

DELVO-X-PRESS IR KITŲ METODŲ INHIBITORIAMS ŽALIAME PIENE NUSTATYTI PALYGINAMASIS ĮVERTINIMAS

Joana Šalomskienė, Dovilė Jonkuvienė, Marija Paserpskienė
 KTU Maisto institutas, Taikos pr. 92, LT-51180, Kaunas; tel. (8~37) 31 23 80; el. paštas: mikrobjs@lmai.lt

Santrauka. Atliktas keturių metodų inhibitoriams žaliame piene nustatyti – mikrobiologinio su jautrios kultūros *Geobacillus stearothermophilus* sporomis, naudojant *Delvotest-SP-NT* preparatus, ir sparčiųjų metodų *Delvo-X-PRESS*, *Penzym* bei *Penzym S* palyginamasis įvertinimas. Nustatyta, kad visų keturių metodų jautrumas keturiems beta laktaminių žiedų turintiems antibiotikams (penicilinui, ampicilinui, amoksicilinui, oksacilinui) atitiko firmų-gamintojų nurodytą jautrumą. Lyginant sparčiuosius metodus su pamatiniu mikrobiologiniu metodu inhibitoriams „teigiamuose“ (su inhibitoriais) pieno mėginiuose nustatyti, sutapo: 94,3 proc. – *Delvo-X-PRESS* ir *Delvotest-SP-NT*; 73,7 proc. – *Penzym* ir *Delvotest-SP-NT*; 68,0 proc. – *Penzym S* ir *Delvotest-SP-NT* metodais ištirtų mėginių rezultatų. Lyginant Lietuvoje du plačiausiai taikomus sparčiuosius metodus – *Delvo-X-PRESS* ir *Penzym* – inhibitoriams pieno mėginiuose nustatyti, sutapo 68,4 proc. ištirtų mėginių rezultatų. Pieno mėginių, kuriuose antibakterinės medžiagos rastos tik *Penzym* ir *Penzym S* metodais, bei tokių mėginių, kuriuose antibakterinės medžiagos rastos *Delvotest-SP-NT* ir *Penzym* bei *Penzym S* metodais, patikrinimas po apdorojimo penicilinaze ir p-aminobenzenkarboksirūgštimi parodė, kad *Penzym* ir *Penzym S* metodais galėjo būti gauti klaidingi teigiami rezultatai.

Remiantis tyrimų rezultatais, pasiūlyta įteisinti *Delvo-X-PRESS* metodą, kurio rezultatai, tiriant „teigiamus“ mėginius, 94,3 proc. sutapo su mikrobiologiniu metodu.

Raktažodžiai: inhibitoriai, penicilinas, žalias pienas, *Delvo-X-PRESS* metodas, *Delvotest-SP-NT*, *Penzym* ir *Penzym S* metodai, palyginamasis įvertinimas.

COMPARISON OF DELVO-X-PRESS AND OTHER METHODS FOR DETERMINING INHIBITORS IN RAW MILK

Joana Šalomskienė, Dovilė Jonkuvienė, Marija Paserpskienė
 Food Institute of Kaunas University of Technology, Taikos pr. 92, LT-51180 Kaunas, Lithuania;
 e-mail: mikrobjs@lmai.lt

Summary. Comparison of four methods for determining inhibitors in raw milk – *Delvotest-SP-NT* (microbiological method with spores of *Geobacillus stearothermophilus*) and rapid methods *Delvo-X-PRESS*, *Penzym* and *Penzym S* – was made. It has been determined that sensitivity of *Delvo-X-PRESS* and *Delvotest-SP-NT* to four β -lactams (penicillin, ampicillin, amoxicillin, oxacillin) corresponded with sensitivities declared by manufacturers. Comparison of rapid methods with a reference microbiological method for determining inhibitors in „positive“ milk samples resulted in 94.3 % coinciding of *Delvo-X-PRESS* and *Delvotest-SP-NT*, 73.7 % of *Penzym* and *Delvotest-SP-NT* and 68.0 % of *Penzym S* and *Delvotest-SP-NT*, respectively. Comparison of two rapid methods widely used in Lithuania for determining inhibitors in milk – *Delvo-X-PRESS* and *Penzym* – showed that 68.4 % results of investigated samples tallied. Examination of milk samples in which antibacterial substances were found only using *Penzym* and *Penzym S* method and also the samples, in which antibacterial substances have been found using *Delvotest-SP-NT*, *Penzym* and *Penzym S* method after treating them with penicillinase and p-aminobenzoic acid showed that the results received using *Penzym* and *Penzym S* methods could be false positive.

Based on the results of investigation, proposition was made to validate *Delvo-X-PRESS* method which results during investigation of „positive“ milk samples tallied with a microbiological method in 94.3 % cases.

Key words: inhibitors, penicillin, raw milk, *Delvo-X-PRESS* method, *Delvotest-SP-NT*, *Penzym* and *Penzym S* methods.

Įvadas. Europos Tarybos reglamentas (EB) Nr. 2377/90 nustato antibiotikų ir kitų antibakterinių medžiagų didžiausią leistiną likučių kiekį (DLK, angl. – MRL) gyvūniniuose maisto produktuose. Antibiotikams piene nustatyti taikomi imuninio arba receptorių tyrimo (fermentiniai), mikrobiologiniai ir fizikiniai cheminiai metodai. Imuninio arba receptorių tyrimo metodai pagrįsti fermentų sąveika su antibiotikais. Šie metodai gali būti kiekybiniai, bet paprastai taikomi kaip kokybiniai. Fermentiniai metodai yra daug brangesni už mikrobiologinius ir nustato tas medžiagas, kurios imunologiškai rea-

guoja su imobilizuotu receptoriumi. Fermentiniai metodai yra greitai, jų trukmė – nuo keleto iki keliolikos minučių, tačiau jie yra specifiniai tik vienam antibiotikui ar jų grupei. Metodai gali būti ne visai tikslūs, todėl fermentinių metodų rezultatai paprastai tikrinami mikrobiologiniais metodais, plačiai taikomais oficialiajai kontrolei, mat yra pakankamai tikslūs, gana paprasti ir nebrangūs. Jais gali būti nustatomi ne tik beta laktamų grupės antibiotikai, bet ir tetraciklinai bei sulfonamidai. Jų trukumas – ilga trukmė (2,5–4 h). Mikrobiologinių metodų principas – jautrių antibiotikams bakterijų kultūrų, dažniausiai sporinių, pvz.,

Geobacillus stearothermophilus, *Bacillus subtilis*, naudojimas. Kambario temperatūroje sporos yra labai stabilios, o inkubuojant optimalioje temperatūroje jos sudygsta, sunaudoja terpėje esantį cukrų ir kaip metabolitą išskiria rūgštį, dėl to kinta indikatorius spalva (Gaudin, Maris, 2001). Europoje plačiausiai taikomas mikrobiologinis antibiotikų nustatymo metodas su jautria kultūra – *Geobacillus stearothermophilus*, naudojant *Delvotest* preparatus (DSM, Nyderlandai). *Delvotest* analogai yra *Copan* (CMT) (<http://www.chr-hansen.com>), *LPT*¹ ir *Mal-1*² testai. *BRT* testu nustatomi antibiotikų likučiai, mažesni nei (EB) Nr. 2377/90 reglamentuojami DLK. Šiuo metodu galima aptikti beta laktaminius antibiotikus (benzilpeniciliną, oksaciliną ir kloksaciliną) bei sulfonamidus (sulfatiazolą ir sulfometaziną) (Adriany et al., 1995).

Du mikrobiologiniai metodai – *Delvotest SP-NT* ir *Copan* testas – palyginti norint juos įteisinti antimikrobinų medžiagų likučiams piene nustatyti. Ištirti dešimties skirtingų antibiotikų likučiai. Tyrimai parodė, kad abu metodai tinka penicilino, kloksacilino, sulfametazino, cefpaleksino ir gentamicino likučiams piene nustatyti. Šiais metodais galima nustatyti ES reglamentuojamus leistinus arba dar mažesni minėtų antibiotikų likučių kieki. Metodai negali būti įteisinti oksitetraciklino, dihidrostreptomocino, trimetoprimo ir cefkvinomo likučiams nustatyti (Le Breton et al., 2000).

Delvo-X-PRESS metodas (AOAC *ELISA* metodas) taikomas beta laktaminių antibiotikų likučiams žaliame piene nustatyti. Taikant modifikuotą metodiką ir naują įrangą, mėginio tyrimas trunka 7 minutes (Keizer et al., 1995). *Delvo-X-PRESS* yra spartusis receptorių tyrimo metodas. JAV maisto ir vaistų asociacija (Food and Drug Association, FDA, JAV) reikalauja aptikti keturių iš šešių beta laktamų – penicilino G, cefapirino, ceftiofuro, ampicilino, amoksicilino ir kloksacilino – DLK. *Delvo-X-PRESS* metodu aptinkami penki iš šešių FDA reikalaujamų beta laktamų (neaptinkamas tik kloksacilinas), tačiau šis metodas atitinka ES reikalavimus dėl DLK (<http://www.dsm-dairy.com>). *Delvo-X-PRESS* metodas, žinomas nuo 1995 m., Lietuvoje pradėtas taikyti prieš 12 metų.

Atlikti palyginamieji tyrimai beta laktaminį žiedą turinčių antibiotikų likučiams tirti taikant du metodus – *Delvotest-P* ir *Delvo-X-PRESS*. Tyrimui panaudota 100 žalio pieno mėginių, kuriuose buvo nevienodas skirtingų antibiotikų likučių kiekis. Buvo lyginama aptikimo riba ir antibiotikų DLK, reglamentuojamas šalyje. Visais atvejais abu metodai atitiko arba viršijo deklaruojamą metodų jautrumą, išskyrus *Delvo-X-PRESS* metodu aptiktą kloksaciliną. Šio antibiotiko leistinas kiekis – 30 ng/ml, o aptikta tik 70 ng/ml, nors gamintojas deklaruoja 50 ng/ml. Nebuvo klaidingai „teigiamų“ ar „neigiamų“ mėginių. Abu metodus lengva taikyti, nors *Delvo-X-PRESS* reikalauja didesnių įgūdžių. Dėl neilgos tyrimo trukmės – *Delvo-X-PRESS* – 10 min, o *Delvotest-P* – 2,5 h – pirmasis

taikytinas superkamam pienui vertinti (Mitchell et al., 1995).

Kita mokslininkų grupė (Scannella et al., 1997) *Delvotest-P* ir *Delvo-X-PRESS* metodais ištyrė 500 žalio pieno mėginių. 499 mėginių rezultatai sutapo tiriant abiem metodais. Vienas mėginys buvo priskirtas prie teigiamų tiriant *Delvo-X-PRESS* metodu, o *Delvotest-P* metodu – prie neigiamų. Rezultatai parodė, kad *Delvo-X-PRESS* metodas tinka beta laktamams žaliame piene aptikti.

Komerciniai antibakterinių medžiagų likučių nustatymo fermentiniai tyrimo metodai skiriasi savo mechanizmais ir spalvinėmis reakcijomis, bet dažniausiai bendras požymis yra imunologinė susijungimo reakcija ir spalvos pokytis. Tačiau yra dvi išimtys. *Penzym* (UCB *Bioproducts*)³, vienas iš pirmųjų 1980 m. pradžioje sukurtų fermentinių testų beta laktaminiams antibiotikams aptikti, vietoj imuninės reakcijos naudoja fermento stabdymo reakciją, ir vizualiai tai matyti pagal spalvos pokytį. *Charm II* (*Charm Sciences Inc*, JAV) (<http://www.charm.com>) – vėliau sukurtas testas, kuriuo galima aptikti septynias antibakterinių medžiagų likučių grupes. Jam naudojama imuninė antibakterinės medžiagos ir bakterijos receptorius sujungimo reakcija. Šis kompleksas stebimas vietoj fermento reakcijos naudojant žemo dažnio ³H arba ¹⁴C radioizotopus. Visai neseniai pasirodė dar paprastesni receptorių pagrindu sukurti testai, tokie kaip *SNAP* (*IDEXX Laboratories*, Inc, JAV, 2001), *β-STAR* (UCB *Bioproducts*, Belgija, 2003), *ROSA* (*Charm Sciences Inc*, JAV) (<http://www.charm.com>) ir *Twinsensor*^{BT} (*Unisensor*, Belgija) (<http://www.twinsensor.com>). *Penzym*, *β-STAR*, *ROSA* ir *SNAP* testams atlikti sėkmingai panaudoti beta laktamams specifiniai receptorių baltymai arba penicilinus jungiantys baltymai (1 lentelė).

Lyginant keturis metodus – *Penzym S*, *Delvo-X-PRESS β-lactam II*, *Delvo-SP* ir difuzijos testus – ištirta 218 pieno mėginių, atrinktų skirtingose gamybos grandyse – ūkiuose, supirkimo punktuose, pieninėse ir rinkoje. Visų metodų jautrumas aptinkant peniciliną G, ampiciliną ir amoksiciliną atitiko reikalaujamą jautrumo lygį, išskyrus difuzijos testą ir *Delvo-X-PRESS* metodą, kurių jautrumas buvo nepakankamas kloksacilinui aptikti (Petrovič et al., 2008).

Paprastai antibiotikų likučiai piene nustatomi dviem etapais: rūšiavimo metodu aptinkami „teigiami“ pieno mėginiai (kuriuose rasta inhibitorių), toliau mėginiai patvirtinami tikslesniais metodais. Patvirtinti galima efektyviosios skysčių chromatografijos metodu ir UV detektoriumi. Taip identifikuojamos mėginyje esančios antibiotikų molekulės ir jų kiekis (Ghidini et al., 2002). Šių metodų jautrumas ir selektyvumas gana žemas. Juos pagerinti galima keliais gryninimo etapais (Faria Reyes et al., 2000).

Šiuo metu yra didelė antibakterinių medžiagų likučių piene nustatymo metodų pasiūla, todėl pagrįstai kyla klausimas, kurie jų patikimiausi. ES reglamentuojamų DLK antibakterinių preparatų sąrašas vis labiau plečiamas. Tiekėjai turi garantuoti, kad jų pristatomas pienas neužterštas nė vienos iš reglamentuojamų antibakterinių

¹ IST 3381629-01:2000. Preparatas LPT inhibitoriams piene nustatyti. Bendrieji reikalavimai.

² IST 1195612-102:2001. Preparatas Mal-1 inhibitoriams piene nustatyti. Bendrieji reikalavimai.

³ Dabar *Nitrogen corporation*.

medžiagų likučiais arba likučiai neviršija DLK ribų. Daugelis siūlomų metodų negali garantuoti visų šių medžiagų nustatymo normų. Nors dažniausiai veterinarijos praktiko-

je naudojami beta laktaminės grupės antibiotikai, gali būti aptinkami ir sulfonamidai, tetraciklinai bei kitos medžiagos.

1 lentelė. Inhibitoriams žalio pieno mėginiuose nustatyti naudojamų sparčiųjų testų charakteristika

Testas	Firma gamintoja	Metodo veikimo principas	Aptinkami inhibitoriai
<i>Delvo-X-PRESS</i>	DSM, Nyderlandai	Imuninio-receptorių tyrimo metodas, pagrįstas laisvų beta laktamų radikalų ir receptoriaus (<i>Bacillus stearothermophilus</i>) susijungimo reakcija	Penicilinas G 0,002–0,004 µg/ml ampicilinas 0,004 µg/ml amoksicilinas 0,004 µg/ml kloksacilinas 0,030–0,060 µg/ml oksacilinas 0,025–0,050 µg/ml ir kiti beta laktamai
<i>Penzym, Penzym S</i>	<i>Nitrogen corporation</i> , buvusi <i>UCB Bioproducts</i> , Belgija	Fermentinis metodas. Naudojamas fermentas DD-karboksipeptidazė, hidrolizuojanti <i>R-D-Ala-D-Ala</i> tipo sintetinius substratus ir greitai reaguojanti su beta laktaminį žiedą turinčiais antibiotikais, sudarydama pastovų kompleksą	Pagal naudojimo instrukciją, pridedama gamintojo: <i>Penzym</i> 0,017 TV/ml; <i>Penzym S</i> , penicilinas G 0,005–0,006 TV/ml. Pagal gamintojo deklaruojamus aptinkamus kiekius: <i>Penzym</i> 0,004–0,006 µg/ml; <i>Penzym S</i> 0,002–0,004 µg/ml
<i>β-STAR</i>	<i>Nitrogen corporation</i> , buvusi <i>UCB Bioproducts</i> , Belgija	Imuninio-receptorių tyrimo metodas, pagrįstas specifine beta laktaminį žiedą turinčių antibiotikų receptoriaus, susijungusio su aukso dalelėmis, ir beta laktaminį žiedą turinčių antibiotikų, esančių piene, sąveika	Penicilinas G 0,003 ± 0,001 TV/ml ir kiti beta laktaminiai antibiotikai
<i>SNAP</i>	<i>IDEXX Laboratories</i> , Inc, JAV	Imunofermentinis metodas, pagrįstas tuo, kad naudojamas konjugatas (antibiotikus jungiantys receptoriniai baltymai, konjuguoti su fermentu – krienų peroksidaze), kuris prijungia piene esančius tiriamus antibiotikus, sudarydamas stabilius kompleksus	Penicilinas G 0,004 µg/ml, ampicilinas 0,004 µg/ml, amoksicilinas 0,004 µg/ml, cefapirinas 0,004 µg/ml, ceftiofuras 0,006 µg/ml, kloksacilinas 0,03 µg/ml, dikloksacilinas 0,025 µg/ml
<i>ROSA</i>	<i>Charm Sciences</i> , JAV	Imuninio-receptorių tyrimo metodas, pagrįstas konkurentine receptorine reakcija	Penicilinas G 0,004 µg/ml, amoksicilinas, ampicilinas, cefazolas, ceftiofuras, cefchinomas, cefaloniumas, cefapirinas, kloksacilinas, dikloksacilinas, oksacilinas, nafcilinas
<i>Twinsensor^{BT}</i>	<i>Unisensor</i> , Belgija	Imuninio-receptorių tyrimo metodas, pagrįstas specifine beta laktaminį žiedą turinčių antibiotikų receptoriaus, susijungusio su aukso dalelėmis, ir beta laktaminį žiedą turinčių antibiotikų, esančių piene, sąveika	Benzilpenicilinas 0,002–0,003 µg/ml amoksicilinas 0,003–0,005 µg/ml ampicilinas 0,003–0,005 µg/ml chlortetraciklinas 25–30 µg/ml oksitetetraciklinas 30–40 µg/ml tetraciklinas 0,040–0,050 µg/ml

Kauno technologijos universiteto Maisto institute antibakterinių medžiagų grupės žaliame karvių piene nustatytos mikrobiologiniais metodais (Žvirdauskienė ir kt., 2004): iš 10 000 žalio pieno mėginių 0,8 proc. rasta su inhibitorių likučiais. Didžiausią dalį (86 proc.) sudarė penicilinų grupės antibiotikų likučiais užteršti mėginiai. Tetraciklino, sulfonamidų, aminoglikozidų ir makrolidų likučiais užteršti mėginiai sudarė atitinkamai 24, 55, 34 ir 19 proc. „teigiamų“ mėginių. Daugelis pieno mėginių buvo užteršti keleto inhibitorių grupių likučiais. Kadangi ne tik Lietuvoje, bet ir daugelyje kitų šalių didžiąją dalį mėginių su inhibitoriais sudaro penicilinų grupės likučiais už-

teršti pieno mėginiai, daugiausia metodų taikoma būtent beta laktaminės grupės antibiotikams (penicilinams) nustatyti.

Sparčiai inhibitorių likučiams žaliame piene nustatyti Lietuvoje iki šiol plačiausiai buvo taikomi du spartieji metodai – *Delvo-X-PRESS* ir *Penzym*. Abu jie skirti beta laktamų likučiams žaliame piene nustatyti, tačiau pavyko rasti tik vieną literatūros šaltinį, kuriame būtų jų palyginimo duomenys (Petrovič et al., 2008). Norint įteisinti *Delvo-X-PRESS* metodą, kad būtų galima jį taikyti superkant pieną (t. y. įtraukti *Delvo-X-PRESS* metodą į *Pieno supirkimo taisykles* bei *Žalio pieno pirminių rodiklių įver-*

tinimo instrukcija), buvo būtina atlikti palyginamąjį šio metodo įvertinimą su ES plačiausiai taikomu mikrobiologiniu (su *G. stearothermophilus* kultūros sporomis) bei *Penzym* metodu.

Darbo tikslas – atlikti *Delvo-X-PRESS* metodo inhibitoriams žaliame piene nustatyti palyginamąjį įvertinimą su pamatiniu mikrobiologiniu metodu ir plačiausiai taikomu fermentiniu metodu.

Medžiagos ir metodai. Darbas atliktas KTU MI Mikrobiologijos laboratorijoje. Tyrimo objektai – žalias pienas, sterilizuotas pienas „Margė“ ir antibiotikų piene tirpalai. Žalio pieno mėginiai gauti iš pieno perdirbimo įmonių ir VĮ „Pieno tyrimai“. Sterilizuotas pienas „Margė“ išsigytas prekybos tinkle.

Antibiotikų tirpalų pirmieji skiediniai ruošti steriliame distiliuotame vandenyje, pora paskutiniųjų skiedinių – piene, regeneruotame iš sauso nugriebto pieno miltelių (10 proc. tirpale). Skiediniams ruošti buvo naudojami *Merck* firmos pieno milteliai be inhibitorių, kat. Nr. 1.15363.

Delvo-X-Press metodas, naudojant žalio pieno mėginius, buvo lyginamas su *Penzym*, *Penzym S* ir *Delvotest-SP-NT* (ES pamatinio metodo⁴ analogas) testais (<http://www.dsm-dairy.com>). Panaudoti *Delvo-X-Press*, *Delvotest-SP-NT*, *Penzym* ir *Penzym S* preparatai (pagal gamintojų instrukcijas) ir antibiotikų etalonai: penicilinas G, ampicilinas, oksacilinas – *Fluka (bioChemika)* firmos, amoksicilinas ir penicilnazė – *SIGMA* firmos; p-aminobenzenkarboksirūgštis – *Merck* firmos.

Kokybiniam dviejų testų palyginimui taikytas *Mac-Nemars* testas (Guideline No. 29.2001).

Tyrimų kartotinumai – du fermentiniams ir trys mikrobiologiniams testams.

Tyrimo rezultatai.

1. *Delvo-X-PRESS* metodo jautrumo nustatymas

Kadangi *Delvo-X-PRESS* metodas jautrus tik beta laktaminiams antibiotikams, jautrumas patikrintas keturiais šios grupės antibiotikais. Iš fermentinių ir imuninio arba receptorių tyrimo metodų Lietuvoje plačiausiai taikomas *Penzym*, todėl kartu pateikiami šio metodo ir mikrobiologinio metodo jautrumo patikrinimo rezultatai.

Buvo pagaminti penicilino G, ampicilino, amoksicilino ir oksacilino tirpalai, kurių koncentracijos parinktos pagal vertintų metodų jautrumo ribas, deklaruojamas gamintojų.

Delvo-X-PRESS metodo beta laktamų nustatymo ribos: 0,002–0,004 µg/ml penicilino G; 0,004 µg/ml ampicilino; 0,004 µg/ml amoksicilino; 0,025–0,050 µg/ml oksacilino piene.

Delvotest SP-NT metodo beta laktamų nustatymo ribos: 0,0025 µg/ml penicilino G; 0,003–0,005 µg/ml ampicilino; 0,003–0,005 µg/ml amoksicilino; 0,010 µg/ml oksacilino piene.

Penzym ir *Penzym S* metodo beta laktamų nustatymo ribos – atitinkamai 0,004–0,006 µg/ml penicilino G ir 0,002–0,004 µg/ml penicilino G. *Penzym* preparato rinkini-

nyje yra gamintojo įdėta spalvų skalė ir naudojimo instrukcija. Spalvų skalėje nurodytos spalvos, atitinkančios 0,000 TV/ml; 0,008 TV/ml ir 0,017 TV/ml. Pagal instrukciją 0,000 TV/ml skalės spalva (rausvai oranžinė) iš tikrųjų būdinga mėginiams, kuriuose randama mažiau kaip 0,005 TV/ml penicilino. Kadangi 0,004 µg/ml penicilino atitinka 0,0067 TV/ml penicilino, galima teigti, kad metodas atitinka ES reglamentuojamą penicilino DLK. Tyrimo rezultatai pateikti 2 lentelėje.

Tyrimų rezultatai parodė, kad *Delvo-X-PRESS*, *Penzym* ir *Penzym S* bei mikrobiologinio metodo *Delvotest-SP-NT* jautrumas keturiems beta laktaminų žiedą turintiems antibiotikams – penicilinui, ampicilinui, amoksicilinui ir oksacilinui – atitiko firmų-gamintojų nurodytą jautrumą.

2. Metodų palyginimas naudojant žalio ir sterilizuoto pieno mėginius

Delvo-X-PRESS metodo palyginamasis įvertinimas su kitais inhibitorių nustatymo testais buvo atliktas naudojant žalio ir sterilizuoto pieno mėginius. Iširta 112 žalio ir 10 sterilizuoto pieno mėginių. Pieno perdirbimo įmonių buvo prašoma atrinkti „teigiamus“ žalio pieno mėginius, t. y. su inhibitoriais (įmonės taikė *Delvo-X-PRESS* metodą), ir iki išvežant į institutą laikyti minus 18°C temperatūroje. Žalio pieno mėginiai, gauti iš pieno perdirbimo įmonių, iki tyrimo buvo laikomi užšaldyti minus 18°C temperatūroje. Prieš tyrimą mėginiai atšildyti 20°C temperatūros vandens vonelėje. Iš VĮ „Pieno tyrimai“ buvo gauta 50 „teigiamų“ žalio pieno mėginių, atrinktų įmonėje *LPT* metodu (*Delvotest SP-NT* analogas). KTU MI mėginiai buvo laikomi 2–4°C temperatūroje iki tyrimo, t. y. nebuvo užšaldyti. Kiekvienas mėginys buvo tiriamas visais metodais tą pačią dieną. Kai kurių mėginių likučiai po tyrimo užšaldyti ir toliau laikyti minus 18°C temperatūroje tolesniam tyrimui. Tyrimų rezultatai, sugrupuoti pagal vienodus tyrimų rezultatus, pateikti 3 lentelėje.

Iš 4 lentelės duomenų matyti, kad rasta „teigiamų“ mėginių: tirtų *Delvotest-SP-NT* metodu – 53,3 proc. iš 122 pieno mėginių; *Delvo-X-Press* metodu – 48,4 proc. iš 122 mėginių; *Penzym* metodu – 75,4 proc. iš 57 mėginių; *Penzym S* metodu – 83,6 proc. iš 122 pieno mėginių.

57 pieno mėginių, kurie buvo tirti ir *Penzym*, ir *Penzym S* metodais, rezultatai sutapo 100 proc. Tą galima paaiškinti minėtu panašiu šių metodų jautrumu.

Buvo mėginių, kuriuose antibakterinės medžiagos rastos tik *Penzym* ir *Penzym S* metodu, ir tokių mėginių, kuriuose antibakterinės medžiagos rastos *Delvotest-SP-NT* ir *Penzym S* metodu, o *Delvo-X-PRESS* metodu – nerastos. Kadangi *Penzym* ir *Penzym S* metodai skirti tik beta laktaminiams antibiotikams aptikti, į „teigiamus“ pieno mėginius buvo įpilta fermento penicilnazės tirpalo galimiems beta laktaminiams antibiotikams suskaidyti. Antroji kontrolė – regeneruotas *Merck* pienas be inhibitorių, į kurį specialiai įpilta penicilino 0,008 µg/ml pieno, buvo paruošta tam, kad būtų galima įsitikinti, jog penicilnazė yra veikli (4 lentelė).

⁴ ISO/TS 26844:2006|IDF/RM 215:2006 Milk and milk products – Determination of antimicrobial residues – Tube diffusion test.

2 lentelė. *Delvo-X-PRESS*, *Delvotest SP-NT* ir *Penzym* metodų jautrumo patikrinimas

Mėginys	ES nustatyti DLK*, μg/ml	Tiriama koncentracija, μg/ml	<i>Delvo-X-Press</i>	<i>Delvotest SP-NT</i> (mikrobiologinis)	<i>Penzym</i>	<i>Penzym S</i>
1 kontrolinis mėginys (regeneruotas <i>Merck</i> pienas) be inhibitorių	–	–	–	–	–	–
2 kontrolinis mėginys (regeneruotas iš sauso <i>DSM</i>)	–	–	–	–	–	–
Penicilinas G	0,004	0,001	–	–	–	–
		0,002	–	+	–	–
		0,003	+	+	–	+
		0,004	+	+	+	+
Ampicilinas	0,004	0,003	–	+	+	+
		0,004	+	+	+	+
		0,005	+	+	+	+
		0,006	+	+	+	+
Amoksicilinas	0,004	0,003	–	+	+	+
		0,004	–	+	+	+
		0,005	+	+	+	+
		0,006	+	+	+	+
Oksacilinas	0,030	0,02	–	+	–	–
		0,025	+	+	–	+
		0,04	+	+	+	+
		0,05	+	+	+	+

„+“ – antibiotikų rasta; „–“ – antibiotikų nerasta; *žr. [7]

3 lentelė. Inhibitorių piene nustatymo keturiais metodais rezultatai

Mėginys	Metodo pavadinimas			
	<i>Delvo-X-Press</i>	<i>Delvotest-SP-NT</i> (mikrobiologinis)	<i>Penzym</i>	<i>Penzym S</i>
1–34	+	+	x	+
35–40	–	–	x	–
41–64	–	–	x	+
65	–	+	x	+
66–89	+	+	+	+
90–102	–	–	–	–
103–107	–	+	+	+
108–120	–	–	+	+
121	+	–	+	+
122	–	+	–	–

„+“ antibakterinių medžiagų rasta; „–“ antibakterinių medžiagų nerasta; „x“ tyrimai nedaryti

Pieno mėginių Nr. 66, 70 ir 75, apdorotų penicilinaze, tyrimas parodė, kad *Penzym* ir *Penzym S* metodai galėjo rodyti klaidingus „teigiamus“ rezultatus, nes po apdorojimo *Delvo-X-PRESS* ir *Delvotest-SP-NT* metodai rodė, kad antibakterinių medžiagų nerasta. Sunku paaiškinti mėginių Nr. 103, 106 ir 107 „teigiamus“ rezultatus iki ir po apdorojimo penicilinaze. Mėginių apdorojimas p-aminobenzenkarboksirūgštimi parodė, kad tai nėra sulfamidų likučiai, nes *Delvotest-SP-NT*, *Penzym* ir *Penzym S*

metodai vis tiek rodė, kad antibakterinių medžiagų rasta. *Delvotest-SP-NT* metodas yra plataus spektro, todėl jis galėjo rodyti, pavyzdžiui, tetraciklino ar eritromicino likučius, kurių negalima aptikti *Delvo-X-PRESS* metodu. Veikiausiai *Penzym* bei *Penzym S* metodai ir šiuo atveju galėjo rodyti klaidingus „teigiamus“ rezultatus.

Metodų palyginimo rezultatai apdoroti *MacNemars* metodu. Skirtumai rasti tarp visų palygintų metodų (5 lentelė).

4 lentelė. Beta laktaminį žiedą turinčių antibiotikų pieno mėginiuose, kuriuose rasta antibakterinių medžiagų, patikrinimas

Mėginio Nr.	Inhibitorių nustatymo rezultatai prieš įdedant penicilinazės				Inhibitorių nustatymo rezultatai įdėjus penicilinazės			
	<i>Delvo-X-PRESS</i>	<i>Delvotest-SP-NT</i>	<i>Penzym</i>	<i>Penzym S</i>	<i>Delvo-X-PRES</i>	<i>Delvotest-SP-NT</i>	<i>Penzym</i>	<i>Penzym S</i>
K ₁ *	–	–	–	–	–	–	–	–
K ₁ +0,008 μg/ml penicilino	+	+	+	+	–	–	–	–
108**	–	–	+	+	–	–	+	+
109	–	–	+	+	–	–	+	+
119	–	–	+	+	–	–	+	+
103	–	+	+	+	–	+	+	+
106	–	+	+	+	–	+	+	+
107	–	+	+	+	–	+	+	+
66	+	+	+	+	–	–	+	+
70	+	+	+	+	–	–	+	+
75	+	+	+	+	–	–	+	+

*regeneruotas *Merck* pienas be inhibitorių; **šio pieno mėginio ir kitų pieno mėginių numeriai atitinka jų numerius 3 lentelėje;

„–“ antibakterinių medžiagų nerasta;

„+“ antibakterinių medžiagų rasta

5 lentelė. *Delvo-X-PRESS* palyginimo su kitais metodais rezultatai, apdorojus *MacNemars* metodu

Lyginti metodai	Mėginių skaičius	Sutapusių mėginių tyrimo rezultatų skaičius (proc.) nuo bendro ištirtų mėginių skaičiaus	Skirtumas tarp metodų
<i>Delvo-X-PRESS</i> ir <i>Delvotest-SP-NT</i>	122	94,3	Rastas
<i>Delvo-X-PRESS</i> ir <i>Penzym</i>	57	68,4	Rastas
<i>Delvo-X-PRESS</i> ir <i>Penzym S</i>	122	64,8	Rastas
<i>Penzym</i> ir <i>Delvotest-SP-NT</i>	57	73,7	Rastas
<i>Penzym S</i> ir <i>Delvotest-SP-NT</i>	122	68,0	Rastas

Aptarimas ir išvados. VĮ „Pieno tyrimai“ 2005–2007 m. duomenimis (<http://www.pieno-tyrimai.lt>), vidutinis „teigiamų“ žalio pieno mėginių (kuriuose rasta inhibitorių) skaičius per metus buvo apie 0,5 proc. Mūsų tyrimai atlikti daugiausia naudojant „teigiamus“ mėginius, todėl metodų sutapimo rezultatai buvo perskaičiuoti pagal bendrą Lietuvoje ištirtų žalio pieno mėginių skaičių. Laikyta, kad 99,5 proc. „neigiamų“ mėginių (kuriuose inhibitorių nerasta) visais metodais atliktų tyrimų rezultatai sutapo. Perskaičiuoti rezultatai sutapo taip: *Delvo-X-PRESS* ir *Delvotest-SP-NT* – 99,97 proc.; *Penzym* ir *Delvotest-SP-NT* – 99,87 proc.; *Penzym S* ir *Delvotest-SP-NT* – 99,84 proc.; *Delvo-X-PRESS* ir *Penzym* – 99,84 proc.; *Delvo-X-PRESS* ir *Penzym S* – 99,82 proc. atvejų.

Norint sparčiai nustatyti penicilino grupės antibiotikus, galima toliau taikyti šalyje plačiausiai paplitusius metodus – *Delvo-X-PRESS* ir *Penzym* (ar *Penzym S*). Perskaičiavus šių metodų palyginimo rezultatus nuo bendro ištirtų žalio pieno mėginių skaičiaus, rezultatai sutapo: *Delvo-X-PRESS* ir *Penzym* – 99,84 proc.; *Delvo-X-PRESS*

ir *Penzym S* – 99,82 proc. atvejų. Lyginant su pamatiniu metodu, *Delvo-X-PRESS*, *Penzym* ir *Penzym S* rezultatai, perskaičiuoti nuo bendro Lietuvoje ištirtų mėginių skaičiaus, sutapo atitinkamai 99,97; 99,87 ir 99,84 proc. atvejų.

Norint sparčiai nustatyti antibiotikus, galima taikyti tiek *Penzym*, tiek *Penzym S* metoda, nes jų abiejų jautrumas atitinka ES reikalavimus. Tą patvirtino žalio pieno mėginių tyrimų, atliktų *Penzym* ir *Penzym S* metodais, rezultatai, sutapę 100 proc.

Delvo-X-PRESS metodas įtrauktas į *Žalio pieno pirminių kokybės rodiklių įvertinimo instrukciją*, patvirtintą Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministro.

Apibendrinę tyrimų duomenis, darome šias **išvadas**:

1. *Delvo-X-PRESS*, *Penzym*, *Penzym S* ir pamatinio metodo analogo *Delvotest-SP-NT* jautrumas keturiems beta laktaminį žiedą turintiems antibiotikams (penicilinui, ampicilinui, amoksicilinui, oksacilinui) atitinka firmų gamintojų nurodytą jautrumą.

2. Lyginant sparčiuosius metodus su mikrobiologiniu metodu *Delvotest-SP-NT* (su jautrios kultūros *Geobacillus stearothermophilus* sporomis) inhibitoriams pieno mėginiuose nustatyti, sutapo tiek ištirtų mėginių rezultatų: *Delvo-X-PRESS* ir *Delvotest-SP-NT* – 94,3 proc.; *Penzym* ir *Delvotest-SP-NT* – 73,7 proc.; *Penzym S* ir *Delvotest-SP-NT* – 68,0 proc.

3. Rezultatai, gauti *Penzym* ir *Penzym S* metodais, labai panašūs tikriausiai dėl artimų šių metodų jautrumo ribų (atitinkamai 0,004–0,006 µg/ml ir 0,002–0,004 µg/ml). 57 pieno mėginių, kurie buvo tirti abiem minėtais metodais, rezultatai sutapo 100 proc.

4. Lyginant du plačiausiai Lietuvoje taikomus sparčiuosius metodus – *Delvo-X-PRESS* ir *Penzym* bei jautresnį šio metodo variantą *Penzym S* – inhibitoriams pieno mėginiuose nustatyti, sutapo tiek ištirtų mėginių rezultatų: *Delvo-X-PRESS* ir *Penzym* – 68,4 proc.; *Delvo-X-PRESS* ir *Penzym S* – 64,8 proc.

5. Pieno mėginių, kuriuose antibakterinės medžiagos rastos tik *Penzym* ir *Penzym S* metodais, bei tokių mėginių, kuriuose antibakterinės medžiagos rastos *Delvotest-SP-NT* ir *Penzym* bei *Penzym S* metodais, patikrinimas apdorojus penicilinaze ir p-aminobenzenkarboksirūgštimi parodė, kad *Penzym* ir *Penzym S* metodais galėjo būti gauti klaidingi teigiami rezultatai (apdorotuose penicilinaze mėginiuose beta laktaminį žiedą turinčių antibiotikų likučių *Delvotest-SP-NT* metodas neberodė).

Literatūra

- Adriany A., Märklbauer, E., Zaadhof K.-J. A modified Brilliant Black-Reduction Test (BRT) with improved sensitivity for Tetracyclines and Sulfonamides. Proceedings of Symposium on Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. Kiel, Germany, 28–31 August, 1995. P. 172–176.
- Antibiotic Test Kit brochure – 4th ed. / Nov2003/1:17.
- Antibiotic tests – [žiūrėta 2008-01-04] – Internetė: <http://www.charm.com>.
- Beta Lactam Test Kit (penicillin G). SNAP. IDEXX laboratories, USA, 2001. Firmos prospektas.
- CMT – Copan Milk Test for the detection of antibiotics and sulphonamides in milk and milk products. Firmos prospektas.
- Copan Test Kits, BetaStar and Penzym Test Kits – [žiūrėta 2008-01-04] – Internetė: <http://www.chrhansen.com>.
- Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 laying down Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin // Official J. of European Community. 1990. No. L224. P. 1–8.
- Delvotest. Standard diffusion tests for the detection on antibacterial substances in milk. Firmos prospektas.
- DSM Food Specialties – Dairy. Tests – [žiūrėta 2008-01-04] – Internetė: <http://www.dsm-dairy.com>.
- Faria Reyes J. F., Allara Cagnasso M. G., Arenas de Moreno L., Marques Salas E., Reyes J. F. F., Salas E. M. Extraction and quantification of penicillin G in raw milk by high performance liquid chromatography (HPLC). Rievista Cientifica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Zulia. 2000. Vol. 10. P. 212–221.
- Gaudin V., Maris P. Development of a biosensor-based immunoassay for screening of chloramphenicol residues in milk // Food and Agricultural Immunology. 2001. Vol. 13, No. 2. P. 77–86.
- Ghidini S., Zanardi E., Varisco G., Chizzolini R. Prevalence of molecules of β -lactam antibiotics in bovine milk in Lombardia and Emilia Romagna (Italy). Ann. Fac. Medic.Vet. di Parma. 2002. Vol. XXII. P. 245–252.
- Guidelines for Establishing the Suitability of Food Microbiology Methods. Ed. By C. L. Baylis, K. Jewell, C. A. Oscroft and F. L. Brookes. Guideline No. 29. 2001.
- Keizer G. D., Blankwater Y. J., Kerkhof J. H. P. M., van Paridon P. A. Delvo-X-Press: detection of β -lactam residues in 7 minutes. Proc. of Symposium on Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. Kiel, Germany, 1995. P. 244–246.
- Le Breton M.-H., Savoy-Per M.-C., Diserens J.-M. Validation and comparison of the Copan milk test and Delvotest SP-NT for the detection of antimicrobials in milk. 2000. Analytica Chimica Acta. Vol. 586. No. 1–2. P. 280–283.
- Mitchell M., Bodkin B., Martin J. Detection of beta-lactam antibiotics in bulk tank milk. Journal of Food Protection. 1995. Vol. 58, No. 5. P. 577–588.
- Penzym. General information. Enzymatic assay of β -lactam antibiotics in milk. Firmos prospektas. UCB-Bioproducts, Belgija.
- Petrovič J. M., Katič V. R., Bugarski D. D. Comparative examination of the analysis of β -lactam antibiotic residues in milk by enzyme, receptor enzyme, and inhibition procedures. Food Analytical Methods. 2008. Vol. 1, No. 2. P. 119–125.
- Rapid Test for Antibiotic residues in milk. TwinsensorBT – [žiūrėta 2008-01-04] – Internetė: <http://www.twinsensor.com/bt.php>.
- Scannella D., Neaves P., Keedy K., Bell C. An evaluation of the Delvo X-Press β L test for detecting β -lactams in ex-farm raw milks. International Dairy Journal. 1997. Vol. 7, No. 1. P. 93–96.
- Statistika. Inhibitorinės medžiagos – [žiūrėta 2008-01-04] – Internetė: <http://www.pieno-tyrimai.lt/>.

22. Žvirdauskienė R., Šalomskienė J., Urbšienė L. Inhibitorių grupių nustatymas žaliame karvių piene mikrobiologiniais metodais. *Maisto chemija ir technologija: KTU MI mokslo darbai*. 2004. T. 38, Nr. 2. P. 55–61.

Gauta 2008 06 26

Priimta publikuoti 2009 03 07