

ŠIROKOSPEKTRÁLNÍ TESTY SCHVÁLENÉ V ČR PRO STANOVENÍ RIL V SYROVÉM KRAVSKÉM MLÉČE

Pavλίna Navrátilová¹, Jana Vyhnálková¹,
Jaroslava Jeřábková²

1 Ústav hygieny a technologie mléka, Veterinární
a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1/3, Brno

2 Státní veterinární ústav Jihlava, Rantířovská 93,
Jihlava

BROAD-SPECTRUM TESTS APPROVED IN THE CZECH REPUBLIC TO DETERMINE RESIDUES OF INHIBITORY SUBSTANCES IN RAW COW'S MILK

Abstrakt

K zajištění bezpečnosti mléka a mléčných výrobků je nezbytná aplikace rychlých, selektivních, dostatečně citlivých a spolehlivých screeningových metod pro detekci reziduí veterinárních léčiv. Článek je zaměřen na širokospektrální rychlotesty, které jsou rutinně využívány pro detekci reziduí antimikrobiálních látek v syrovém mléce. Popisuje princip testů, výhody a nevýhody použití a jejich citlivost k vybraným veterinárním léčivům vzhledem ke stanoveným MRL. V publikaci jsou ze široké nabídky vybrány testy, které jsou uvedeny v ČR v Seznamu veterinárních přípravků schválených dle zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči.

Klíčová slova: mléko, rezidua, screeningové testy

Abstract

To ensure the safety of milk and milk products it is essential to apply fast, selective and sufficiently sensitive and reliable screening methods for the detection of the residues of the veterinary drugs. The article focuses on the commercial microbiological tests that are routinely used for the detection of the residues of these substances in raw cow's milk. The article describes the principles of the tests, advantages and disadvantages of their usage, their application and sensitivity to the veterinary drugs with respect to the MRL. The publication chooses from a wide range of the selected tests on the market that are listed in the Czech Republic in the List of Veterinary Medicinal Products approved by Law No.166/1999 Coll., On veterinary care.

Keywords: milk, residues, screening tests

Úvod

Aplikace antibiotik a chemoterapeutik ve veterinární praxi k léčbě nebo k prevenci infekčních onemocnění

u hospodářských zvířat vede k výskytu reziduí těchto látek ve svalovině, orgánech, mléce a vejcích. Rezidua těchto látek, pokud jsou přítomná v surovinách živočišného původu, mohou představovat zdravotní rizika pro člověka. Proto je indikace veterinárních léčivých přípravků (VLP) u potravinových zvířat řízena přísnými pravidly, z nichž nejdůležitější je dodržování předepsaných ochranných lhůt. Nadměrné a neuvážlivé používání VLP ve veterinární praxi má za následek rozvoj rezistence u saprofytických a patogenních mikroorganismů.

Veškeré VLP musí být registrovány. Jejich použití u hospodářských zvířat v zemích EU je řízeno přísnými pravidly, s cílem zabezpečit zdravotní nezávadnost surovin a potravin živočišného původu. Farmakologicky účinné látky jsou hodnoceny toxikologicky a na základě toxikologického hodnocení jsou navrženy limitní hodnoty - maximální limity reziduí (MRL). MRL pro farmakologicky účinné látky veterinárních přípravků v surovinách živočišného původu uvádí Nařízení Komise (EU) č. 37/2010. Kromě hygienického rizika představují rezidua VLP v mléce také riziko pro mlékárenské technologie využívající bakterie mléčného kvašení, zejména pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků, tvarohů a sýrů (Botsoglou a Fletouris, 2001; Mitchell a kol., 1998; Roeder a Roeder, 2000). VLP patří mezi hlavní zdroje reziduí inhibičních látek (RIL) v surovinách a potravinách živočišného původu.

V posledních letech se s rozšiřujícím spektrem VLP, pro které jsou stanoveny hodnoty MRL v surovinách živočišného původu, mění i požadavky na metody pro detekci RIL. Především v oborech, jakým je např. kontrola zdravotní nezávadnosti potravin, vzrůstá požadavek na spolehlivé, dostatečně citlivé, rychlé a nenákladné metody, které je možné použít pro detekci širokého spektra léčiv v různých maticích. Při detekci RIL je nezbytné kombinovat různé metody do integrovaného systému. Systém kontroly RIL obvykle zahrnuje screeningové, post-screeningové a konfirmační metody.

Screeningové testy jsou první metody používané v programech kontroly RIL, jejich cílem je stanovit přítomnost nebo nepřítomnost těchto reziduí vzhledem ke stanoveným MRL. Screeningové metody jsou definovány jako metody poskytující přesné a spolehlivé informace, že analyt, který je předmětem zájmu, není ve vzorku přítomný v nebezpečných nebo nepovolených koncentracích. Při plošném monitorování RIL v mléce jsou všeobecně nejvíce využívány selektivní rychlotesty a širokospektrální rychlotesty.

V České republice se "širokospektrální rychlotesty" používají jako screeningové testy v centrálních laboratořích a v dalších akreditovaných laboratořích. Schválené širokospektrální testy k detekci reziduí antimikrobiálních látek v mléce jsou uvedeny v Seznamu veterinárních přípravků schválených dle zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči: Eclipse 50, Eclipse 100, Delvo test SP-NT - ampule, Delvo-test SP-NT mikrodestičky, Kalidos MP, Kalidos TB.

Tab. 1 Přehled širokospektrálních testů uvedených v Seznamu veterinárních přípravků schválených dle zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči

Test	Testovací mikroorganismus	Teplota [°C]	Inkubační podmínky Doba	Indikátor	Objem vzorku [μl]	Hodnocení výsledku
<i>Eclipse 50</i>	<i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>	65	specifická pro danou soupravu (2-3 hod.)	brom-kresolová červeň	50	vizuálně / fotometricky
<i>Eclipse 100</i>	<i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>	65	specifická pro danou soupravu (2-3 hod.)	brom-kresolová červeň	100	vizuálně / fotometricky
<i>Kalidos MP</i>	<i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>	65	specifická pro danou soupravu (2,5-3 hod.)	brom-kresolová červeň	50	vizuálně / specifický software a skener
<i>Kalidos TB</i>	<i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>	65	specifická pro danou soupravu (2,5-3 hod.)	brom-kresolová červeň	100	vizuálně / specifický software a skener
<i>Delvo-test® SP-NT - ampule</i>	<i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>	64 ± 0,5	3* hod.	brom-kresolová červeň	100	vizuálně / specifický software a skener
<i>Delvo-test® SP-NT destičky</i>	<i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>	64 ± 0,5	3* hod.	brom-kresolová červeň	100	vizuálně / specifický software a skener

* fixní odečítací čas

Širokospektrální rychlotesty, princip

Širokospektrální rychlotesty řadíme do skupiny mikrobiologických inhibičních metod. Komerčně vyráběné širokospektrální rychlotesty, se mohou navzájem lišit druhem testovacího mikroorganismu, použitým indikátorem, inkubační dobou a teplotou, spektrem detekovatelných látek a detekčními limity pro RIL. Širokospektrální rychlotesty jsou obecně založeny na detekci inhibice růstu citlivých bakteriálních kmenů. Většina testů využívá jako testovací mikroorganismus *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, který je vynikajícím testovacím mikroorganismem pro své vlastnosti, z nichž nejvýznamnější je, jak uvádí Katz a Siewierski (1995), schopnost rychlého růstu při zvýšených teplotách (64 °C) a vysoká citlivost ke skupině β-laktamových antibiotik.

Širokospektrální testy jsou založeny na následujícím principu. Ampule nebo jamky mikrodestičky obsahují agarové médium inokulované standardizovaným množstvím spor kmene *G. stearothermophilus* v.c., obohacené o nutriční látky a obsahující indikátor pH. Vzorek mléka je aplikován na povrch média většinou přímo, bez předchozí úpravy. Během inkubace, která probíhá při teplotě asi 65 °C, vzorek difunduje do agarového média

(princip agarové difuze). V případě, že nejsou ve vzorku přítomna rezidua inhibičních látek, nebo je jejich koncentrace nižší než limit detekce, v průběhu inkubace testu spory vyklíčí. Dochází k pomnožení testovacího kmene a mikrobiální metabolismus (produkce dostatečného množství kyselin fermentací přítomného sacharidu) způsobí změnu pH média a následně změnu barvy přítomného indikátoru z fialové na žlutou. Pokud jsou ve vzorku přítomna rezidua antibiotik nebo chemoterapeutik, růst kmene je inhibován, produkce kyselin je zpožděna a nedochází ke změně barvy indikátoru, barva média zůstává fialová až modro-fialová. Po ukončení inkubace se hodnotí vizuálně zabarvení dolních 2/3 agaru, nebo se výsledek testu hodnotí pomocí čtecího zařízení. Charakteristiku testů uvádí tabulka č. 1.

Nejvíce používané testy jsou *Eclipse* (Zeu-Inmunotec, S.L., Spain), oba typy testů *Eclipse 50* i *Eclipse 100* jsou určeny k testování kravského, kozího a ovčího mléka. Testy jsou dodávány ve formátu mikrodestiček. Rozdíl mezi oběma testy je v objemu aplikovaného vzorku mléka a v provedení testu. Optimální inkubační doba je specifická pro každou šarži testu. *Kalidos* (EuroClone S.p.A., Italy) - test vhodný pro kontrolu syrového kravského, kozího a ovčího mléka. Je dodáván v podobě ampulí (*Kalidos TB*-

Tab. 2 Detekční limity širokospektrálních testů k vybraným VP vzhledem ke stanoveným MRL

Antimikrobiální látka	MRL	Delvotest® SP-NT* ampule	Eclipse 50 test	Eclipse 100 test	Kalidos MP	Kalidos TB
<i>Penicilin</i>	4	3	3-4	3	2-4	2-4
<i>Ampicilin</i>	4	3	4-5	4	3-4	3-4
<i>Cloxacilin</i>	30	16	35	30	15-40	15-40
<i>Cefalonium</i>	20	8	20	20	neuváděno	neuváděno
<i>Tetracyklin</i>	100	700	100	100	100-200	100-200
<i>Oxytetracyklin</i>	100	680	100	100	100-200	100-200
<i>Sulfadiazine</i>	100	170	100	100	25-100	25-100
<i>Gentamicin</i>	100	200	400	200	neuváděno	neuváděno
<i>Neomycin</i>	1500	340	1500	400	neuváděno	neuváděno
<i>Streptomycin</i>	200	1800	1500	400	400-800	400-800
<i>Erytromycin</i>	40	180	400-800	200	neuváděno	neuváděno
<i>Tylosin</i>	50	50	80-100	40	neuváděno	neuváděno

* detekční limit ve fixním odečítacím čase

100 testů), nebo v podobě mikrodestiček (Kalidos MP-3 x 96 testů). Optimální inkubační doba je specifická a je uvedena v certifikátu u každé soupravy. **Delvotest® SP-NT** (DSM Food Specialties B.V., the Netherlands) je test určený podle výrobce k vyšetření syrového kravského mléka. Test je dodáván ve formě ampulí nebo mikrodestiček. Inkubační doba je 3 hodiny (tzv. fixní odečítací čas). V případě, že je současně testována negativní kontrola, může být inkubační doba ukončena v době, kdy se barva negativní kontroly změní na žlutou (kontrolní čas negativní kontroly).

Při práci s testy je důležité dodržovat zásady správné laboratorní praxe, kontrolovat pH vyšetřovaného vzorku, důsledně dodržovat teplotu a dobu inkubace dle doporučení výrobce a současně se vzorkem vždy aplikovat negativní kontrolu (indikuje správnou dobu inkubace). Doporučuje se i použití pozitivní kontroly.

Výhody testů

Výhodou testů je, že mají široké detekční spektrum, jsou jednoduché na provedení a časově nenáročné, nejsou finančně nákladné a je možné je využít pro screening velkého počtu vzorků (Mitchell a kol., 1998).

Nevýhody testů

Testy mají i nedostatky limitující jejich použití: jsou pouze kvalitativní, neumožňují specifickou identifikaci antibiotik, mají limitované detekční hladiny pro řadu VLP. Další nevýhodou je, že vykazují vysokou citlivost k β -laktamovým antibiotikům, především k penicilinu (tabulka č. 2). Testy jsou méně citlivé vůči některým běžně používaným léčivům (streptomycin), některá léčiva nedetekují vůbec (chloramfenikol).

Výskyt falešně-pozitivních a negativních výsledků

Přirozené antimikrobiální látky, pokud jsou v mléce přítomny ve vyšších koncentracích, mohou být u těchto testů příčinou falešně-pozitivních výsledků při vyšetření individuálních vzorků mléka. Výskyt falešně-pozitivních výsledků může souviset i se zvýšeným počtem somatických buněk v mléce (van Eenennaam a kol., 1993; Andrew, 2001; Kang a kol., 2005). Vliv přirozeně se vyskytujících antibakteriálních látek lze u těchto testů eliminovat modifikací pracovního postupu - například tepelným ošetřením vzorku mléka, kdy dochází k inaktivaci těchto látek. Falešně-negativní výsledek může být způsoben kyselým pH vzorku ($\text{pH} < 6$).

VLP i přirozené antimikrobiální látky jsou schopné difundovat do agarů a ovlivnit růst testačního mikroorga-

nismu. Například lysozym a laktoferin difundují pouze do malé vzdálenosti, a proto neovlivní růst mikroorganismu v celé vrstvě média. Laktoferin a lysozym jsou silně bazické proteiny a při neutrálním pH mají pozitivní náboj. Jejich difuze v mediu (u agarových difuzních metod) je přerušena interakcemi s negativně nabitými sulfhydrylovými skupinami agarů (Carlsson a kol., 1989). Proto se doporučuje při hodnocení výsledků testů odečítat zabarvení dolních 2/3 agarů v ampulích nebo v jamkách mikrodestiček.

Závěr

I přes řadu nevýhod patří širokospektrální rychlotesty již od 70. let dvacátého století k důležitým screeningovým metodám detekce RIL v mléce především proto, že jsou schopné detekovat přítomnost širokého spektra veterinárních léčivých přípravků, které se používají při léčení potravinových zvířat.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory projektu NAZV "KUS" QJ1230044.

Seznam literatury

- ANDREW S.M. (2001): Effect of composition of colostrum and transition milk from holstein heifers on specificity rates of antibiotic residue tests. *J. Dairy Sci.*, 84, s. 100-106.
- BOTSOGLOU N.A., FLETOURIS D.J. (2001): *Drug residues in foods: pharmacology, food safety and analysis*. 1 Vyd. New York, Marcel Dekker, 1194 s. ISBN 0-8247-8959-8.
- CARLSSON A., BJORCK L., PERSSON K. (1989): Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest P. *J. Dairy Sci.*, 72, s. 3166-3175.
- KANG J.H., JIN J.H., KONDO F. (2005): False-positive outcome and drug residue in milk samples over withdrawal times. *J. Dairy Sci.*, 88, s. 908-913.
- KATZ S.E., SIEWIERSKI M. (1995): *Bacillus stearothermophilus* disc assay: a review. *J. AOAC Int.*, 78, s. 1408-1415.
- MITCHELL J.M., GRIFFITHS M.W., MC EWEN S.A., MCNAB W.B., YEE A.J. (1998): Antimicrobial drug residues in milk and meat: cause, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *J. Food Prot.*, 61, s. 742-756.
- NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 37/2010 o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu, ve znění pozdějších předpisů. *Úřední věstník Evropské unie*, 15, 20.1.2010, s. 1-72.
- ROEDER A.M., ROEDER M. (2000): Antibiotics in foods of animal origin. Ve: FRANCIS F. (edit.): *Encyclopedia of Food Science and Technology*. (2 vyd.), sv. 1, (pp. 54-63). New York, John Wiley&Sons Inc.
- VAN EENENNAAM A.L., CULLOR J.S., PERANI L., GARDNER I.A., SMITH W.L., DELLINGER J., GUTERBOCK W.M., JENSEN L. (1993): Evaluation of milk antibiotic residues screening-tests in cattle with naturally-occurring clinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, 76, s. 3041-3053.
- ZÁKON MZe č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů. (1999): *Sbírka zákonů České republiky*, částka 57, s. 3122-3168.

Přijato do tisku 7. 8. 2013

Lektorováno 26. 9. 2013