

HANNA RÓŻAŃSKA
Puławy

artykuł przeglądowy

Fałszywie dodatnie lub ujemne wyniki w wykrywaniu pozostałości antybiotyków

Pozostałości antybiotyków, które z różnych przyczyn mogą znaleźć się w żywności zwierzęcego pochodzenia (2, 3, 9, 15, 16, 18, 19) nie są, jak wynika z licznych doniesień, obojętne dla jej jakości zdrowotnej. Zanieczyszczone tymi substancjami tkanki zwierzęce, mleko czy jaja nie nadają się do konsumpcji. Brak również praktycznych możliwości uzdatnienia tych surowców. Z tego względu wykrywanie pozostałości antybiotyków ma duże znaczenie w diagnostyce laboratoryjnej, zarówno w ramach rutynowego nadzoru sanitarno-weterynaryjnego, jak i w badaniach monitorowych. Ze względu na stosunkowo niski koszt, łatwość wykonania i na ogół wystarczającą czułość, podstawowe znaczenie mają w tym zakresie metody mikrobiologiczne, zwłaszcza w badaniach skryningowych.

Wspólną cechą metod mikrobiologicznych jest wykorzystanie zjawiska hamowania wzrostu wybranych drobnoustrojów (tzw. szczepów testowych) rosnących na podłożach stałych lub płynnych, przez substancje przeciwbakteryjne, w tym antybiotyki zawarte w badanym materiale. Stosowanie metod mikrobiologicznych musi jednak uwzględniać szereg warunków, które z jednej strony mogą decydować o czułości metody, a z drugiej powodować wystąpienie fałszywie dodatnich lub fałszywie ujemnych wyników analiz. Przyczyny tych zjawisk można uszeregować w kilku grupach:

- rodzaj i właściwości badanego materiału;
- dobór drobnoustroju testowego i wielkości *inoculum*;
- skład i odczyn pH podłoża;
- rodzaj i pH rozcieńczalnika (o ile stosuje się ekstrakcję) oraz współczynnik rozcieńczenia;
- warunki i czas inkubacji.

Rodzaj badanego materiału i jego właściwości mają istotne znaczenie. Spośród tkanek zwierzęcych materiałem do badań są zwykle nerki (6, 10, 19, 22), rzadziej wątroba. Ma to swoje uzasadnienie w metabolizmie większości antybiotyków, które w dużej części wydalane są w formie niezmienionej z moczem. Mechanizm wchłaniania zwrotnego w nerkach jest przyczyną dużej kumulacji tych związków, które osiągają w nerkach stężenia wyższe niż w innych narządach i tkankach. W przypadku drobiu, u którego pozyskanie nerek jest technicznie trudne, optymalnym materiałem do tego rodzaju badań jest wątroba (20).

Przy badaniu nerek, zwłaszcza świń i koni, należy się jednak liczyć z wystąpieniem wyników fałszywie dodatnich, których przyczyną może być przede wszystkim lizozym (5, 6, 8, 10, 11, 19, 20, 21, 22). Zjawisko to jest powszechne szczególnie wówczas, kiedy badane są nerki mrożone. Zamrażanie, a następnie rozmrażanie tkanki powoduje destrukcję komórek, a w rezultacie uwolnienie lizozymu, manifestujące się powstawaniem stref hamowania wzrostu szczepu testowego na podłożu agarowym, niekiedy o dość dużej średnicy. Strefy te są z reguły mniej wyraziste niż w przypadku obecności antybiotyków, ale mogą decydować o interpretacji wyników. Z własnych doświadczeń (dane nie opublikowane) związanych m.in. z wykonywaniem badań monitorowych przy użyciu testu krążkowego z *Bacillus subtilis* wynika, że ok. 70% nerek świń, które otrzymano w stanie zamrożenia dawało strefy hamowania wzrostu wielkości do 17 mm. Dla stwierdzenia, iż są to wyniki fałszywie dodatnie wykonano doświadczenie polegające na tym, że badano najpierw nerki świeże, a następnie te same po zamrożeniu. Ogółem na 121 badanych nerek w przypadku 85 (70%) po uprzednim zamrożeniu otrzymano strefy hamowania wzrostu, podczas gdy nie notowano wyników dodatnich przy badaniu nerek świeżych. Dodatkowo dla potwierdzenia otrzymanych rezultatów te same zamrożone nerki poddawano gotowaniu przez 10 minut, po czym badano powtórnie tą samą metodą, nie uzyskując wyników dodatnich. Również z dostępnych publikacji wynika, że w przypadkach wątpliwych można zastosować ogrzewanie badanego materiału przez kilka minut w temperaturze powyżej 70°C. Wystarcza to do unieczynnienia lizozymu, natomiast nie zmienia aktywności ewentualnie obecnych antybiotyków (11, 14, 21, 23). Niektórzy autorzy proponują zastosowanie filtrów membranowych uniemożliwiających dyfuzję lizozymu z badanego materiału (10, 23).

Z podobnymi problemami można się zetknąć przy badaniu jaj, gdzie zwłaszcza białko cechuje się bardzo silnymi właściwościami bakteriostatycznymi (2, 3, 11, 21), co praktycznie uniemożliwia stosowanie metod mikrobiologicznych bez uprzedniej obróbki termicznej jaj lub odpowiednio dobranej ekstrakcji. Lepsze wyniki daje badanie samego żółtka, w którym zresztą poziom pozostałości antybiotyków lub in-

nych leków przeciwbakteryjnych jest wyższy. Naturalnymi właściwościami hamowania wzrostu drobnoustrojów cechuje się także miód pszczeli (17).

W przypadku mleka surowego, przy stosowaniu metod mikrobiologicznych zawartych w obowiązującej aktualnie Polskiej Normie: PN-91/A-86033 Mleko. Wykrywanie antybiotyków i innych substancji hamujących, należy się liczyć z możliwością wystąpienia wyników fałszywie dodatnich wtedy, kiedy bada się mleko od pojedynczych krów. Może ono zawierać podwyższony poziom naturalnych inhibitorów, jak m.in. laktoferyny i laktoperoksydazy, a także komórek fagocytarnych i komórek somatycznych (12, 15). Stąd też wskazane jest badanie mleka zbiorczego od dostawcy. W przypadkach koniecznych mleko można badać po uprzednim podgrzaniu, które podobnie jak w przypadku nerek eliminuje aktywność naturalnych inhibitorów.

W każdym przypadku stosowania metod mikrobiologicznych należy wziąć pod uwagę, że duże zanieczyszczenie bakteryjne badanego materiału uniemożliwia wykonanie badania (20, 23). Ewentualne strefy hamowania nie będą widoczne, a przy metodach uwzględniających zmiany barwy podłoża wskutek zakwaszenia spowodowanego wzrostem szczepu testowego w czasie inkubacji (np. metody mikrobiologiczne w wym. PN dla mleka) zjawisko to wystąpi wskutek namnażania się innych drobnoustrojów, mimo ewentualnej obecności substancji przeciwbakteryjnych. Taki sam efekt powstaje przy badaniu mleka nadkwaszonego, stąd konieczność uprzedniego sprawdzenia jego kwasowości.

Druża grupa przyczyn błędnych wyników oznaczeń w metodach mikrobiologicznych wynika z nieprawidłowego doboru drobnoustroju testowego i niewłaściwej jego ilości w pożywce. Spośród metod mikrobiologicznych najszerze zastosowanie mają tzw. testy jakościowe, w których stosuje się jeden szczep testowy, najczęściej *Bacillus subtilis* lub *Bacillus stearothermophilus* (1, 19) oraz pożywkę testową o wartości odczynu pH w granicach 7-8. Metody te umożliwiają tylko wykrycie obecności substancji przeciwbakteryjnych, bez możliwości ich identyfikacji i oceny ilościowej. W zależności od szczepu testowego czułość tych metod jest różna w odniesieniu do poszczególnych substancji. *Bacillus stearothermophilus* jest np. bardzo wrażliwy na obecność penicylin (poziom wykrywalności – nawet 0,003 j.m. w 1 ml mleka), natomiast stosunkowo mało wrażliwy na aminoglikozydy (wykrywalność: 1,0-4,0 mcg/ml mleka). W przypadku niższych poziomów np. streptomycyny wynik badania będzie więc ujemny. Przy zastosowaniu *Bacillus subtilis* sytuacja przedstawia się odwrotnie. Z kolei wrażliwość tych szczepów w odniesieniu do makrolidów jest zbliżona. Nawet przy użyciu tego samego szczepu testowego i podobnej pożywki drobne różnice jej składu mogą decydować o otrzymaniu różnych

wyników. Stanowi to niekiedy problem przy badaniu mleka wg PN-91/A-86033, kiedy inne metody stosowane są w laboratoriach weterynaryjnych, a inne w zakładach mleczarskich, pomimo tego, iż są to metody, w których używana jest podobna pożywka i ten sam szczep testowy, tj. *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953.

W mikrobiologicznych metodach ilościowych szczepy testowe, skład i pH pożywki dobierane są zgodnie z kierunkiem badań (19). I tak np. przy oznaczaniu penicylin optymalnym drobnoustrojem jest *Micrococcus luteus* ATCC 9341 i pożywka o pH 6,6-6,8; dla tetracyklin: *Bacillus cereus* ATCC 11778 i pożywka o pH 5,7-5,9 itd. Właściwy dobór pH daje możliwości uzyskania możliwie najlepszej dyfuzji antybiotyku z badanego materiału, a więc również największych stref hamowania wzrostu, natomiast użyty szczep testowy decyduje o czułości metody. Należy zwrócić uwagę na fakt, że szczepy testowe powinny pochodzić z referencyjnych kolekcji, np. z ATCC (American Type Culture Collection), czy z BGA (Bundesgesundheitsanstalt). Chodzi tu o zachowanie wysokiej wrażliwości szczepu na określone substancje mimo wielokrotnego pasażowania w warunkach laboratoryjnych. Trzeba dodać, że mówiąc o *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* lub *Bacillus cereus* ma się na uwadze zawiesiny przetrwalników tych drobnoustrojów, otrzymane przez odpowiednie przygotowanie hodowli, tj. wielokrotne przemywanie w wirówce i ogrzewanie, zwykle w temp. 70°C przez 30 minut. Chodzi o zapewnienie równomiernego wzrostu szczepu, co jest warunkiem uzyskania czytelnych, wyraźnie oddzielonych stref hamowania wzrostu. Ponadto zawiesiny takie mogą być długo używane, bez konieczności częstego przesiewania i odnawiania hodowli.

Nie mniej istotna niż dobór samego szczepu testowego jest jego ilość w pożywce, tj. wielkość *inoculum*. Zwykle waha się ono w granicach 10^4 - 10^6 jtk/cm³ podłoża. Generalnie przyjmuje się, że im mniejsze *inoculum*, tym większe strefy hamowania wzrostu, a więc tym większa czułość testu (13, 24). Niezbędna jest jednak pewna minimalna ilość drobnoustroju dla otrzymania wystarczająco czytelnych rezultatów. W metodach płytkowych dość istotne znaczenie ma grubość warstwy agar, zależna od objętości pożywki wlanej do jednej płytki (1, 4, 15). Mniejsza grubość warstwy agar daje lepsze możliwości dyfuzji antybiotyku i korzystniejsze warunki wzrostu drobnoustroju testowego. Zbyt mała ilość podłoża na płytce sprzyja jego wysychaniu i pękaniu, zwłaszcza przy inkubacji w wysokiej temperaturze, co ma miejsce przy użyciu *Bacillus stearothermophilus*.

W odniesieniu do stosowanej techniki nanoszenia materiału w metodach płytkowych, przy użyciu studzienek uzyskuje się z reguły lepsze wyniki, niż przy stosowaniu krążków bibułowych lub cylinder-

ków. Materiał ze studzienek dyfunduje bowiem równomiernie na całej wysokości studzienki, podczas gdy z cylinderek lub krążków raczej powierzchownie, trudniej w głąb podłoża.

O ile w prostych testach jakościowych nie stosuje się żadnej wstępnej obróbki badanego materiału, o tyle w przypadku metod służących do identyfikacji i ilościowego oznaczenia szukanej substancji konieczne jest użycie właściwego rozcieńczalnika, o odpowiednim pH i we właściwej objętości. Chodzi o to, żeby nie „zgubić” antybiotyku przez nadmierne lub niewłaściwe rozcieńczanie (4, 13, 19).

W pewnych przypadkach konieczne jest odbiałanie materiału przed rozpoczęciem analizy, ponieważ niektóre substancje tworzą nierozpuszczalne i nieaktywne biologicznie kompleksy z białkami (2, 16). Wreszcie w metodach ilościowych niezbędne jest bardzo precyzyjne przygotowanie krzywych wzorcowych, przy czym muszą być zachowane wszystkie opisane wyżej warunki dotyczące doboru drobnoustroju testowego, pożywki i rozcieńczalnika. Jest też oczywiste, że bazą do sporządzania krzywej wzorcowej musi być taki sam materiał, jaki będzie poddawany analizie. Decydujące jest jednak użycie standardu antybiotyku o gwarantowanej zawartości substancji czynnej, np. wg United States Pharmacopea oraz prawidłowe przygotowanie stężenia wyjściowego i kolejnych stężeń roboczych. Niektóre substancje nie rozpuszczają się w wodzie, toteż najważniejszą należy uprzednio rozpuścić np. w alkoholu (erytromycyna) lub kwasie (tetracyklina), a po uzupełnieniu do potrzebnej objętości rozcieńczać odpowiednio dobranymi roztworami buforowymi (13). Należy również pamiętać o niekiedy krótkich terminach trwałości przygotowanych rozcieńczeń, ponieważ nawet pozornie niewielki spadek aktywności przeciwbakteryjnej antybiotyku w znacznym stopniu rzutuje na kształt krzywej standardowej, podobnie zresztą, jak dokładność ważenia substancji wzorcowej. Na ogół stężenia wyjściowe można bezpiecznie przechowywać do 10 dni, ale np. penicyliny tylko do 3 dni.

Dobór warunków, tj. czasu i temperatury inkubacji zależy głównie od użytego szczepu testowego. W metodach płytkowych bardzo dobre wyniki (większe strefy hamowania wzrostu) daje preinkubacja, zwykle w temp. pokojowej, przez 1-4 godzin (4, 15, 16, 24), a następnie inkubacja w temperaturze odpowiedniej dla danego szczepu. W przypadku drobnoustrojów z rodzaju *Bacillus* zbyt długi czas inkubacji spowoduje przerost kolonii, przez co strefy hamowania będą mniej czytelne.

Reasumując należy stwierdzić, że jakkolwiek metody mikrobiologiczne są stosunkowo proste w wykonaniu i nie wymagają kosztownego sprzętu i aparatury uzyskanie zadowalających wyników uzależnione jest od przestrzegania określonych warunków. Dla ostatecznego potwierdzenia wyników badań mikrobiolo-

gicznych, zwłaszcza przy konieczności identyfikacji stwierdzonych pozostałości powinny być użyte wysoce specyficzne metody instrumentalne, np. chromatografia cienkowarstwowa, cieczowa, gazowa ze spektrometrią masową, metody radioimmunologiczne itd. Mimo zachowania wszystkich reżimów metoda mikrobiologiczna z racji swej natury nie może bowiem dać wyników absolutnie pewnych, szczególnie w odniesieniu do tożsamości wykrytego związku.

Piśmiennictwo

1. Bielecka M., Baldock J. D., Kotula A. W.: J. Fd Prot. 44, 194, 1981.
2. Boudaut B., Moretain J. P., Boisseau J.: Food Add. Contam. 4, 297, 1987.
3. Burbianka M., Pliszka A., Burzyńska H.: Mikrobiologia żywności, PZWL, Warszawa, 1983.
4. Davis W. W., Stout T. R.: Appl. Microbiol. 22, 659, 1971.
5. DeZutter L., Koenen-Dierick K., VanHoof J.: Vlaams diergeeneesk. Tijdschr. 56, 118, 1987.
6. Forscher E., Glende W.: Fleischwirtschaft 56, 226, 1976.
7. Gemmer H., Seeger H., Haase M.: Blauen Hefte 50, 529, 1973.
8. Glende W. H.: Veterinärmedizinische Beiträge über die Antibiotika verweildauer und den Antibiotikagehalt in der Muskulatur, Leber, Niere, Galle und im Blut von Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) nach peroraler Verabreichung verschiedener Chlortetracyklin (Aureomycin) Dosen. Praca dokt., Hannover, 1972.
9. Heillmann R.: Ringuntersuchung auf Hemmstoffe (Antibiotika) bei normalgeschlachteten Rindern, Schweinen und Kälbern an 11 Schlachthöfen in der Bundesrepublik Deutschland. Praca dokt., Hannover, 1971.
10. Heinert H. H., van der Wall G., Brehmer H.: Arch. Lebensmittelhyg. 27, 55, 1976.
11. Inglis J. M., Katz S. E.: J. Am. Off. Anal. Chem. 61, 1098, 1978.
12. Kurek Cz.: Mat. Kraj. Konf. Nauk.-Tech.: Substancje chemiczne w mleku działające hamująco. Olsztyn, 1992, s. 3.
13. Microbiology Laboratory Guidebook, US FDA, 1974.
14. Moats W. A.: J. F. Prot. 51, 491, 1988.
15. Mol H.: Antibiotics and milk. A contribution to the evaluation and solution of a problem. Praca dokt., Utrecht, 1975.
16. Rutczyńska-Skonieczna E.: Roczniki PZH 17, 199, 1966.
17. Roth L. A., Kwan S., Sporns P.: J. F. Prot. 49, 436, 1986.
18. Różańska H., Kwiatek K.: Życie wet. 67, 277, 1992.
19. Różańska H., Kwiatek K.: Przegląd metody wykrywania i oznaczania pozostałości antybiotyków w żywności zwierzęcego pochodzenia. Postęp w analizie żywności. T3. Wybrane zagadnienia analizy chemicznej i fizykochemicznej. Wyd. Inst. Przem. Mięsnego, Warszawa, 1993, s. 194.
20. Schaal E.: Fleischwirtschaft 13, 561, 1961.
21. Schellhaas G.: Forsch. Vet. Med. z. 20, 272, 1974.
22. Schmidt U., Cremling K.: Fleischwirtschaft 55, 1736, 1975.
23. Smither R.: J. Appl. Bacteriol. 45, 267, 1978.
24. Thomsen F. V.: Acta Pathol. Micro. Scand. 61, 303, 1964.

Adres autora: lek. wet. Hanna Różańska, ul. Kaniowczyków 6/11, 24-100 Puławy

WALL P. G., MORGAN D., LAMDEN K., GRIFFIN M., THRELFALL E. J., WARD L. R., ROWE B.: Transmisja szczepów *Salmonella typhimurium* opornych na wiele leków przeciwbakteryjnych z bydła na człowieka. (Transmission of multi-resistant strains of *Salmonella typhimurium* from cattle to man). Vet. Rec. 136, 591-592, 1995 (23)

Wzrost liczby izolatów *Salmonella typhimurium* opornych na wiele preparatów przeciwbakteryjnych zainspirował badania nad źródłami zakażenia tym drobnoustrojem. Czynnikiem ryzyka był kontakt z chorymi cielętami zakażonymi *S. typhimurium* DT 104. Szczepy *S. typhimurium* DT 104 są oporne na ampicylinę, chloramfenikol, streptomycynę, sulfonamidy i tetracykliny, przy czym geny lekooporności są zintegrowane z chromosomami. Badaniem objęto 105 osób chorych oraz 235 osób zdrowych. U chorych występowała biegunka (u 27% krwawe stolce), wymioty (45%), bóle brzucha (68%) i gorączka (83%). W 10 przypadkach ustalono istnienie kontaktów z chorym bydłem.