., K. LAROUCAU, and A. RODOLAKIS (2000): The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 72, 285-293.
8. DE BRUIN, A., R. Q. VAN DER PLAATS, L. DE HEER, R. PAAUWE, B. SCHIMMER, P. VELLEMA, B. J. VAN ROTTERDAM and Y. T. VAN DUYNHOVEN (2012): Detection of *Coxiella burnetii* DNA on small ruminant farms during a Q fever outbreak in the Netherlands. *Appl. Environ. Microb.* 78, 1652-1657.
9. DELSING, C. E., C. P. BLEEKER-ROVERS, M. NABUURS-FRANSEN, T. SPRONG, A. J. VAN DER VEN and B. J. KULLBERG (2009): Q fever, a potential serious disease. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 153, 652-657.
10. DŽELALIJA, B. (2008): Q-vrućica: klinička, laboratorijska, epidemiološka i terapijska obilježja. *Medicus* 17, 63-69.
11. EFSA (2010): Scientific opinion on Q Fever. *EFSA Journal* 2010, 8, 1595.
12. ELDIN, C., E. ANGELAKIS, A. RENVOISE' and D. RAOULT (2013): *Coxiella burnetii* DNA, but not viable bacteria, in dairy products in France. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 88, 765-769.
13. FISHBEIN, D. B. and D. RAOULT (1992): A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 35-40.
14. FRETZ, R., W. SCHAEREN, M. TANNER and A. BAUMGARTNER (2007): Screening of various foodstuffs for occurrence of *Coxiella burnetii* in Switzerland. *Int. J. Food Microbiol.* 116:414-418.
15. GIACOMETTI, F., A. SERRAINO, G. FINAZZI, P. DAMINELLI, M. N. LOSIO, M. TAMBA, A. GARIGLIANI, R. MATTIOLI, R. RIU and R. G. ZANONI (2012): Field handling conditions of raw milk sold in vending machines: experimental evaluation of the behaviour of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Campylobacter jejuni*. *Ital. J. Anim. Sci.* 11, 132-136.
16. GUATTEO, R., F. BEAUDEAU, M. BERRI, A. RODOLAKIS, A. JOLY and H. SEEGER (2006): Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Vet. Res.* 37, 827-833.
17. KERSH, G. J., K. A. FITZPATRICK, J. S. SELF, R. A. PRIESTLEY, A. J. KELLY, R. R. LASH, N. MARSDEN-HAUG, R. J. NETT, A. BJORK, R. F. MASSUNG, A. D. ANDERSON (2013): Presence and Persistence of *Coxiella burnetii* in the Environments of Goat Farms Associated with a Q Fever Outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1697-1703.
18. KIM, S. G., E. H. KIM, C. J. LAFFERTY, and E. DUBOVI (2005): *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 619-621.
19. MARMION, B. P. and M. G. STOKER (1958): The epidemiology of Q fever in Great Britain; an analysis of the findings and some conclusions. *Brit. Med. J.* 2, 809-816.
20. MUSKENS, J., C. VAN MAANEN and M. H. MARS (2011): Dairy cows with metritis: *Coxiella burnetii* test results in uterine, blood and bulk milk samples. *Vet. Microb.* 147, 186-189.
21. NOGAREDA, C., S. ALMERIA, B. SERRANO, I. GARCIA-ISPIERTO and F. LOPEZ-GATIUS (2012): Dynamics of *Coxiella burnetii* antibodies and seroconversion in a dairy cow herd with endemic infection and excreting high numbers of the bacterium in the bulk tank milk. *Res. Vet. Sci.* 93, 1211-1212.
22. SEP-ŠEVERDIJA, B. (2009): Q GROZNICA – iz specijalističkog rada pod nazivom "Epidemiološka karakteristika Q groznice u Istarskoj županiji u razdoblju od 1968. do 2008. godine" (Obrana specijalističkog rada 17. rujna 2009. godine). *Javnozdravstveni glas - Glasilo Zavoda za javno zdravstvo Istarske županije* 37-38, 6-15.
23. TISSOT-DUPONT, H., V. VAILLANT, S. REY and D. RAOULT (2007): Role of sex, age, previous valve lesion, and pregnancy in the clinical expression and outcome of Q fever after a large outbreak. *Clin. Infect. Dis.* 44, 232-237.
24. VILTROP, A. and M. ROASTO (2013): Microbial risks to humans in Estonia in association with non-pasteurised milk consumption. Risk profile. *Estonian University of Life Sciences, Tartu.*

Presence of *Coxiella burnetii* in raw milk from milk vending machines in the Republic of Croatia

Brigita HENGL, DVM, PhD, Croatian Food Agency, Osijek, Croatia; Silvio ŠPIČIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Sanja DUVNJAK, BSc, PhD, Postdoctoral Student, Irena REIL, DVM, Andrea HUMSKI, DVM, PhD, Assistant Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Lidija KOZAČINSKI, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia; Ivančica KOVAČEK, DM, PhD, Spec. Med. Microb., Andrija Štampar Teaching Institute of Public Health, Zagreb, Croatia; Andrea BENUSSI SKUKAN, BSc, PhD, Center for Food Control, Zagreb, Croatia

C. burnetii is known as the cause of human Q-fever disease and as such is a pathogen of public health interest. Disease reservoirs are cattle, goats, sheep and other animals. Raw milk from vending machines is a potential source of this bacteria. For the first time in Croatia, raw milk from vending machines was sampled for molecular analyses on *C. burnetii* and this pathogen was confirmed for the first time. Due to a lack of evidence of the presence of *C. burnetii* in raw milk, this study included almost all milk vending machines in Croatia and was conducted in two sampling periods, in February and June. The mean prevalence of

C. burnetii in raw milk was 17.54% (17.86 and 17.25% by sampling period). However, it is of particular concern that this pathogen was found in both samples from three producers. Monitoring of *C. burnetii* and veterinary and sanitary measures during milking, processing and selling raw milk are recommended. This would assist in maintaining this relatively low prevalence and preventing the spread to other herds, where it will be very difficult to eradicate after pathogen first herd introduction.

Key words: raw milk, milk vending machine, *Coxiella burnetii*