

doi:10.5219/140

DETECTION OF LASALOCID RESIDUES IN THE TISSUES OF BROILER CHICKENS BY A NEW SCREENING TEST TOTAL ANTIBIOTICS

Ivona Kožárová, Jana Šimková, Mária Mártonová, Ján Mačanga, Martin Levkut

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the microbial growth inhibition test Total antibiotics with the test organism *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* for the screening of lasalocid residues in the tissues of broiler chickens after its oral administration in medicated feed. The residues were investigated throughout the 5-day withdrawal period (WP) and also on day 6 representing the first day following the WP. All broiler chicken tissues were positive for lasalocid. The breast muscle was positive (the presence of residues at/above the detection limit /LOD/ of method) up to day 1 of the WP, the thigh muscle, gizzard, heart, skin and fat up to day 3 of the WP and the liver and kidneys up to day 4 of the WP. When evaluating the dubious results (the presence of residues just below the LOD of method), the breast muscle was suspect positive up to day 3 of the WP and the gizzard, skin and fat up to day 4 of the WP. No positive or dubious results were detected on day 5 of the WP. The LOD of *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* for maduramycin was 500 µg.l⁻¹.

Keywords: lasalocid, residues, tissues of broiler chickens, screening, total antibiotics

ÚVOD

Živé zvieratá a živočíšne produkty týchto zvierat sa vyšetrujú na prítomnosť rezíduí antibiotík a sulfónamidov v prvej fáze screeningu rezíduí použitím mikrobiálnych inhibičných testov. Cieľom týchto mikrobiologických metód je čo najskôr poskytnúť výsledok o prítomnosti alebo neprítomnosti látky vo vyšetrovaných maticiach na príslušnej úrovni (Kožárová et al., 2009a; Pikkemaat, 2009; Pikkemaat et al., 2009; Cháfer-Pericás et al., 2010; Gaudin et al., 2010).

Total antibiotics je nový mikrobiálny inhibičný test vyvinutý firmou Euroclone S.p.A. (Taliansko) na stanovenie rezíduí antibiotík v mäse a v mlieku potravinových zvierat. Vzhľadom na jeho jednoduchosť, širokospektrálnosť a krátky čas stanovenia je tento kvalitatívny screeningový test vhodný nielen na použitie v laboratóriách schválených na úradnú kontrolu prítomnosti rezíduí, ale aj v celom potravinovom reťazci.

Princípom testu Total antibiotics je inhibícia rastu testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* v agarovom médiu prítomnou farmakologicky účinnou látkou. Ak je vyšetovaná vzorka prostá rezíduí antibiotík, výsledkom testu je zmena farby agarového média (indikátora) z modrofialovej na žltú v dôsledku aktívneho metabolizmu testovacieho kmeňa, produkcie kyselín a poklesu hodnoty pH. Ak je vyšetovaná vzorka pozitívna na prítomnosť rezíduí antibiotík, rast testovacieho kmeňa je inhibovaný a farba agarového média (indikátora) zostáva modrofialová.

Total antibiotics je vyrábaný v dvoch formách, ako kit obsahujúci 96 testovacích skúmaviek (ampuliek, 96 analýz), a ako kit obsahujúci tri mikrotitračné platničky s ôsmymi jamkami usporiadanými v jednom rade (288 analýz). Každá súprava testu obsahuje extrakčný roztok určený na vyšetovanie vzoriek mäsa potravinových zvierat.

Firma Euroclone v súčasnosti ponúka na trh aj ďalší mikrobiálny inhibičný test, Kalidos TB (skúmavky) a MP (mikrotitračné platničky), ktorý bol od 1. 1. 2010 zaradený do zoznamu úradných metód laboratórnej diagnostiky

potravín a krmív ako metóda CH 12.21 (2009) určená na stanovenie rezíduí inhibičných látok v mlieku.

Bacillus stearothermophilus var. *calidolactis* je testovací kmeň mnohých mikrobiálnych inhibičných testov (Premi[®] Test, Delvotest[®] SP-NT, mikrobiologická metóda s *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953, screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov /STAR/, atď.), vykazujúci citlivosť na viaceré antibiotiká (beta-laktámy, cefalosporíny, makrolidy, aminoglykozidy, tetracyklíny, chinolóny, amfenikoly, polypeptidy) a sulfónamidy. Fenomén citlivosti testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* na široké spektrum látok s farmakologickou účinnosťou bol podnetom pre smerovanie našich experimentálnych štúdií zameraných na prehodnocovanie citlivosti testovacieho kmeňa aj na ďalšiu významnú skupinu látok antibiotickej povahy používanú v chovoch zvierat produkujúcich potraviny – kokcidiostatiká a potencionálny screening rezíduí týchto látok v živočíšnych produktoch hydiny (Kožárová et al., 2002; Kožárová et al., 2008; Kožárová et al., 2009b; Kožárová et al., 2010).

Lasalocid je polyéterové ionofórové kokcidiostatikum schválené nariadením Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 ako krmna doplnková látka určená na prevenciu kokcidiózy. Kokcidióza je jedno z ekonomicky najzávažnejších ochorení, ktoré postihuje predovšetkým kurčatá a mladú hydinu, u ktorých hynutie môže často presiahnuť až 80 % (Goldová et al., 2000; Goldová et al., 2001; Goldová, 2002). Ako kokcidiostatikum sa povoľuje nariadením Komisie (ES) č. 1455/2004 pre kurčatá a nariadením Komisie (EÚ) č. 874/2010 pre morky v dávke 75 – 125 mg účinnej látky na 1 kg krmiva s ochrannou lehotou minimálne 5 dní pred zabitím. Na ochranu verejného zdravia sa nariadením Komisie (EÚ) č. 37/2010 stanovuje pre lasalocid maximálny limit rezíduí (MRL) v cieľových tkanivách hydiny nasledovne: 20 µg.kg⁻¹ svalovina, 100 µg.kg⁻¹ koža a tuk, 100 µg.kg⁻¹ pečeň, 50 µg.kg⁻¹ obličky a 150 µg.kg⁻¹ vajcia.

Prezentovaná práca sa zaoberá stanovením rezíduí lasalocidu v tkanivách brojlerových kurčiat po jeho experimentálnom podávaní v krmive použitím nového screeningového testu Total antibiotics. K stanoveniu detekčnej citlivosti testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (detekčného limitu /LOD/ metódy) na lasalocid bol použitý štandard lasalocidu.

MATERIÁL A METÓDY

Experimentálne zvieratá

V experimente bolo použitých 80 brojlerových kurčiat (hybrid Ross 308, Animex Grupa Surowcowa Sp. z o.o., Bialystok, PL), ktoré boli náhodne rozdelené do experimentálnej a kontrolnej skupiny s počtom zvierat 40 ks v každej skupine. Zvieratá mali voľný prístup k vode a krmivu. Postup kŕmenia brojlerových kurčiat bol nasledovný: a) experimentálnej skupine zvierat bola od 1. do 18. dňa veku podávaná kŕmna zmes HYD 01 štartérová, od 19. do 35. dňa veku kŕmna zmes HYD 02 rastová, a od 36. do 42. dňa veku (ochranná lehota) kŕmna zmes HYD 03 finálna. Kŕmne zmesi boli zakúpené od spoločnosti TAJBA, a.s., α SK 100133 (Čaña, SK). Kokcidiostatiká boli do kŕmnych zmesí zapracované nasledovne: HYD 01 – Robenidín hydrochlorid (Cycostat 66 G /6,6 % premix/, Alparma BVBA, Belgicko) v dávke 33 mg účinnej látky.kg⁻¹ krmiva a HYD 02 – Lasalocid A sodný (Avatec 150 G /15 % premix/, Alparma BVBA, Belgicko/ v dávke 100 mg účinnej látky.kg⁻¹ krmiva; b) postup kŕmenia zvierat v kontrolnej skupine bol zhodný s postupom kŕmenia zvierat v experimentálnej skupine. Zvieratám však neboli podávané kokcidiostatiká z dôvodu získania negatívnych vzoriek. Počas stanovenej ochrannéj lehoty boli zvieratá v počte 2 ks/deň z každej skupiny postupne zabíjané a tkanivá (prsna svalovina, stehenná svalovina, žalúdok, pečeň, srdce, obličky, koža, tuk) boli oddelené a skladované pri teplote -20 °C do analýzy. Experiment bol schválený ŠVPS SR (č. r. 1859/09-221/3) a vykonávaný v schválenom pokusnom zariadení UVLF v Košiciach (Ústav patologickej anatómie /SK P 52004/).

Total antibiotics (postup skúšania a vyhodnotenie výsledkov)

Vzorky tkanív boli pred vyšetrením rozmrazené a najemno nakrájané skalpelom. K 2,5 g vzorky naváženej do skúmavky sa pridalo 10 ml pracovného extrakčného roztoku pripraveného zriedením koncentrovaného extrakčného roztoku so sterilnou destilovanou vodou v pomere 1:10 (v/v). Obsah skúmavky sa dôkladne premiešal a vzorka sa nechala stáť pri izbovej teplote približne 12 – 16 hodín (cez noc). Na stanovenie rezíduí bola použitá vrchná vrstva (čirý supernatant). 200 µl vzorky sa napipetovalo do skúmavky s agarovým médiom a skúmavka sa dôkladne uzatvorila pomocou plastového viečka, ktoré sa následne prepichlo ihlou. Skúmavky sa nechali inkubovať v termobloku pri teplote 65 ± 2 °C 3 hodiny. Po troch hodinách inkubácie sa hodnotila farba agarového média. Výsledky boli vyhodnotené nasledovne: pri negatívnej vzorke a kontrole dochádza k zmene farby agarového média z fialovej na žltú, pri pozitívnej vzorke farba agarového média ostáva nezmenená (fialová). Test sa považuje za ukončený pri zmene farby negatívnej

kontroly. Ako negatívna kontrola boli použité tkanivá zvierat z kontrolnej skupiny. Nástroje a pomôcky použité na vyšetrenie vzoriek boli sterilné.

Stanovenie LOD metódy pre lasalocid

Zásobný roztok lasalocidu s koncentráciou 500 µg.ml⁻¹ bol pripravený zriedením 5 mg štandardu lasalocidu (Sigma L1021, USA) v 10 ml metanolu p.a. čistoty (Merck, Nemecko). Pracovné roztoky lasalocidu boli pripravené ďalším riedením zásobného roztoku sterilnou destilovanou vodou na finálnu koncentráciu 10 µg.l⁻¹. Zásobný roztok a pracovné roztoky lasalocidu boli uchovávané v chladničke pri teplote +4 °C.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky stanovenia rezíduí lasalocidu v tkanivách brojlerových kurčiat po jeho experimentálnom podávaní v krmive použitím screeningového testu Total antibiotics sú prezentované v tabuľke 1. Vzorky tkanív boli vyšetrované na prítomnosť rezíduí lasalocidu nielen počas stanovenej 5-dňovej ochrannéj lehoty, ale aj v posledný deň podávania lasalocidu v krmive (0-tý deň) a v prvý deň po ukončení stanovenej 5-dňovej ochrannéj lehoty (6-ty deň).

Tabuľka 1 Pozitívne a negatívne výsledky stanovené pri vyšetrovaní tkanív brojlerových kurčiat použitím testu Total antibiotics po experimentálnom podávaní lasalocidu v krmive

Matrica	Deň ochrannéj lehoty							Kontrola
	0	1	2	3	4	5	6	
Stehno	+	+	±	+	-	-	-	-
Prsia	+	±	±	±	-	-	-	-
Žalúdok	+	+	±	+	±	-	-	-
Pečeň	+	+	±	+	+	-	-	-
Srdce	+	+	+	+	-	-	-	-
Obličky	+	+	±	+	+	-	-	-
Koža	+	+	±	+	±	-	-	-
Tuk	+	+	±	+	±	-	-	-

+

 pozitívny výsledok, ± dubiózny výsledok, - negatívny výsledok

Total antibiotics detegoval prítomnosť rezíduí lasalocidu vo všetkých vyšetrovaných matriciach brojlerových kurčiat. Fialové zafarbenie agarového média bolo výsledkom inhibície rastu testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* podávanou farmakologicky účinnou látkou. Všetky možné farebné odtiene od žltej po fialovú, pri ktorých nevieme jednoznačne rozhodnúť, či výsledok testu je pozitívny alebo negatívny, sú spôsobené obmedzením rastu testovacieho kmeňa prítomnosťou inhibičných faktorov vo vzorkách, akými sú antibiotiká, tesne pod LOD metódy. Tieto vzorky by mali byť jednoznačne považované za suspektné (dubiózne).

Prsna svalovina bola pozitívna (prítomnosť rezíduí lasalocidu na/nad LOD metódy) do 1. dňa ochrannéj lehoty, stehenná svalovina, žalúdok, srdce, koža a tuk do

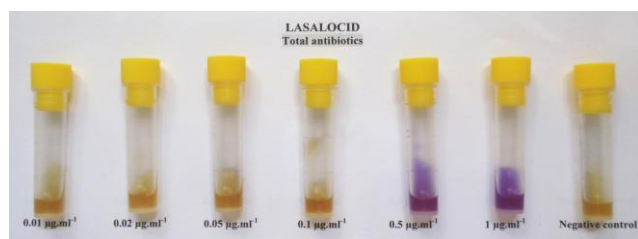
3. dňa ochrannej lehoty a pečeň a obličky do 4. dňa ochrannej lehoty. Pri hodnotení výsledku testu na základe dubióznych výsledkov (prítomnosť rezíduí lasalocidu tesne pod LOD metódy), môžeme považovať prsnú svalovinu za potencionálne pozitívnu do 3. dňa ochrannej lehoty a žalúdok, kožu a tuk až do 4. dňa ochrannej lehoty. Na piaty deň ochrannej lehoty neboli už detegované žiadne pozitívne ani dubiózne výsledky. Uvedené výsledky poukazujú na dostatočnosť 5-dňovej ochrannej lehoty stanovenej pre lasalocid, ktorá je potrebná na zabezpečenie, že tkanivá a živočíšne produkty zvierat neobsahujú reziduá v množstvách prekračujúcich MRL. Vzorky tkanív brojlerových kurčiat z kontrolnej skupiny boli negatívne na prítomnosť rezíduí lasalocidu.

LOD metódy je najmenšie množstvo analytu, ktoré inhibuje rast testovacieho kmeňa prezentovaný zachovaním farby agarového média. LOD metódy pre lasalocid bol stanovovaný použitím štandardu lasalocidu testovaného v reziduálnych koncentráciách 10 - 1000 µg.l⁻¹. Detekčná citlivosť testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* screeningového testu Total antibiotics na lasalocid je prezentovaná v tabuľke 2.

Tabuľka 2 LOD screeningového testu Total antibiotics pre lasalocid

Total Antibiotics	Koncentrácia (µg.l ⁻¹)				
	10	50	100	500	1000
	-	-	-	+	+

LOD metódy pre lasalocid bol detegovaný na úrovni 500 µg.l⁻¹ (obr. 1). Vzhľadom na MRL stanovený pre lasalocid v tkanivách a živočíšnych produktoch hydiny nariadením Komisie (EÚ) č. 37/2010 od 20 – 150 µg.kg⁻¹ môžeme konštatovať, že citlivosť testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* na lasalocid nie je na požadovanej úrovni. Inhibícia rastu testovacieho kmeňa však bola jednoznačne potvrdená. Dubiózne výsledky naznačujú možnú prítomnosť rezíduí lasalocidu v tkanivách brojlerových kurčiat aj v koncentráciách nižších ako je LOD metódy.



Obrázok 1 LOD screeningového testu Total antibiotics pre lasalocid

ZÁVER

Mikrobiálny inhibičný test je vhodný na stanovenie rezíduí antibiotík, ak deteguje reziduá príslušných látok v koncentráciách ich stanovených MRL. Total antibiotics vyvinutý firmou Euroclone S.p.A. (Taliansko) deklaruje citlivosť testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* na mnohé významné antibiotiká používané vo veterinárnej medicíne a jeho využitie pre screening rezíduí týchto látok v mäse a v mlieku

potravinových zvierat na požadovanej úrovni. Uvedený screeningový test bol použitý aj na stanovenie rezíduí lasalocidu v tkanivách brojlerových kurčiat po jeho experimentálnom podávaní v krmive. LOD metódy pre lasalocid (500 µg.l⁻¹) bol síce nad úrovňou MRL stanoveného pre lasalocid v tkanivách a živočíšnych produktoch hydiny (20 – 150 µg.kg⁻¹), ale pozitívne (dubiózne) výsledky detegované až do 4. dňa ochrannej lehoty potvrdzujú riziko prítomnosti rezíduí lasalocidu v tkanivách brojlerových kurčiat a možné ovplyvnenie zdravia obyvateľstva. Každý pozitívny výsledok však musí byť jednoznačne potvrdený príslušnou konfirmačnou metódou.

LITERATÚRA

CH 12.21. 2009. Stanovenie rezíduí inhibičných látok v mlieku metódou Kalidos TB, MP. In *Zoznam úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív*. Vestník Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky, vol. 41, 2009, no. 25, p. 6-10.

CHÁFER-PERICÁS C, MAQUIEIRA Á, PUCHADES R. 2010. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. In *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 29, 2010, no. 9, p. 1038-1049.

GAUDIN, V., HEDOU, C., RAULT, A., VERDON, E. 2010. Validation of a Five Plate Test, the STAR protocol, for the screening of antibiotic residues in muscle from different animal species according to European Decision 2002/657/EC. In *Food Additives and Contaminants A*, vol. 27, 2010, no. 7, p. 935-952.

GOLDOVÁ, M. 2002. Kokcidióza hydiny. In *Slovenský veterinársky časopis*, 2002, no. 6, p. 30-32.

GOLDOVÁ, M., PISTL, J., LETKOVÁ, V., CSIZSMÁROVÁ, G., REVAJOVÁ, V., LOÓSZOVÁ, A., LEVKUT, M. 2000. Cellular immunological responses of pheasant during endogenous development of *Eimeria colchici*. In *Parasitology International*, vol. 49, 2000, p. 47-154.

GOLDOVÁ, M., REVAJOVÁ, V., PISTL, J., LETKOVÁ, V., LEVKUT, M., WAGSHAL, E., CSIZSMÁROVÁ, G., LOÓSZOVÁ, A. 2001. *Eimeria colchici* and immunocompetent cells in specific and non-specific hosts. In *Acta Parasitologica*, vol. 46, 2001, no. 1, p. 39-44.

KOŽÁROVÁ, I., JANOŠOVÁ, J., MÁTÉ, D., TKÁČIKOVÁ, S. 2009a. Evaluation of different microbial inhibition tests for the detection of sulphamethazine residues in the edible tissues of rabbits. In *Food Additives and Contaminants A*, vol. 26, 2009, no. 7, p. 978-987.

KOŽÁROVÁ, I., MAČANGA, J., GOLDOVÁ, M., MAJOR, P., KORÉNEKOVÁ, B. 2009b. Komparatívna štúdia stanovenia prítomnosti rezíduí vybraných kokcidiostatík v tkanivách kurčiat a bažantov. In *Potravinárstvo*, vol. 3, 2009, no. 2, p. 40-44.

KOŽÁROVÁ, I., MAČANGA, J., ŠIMKOVÁ, J., MAĎAROVÁ, M., SÝKOROVÁ GOFFOVÁ, Z., LEVKUT, M. ml., MAJOR, P. 2010. Stanovenie prítomnosti rezíduí lasalocidu v tkanivách brojlerových kurčiat. In *Proceeding Book of X International Scientific Conference on Risk Factors of Food Chain*, 13 – 14 September, 2010, Nitra. Nitra : Slovak University of Agriculture, 2010, p. 196–201. ISBN 978-80-552-0436-9.

KOŽÁROVÁ, I., MÁTÉ, D., CABADAJ, R., RÓŽAŇSKA, H., HUSSEIN, K., LACIAKOVÁ, A. 2002. An evaluation of the microbiological diffusion methods as a tool for screening

monensin residues in the tissues of broiler chickens. In *Folia Veterinaria*, vol. 46, 2002, no. 1, p. 27-33.

KOŽÁROVÁ, I., SÝKOROVÁ GOFFOVÁ Z., MÁTÉ, D. 2008. Detection of maduramycin residues in the tissues of broiler chicken by using the Premi[®]Test and the STAR. In *Slovak Journal of Animal Science*, vol. 41, 2008, p. 206.

NARIADENIE (ES) č. 1831/2003 EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY z 22. septembra 2003 o doplnkových látkach určených na používanie vo výžive zvierat. In *Úradný vestník Európskej únie L 268*, 18. 10. 2003, p. 29-43.

NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 1455/2004 zo 16. augusta 2004 o povolení doplnkovej látky do krmív „Avatec 15 %“ patriacej do skupiny kokcidostatiká a iné liečivé látky na desať rokov. In *Úradný vestník Európskej únie L 269*, 17. 8. 2004, p. 14-16.

NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 37/2010 z 22. decembra 2009 o farmakologicky účinných látkach a ich klasifikácii, pokiaľ ide o maximálne limity rezíduí v potravinách živočíšneho pôvodu. In *Úradný vestník Európskej únie L 15*, 20. 1. 2010, p. 1-72.

NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 874/2010 z 5. októbra 2010 o povolení sodnej soli lasalocídu A ako kŕmnej doplnkovej látky pre morky vo veku do 16 týždňov, ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie (ES) č. 2430/1999. In *Úradný vestník Európskej únie L 263*, 6. 10. 2010, p. 1-3.

PIKKEMAAT, M. G., 2009: Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 395, 2009, no. 4, p. 893-905.

PIKKEMAAT, M. G., RAPALLINI, M. L. B. A., OOSTRA-VAN DIJK, S., ELFERINK A. J. W. 2009. Comparison of three microbial screening methods for

antibiotics using routine monitoring samples. In *Analytica Chimica Acta*, vol. 637, 2009, no. 1-2, p. 298-304.

Acknowledgements:

This study was supported by VEGA grant 1/0658/09.

Contact address:

doc. MVDr. Ivona Kožárová, PhD., Department of Food Hygiene and Technology, Institute of Food Hygiene and Technology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: kozarova@uvm.sk

MVDr. Jana Šimková, PhD., Department of Chemistry, Biochemistry and Biophysics, Institute of Biochemistry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: simkova@uvm.sk

MVDr. Mária Mártonová, PhD., Department of Chemistry, Biochemistry and Biophysics, Institute of Biochemistry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: martonova@uvm.sk

MVDr. Ján Mačanga, Department of Food Hygiene and Technology, Institute of Food Hygiene and Technology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: jan.macanga@gmail.com

MVDr. Martin Levkut, Department of Pathological Anatomy and Pathological Physiology, Institute of Pathological Physiology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: levkutm@uvm.sk