

Toorpiima ohutuse alane uuring Eestis

ARUANNE

Projekti kestus: 01.06.2014-10.12.2014 a.

Projekti tellija: Eesti Vabariigi Põllumajandusministeerium

Projekti läbiviija: Eesti Maaülikool veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut

Aruande koostajad: prof. Arvo Viltrop, prof. Mati Roasto, dots. Piret Kalmus, dots. Kadrin Meremäe, doktorant Toomas Kramarenko

1. Sissejuhatus

Uuringu „Toorpiima ohutuse alane uuring Eestis“ peaesmärgiks oli hinnata 2014. aastal toorpiima otseturustavates karjades zoonoossete haigustekitajate levimust, võrrelda toorpiima ohutust ja kvaliteeti 2013. aasta pilootuuringu tulemustega ning hinnata juba rakendatud korrektiivmeetmete piisavust. Uuringusse kaasati 10 piimatootmisettevõtet, kellele oli välja antud veterinaartõend toorpiima turustamiseks väljaspool farmi (turud, müügiautomaadid, kauplused, jaemüügikohad), ja kes osalesid 2013. aasta toorpiima ohutuse alases pilootuuringus, ning jätkasid piima tootmist ja otseturustamist ka 2014. aastal.

2014. a. uurimisprojekti teiseks eesmärgiks oli hinnata *Salmonella* spp. ja Shiga-toksiine tootva *Escherichia coli* (*E. coli*) (STEC) piima sattumise tõenäosust nende tekitajate suhtes positiivsetes testkarjades teatud perioodi vältel. Laboratoorsed analüüsid teostati akrediteeritud meetodikatega Eesti Veterinaar- ja Toidulaboratooriumis ja Jõudluskontrollikeskuse piimanduslaboratooriumis.

2. Materjal ja meetodika

2014. aastal koguti uurimisalustes karjadest sama taustainformatsioon kui 2013. aastal, ja see hõlmas infot loomade tervisliku seisundi, lüpsihügieeni ning toodetava toorpiima koguste kohta. Farmi tankipiimast määrati somaatiliste rakkude arv (SRA), mikroobide üldarv ja mastiidipatogeenide esinemus. Mikroobide üldarvu uuriti ka sama partii toorpiimast võetud proovides kas müügikohtades või piimaautomaatides toorpiima realiseerimise viimasel päeval. Nii lüpsifarmi piimafiltrit kui jahutipiima uuriti *Listeria* (*L.*) *monocytogenes*’e, *Salmonella* spp., Shiga-toksiine tootva *E. coli* (STEC) ja kampülobakterite esinemise suhtes. Samuti teostati STEC serogruppide ja virulentsusmarkerite geenide määramine piimafiltritel ja tankipiimas. STEC tuvastamiseks ning serogruppide O157, O111, O26, O103 ja O145 määramiseks kasutati reaalaaja polümeerasahelreaktsioonil (*real-time* PCR) põhinevat meetodit. Meetodi kohaselt uuriti proovimaterjalist esmalt *stx1* ja *stx2* geenide olemasolu (esmane skriining) ning kui üks või teine neist tuvastatakse või tuvastatakse proovist mõlemad geenid, siis määratakse, millise serogrupiga, mainitud viiest, on tegemist. Lisaks määrati intimiini kodeeriva *eae* geeni olemasolu.

Ühest eelnevalt teadaolevast *Salmonella* positiivsest ja ühest STEC positiivsest karjast koguti üks kord nädalas viie nädala vältel tankipiimaproovid ja piimafiltrid. Tankipiimaproove uuriti viiest osaproovist.

3. Projekti tulemused

3.1. Farmide üldisloomustus

Komplekses toorpiima kvaliteedi uuringus osales 2014. aastal 10 karja, millest viis karja oli mahetootmisega ja viis tavatootmisega karjad. Neli farmi, mis osalesid toorpiimaalases pilootprojektis 2013. aastal, olid lõpetanud piima otseturustamise, mistõttu kahe aasta võrdluses nende karjade andmeid ei kasutatud.

Käesolevas projektis oli keskmine lehmade arv karjas 96. Kokku viies (50%) karjas peeti kuni 50 lehma, 51-100 lehma oli kahes ning üle 100 lehmaga karju oli kokku kolm.

Otseturustatava piima kogus oli proovivõtmise päeval 2126 kg. Üks kari turustas kogu toodetud piima otseturustusena, ülejäänud karjades jäi otseturustatava piima osakaal 4,6-90% vahele, olles keskmiselt 36,7%. Praakpiima osakaal proovivõtmise päeval oli keskmiselt 12,8% kogu toodetud piimast jäädes 1,9-30,7% vahele. Torusselüpsi ja platsillüpsi kasutavaid karju oli võrdselt.

3.2. Küsitluse tulemuste kokkuvõte 2013.-2014. aastal

Farmeritelt taustainformatsiooni kogumiseks kasutati sama küsitluslehte nii 2013. kui ka 2014. aastal.

Farmides läbi viidud küsitluse tulemused on ära toodud tabelis 1.

Tabel 1. Küsitluse tulemused 10s piima otseturustavas farmis 2013.-2014. aastal

Võte piimakvaliteedi tagamiseks	Võtet kasutatavate karjade arv (%) osakaal	
	2013	2014
Individuaalsed puhastuslapid igale lehmale	60%	70%
Kinnaste kasutamine lüpsmise ajal	90%	90%
Lüpsijärgne nisade desinfitseerimine	80%	80%
Kinnisperioodiaegne ravi	60%	70%
Haigete loomade viimasena lüpsmine	100%	100%
Kõrge SRAGA loomade viimasena lüpsmine	50%	90%
Piimaproovid haigustekitajate määramiseks		
Alati	10%	
Vahetevahel	70%	90%
Ei tee	20%	10%

Antibiootikumijääkide testide kasutamine farmis	40%	40%
Ravide registreerimine		
Märkmik	80%	70%
Märkmik ja arvuti	20%	30%
Loomaarsti teenus		
Kutse peale	80%	90%
Palgal	20%	10%
Siloanalüüsid		
Alati	50%	40%
Vahetevahel	20%	30%
Ei tee	30%	30%
Kõhulahtisuse esinemine veistel viimasel aastal	40%	20%
Farmitöötajate haiglaravi	20%	0%

Tulemustes selgub, et lüpsihügieenivõtteid muutis üks projektis osalenud kari. Kõrge SRAga lehmade viimasena lüpsmist oli hakanud rakendama 2014. aastal 9 karja võrreldes 2013. aasta viie karjaga. Erinevatel põhjustel oli 2013. aastal otseturustavale toorpiimale seatud kitsendused kolme karja piimale ja 2014. aastal kahe karja piimale. Väga hea udaratervisega karjades jääb haigestumus kliinilisse mastiiti alla 2% aastas (Green et al., 2009). 2014. aasta küsitluse põhjal ei registreeritud 40% karjades ühtegi kliinilise mastiidi juhtu kuus. Kahes karjas jäi haigestumus alla 2% kuus. Seega küsitluse põhjal oli 60% karjades haigestumus kliinilisse mastiiti üliväike. Siiski peab märkima, et karjades, kus ühtegi kliinilise mastiidi juhtu ei registreeritud, oli keskmine nädalane praakpiima osakaal 19,1%. Kuna lehmade udarapõletik on üks peamisi piima kvaliteeti ja koostist mõjutavaid haiguseid, tuleb toorpiima otseturustatavates karjades pöörata rohkem tähelepanu lüpsihügieenile ning karja omanikud peaksid sisse viima rutiinse mastiiditõrje programmi.

3.3. Mastiidipatogeenide esinemus uurimisalustes karjades

Tankipiima bakterioloogiline analüüs võimaldab kaudselt hinnata karja lüpsihügieeni ning *S. aureus*, *Str. agalactiae* ning *Mycoplasma* spp. positiivsete loomade olemasolu karjas. 2014. aastal oli *S. aureus* positiivseid karju kokku 5. Nendest neli olid ka 2013. aastal *S. aureus* poolt nakatunud karjad. Viiest projektis osalenud mahetootmisega karjast, neljal esineb

S. aureus poolt nakatunud loomi. Rooja normaalmikrofloorat (*E. coli*, enterokokid) esines viie karja tankipiimades, milles ühe karja tankipiimas esines mõlemaid mikroobiliike suurel hulgal. Hinnates küsitlusel välja toodud lüpsihügieeni võtteid tankipiima keskkonnabakteritega saastumisega, saab öelda, et halvema lüpsihügieeniga karjades on ka tankipiimas rohkem keskkonnabaktereid.

3.4. *Staphylococcus aureus* arvukus tankipiimas

Vastavalt põllumajandusministri määrusele nr 71 Toorpiima käitlemise hügieeninõuded, peab *S. aureus* arvukust määrama kord kahe kuu jooksul see peab jääma alla 500 pmü/ml. *S. aureus* arvukus osutus mittenõuetekohaseks ühe farmi piimaproovis, kus see ületas kehtestatud piinormi kolmekordselt. Analüüs samast proovist bakterite üldarvu suhtes näitas samuti bakterite kõrget kontsentratsiooni. Enamikel juhtudel jäi *S. aureus*'e arvukus proovides alla 10 pmü/ml.

3.5. Tankipiima somaatiliste rakkude arv, mikroobide üldarv ja müügipiima mikroobide üldarv 2013. ja 2014. aasta uuringutes

Mikroobide üldarv jäi 2014. aastal 7 farmi (70%) tankipiimaproovides alla 100.000 pmü/ml ning kolme farmi tankipiimas oli bakterite arv sellest suurem (Tabel 2). Jaemüügi tasandilt võetud piimaproovides, kus analüüsid teostati "kõlblik kuni" viimasel päeval, olid arvukused koguni 5 farmi puhul kõrgemad kui 100.000 pmü/ml.

Kahest farmist ei võetud jaemüügi tasandil piimaproove ning piirduti vaid farmitasandi proovidega. Neist ühe piimatootmisettevõtte puhul, kus toodang realiseeriti ühe ööpäeva jooksul, ületas bakterite üldarv tankipiimaproovis 100.000 pmü/ml piiri enam kui viiekordselt (530.000 pmü/ml). Teises farmis toorpiima otseturustamist uurimise hetkel ei toimunud.

Võrreldes bakterite sisaldust müügipunktides võetud proovides kahel järjestikusel aastal, tuleb tõdeda, et statistiliselt olulist nihet paremusele toimunud ei ole ($p = 0,68$). Valimisse haaratud 10 müügipunktis ületasid bakterite üldarvud 100.000 pmü/ml piiri 2013. aastal 6-s ning 2014. aastal 5-s müügikohas, kusjuures kolme müügikoha puhul oli täheldatav tingliku piirmäära ületamine mõlemal aastal.

Somaatiliste rakkude arv jäi 9 farmi piimaproovides alla 400.000 raku/ml. Siiski ühe karja piimaproovi puhul ulatus see 768.000 rakuni/ml. Samas proovis tuvastati ka väga kõrge bakterite üldarv. 2013. aastal ületas kahe karja tankipiima SRA kehtestatud piirmäära, millest ühes karjas on tuntavalt vähenenud nii SRA kui ka mikroobide üldarv võrreldes 2013. aasta andmetega. Kuigi 2013. aasta karjade keskmine jahutipiima SRA oli kõrgem (340.300

rakku/ml) võrreldes 2014. aastaga (256.000 rakku/ml), statistilist erinevust ei esinenud ($p = 0,17$).

Tabel 2. Uuringus osalenud karjade somaatiliste rakkude arv, mikroobide üldarv 2013. ja 2014. aastal

Farm	Somaatiliste rakkude arv		Mikroobide üldarv tankipiimas ja müügipiimas 2013		Mikroobide üldarv tankipiimas ja müügipiimas 2014		
	2013	2014	Tankipiim	Müügipiim	Tankipiim	Müügipiim	RA*
1	632000	75000	16000000	20000000	20000	37000	4 ööpäeva
2	777000	768000	12000	2100000	530000	x	x
3	313000	160000	1500	290000	7500	660000	3 ööpäeva
4	384000	132000	75000	76000	4100000	24000000	3 ööpäeva
5	263000	261000	18000	710000	50000	850000	1 ööpäev
6	162000	217000	130000	22000	26000	x	x
7	156000	195000	9000	13000	130000	260000	4 ööpäeva
8	143000	215000	8000	380000	12000	590000	4 ööpäeva
9	267000	146000	35000	3200000	6000	4500	3 ööpäeva
10	306000	398000	5000	5000	5000	64000	2 ööpäeva

*Müügipiima realiseerimisaeg päevades

x, jaemüügitasandilt piimaproovi ei võetud

3.6. *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. ja Shiga-toksiine tootva *E. coli* esinemus toorpiimaproovides

Uuringusse kaasatud farmide piimafiltritest ning tankipiimaproovidest termofiilseid kampülobaktereid ja salmonellasid, sarnaselt 2013. aasta uuringutulemustega, ei tuvastatud.

Molekulaarse sõeluuringu tulemusel tuvastati 2014. aastal STEC esinemisele viitavaid gene 7 farmi (70%) eritüübilistest proovidest (tabel 3). Kui kolmes farmis osutusid *stx* geenidele positiivseks nii piimafiltri kui tankipiimaproovid, siis kahe farmi puhul vaid piimafiltrid. Kahes farmis oli piimafilter negatiivne, kuid tankipiima osaproovid positiivsed. Selline

muster ning tõik, et edasine korduv eluvõimeliste bakterite isoleerimine ei osutunud tulemuslikuks, viitab potentsiaalsete haigustekitajate väga madalale sisaldusele antud proovides. D'Amico *et al.* (2008) hinnangul jääb *E. coli* O157:H7 sisaldus toorpiimas reeglina alla 1 pmü milliliitri kohta. Trevisani *et al.* (2013) näitasid, et toorpiimaproovidest, kus STEC sisaldus on väga madal, oli bakterite konventsionaalne isoleerimine raskendatud ning tuvastamismäär seetõttu madal. Seda kahel põhjusel. Esiteks pole STEC isoleerimiseks senini kasutusel oleva konventsionaalse mikrobioloogilise meetodika spetsiifilisus ja tundlikkus 100% eelkõige proovides prevaleeriva kõrvalmikrofloora tõttu, mis läbi oma mittespetsiifilise immunomagnetilistele partiklitele seondumise segab tugevalt nende väheste otsitavate STEC rakkude isoleerimist. Teisalt on näidatud (Farrokh *et al.*, 2013; Oliver, 2010), et patogeensed bakterid sh STEC on võimeline mitmete stressifaktorite mõjul minema mittekultiveeritavasse staadiumi (VBNC- *viable but not culturable*). Selles staadiumis bakterid säilitavad küll oma eluvõime, kuid ei paljune, mistõttu pole neid võimalik tavalistel mikrobioloogilistel söötmetel ka kasvatada ning isoleerida. VBNC bakterite tuvastamiseks kasutatakse läbivoolutsütomeetria ning uuringuid molekulaarsete meetoditega.

EFSA 2013. aasta BIOHAZ paneeli teaduslikule arvamusele toetudes saab väita, et geenide kombinatsioon *stx2* (Shigatoksiin 2) ja *eae* (intimiin) omavad võrreldes teiste *E. coli* geenikombinatsioonidega suuremat riski tõsiste haigusjuhtumite tekkes. Käesolevas uuringus avastati kuue lüpsifarmi (60%) piimafiltril ja/või tankipiima proovis mainitud geenikombinatsiooni esinemine.

STEC serogruppe ning virulentsusmarkereid kodeerivate geenide esinemine valimisse kuulunud karjades 2013. ja 2014. aastal on esitatud tabelis 4.

STEC-i esinemissagedustes kahel järjestikusel aastal (2013/2014) võetud piimafiltri proovides statistiliselt olulist erinevust ei esinenud ($p = 1$). Piimafiltri ja tankipiimaproovid, mis molekulaarse sõeluuringu käigus osutusid 2014. aastal STEC esinemise suhtes positiivseiks, pärinesid enamuses farmidest, mille tulemused olid positiivsed ka 2013. aasta uuringus. Samuti ei ole märgata statistiliselt olulist erinevust serogruppide O26, O103, O145 ja O157 esinemissagedustes. Serogrupile O111 viitavaid geene mõlemal aastal võetud proovides ei tuvastatud.

Tabel 3. STEC serogruppide ja virulentsusmarkerite geenide esinemine piimafiltritel ja tankipiimas 2014. aastal

Farm	Prooviliik	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	O26	O103	O111	O145	O157	Serogrupp teadmata
1	Piimafilter	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tankipiim	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Piimafilter	-	+	-	-	-	-	-	-	+
	Tankipiim	-	+	+	+	-	-	-	-	-
3	Piimafilter	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tankipiim	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Piimafilter	-	+	-	-	-	-	-	-	+
	Tankipiim	-	+	+	-	-	-	-	-	+
5	Piimafilter	-	+	+	-	-	-	+	-	-
	Tankipiim	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Piimafilter	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	Tankipiim	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Piimafilter	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tankipiim	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Piimafilter	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	Tankipiim	-	+	-	-	-	-	-	-	-
9	Piimafilter	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tankipiim	-	+	+	+	-	-	+	-	-
10	Piimafilter	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tankipiim	-	+	+	+	+	-	-	+	-
Kokku	Piimafilter	0/0%	5/50%	2/20%	0/0%	2/20%	0/0%	1/10%	0/0%	2/20%
	Tankipiim	0/0%	5/50%	4/40%	3/30%	1/10%	0/0%	1/10%	1/10%	1/10%
	Kokku	0/0%	7/70%	6/60%	3/30%	3/30%	0/0%	2/20%	1/10%	2/20%

-, ei tuvastatud

+, tuvastati

Tabel 4. STEC serogruppide ja virulentsusmarkerite geenide esinemine 2013 ja 2014. aastal farmide piimafiltritel või tankipiimades

Farm	<i>stx1</i>		<i>stx2</i>		<i>eae</i>		O26		O103		O111		O145		O157	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-
3	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
9	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+
	0/10	0/10	7/10	7/10	6/10	6/10	1/10	3/10	4/10	3/10	0/10	0/10	5/10	2/10	3/10	1/10

-, ei tuvastatud

+, tuvastati

3.7. *Listeria monocytogenes* tuvastamine

L. monocytogenes tuvastati kolme farmi proovides: ühes farmis üksnes piimafiltri proovist; ühes farmis nii piimafiltrist kui tankipiimaproovist ning ühes farmis üksnes tankipiimaproovist.

2013. aastal müügipunktidest (enamasti toorpiima automaatidest) võetud piimaproovide "kõlblik kuni" viimasel kuupäeval tehtud arvukuse analüüsid osutusid negatiivseks ehk *L. monocytogenes* arvukus 1 ml piimas jäi alla määramispiiri, mis viitab asjaolule, et bakteri arvukus toorpiimas on üldjuhul väga madal. Seda fakti toetavad ka 2014. aasta uuringuandmed, kus tankipiimaproovid uuriti viie osaproovina. Kahe farmi positiivsete tankipiimaproovide puhul osutus 5-st osaproovist positiivseks mõlemal juhul vaid üks osaproov. Samuti saab bakteri madala kontsentratsiooniga selgitada tõika, miks kahest farmist pärit proovides osutus *L. monocytogenes*'e osas positiivseks vastavalt üksnes piimafiltri ja tankipiimaproovid. Kõrgema arvukuse puhul oleks mikroobide jaotumus proovides olnud ühtlasem ning seeläbi ka positiivsete osaproovide osakaal suurem. D'Amico *et al.* (2008) ning Waak *et al.* (2002) on oma töödes näidanud, et toorpiima patogeenidega saastatus on erakordselt madal, ulatudes *L. monocytogenes*'e puhul < 1 kuni 60 bakterirakuni milliliitris. Van Kessel *et al.* (2004) andmeil on bakterikontsentratsioonid veelgi madalamad ulatudes 1 kuni 40 pmü-ni 10 milliliitri toorpiima kohta.

Kõrvutades 2013. ning 2014. aastal läbiviidud uuringute tulemusi, ei ole nii piimafiltri kui tankipiimaproovide puhul märgata *L. monocytogenes*'e esinemissagedustes statistiliselt olulist erinevust ($p = 0,65$ ja $p = 1$). Ühe farmi tankipiimaproovides tuvastati *L. monocytogenes*'e esinemine mõlemal järjestikusel aastal.

3.7.1. *L. monocytogenes* kestvuskatse

EFSA 2007. aastal avaldatud teadusliku arvamuse kohaselt, kus käsitleti *L. monocytogenes* riski valmistoitutes, on rahvatervisele avalduv oht olemas siis, kui arvukused ületavad märgatavalt 100 pmü/g (EFSA, 2007). Selleks, et hinnata *L. monocytogenes* kasvupotentsiaali toorpiimas, teostati Veterinaar- ja Toidulaboratooriumis kestvuskatsed EL-i *Listeria monocytogenes* referentlaboratooriumi tehnilises juhenddokumendis (versioon 3, 06.06.2014) kirjeldatud korrale. Võrdlusmaterjalina kasutati pastöriseeritud piima.

Katsed viidi läbi kahe erineva *L. monocytogenes* tüvega ning bakteri arvukus määrati 0, 24, 48, 72 ja 96 tunnil. Esimene katseseeria viidi läbi 6 °C temperatuuri juures. Teine katseseeria teostati temperatuuril 22 °C esimesed 48 tundi ning seejärel temperatuuril 6 °C 24 tundi.

Esimese katseseeria tulemused on näha joonistel 14. Selgub, et pastöriseeritud piimas oli *L. monocytogenes* kasv märkimisväärselt kiire ning kasvupotentsiaali väärtus kõrge – vastavalt 1,66 ning 1,79. Leitud arvvaartused näitavad, et arvulise piirnormi 100 pmü/ml ületamiseks 96 h säilivusaja jooksul piisab väga madalast *L. monocytogenes*'e sisaldusest proovis (<5 pmü/ml). Algkontsentratsiooni 10 pmü/ml puhul on bakterite hinnanguline lõppkontsentratsioon pärast 96 h nõuetekohast säilitamist vastavalt 460 ja 620 pmü/ml.

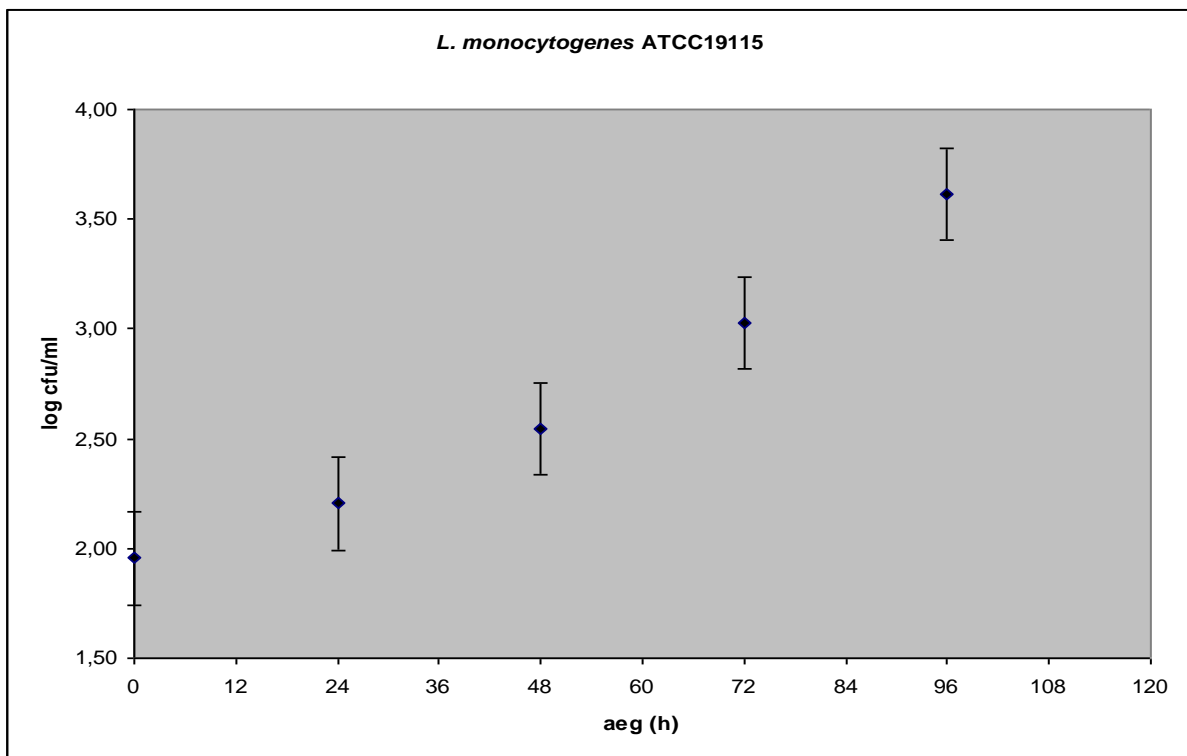
Seevastu oli temperatuuri 6 °C juures säilitatud toorpiima puhul täheldatav ilmselge *L. monocytogenes* kasvu pidurdav toime. Toitu klassifitseeritakse *L. monocytogenes*'e kasvu toetavaks, kui viimase kasvupotentsiaal δ jääb üle 0,5 log pmü/g. Nimetatud katsetes leitud kasvupotentsiaalide väärtused jäid sellele alla – vastavalt 0,24 ja 0,42. Leitud väärtusi ning toorpiima piiratud realiseerimisaega (maksimaalselt 96 h) arvestades ei tohiks valmistoitudele kehtestatud piirnormi bakterite madalate kontsentratsioonide juures ning nõuetekohaste säilitamistingimuste (maksimaalselt 6 °C) puhul ületatud saada. Eriliselt toonitame nõuetekohaste säilitamistingimuste tähtsust, sest meie teine katseseeria, kus mimikeeriti kõrgemate säilitamistemperatuuride mõju *L. monocytogenes* kasvupotentsiaalile toorpiimas, näitas kasvupotentsiaali väärtusi üle ühe (vaata tulemusi allpool).

L. monocytogenes kasvu mõjutavaid faktoreid toorpiimas on varasemalt uuritud ning leitud, et patogeen kasvab nii toorpiimas kui ka toorpiimast valmistatud juustus tunduvalt aeglasemalt võrreldes pastöriseeritud piimaga ning pastöriseeritud piimast valmistatud juustuga (Gay ja Amgar, 2005). Gay ja Amgar (2005) uuringus leiti, et *L. monocytogenes* kasvu pidurdumine toorpiimas oli osaliselt tingitud laktoperoksüdaas süsteemist (LPS). Lisades toorpiimale tiotsünaati ning vesinikperoksiidi saavutati veelgi suurem *L. monocytogenes* kasvu inhibeerimine piimas. Lisaks leiti, et toorpiimast valmistatud Camembert juustus mõjutas *L. monocytogenes* kasvu kõige enam juustu mikrobioloogiline koostis, eriti termofiilsete piimhappebakterite ning pärmide arvukas esinemine. Kõrge pärmseente arvukus toorpiimajuustus pikendas oluliselt *L. monocytogenes* lag-faasi kestvust ning võrreldes pastöriseeritud piimast valmistatud Camembert juustuga olid *L. monocytogenes* arvukused oluliselt väiksemad. Kokkuvõtvalt järeldati, et olulisteks *L. monocytogenes* inhibeerimisfaktoriteks toorpiimas on nii selle keemiline kui mikrobioloogiline koostis.

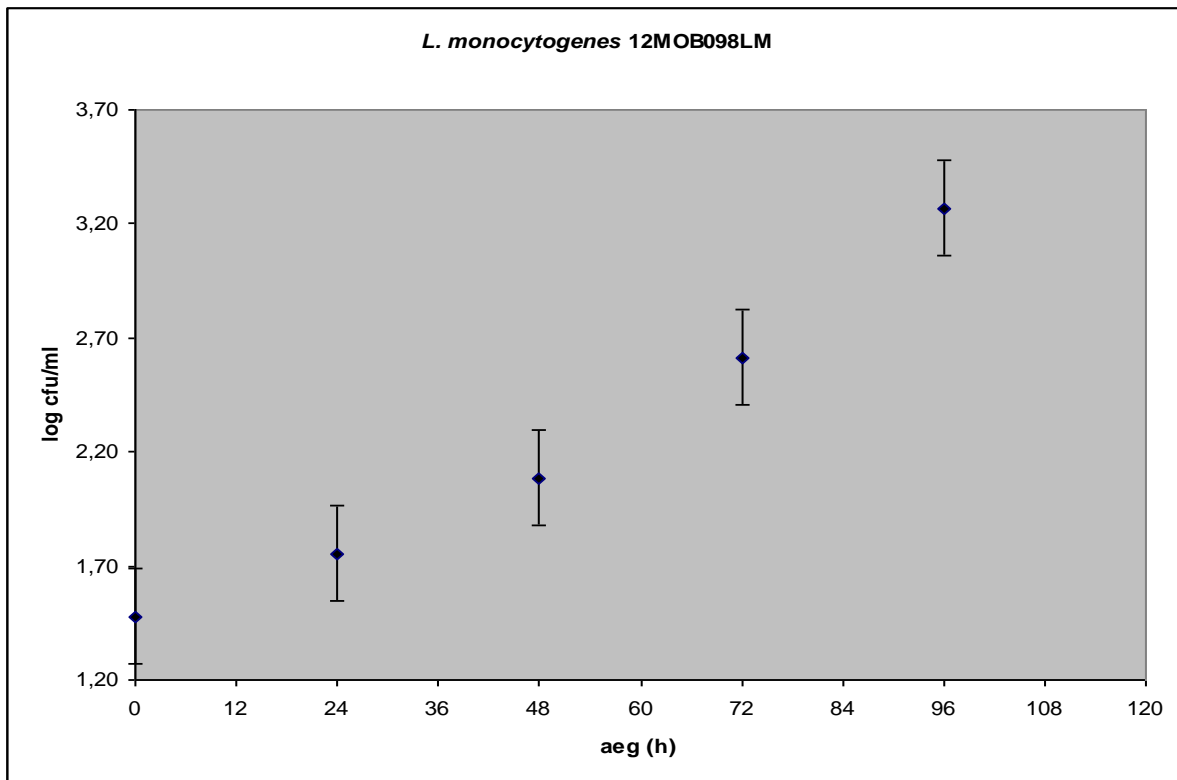
Ameerika Ühendriikides teostatud riskihindamise tulemusena on leitud, et toorpiima tarbijatele on listerioosi haigestumise tõenäosus mitmeid korda suurem juhtudel, kus toorpiima ostetakse mitte otse farmist vaid nt jaemüügi tasandilt. Mida pikem on külmaketi ajaline kestus, seda suuremad on võimalused *L. monocytogenes* arvukuse tõusuks. Uuringutes on leitud, et haigestumise tõenäosust mõjutas kõige enam kodukülmkappide temperatuur nt

toorpiima säilitamistemperatuuri tõstmine 4 °C-lt 8 °C-ni põhjustas prognoositavate listerioosi juhtumite 7-kordse tõusu (King et al., 2014).

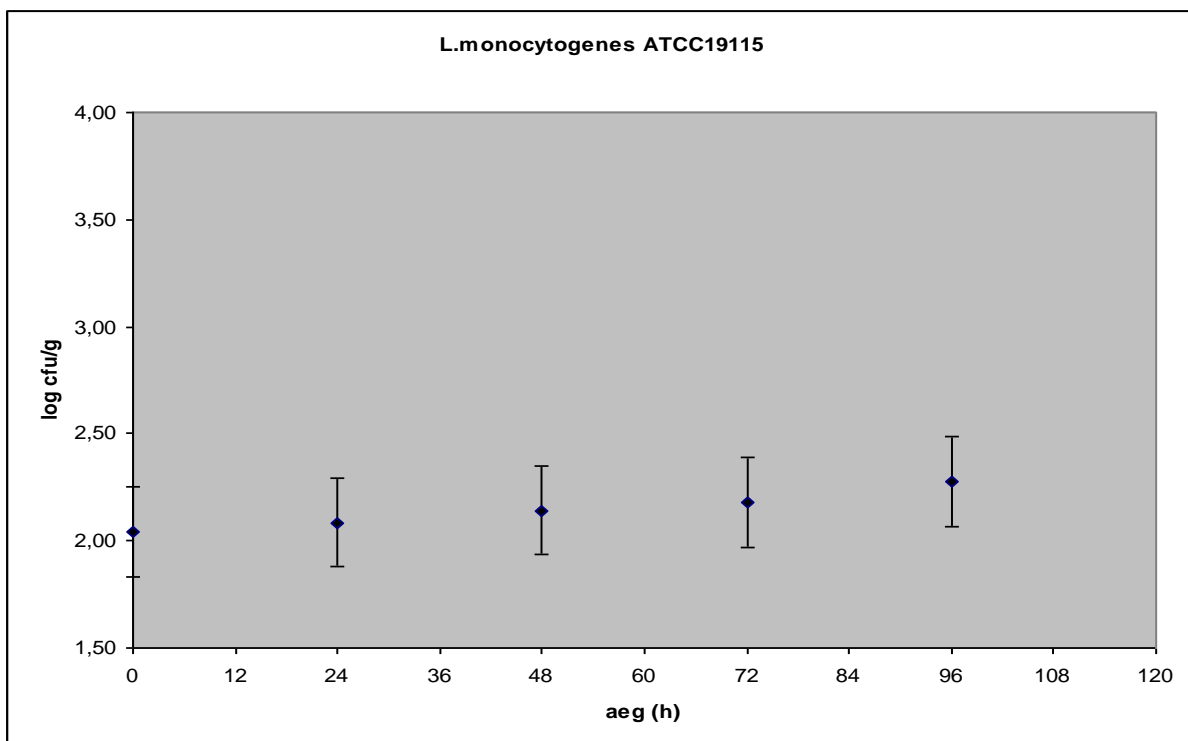
Meie teise katseseeria eesmärk oli mimikeerida olukorda, kus tarbija ostab toorpiima hapendamise eesmärgil. Selleks hapendati *L. monocytogenes*'e bakteritega nakatatud toorpiima algselt temperatuuril 22 °C 48 h jooksul, millele järgnes 24 h säilitamine 6 °C juures. Bakteri arvukus määrati 0, 24, 48 ja 72 tunnil. Katsetulemustest järeldub, et toorpiimas endas esinevate looduslike inhibiitorite toime *L. monocytogenes*'e kasvule on toatemperatuuril selgelt nõrgem. Kasvupotentsiaalide väärtused 22 °C juures 48 h puhul vastavalt 1,51 ja 1,45 log cfu/ml (6 °C juures on need vastavalt 0,10 ja 0,26). See tähendab, et piisab vaid 6–13 *L. monocytogenes*'e bakterirakust milliliitris toorpiimas, et valmistoitudele kehtestatud piirnorm 100 pmü/ml saaks 24 h jooksul ületatud. Pärast 48 h hapendamist ulatub listeria bakterite kontsentratsioon samade algkontsentratsioonide juures hinnanguliselt juba 190–380 rakuni milliliitris.



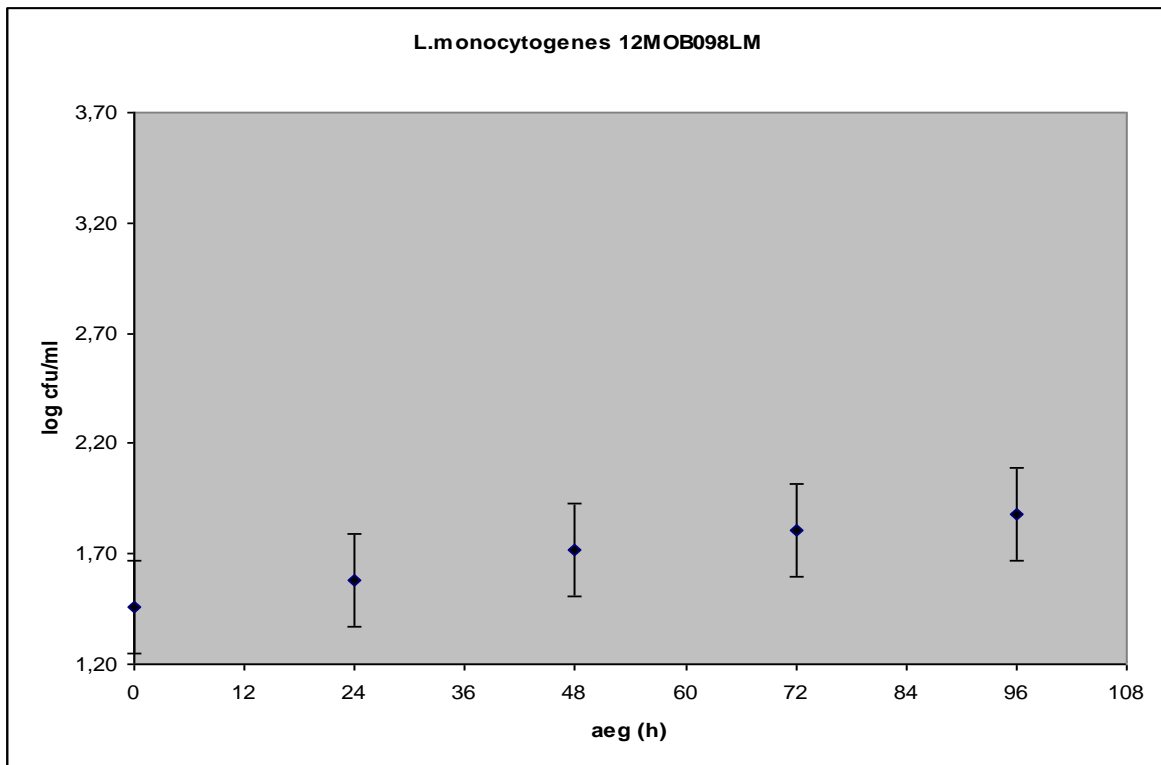
Joonis 1. *L. monocytogenes* ATCC19115 kasvukõver pastöriseeritud piimas esimesed 96 h temperatuuril 6 °C. Tulemused on esitatud koos mõõtemääramatusega ($k = 2$). Kasvupotentsiaal $\delta = 1,66$ (log pmü/ml).



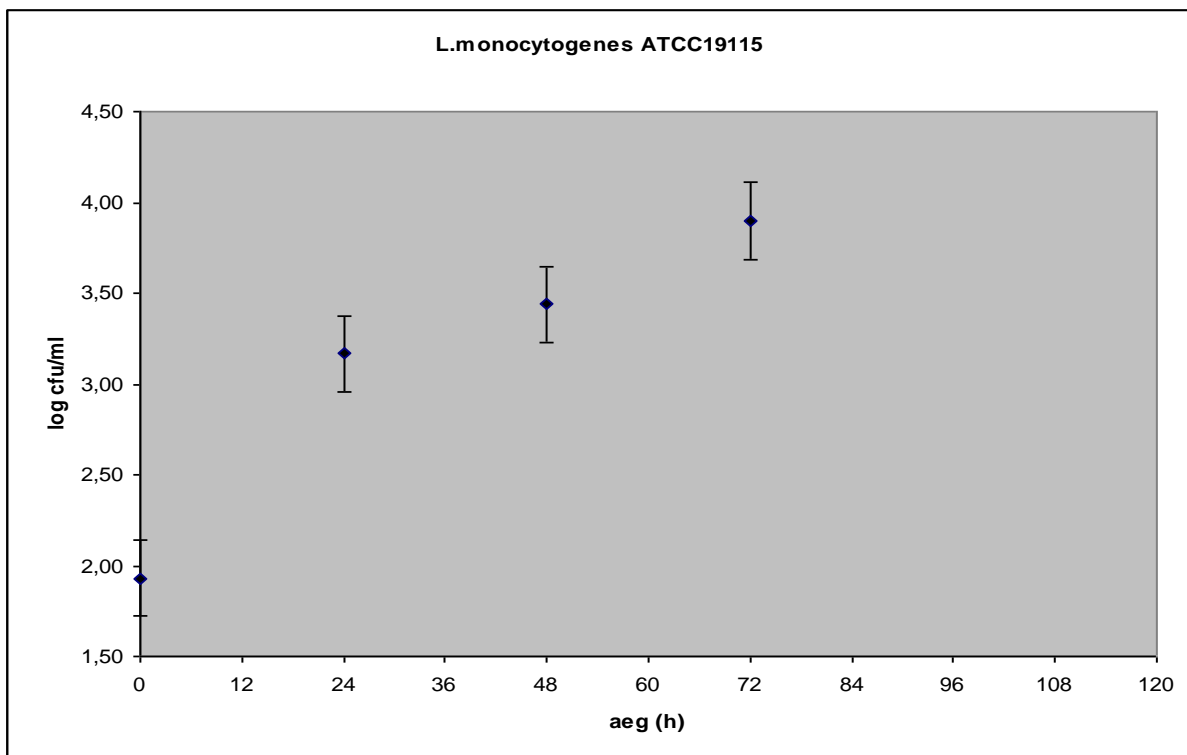
Joonis 2. *L. monocytogenes* 12MOB098LM kasvukõver pastöriseeritud piimas esimesed 96 h temperatuuril 6 °C. Tulemused on esitatud koos mõõtemääramatusega ($k = 2$). Kasvupotentsiaal $\delta = 1,79$ (log pmü/ml).



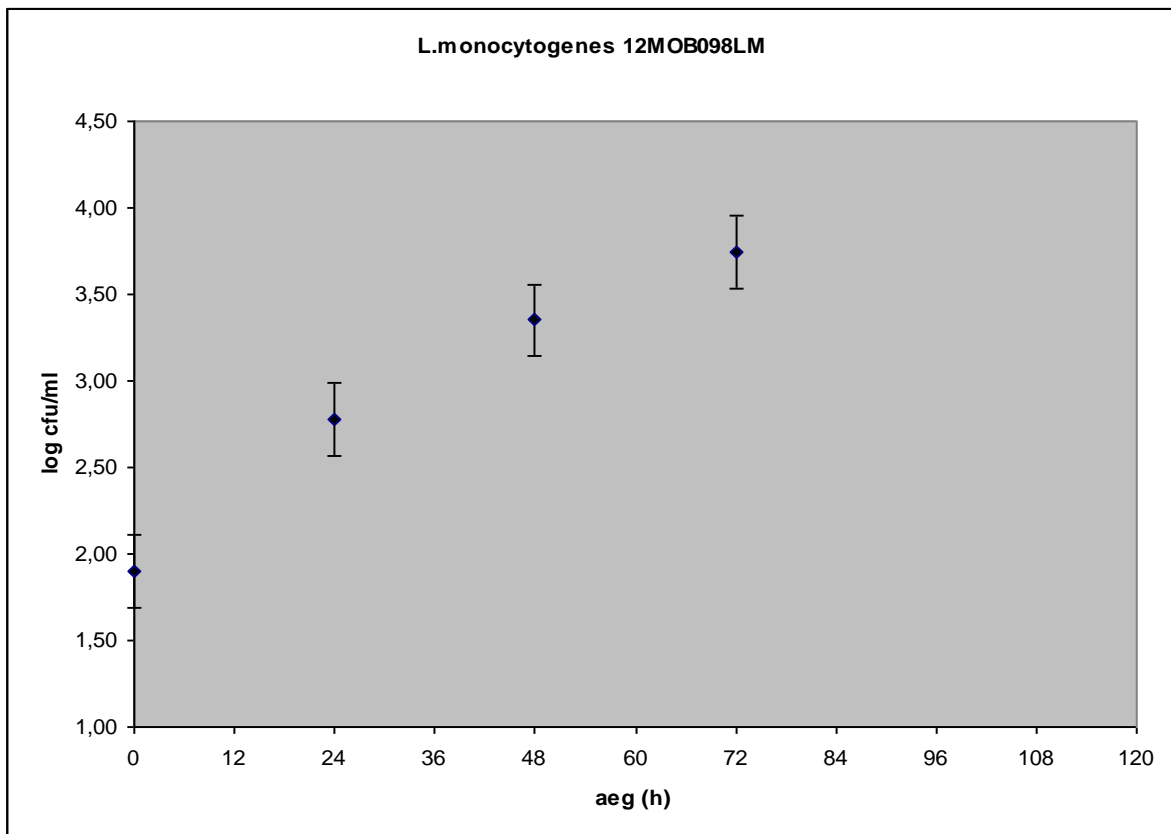
Joonis 3. *L. monocytogenes* ATCC19115 kasvukõver toorpiimas esimesed 96 h temperatuuril 6 °C. Tulemused on esitatud koos mõõtemääramatusega ($k = 2$). Kasvupotentsiaal $\delta = 0,24$ (log pmü/ml).



Joonis 4. *L. monocytogenes* 12MOB098LM kasvukõver toorpiimas esimesed 96 h temperatuuril 6 °C. Tulemused on esitatud koos mõõtemääramatusega ($k = 2$). Kasvupotentsiaal $\delta = 0,42$ (log pmü/ml).



Joonis 5. *L. monocytogenes* ATCC19115 kasvukõver toorpiimas temperatuuril 22 °C (48 h) ja seejärel 6 °C (24 h). Kasvupotentsiaal $\delta = 1,97$ (log pmü/ml).



Joonis 6. *L. monocytogenes* 12MOB098LM kasvukõver toorpiimas temperatuuril 22 °C (48 h) ja seejärel 6 °C (24 h). Kasvupotentsiaal $\delta = 1,85$ (log pmü/ml).

3.8. *Salmonella* spp. positiivse ja STEC positiivse karja toorpiimaproovide uurimine

Uuringusse kaasati kaks karja, millest ühes oli diagnoositud 2014. aastal vasikatel *S. Typhimurium* ning teises karjas vasikate roojaproovidest *E. coli* O26 esinemine. Karjadest võeti viie nädala vältel üks kord nädalas tankipiimaproov (5 osaproovi) ning samal päeval kasutuses olnud piimafilter.

Ühestki toorpiimaproovist (n=25) ega piimafiltrilt ei tuvastatud salmonellasid.

STEC positiivses karjas tuvastati STEC geenid kolmel nädalal viiest piimafiltrilt ja vähemalt ühest tankipiima osaproovist (vt tabel 5). Seejuures tuvastati esimesel nädalal STEC vaid piimafiltrilt ja kolmandal nädalal ainult ühest tankipiima osaproovist. Sellest võib järeldada, et STEC eritumine nakatunud karjas varieerub suurtes piirides. Enamus juhtudel on eritumine madalal tasemel, kuid periooditi see intensiivistub (nädal 5, kolm osaproovi viiest positiivne). Siiski selgub uuringu tulemustest, et bakterite sisaldus piimas on sedavõrd madal, et ühelgi nädalal võetud proovidest ei osutunud kõik osaproovid positiivseks. Sellest võib järeldada, et üks tankipiimaproov ei ole piisav nakkuse tuvastamiseks piimas.

Tabel 5. STEC serogrupi- ja virulentsusgeenid farmi piimafiltrit ja tankipiimas

Proovivõtu kuupäev	Maatriks	PCR tulemused							
		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	O157	O145	O026	O103	O111
26.08.2014	Piimafilter	+	+	+	+	+	+	+	+
	Tankipiima osaproovid Nr 1-5	-	-	-	-	-	-	-	-
2.09.2014	Piimafilter	-	+	+	-	+	-	+	-
	Tankipiima osaproovid Nr 1;3;5	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nr 2	-	+	+	-	-	+	+	-
	Nr 4	-	+	+	-	-	-	+	-
9.09.2014	Piimafilter	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tankipiima osaproovid Nr 1-4	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nr 5	-	+	+	-	-	-	+	-
16.09.2014	Piimafilter	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tankipiima osaproov Nr 1-5	-	-	-	-	-	-	-	-
23.09.2014	Piimafilter	+	+	+	-	+	-	+	-
	Tankipiima osaproovid Nr 1 ja 5	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nr 2	+	+	+	-	-	-	+	-
	Nr 3	+	+	+	-	-	-	+	-
	Nr 4	+	+	+	-	-	-	+	-

4. Kokkuvõte ja järeldused

1. Lüpsihügieeni võtteid muutis paremaks üks 2013 aastal ebapiisava lüpsihügieeniga kari. Kolm karja, kus 2013 aastal lüpsihügieenivõtted olid mittepiisavad, ei olnud aasta jooksul muutusi teinud.
2. Võrreldes 2013 aastaga, ei olnud 2014 aastal statistilist erinevust farmide jahutipiimast võetud proovide mikroobide üldarvus. Kui 2013 aastal ületas mikroobide üldarv 100.000 pmü/ml 21,4%-l farmidest, siis 2014 aastal 30%-l farmidest.
3. Võrreldes 2013 aastaga, ei olnud 2014 aastal statistilist erinevust müügikohast võetud proovide mikroobide üldarvus. Kui 2013 aastal ületas 100.000 pmü/ ml 71,4% juhtudest, siis 2014 aastal 50% proovidest.
4. *Salmonella* spp. ja *Campylobacter* spp. baktereid uuritud farmide piimafiltri ja tankipiima proovidest ei tuvastatud 2013 ega 2014 aastal.

5. *Listeria monocytogenes* tuvastati 2013 aastal 35,7% ja 2014 aastal 30% piimafiltritel või tankipiimas. Statistilist erinevust kahe aasta võrdluses ei leitud.
6. Molekulaarse sõeluuringu tulemusel tuvastati 2014. aastal STEC esinemisele viitavaid gene 7 farmi (70%) eritüübilistest proovidest ja 2013 aastal 64,3% piimafiltri proovidest. Statistilist erinevust ei leitud. Mitmes karjas tuvastati üheaegselt mitme STEC O serogrupi olemasolu.
7. Üksikutes osaproovides *L. monocytogenes* ja STEC-i tuvastamine viitab antud patogeenide madalale arvukusele tankipiima proovides.
8. *L. monocytogenes* kestvuskatsed näitasid, et bakteri kasvupotentsiaal õigetes säilitamistingimustes on madal. Toorpiima hapendamisel toatemperatuuril oli bakteri paljunemine eksponentsiaalne.
9. Teadaolevast *Salmonella* suhtes positiivsest karjast uuritud jahutipiima proovidest *Salmonella* spp. ei leitud.
10. Teadaolevast VTEC positiivsest karjast leiti neljal nädalal viiest VTEC geenide esinemist kas piimafiltril või jahutipiima osaproovides.
11. Uuringus kasutatud proovivõtuskem, kus tankipiimast võeti ning analüüsiti 5 osaproovi patogeenide esinemise suhtes oli õigustatud, kuna mitmel juhul tuvastati patoogen üksikutes osaproovides. Antud hetkel kasutuselolev proovivõtukava on puudulik kuna üksikproovide analüüsimine ei anna tõest pilti patogeenide esinemisest tankipiimas.

Tuginedes 2013 ja 2014 aastal läbiviidud projekti tulemustele on soovitatav ajakohastada siseriiklikud nõuded otseturustatavale toorpiimale.

5. Kasutatud kirjandus

- D'Amico, D.J., Groves, E., Donnelly, C. W. 2008. Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *J. Food Prot.* 71:1580-1589.
- EFSA, European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. 2007. The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *EFSA Journal*; 130: 1-352.
- Farrokh, G., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condron, R., De Reu, K., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Miszczycha, S., Moussiégt, S., Verstraete, K., Cerf, O. 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology* 162 (2): 190–212.
- Gay, M., Amgar, A. 2005. Factors moderating *Listeria monocytogenes* growth in raw milk and in soft cheese made from raw milk. *INRA, EDP Sciences*, 85, 153-170.
- King, N., Lake, R., Cressey, P. 2014. Risk Profile: *Listeria monocytogenes* in Raw Milk. MPI Technical Paper No: 2014/16, ISBN No: 978-0-478-43214-5 (online); ISSN: No: 2253-3923 (online).
- Oliver, J. D. 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34 (4): 415–25.
- Trevisani, M., Mancusi, R., Riu, R., Serraino, A. 2013. Quantitative detection of Shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes O157 and O26 in bulk raw milk. *Food Anal. Methods* 6, 1750 – 1758.
- Van Kessel, J.S., Kams, J.S., Gorski, L., McCluskey, B.J., Perdue, M.L. 2004. Prevalence of salmonellae, *Listeria monocytogenes* and fecal coliforms in bulk tank milk in US dairies. *J. Dairy Sci.* 87:2822-2830.
- Waal, E., Tham, W., Daniellsson-Tham, M.L. 2002. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3366-3370.