

# OTKRIVANJE ZAOSTATAKA ANTIBIOTIKA U MLIJEKU\*

Ivan BACH

Tehnološki fakultet, Zagreb

## UVOD

Zaostaci antibiotika u mlijeku i mlječnim proizvodima postali su jednako značajni, kako za mljekarske tehnologe, tako i za zdravstvene stručnjake — od časa kada su antibiotici prvi put upotrijebljeni kao lijekovi u veterinarskoj medicini, tj. od sredine 1940. godine. Već tada je, naime, utvrđeno da primjena antibiotika u liječenju upale vimena (mastitis) dovodi do pojave zaostataka antibiotika u mlijeku, jer primljeni antibiotik prelazi iz krvi liječene životinje u mlijeko.

Količina tako prispjelog antibiotika u mlijeko i trajanje njegova izlučivanja ovise o različitim činiocima, a samo izlučivanje počinje već 12. sati nakon davanja mlijeka, i traje od tog časa pa sve do 12-og dana. Najveće količine antibiotika u mlijeku javljaju se nakon intramamarne infuzije lijeka, a neusporedivo manje količine nakon intravenozne ili intramuskularne injekcije, odnosno intrauterine primjene.

Prvi dokaz o **štetama u preradi mlijeka** koje sadrži zaostatke antibiotika penicilina objavio je još 1947. god. HANSEN, a o **učestalosti** pojave zaostataka antibiotika u mlijeku izvještava npr. GROSSKLAUS za 1967. godinu ovako: granične vrijednosti, izražene u postocima, za mlijeko koje je sadržavalo zaostatke antibiotika i koje je bilo isporučeno mljekarama (u kantama ili cisternama) — kretale su se u pojedinim zemljama u ovim razmjerima: u SAD do 6,5%; u Danskoj do 3%; u Velikoj Britaniji do 16,6%; u Australiji do 15%; itd. U nas je npr. prema podacima što ih iznose CIGOJ et al. (1969) za Sloveniju utvrđeno 1965. god. 6,4% uzoraka mlijeka (od ukupno 748 ispitanih uzoraka) pozitivnih na penicilin. Ne raspoložem, na žalost, s podacima za ostale naše republike.

Zaostatke antibiotika u mlijeku prate već godinama u velikom broju zemalja u svijetu. Prema podacima Uprave za namirnice i lijekove u SAD (Food and Drug Administration) oko 10% stanovništva u SAD **osjetljivo je prema penicilinu**. Opisani su slučajevi u kojima su kod ljudi nakon uzimanja mlijeka u kojem je bilo zaostataka penicilina zapaženi ovi simptomi: koprivnjača (urticaria), ekcem i teške alergične reakcije.

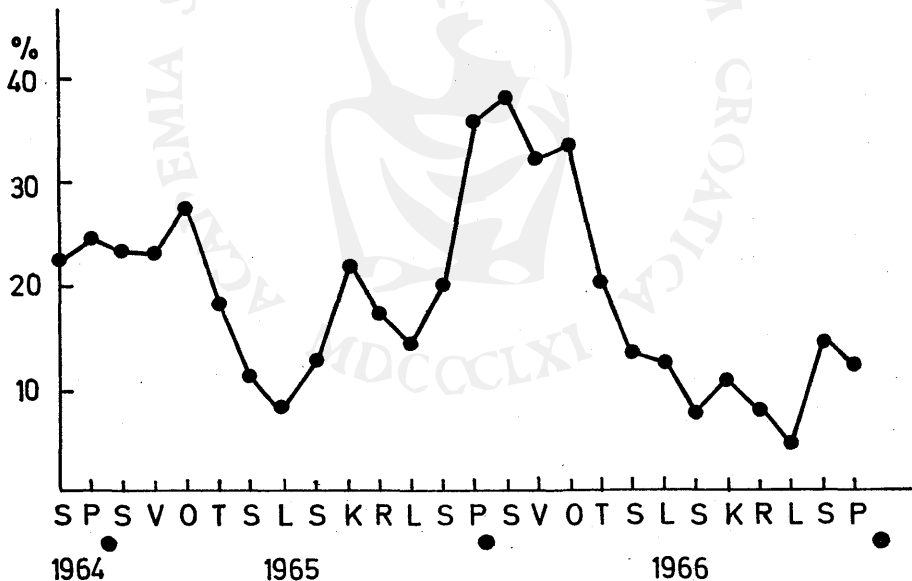
Budući da se toplinskom obradom mlijeka u mljekarama (ni pasterizacijom, ni postupkom ultra-visokog grijanja mlijeka do 140°C/4 sek) nimalo ne smanjuje prisutna količina penicilina u mlijeku — potrošači mlijeka i mlječnih proizvoda nalaze se u takvom položaju da taj **antibiotik unose u svoj organizam** redovnim uzimanjem toplinom obrađenog mlijeka i mlječnih prerađevina. Dodamo li k tome da su streptomycin i kloramfenikol još otporniji

\* Referat sa XIV. naučnog sastanka mikrobiologa i epidemiologa Jugoslavije, 5—10. 6. 1972., Pula.

prema toplini od penicilina, onda to znači da i ti antibiotici dospijevaju u ljudski organizam tako kontaminiranog mlijeka i mlječnih proizvoda.

To često unošenje antibiotika u ljudski organizam putem mlijeka i mlječnih proizvoda uzrokuje, nadalje, pojavu **rezistentnih sojeva bakterija prema tim antibioticima**, a među njima i patogenih bakterija, što sve kasnije doводи do **neefikasne primjene tih antibiotika u liječenju ljudi**.

Zaostaci antibiotika u mlijeku izazivaju i **znatne štete u mljekarskoj industriji** jer zaustavljaju rast bakterija ili pak uništavaju bakterije mlječno-kiselog vrenja koje su neophodne u proizvodnji maslaca, sira, jogurta i ostalih vrsta fermentiranog mlijeka. Zbog toga dolazi do neželjenih posljedica, kao što su: poremećaji u proizvodnji, pad kvalitete proizvoda, proizvodi s



Slika 1. — Sezonska kolebanja zaostataka penicilina u pasteuriziranom mlijeku. Postotak uzoraka pasteuriziranog mlijeka koji sadrže 0,01 i.j./ml ili više penicilina. (CHAMBERS & MURRAY, 1967)

manama i sl. Tako je npr. u proizvodnji jogurta dovoljno već 0,05—0,10 i. j. (internacionalnih jedinica penicilina) u 1 ml mlijeka, pa da to omete čitav postupak proizvodnje jogurta. Čak i vrlo male količine penicilina u siru (0,01—0,1 i. j. u 1 g) uzrokuju lošu aromu, slabu konzistenciju i nadimanje.

Zanimljivi su podaci, prikupljeni putem anketnog upitnika od 382 mljekare u Bavarskoj, koji su pokazali da su npr. 1960. godine u 24% anketiranih pogona ustanovljeni gubici u proizvodnji sira, jogurta i maslaca (proizvedenog iz kiselog vrhnja). Jedna velika sirana pretrpjela je u nekoliko dana štetu od 80.000 njem. maraka zbog mlijeka koje je sadržavalo antibiotike. Ne raspoložem, na žalost, podacima o sličnim ekonomskim gubicima u našim mljekarama. No, vrlo je vjerojatno da se ti gubici znatnije ne razlikuju od onih iz Bavarske.

Zaostaci antibiotika u mlijeku mogu, nadalje, dati **lažnu sliku kvalitete mlijeka** kada se ona određuje pokusom na reduktazu, bilo s metilenskim plavilom ili kojim drugim bojilom. Zaustavljanje rasta bakterija mlječno-kiselog vrenja koje su, naime, najčešće odgovorne za redukciju spomenutih bojila — dovodi do produženja vremena redukcije dodane otopine bojila, a time i do krivih rezultata o bakteriološkoj kvaliteti takvog mlijeka.

## **METODE ODREĐIVANJA ZAOSTATAKA ANTIBIOTIKA U MLIJEKU**

Jasno je da su zbog svih navedenih razloga metode za otkrivanje, odnosno određivanje zaostataka antibiotika u mlijeku zauzele ključni položaj u borbi protiv puštanja takvog mlijeka u promet i preradu. Te su metode mnogobrojne i vrlo raznovrsne, pa ih možemo razvrstati u dvije glavne skupine, i to:

- A) mikrobiološke analitičke metode; i
- B) označivanje antibiotika neškodljivim bojilima.

Uz gred bih spomenuo da kemijsko analitičke metode nemaju širu primjenu, i one se upotrebljavaju samo u svrhu određenih znanstvenih istraživanja.

### **A) Mikrobiološke analitičke metode**

Mikrobiološke analitičke metode zahtijevaju, međutim, određeno vrijeme do postizanja konačnog rezultata, a ono se kreće obično od 1 do 24 sata, pa zbog toga te metode ne omogućavaju pravovremeno odbacivanje mlijeka kontaminiranog antibioticima. S pomoću mikrobioloških metoda moguće je otkriti vrlo male količine antibiotika u mlijeku; u većini zemalja upravo se te metode najčešće upotrebljavaju za otkrivanje i određivanje antibiotika u mlijeku.

One se mogu razvrstati u 5 skupina:

1) **Metode koje se temelje na proizvodnji kiseline.** Tu se bakterije mlječno-kiselog vrenja (ponajčešće streptokoki) uzgajaju u uzorku mlijeka i uspoređuju s mlijekom provjerenim da ne sadrži antibiotike.

Proizvodnja kiseline u mlijeku po test-organizmu otkriva se: titracijom; mjerenjem vremena koagulacije; mjerenjem pH; ili upotrebom indikatora.

2) **Metode koje se temelje na redukciji oksidativno-reduktivnih bojila.** S pomoću tih metoda mjere se promjene u oksidativno-reduktivnom potencijalu u mlijeku što ih uzrokuje rast upotrijebljenog test-organizma — uz upotrebu bojila koja mijenjaju svoju boju prilikom redukcije.

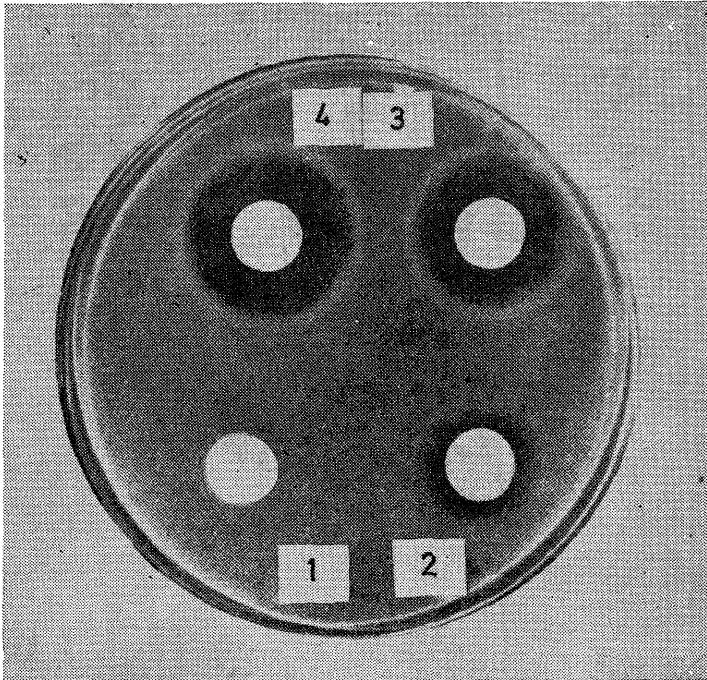
Prisutnost antibiotika otkriva se inhibicijom promjene boje. Najčešće se upotrebljavaju ova bojila: metilensko plavilo; resazurin; i trifeniltetrazolijev klorid (TTC).

U usporedbi sa acidometrijskim metodama, te su metode mnogo osjetljivije prema penicilinu, jer uvijek otkrivaju količine od 0,02 i. j./ml. Acidometrijske metode, međutim, osjetljivije su, međutim, prema streptomycinu (0,025  $\mu\text{g/ml}$ ), klortetraciklinu (0,06  $\mu\text{g/ml}$ ) i kloramfenikolu (0,03  $\mu\text{g/ml}$ ). Osjetljivost svake od ovih dviju metoda ovisi o upotrijebljenom test-organizmu.

3) **Metode koje se temelje na morfološkim promjenama bakterijskih stanica.** Bakterije mlječno-kiselog vrenja koje su osjetljive prema antibioticima

(obično *Streptococcus cremoris* ili *Str. thermophilus*) mijenjaju svoj izgled u prisutnosti stanovitih količina antibiotika. Mikroskopi-  
ranjem se zapažaju odebljale i izdužene stanice test-organizma u kulturi u  
ispitivanom uzorku mlijeka, i prema njima se otkrivaju količine od 0,05—0,005  
i. j./ml penicilina.

4) Metode koje se temelje na rastu bakterija na čvrstim podlogama. S  
pomoću ovih metoda moguće je mjerenjem zone inhibicije rasta bakterija na  
čvrstoj podlozi odrediti kvantitativno prisutni antibiotik u uzorku mlijeka.



Slika 2. — Određivanje penicilina s pomoću metode po Galesloot-  
-Hassing-u (kao test-organizam upotrijebljen je *Bacillus*  
*stearothermophilus* C 953). 1 = kontrolni uzorak mli-  
jeka bez antibiotika; 2 = mlijeko s antibiotikom (0,001 i.j./peni-  
cilina u 1 ml); 3 = mlijekom s antibiotikom (0,01 i.j. penicilina u  
1 ml); 4 = mlijeko s antibiotikom (0,1 i.j. penicilina u 1 ml).  
(PACIFICI et al., 1970)

Upotrebom odabranog osjetljivog test-organizma (kao što su *Bacillus sub-*  
*ttilis* ATCC 6633, *Sarcina lutea* ATCC 9341, *B. stearothermo-*  
*philus* ili *B. calidolactis*) pojedini antibiotici mogu se odrediti kvan-  
titativno. Pri tome se primjenjuju stakleni ili kovinski cilindri ili kolutići fil-  
tar-papira što se stavljaju na čvrstu podlogu prethodno nacijepljenu kulturom  
test-organizma. Mlijeka koje se ispituje difundira iz cilindrom opasanog dijela  
podloge ili s kolutića filter-papira u podlogu s agarom i pri tome izaziva in-  
hibiciju rasta test-organizma ako sadrži izvjesne količine antibiotika.

Postoji stanovit broj tih metoda, no, izgleda da se češće upotrebljava metoda po GALESLOOT-HASSING-u (1962), odnosno ta ista metoda modificirana po FEAGAN-u (1964). U svom radu iz 1970. god. PACIFICI et al., iz poznatog zavoda Istituto Superiore di Sanità u Rimu, preispitali su tu modificiranu metodu po Feaganu i utvrdili: da se smanjenjem u podlogu uvrštenog (uključenog) penicilina na 0,00374 i. j./ml postizava lakše i bolje očitavanje rezultata; da je ta metoda izrazito osjetljiva za penicilin (može se otkriti čak do 0,0001 i. j. penicilina/ml mlijeka); i da za ostale antibiotike kao streptomycin, kloranfenikol, bacitracin, eritromicin i neomicin, a pogotovu za tetraciklin, polimiksin, oleandomicin i tirotricin ta metoda ne pokazuje dovoljnu osjetljivost.

5) **Metode koje se temelje na rastu bakterija u tekućim podlogama.** Kod tih metoda rast bakterija prati se u bistrom mlječnom serumu pripremljenom iz uzorka mlijeka koje se ispituje. Rast bakterija određuje se u pravilnim vremenskim razmacima s pomoću turbidimetra.

Prije osam godina JAQUET i CHARTON (1964) izradili su tzv. **biofotometrijsku metodu**, a kao test-organizme upotrijebili su prema penicilinu osjetljiv soj *Staphylococcus aureus* Oxford i *B. stearothermophilus*. Za mjerenje zamućenosti bakterijske kulture upotrijebili su biofotometar po Bonet-Maury-ju.

Već spomenuti rimski autori PACIFICI et al. (1970) preispitali su i ovu turbidimetrijsku metodu. Princip je metode, da se usporedbom krivulje rasta test-organizma u serumu mlijeka što se ispituje s krivuljom rasta istog test-organizma u serumu mlijeka u kojem sigurno nema antibiotika — otkriva inhibitorna aktivnost eventualno prisutnih antibiotika, čak i u vrlo malim količinama. Kao test organizme upotrijebili su *S. aureus* FDA 209; *B. stearothermophilus* C 953; *B. subtilis* ATCC 9799; i *Escherichia coli* ISS 4. Ta se metoda pokazala izrazito osjetljivom. Uz upotrebu test-organizma *S. aureus* mogle su se otkriti ove količine antibiotika: 0,02—0,4  $\mu\text{g}$  eritromicina; 0,01—0,02  $\mu\text{g}$  tetraciklina; 0,1  $\mu\text{g}$  streptomicina; 0,05—0,1  $\mu\text{g}$  kloramfenikola i čak do 0,0004 i. j. penicilina/ml mlijeka.

Uz primjenu test-organizma *B. stearothermophilus* otkrili su ove količine: 0,001—0,005  $\mu\text{g}$  eritromicina; 0,003  $\mu\text{g}$  tetraciklina, 0,1—0,5  $\mu\text{g}$  streptomicina i 0,1—0,2  $\mu\text{g}$  kloramfenikola/ml, a penicilina čak do 0,00005 i. j./ml mlijeka. *B. stearothermophilus* se pokazao u odnosu na *S. aureus* mnogo osjetljiviji prema penicilinu, tetraciklinu i eritromicinu, a podjednako osjetljiv prema streptomicinu i kloramfenikolu.

Ispitivanja PACIFICI-ja i suradnika su pokazala da je metoda po GALESLOOT-HASSING-u i njena modifikacija po FEAGAN-u vrlo osjetljiva, i za praksu prikladna u otkrivanju penicilina, ali ne i u otkrivanju ostalih antibiotika. Turbidimetrijska metoda od JAQUET-CHARTON-a omogućuje otkrivanje vrlo malih količina raznovrsnih antibiotika, pa je najprikladnija za tu svrhu. No, tu metodu mogu primjenjivati samo dobro opremljeni laboratoriji čiji analitičari posjeduju izvjesno iskustvo u pripremi uzorka za analizu (koagulacija mlijeka sirilom, ili, još bolje čistim i aktivnim preparatima enzima za grušanje mlijeka).

## **B) Označivanje antibiotika neškodljivim bojilima**

Iz prethodnog izlaganja može se vidjeti da i najjednostavnije mikrobiološke metode zahtijevaju odgovarajuće iskustvo i vrijeme, a uz to su preskupe

i tegobne za svakodnevne analize mlijeka. I tamo gdje su one uvedene za rutinska otkrivanja antibiotika, učestalost ispitivanja kreće se obično od jednom tjedno do jednom mjesečno. Druga mana tih metoda je nemogućnost pravovremenog odbacivanja pozitivnih uzoraka mlijeka zbog vremena potrebnog za izvođenje analiza, pa se zbog toga ne može spriječiti kontaminacija ukupnog mlijeka zaostacima antibiotika.

To su razlozi zbog kojih se nastojalo pronaći drukčiji način otkrivanja antibiotika koji će omogućiti pravovremeno odbacivanje mlijeka kontaminiranog antibioticima i tako spriječiti unošenje takvog mlijeka u skupno mlijeko. Dodatak bojila antibioticima za intramamarnu primjenu preporuča se kao sredstvo za obojenje mlijeka u razdoblju izlučivanja zaostatka antibiotika u mlijeko od liječene životinje.

Obvezatno bojenje antibiotika za intramamarnu primjenu uvedeno je još 1. 9. 1962. god. u Australiji u državi Viktorija. Dok je prije uvođenja takvog označivanja antibiotika prikladnim bojilom 12% mlijeka od pojedinačnih proizvođača i 77% skupnog mlijeka iz cisterna sadržavalo zaostatke penicilina, taj se omjer nakon 4 godine, tj. u 1966. god. bitno popravio, pa je za pojedinačno mlijeko iznosio samo 2,1%, a za skupno 4,5%.

Kao bojila upotrebljavaju se danas samo dva trifenilmetanska bojila, dopuštena za bojenje namirnica, i to: plavo bojilo za namirnice br. 2 (NC/42090) i zeleno bojilo za namirnice br. 4 (NC/44090).

## RAZMATRANJA I ZAKLJUČCI

Usporedimo li mikrobiološke analitičke metode s postupkom označivanja antibiotika dopuštenim bojilima, vidjet ćemo da ovaj posljednji predstavlja vrlo jednostavan i uspješan način isključivanja mlijeka kontaminiranog antibioticima iz prometa ili prerade. Sâm proizvođač mlijeka može tim načinom otkriti prisutnost antibiotika u mlijeku iz svake pojedine četvrti vimena, a mljekara može otkriti svaku pojedinu kantu s kontaminiranim mlijekom. Primjenom iono-izmjenjivačkih smola u svrhu otkrivanja bojila u mlijeku mogu se otkriti vrlo male količine antibiotika čak do 0,001 i. j. penicilina/ml mlijeka. To je jeftin i dovoljno pouzdan način za otkrivanje zaostatka antibiotika u mlijeku, a uz to ne zahtijeva nikakovo radno iskustvo u usporedbi s mikrobiološkim metodama. Oba spomenuta bojila dopuštena su u mnogim zemljama u svijetu, pa čak i neotkriveni tragovi bojila koji mogu zaostati u mlijeku prilikom primjene bojilom označenog antibiotika za intramamarnu infuziju (obično 0,001—0,0001 mg/l) ne mogu predstavljati nikakvu opasnost po zdravlje.

Da bi se prikupili potpuniji podaci o raširenosti i opsegu pojave zaostatka antibiotika u mlijeku i mlječnim proizvodima u čitavoj SFRJ, a ne samo u SR Hrvatskoj, bit će potrebno provesti opsežnija i sustavnija ispitivanja. Iz dosadašnjih nepotpunih podataka može se naslutiti da stanje u tom pogledu nije ništa povoljnije od onog što je prvobitno vladalo i u ostalim razvijenim zemljama u svijetu. Tako je npr. prilikom prvog sustavnog ispitivanja zaostatka antibiotika u mlijeku u SAD, što je završeno u siječnju 1957. god. (WELCH, 1957), dokazana u 5,9% od ukupno 1.706 uzoraka mlijeka prikupljenih iz svih 48 saveznih federalnih država i Distrikta Kolumbije prisutnost penicilina u količinama od 0,003—0,550 i. j./ml, a najveća otkrivena količina penicilina iznosila je 550 i. j./1,14 litre mlijeka.

Da bi se problem zaostataka antibiotika u mlijeku s obzirom na zaštitu zdravlja potrošača i očuvanja mljekara od daljnjih šteta stavio pod odgovarajući nadzor — potrebno je poduzeti ove mjere:

1. osigurati uspješan nadzor provođenja postojećeg zakonskog propisa o zabrani stavljanja mlijeka u promet prije isteka roka od 5 dana po davanju posljednje doze antibiotika liječenoj životinji;

2. razmotriti prihvata zakonske obveze označavanja antibiotika za i/mm primjenu dopuštenim bojilima za namirnice;

3. zakonskim propisima o prometu lijekova onemogućiti kupnju antibiotika mimo veterinarskog recepta i izravno u ruke proizvođača mlijeka. Liječenje upala vimena antibioticima smije poduzeti samo veterinar i ono se može provoditi samo pod njegovim nadzorom;

4. uvesti jednu od najprikladnijih mikrobioloških metoda za otkrivanje zaostataka antibiotika kao preporučenu metodu za rutinska ispitivanja u većim mljekarama;

5. proizvođače mlijeka koji stavljaju u promet mlijeko kontaminirano antibioticima onemogućiti ekonomskim mjerama od strane mljekare.

Zajedničkim naporima veterinarske i zdravstvene službe uz aktivno sudjelovanje predstavnika naših mljekara moći ćemo i mi, poput ostalih zemalja u svijetu, barem smanjiti, ako ne potpuno isključiti količinu mlijeka kontaminiranog antibioticima u prometu sustavnom primjenom i provođenjem predloženih mjera.

#### Literatura

- Bach, I. (1970): Pojavljivanje i otkrivanje inhibitornih tvari u mlijeku. *Mljekarstvo* 20 (5) 106—115.
- Chambers, G. & Murray, J. G. (1967): Schemes for the control of antibiotics in milk — Northern Ireland. *J. Soc. Dairy Technol.* 20 (3) 138—141.
- Feagan, I. T. (1966): The detection of antibiotic residues in milk. *Dairy Sci. Abstr.* 28 (2) 53—60.
- Pacifici, L., Amato, F. & Dracos, A. (1970): Melodi di ricerca degli antibiotici nel latte. *Nuovi annali d'igiene e microbiologia* 21 (4) 362—380.

## PRILOG POZNAVANJU STANJA MIKROBIOLOŠKOG KVALITETA TOPLJENIH SIREVA\*

Stojanka MITIĆ, Ivanka OTENHAJMER i Milka BOROTA  
Institut za mlekarstvo Jugoslavije, Beograd

Poslednjih godina došlo je do naglog uspona proizvodnje i prometa topljenih sireva dejstvom tehnološko-tehničkih, ekonomskih i komercijalnih faktora.

Primenom tehničkih dostignuća i savremene tehnologije proizvode se kvalitetni topljeni sirevi u bakteriološkom pogledu, koji su po svojoj hranljivosti, sastavu, ukusu i mirisu bliski originalnim sirevima od kojih su dobijeni.

\* Referat sa XIII Naučnog sastanka mikrobiologa, Pula, 1971.