

¹EMILIJA STOJANOVIĆ²ZORA MIJAČEVIĆ²SNEŽANA BULAJIĆ¹S.E.Ver²Fakultet veterinarske medicine,
Beograd

UDK 637.12:615.281:543.2

Antibiotici se koriste u lečenju životinja i često se rezidue antibiotika mogu utvrditi u mleku. Negativni uticaj prisutnih rezidua antibiotika u mleku sa zdravstvenog i tehnološkog aspekta je poznat proizvođačima i prerađivačima mleka. Da bi se prisustvo rezidua antibiotika u mleku svelo na što manju meru i da bi se smanjili rizici njihovog štetnog dejstva na zdravlje ljudi i na tehnološke postupke, neophodna je metoda koja će brzo dati rezultat o prisustvu rezidua antibiotika na nivou maksimalno dozvoljenih količina. Twinsensor testom se u roku od 6 min. može utvrditi prisustvo rezidua β -laktama i tetraciklina na nivou maksimalno dozvoljenih količina.

Ključne reči: antibiotici • β -laktami • tetraciklini • MRL vrednosti • Twinsensor

UVOD

U mleko dospevaju rezidui iz hrane i posle terapije životinja. Rezidui antibiotika u mleku utiču na toksikološku i tehnološku sigurnost. Tehnološka sigurnost predstavlja ono mleko koje nema smetnji u fermentaciji a prisutni rezidui antibiotika mogu da uspore ili potpuno inhibiraju fermentaciju mleka čije posledice su loš kvalitet proizvoda. Stepent inhibicije fermentacije sa reziduima antibiotika zavisi od vrste i koncentracije prisutnih antibiotika u mleku, kao i upotrebljenog startera (1,2).

Iz tog razloga se u svetu a i kod nas poslednjih godina sprovodi kontrola antibiotika u mleku da bi se smanjili ili sa-

KONTROLA β -LAKTAMA I TETRACIKLINA U MLEKU TWINSENSOR TESTOM

svim otklonili problemi koji mogu nastati kao posledica njihovog prisustva u mleku (3,4,5,6).

Preporuka je da se mikrobiološkim testovima kontroliše mleko na mestu proizvodnje i u posudama za skladištenje pre izlivanja u proizvodne posude u samoj mlekari. Na našem tržištu su dostupni Delvo i Copan test za kontrolu antibiotika širokog spektra (3,4,7,8,9). S obzirom da su to testovi koji traju 2 h i 45 minuta odnosno tri sata, mogu se ispitivati uzorci iz tankova koji imaju gde da se skladište, ali za odvajanje i veliku mogućnost preventivnog uklanjanja mleka sa antibioticima potrebni su brzi testovi kojima se može na licu mesta razdvojiti mleko sa i bez antibiotika. Tako se prilikom otkupa ili prijema na rampi mlekara preporučuju brzi testovi kojima se može utvrditi prisustvo antibiotika, po mogućstvu u granicama maksimalno dozvoljenih vrednosti (MRL vrednosti). To su testovi koji su jednostavni, brzi i efikasni, kojih ima na našem tržištu, ali samo za kontrolu β -laktamskih antibiotika kao što su Delvo-X-press, Charm, SNAP, β -Star, Penzyme S i sl. (7,8,9,10)

Neka ranija uporedna ispitivanja testova kao β -Star testa sa SNAP testom ukazuje da se sa β -Starom dobilo samo 0,01% lažno pozitivnih rezultata, dok je sa SNAP testom bilo 2,1% lažno pozitivnih rezultata (10). I uopšte ima dosta objavljenih radova o nalazu i uticaju antibiotika u mleku, što ukazuje koliki se značaj pridaje kontroli rezidua antibiotika u mleku (1,2).

Pored β -laktamskih antibiotika koriste se i tetraciklinski preparati u lečenju mastita kao Matijet Forte, koji je registrovan kod nas 2002. Od spomenutih testova tetracikline je moguće detektovati samo mikrobiološkim testovima Copan i Delvo (8,9). U tabeli 1 su date MRL vrednosti za tetracikline i nivo detekcije Copan i Delvo testa.

Tabela 1. MRL VREDNOSTI ZA TETRACIKLINE I DETEKCIONI NIVO DELVOTEST® SP I COPAN TESTA

Table 1. MRL VALUES FOR TETRACYCLINES AND LEVEL OF DETECTION OF DELVOTEST® SP AND COPAN TESTS

Tetraciklini / Tetracyclines	*Delvotest® SP	Copan test	MRL (μ g/kg)
Chlortetracycline	100–150	250–500	100
	200–400		
	300–600		
Oxytetracycline	100	250–500	100
	200–400		
	400–500		
Tetracycline	100	250–500	100
	200–400		
	300–600		
Doxycycline		150	100

* Zavisi od vremena očitavanja

Adresa autora: dr Emilija Stojanović, S.E.Ver,
Rumenački put 58, 21 000 Novi Sad
tel: 021/518 507, 065/202 1336
emica@eunet.yu

Prošle godine u julu je na evropsko tržište kuća UNISENSOR iznela brzi test za kontrolu tetraciklina Twinsensor Milk (Unisensor, Liege, Belgija), kojim se detektuju u toku 6 minuta i β -laktamski i tetraciklinski preparati ukoliko su prisutni u mleku (12,13).

Poznato je da tetraciklini utiču na aktivnost jogurtne kulture tako što 70-300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ inhibira 50-80% stvaranje kiseline (14) ili 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ po drugom autoru (15) stopira starter. Hlortetraciklin u količini od 40-100 i oksitetraciklin u količini od 50-150 μg 50-80% inhibira stvaranje kiseline. Po različitim autorima (14,15,16) tetraciklini utiču na sirarske kulture izazivajući inhibiciju stvaranja kiseline 50-80%, ili potpuno inhibiraju starter kulturu, smanjuju viskozitet i sl. Odnosno slično deluju kao i β -laktamski rezidui antibiotika ukoliko su prisutni u mleku. Jednako je tako važno kontrolisati uzorke mleka na njihovo prisustvo kao neizostavni deo HACCP sistema kontrole u mlekarama (17,18,19). Prema izvoru FEDESA2.1997, čak 66% prodatih antibiotika za upotrebu u veterini su tetraciklini (naravno koriste se i u lečenju živine i dr.).

Twinsensor

Metoda Twinsensor je receptorska (sl. 1 i 2) i na mestima "hvatača" β -laktamskih i tetraciklinskih rezidua dolazi do obojene reakcije, formira se crvena linija ukoliko nema rezidua traženih antibiotika tetraciklina i β -laktama.

Test je validovan na DVK-CLO od strane Commission Decision 2002/657/EC (13). Validacija testa je rađena i širom

Evrope: **UK** – Sara Stead, Central Science Laboratory, **Germany** – Gertraud Suhren, Federal Research Centre for Nutrition and Food, **France** – Nathalie Cadieu, AFSSA, **Switzerland** – Jean-Marc Diserens, Nestle Research Center, **Belgium** – Yasmine Govaert, Institute for Public Health, **Spain** – Prof. Pilar Molina, Universidad Politecnica de Valencia, **Denmark** – Steen Jensen, Steins Laboratorium, **Ireland** – Lorraine Lynas, Dep. Of Agriculture and Rural Development for Northern Ireland, **Italy** – Anna Maria Ferrini, Istituto Superiore di Sanità, **Czech Republic** – Alena Honzlova, State Veterinary Institute Jihlava, **Poland** – Bolleslaw J. Wojton, Panstwowy Instytut Weterynarii (12), a ove godine i u **Srbiji** na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu. Dosadašnja iskustva iz tri mlekare u Srbiji ukazuju da su u dve češći nalazi tetraciklina u uzorcima mleka, a u jednoj je češći nalaz prisustva β -laktama.

Twinsensor test je brz, jednostavan i pouzdan test za kontrolu rezidua antibiotika u mleku na rampi mlekare (13).

U tabeli 2 i slici 3 su prikazani detekcioni limiti Twinsensor testa za β -laktame i tetracikline, sa MRL vrednostima za iste.

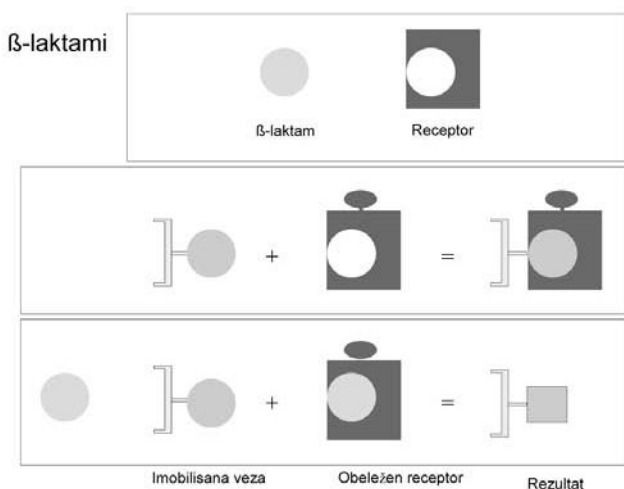
Na slici 4 je prikazano pakovanje i sastav Twinsensor kita gde se vidi da je kit opremljen svim potrebnim elementima za izvođenje testa, sem inkubatora. Inkubatori omogućavaju izvođenje 24 ili 40 testova istovremeno a ima ih sa različitim priključcima na različiti tip izvora energije: 12V, 24V i 220V. Naravno, mo-

žete koristiti i već postojeće inkubatore obzirom na opremljenost kita.

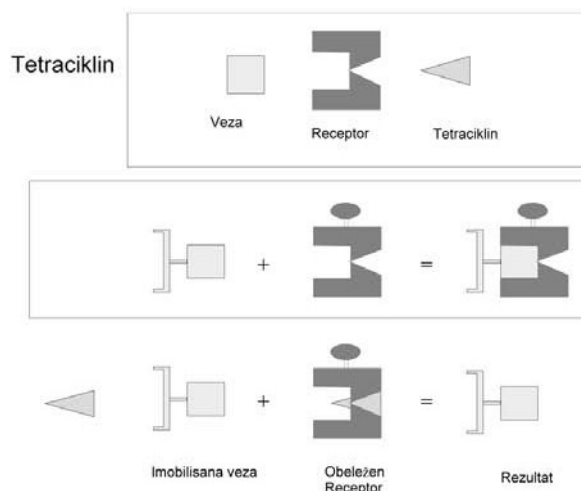
Procedura testa je veoma jednostavna: **1.** Dodati 200 μl mleka u posudicu i blago je okretati u krugovima po površini. **2.** Inkubirati 3 minuta na 50°C. **3.** Zagnjuriti traku u posudicu. **4.** Produžiti inkubaciju još 3 minuta na 50°C. **5.** Uraditi interpretaciju rezultata na osnovu priloga sa slikovitim prikazom. Interpretacija rezultata testa je golim okom. Na slici 5 prikazani su različiti rezultati kontrole na rezidue antibiotika.

LITERATURA

- Zora Mijačević, Snežana Bulajić, Drago N. Nenadić (2001): Uticaj rezidua antibiotika i sulfonamida na aktivnost bakterija mlečne kiseline, Prehrambena industrija, Mleko i mlečni proizvodi, Beograd, 12, 1-2, 31-34
- Emilija Stojanović, Ana Pecnik, Slobodanka Depalov (2006): Uticaj hloramfenikola na kvalitet grušia i ukupnu kiselost mleka, Prehrambena industrija, Mleko i mlečni proizvodi, vol.17, 1-2, 115-117
- Vesna Lj. Bulatović, Emilija V. Stojanović, Đurđica M. Kelemen-Mašić, Dušan R. Pajkić, Dragana V. Plavšić (1997): Usporedno određivanje rezidua antibiotika u mleku, Prehrambena industrija 3-4, str. 11-14
- Emilija Stojanović, Dušan Pajkić, Vesna Bulatović (1998): Kvalitet sirovog mleka, III jugoslovenski simpozijum prehrambene tehnologije, Zbornik radova, Sveska IV, 4-6 februara, 14-19
- Godič-Tokar, K., Golc-Teger, S. (1995): Inhibitory substances in raw cow's milk produced on Slovenian farms, Symposium on residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk, Antibiotic residue testing in the dairy industry, Kiel, 28-31 August, Germany
- Gertraud Suhren H.-G. Walte (2003): Experiences with the application of method combinations for the detection of residues



Slika 1. ŠEMATSKI PRIKAZ VEZIVANJA β -LAKTAMA
Figure 1. SHEMATIC PRESENTATION OF β -LACTAMS CONNECTION



Slika 2. ŠEMATSKI PRIKAZ VEZIVANJA TETRACIKLINA
Figure 2. SHEMATIC PRESENTATION OF TETRACYCLINS CONNECTION

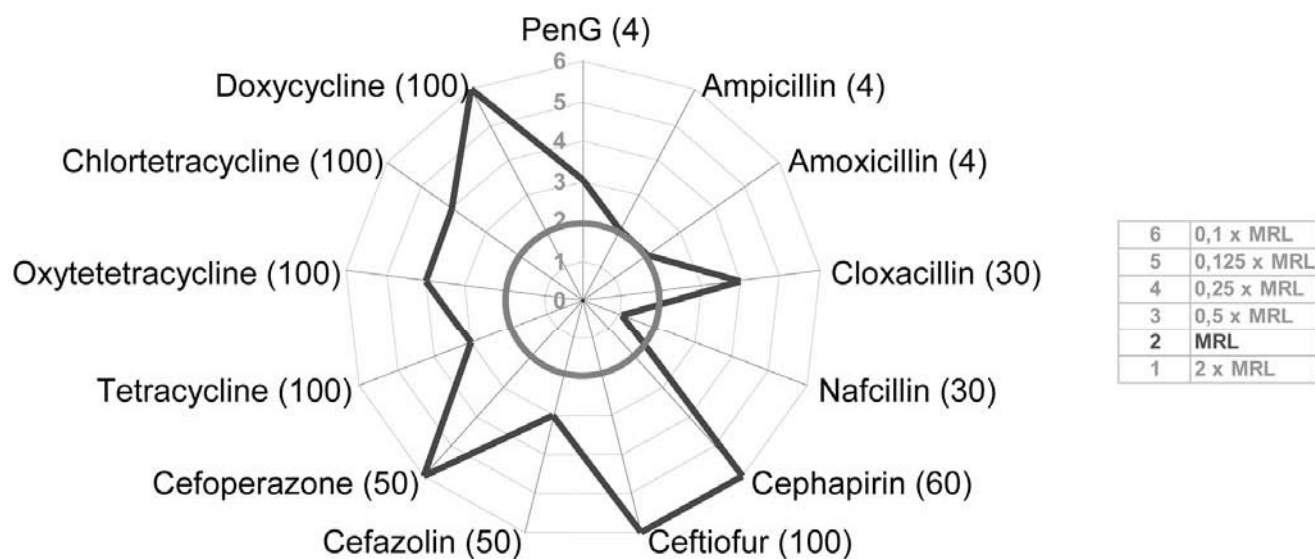
Tabela 2. DETEKCIONI LIMITI TWINSENSOR TESTA ZA β -LAKTAME I TETRACIKLINE
Table 2. DETECTION LIMITS FOR β -LACTAMES AND TETRACYCLINES OF TWINSENSOR TESTS

	Twinsensor (ppb)	MRL (ppb)
β-laktami		
Ampicillin	3–5	4
Amoxicillin	3–5	4
Benzylpenicillin	2–3	4
Cefacetrile	30–40	125
Cefalonium	3–5	20
Cefazolin	18–22	50
Cefoperazone	3–4	50
Cefquinome	30–35	20
Ceftiofur	10–15	100
Cephapirin	6–8	60
Cloxacillin	6–8	30
Dicloxacillin	6–8	30
Nafcillin	30–40	30
Oxacillin	12–18	30
Tetraciklini		
Chlortetracycline	25–30	100
Oxytetracycline	30–40	100
Tetracycline	40–50	100

13. Wim Reybroeck, Sigrid Ooghe (2006): Validation of the twinsensor milk for rapid screening of β -lactam and tetracyclines in milk, 19 May, 5th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, Antwerp, Belgium
14. Waes, G., Naudts, M. (1973): Revue de l'Agriculture 4S. 721-737.
15. Hsu, H.-Y., Jewett, F.F., Charm, S. E. (1978): Cultured Dairy Products Journal, 18-24
16. Jakimov, N. (1970): Mikrobiologija 7 99-109
17. Mijačević, Z., Bulajić, S. (2001): Principi integrisanog sistema detekcije rezidua antibiotika i sulfonamida u mleku – kontrola pojedinačnog mleka, Zbornik radova „Mastiti i kvalitet mleka“ Vrnjačka Banja, str. 85-93
18. J. Eric Hillerton, Ben I. Halley, Paul Neaves, Martin D. Rose (1999): Detection of Antimicrobial Substances in individual Cow and Quarter Milk Samples Using Delvotest Microbial Inhibitor Tests, J Dairy Sci 82:704-711
19. S.M. Andrew, R.A. Frobish, M. J. Paape, L.J. Maturin (1997): Evaluation of selected Antibiotic Residue Screening Tests for Milk from individual Cows and Examination of Factors That Affect the Probability of False-Positive Outcomes, J. Dairy Sci 80:3050-305

- of antimicrobial drugs in milk from collecting tankers, Milchwissenschaft 58 (9/10), 536-540
7. Emilija Stojanovic, Jelisaveta Raič (2002): Kontrola antibiotika u mleku, Mleko i mlečni proizvodi, Vrnjačka Banja, Zbornik radova savremeni trendovi u mlekarstvu 78-82
 8. Chr. Hansen (2001): Test kits, First edition, Novembar
 9. Gist Brocades (1996): Delvotest SP, brošura

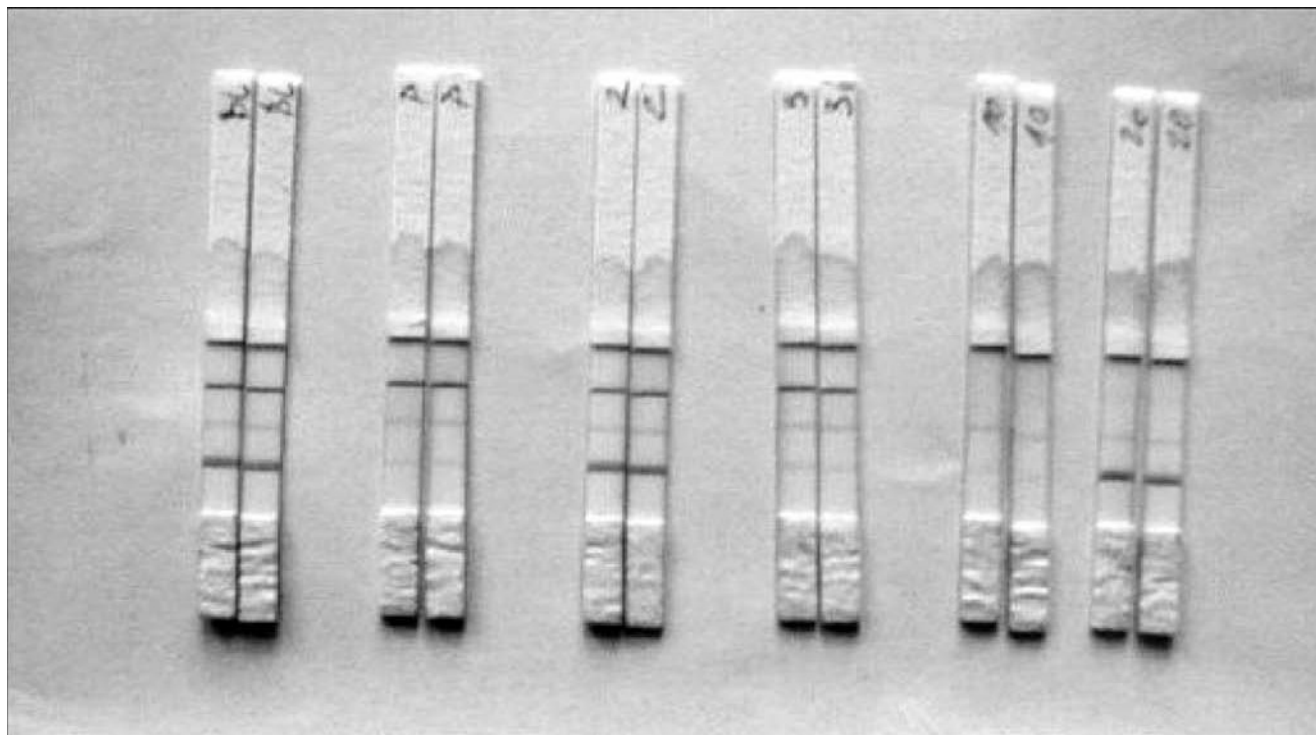
10. Ase Sternesjo, G. Johnsson (2003): The Swedish system for detection and separation of β -lactam antibiotics contaminated milk – a practical approach, Milchwissenschaft 58 (1/2), 68-69
11. Paul Neaves, Williams&Neaves: Monitoring antibiotics in milk – the changing world of test methods, The food Microbiologists, KT22 7TQ
12. Unisensor (2005): *Twinsensor*, brošura



Slika 3. ŠEMATSKI PRIKAZ NIVOA OSETLJIVOSTI TWINSENSOR TESTA NA β -LAKTAME I TETRACIKLINE ZAJEDNO
Figure 3. SHEMATIC PRESENTATION OF TWINSENSOR TEST SENSITIVITY OF β -LACTAMS AND TETRACYCLINS



Slika 4. IZGLLED I SADRŽAJ TWINSSENSOR KITA (ZA 96 ANALIZA)
 Figure 4. TWINSSENSOR TEST KIT (FOR 96 ANALYSES)



Slika 5. **BL** – mleko bez antibiotika, **P** – mleko sa penicilinom, **2** – mleko bez β -laktama i tetraciklina, **3** – mleko sa β -laktamima, **10** – mleko sa β -laktamima i tetraciklinima, **20** – mleko sa tetraciklinima
 Figure 5. **BL** – milk without antibiotics, **P** – milk with penicillin, **2** – mleko without β -lactams i tetracyclins, **3** – milk with β -lactams, **10** – milk with β -lactams and tetracyclins, **20** – milk with tetracyclins

SUMMARY

CONTROLE OF β -LACTAMS AND TETRACYCLINE RESIDUE IN MILK WITH TWINSENSOR

¹Emilija Stojanović, ²Zora Mijačević, ²Snežana Bulajić

¹S.E.Ver, ²Faculty of veterinary medicine

Antibiotics are being used in treating various animal diseases and antibiotics residue can often be found in milk. Negative influence of the antibiotic residues on the human health is known to the producers of milk and dairy products. In order to decrease negative effects of the antibiotics residue to the minimum and in order to minimize risks of its negative effects on the human health and technology processes, a method which will expressly show the residue's presence is required. Twinsensor test requires only 6 minutes in order to show presence of the residue in β -lactams and tetracycline on the MRL level.

Key words: antibiotics • β -lactams • tetracycline
• MRL limits • Twinsensor