

Substancje hamujące w mleku

Cz. II. Metody wykrywania

Anna Litwińczuk, Izabela Lawera

AR w Lublinie

Polska Norma PN-91/A-86033: Mleko. Wykrywanie antybiotyków i innych substancji hamujących [14], przewiduje możliwość stosowania wielu metod analitycznych, traktując je równorzędnie. Według Ostaszewskiego [13] metody wykrywania obecności antybiotyków i innych substancji hamujących w mleku można podzielić na:

- ◆ mikrobiologiczne,
- ◆ enzymatyczne,
- ◆ chromatograficzne i inne.

Metody mikrobiologiczne polegają na hamowaniu rozwoju organizmu testowego przez substancje hamujące, obecne w badanej próbce. Inhibicję szczepu testowego określa się na podstawie zmiany kwasowości lub potencjału oksydoredukcyjnego podłoża, a w przypadku metod płytkowych na podstawie wielkości strefy hamowania wzrostu [9, 13, 17].

Zaletą metod mikrobiologicznych jest stosunkowo niski koszt analizy jednostkowej oraz bezpośrednie użycie i bardzo proste przygotowanie próbki do analizy. Nie wymaga się specjalistycznego sprzętu laboratoryjnego. Wadą jest natomiast dość długi czas oczekiwania na wynik (kilka lub kilkanaście godzin, co sprawia, że metody te mają ograniczoną przydatność do bieżącej oceny mleka w trakcie jego przerebu), następnie ograniczona czułość, wrażliwość na pH oraz możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych. Najczęściej stosowanymi drobnoustrojami są: *Bacillus stearothermophilus* i *Streptococcus thermophilus*, a także *Bacillus subtilis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus lactis*, *Sarcina lutea*, kultura jogurtowa [7, 13].

Metody wykorzystujące *Bacillus stearothermophilus*, termofilny gatunek szczególnie wrażliwy na penicylinę, można podzielić na dwie grupy:

- metody wykorzystujące wskaźniki potencjału oksydoredukcyjnego (czerń brylantowa, chlorek trójfenylotetrazolowy – TTC, resazuryna);
- metody oparte na wskaźnikach pH (purpura bromokrezolowa);

Na rynku dostępnych jest wiele testów sprzedawanych w formie gotowych zestawów, przeznaczonych do wykrywania lub oznaczania pozostałości antybiotyków i substancji hamujących w mleku. Wśród nich znajdują się: BR Test, (AS i BR Test Blue Star), Charm test, STD-test. Metody te wykorzystują jako wskaźnik oksydoredukcyjny *Bacillus stearothermophilus* i czerń brylantową.

BR Test umożliwia wykrycie penicyliny w stężeniu 3 j.m./dm³ w czasie 2,5-3 h. Czułość Delvotestu (SP i P) względem penicyliny wynosi 3-5 j.m./dm³ przy inkubacji przez 2,5-3 h w temp. 63-66°C. STD pozwala na wykrycie 4 j.m./dm³ penicyliny w ciągu 2,5-3 h. Polutest M – test ten wykrywa 3-4 j.m./dm³ penicyliny przy inkubacji przez ok. 3 h w temp. 65°C. Szczep *Bacillus stearothermophilus* jest szczególnie wrażliwy na penicyliny, natomiast relatywnie mało wrażliwy na antybiotyki aminoglikozydowe, np. streptomycynę [18].

Metoda płytkowa „Biolacta” do oznaczenia antybiotyków w mleku, przy użyciu gotowego preparatu produkowanego przez Zakład Produkcji Biopreparatów Mleczarskich w Olsztynie, jest pierwszą metodą zastosowaną w kraju. Szczepem testowym jest *Bacillus stearothermophilus* [2, 16, 20]. W metodzie płytkowej mleko nadkwaszone może być również badane na obecność antybiotyków, a wynik interpretowany na podstawie strefy hamowania [16]. Podłoże do oznaczania obecności antybiotyków metodą płytkową pozwala na wykrycie obecności 0,003 j.m. penicyliny w 1 ml produktu [19].

W metodach wykorzystujących *Streptococcus thermophilus* jako wskaźnika używa się również purpurę bromokrezolową. Na rynku dostępne są takie metody, jak: AIM firmy Oxoid, Intertest lub Accusphere firmy Intervet, test Valio T 101 [12]. Oznaczenie tymi metodami polega na zregenerowaniu podłoża, dodaniu określonej ilości badanego mleka i inkubacji w temp. 37,5°C, 42°C, 45°C przez 4-4,5 h. Czułość waha się od 4 j.m. penicyliny/dm³ dla T 101 do 20 j.m. dla AIM. Na polskim rynku pojawił się także nowy wskaźnikowy test receptorowy Beta star. Jest on przeznaczony do szybkiego oznaczania w mleku wszelkich antybiotyków betalaktamowych (penicyliny, kloxacyliny, ampicyliny), stosowanych w profilaktyce i leczeniu bydła, szczególnie mastitis. Zaletą testu Beta star jest szybkość otrzymania wyniku badania. Jest dostępny w dwóch wersjach – Beta star 25 i Beta star 100 [10].

Metodą stosowaną w wielu krajach jest test oparty na ocenie stopnia ukwaszenia próbki przez *Streptococcus thermophilus* z wykorzystaniem purpury bromokrezolowej. Metoda wykazuje czułość 5 j.m. penicyliny w 1 dm³ mleka. Dodatek do badanych próbek mleka 0,002% chlorku benzalkonu pozwala na wykrycie w nich 4 j.m. penicyliny/dm³ [13].

Francuska firma opracowała metodę pozwalającą wykryć już 3 j.m. penicyliny/dm³ w ciągu 40-60 min. Jest to test oparty na pomiarze zawartości ATP w próbkach zaszczepionych kulturą *Streptococcus thermophilus* po 20, 40, 60 minutach inkubacji w temp. 45°C. Pomiar zawartości ATP jest oparty na enzymatycznej reakcji lucyferyna – lucyferaza, przebiegającej przy udziale bakteryjnego ATP.

Szybka i bardzo czuła metoda opracowała firma Lumac. Test trwający 35 minut pozwala wykryć 1,7 j.m. penicyliny/dm³. Oznaczenie opiera się na aktywności enzymatycznej szczepu *Streptococcus thermophilus* wobec chromogenu (związku barwnego), który utleniając się zmienia barwę [13].

Metody enzymatyczne oparte są na specyficznych reakcjach biochemicznych enzymu dodanego do próbki mleka. Wynikiem reakcji są barwne produkty umożliwiające ocenę. Metody te są szybkie i czułe, co umożliwia ich stosowanie do oceny mleka jeszcze przed jego przyjęciem. Wadą jest specyficzność oznaczania względem określonej grupy antybiotyków, np. tylko dla betalaktamowych. Najbardziej znaną meto-

dą jest test Penzym. Zasada tego testu polega na hamowaniu enzymu DD – karbohidrosypeptydazy (penicylinazy) przez pierścień betalaktamowy antybiotyku. Test ten może być wykonywany w laboratoriach mleczarskich i weterynaryjnych (wersja laboratoryjna), a także przez samego rolnika (wersja farmerska). Istnieje zatem możliwość bezpośredniego kontrolowania czy antybiotyk został już usunięty z gruczołu mlekowego [8, 11]. Zdaniem Kurka i wsp. [5] oraz Malinowskiego [8] niektóre środki myjąco-dezynfekcyjne (Chlorogen D, Mastycyd, Chloramina, Mirox) maskują reakcję enzymatyczną w teście Penzym, czego konsekwencją są ujemne wyniki, mimo obecności antybiotyków. Test Penzym można wykonywać w przypadku mleka świeżego, bowiem zmiana kwasowości może, według Kłossowskiej i wsp. [3] oraz Kurka i wsp. [5], spowodować fałszywe wyniki. Czułość tego testu wynosi 8-10 j.m. penicyliny/dm³ przy czasie oznaczania trwającym 20 minut [13]. Do grupy metod enzymatycznych zalicza się również metody immunoenzymatyczne. Są to oznaczenia szybkie i dokładne, wykorzystanie ich ogranicza się jednak, według Ostaszewskiego [13], do laboratoriów badawczych.

W metodach chromatograficznych badaną próbkę poddaje się rozdziałowi na odpowiednim adsorbencie pod wpływem działania rozpuszczalników organicznych lub gazów. Drugim etapem oznaczania jest identyfikacja poszczególnych antybiotyków przez porównanie z wzorcami.

Stosowane są różne rodzaje chromatografii (bibułowa, cienkowarstwowa TLC, cieczowa, gazowa) w połączeniu z wieloma typami detektorów. W chromatografii gazowej i cieczowej stosowane są czułe i selektywne detektory, umożliwiające precyzyjne określenie śladowej zawartości analizowanej substancji w badanym materiale [15]. Zastosowanie chromatografii pozwala wykryć np. 1 ng chloramfenikolu/cm³, 15 ng streptomycyny/cm³, 1-10 ng tetracyklin/cm³. Wadą metod chromatograficznych jest duża czasowa i pracochłonność oraz skomplikowany i drogi sprzęt.

Wśród innych metod proponowanych do oznaczania substancji hamujących ciekawym rozwiązaniem są radioimmunologiczne testy Charma I i II, wykorzystujące znaczniki izotopowe. Testem Charm II można np. wykryć tetracykliny na poziomie poniżej 3 ng/ml. Opracowano również metody oznaczania substancji hamujących w mleku oparte na elektroforezie lub spektrofotometrii, czy też test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), które opierają się na specyficznych reakcjach między receptorami i antyciałami. Dostosowane są one do poszczególnych grup antybiotyków [4, 9, 13]. Test ELISA wykrywa tetracykliny na poziomie 10 ng/ml [9].

Różnorodność metod proponowanych w PN-91/A-86033 [14] powoduje, że poszczególne laboratoria, zarówno weterynaryjne jak i zakładowe spółdzielni mleczarskich, mogą stosować jedną lub więcej z wybranych metod. Nie wszystkie jednak metody dają identyczne wyniki. W efekcie dochodzi czasami do sytuacji, kiedy wyniki badania tego samego mleka w laboratorium zakładowym są inne niż w laboratorium weterynaryjnym. Również poszczególne laboratoria weterynaryjne posługują się różnymi metodami, co zdaniem Różańskiej [18] bardzo utrudnia obiektywną analizę wyników badań w skali całego kraju.

W aspekcie tych rozbieżności powstała koncepcja podwójnego badania obecności substancji hamujących w mleku, która zakłada, według Degelaena [1]:

– użycie szybkiego testu, takiego jak Penzym, do wykrywania antybiotyków betalaktamowych w momencie przyjazdu cystern do mleczarni, co pozwoli na wykluczenie większości skażeń i zmniejszenie ryzyka przedostania się skażeń do silosów z mlekiem;

– badanie testem mikrobiologicznym mleka w silosach przed skierowaniem go do produkcji, w celu wykrycia ewentualnej obecności antybiotyków innych niż betalaktamowe.

Należy sądzić, że podwójne badania w mleczarniach wraz z działaniami kontrolnymi, prowadzonymi przez laboratoria oficjalnego nadzoru, skutecznie wpłynę na dostarczanie konsumentowi produktu bezpiecznego i odpowiedniej jakości. Wykorzystywanie natomiast przez producentów mleka, oczywiście tych większych (specjalizujących się w tej produkcji), prostych testów do wykrywania substancji hamujących (np. test Penzym) pozwoli dokładniej kontrolować przebieg leczenia stanów zapalnych wymion u poszczególnych krów, uwzględniając ich indywidualne predyspozycje do czasu usuwania antybiotyków z organizmu. Postępowanie takie daje możliwość maksymalnego wykorzystania produkowanego przez rolnika mleka, jako źródła dochodu w gospodarstwie, przy jednoczesnej pewności, że cały odstawiany surowiec jest w pełni produktem bezpiecznym, spełniającym wymogi normy jakościowej dla mleka.

Literatura: 1. Degelaen J.: Przeg. Mlecz. 2, 51, 1996. 2. Kłossowska A., Malinowski E., Kuźma R.: Med. Wet. 52 (11), 700, 1996. 3. Kłossowska A., Malinowski E., Biegała T.: Życie Wet. 8, 183, 1993. 4. Kucharska U.: Przem. Spoż. 6, 43, 1999. 5. Kurek C., Milko K., Kacprzyński M.: Przeg. Mlecz. 1, 13-15, 1991. 6. Kurek C., Milko K., Kacprzyński M.: Med. Wet. 46 (11), 424, 1990. 7. Lipińska E.: Przeg. Mlecz. 6, 146, 1994. 8. Malinowski E.: Przeg. Mlecz. 6, 134, 1994. 9. Michalski M.M., Wojtoń B., Spenner J.: Przeg. Mlecz. 4, 81, 1994. 10. Michalski M.M.: Przeg. Mlecz. 1, 18, 1991. 11. Michalski M.M.: Przeg. Mlecz. 8, 183, 1994. 12. Michalski M.M., Rola J.G.: Przeg. Mlecz. 4, 122, 1997. 13. Ostaszewski P.: Przem. Spoż. 4, 29, 41, 1996. 14. Polska Norma: PN-91/A-86033 Mleko. Wykrywanie antybiotyków i innych substancji hamujących. 15. Posyniak A., Semeniuk S., Niedzielska J., Żmudzki J.: Med. Wet. 50 (7), 312, 1994. 16. Proszek A., Hoppe K.W.: Przeg. Mlecz. 2, 11, 1991. 17. Różańska H.: Med. Wet. 52 (3), 67, 1996. 18. Różańska H.: Przeg. Mlecz. 4, 104, 1998. 19. Sedrowska E.: Przem. Spoż. 6, 20, 1999. 20. Turlejska H.: Przeg. Mlecz. 8, 227, 1996.



Zakład Deratyzacji „SZCZUROŁAP”

Wiesław i Jarosław Dobrzeńscy
ul. Graniczna 10
87-100 Toruń
tel. (0-56) 655-21-41
lub 654-65-47

Wyniszczam całkowicie bytujące i dochodzące szczury, z gwarancją. Fermy, mieszalnie pasz, zakłady rolne, magazyny, bezpieczeństwo 100%. Metodę przedstawiłem w filmie „SzczuroŁap”. Dla zainteresowanych wdrażamy HACCP.