

KRYSTYNA RYBIŃSKA, JACEK POSTUPOLSKI, MAŁGORZATA SZCZĘSNA, BARBARA SIOŃEK, KAZIMIERZ KARŁOWSKI

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI ANTYBIOTYKÓW I INNYCH SUBSTANCJI HAMUJĄCYCH W MLEKU – SYSTEM ZAPEWNIANIA JAKOŚCI

DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESIDUES AND OTHER INHIBITORS IN MILK – QUALITY ASSURANCE IN LABORATORY

Zakład Badania Żywności i Przedmiotów Użytku, Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: doc. dr hab. K. Karłowski

W pracy opisano wymagania dotyczące systemów zapewniania jakości przy oznaczaniu antybiotyków i innych substancji hamujących w mleku. Podano wymagania metodyczne oraz zasady wewnątrz- i zewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości badań.

WSTĘP

Powszechne stosowanie antybiotyków w weterynarii, a zwłaszcza w leczeniu i profilaktyce chorób bakteryjnych gruczołu mlekowego u krów, stanowi ryzyko występowania pozostałości tych preparatów w mleku spożywczym, a także w mleku w proszku – podstawowym surowcu do produkcji mieszanek dla niemowląt i dzieci. Jak wynika z badań wykonanych w 23 województwach w latach 1990–1993, stwierdzona w zależności od metody liczba próbek zawierających pozostałości antybiotyków i innych substancji hamujących wynosiła:

- w mleku surowym (przed zmieszaniem w basenach zbiorczych) od 13,1 do 22,4%,
- w mleku spożywczym od 10,5 do 19,5%,
- w mleku w proszku od 12,9 do 18,2% [18].

Zagrożenie dla zdrowia człowieka wynikające z obecności w żywności pozostałości antybiotyków związane jest z istotnymi problemami:

- wywoływaniem alergii,
- powstawaniem i narastaniem oporności drobnoustrojów saprofitycznych i chorobotwórczych na antybiotyki,
- toksycznością samych związków,
- zanieczyszczeniem środowiska.

Zwraca uwagę fakt, że w krajach o dobrze rozwiniętej hodowli bydła mlecznego ilość próbek, w których stwierdza się antybiotyki wynosi poniżej 0,1% [10, 11, 14].

STAN PRAWNY

Krajowe ustawodawstwo żywnościowe nie dopuszcza obecności antybiotyków w żywności pochodzenia zwierzęcego [24]. Oznacza to, że zawartość antybiotyku w próbce musi być niższa od wykrywalności rutynowo stosowanych metod analitycznych. W zaleceniach Komitetu Kodeksu Żywnościowego FAO/WHO oraz w ustawodawstwie Unii Europejskiej przyjęto dla leków weterynaryjnych pojęcie „najwyższe dopuszczalne pozostałości” (Maximum Residue Limits – MRL's), uwzględniające ustalone dopuszczalne dzienne pobranie (ADI). Porównanie wymagań UE i KKŻ FAO/WHO dla niektórych antybiotyków i innych substancji hamujących w mleku przedstawia tabela I [1–5, 22, 23]

Tabela I. Wartości ADI i MRL ustalone przez UE i KKŻ FAO/WHO
ADI and MRL values established by UE and FAO/WHO

| L.p. | Związek | MRL's [mg/kg] | | |
|------|----------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | ADI [mg/kg m. c. / dzień] | KKŻ | UE |
| 1 | Penicylina G | 0,03 ¹ | 0,004 | 0,004 |
| 2 | Oksytetracyklina | 0–0,003 | 0,1 | 0,1 ² (T) |
| 3 | Sulfamididyna | 0–0,05 | 0,025 | 0,1 ³ (T) |
| 4 | Chloramfenikol | nie określono | pozostałość nie akceptowalna | pozostałość nie akceptowalna |
| 5 | Gentamycyna | 0–0,004 (T) | 0,1 (T) | 0,1 (T) |
| 6 | Neomycyna | 0–0,06 | 0,5 | – |
| 7 | Dihydrostreptomycyna | 0–0,05 | 0,2 (T) | 0,2 (T) |
| 8 | Spiramycyna | 0–0,05 | 0,2 | 0,15 |

(T) – ustalono tymczasowo

¹na osobę

²wszystkie substancje należące do grupy tetracyklin

³wszystkie sulfonamidy

Ocena krajowych metod analitycznych

Metody wykrywania obecności antybiotyków i innych substancji hamujących w mleku można podzielić na:

- mikrobiologiczne,
- enzymatyczne,
- chromatograficzne i inne.

Metody mikrobiologiczne polegają na hamowaniu rozwoju organizmu testowego przez substancje obecne w badanej próbce. Określa się je na podstawie zmiany kwasowości lub potencjału oksydo-redukcyjnego podłoża a w przypadku metod płytkowych dodatkowo – na podstawie wielkości strefy hamowania wzrostu.

Metody te wyróżniają się niskim kosztem jednostkowym oznaczenia oraz prostotą wykonania i małymi wymaganiami w stosunku do wyposażenia laboratorium. Jako wady wymienia się długi czas oznaczenia (kilka – kilkanaście godzin), wrażliwość na enzymy tkankowe, niedostateczną czułość na niektóre grupy antybiotyków, niespecyficzność.

Testy mikrobiologiczne, szczególnie w postaci zestawów, są powszechnie stosowane w rutynowej kontroli. Jako organizmy testowe wykorzystuje się najczęściej *Bacillus stearothermophilus* i *Streptococcus thermophilus*, a także *Bacillus subtilis*, *Streptococcus lactis*, *Sarcinia lutea*.

PN-91/A-86033 „Mleko. Wykrywanie antybiotyków i innych substancji hamujących” zaleca kilka metod do oceny mleka w kierunku pozostałości antybiotyków [15]:

- mikrobiologiczną metodę dyfuzyjną płytkową ze szczepem testowym *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* – C 953,
- testy bakteryjne probówkowe ze szczepem testowym *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* – C 953:
- Szybki Test Dyfuzyjny (STD-ABIOTEST),
- test redukcyjny z czernią brylantową (BR-test),
- Polutest M,
- Delvotest,
- enzymatyczną metodę „Penzym” do wykrywania antybiotyków β -laktamowych (i jej warianty).

W krajowych metodach oznaczania antybiotyków i innych substancji hamujących – STD i Polutest M wykorzystano *Bacillus stearothermophilus* oraz purpurę bromokrezolową STD produkowany w postaci gotowych do użycia fiolek, zawierających pożywkę agarową z barwnikiem zaszczepioną przetrwalnikami organizmu testowego; trwałość testu wynosi 2 miesiące. W Poluteście M wszystkie składniki występują w postaci proszku: liofilizowane przetrwalniki *Bacillus stearothermophilus*, czynnik żelujący i substancje odżywcze zmieszane w odpowiednich proporcjach są umieszczone w fiolkach. Trwałość preparatu wynosi 18 miesięcy. Przed wykonaniem oznaczenia podłoże należy uwodnić.

Najbardziej znaną metodą enzymatyczną jest Penzym. Ocena opiera się na hamowaniu przez antybiotyki z grupy β -laktamowych aktywności DD-karboksypeptydazy (penicylinazy): w mleku wolnym od antybiotyków β -laktamowych penicylinaza odszczepia D-alaninę z substratu syntetycznego. D-alanina w wyniku specyficznych reakcji enzymatycznych zostaje utleniona do kwasu pirogronowego z jednoczesnym wytworzeniem nadtlenu wodoru, który utlenia wskaźnik oksydoredukcyjny, w środowisku kwaśnym barwi się na intensywny różowy kolor. Obecność antybiotyków β -laktamowych powoduje związanie części lub całości penicylinazy – białozółta barwa próbki.

Do grupy metod enzymatycznych zalicza się również tzw. testy immunoenzymatyczne, wykazujące dużą specyficzność w stosunku do oznaczanych antybiotyków. Są to zwykle oznaczenia szybkie i dokładne, wykorzystywanie ich ogranicza się jednak wyłącznie do laboratoriów badawczych.

Do oznaczenia pozostałości antybiotyków stosuje się również metody chromatograficzne (cienkowarstwową, cieczową, gazową) przy zastosowaniu różnych rodzajów detekcji. Mimo dobrej wykrywalności chromatografia nie jest techniką stosowaną

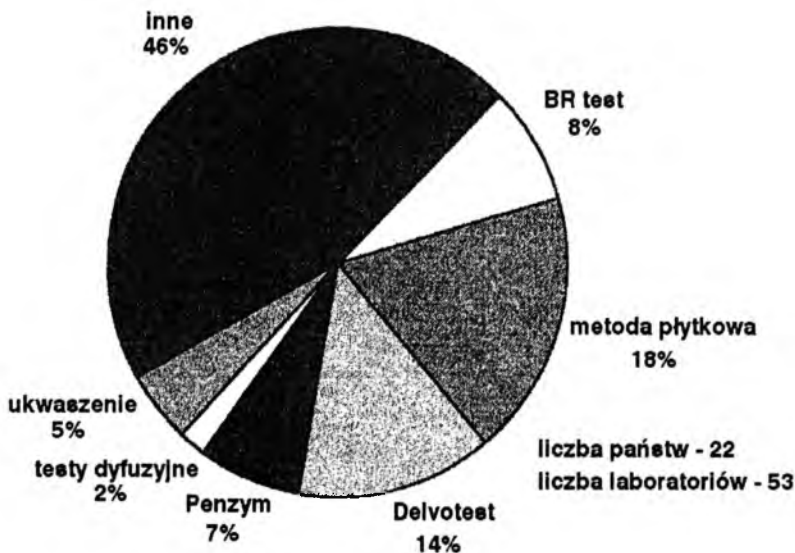
Tabela II. Ocena wykrywalności metod analitycznych oznaczania antybiotyków w mleku wg. [15] i badań własnych (mg/kg, penicylina G w j/kg)
 Assessment of the detectability of analytical methods for antibiotic determination in milk [15] and own studies (mg/kg, penicilin G in u/kg)

| Lp. | Antybiotyk/sulfonamid | Metoda płytkowa | STD | Polutest M | Penzym | BR test | Delvotest |
|-----|-----------------------|--------------------|--------|------------|--------|---------|-----------|
| 1 | Penicylina G | 0,003 | 0,004 | 0,004 | 0,008 | 0,004 | 0,004 |
| | | 0,003* | 0,003* | 0,003* | 0,008* | – | – |
| 2 | Ampicylina | – | – | – | 0,004 | 0,002 | 0,01 |
| | | 0,005* | 0,005* | 0,005* | 0,005* | – | – |
| 3 | Oksytetracyklina | 0,4 | – | 0,3 | – | 0,1 | 0,8 |
| | | 0,5* | 0,5* | 0,5* | – | – | – |
| 4 | Sulfadimidyna | – | – | – | – | 0,15 | – |
| 5 | Chloramfenikol | 0,7 | 0,2 | – | – | 2,75 | 1,2 |
| | | 1* | 0,5* | 0,5* | – | – | – |
| 6 | Gentamycyna | – | – | – | – | 0,3 | 0,6 |
| 7 | Neomycyna | 0,2 | 0,1 | 1 | – | 0,3 | 1,5 |
| 8 | Dihyrostreptomycyna | 1 | 3 | 0,5 | – | 1,8 | 6 |
| | | 0,5* | 0,5* | 0,5* | – | – | – |
| 9 | Spiramycyna | – | – | – | – | 2,5 | – |
| 10 | Erytromycyna | 0,3 | 0,1 | 0,4 | – | 0,08 | 0,7 |
| | | 0,5* | 0,5* | 0,5* | – | – | – |

* badania własne

w kontroli rutynowej, jest czaso- i pracochłonna; wymaga niejednokrotnie skomplikowanego sprzętu. Może być stosowana jako metoda odwoławcza lub potwierdzająca bądź w pracach badawczych [13].

Metody opisane w PN-91/A-86033 należą również do najczęściej stosowanych na świecie: rycina 1 [21]. Jak wynika z badań Międzynarodowej Federacji Mleczarskiej (International Dairy Federation, IDF) do najpopularniejszych zalicza się: Delvotest, metodę płytkową i jej modyfikacje, BR-test, testy dyfuzyjne próbki, ukwaszenie oraz test Penzym. Poza testem opartym na ocenie stopnia ukwaszenia próbki pozostałe techniki są uwzględnione w ww. PN.



Ryc. 1. Ocena częstotliwości stosowania metod analitycznych oznaczania zawartości antybiotyków i innych substancji hamujących.

Assesment of the frequency of the use of analytical methods for the determination of antibiotic residues and other inhibitors.

Zaletą testów mikrobiologicznych jest ich dobra wykrywalność, są one jednak niespecyficzne. Szczepy testowe nie reagują wybiórczo, są wrażliwe na szereg antybiotyków. Fałszywe wskazania mogą być spowodowane zawartością w tkance lub mleku substancji naturalnych np. enzymów lub substancji pochodzenia obcego – środków myjących czy też innych leków jak np. sulfonamidów [6].

Sprawdzając niektóre zalecenia producentów testów krajowych stwierdzono, że używane mleko do badania powinno być świeże, nie należy poddawać go gotowaniu. Wbrew informacjom producentów testów zagotowanie próbki może spowodować pogorszenie wykrywalności, zwłaszcza w przypadku antybiotyków β -laktamowych [19].

Decydującym parametrem określającym przydatność metody do oznaczania antybiotyków i innych substancji hamujących jest jej wykrywalność (w testach mikrobiologicznych minimalne stężenie hamujące – MIC). Powinna być ona niższa od dopuszczalnego

maksymalnego poziomu pozostałości. Należy sądzić, że stosowane dotąd metody oznaczania antybiotyków w mleku będą weryfikowane, zgodnie z zaleceniami ich wykrywalność powinna być równa lub mniejsza niż ustalony, maksymalny poziom pozostałości (MRL) [4].

Porównanie zbadanych granic wykrywalności dla metod podanych w PN przedstawiono w tabeli II.

Czułość testów na poszczególne substancje hamujące była często niższa od progów wykrywalności, podanych przez producentów bądź autorów metod.

Wyniki oznaczeń potwierdzają zasadność zamieszczenia w PN, obok metody płytkowej, mikrobiologicznych testów dyfuzyjnych: STD-Abiotest oraz Polutest M (produkcji krajowej) jak również Delvotestu i BR-testu. W rutynowej kontroli mleka w kierunku obecności antybiotyków negatywny wynik testu Penzym wymaga ewentualnego potwierdzenia metodą mikrobiologiczną.

WYMAGANIA TECHNICZNE

Pomieszczenia i warunki ogólne

Pomieszczenia stosowane do oznaczania antybiotyków i innych substancji hamujących jak również podstawowe zasady pracy powinny odpowiadać co najmniej ogólnym wymaganiom podanym dla laboratoriów mikrobiologicznych w PN-93/A-86034/02 „Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. Ogólne zasady badań” [16].

Wyposażenie

Do wykonywania oznaczeń antybiotyków i innych substancji hamujących wg. PN-91/A-86033 niezbędne jest następujące wyposażenie: pehametr – (metoda płytkowa), cieplarka o temperaturze $64 \pm 1^\circ\text{C}$ (metoda płytkowa, STD, BR-test, Delvotest), cieplarka $68 \pm 1^\circ\text{C}$ lub łaźnia wodna $65 \pm 1^\circ\text{C}$ (Polutest M), łaźnia wodna $47 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (Penzym), lodówka, zamrażarka.

Szkló należy myć i wyjaławiać zgodnie z PN-93/A-86034/02. Oznaczenie bakteriobójczy lub bakteriostatycznych pozostałości na powierzchni szkła laboratoryjnego powinno być wykonane np. wg. [12].

Cieplarki, łaźnie wodne i lodówki

Termostaty, łaźnie wodne i lodówki powinny się sprawdzać rutynowo raz dziennie przed podjęciem pracy. Celowe jest wyposażenie każdego urządzenia w termometr umieszczony w zlewce z gliceryną, termometr elektroniczny lub termograf. Zapis powinien obejmować oznaczenie urządzenia, datę i godzinę pomiaru, numer termometru, położenie na półce (cieplarka, lodówka), podpis osoby dokonującej pomiaru. Dodatkową kontrolę przy użyciu innego termometru należy przeprowadzić wg. wskazań podanych w tabeli III. Sprzęt należy kalibrować w istotnym zakresie temperatur używając termometru o podziałce elementarnej nie większej niż $0,1^\circ\text{C}$ [9].

Pehametr

Pehametry przed użyciem należy kalibrować przy pomocy buforów wzorcowych. Dostępne są w sprzedaży odpowiednie bufony wzorcowe o pH 4,0 i 7,0. Aby sprawdzić czułość elektrody można zmierzyć różnicę potencjału w mV pomiędzy pH 4,0 i 7,0. Powinna ona wynosić 172–171 mV. Jeżeli jest mniejsza niż 172 mV ale większa niż 150 mV elektrodę należy zregenerować przed użyciem przy pomocy dwufluorowodoru

Tabela III. Częstotliwość i dokładność kontrolowania wyposażenia
Frequency and accuracy of equipment controls

| Rodzaj sprzętu | Częstotliwość kontroli | Dokładność |
|--|------------------------|---------------------------------|
| Termostat do podgrzewania lub chłodzenia | dwa razy w miesiącu | $\pm 1,0^{\circ}\text{C}^{1,2}$ |
| Łaźnia wodna | dwa razy w miesiącu | $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ |
| Lodówka lub zimny pokój | raz w miesiącu | $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ |

¹ Upewnić się, że temperatura w różnych miejscach termostatu jest taka sama

² Dla niektórych metod wymagana jest większa dokładność

amonu (patrz niżej). Jeżeli różnica jest mniejsza niż 150 mV elektrodę należy wymienić. Elektrodę należy regularnie czyścić roztworem pepsyny. Tłuszcz można usuwać przez przemywanie acetonem. Należy pamiętać, że jeżeli elektroda była zanurzona w acetonie przez dłuższy czas to membrana będzie wysuszona i wymaga zrównoważenia w wodzie [9].

Regeneracja elektrody pehametru w roztworze dwufluorowodoru amonu:

1. Zanurzyć elektrodę w 20% NH_4HF_2 na 30 sekund.
2. Przemyć wodą destylowaną.
3. Zanurzyć elektrodę w 6M HCl na 5 minut.
4. Przed użyciem zanurzyć przez 12–24 godzin w buforze o pH 7,0.

Odczynniki i materiały pomocnicze

Odczynniki powinny być co najmniej o czystości „do mikrobiologii”. Jakość produktów różnych dostawców jest zróżnicowana, co może wpływać na wykrywalność testów. Różna może też być jakość poszczególnych partii testów od tego samego dostawcy. Ważne jest także, aby laboratorium posiadało procedury kontroli jakości pożywek. Każda partia sprowadzanych do laboratorium testów powinna zostać rutynowo sprawdzana.

WEWNĄTRZLABORATORYJNA KONTROLA JAKOŚCI

Laboratorium powinno stworzyć system, umożliwiający stałe sprawdzanie jakości wykonywanych prac. Może polegać to na równoległym oznaczeniu:

- próbek fortyfikowanych,
- próbek archiwalnych,
- materiałów referencyjnych.

W przypadku oznaczania antybiotyków i innych substancji hamujących w mleku najbardziej użyteczną metodą jest równoległe oznaczenie próbek fortyfikowanych.

System taki powinien zawierać:

- określenie częstotliwości oznaczenia próbek fortyfikowanych,
- przygotowanie i fortyfikowanie próbek,
- oznaczenie,
- rejestrację wyników,
- ocenę wyników,
- wnioski i ewentualne działania korygujące.

Określenie częstotliwości oznaczenia próbek fortyfikowanych

Laboratorium powinno określić częstotliwość wykonywania oznaczeń próbek fortyfikowanych. Powinny one być wykonywane co najmniej:

- przed pierwszym użyciem nowej partii podłoży lub testów,
- zmianie w postępowaniu mogącej mieć wpływ na wynik oznaczenia, np. zmiana procedury mycia szkła,
- każdorazowo przy oznaczeniu próbek badanych.

Zaleca się również, aby każdy z pracowników wykonujących badania pozostałości antybiotyków był przeszkolony oznaczając próbki fortyfikowane i kontrolne (mleko wolne od antybiotyków).

Przygotowanie próbek fortyfikowanych

Roztwór podstawowy otrzymuje się przez rozpuszczenie odważonej ilości soli sodowej penicyliny G (np. Sigma nr kat. PEN-NA) w 1% buforze fosforanowym, pH 6,0 tak aby otrzymać stężenie 1000 j/ml (1667 jednostek = 1 mg soli sodowej penicyliny G). Trwałość roztworu podstawowego w temperaturze pokojowej dwa dni, w temperaturze -8°C dwa tygodnie [20]. Następnie należy przygotować rozcieńczenie mlekiem wolnym od antybiotyków (np. Difco nr kat. 1803-63-1, Biolacta) do otrzymania pożądaných stężeń. Dobór stężeń w zależności od testu przedstawia tabela IV.

Tabela IV. Zalecane stężenia antybiotyków (wewnątrzlaboratoryjna kontrola jakości)
The recommended concentrations of antibiotics (intralaboratory quality control)

| Lp. | Stężenie [j/ml] | Ilość oznaczeń (powtórzenia równoległe) | | | |
|-----|--------------------|--|------------------------------------|--|------------------------------------|
| | | Testy mikrobiologiczne | | Penzym | |
| | | Kontrola dla nowej partii testu i przy zmianach procedur | Kontrola dla każdej serii oznaczeń | Kontrola dla nowej partii testu i przy zmianach procedur | Kontrola dla każdej serii oznaczeń |
| 1 | 0,002 | 2 ¹ | – | – | – |
| 2 | 0,004 | – | – | 2 ¹ | – |
| 3 | 0,008 | 2 ² | 1 ² | – | – |
| 4 | 0,02 | – | – | 2 ² | 1 ² |

¹ wszystkie próbki ujemne

² wszystkie próbki dodatnie

Uwaga: materiał kontrolny o zawartości 0,12j/ml penicyliny G w wolnym od antybiotyków odtuszczonym mleku w proszku firmy Difco, nr kat. 1802-33-9

Oznaczenie

Oznaczenie antybiotyków i innych substancji hamujących w próbkach fortyfikowanych należy wykonywać ściśle według ustalonej procedury, w takich samych warunkach jak oznaczenia badanych próbek. Dobór stężeń w zależności od testu przedstawia tabela IV. Dla oznaczeń wykonywanych dla nowej partii a także przy innych zmianach należy badać co najmniej dwa razy po dwie równoległe próbki; dla kontroli podczas oznaczenia dwie równoległe próbki, dla podanych w tabeli stężeń.

Rejestracja wyników

Uzyskane wyniki laboratorium powinno zapisywać i przechowywać zgodnie z przyjętymi zasadami. Uzyskane wyniki mogą służyć jako dowód poprawnego wykonywania testów, ich właściwej jakości oraz jako świadectwo przeszkolenia i biegłości pracowników.

MIĘDZYLABORATORYJNE BADANIA BIEGŁOŚCI

Laboratorium powinno starać się uczestniczyć w międzylaboratoryjnych badaniach biegłości dotyczących oznaczenia antybiotyków i innych substancji hamujących w mleku w celu potwierdzenia własnych kompetencji [7, 8].

Przy organizowaniu badań biegłości powinno uwzględnić się następujące zagadnienia:

- rodzaj materiału badanego,
- sposób przekazywania próbek uczestnikom i wyników organizatorom,
- częstotliwość wykonywanych badań,
- zalecane metody analityczne,
- sposób informowania uczestników o wynikach,
- zasady łączności z organizatorem,
- zasady zachowania poufności,
- koszty uczestnictwa.

W przypadku badań antybiotyków i innych substancji hamujących w mleku z użyciem metod mikrobiologicznych lub testów biochemicznych należy zwrócić uwagę na przygotowanie próbek do badań oraz ocenę przesłanych danych i klasyfikację uczestników.

Przygotowanie próbek do badań międzylaboratoryjnych [6]

Należy pobrać mleko od minimum siedmiu zdrowych, o średniej mleczności krów, którym nie podawano antybiotyków przez co najmniej 4 tygodnie, odwirować i pasteryzować (15 s, 73–75°C) wymieszać i podzielić na części (5 l). Pozyskane mleko musi być dobrej jakości mikrobiologicznej.

Do każdej części dodać 5 ml wodnego roztworu antybiotyku o stężeniu odpowiednim do oczekiwanego w końcowym materiale i wymieszać.

Pobrać po 33 ml mleka z antybiotykiem, podzielić na dwie części, oznakować i zamrozić w temperaturze -20°C a następnie liofilizować (48 h, $\leq 25^{\circ}\text{C}$) i zamknąć. Do momentu wysłania, próbki należy przechowywać w temperaturze 6°C [20]. Równocześnie należy przygotować próbkę kontrolną o znanym uczestnikowi stężeniu (np. 10 j/m penicyliny G) oraz próbkę wolną od antybiotyków i innych substancji hamujących. Do fortyfikowania próbek należy używać antybiotyków najczęściej stosowanych w lecznictwie, pochodzących z różnych grup chemicznych (penicylina G i tetracyklina), w stężeniach powyżej granicy wykrywalności większości używanych testów. Laboratorium powinno otrzymać co najmniej 5 próbek, zawierających antybiotyki z różnych grup chemicznych jak również kontrolę wolną od antybiotyków.

Każda próbka powinna być analizowana dwukrotnie. Otrzymaną przez laboratorium próbkę należy rozcieńczyć sterylną wodą destylowaną wolną od substancji hamujących (1:10) i rozpuścić w temperaturze pokojowej. Próbka powinna być oznaczona w czasie

12 h od uwodnienia. Do laboratorium powinno się przesłać oprócz próbek do badań próbki kontrolne (dodatnią i ujemną), kod laboratorium, instrukcję postępowania oraz instrukcję (formularz) do sporządzenia raportu z badań.

Laboratorium organizujące badania powinno oznaczyć próbki rutynowo stosowanymi metodami (wszystkie stężenia, rodzaje antybiotyków przewidziane do badań), jak również ustalić, na podstawie badań, okres przechowywania próbek.

Raport z badań biegłości

Organizator badań powinien, w ustalonym terminie, przesłać raport zawierający:

- wyniki oznaczenia próbek przesłanych do badania,
- zawartość antybiotyku dodanego w poszczególnej próbce,
- wyniki oznaczenia próbek w laboratorium organizatora wraz z podaniem metod,
- informację o stosowanych metodach,
- listę uczestników.

Z uwagi na charakter badania (test jakościowy) nie ma konieczności dokonywania statystycznej oceny uczestników.

Należy podkreślić, że zapewnienie w laboratorium kontrolującym żywność wewnątrz i zewnątrzlaboratoryjnego systemu jakości jest postawą do uwiarygodnienia uzyskiwanych wyników.

K. Rybińska, J. Postupolski, M. Szczęсна, B. Sionek, K. Karłowski

DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESIDUES AND OTHER INHIBITORS IN MILK – QUALITY ASSURANCE IN LABORATORY

Summary

In the methods used widely for the determination of antibiotic residues in food product of animal origin the antibiotic-sensitivity of microorganisms is used.

An advantage of microbiological methods is their high detection rate, but they are not specific. The test strains are not selectively sensitive and are inhibited by many antibiotics. False positive results of these tests may be due to the presence in tissues or milk of natural substance, e.g. enzymes or compounds of external origin – detergents or other drugs, e.g. sulphonamides.

The microbiological tests – plate and tube STD and Polutest, as well as the enzymatic Penzym test, all recommended in the Polish Standards PN-91/A-86033 for milk control for the detection of antibiotic residues were compared.

The authors describe the requirements to be met by the systems of quality ensuring during determination of antibiotics and other inhibitors in milk. The requirements to be met by the methods of this determination are discussed, together with the principles of intralaboratory and interlaboratory quality controls.

PIŚMIENNICTWO

1. Codex Alimentarius Commission. Report of the Ninth Session of The Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods. Alinorm 97/31, 1996. – 2. Codex Alimentarius Commission, Report of the Seventh Session of the Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods, Alinorm 93/31, 1992. – 3. Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 42 meeting, Rome 1994. – 4. Codex Alimentarius. Residues of Veterinary Drugs in Food. Vol. 3. FAO/WHO, Rome 1996. – 5. Commission

Regulation (EC) No 2377/94; OJEC No 287, 7, 8, 11, 1994. – 6. Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products. 2nd Edition. Bulletin of the IDF, 1991, 258. – 7. Development and operation of laboratory proficiency testing. ISO/IEC Guide 43, 1984. – 8. *Dobecki M.*: Międzylaboratoryjne badania porównawcze i badania biegłości. Biuletyn Informacyjny POLLAB, 1993, 4, 15. – 9. Handbook for microbiological laboratories. Introduction to internal quality control of analytical work. Nordic Committee on Food Analysis, Report No. 5, 1989. – 10. *Harding F.*: Antibiotic testing in the United Kingdom, Past and Future. Bulletin of the IDF, 1993, 283, 61.

11. *Madsen P.S.*: Antibiotic testing in the Denmark, Past and Future. Bulletin of the IDF, 1993, 283, 63. – 12. Manual of food quality control. 12. Quality assurance in the food control microbiological laboratory. FAO Food and Nutrition Paper 14/12. FAO, Rome 1991. – 13. *Ostaszewski P.*: Przegląd metod wykrywania substancji hamujących w mleku. Przemysł Spożywczy, 1996, 4, 29. – 14. *Österås O.*: Antibiotic testing in the Norway. Past and Future. Bulletin of the IDF, 1993, 283, 63. – 15. PN-A/-86033. Mleko. Wykrywanie antybiotyków i innych substancji hamujących. – 16. PN-93/A-86034/02 Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. Ogólne zasady badań. – 17. Residues of some veterinary drugs in animals and food. FAO Food and Nutrition Paper, 41/8, FAO, Rome 1996. – 18. *Rybińska K., Postupolski J., Szczęsna M.*: Pozostałości antybiotyków i innych substancji hamujących w mleku. Roczn. PZH 1995, 46, 239. – 19. *Rybińska K.*: Oznaczanie antybiotyków b-laktamowych w mleku. Roczn. PZH, 1989, 39, 26. – 20. Specification for identity purity of some antibiotics. FAO Nutrition Meetings Report Series, No 45 A, HO/Food Add./69, 34, 1969.

21. *Suherm G.*: Experiences with an IDF-experimental study for the detection of penicillin and tetracycline applying routinely used methods. Bulletin of the IDF, 1993, 283, 16. – 22. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series 38, WHO, Geneva 1996. – 23. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series 39, WHO, Geneva 1997. – 23. Ustawa o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia z dnia 25 listopada 1970 r. Dz.U. nr 29 poz. 245, Dz.U. 1992 nr 91 poz. 456.

Otrzymano: 1997.05.12