

Státní veterinární správa
Slezská 100/7
120 00 Praha 2

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

SVS/2018/006600-G

o uznání certifikované metodiky
v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a hodnocení programů
účelové podpory, schválené usnesením vlády ČR ze dne 8. února 2017 č. 107.

Stanovení inhibičních látek ve vybraných surovinách živočišného původu

doc. MVDr. Vladimír Pažout, CSc., doc. MVDr. Pavel Novák, CSc.
Ing. Gabriela Malá, Ph.D.

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhřetěves

Praha 2017

ISBN 978-80-7403-87-8

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu/~~podpory na rozvoj~~ výzkumné organizace č. NAZV QJ1530058.

Projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolovu“ ANO/NE*.
V případě, že projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolovu“, je výsledek typu N_{met} zdarma k dispozici všem zájemcům na webové stránce
http://www.vuzv.cz/index.php?p=vydavatelska_cinnost_kategorie&site=default&kateg=4

V Praze dne 15. 1. 2018

ÚSTŘEDNÍ VETERINÁRNÍ SPRÁVA
STÁTNÍ VETERINÁRNÍ SPRÁVY
Slezská 7/100, 120 56 Praha 2
- 13 -

Razítko odborného orgánu státní správy:

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy: MVDr. Zbyněk Semerád

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy: ústřední ředitel

Podpis zástupce odborného útvaru státní správy:

Souhlas Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

Datum a podpis ředitelky odboru:

31 -01- 2018

Ing. Pavlína Adam, Ph.D.

MINISTERSTVO
ZEMĚDĚLSTVÍ
Těšnov 65 17
110 00 Praha 1- Nové Město
-3-

* Nehodící se škrtněte.

Vladimír Pažout
a kolektiv

STANOVENÍ REZIDUÍ INHIBIČNÍCH LÁTEK VE VYBRANÝCH SUROVINÁCH ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU



ISBN 978-80-7403-87-8



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Stanovení inhibičních látek ve vybraných surovinách živočišného původu

Autoři

doc. MVDr. Vladimír Pažout, CSc.

doc. MVDr. Pavel Novák, CSc.

Ing. Gabriela Malá, Ph.D.

Oponenti

MVDr. František Kouba

Ředitel sekce Krajské veterinární správy SVS pro Jihočeský kraj

doc. MVDr. Jan Bardoň, Ph.D., MBA

Ředitel Státního veterinárního ústavu Olomouc

MVDr. Petr Šatrán, Ph.D.

Státní veterinární správa, Odbor ochrany zdraví a pohody zvířat

Metodika vychází z řešení projektu NAZV č QJ 153058

Obsah

I. CÍL METODIKY	5
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY	5
II.1. Úvod	5
II.2. Vlastní metodika	5
II.2.1 Metody pro stanovení reziduí inhibičních látek	5
II.2.2 Plotnové metody	6
II.3. Závěr a doporučení pro praxi	9
III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	9
IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	9
V. EKONOMICKÉ ASPEKTY	9
VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	10
VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	10

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je poskytnout uživatelům možnost rychlého stanovení reziduí inhibičních látek (RIL) ve vybraných surovinách a potravinách živočišného původu (mléko, vejce, med) modifikovaným postupem využívajícím filtrační papíry s vyšší nasákavostí a větší velikostí disků. Volba vhodné a rychlé metody stanovení RIL je důležitým zdravotním i technologickým kritériem pro nákup a zpracování vybraných surovin i potravin živočišného původu.

II. Vlastní popis metodiky

II.1. ÚVOD

V průběhu posledního desetiletí dochází ke zvýšení frekvence výskytu velmi závažných onemocnění, které se šíří prostřednictvím potravin. Výsledky epidemiologických studií WHO ukazují, že mikroorganismy v potravinách živočišného původu (viry, bakterie včetně protozoí, helmintů) jsou identifikovány jako nejčastější příčina onemocnění populace z potravin. Každý rok jsou alimentární onemocnění diagnostována u jednoho z deseti obyvatel naší planety. Po konzumaci kontaminovaných potravin každoročně zemře 420 000 lidí, z toho téměř jednu třetinu představují děti do pěti let. Je prokázáno, že většina alimentárních chorob je přenášena na člověka ze zvířat, která nevykazují žádné klinické příznaky onemocnění.

Ochrana lidského zdraví před zoonózami a nemocemi přenosnými potravinami vyžaduje mnoho opatření různého druhu na mezinárodní i národní úrovni. Základem jsou však dobrá účinná hygienická opatření v chovech hospodářských zvířat. Vysoká úroveň hygieny chovu zvířat je základním kamenem při zajištění vysoké úrovně ochrany lidského zdraví. Vyšší úroveň biosecurity chovu vede ke zlepšení zdraví a užitkovosti zvířat, a ke snížení potřeby používání antimikrobiálních látek a tím současně i ke zlepšení bezpečnosti potravin na začátku výrobního řetězce v zemědělské prvovýrobě.

Jestliže producenti standardizují postupy produkce na farmě, potom suroviny a potraviny živočišného původu budou produkovány na základě definovaných pravidel správné chovatelské praxe, mohou být odděleny od průměrných zvířat, hodnota konečného produktu se může jen zvýšit. Nezbytný je proto komplexní přístup k zajištění integrované ochrany kvality produkce na všech článcích výrobního procesu, "from conception to consumption - od početí ke spotřebě" nebo "from stable to table – ze stáje na stůl".

Obsah hormonů, dioxinů, BSE, E. coli O157:H7, Listeria, Campylobacter, Salmonella, rezidua antibiotik a chemických látek v surovinách a potravinách živočišného původu zvyšuje obavy spotřebitelů o zdravotní nezávadnost a bezpečnost potravin v Evropě.

II.2. VLASTNÍ METODIKA

II.2.1 Metody pro stanovení reziduí inhibičních látek

K detekci a stanovení RIL se využívají buď mikrobiologické screeningové metody, nebo fyzikálně chemické metody.

Mikrobiologické screeningové metody se dělí na selektivní rychlotesty, širokospektrální rychlotesty, plotnové nebo titrační metody.

Selektivní rychlotesty se používají především v mlékárenské praxi a v prvovýrobě mléka. Jsou založeny na receptorové nebo enzymatické analýze, která umožňuje stanovit velice rychle farmakologická léčiva. Výhodou těchto testů je jednoduchost a rychlost (1-10 minut podle druhu testu). Většina testů vyžaduje inkubaci vzorku při teplotě 40-56 °C.

Principem **širokospektrálních rychlotestů** je agarová difúze spojená se změnou barvy indikátoru v důsledku změny pH půdy, způsobené růstem testovacího kmene (*Geobacillus stearothermophilus*

v. c. C 953). Vzorky mléka a tekutých mléčných výrobků se inkubují při teplotě 64-65 °C. Výhodou této metody je skutečnost, že umožňuje záchyt a detekci širokého spektra veterinárních léčiv a jednak její jednoduché provedení. Nevýhodou je její časová náročnost 2-3 hodiny podle druhu testu. Tato metoda nachází uplatnění ve státních laboratořích potravinového dozoru i při plošném monitoringu. Z komerčně vyráběných diagnostik se jedná např. o INTEST a INTEST AS (ČR), BR test, BR AS test a BR Blue Star (SRN), FDT a STD – ABIOTEST (Polsko), DELVOTEST P a DELVOTEST SP (Holandsko), COPAN TEST KIT (Itálie).

Plotnové metody (metoda 6 ploten) umožňují záchyt a skupinovou identifikaci veterinárních léčiv podle velikosti inhibiční zóny. Odborným kvalifikovaným odhadem se stanovuje přibližná koncentrace veterinárních léčiv. Tyto metody jsou využívány při stanovení reziduí léčiv především v mase hospodářských zvířat jako screeningová metoda a dále u vzorků (mlékárenské výrobky, ostatní potraviny, krmné směsi aj.), u kterých nelze použít komerčně vyráběné testy. Při stanovení reziduí inhibičních látek plotnovými metodami se používají následující testovací kmeny: *Bacillus subtilis* BGA CCM 4062, *Bacillus subtilis* BGA CCM 4062+trimethoprim, *Kocuria rhizophila* CCM 552, *Geobacillus stearothermophilus* v. c. C953 CCM5965, *Escherichia coli* CCM 7372 k detekci tetracyklinů, aminoglykosidů, betalaktamových makrolidů a aminoglykosidů, sulfonamidů a chinolonů.

Mezi výhody plotnových metod patří schopnost detekovat současně velké množství různých antibakteriálních látek s různou chemickou strukturou; současně umožňují skupinovou identifikaci RIL a post-screeningové konfirmační metody.

Nevýhodou plotnových metod je, že citlivost agarových difuzních metod může být ovlivněna některými faktory (např. pH, množství média, druh MO, atd.). Dále pak významné kolísání citlivosti plotnových metod. Tyto metody navíc neposkytují úplnou informaci o vyšetřovaném vzorku. V neposlední řadě je třeba jmenovat delší inkubační dobu (18-24 hod.) a náročnost provedení.

Další možností stanovení reziduí inhibičních látek je jejich průkaz v tekutých médiích (např. mléko), tzv. antibiotest. Jedná se rychlou, jednoduchou a dostatečně citlivou metodu stanovení pomocí indikátorových papírků s vysušenou živnou půdou, nasycených testovací kulturou (*Bacillus subtilis*).

Poslední mikrobiologickou screeningovou metodou jsou **titrační metody**. Tento test se týká nejen obsahu cizorodých inhibičních látek, ale i ostatních faktorů, ovlivňujících růst čistých mlékařských kultur. Lze jím tedy posoudit (orientačně) i technologickou zpracovatelnost mléka.

Fyzikálně chemické metody spočívají v identifikaci a konfirmaci, včetně kvantifikace metodami chromatografickými (HPLC, TLC), gelovou elektroforézou (vysokonapěťová HVELFO-kapilární elektroforéza), enzymatickými (ELISA) a radioimunologickými (analýzátor CHARM II) metodami.

II.2.2 Plotnové metody

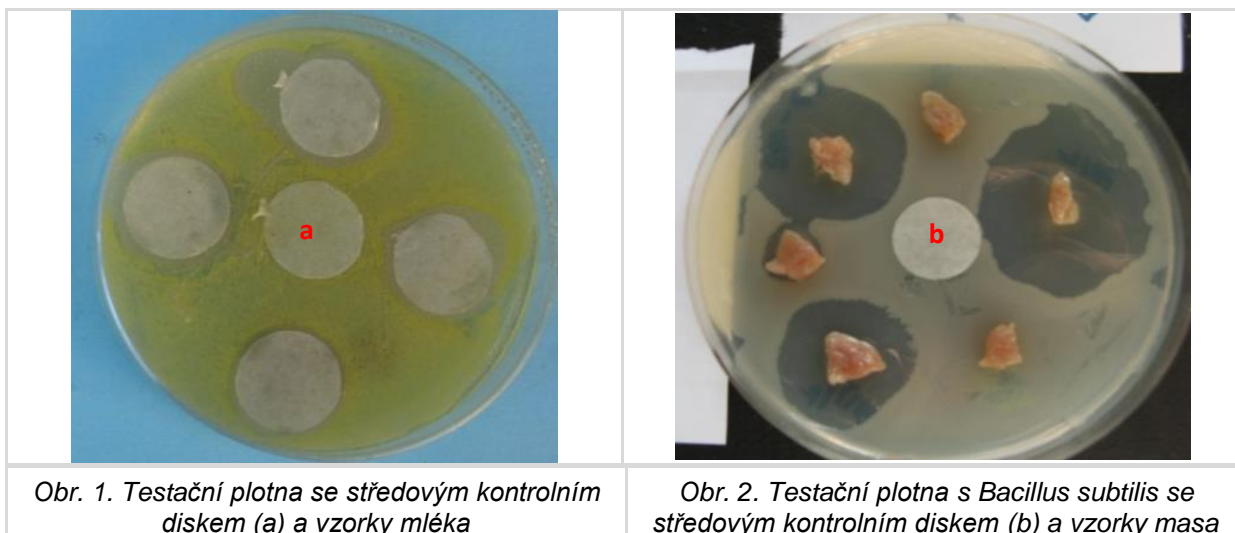
Základem plotnových metod je agar difuzní test. Tento test využívá testovací mikroorganismy (např. *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* aj.), které se inokulují na povrch kultivační půdy (glukózový agar, masopeptonový živný agar s upraveným pH) a přítomnost reziduí inhibičních látek (RIL) ve sledovaných vzorcích se projeví inhibicí růstu a vytvořením inhibiční zóny v okolí vzorku na plotnách. Ve zbytku agaru dochází k vyklíčení spor testovacích mikroorganismů, resp. k růstu testačního kmene, což se projeví jako zákal nebo je možno pozorovat splývající KTJ přímo v testovacím agaru.

Pro stanovení přítomnosti inhibičních látek byly vybrány testovací mikrobiální kmeny:

- *Bacillus subtilis* BGA CCM 4062
- *Goebacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 935 CCM 5965
- *Kocuria rhizophila* CCM 552
- *Escherichia coli* CCM 7372

z České sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy university v Brně.

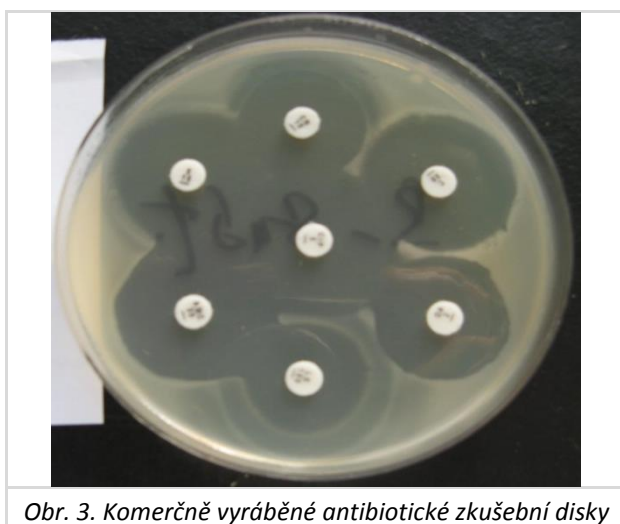
Před inokulací vzorků se musí testovací plotny krátce předsušit v termostatu, aby byl povrch půdy suchý bez kondenzace vody. Doprostřed testační plotny se umísťuje kontrolní disk napuštěný vybraným antibiotikem (obr. 1 a 2). Jedná se o komerčně vyráběné antibiotické zkušební disky (gentamicin, chloramfenikol, oxacilin, linkospektin, amoxicilin, erythromicin a ciproflexacilin) (obr. 3).



Obr. 1. Testační plotna se středovým kontrolním diskem (a) a vzorky mléka

Obr. 2. Testační plotna s *Bacillus subtilis* se středovým kontrolním diskem (b) a vzorky masa

U jatečných zvířat se pro stanovení RIL odebrává kostka svalu (vzorek 8x8x8 cm), ledvina (délka 10 cm) nebo játra (hrana 6-8 cm).



Obr. 3. Komerčně vyráběné antibiotické zkušební disky

Tuhé vzorky surovin živočišného původu (maso, ledviny, játra, vařený bílek nebo žloutek) se ke kultivaci odebírají po předchozím opálení povrchu vzorku opalovací pistolí. Sterilními nůžkami nebo skalpelem a pinzetou se vystřihne z hloubky tkáně vzorek o velikosti 7x7x7 mm, který se pokládá na povrch testovací plotny. Tuhé vzorky (maso, uvařený bílek nebo žloutek aj.) se kladou v počtu 4 kusy na testovací plotnu. Tekuté vzorky (mléko, syrový bílek, syrový žloutek, med aj.) o objemu 2 kapek se umísťují na filtrační papírový disk o průměru 10 mm v počtu maximálně 6 vzorků (obr. 2).

Modifikace metody stanovení reziduí inhibičních látek spočívá ve zvýšení vypovídací schopnosti při analýze tekutých vzorků surovin a potravin živočišného původu (mléko, syrová vejce, med) využitím filtračních papírů s vyšší nasákavostí (vinařské filtry – obr. 4, 5) a větší velikostí disků (15 mm). Tyto disky lze nasytit až 10 kapkami tekutých surovin a potravin živočišného původu (obr. 6, 7, 8 a 9) a tím se také zvyšuje pravděpodobnost záchytu RIL v testovaných vzorcích.

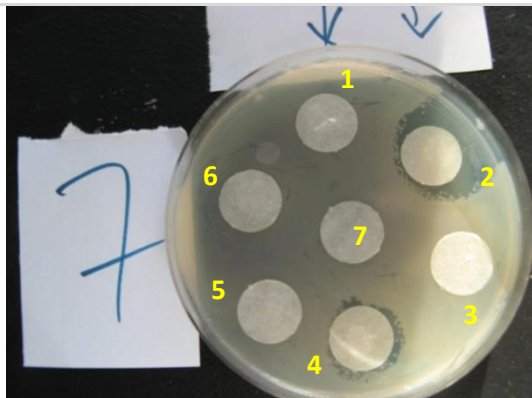


Obr. 4. Příprava testačních disků z vinařských filtrů

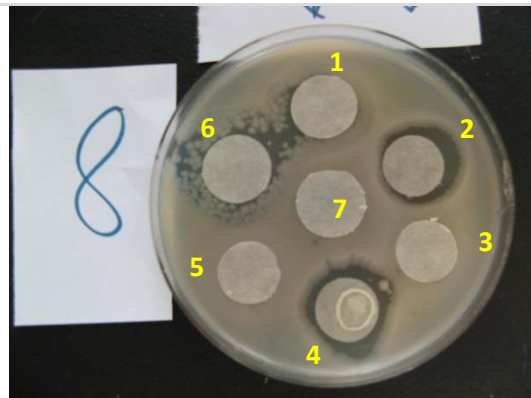


Obr.5. Testační disky vyrobené z vinařských filtrů

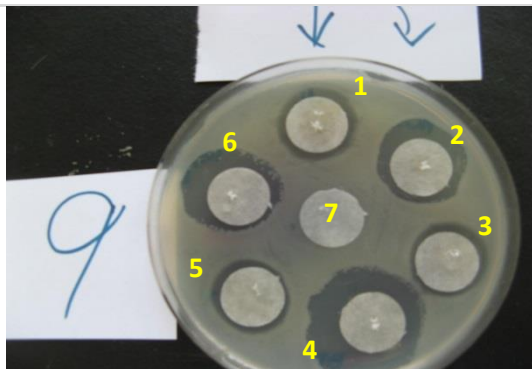
Testace s *Bacillus subtilis*



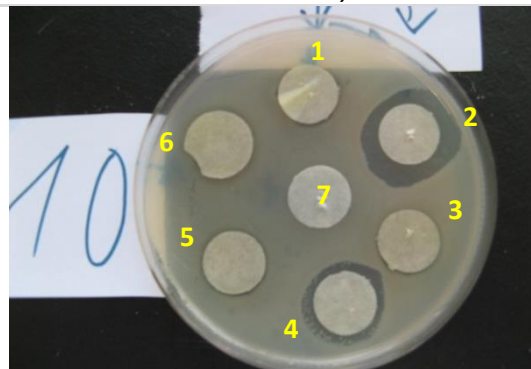
Obr. 6. Kravské mléko



Obr. 7. Medovicový med



Obr. 8. Vaječný bílek



Obr. 9. Vaječný žloutek

Tabulka 1. Inkubační teplota v závislosti na mikrobiálním kmeni

Mikrobiální kmen	Inkubační teplota [°C]	pH
<i>Bacillus subtilis</i> BGA CCM 4062	30	6,0 / 7,2 / 8,0
<i>Kocuria rhizophila</i> CCM 552	37	8,0
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> C 935 CCM 5965	64	8,0
<i>Escherichia coli</i> CCM 7372	37	8,0

Inkubační teplota testovací plotny závisí na použitém mikrobiálním kmeni (tabulka 1). Všechny plotny s mikroorganismy se inkubují 18-24 hodin, jen plotnu s *Geobacillus stearothermophilus* je možno odečítat již po 5hodinách inkubace. Testovací plotny se při inkubaci neobracejí dnem vzhůru.

Za pozitivní vzorek se považuje takový vzorek, u kterého je inhibiční zóna větší než 2 mm. Velikost inhibiční zóny se měří od vnějšího okraje inhibiční zóny po vnější okraj vzorku. Inhibiční zóna vzniká vždy okolo středového kontrolního disku napuštěného vybraným antibiotikem. Pokud se inhibiční zóna kolem středového kontrolního disku nevytvoří, je to důkaz o chybě při přípravě testačních půd.

Plotnové metody umožňují skupinovou identifikaci inhibiční látky. Pokud se zjistí pozitivní výsledek, je nutné tyto vzorky poslat do referenčních laboratoří pro další kvalitativní i kvantitativní vyšetření.

II.3. ZÁVĚR A DOPORUČENÍ PRO PRAXI

Modifikovaný postup agar difuzního testu je vhodný pro screeningové vyšetření reziduí inhibičních látek ve všech testovaných surovinách a potravinách živočišného původu (mléko, vejce, med). Má vyšší vypovídací schopnost a větší pravděpodobnost záchytu RIL v testovaných vzorcích.

Použité testační kmeny *Bacillus subtilis* BGA CCM 4062, *Kocuria rhizophila* CCM 552, *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 935 CCM 5965, *Escherichia coli* CCM 7372 jsou dostatečně citlivé na většinu ze 7 testovaných antibiotik (gentamicin, chloramfenikol, oxacilin, linkospektin, amoxicilin, erythromicin a ciproflexacilin).

Nejcitlivější kmen k zachycení nízké hladiny inhibičních látek ve vzorcích surovin a potravin živočišného původu je *Kocuria rhizophila*.

III. Srovnání „novosti postupů“

Modifikovaný postup agar difuzního testu spočívá v rozšíření možnosti jeho použití na vybrané suroviny a potraviny živočišného původu (mléko, vejce a med). V porovnání s klasickým difuzním testem dochází k významnému zvýšení vypovídací schopnosti upravené metodiky v důsledku použití filtračních papírů s vyšší nasákavostí a větší velikostí disků. Dále větší velikost disků umožňuje pojmout větší množství vzorku, čímž se samozřejmě také zvýší pravděpodobnost průkazu reziduí inhibičních látek (RIL) v testovaných surovinách resp. potravinách živočišného původu.

IV. Popis uplatnění certifikované metodiky

Modifikovaný postup stanovení reziduí inhibičních látek agar difuzním testem je přednostně určen především pro laboratoře Státních veterinárních ústavů, laboratoře Státní zemědělské a potravinářské inspekce, laboratoře mlékáren, provozní laboratoře zpracovatelů živočišných produktů (vejce, med), dále veterinární lékaře včetně laboratoří středních odborných a vysokých škol zemědělského, potravinářského a veterinárního zaměření, odborné veřejnosti i dalším zájemcům o danou problematiku.

V. Ekonomické aspekty

Předpokládané přímé ekonomické přínosy pro uživatele se pohybují na úrovni 0 Kč ve formě hospodářského výsledku v průběhu následujících pěti let. Hlavní přínosy metodiky jsou nepřímé.

Jedním z významných nepřímých ekonomických profitů zavedení modifikované metodiky stanovení reziduí inhibičních látek agar difuzním testem je rozšíření možnosti stanovení reziduí inhibičních látek ve vybraných surovinách a potravinách živočišného původu (mléko, vejce a med) zvýšením vypovídací schopnosti takto modifikované metodiky v důsledku použití filtračních papírů s vyšší nasákavostí a větší velikostí disků.

VI. Seznam použité související literatury

- CARLSSON, A., BJORCK, L. (1989): Lactoferrin and Lysozyme in Milk During Acute Mastitis and their Inhibitory Effect in Delvotest P. J. Dairy Sci., 72. 3166-3175.
- COUNCIL DIRECTIVE 92/46/EEC of the 16 June 1992 laying down the health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat-treated milk and milk-based products. 1992, 41.
- GELDERS S. (2001): Microbiological Contamination of Foods: Current Status and Need for Action. Conference Paper. AFC/WHO/FAO Intercountry Workshop on Emerging Food Safety Issues and Consumer Protection. Amman, Jordan, 28-30 October 2001.
- HANUŠ, O., TICHÁČEK, A. (1997): Analysis of milking technique effect on somatic cell count. Stočarstvo, 51. 121-128.
- HOLEC, J. (1994): Výskyt inhibičních látek v mléce a jeho hygienická a technologická rizika. In: Sborník k Inhibiční látce v mléce. Výzkumný ústav pro chov skotu, Proceedings. Rapotín, 4.
- HONKANEN-BUZALSKI, T., SUHREN, G. (1999): Residues of Antimicrobial Agents in Milk and their Significance to Public Health in Milk Processing. Bulletin IDF, 345, 11-12.
- HOZOVÁ B., GÖRNER F., SKLENÁROVÁ Z. Novšie poznatky z oblasti stanovenia inhibičných látok v mlieku. Potravná veda 1994. 12:489-496.
- KYRIAKIS, S.C., ALEXOPOULOS, C. (2000): Preventive Veterinary Medicine and Hygiene On-Farm Strategies for the Assurance of Safety and Quality in Pork Production. In Product Safety and Quality Assurance. ISPA, University of Vechta, June 22-23, 2000.
- NAVRÁTILOVÁ, P. (2002): Problematika reziduí inhibičních látek v syrovém kravském mléce. Veterinářství, 52, 478-481.
- PEELITZ, H.D., FEUCKER, W. (1998): Kontrolle des Ernährungs – zustandes am Computer. Neue Landwirtschaft, 11. Z 63 – 66.
- RIBBENS S, DEWULF J, KOENEN F, MINTIENS K, DE SADELEER L, DE KRUIF A, MAES D (2008): A survey on biosecurity and management practices in Belgian pig herds. Prev Vet Med, 83:228-241.
- SALONIEMI, H. (1997): Animal hygiene – scientific co-operation over borders for animal and human health. 9th International Congress in Animal Hygiene. 17-21 August 1997, Helsinki, Finland. Proceedings, Vol. 1: 3-7.
- TEST KITS (2001): Christian Hansen. First Ed., 4 pp.
- VOLDŘICH, M., JECHOVÁ, M. (2004): HACCP: správná výrobní a hygienická praxe, aktuální legislativa: příručka pro pracovníky restaurací a účelového stravování. (eds.): Bezpečnost pokrmů v gastronomii. České a slovenské odborné nakladatelství/Food Service. Praha, 183s.
- WHO (2002): Global Strategy for Food Safety – Food Safety Programme. Revised edition, 01/02
- Zákon MZe č. 166/1999Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

- PAŽOUT, V., TREML, F., ILLEK, J., NOVÁK, P. & MALÁ, G. Detection of residues of inhibiting substances in selected raw materials and foodstuffs of animal or. In XXVI International Congress of the Hungarian Association for Buiatrics. Budapest: University of Veterinary Science, 2016, s. 336-338.
- PAŽOUT, V., TREML, F., ILLEK, J., MALÁ, G. & NOVÁK, P. Orientační průkaz reziduí inhibičních látek ve vybraných surovinách a potravinách živočišného původu. In Aktuální otázky bioklimatologie zvířat 2016. Praha Uhřetěves: Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., 2016, s. 40-42.
- PAŽOUT, V., TREML, F., ILLEK, J., MALÁ, G. & NOVÁK, P. Průkaz reziduí inhibičních látek ve vybraných složkách potravního řetězce. In Aktuální otázky bioklimatologie zvířat 2017. Praha Uhřetěves: Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., 2017, s. 46-48.

Vydal: Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.
Přátelství 815, 104 00 Praha Uhřetěves

Název: **STANOVENÍ REZIDUÍ INHIBIČNÍCH LÁTEK VE VYBRANÝCH SUROVINÁCH
ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU**

Autor: doc. MVDr. Vladimír Pažout, CSc. (podíl na vzniku metodiky 90 %)
doc. MVDr. Pavel Novák, CSc. (podíl na vzniku metodiky 5 %)
Ing. Gabriela Malá, Ph.D. (podíl na vzniku metodiky 5 %)

ISBN: 978-80-7403-87-8

Metodika vychází z řešení projektu NAZV č QJ 1530058

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Palackého tř. 1946/1
612 42 Brno

www.vfu.cz

Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i.
Přátelství 815
104 00 Praha Uhřetěves

www.vuzv.cz