

UPOREDNO ISPITIVANJE REZIDUA ANTIBIOTIKA U
MLEKU ENZIMSKOM I MIKROBIOLOŠKIM METODAMA*
*COMPARATIVE ANALYSIS OF ANTIBIOTIC RESIDUE IN MILK
USING ENZYME AND MICROBIOLOGICAL METHODS*

Jelena Petrović, Vera Katić **

*Rezidue antibiotika mogu štetno da deluju i na zdravlje ljudi i ometaju preradu mleka u proizvode. Da bi se sprečili ovi nepoželjni efekti rezidua, danas se koriste različite skrining metode. Osnovni zadatak ovoga rada je poređenje skrining metoda prilikom ispitivanja mleka sa različitim mesta u lancu proizvodnje. U radu smo uporedo ispitali tri skrining metode: mikrobiološke metode Delvo SP test i Difuzionu metodu sa *B. stearothermophilus* kao test mikroorganizmom i enzimsku metodu Penzym S test. Ispitano je 20 uzoraka mleka iz sabirnih tankova sa farme, 20 uzoraka mleka iz transportnih cisterni, 10 uzoraka pasterezovanog mleka i 10 uzoraka sterilizovanog mleka iz prometa. Na osnovu uporednih ispitivanja Difuzione metode, Delvo SP testa i Penzym S testa zaključujemo da su sve tri metode u visokoj međusobnoj saglasnosti (kappa vrednost se kreće od skoro idealne podudarnosti do idealne podudarnosti) i time ispunjavaju jedan od kriterijuma za uključivanje u sistematsku kontrolu mleka na prisustvo rezidua antibiotika.*

Ključne reči: mleko, rezidue, antibiotici, Difuzionu metoda, Delvo SP test, Penzym S test

Uvod / Introduction

Beta laktamski antibiotici se široko koriste u terapiji i profilaksi oboljenja mlečnih goveda, pre svega mastitisa, pa stoga ova grupa antibiotika predstavlja najčešću vrstu rezidua koja može da se nađe u mleku [1]. Rezidue veterinarskih lekova obuhvataju izvorni lek i/ili njegove metabolite u bilo kom jestivom delu životinjskog proizvoda [2]. Rezidue veterinarskih lekova u sirovom mleku su posledica izlučivanja, a u mleku za javnu potrošnju posledica su: nepoštovanja

* Rad primljen za štampu 2.4. 2003. godine

** Mr Jelena Petrović, istraživač saradnik, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad; dr Vera Katić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

karence, predoziranja, nestručne primene lekova, odsustva ili neadekvatne kontrole.

Rezidue antibiotika i sulfonamida u mleku mogu štetno da utiču na zdravlje ljudi uzrokujući alergijske reakcije [3], rezistenciju patogenih mikroorganizama [4] i redukciju normalne mikroflore u organizmu [5]. Pored toga, rezidue antibiotika nepovoljno utiču i na tehnološke procese pri preradi mleka [6]. Da bi se sprečili nepoželjni efekti rezidua, u svetu se primenjuju različiti postupci kontrole, koji obuhvataju kontrolu proizvodnje, distribucije i upotrebe lekova, određivanje nivoa rezidua koji utiče na zdravlje ljudi i razvijanje metoda za otkrivanje te količine. Danas se za dokazivanje rezidua antibiotika i sulfonamida u mleku koriste kvalitativne (mikrobiološke, enzimske, receptor enzimske i imunološke) i kvantitativne metode (*HPLC*, spektrofotometrijske i masenospektrofotometrijske). Kvantitativne metode daju podatke o vrsti i količini prisutne rezidue, međutim, ove metode dugo traju, za njihovo izvođenje je potrebna skupa oprema i obučeni kadar.

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. Za identifikaciju se koriste imunološki, enzimski, receptor-vezujući ili modifikovani mikrobiološki testovi inhibicije, a za kvantifikaciju rezidua se koriste *HPLC*, *GC* i *GC/MC*. Pored brzine dobijanja rezultata i jednostavnosti postupka, kriterijum za izbor skrining metoda, koje bi bile uključene u sistematsku kontrolu rezidua je i međusobna saglasnost dobijenih rezultata.

Cilj rada je da se primenom različitih skrining metoda uporedo 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* i enzimska metoda Penzym S test.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Ispitano je 20 uzoraka mleka iz sabirnih tankova sa farme, 20 uzoraka mleka sa linija (mleko iz transportnih cisterni sa linija dovoza) u mlekari, 10 uzoraka pasterizovanog mleka i 10 uzoraka sterilizovanog mleka iz prometa. Dokazivanje rezidua antibiotika Difuzionom metodom, sa *B. stearothermophilus* kao test mikroorganizmom, rađeno je metodom po Galeslootu i Hassingu [7]. Metoda je modifikovana u smislu povećanja temperature inkubacije sa 55°C na 63°C. Delvo SP test i Penzym S test su izvođeni prema uputstvu proizvođača. Proizvođač Delvo SP testa je Gist-Brocades N.V. Delft, Holandija, a proizvođač Penzym S testa je UCB-Bioproducts S.A., Belgija.

Statističke metode. Saglasnost testova je poređena pomoću kappa vrednosti [8]. 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 podudarnost ako je vrednost kappa >0.81, skoro idealna podudarnost je za raspon 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 rada i diskusija / Results and discussion

Rezultati uporednog ispitivanja uzoraka sirovog mleka Delvo SP testom, Penzym S testom i Difuzionom metodom sa *B. stearothermophilus* prikazani su u tabelama 1 i 2.

Tabela 1. Rezultati uporednog ispitivanja uzoraka sirovog mleka iz tanka sa farme Delvo SP testom, Penzym S testom i Difuzionom metodom sa *B. stearothermophilus*
Table 1. Results of comparative analysis of raw milk samples from farm tank performed by the Delvo SP test and diffusion method with *B. stearothermophilus*

Naziv testa / Method used		Difuziona metoda sa <i>B. stearothermophilus</i> / Diffusion method with <i>B. stearothermophilus</i>		Penzym S test / Penzym S test	
		pozitivno / positive	negativno / negative	pozitivno / positive	negativno / negative
Delvo SP test / Delvo SP test	pozitivno / positive	5	1	5	1
	negativno / negative	1	13	1	13
Penzym S test / Penzym test	pozitivno / positive	5	1	/	/
	negativno / negative	1	13	/	/

Na osnovu obavljenih ispitivanja u sirovom mleku iz tanka sa farme ustanovljeno je 30 posto pozitivnih uzoraka svakim od testova. Sva tri testa u međusobnoj saglasnosti, imaju kappa vrednost od 0.76, ova vrednost pripada intervalu kappa vrednosti od 0.61 do 0.80 koji predstavlja skoro idealnu podudarnost. Visoku međusobnu podudarnost ova tri testa prilikom ispitivanja mleka iz tanka sa farme su ustanovili i Seimour i sar. [9].

Ispitivanjem sirovog mleka iz transportnih cisterni sa linija dovoza u mlekari ustanovljeno je Delvo SP testom i Penzym S testom 15 posto pozitivnih uzoraka, dok je Difuzionom metodom ustanovljeno 20 posto pozitivnih uzoraka. Penzym S i Delvo SP test imaju istu kappa vrednost prema Difuzionoju metodi sa *B. stearothermophilus*, ova vrednost iznosi 0.83 i pripada intervalu idealne podudar-

nosti. Kappa vrednost saglasnosti Penzym S testa i Delvo SP testa je, takođe, idealna, pošto iznosi 1.00. Interval idealne podudarnosti se odnosi na kappa vrednost veću od 0.81.

Tabela 2. Rezultati uporednog ispitivanja uzoraka sirovog mleka sa linija Delvo SP testom, Penzym S testom i Difuzionom metodom sa *B. stearothermophilus*
 Table 2. Results of comparative analysis of raw milk samples from production lines performed by the Delvo SP test, Penzym S test and diffusion method with *B. stearothermophilus*

Naziv testa / Method used		Difuziona metoda sa <i>B. stearothermophilus</i> / Diffusion method with <i>B. stearothermophilus</i>		Penzym S test / Penzym S test	
		pozitivno / positive	negativno / negative	pozitivno / positive	negativno / negative
Delvo SP test / Delvo SP test	pozitivno / positive	3	0	3	0
	negativno / negative	1	16	0	17
Penzym S test / Penzym test	pozitivno / positive	3	0	/	/
	negativno / negative	1	16	/	/

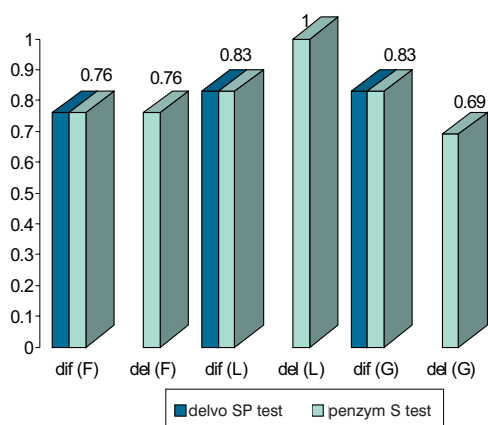
Rezultati uporednog ispitivanja 20 uzoraka pasterizovanog i sterilizovanog mleka iz prometa Delvo SP testom, Penzym S testom i Difuzionom metodom sa *B. stearothermophilus* su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3. Rezultati uporednog ispitivanja uzoraka pasterizovanog i sterilizovanog mleka Delvo SP testom, Penzym S testom i Difuzionim testom sa *B. stearothermophilus*
 Table 3. Results of comparative analysis of pasteurized and sterilized milk performed by the Delvo SP test, Penzym S test and diffusion method with *B. stearothermophilus*

Naziv testa / Method used		Difuziona metoda sa <i>B. stearothermophilus</i> / Diffusion method with <i>B. stearothermophilus</i>		Penzym S test / Penzym S test	
		pozitivno / positive	negativno / negative	pozitivno / positive	negativno / negative
Delvo SP test / Delvo SP test	pozitivno / positive	3	1	3	1
	negativno / negative	0	16	1	15
Penzym S test / Penzym test	pozitivno / positive	3	1	/	/
	negativno / negative	0	16	/	/

Ispitivanjem pasterizovanog i sterilizovanog mleka ustanovljeno je 20 posto pozitivnih uzoraka pomoću Penzym S testa i Difuzione metode, dok je pomoću Delvo SP testa ustanovljeno 25 posto pozitivnih uzoraka. Difuziona metoda se prema oba testa nalazi u intervalu idealne podudarnosti (kappa je 0.83), dok se Delvo SP test sa Penzym S testom nalazi u intervalu skoro idealne podudarnosti (kappa 0.69).

Kappa saglasnost testova prilikom ispitivanja sve tri grupe uzoraka je prikazana na slici 1.



Slika 1. Kappa saglasnost ispitanih metoda za određivanje rezidua antibiotika u sirovom mleku iz tanka sa farme, iz transportnih cisterni i pasterizovanom i sterilizovanom mleku
Legenda: dif - Difuziona metoda, F - mleko iz tanka sa farme,
L - mleko sa linija, G - pasterizovano i sterilizovano mleko

Figure 1. Kappa coincidence of analyzed methods for detecting antibiotic residue in raw milk from farm tank, transport cisterns and pasteurized and sterilized milk

Legend 1. dif - diffusion method, F - milk from farm tank, L - milk from production lines,
G - pasteurized and sterilized milk

Razlike koje se javljaju prilikom ispitivanja istog uzorka sa tri različite metode proističu iz različite osetljivosti ovih metoda. Delvo SP test je osetljiv prema antibioticima, sulfonamidima, dezinficijensima i promenjenom mleku. Difuziona metoda je osetljiva prema antibioticima, dok je Penzym S test osetljiv samo prema beta laktamskim antibioticima. Visoka podudarnost Penzym S testa sa ostala dva testa ide u prilog navodima drugih autora [10, 11], po kojima su beta laktamski antibiotici najčešća vrsta rezidua koja može da se nađe u mleku. Razlike u rezultatima, takođe, mogu da nastanu i zbog razlika u pragu detekcije prema istim antibioticima, tako je prema ceftiofuru najosetljiviji Delvo SP test, jer detektuje količine od 50 µg/kg, dok Difuzioni test detektuje količine od 75 µg/kg, a Penzym S test detektuje količine od 80 µg/kg ceftiofura, [12].

Zaključak / Conclusion

Na osnovu uporednih ispitivanja Difuzione metode, Delvo SP testa i Penzym S testa zaključujemo da su sve tri metode u visokoj međusobnoj saglasnosti (kappa vrednost se kreće od skoro idealne podudarnosti do idealne podudarnosti) i time ispunjavaju jedan od kriterijuma za uključivanje u sistematsku kontrolu mleka na prisustvo rezidua.

Literatura / References

1. Heeschen W., Suchren G.: Proceedings from Symposium on residues of antimicrobial drugs and their inhibitors in milk. Kiel, Germany, 107-114 1995. - 2. Codex Alimentarius, Vol three Food and Agriculture Organisation of United Nations, WHO. Rome 1993. - 3. Dewdney J. M., Maes L., Raynaud J. P., Blanc F., Scheid J. P., Jackson T., Lens S., Verschueren C.: Food Chem Toxicol, Jul; 29, 7, 477- 483, 1991. - 4. Corpet D. E., Lumeau S., Corpet F.: Antimicrob Agents Chemoter, Apr; 33, 4, 535-540, 1989. - 5. Corpet D. E.: Vet. Hum. Toxicol. 35 Suppl 1, 37-46, 1993. - 6. Mayra-Makinen: citat po Mijačević Zora i Bulajić Snežana, Zlatibor, Zajednica stočarstva, Zbornik radova 78-85, 2000. - 7. Miljković V., Šipka M.: Metode pregleda mleka i mlečnih proizvoda, Naučna knjiga Beograd 66-67, 1975. - 8. Valčić M.: Opšta epizootologija. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, 1998. - 9 Seymour E. H., Jones G. M., Mc Gilliard M. L.: J Dairy Sci, Feb; 71, 2, 539-544, 1988. - 10 Heeschen W., Suchren G.: Proceedings from Symposium on residues of antimicrobial drugs and their inhibitors in milk. Kiel, Germany, 107-114, 1995. - 11 Long T.: Mater of Science-thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Publikation no 98. Uppsala 1999. - 12. FDA memorandum M-a-85, revision 1, September 1994.

ENGLISH

COMPARATIVE ANALYSIS OF ANTIBIOTIC RESIDUE IN MILK USING ENZYME AND MICROBIOLOGICAL METHODS

Jelena Petrović, Vera Katić

Antibiotic residue can have a harmful effect on human health and can disrupt the processing of milk and milk products. In order to prevent these unwanted effects of residue, different screening methods are used today. The basic goal of this paper is to compare screening methods performed during the testing of milk from different points of the production chain. In this paper we have comparatively analyzed three screening methods: microbiological methods – the Delvo SP test and the diffusion method with *B. stearothermophilus* as the test microorganism, and an enzyme method – the Penzym S test. Twenty samples of farm milk from collective tanks were analyzed, as well as 20 samples of milk from transport cisterns, 10 samples of pasteurized milk and 10 samples of sterilized market milk. Based on the comparative analysis of the diffusion method, Delvo SP test and Penzym S test, we conclude that all three methods are in high mutual accordance (the kappa value oscillates from nearly ideal to ideal coinciding) and thus meet one of the criteria for being included in the systematic control of milk for the presence of antibiotic residue.

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

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИСПЫТАНИЕ ОСТАТКОВ АНТИБИОТИКОВ В МОЛОКЕ
ЭНЗИМНЫМ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ**

Елена Петрович, Вера Катич

Остатки антибиотиков могут вредно действовать и на здоровье людей и мешают переработку молока в продукты. Чтобы предупредились эти нежелательные эффекты остатков в настоящее время пользуются различные скрининг методы. Основная задача этой работы сравнение скрининг методов при испытании молока с различных мест в цепи производства. В работе мы сравнительно испытали три скрининг метода: микробиологические методы Дельво *SP* тест и Диффузионный метод с *B. stearothermophilus* как тест микроорганизмом и энзимный метод *Penzym S* тест. Испытано 20 образчиков молока из собирательных баков с фермы, 20 образчиков молока из транспортных цистерн, 10 образчиков стерлизованного молока из оборота. На основе сравнительных испытаний Диффузионного метода, Дельво *SP* теста и *Penzym S* теста мы сделаем вывод, что все три метода в высоком междусобном согласии (каппа стоимость двигалась от почти идеальной до идеального совпадения и тем выполняют один из критериев для включения в систематический контроль молока на присутствие остатков антибиотиков.

Ключевые слова: молоко, остатки, антибиотики, Диффузионный метод, Дельво *SP* тест, *Penzym S* тест