

INHIBIČNÍ LÁTKY V MLÉCE



Září 2020

**Ing. Alena Honzlová
Státní veterinární ústav Jihlava**

INHIBIČNÍ LÁTKY (IL)



skupina látek s bakteriocidními a bakteriostatickými účinky

HLAVNÍ ZDROJE IL

- **léčiva – antibiotika, chemoterapeutika, ostatní léčiva**
- **chemické látky (kontaminanty) – pesticidy, PCB, mykotoxiny**
- **dezinfekční látky (kvarterní amonné báze)**
- **přírodní inhibitory – lysozym, laktoferin, imunoglobuliny (termolabilní látky – deaktivace zahřátím)**

PŘÍTOMNOST RIL ZPŮSOBUJE:



ZDRAVOTNÍ RIZIKA



- **zejména příjem malých opakovaných dávek léčiv**
- **modifikace přirozené střevní mikroflóry**
- **alergické reakce**
- **rezistence**
- **imunosupresivní účinky (snížení obranyschopnosti organismu)**

PŘÍTOMNOST RIL ZPŮSOBUJE:



TECHNOLOGICKÉ PROBLÉMY

- **při výrobě zakysaných mléčných výrobků, tvarohu a sýrů**
- **zpracování odpadů v bioplynových stanicích**

DOPAD NA ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ

- **kontaminace zemědělské půdy, přenos do rostlin**
- **ovlivnění mikroflóry v ekosystému (přenos rezistence ze saprofytické mikroflóry na patogeny)**



NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 470/2009 ze dne 6. května 2009, kterým se stanoví postupy Společenství pro stanovení limitů reziduí farmakologicky účinných látek v potravinách živočišného původu

V zájmu zajištění bezpečnosti potravin stanoví toto nařízení pravidla a postupy s cílem stanovit:

- maximální koncentraci reziduí farmakologicky účinné látky, jež může být povolena v potravinách živočišného původu (**MRL**)
- vědecké hodnocení rizika zvažuje metabolismus a vylučování farmakologicky účinných látek u příslušných druhů zvířat a druh reziduí a jejich množství, jaké může člověk v průběhu života přijmout bez jakéhokoli citelného zdravotního rizika



NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 37/2010

ze dne 22. prosince 2009

o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu

Příloha:

Povolené látky – abecední seznam s maximálními limity reziduí podle druhů zvířat a tkání a produktů zvířat; definice reziduí

Zakázané látky - podražec a přípravky z něj, kolchicin, chloramfenikol, chlorpromazin, dapson, dimetridazol, metronidazol, nitrofurany včetně furazolidonu, ronidazol

LEGISLATIVA



Farmakologicky účinná(-ě) látka(-y)	Indikátorové reziduum	Druh zvířat	MRL	Cílové tkáně	Další ustanovení (podle čl. 14 odst. 7 nařízení (ES) č. 470/2009)	Zařazení podle léčebného účelu
benzylparaben	NETÝKÁ SE TÉTO POLOŽKY.	všechny druhy zvířat určené k produkci potravin	Není nutné stanovit MRL.	NETÝKÁ SE TÉTO POLOŽKY.	ŽÁDNÁ	ŽÁDNÉ
chlortetracyklin	suma původ- ního léčiva a jeho 4- epimeru	všechny druhy zvířat určené k produkci potravin	100 µg/kg 300 µg/kg 600 µg/kg 100 µg/kg 200 µg/kg	svalovina játra ledviny mléko vejce	U ryb se MRL pro svalovinu vztahuje na „svalovinu a kůži v přirozeném poměru“. MRL pro játra a ledviny se nevztahují na ryby.	antiinfektiva/ antibiotika
					pro tuk vztahuje na „kůži a tuk v přiro- zeném poměru“. Nepoužívat u zvířat, jejichž vejce jsou určena k lidské spotřebě.	

ÚČEL:

- **Zajistit zdravotní nezávadnost potravin (surovin živočišného původu)**
- **Zajistit kvalitní surovinu (mléko, maso) pro další technologické zpracování – výroba zakysaných mléčných výrobků, sýrů, tepelně neopracované zrající masné výrobky**





Využívá se vícestupňová diagnostika

1. Plošné screeningové vyšetření

- zachytit co nejširší spektrum antibiotik na hladině MRL
- jednoduché, časově nenáročné
- vytřídit podezřelé vzorky (vyloučit ze zpracování)
- **širokospektrální rychlotesty, selektivní rychlotesty, mikrobiologické plotnové metody**

2. Cílené vyšetření

- stanovení konkrétní látky použité při léčbě
- **ELISA metody, RIA metody**



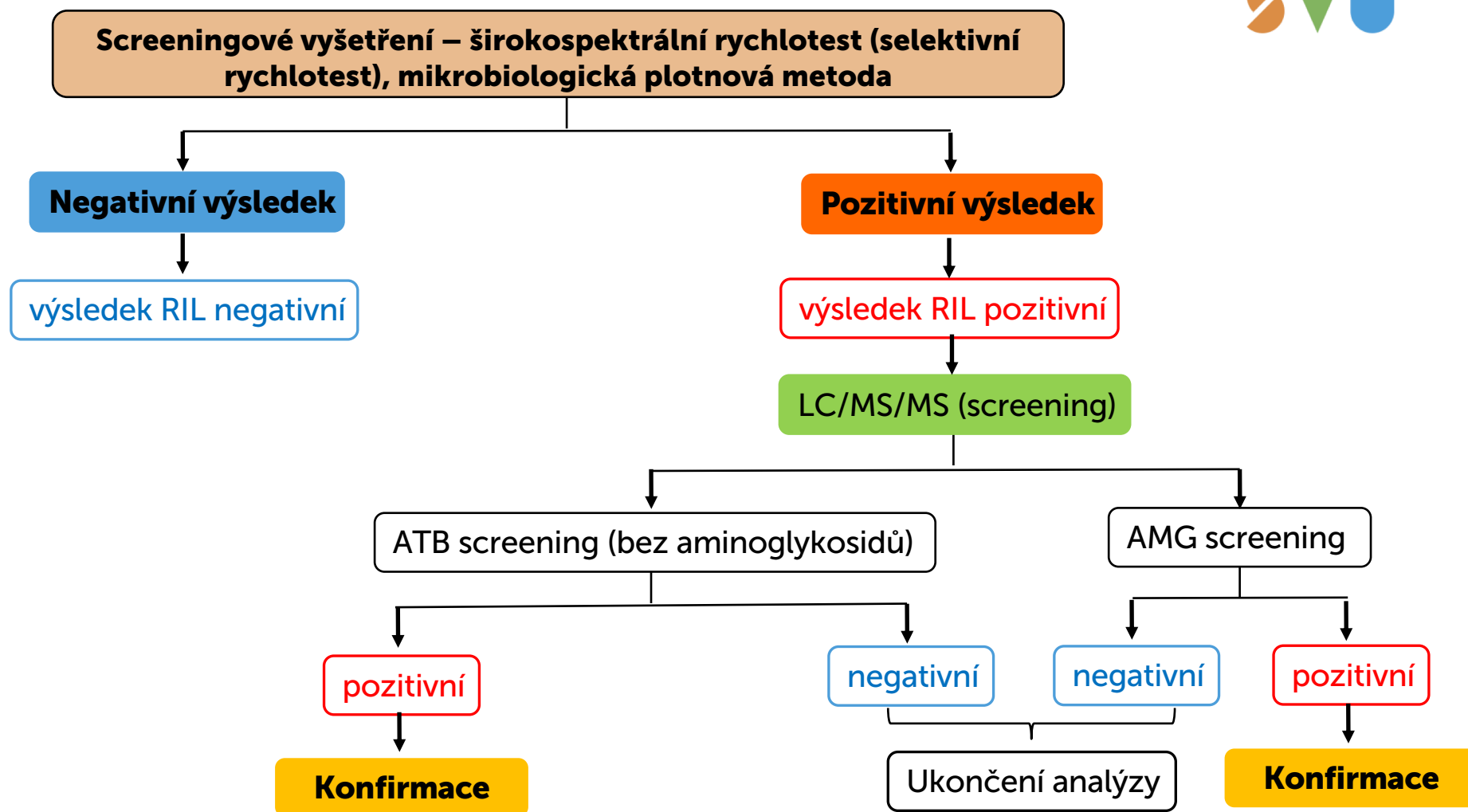
Využívá se vícestupňová diagnostika

3. Identifikace inhibiční látky

- určení konkrétního léčiva (metabolitu)
- **multireziduální screeningová metoda kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií LC-MS/MS**

4. Konfirmace inhibiční látky

- stanovení koncentrace identifikovaného léčiva
- vyhodnocení koncentrace a identity látky dle platné legislativy
- **konfirmační metoda kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií LC-MS/MS**



ŠIROKOSPEKTRÁLNÍ RYCHLOTESTY



- zachytit co nejširší spektrum antibiotik na hladině MRL
- doba provedení 2 – 4 hodiny
- inkubace při 64 – 65 °C

DELVOTESTY
ECLIPSE TESTY
CHARM BLUE YELLOW II TEST
BR TESTY
COPAN TEST KIT



agarová difuze spojená se změnou barvy indikátoru v důsledku změny pH půdy způsobené růstem testačního kmene (*Geob. stearothermophilus* v.c. C 953)

vizuální posouzení barevné změny

SELEKTIVNÍ RYCHLOTESTY



- testy umožňující detekci pouze **jedné skupiny** veterinárních léčiv (TC, β - laktamy + cefal., SU, QUINOL.), nebo detekci **konkrétního léčiva** (TYL, NEO, STM, GENT, ENROFLOX., CHLORAMF.)
- testy umožňující detekovat **dvě skupiny** léčiv současně (TC+ β - laktamová ATB spolu s cefalosporiny)
- testy umožňující detekovat **tři skupiny** léčiv současně (β - laktamová ATB spolu s cefal. + SU + TC), (NEO + STM + GENT)
- testy umožňující detekovat **čtyři skupiny** léčiv současně (NEO + STM + GENT + KAN), (STM + β - laktamová ATB spolu s cefal. + TC + CHLORAMF.)

SELEKTIVNÍ RYCHLOTESTY



- Doba provedení – řádově minuty
- Inkubace při 40 – 56°C, některé při pokojové teplotě

DELVO-X-PRESS TEST
SNAP TESTY
ROSA MRL TESTY
BETA-STAR TEST
PENZYME TEST
TWINSENSOR
TESTY FY RING BIOSCIENCE



rychlý receptorový test

SELEKTIVNÍ RYCHLOTESTY



Vyhodnocení testu

vizuální posouzení barevné změny

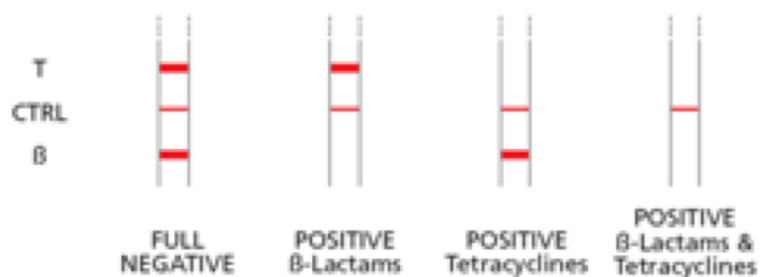
nebo

odečítání pomocí čtecího zařízení

Results

Visual interpretation of the result by comparing the intensity of the "TEST" lines with the one of the "CTRL" line.

T: Tetracyclines - B: β -Lactams



VÝSLEDEK SCREENINGOVÉHO TESTU



kvalitativní stanovení inhibiční látky – pozitivní x negativní

- na hladině citlivosti použitého testu
- citlivost testů je udávána výrobcem, většina testů má vyšší citlivost, než jsou MRL

vizuální posouzení barevné změny



pozitivní nebo negativní výsledek

posouzení barevné změny pomocí čtecího zařízení



**pozitivní výsledek nad koncentrací citlivosti
negativní výsledek pod koncentrací citlivosti**

SELEKTIVNÍ RYCHLOTESTY – CITLIVOSTI v µg/kg



BETA-LAKTÁMOVÁ ATB

léčivo	SNAP Beta-Lactam ST Plus	ROSA MRL Test	TwinSensor	Ring Bioscience test	MRL
Penicilin G	2	2 - 3	2 - 3	2 - 4	4
Ampicilin	4	3 - 4	3 - 4	3 - 4	4
Amoxicilin	2	3 - 4	3 - 4	3 - 4	4
Cloxacilin	3	25 - 35	6 - 8	6 - 8	30
Cefapirin	25	6 - 10	6 - 8	50 - 60	60
Cefquinom	12	15 - 20	20 - 30	15 - 20	20
Ceftiofur*	9 (30)	10 - 20	10 - 15	90 - 100	100
Cefoperazon	20	5 - 9	3 - 4	40 - 50	50
Cefalonium	18	3 - 5	3 - 5	18 - 20	20
Cefacetril	90	8 - 18	30 - 40	100	125

* Markerové reziduum - desfuoylceftiofur

SELEKTIVNÍ RYCHLOTESTY



VÝHODY

- velmi rychlé provedení testu
- snadné provedení testu
- cena testu
- minimální přístrojové vybavení



NEVÝHODY

- vysoká citlivost testů vůči některým antibiotikům
- sumární efekt (přítomnost více ATB)
- chybí informace o druhu ATB



MIKROBIOLOGICKÉ PLOTNOVÉ METODY



- 4 – plotnová metoda

Bacillus subtilis BGA, pH 6,0 (tetracykliny)

Bacillus subtilis BGA, pH 8,0 (aminoglykosidy)

Kocuria rhizophila, pH 8,0 (makrolidy, β -laktámy)

Bacillus subtilis BGA + TMP, pH 7,2 (sulfonamidy, tetracykliny)

- plotna s *Geobacillus stearothermophilus* v.c. C953, pH 8,0 (β -laktámy, aminoglykosidy)

- plotna s *Escherichia coli*, pH 8,0 (chinolony)

- agarová difuze na plotnách

vizuální posouzení testačního kmene a odečítání inhibičních zón

- složitější příprava ploten, provedení testu je jednoduché, dlouhá inkubace (18 – 24 hodin)

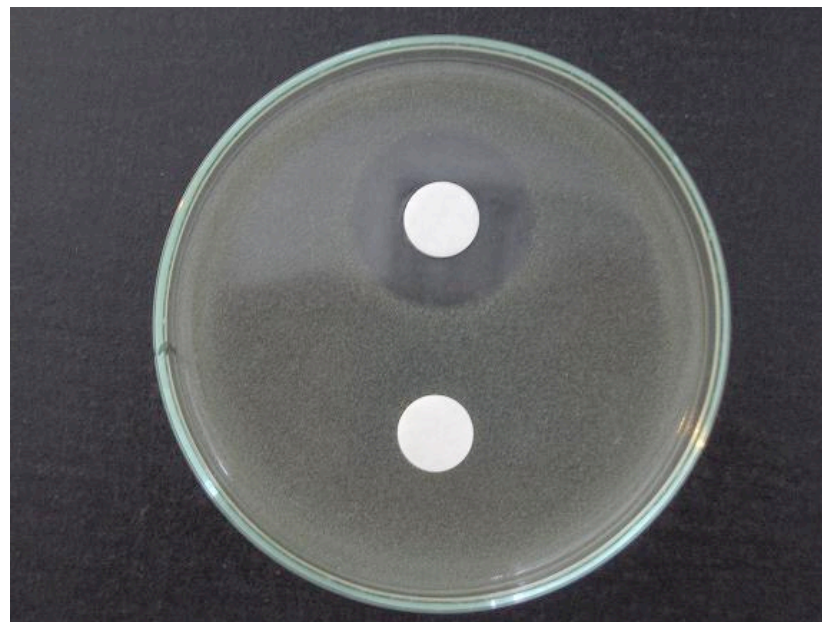
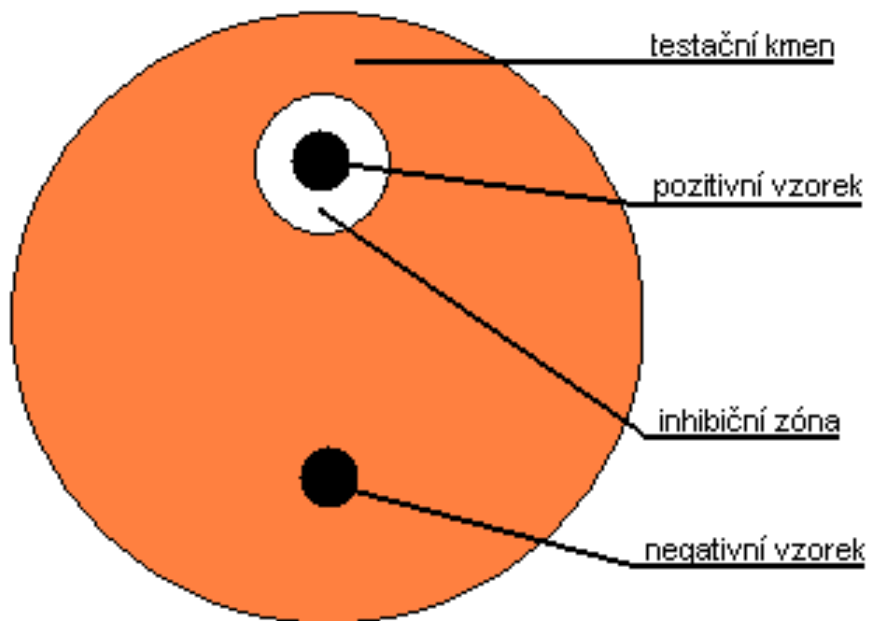
- plotnové metody umožňují:

- **skupinovou identifikaci IL**

- podle velikosti inhibiční zóny - **odhad přibližné koncentrace IL**



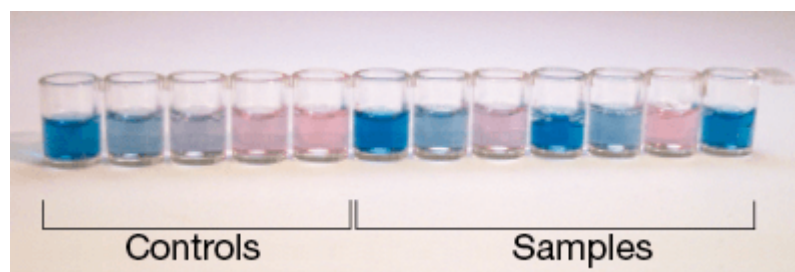
Plotna se vzorky mléka



ELISA METODY



- rychlá
- specifická pro jednotlivé látky nebo skupiny
- vyžaduje přístrojové vybavení
- vyžaduje kvalifikovaný personál
- nevhodná pro zpracování jednotlivých vzorků
- pouze pro vybrané matrice
- semikvantitativní výsledek

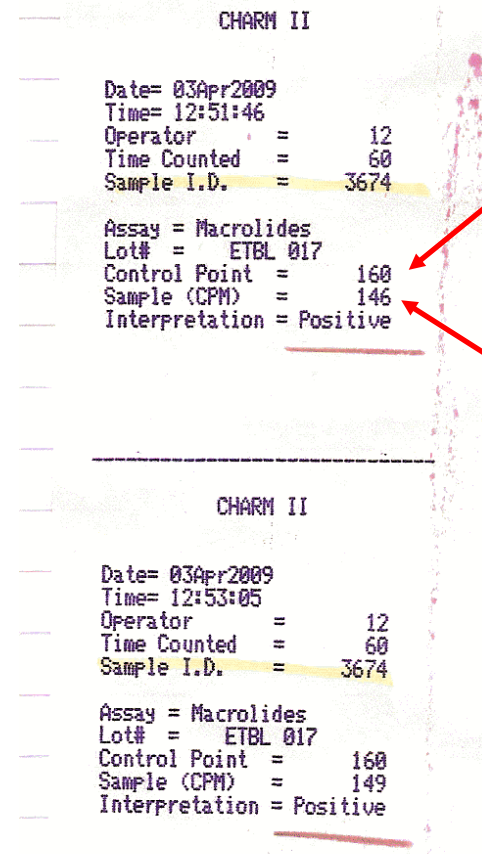


RIA METODY



CHARM II

- princip RIA metody, využívá se efektu vazby detekované látky a látky značené ^{14}C nebo ^3H na vazebný receptor nebo specifickou protilátku, měří se množství navázané značené látky v jednotkách CPM (count per minute)
- CPM vzorku se porovná s CPM kontrolního bodu pro jednotlivé inhibiční látky, kontrolní bod je nastaven na hladinu MLR (maximální limit reziduí)
- metoda umožňuje – **semikvantitativní stanovení IL**



Kontrolní bod

CPM vzorku

CPM vzorku < kontrolní bod



pozitivní vzorek nad MRL

NOVÉ METODY - BEADYPLEX



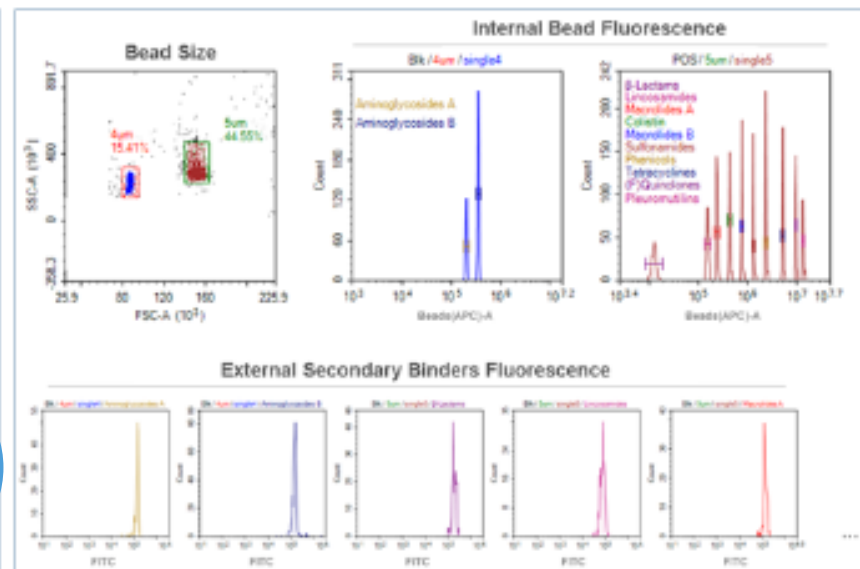
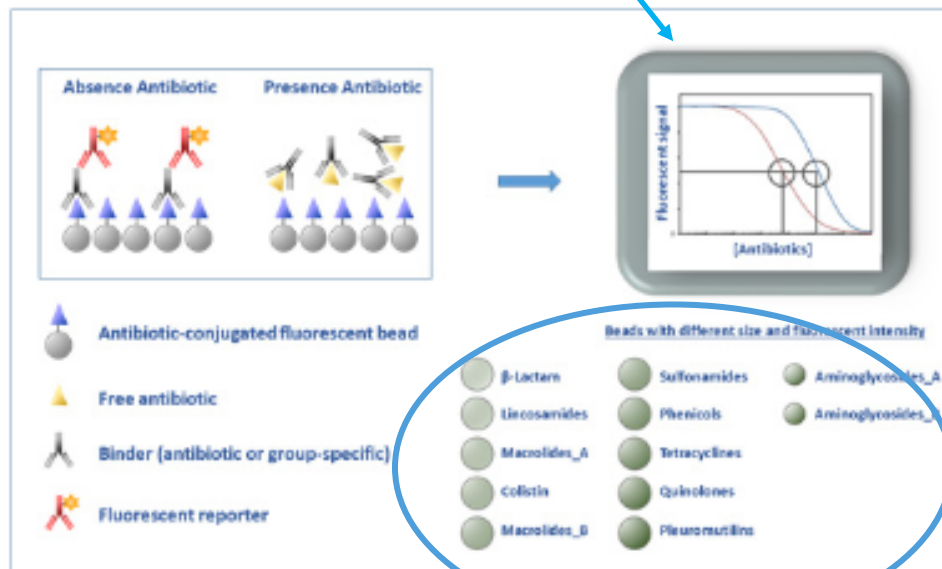
- kompetitivní imunoanalýza s průtokovou cytometrií jako koncovkou
- screeningová analýza 74 antibiotik z 10 různých skupin
- rychlá
- nevhodná pro jednotlivé vzorky



BEADYPLEX – FLUORESCENČNÍ PRŮTOKOVÁ IMUNOANALÝZA



čím ↑ koncentrace ATB ve vzorku, tím ↓ odezva



12 partikulí => detekce 10 skupin antibiotik

BEADYPLEX - VÝSLEDKY



Negativní kontrola

Sample Name:	A1:beef uni neg
Sample Type:	Blank
Assay Beads	Results
Tetracyclines	VALID
β-Lactams	VALID
Sulfonamides	VALID
(F)Quinolones	VALID
Aminoglycosides A	VALID
Aminoglycosides B	VALID
Colistin	VALID
Macrolides A	VALID
Macrolides B	VALID
Lincosamides	VALID
Pleuromutilins	VALID
Phenicol	VALID

Pozitivní kontrola

Sample Name:	B1:beef uni pos	
Sample Type:	Positive Control	
Assay Beads	Normalized Signal	Results
Tetracyclines	12	VALID
β-Lactams	24	VALID
Sulfonamides	17	VALID
(F)Quinolones	8	VALID
Aminoglycosides A	14	VALID
Aminoglycosides B	43	VALID
Colistin	30	VALID
Macrolides A	10	VALID
Macrolides B	8	VALID
Lincosamides	6	VALID
Pleuromutilins	19	VALID
Phenicol	59	VALID

Vzorek – mléko

Sample Name:	B9:995	
Sample Type:	Unknown	
Assay Beads	Normalized Signal	Results
Tetracyclines	11	POS
β-Lactams	91	NEG
Sulfonamides	127	NEG
(F)Quinolones	103	NEG
Aminoglycosides A	109	NEG
Aminoglycosides B	82	NEG
Colistin	97	NEG
Macrolides A	100	NEG
Macrolides B	106	NEG
Lincosamides	91	NEG
Pleuromutilins	54	NEG
Phenicol	91	NEG

Aminoglycosides A: Streptomycin and Dihydrostreptomycin. Aminoglycosides B: Gentamicin, Neomycin, Kanamycin A, Paromomycin, Apramycin, Tobramycin.

Macrolides A: Tilmicosin, Tylosin A, Tylvalosin and Tildipirosin. Macrolides B: Tylosin A and Spiramycin.

IDENTIFIKACE II



Screeningová LC-MS/MS metoda (82 analytů)

β -laktamová ATP

penicilin V, benzylpenicilin,
amoxicilin, ampicilin,
oxacilin, cloxacilin

cefalosporiny

cefquinom, cefalonium,
cefazolin, cefoperazon,
cefalexin,

tetracykliny

chlortetracyklin, 4-epi
chlortetracyklin,
doxycyklin,
tetracyklin, 4-epi
tetracyklin,

sulfonamidy

sulfachlorpyridazin,
sulfamethoxazol, sulfadiazin,
sulfathiazol, sulfamerazin,
sulfadimethoxin, sulfadiazin,
sulfadimidin, sulfamethoxazol,
sulfadoxin, sulfanilamid,
sulfaguanidin, sulfamonomethoxin

makrolidy

tylosin, tilizacin,
spiramycin

chinolony

floxacin, enrofloxacin,
difloxacin, difloxacin,
marbofloxacin,
flumequin,
oxolinová, kyselina

aminoglykosidy

dihydrostreptomycin,
streptomycin, neomycin,
spectinomycin,
apramycin

pleuromutiliny

valerianol, valerianol

amfenikoly

florfenikol, florfenikolamin

lincosamidy

clindamycin, lincosamin

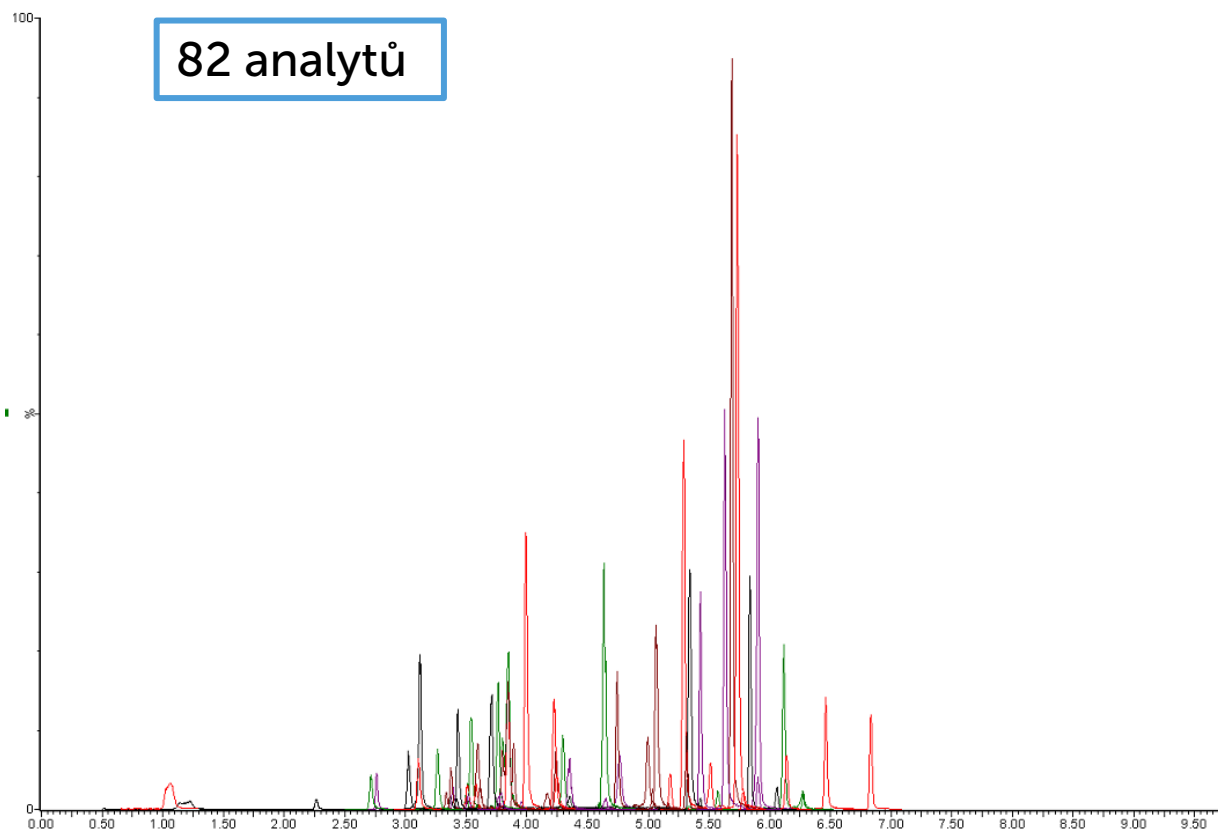
ostatní

novobiocin, rifaximin

IDENTIFIKACE IL – LC-MS/MS metoda



82 analytů



Průkaz analytu na hladině 3, resp. 10 $\mu\text{g/kg}$

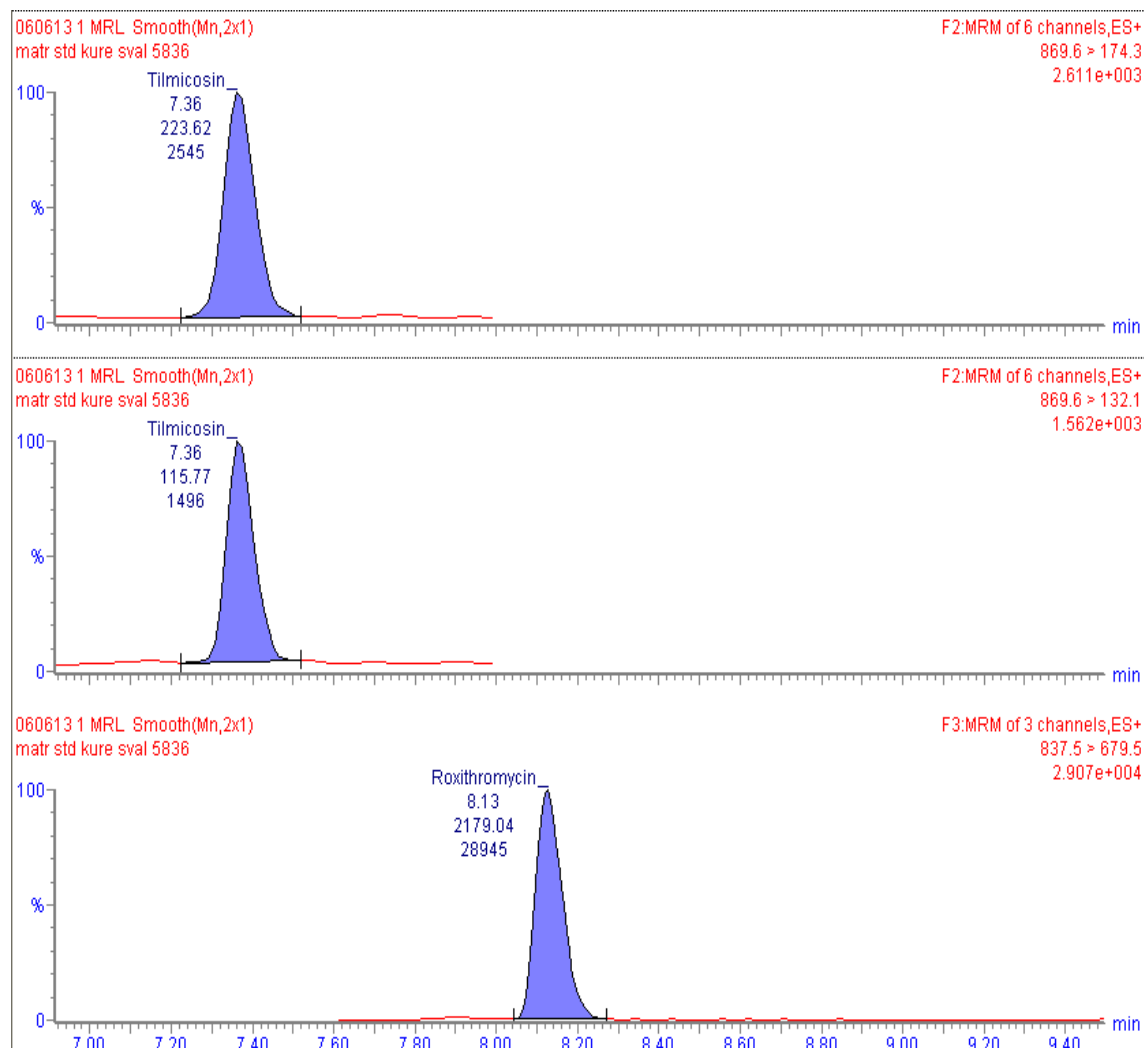


KONFIRMAČNÍ ANALÝZA - MAKROLIDY



- Josamycin
- Tylosin
- Tilmicosin
- Erytromycin
- Tulathromycin
- Spiramycin

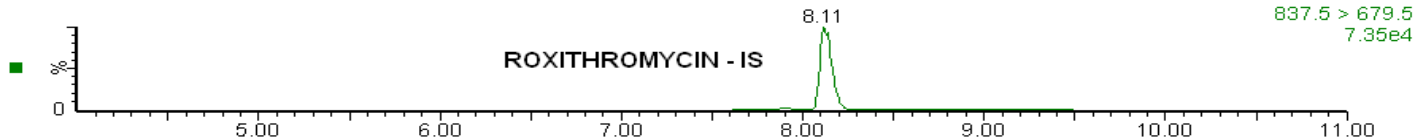
vnitřní standard:
roxithromycin



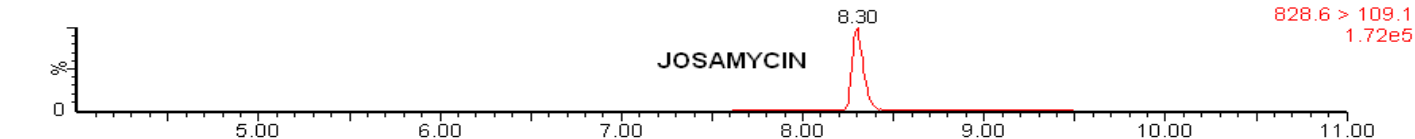
KONFIRMAČNÍ ANALÝZA - MAKROLIDY



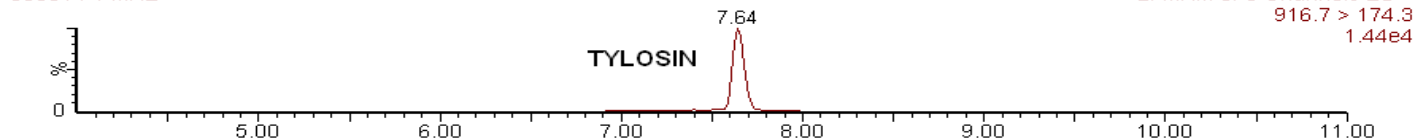
060614 1 MRL



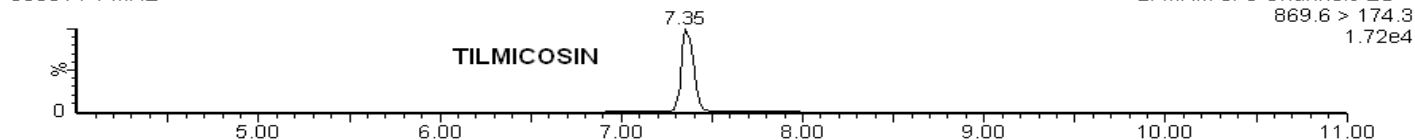
060614 1 MRL



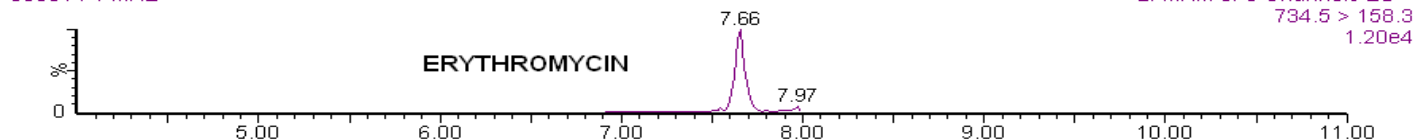
060614 1 MRL



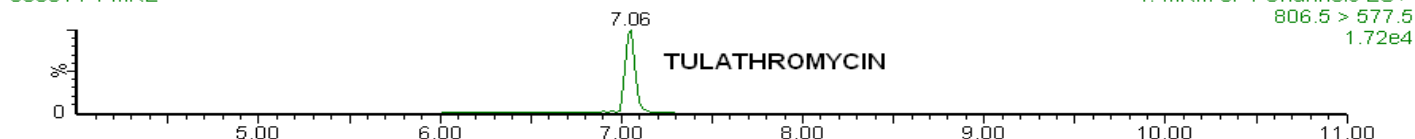
060614 1 MRL



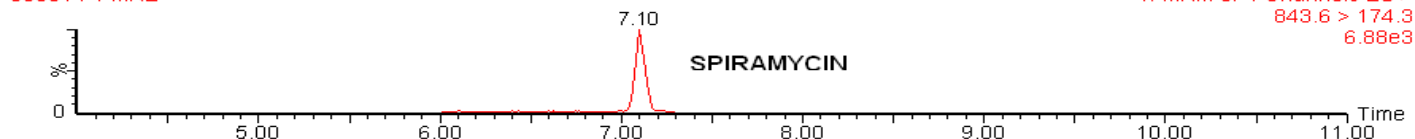
060614 1 MRL



060614 1 MRL



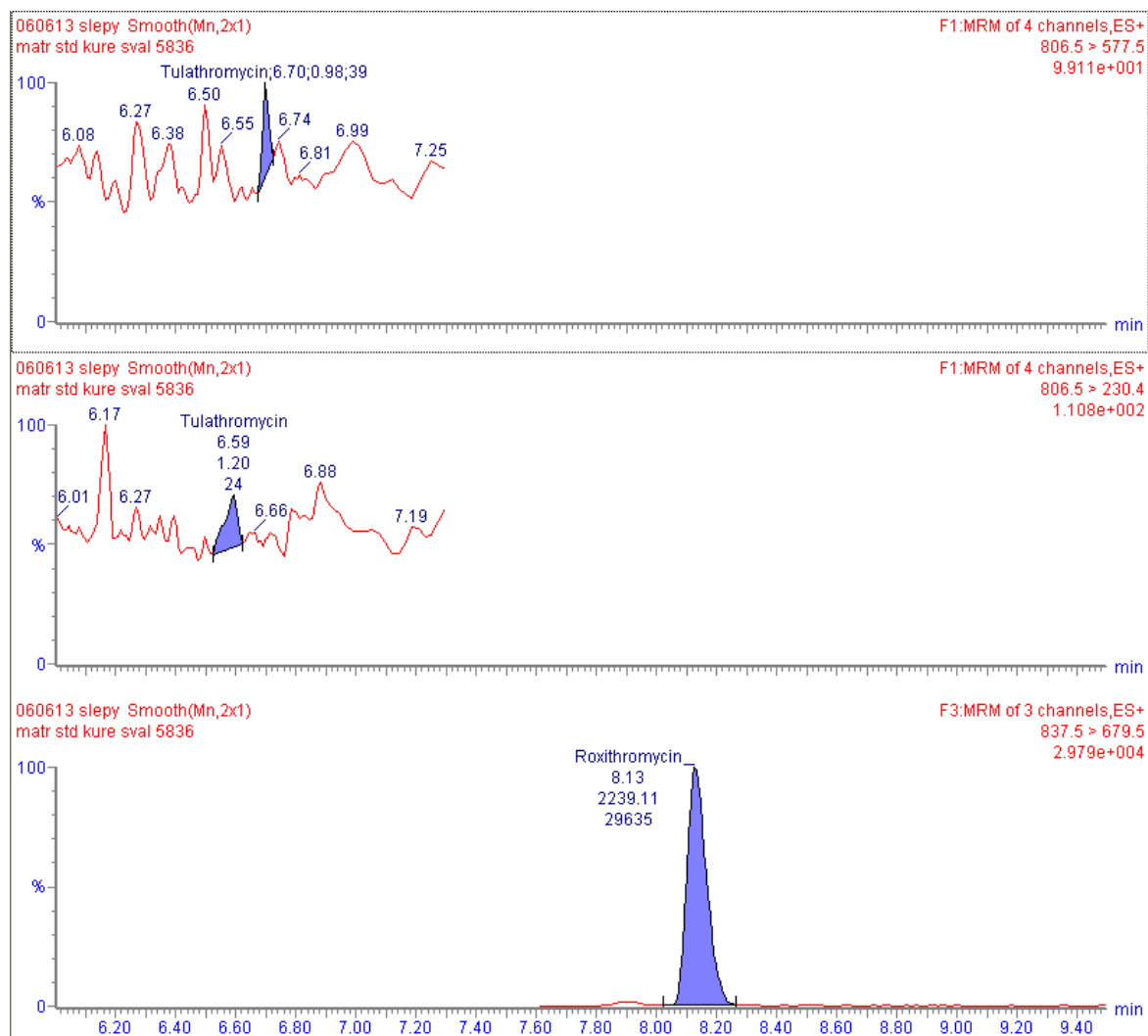
060614 1 MRL



KONFIRMAČNÍ ANALÝZA - TULATHROMYCIN



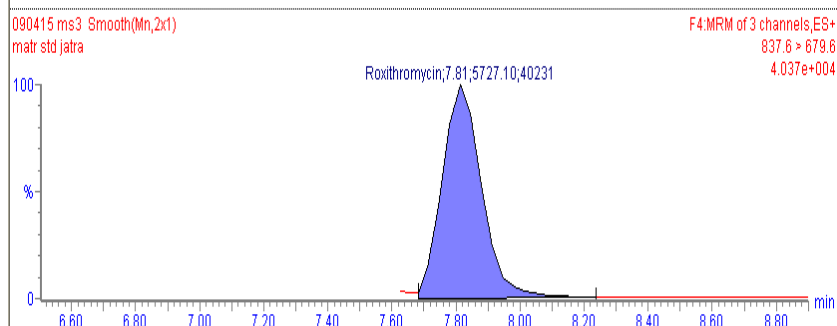
Slepý vzorek



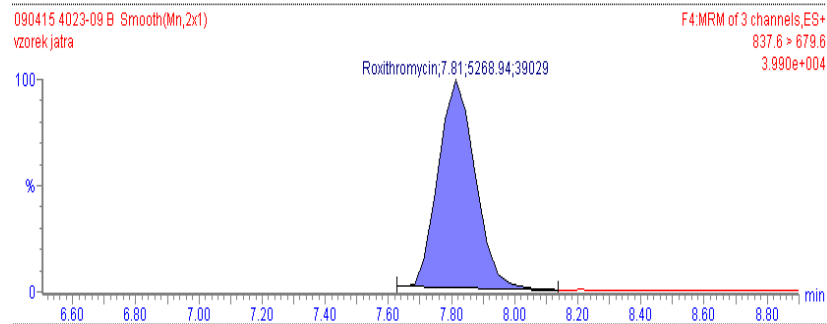
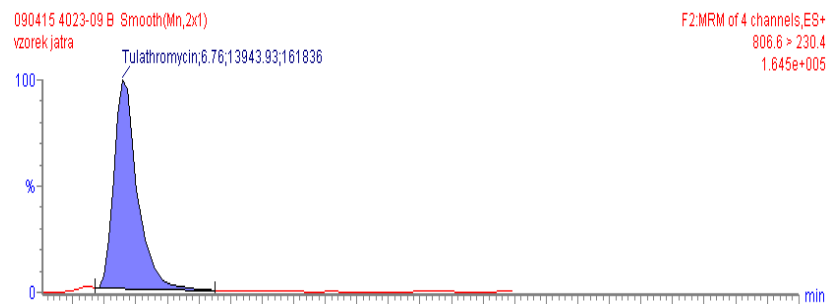
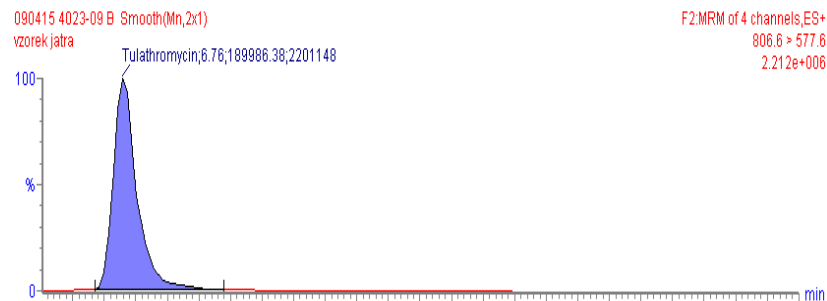
KONFIRMAČNÍ ANALÝZA - TULATHROMYCIN



matricový standard



vzorek jater



ZAJIŠTĚNÍ KVALITY VÝSLEDKŮ



- **vnitrolaboratorní kontroly – pozitivní x negativní kontrola**
- **analýza blankových vzorků**
- **analýza referenčních materiálů, vzorků s přidavkem**
- **účast v mezilaboratorních testech**

Scheme: Dairy Chemistry (QDCS)

Round: 270

57A - Milk (Freeze-dried)

Analyte	Test	Analyst	Method	Result	Assigned Value	No of results	Satisfactory %
Antibiotics	Result	Lab Result	Eclipse 50	Negative/Pass	Negative/Pass	28	96.4

57B - Milk (Freeze-dried)

Analyte	Test	Analyst	Method	Result	Assigned Value	No of results	Satisfactory %
Antibiotics	Result	Lab Result	Eclipse 50	Positive/Fail	Positive/Fail	28	96.4

57C - Milk (Freeze-dried)

Analyte	Test	Analyst	Method	Result	Assigned Value	No of results	Satisfactory %
Antibiotics	Result	Lab Result	Eclipse 50	Positive/Fail	Positive/Fail	28	82.1

Tabulka 5: Závěrečné hodnocení laboratoří – základní stanovení RIL

Číslo laboratoře	Číslo vzorku	Výsledek laboratoře	Hodnocení
20171	1	pozitivní	vyhověl
	2	pozitivní	vyhověl
	3	negativní	vyhověl
20172	1	pozitivní	vyhověl
	2	pozitivní	vyhověl

- NRL SVI
- 3 vzorky

Tabulka 6: Závěrečné hodnocení laboratoří – skupinová specifikace RIL

Číslo laboratoře	Specifikace RIL	Hodnocení
Vzorek 1/2018		
20171	β -laktamy	vyhověl
20172	β -laktamy	vyhověl
20174	β -laktamy	vyhověl
20177	β -laktamy	vyhověl
Vzorek 2/2018		
20174	sulfonamidy	vyhověl
20177	sulfonamidy	vyhověl

20179	2	negativní	nevyhověl
	3	negativní	vyhověl

Děkuji za pozornost



Státní veterinární ústav Jihlava
State Veterinary Institute Jihlava

Rantířovská 93/20 | 586 05 Jihlava | ČR
T: 567 143 111 | E: info@svujihlava.cz | www.svujihlava.cz