

Antibiotikum és szulfonamid maradékanyagok kimutatása vágóállatok szerveiből és szöveteiből, valamint állati eredetű élelmiszerekből

ÁCS GYÖZÖNÉ és SIMONFFY ZOLTÁN

Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Központ

Erkezett: 1984. április 12.

Tanulmányunk célja olyan vizsgálati módszer gyakorlati bevezetése, melynek segítségével a friss húsból, állati szervekből és szövetekből, egyes állati eredetű élelmiszerekből a visszamaradó gátló anyagok nagy biztonsággal kimutathatóak.

Élelmiszer-egészségügyi szempontból az aggálymentes hústermelés iránt támasztott hazai és külföldi követelmények az utóbbi években rendkívüli mértékben fokozódtak. Ugyanakkor a gazdaságos állattenyésztés feltételei szükségessé teszik, hogy az állatok optimális teljesítményének eléréséhez a takarmányokat biológiailag aktív anyagokkal (vitaminokkal, nyomelemekkel, kokcidiosztatikus szerekekkel stb) egészítsék ki.

A 2/1983. (I. 29.) MÉM számú rendelet 4. számú melléklete tartalmazza a biológiailag aktív anyagok felhasználásának lehetőségeit, az ipari takarmányok kísérőiratában és címkéjén feltüntetendő adatokat. Kötelező érvénnyel írja elő a felhasználók tájékoztatását a takarmányokban levő biológiailag idegen anyagok mennyiségéről és alkalmazásukra vonatkozó előírásokról is. Ugyanakkor rendelkezünk kell könnyen kivitelezhető, érzékeny és specifikus vizsgáló eljárásokkal, melyekkel megállapítható, hogy az állatok tenyésztése, illetve tartása során az állattartók a rendeletben szabályozott feltételeket (a szerek dózisát, a kiürülési időt stb.) betartották-e? Az ellenőrzést rendszeressé és folyamatossá kell tenni, hogy az esetleg jelenlevő nem kívánatos toxikus anyagokat tartalmazó termékeket kiszűrhessük.

Anyagok és módszerek

A módszer elve

4 csészés agardiffúziós eljárás, melynek során a megfelelő nagyságúra kivágott szöveti (egyéb) mintákat ráhelyezzük a négy Petri csészébe kiöntött különféle agartáptalaj felületére. A 6,0; 7,2 és 8,0 pH-jú táptalajokat előzőleg *B. subtilis* spórákkal, illetve egy másik adag 8,0-as pH értékű táptalajt *M. luteus* csírákkal oltottunk be. A pH 7,2-es táptalajhoz TMP-t adunk, hogy fokozzuk érzékenységet a szulfonamid maradékokkal szemben. Az antibakteriálisan ható anyag diffúzióját egy, vagy valamennyi csészénél keletkező gátlási zónák kialakulása jelzi. (Lásd 1. táblázat)

Tesztmikroorganizmusok

B. subtilis BGA

Micrococcus luteus ATCC 9341

Törzskultúrák fenntartása

Ferdeagarra *B. subtilis*-t és *M. luteus*-t oltunk.

A *B. subtilis* BGA-t +30 °C-on, a *M. luteus*-t +37 °C-on 16–24 órán át keltetjük.

A kultúrákat +4 °C-on hűtőszekrényben tároljuk. Havonként kell átoltani.

B. subtilis BGA spóraszuszpenzió előállítás

Zselatinos alapagarra (0,1% KH_2PO_4 -tal) pH 7,0-re állítva nagymennyiségű *B. subtilis* BGA tenyészetet oltunk. 10 napi +30 °C-on történő inkubálás után a tenyészetet steril, 0,8%-os konyhasó-oldattal lemoszuk. Ezt a szuszpenziót 10 percig 3000 ford/perc mellett centrifugáljuk és a felülúszót leöntjük. Az üledéket még egyszer steril konyhasóoldattal felöntjük, összekeverjük, centrifugáljuk és leöntjük. Ezt harmadszor is megismételjük, majd fiziológiás konyhasóoldattal szuszpenziót készítünk. A szuszpenziót +70 °C-on 30 percig hőkezeljük. A szuszpenziót olyan mértékben hígítjuk, hogy cm^3 -enként 10^7 spórát tartalmazzon. (A spóraszám beállítása MPN szám meghatározás szerint történik.) A szuszpenzió hűtőszekrényben tartva hetekig használható. Általában 0,1 cm^3 spóraszuszpenziót adunk 100 cm^3 táptalajhoz (tesztáltalaj), hogy cm^3 -enként 10^4 spórasűrűséget érjünk el.

M. luteus levestenyészet előállítása

Az alaplevest 1 kacsnyi *M. luteus* ATCC 9341 törzsszel beoltjuk és +37 °C-on 24 órán át keltetjük.

Minden kiöntéshez frissen kell készíteni.

Táptalajok és reagensek

Tesztáltalaj

alapleves	1000 cm^3
agar-agar	15 g
zselatin	5 g
glükóz	1 g

Autoklávozás 121 °C-on 15 percig. Ezt követően 48–50 °C-ra lehűtjük és 0,1 mólos HCl-val vagy 0,1 mólos NaOH-dal a pH-t úgy állítjuk be, hogy 6,0 és 8,0 pH értékű legyen.

Trimetoprim törzsoldat (TMP)

10 mg standard minőségű trimetoprimet 10 cm^3 etanolban rázogatóssal teljesen feloldunk, majd steril desztillált vízzel tovább hígítjuk, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ -es koncentrációig.

0,8%-os konyhasóoldat

8 g NaCl-ot vízben oldunk és 1000 cm^3 -re felöntjük, majd sterilizáljuk.

Müller – Hinton-féle táptalaj szulfonamidok kimutatására

Oxoid marhahús kivonat (krém)	5,0 g
Lactacid pepton (Human)	17,5 g
glükóz	2,0 g

Oxoid agar Nr. 1. vagy megfelelő tisztaságú szálas vagy por agar-agar hasonló gélerősséget adó mennyiségben desztillált víz
A táptalaj pH-ja autoklávozás után

13 – 17 g
1000 ml
7,0 – 7,2.

Teszt-csészék elkészítése

A teszt táptalajokat folyékonyra tesszük, hozzáadjuk a tesztbaktériumokat és gondosan összekeverjük. A Petri csészéket, melyeknek feneke tökéletesen sima, ellenőrzés mellett, vízszintesen elhelyezzük. Az agar mennyiségét úgy választjuk meg, hogy kiöntés után az agar vastagsága pontosan 2 mm legyen.

1. csésze:

100 cm³ 6,0 pH értékű táptalajhoz hozzáadunk 0,1 cm³ B. subtilis BGA spóraszuszpenziót. Így a táptalajban a spóra koncentrációja 10⁴ spóra/cm³ lesz.

2. csésze:

100 cm³ 8,0 pH értékű táptalajhoz hozzáadunk 0,1 cm³ B. subtilis BGA spóraszuszpenziót. Így a táptalajban a spórakoncentráció 10⁴ spóra/cm³ lesz.

3. csésze:

100 cm³ 8,0 pH értékű táptalajhoz hozzáadunk 1,0 cm³-t a M. luteus 24 órás levestenyészetéből. Így a baktériumkoncentráció kb. 10⁶ bakt/cm³ lesz.

4. csésze:

100 cm³ 7,2 pH értékű táptalajhoz hozzáadunk 0,1 cm³ B. subtilis BGA spóraszuszpenziót és 1,0 cm³ trimetoprim törzsoldatot.

1. táblázat

Az alkalmazott módszer paraméterei

Csésze-szám	Tesztmikroorganizmus	Táptalaj		Keltetés	
		összetétel	pH-érték	idő [ó]	hőfok [°C]
1	B.subtilis BGA	zselatinos alapagar	6,0	16 – 24	32
2	B.subtilis BGA	zselatinos alapagar	8,0	16 – 24	32
3	M.luteus ATCC 9341	zselatinos alapagar	8,0	16 – 24	32
4	B.subtilis BGA + TMP	módosított Müller – Hinton	7,2	16 – 24	37

A tesztcsészék tárolása

Amennyiben ezeket a Petri csészéket nem azonnal kell felhasználni, úgy hűtőszekrényben +6 °C alatti hőmérsékleten tartva 1 hétig felhasználhatóak.

A minták előkészítése

A szöveti mintákat lehetőség szerint gyakorlatilag sterilen kell venni és a lehető leghamarabb – hűtőtáskában – a laboratóriumba kell szállítani. Amennyiben a szállítás előreláthatólag meghaladja a 6 órát, úgy a mintákat le kell fagyasztani. Baktériumokkal szennyezett anyag vizsgálatra nem alkalmas.

A mintákat a laboratóriumban a hűtőszekrény fagyasztóterében kb. –5 °C-ra fagyasztjuk, a felületét steril szikével eltávolítjuk, majd 8 db 1×1×0,5 cm-es kockát vágunk.

Steril csipesszel minden csészebe 2–2 db mintát helyezünk átlós irányban.

A csészéket ezután 2 órára hűtőszekrénybe tesszük, majd 32 °C, illetve 37 °C-on 16–24 órán át inkubáljuk.

Az eredmények kiértékelése

Keltetés után a gátlási zónákat 0,5 mm-es pontossággal le kell mérni. Ha a négy közül egy csészénél mindkét minta körül a gátlási gyűrű több, mint 2 mm, a próba pozitív.

A tesztet meg kell ismételni, ha az eredmény nem egyértelmű, pl. egy csészében levő két minta közül csak az egyik körül alakul ki pozitívnak értékelendő gátlási zóna, vagy ha bakteriális fertőzés befolyásolja az eredmény értékelését. Amennyiben az eredmény ismét nem egyértelműen pozitív, úgy negatívnak kell tekinteni.

A vizsgálatok során jelentkező nem specifikus gátlási zónákat dializáló hártáa alkalmazásával szűrjük ki. A dializáló hártát derékszögben meghajlítva a Petri csésze közepébe helyezzük, majd a fent leírtak szerint öntjük ki a teszt táptalajokat. A lefagyasztott és kivágott szöveti mintadarabok közül egy-egy Petri csészébe – közel a dializáló hártához – ugyanazon oldalon 1–1 db helyezendő el. Célszerű már a kezdeti vizsgálatnál a dializáló hártát igénybe venni, mert a gyakran előforduló, az elbírálást megnehezítő nem specifikus gátlások ezáltal kiküszöbölhetők.

A csészék kipróbálása (felülvizsgálata)

A csészék érzékenységének ellenőrzése minden kiöntésnél Resistest-koronggal történik.

Következtetések

Megvizsgáltuk és részben módosítottuk a már nemzetközileg is elfogadott 4 csészés agardiffúziós eljárást, amely alkalmas antibiotikum és szulfonamid reziduumok rutinszerű ellenőrzésére. A módszer érzékenységét egyes antibiotikumokra és szulfonamidokra kipróbáltuk, amelynek eredményeit a 2. táblázatban foglaltuk össze.

Javasoljuk a vágóállatok szerveinek és szöveteinek, valamint egyes állati eredetű élelmiszereknek a leírt módszerrel történő széles körű vizsgálatát a hatósági ellenőrzés során. A módszert természetesen szabványosításra is alkalmasnak tartjuk.

2. táblázat

4 csészés agardiffúziós módszerrel végzett egyes kemoterápiás szerekkel szembeni érzékenység

Antibiotikum Szulfonamid egyéb	Táptalaj pH	Érzékenység μg
OTC	B.subtilis BGA pH 6,0	0,0075
Neomycin	B.subtilis BGA pH 8,0	0,03
Streptomycin	B.subtilis BGA pH 8,0	0,015
Zn.bacitracin	M.flavus pH 7,0	0,015
Penicillin	M.luteus pH 8,0	0,001
Flavomycin	Staph.aureus 7,2	0,015
Virginiamycin	M.luteus pH 8,0	0,015
Furazolidon	B.subtilis BGA pH 8,0	0,0075
Salinomycin	B.subtilis BGA pH 6,0	0,06
Tylosin g	M.luteus	0,0075
Monenzin	B.subtilis BGA pH 6,0	0,0075
Sumetrolym	BGA + TMP pH 7,2	0,03
Quinoseptyl	BGA + TMP pH 7,2	0,03
Superseptyl	BGA + TMP pH 7,2	0,06
Sulfaquinoxalin Na	BGA + TMP pH 7,2	0,03
Salvoseptyl	BGA + TMP pH 7,2	0,125
Sulfaklorpiridazin Na	BGA + TMP pH 7,2	0,015
Sulfanylamid	BGA + TMP pH 7,2	0,03

TMP = Trimetoprim

- (1) ISO/TC 34/SC 6 The „four-plate-system”
 (2) Bogaerts, R. und Wolf, F.; Fleischwirtschaft 60, 667 és 671, 1980.

ВЫЯВЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ АНТИБИОТИКОВ И СУЛЬФАМИДНЫХ ВЕЩЕСТВ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ ЗАБИТЫХ ЖИВОТНЫХ И ТАКЖЕ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Д. Ач и З. Шимонфи

Авторы исследовали и частично модифицировали уже принятый в настоящее время, 4 чашечный агар-диффузионный метод, который пригоден для рутинного контроля резидий антибиотика и сульфамида.

В связи с этим, авторы сделали предложение по испытанию органов и тканей забитых животных и пищевых продуктов животного происхождения с помощью описанного метода анализа и также применение этого метода для ведомственного контроля.

Авторы считают пригодным этот метод также и для стандартизации.

DETECTION OF RESIDUES OF ANTIBIOTICS AND OF SULPHONAMIDE IN THE ORGANS AND TISSUES OF BEEF-CATTLE AND IN FOODS OF ANIMAL ORIGIN

Gy. Ács and Z. Simonffy

The already internationally accepted four-plate agar diffusion system suitable for the routine control of residues of antibiotics and of sulphonamide has been investigated and partly modified by the authors.

Therefore the authors proposed a comprehensive investigation of the organs and tissues of beef-cattles and of some foods of animal origin, with the use of the described method, and a quality control by the authorities. According to the authors the method is suitable also for the purposes of standardisation.

NACHWEIS VON RÜCKSTÄNDEN VON ANTIBIOTIKEN UND VON SULFONAMID IN DEN ORGANEN UND GEWEBEN VON SCHLACHTTIEREN UND IN LEBENSMITTELN TIERISCHEN URPRUNGS

Gy. Ács und Z. Simonffy

Das schon auch international angenommene Viertassensystem mit Agar-diffusion zur routinemässigen Kontrolle von Rückständen von Antibiotiken und von Sulfonamid wurde von den Autoren untersucht und teils auch modifiziert.

Die Autoren haben darum vorgeschlagen, die Organe und Gewebe der Schlachttiere, ferner einige Lebensmittel tierischen Ursprungs mittels der beschriebenen Methode weitgehend zu untersuchen bzw. behördlich zu kontrollieren. Die Methode eignet sich nach den Autoren auch zur Normalisierung.

LA DÉTECTION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES ET SULFONAMIDES DANS LES ORGANES ET LES TISSUS DES ANIMAUX DE BOUCHERIE ET DANS LES VIVRES D'ORIGINE ANIMALE

Gy. Ács et Z. Simonffy

La méthode internationale de diffusion en gélose de quatre plats (four plate system) qui est convenable pour contrôle en pratique des antibiotiques et des sulfonamides a été examinée et modifiée par les auteurs. Cette méthode est proposée à l'analyse et contrôle administratif des organes et des tissus des animaux de boucherie et des vivres d'origine animale.

La méthode est aussi considérée convenable pour la standardisation.