

MOGUĆNOST PRIMENE RAZLIČITIH SKRINING METODA ZA KONTROLU REZIDUA ANTIBIOTIKA U MLEKU

Jelena Apić¹, Jelena Petrović, Olga Rackov, Dubravka Milanov

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad

Kratak sadržaj

Rezidue antibiotika u mleku mogu štetno delovati i na zdravlje ljudi i na mlecarsku tehnologiju. Da bi se sprečili nepoželjni efekti rezidua danas se koriste različite skrining metode za kavalitativno ispitivanje rezidua antibiotika u mleku. Cilj rada je da se primenom različitih skrining metoda uporedno ispita prisustvo rezidua antibiotika u uzorcima mleka iz različitih faza proizvodnog lanca (od sirovine do gotovog proizvoda). Izabrane su tri skrining metode koje se najčešće koriste u praksi: Delvo SP test, difuzionna metoda sa *B. stearothermophilus* i Penzim S test. Ukupno je ispitano 60 uzoraka mleka uzorkovanog iz različitih faza proizvodnje mleka od farme do gotovog proizvoda. Ispitivanjima je ustanovljena visoka međusobna podudarnost testova. Razlike koje se javljaju prilikom ispitivanja istog uzorka različitim metodama proističu iz različite osetljivosti ovih metoda. Delvo SP test je osetljiv prema antibioticima, sulfonamidima, dezinficijensima i inhibitornim materijama iz mleka (laktoferin, lizocim, laktoperoksidaza). Difuzionna metoda je osetljiva prema antibioticima, dok je Penzim S test osetljiv samo prema β -laktamskim antibioticima. Visoka podudarnost Penzim S testa sa ostala dva testa potvrđuje da su β -laktamski antibiotici najčešća vrsta rezidua koja se može naći u mleku. Razlike u rezultatima takođe mogu nastati i zbog razlika u pragu detekcije prema istim antibioticima. Na osnovu izvršenih ispitivanja ustanovljen je visok procenat uzoraka mleka koje sadrži rezidue antibiotika 30% u tanku na farmi, 20% u cisterni u mlekari i 20% u pasteizovanom i sterilizovanom mleku u prometu. Na osnovu uporednih ispitivanja difuzione metode, Delvo SP testa i Penzim S testa zaključujemo da su sve tri metode u visokoj međusobnoj saglasnosti i time ispunjavaju jedan od kriterijuma za uključivanje u sistematsku kontrolu mleka na prisustvo rezidua antibiotika.

Ključne reči: mleko, rezidue, difuzionna metoda, Delvo SP test, Penzim S test

¹E-mail: laskov2@neobee.net

CONTROL OF ANTIBIOTIC RESIDUE IN MILK FROM FARM TO TABLE

Jelena Apić, Jelena Petrović, Olga Rackov, Dubravka Milanov

Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Rumenački put 20 Novi Sad

Abstracts

Antibiotic residue in milk may have harmful consequences for humans and milk technology. In order to prevent adverse effects of residue, nowadays different screening methods are used for qualitative examination of antibiotic residue in milk. The aim of the work was to investigate the presence of antibiotic residue in the samples of milk from different phases of production chain (from raw material to final product) by using different screening methods. Three screening methods, that are most often used, were chosen. Microbiological inhibitory methods: Delvo SP test and diffusion method with *B. stearothermophilus* and enzyme method Penzyme S test. A total of 60 samples were examined. The samples were collected from whole milk production chain from farm to final product. The investigation determined high compatibility of tests. The differences that occur in examining the same sample using three different methods are a consequence of different sensitivity of the methods. Delvo SP test is sensitive to antibiotics, sulphonamides, disinfectants and inhibitory substances in milk (lactoferin, lactoperoxidase). Diffusion method is sensitive to antibiotics, while Penzyme S is sensitive only to β -lactam antibiotics. High coincidence of Penzyme S test with two other tests prove that β -lactam antibiotics are the most often residua that can be found in milk. The differences in results may also be a consequence of difference of detection limit for the same antibiotics. On the basis of performed investigation, it was detected that there is a high percent of milk sample that contain antibiotic residues 30% in bulk tanks on farms, 20% in cistern in dairy and 20% in pasteurized and sterilized milk on the market. On the bases of parallel investigation of diffusion method, Delvo SP test and Penzyme S test, we can conclude that all three methods are extremely in agreement and thus they fulfill one of the criteria for introducing them in systematic milk control on presence of antibiotic residue.

Key words: milk, residue, diffusion method, Delvo SP test, Penzyme S test

UVOD

Rezidue veterinarskih lekova obuhvataju izvorni lek i/ili njegove metabolite u bilo kom jestivom delu animalnog proizvoda [1]. Prisustvo rezidua u mleku i proizvodima od mleka je posledica nepoštovanja karence, predoziranja, nestručne primene lekova, odsustva ili neadekvatne kontrole. Rezidue antibiotika u mleku mogu štetno uticati na zdravlje ljudi [2, 3, 4] i tehnološke procese pri preradi mleka [5]. Da bi se sprečili nepoželjni efekti rezidua u svetu se primenjuju različiti postupci kontrole, počev od kontrole proizvodnje, distribucije i upotrebe lekova, preko određivanja nivoa rezidua koji utiče na zdravlje ljudi do razvijanja metoda za otkrivanje te količine.

Ako se na farmi ne sprovodi pravilna kontrola rezidua antibiotika i ne preduzimaju odgovarajuće mere, mleko tretiranih krava u kome se nalazi nedozvoljena količina antibiotika, dospeva u tank sa zbirnim mlekom i kontaminira mleko slobodno od rezidua.

Sistematsko ispitivanje mleka na prisustvo rezidua antibiotika ima za cilj da otkrije sirovo mleko koje sadrži rezidue antibiotika i isključi ga iz dalje proizvodnje. Težište ovakve vrste kontrole se nalazi u mlekari obzirom da se jedino u mlekari mogu pregledati svi uzorci sirovog mleka i efikasno sprečiti ulazak neispravnog mleka u proizvodnju.

U sistematskoj kontroli antibiotika za ispitivanje i selekciju velikog broja uzoraka koriste se skrining metode. Uzorci koji su pozitivni ili sumnjivi na prisustvo antibiotika dalje se ispituju nekom od metoda za identifikaciju i kvantifikaciju rezidua. Ovakva ispitivanja nije moguće izvršiti u mlekari, već se pozitivni i sumnjivi uzorci šalju u ovlašćenu laboratoriju. U laboratoriji se za identifikaciju mogu koristiti imunološki, enzimski, receptor-vezujući ili modifikovani mikrobiološki testovi inhibicije. Za kvantifikaciju rezidua se koriste hromatografske metode.

Kriterijumi za izbor skrining metoda koje bi bile uključene u sistematsku kontrolu rezidua su senzitivnost, specifičnost, brzina dobijanja rezultata, jednostavnost postupka i međusobna saglasnost dobijenih rezultata. Cilj rada je da se primenom različitih skrining metoda uporedno ispita prisustvo rezidua antibiotika u uzorcima mleka iz različitih faza proizvodnog lanca (od sirovine do gotovog proizvoda). Izabrane su tri skrining metode koje se najčešće koriste u praksi. Mikrobiološke inhibitorne metode: Delvo SP test i difuziona metoda sa *B. stearothermophilus* (difuziona metoda) i enzimska metoda Penzim S test.

MATERIJAL I METODE RADA

Materijal. Ispitano je 20 uzoraka mleka iz sabirnih tankova sa farme, 20 uzoraka mleka sa linija (mleko iz transportnih cisterni sa linija dovoza) u mle-

kari, 10 uzoraka pasterizovanog mleka i 10 uzoraka sterilizovanog mleka iz prometa.

Metode. Dokazivanje rezidua antibiotika difuzionom metodom rađeno je postupkom po Galeslootu i Hassingu [6]. Metoda je modifikovana u smislu povećanja temperature inkubacije sa 55°C na 63°C. Delvo SP test i Penzim S test su izvođeni prema proizvođačkoj specifikaciji. Proizvođač Delvo SP testa je Gist-Brocades N.V. Delft, Holandija, a Penzim S testa je UCB-Bioproducts S.A., Belgija.

Statističke metode. Saglasnost testova je poređena pomoću kappa vrednosti [7]. Kappa vrednost se kreće u intervalu od 0 (podudarnost je jednaka onoj koja bi se očekivala pri slučajnoj podudarnosti testova) do 1 (potpuna podudarnost). Uobičajeno se uzima da je idealna ako je vrednost kappa > 0,81, skoro idealna podudarnost 0,61 – 0,80, prilična podudarnost 0,41 – 0,60, srednja podudarnost 0,21 – 0,40, beznačajna podudarnost 0,00 – 0,20 i nema podudarnosti 0,00.

REZULTATI I DISKUSIJA

Uporednim ispitivanjima uzoraka mleka ustanovljena je visoka međusobna podudarnost među testovima (tabele 1, 2 i 3).

Tabela 1: Rezultati uporednog ispitivanja uzoraka sirovog mleka iz tanka sa farme Delvo SP testom, Penzim S testom i difuzionom metodom

Naziv testa		Difuziona metoda		Penzim S test	
		Pozit.	Negat.	Pozit.	Negat.
Delvo SP test	Pozit.	5	1	5	1
	Negat.	1	13	1	13
Penzim S test	Pozit.	5	1	/	/
	Negat.	1	13	/	/

U sirovom mleku iz tanka sa farme, izvršenim ispitivanjima je ustanovljeno 30% pozitivnih uzoraka na svakom od testova. Sva tri testa u međusobnoj saglasnosti imaju kappa vrednost od 0,76 (interval skoro idealne podudarnosti). Visoku međusobnu podudarnost ova tri testa prilikom ispitivanja mleka iz tanka sa farme su ustanovili i drugi autori [8].

Tabela 2: Rezultati uporednog ispitivanja uzoraka sirovog mleka sa linija Delvo SP testom, Penzim S testom i difuzionom metodom

Naziv testa		Difuzionna metoda		Penzim S test	
		Pozit.	Negat.	Pozit.	Negat.
Delvo SP test	Pozit.	3	0	3	0
	Negat.	1	16	0	17
Penzim S test	Pozit.	3	0	/	/
	Negat.	1	16	/	/

Ispitivanjem sirovog mleka iz transportnih cisterni sa linija dovoza u mlekari ustanovljeno je Delvo SP testom i Penzim S testom 15% pozitivnih uzoraka, dok je difuzionom metodom ustanovljeno 20% pozitivnih uzoraka. Penzim S i Delvo SP test imaju istu kappa vrednost pema difuzionoj metodi, ova vrednost iznosi 0,83 (interval idealne podudarnosti). Kappa vrednost sa-glasnosti Penzim S testa i Delvo SP testa je takođe idealna (kappa je 1,00).

Tabela 3: Rezultati uporednog ispitivanja uzoraka pasterizovanog i sterilizovanog mleka Delvo SP testom, Penzim S testom i difuzionim testom

Naziv testa		Difuzionna metoda		Penzim S test	
		Pozit.	Negat.	Pozit.	Negat.
Delvo SP test	Pozit.	3	1	3	1
	Negat.	0	16	1	15
Penzim S test	Pozit.	3	1	/	/
	Negat.	0	16	/	/

Ispitivanjem pasterizovanog i sterilizovanog mleka ustanovljeno je 20% pozitivnih uzoraka Penzim S testom i difuzionom metodom, dok je Delvo SP testom ustanovljeno 25% pozitivnih uzoraka. Difuzionna metoda se prema oba testa nalazi u intervalu idealne podudarnosti (kappa je 0,83), dok se Delvo SP test sa Penzim S testom nalazi u intervalu skoro idealne podudarnosti (kappa je 0,69).

Razlike koje se javljaju prilikom ispitivanja istog uzorka različitim metoda nastaju zbog različite osetljivosti ovih metoda. Delvo SP test je osetljiv prema antibioticima, sulfonamidima, dezinficijensima i abnormalnom mleku

(mleku u kom se nalaze laktoferin, laktoperoksidaza i lizocim). Difuziona metoda je osetljiva prema antibioticima dok je Penzim S test osetljiv samo prema beta laktamskim antibioticima. Visoka podudarnost Penzim S testa sa ostala dva testa ide u prilog navodima drugih autora [9, 10] po kojima su beta laktamski antibiotici najčešća vrsta rezidua koja se može naći u mleku. Razlike u rezultatima takođe mogu nastati i zbog razlika u pragu detekcije prema istim antibioticima, tako je prema ceftiofuru najosetljiviji Delvo SP test jer detektuje količine od 50 µg/kg, difuzioni test 75 µg/kg, a Penzim S test 80 µg/kg [11].

Visok procenat gotovih proizvoda (pasterizovano i sterilizovano mleko) koji sadrže rezidue antibiotika, nameće potrebu za poboljšanjem kontrole rezidua antibiotika. Sistematska kontrola podrazumeva uzorkovanje mleka iz svakog tanka na farmi prilikom redovnog postupka prikupljanja. Za sistematska ispitivanja dobro je koristiti Delvo SP test jer je osetljiv i prema različitim grupama antibiotika i prema sulfonamidima. Ukoliko se želi utvrditi vrsta rezidua koja je prisutna u mleku mogu se ponoviti ispitivanja Penzim S testom, zato što je velika verovatnoća da su prisutne rezidue beta laktamskih antibiotika koje ovaj test može dokazati. Ukoliko bi se u sistematskoj kontroli rezidua koristio samo Penzim S test bilo bi moguće ispitati veliki broj uzoraka u kratkom vremenskom intervalu svega za 25 minuta, međutim postoji verovatnoća da u su u mleku prisutne rezidue drugih antibiotika ne samo beta laktamskih tako da bi ovim testom bio dobijen lažno negativan rezultat. Sistematskim ispitivanjem uzoraka mleka koji su ušli u sastav jedne linije otkupa može se doći do konkretne farme koja je dovela do kontaminiranja mleka sa cele linije otkupa. Mleko koje je pozitivno na bilo kom od skrining testova mora biti isključeno iz proizvodnje i neškodljivo uklonjeno.

Ispitivanje mleka iz prometa se vrši u ovlašćenim laboratorijama. Za ova ispitivanja najbolje je koristiti difuzioni test ili Delvo SP test jer mogu da detektuju široki spektar rezidua [12]. Svi uzorci mleka u kojima je skrining testom ustanovljeno prisustvo rezidua mogu se poslati u ovlašćenu laboratoriju za potvrdu rezultata gde bi se daljim testovima za identifikaciju i kvantifikaciju verifikovalo prisustvo (vrsta i količina) rezidua. Na taj način se pouzdano dokazuje prisustvo rezidue i mogu se argumentovano preduzeti odgovarajuće mere za neodgovorne proizvođače i prerađivače mleka.

ZAKLJUČAK

Uporednim ispitivanjima difuzione metode, Delvo SP testa i Penzim S testa ustanovljeno je da su sve tri metode u dobroj međusobnoj saglasnosti (kappa vrednost se kreće od skoro idealne do idealne podudarnosti) čime ispunjavaju jedan od kriterijuma za uključivanje u sistematsku kontrolu mleka na prisu-

stvo rezidua. Izvršenim ispitivanjima je ustanovljen visok procenat uzoraka mleka koje sadrži rezidue antibiotika (15-30%). Poboljšanjem kontrole mleka obezbedilo bi se mleko koje ne utiče na zdravlje potrošača i smanjile bi se štete koje nastaju pri preradi mleka u proizvode.

LITERATURA

1. Codex Alimentarius, Vol. three Food and Agriculture Organisation of the United Nations, WHO. Rome 1993.
2. Dewdney J.M., Maes L., Raynaud J.P., Blanc F., Scheid J.P., Jackson T., Lens S., Verschuere C, *Food Chem Toxicol* 1991, Jul; 29(7):477-83.
3. Corpet D.E., Lumeau S., Corpet F., *Antimicrob Agents Chemoter* 1989, Apr; 33(4): 535-40.
4. Corpet D.E., *Vet. Hum. Toxicol.* 1993; 35 Suppl 1: 37-46.
5. Mijačević Z., Bulajić S., Zbornik radova, Zlatibor, 78-85, 2000,
6. Miljković V., Šipka M.: Metode pregleda mleka i mlečnih proizvoda, Beograd: Naučna knjiga, 1975.
7. Valčić M., Opšta epizootiologija. Beogradu: Fakultet veterinarske medicine, 1998.
8. Seymour E.H., Jones G.M., McGilliard M.L. *J Dairy Sci* 1988, Feb; 71(2):539-44.
9. Heeschen W. I Suchren G. Proceedings from Symposium on residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. Kiel, Germany, 1995. 107-114.
10. Long T. Master of Science - thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Publikation no 98. Uppsala 1999.
11. FDA memorandum M-a-85, revision 1, September 1994.-12.
12. Petrović J., Magistarska teza. Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 2001.

Primljeno: 25.11.2011.

Odobreno: 20.12.2011.