

**ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI MODIFIKOVANE  
MIKROBIOLOŠKE METODE STAR PROTOKOL ZA  
DETEKCIJU BETA-LAKTAMSKIH ANTIBIOTIKA  
U SIROVOM KRAVLJEM MLEKU\***  
*EVALUATION OF SENSITIVITY OF MODIFIED STAR PROTOCOL  
MICROBIOLOGICAL METHOD FOR BETA-LACTAME ANTIBIOTICS  
DETECTION IN RAW COW MILK*

**Branka Borović, Danka Spirić, B. Velebit, Vesna Đorđević,  
Brankica Lakićević, Tatjana Baltić, Aurelija Spirić\*\***

*Preko namirnica životinjskog porekla ostaci antibiotika iz tkiva životinja mogu dospeti u ljudski organizam, gde mogu izazvati alergijske reakcije ili omogućiti razvoj rezistentnih bakterijskih sojeva. Da bi se sa sigurnošću utvrdio sadržaj ostataka antibiotika u tkivima životinja, potrebno je koristiti odgovarajuće, pouzdane i dovoljno osetljive metode. Mikrobiološke metode za detekciju ostataka antibiotika u primarnim proizvodima životinjskog porekla zasnivaju se na osetljivosti specifičnih bakterijskih sojeva prema određenoj grupi antibiotika. Pravilnikom o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstanci, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstanci koje se mogu nalaziti u namirnicama ("Sl. list SRJ", br. 5/92, 11/92 – ispr. i 32/02), propisano je da se mleko i proizvodi od mleka, meso i proizvodi od mesa, jaja i proizvodi od jaja, slatkovodne ribe i med mogu stavljati u promet ako ne sadrže antibiotike u količinama koje se mogu dokazati referentnim metodama. Metoda predstavlja modifikovani STAR protokol (trijažni test za detekciju antibiotika), propisan od strane CRL (Community Reference Laboratory – Referentna laboratorija Zajednice) Fužet, Francuska, gde je i obavljena inicijalna validacija metode.*

*U skladu sa zahtevima Regulative Komisije EC br. 657/2002, ispitana je osetljivost modifikovane metode STAR protokol za beta-laktamsku grupu antibiotika, odnosno obavljena je skraćena validacija metode čija je inicijalna validacija obavljena u CRL. U seriji oglada korišćeno je 20 "blanko" uzoraka sirovog mleka krava, životinja koje*

\* Rad primljen za štampu 27. 04. 2012. godine

\*\* Branka Borović, Danka Spirić, Branko Velebit, Vesna Đorđević, Brankica Lakićević, Tatjana Baltić, Aurelija Spirić, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

*nisu bile tretirane antibioticima. Do početka eksperimenta uzorci su čuvani u zamrzivaču, na -20°C. Uzorci sirovog mleka obogaćeni su radnim rastvorima sedam antibiotika iz beta-laktamske grupe, tako da se dobiju koncentracije na nivou 0.5; 1 i 1.5 MRL (Maximum Residue Limit) za svaki antibiotik (Regulative Komisije EC br. 37/2010).*

*Za detekciju beta-laktamskih antibiotika korišćen je test agar po Kundratu sa inokulisanim sojem *G. stearothermophilus* ATCC 10149. Po 30 µl radnog rastvora, u visini koncentracija koje odgovaraju 0,5; 1 i 1,5 MRL za svaki antibiotik, naneto je na po dva papirna diska, koja su postavljena na površinu inokulisane hranljive podloge. Petri ploče sa Kundrat agarom, prethodno inokulisanim sa *G. stearothermophilus*, na koje su naneti uzorci, inkubirane su 12-15h na 55°C. Dobijena širina zone inhibicije rasta mikroorganizama, koja treba da iznosi najmanje 2,0 mm, mereno od ivice diska sa uzorkom, pokazala je da je moguća detekcija svih 7 ispitanih antibiotika iz beta-laktamske grupe, na nivou ispod MRL, čime je potvrđeno da je korišćenjem metode "Pet ploča" – STAR protokol moguće da se ispune zahtevi Regulative Komisije EC br. 37/2010.*

*Ključne reči: mleko, antibiotici, rezidue, mikrobiološke metode, STAR protokol*

## **Uvod / Introduction**

Upotreba antibiotika u stočarstvu je neophodna u uslovima intenzivnog farmskog gajenja, gde su jedinice gusto raspoređene po jedinici površine. Zbog male udaljenosti, često i neposrednog kontakta između životinja, zarazna oboljenja čiji su uzročnici mikroorganizmi, prenose se brzo, tako da se antibiotici često koriste, kako za lečenje obolelih, tako i za preventivu nastanka oboljenja kod zdravih životinja. Osim kao terapija obolelih jedinki (Čupić i sar., 2004) i kao profilaktička mera na farmama (Gaggia i sar., 2010) antibiotici se ilegalno koriste i za poboljšanje konverzije hrane kod životinja (Philips, 2007).

Dugotrajno izlaganje životinja malim koncentracijama antibiotika može da dovede do zadržavanja antibiotika u tkivima, mleku i jajima, a usled konzumiranja takve hrane kod ljudi može da se javi alergijska preosetljivost (Bogialli i sar., 2004). Antibiotici mogu da poremete prirodnu ravnotežu mikroflore gastrointestinalnog trakta, kako kod zdravih, tako i kod imunokompromitovanih osoba (Rashid i sar., 2011). Za bezbednost potrošača od velikog su značaja meticilin rezistentni sojevi *S. aureus* (MRSA), koji se prenose putem hrane, sa životinja na ljude (Fetsch i sar., 2011). Osim prema većini predstavnika beta-laktamske grupe antibiotika, MRSA sojevi su razvili rezistentnost i prema antibioticima iz drugih grupa (Bagcigil i sar., 2007) i na ovaj način postali su deo takozvane MDR (mikroorganizmi otporni na više grupa antibiotika) grupe, populacije bakterija koja

predstavlja veliku opasnost za ljudsko zdravlje (Alanis, 2005; Ašanin i sar., 2009; Velebit i sar. 2010).

Maksimalno dozvoljene količine (MRL) antibiotika u različitim matriksima propisane su u Regulativi Komisije EC br. 37/2010, dok se prema Pravilniku o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstanci, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstanci koje se mogu nalaziti u namirnicama ("Sl. list SRJ", br. 5/92, 11/92 - ispr. i 32/02), u promet mogu stavljati mleko i proizvodi od mleka ako ne sadrže antibiotike u količinama koje se mogu dokazati propisanim ili priznatim metodama. Za ispitivanje ostataka antibiotika u hrani zahteva se upotreba dovoljno osetljivih metoda za detekciju količina ispod, ili na nivou MRL. U toku laboratorijskih ispitivanja mogu da se koriste trijažne (*screening*) i konfirmativne metode. Metode za trijažu treba da budu brze, jednostavne i jeftine i da omoguće detekciju svih pozitivnih uzoraka, a da pri tome ne daju lažno negativne rezultate. Ovim metodama treba da se ustanovi samo da li količine ispitanih kontaminenata prelaze MRL vrednosti. Ukoliko *screening* metoda ukazuje na prisustvo nekog jedinjenja u količini većoj od propisane, sledeći korak je konfirmacija, odnosno potvrđivanje ili odbacivanje prethodnog nalaza, korišćenjem metoda kao što su LC-MS, GC-MS i dr. (Spirić i sar., 2006).

Mikrobiološke metode pripadaju trijažnim, kvalitativnim metodama, koje se zasnivaju na osetljivosti specifičnih bakterijskih sojeva prema određenoj grupi antibiotika. Ovaj rad deo je *in-house*, skraćene validacije STAR protokola za *screening* ostataka beta-laktamskih antibiotika u sirovom kravljem mleku. Ciljevi rada su dokazivanje specifičnosti metode i utvrđivanje sposobnosti detekcije pojedinih predstavnika beta-laktamskih antibiotika, na nivou MRL ili nižem, u velikom broju uzoraka sirovog mleka.

#### **Materijal i metode rada / *Material and methods***

Ukupno je korišćeno 20 "blanko" uzoraka, mleka krava koje nisu bile tretirane antibioticima. Do početka eksperimenta uzorci su čuvani u zamrzivaču, na -20°C.

Uzorci sirovog mleka ispitivani su u dva oglada u uslovima unutarlaboratorijske reproduktivnosti. Kao hranljiva podloga korišćen je test agar po Kundratu sa inokulisanim sojem *G. stearothermophilus* ATCC 10149 za detekciju beta-laktamskih antibiotika. Nakon brojanja spora, u podlogu je dodata bakterijska kultura, tako da je dobijena konačna koncentracija spora od  $5 \times 10^5$ /mL. Po 4,5 mL inokulisane podloge razliveno je u sterilne Petri ploče ( $d = 9$  cm). Osnovni rastvori antibiotika, koncentracije 1mg/mL i destilovana voda, korišćeni su za pravljenje radnih rastvora za obogaćenje uzoraka. Antibiotici i koncentracije radnih rastvora prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Beta- laktamski antibiotici korišćeni u postupku validacije modifikovanog STAR protokola

Table 1. Beta lactam antibiotics used in the validation of modified STAR protocol

Antibiotik / <i>Antibiotic</i>	Kataloški broj / <i>Catalogue No.</i> (Sigma Aldrich, Nemačka)	Koncentracija radnih rastvora / <i>Working solution concentration</i> (µg/L)		
		½ MRL	MRL*	1½ MRL
Amoksisilin / <i>Amoxicillin</i>	A 8523	2	4	6
Ampicilin / <i>Ampicillin</i>	A 9393	2	4	6
Oksacilin / <i>Oxacillin</i>	28221	15	30	45
Penicilin G / <i>Penicillin G</i>	13752	2	4	6
Kloksacilin / <i>Cloxacillin</i>	2755	15	30	45
Dikloksacilin / <i>Dicloxacillin</i>	D 9016	15	30	45

MRL\* – maksimalno dozvoljena količina antibiotika u mleku prema Regulativi Komisije (EU) br. 37/2010 / *Maximum Residue Limit of antibiotics in milk according to Commission Regulation (EU) No. 37/2010*

Po 30 µl radnog rastvora svakog antibiotika na nivou koncentracije 0,5; 1 i 1,5 MRL naneto je na po dva papirna diska koja su prethodno postavljena na površinu inokulisane hranljive podloge. Za svaki ispitani antibiotik, uzorci sirovog mleka su podeljeni u po šest alikvota, a zatim na još po tri zapremine za svaku ispitivanu koncentraciju antibiotika. Uzorci su obogaćeni radnim rastvorima beta-laktamskih antibiotika da bi se dobile koncentracije u visini 0.5; 1 i 1.5 MRL, i homogenizovani su. Po 30 µL svakog uzorka, za svaku ispitivanu koncentraciju, pipetirano je na po četiri papirna diska i postavljeno na ploču sa inokulisanim i različenim Kundrat agarom. Kontrolni uzorci mleka bez antibiotika pipetirani su u zapremini 30 µl, na po dva papirna diska postavljena na ploču sa Kundrat agarom. Zasejane ploče sa uzorcima inkubirane su 15-18h na temperaturi 55°C. Nakon inkubacije, širina zone inhibicije merena je od ivice papirnog diska, pomoću mikroskopa sa okularnim mikrometrom.

## Rezultati rada i diskusija / *Results and Discussion*

Prema STAR protokolu, uzorci mleka koji daju zonu inhibicije, merenu od ivice papirnog diska sa ukapanim uzorkom, širu od 2 mm, smatraju se pozitivnim, odnosno, smatra se da ispitivani uzorak sadrži ostatke antibiotika. U tabeli 2. prikazani su rezultati ispitivanja 20 uzoraka sirovog mleka, obogaćenih sa šest beta-laktamskih antibiotika. "Blanko" uzorci mleka nisu dali vidljivu zonu inhibicije, ni u jednom ogledu.

Tabela 2. Širina zone inhibicije (mm), za beta-laktamske antibiotike u uzorcima sirovog mleka (n=20) obogaćenih sa tri vrednosti koncentracije radnih rastvora

Table 2. The growth inhibition zone width (mm) for beta-lactam antibiotics in raw milk samples (n=20) enriched with three concentrations of working solution

Antibiotik / Antibiotic	I ogled / I Experiment $X_{Sr}$			II ogled / II Experiment $X_{Sr}$		
	½ MRL	MRL*	1½ MRL	½ MRL	MRL*	1½ MRL
Amoksisilin / Amoxicillin	1,0	2,4	3,0	1,5	2,2	3,1
Ampicilin / Ampicillin	1,1	2,2	2,4	1,3	2,3	2,4
Oksacilin / Oxacillin	1,0	3,2	2,6	1,8	3,1	3,3
Penicilin G / Penicillin G	1,2	2,8	2,9	1,3	2,4	3,2
Kloksacilin / Cloxacillin	1,0	2,5	3,6	1,8	2,0	2,6
Dikloksacilin / Dicloxacillin	1,3	2,1	3,6	1,3	2,9	2,5

$X_{Sr}$  – aritmetička sredina širine zone inhibicije / arithmetic mean of inhibition zone width

Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da je kod svih antibiotika pri vrednostima koncentracija na nivou MRL, zona inhibicije veća od 2 mm, odnosno da ovom metodom mogu da se detektuju količine beta-laktamskih antibiotika u visini MRL. S obzirom na to da je zona inhibicije veća od 2 mm, kod svih ispitanih uzoraka za sve predstavnike antibiotika, može se zaključiti da je modifikovana metoda STAR protokol specifična za beta-laktamsku grupu antibiotika. Da bi se utvrdila osetljivost metode, potrebno je odrediti sposobnost detekcije (CC $\beta$ ) u skladu sa Regulativom Komisije EC br. 657/2002. Ovaj parametar definisan je kao najmanja količina ispitivane supstance koja se može detektovati nekom metodom u uzorku sa verovatnoćom greške  $\beta$ , koja predstavlja verovatnoću da je uzorak pozitivan, iako je analizom dobijen negativan rezultat. Vrednost CC $\beta$  se dobija kada se najmanjoj vrednosti koncentracije antibiotika koji daju zonu inhibicije od 2 mm, doda vrednost standardne devijacije unutarlaboratorijske reproduktivnosti, pomnožene sa 1,64. "Blanko" uzorci mleka su obogaćeni sa po još jednom količinom antibiotika u visini između MRL i 0,5 MRL. Dobijene vrednosti zone inhibicije rasta i CC $\beta$  za ispitane antibiotike su prikazane u tabeli 3.

Mikrobiološke metode zasnovane na osetljivosti različitih sojeva *G. stearothermophilus*, koriste se za detekciju antibiotika iz beta-laktamske i iz drugih grupa antibiotika. Prilikom inicijalne validacije STAR protokola, gotovo polovina ispitivanih antibiotika je detektovana na pločama koje su inokulisane vrstom *G. stearothermophilus*. Najčešće se koristi *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, (BRTAiM<sup>®</sup>, Delvtotest<sup>®</sup>, CH<sup>®</sup>-ATK Microplate P&S). Neke mikrobiološke metode, kao što su Delvtotest<sup>®</sup> (Althaus i sar., 2002) i BRT-AiM<sup>®</sup> (Molina i sar., 2003b) primenljive su za detekciju rezidua beta-laktamskih antibiotika u namirnicama životinjskog porekla, ali one ne pokazuju dovoljno visoku osetljivost kada su u pitanju ostale grupe antibiotika (Montero i sar, 2005). U odnosu na modifikovanu metodu STAR protokol, Eclipse<sup>®</sup> test (Montero i sar, 2005)

je manje osetljiv za detekciju nekih od ispitivanih antibiotika, kao što su amoksicilin, penicilin G, kloksacilin i oksacilin, a limiti detekcije ovog testa za navedene antibiotike su redom ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ): 7, 5, 68 i 28.

Tabela 3. Sposobnost detekcije (CC $\beta$ ) za datu koncentraciju antibiotika (n=20)  
Table 3. The capability of detection (CC), for the given concentrations of antibiotics (n=20)

Antibiotik / Antibiotic	C ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	$X_{sr}$	SD*	CC $\beta$ ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )
Amoksicilin / Amoxicillin	3	2,1	0,12	3,20
Ampicilin / Ampicillin	3	2,0	0,11	3,18
Oksacilin / Oxacillin	20	2,1	0,15	20,25
Penicilin G / Penicillin G	3	2,2	0,09	3,15
Kloksacilin / Cloxacillin	3	2,0	0,14	20,23
Dikloksacilin / Dicloxacillin	20	2,0	0,22	20,36

$X_{sr}$  – aritmetička sredina širine zone inhibicije (mm) / arithmetic mean of inhibition zone width (mm)  
SD\* – standardna devijacija širine zone inhibicije pri ispitivanoj koncentraciji / standard deviation of the inhibition zone width at the examined concentration

STAR protokol pokazuje dobru osetljivost na različite grupe antibiotika. Literaturni podaci (Gaudin i sar. 2004) ukazuju na to da je moguće da se detektuje 21 od 66 ispitanih antibiotika iz različitih grupa na nivoima ispod nivoa MRL, a da pri tom i drugi statistički pokazatelji: preciznost, tačnost, ponovljivost i reproduktivnost ostanu u prihvatljivim opsezima. U našem eksperimentu dobijena je bolja osetljivost na amoksicilin, ampicilin, penicilin G, kloksacilin i dikloksacilin, u odnosu na druge autore koji su validovali STAR protokol (Gaudin i sar. 2004). Razvijeni su drugi mikrobiološki testovi (sedam ploča) i validovani za post-screening antibiotika u mleku. Osetljivost testa "sedam ploča" je zadovoljavajuća u odnosu na zahtevanu osetljivost prema MRL na beta-laktamske antibiotike u mleku. Povećana osetljivost je postignuta dodavanjem penicilinaze u po jednu test ploču koja je inokulisana *G. stearothermophilus* sojem (Aureli i sar. 1996).

Kada se porede podaci drugih autora (Petrović i sar., 2008) koji su vršili uporedno ispitivanje osetljivosti komercijalnih metoda za detekciju beta-laktamskih antibiotika u mleku, Delvotest<sup>®</sup> (DSM Food Specialties, Holandija) i Penzyme S test (UCB Bioproducts, Belgija) sa rezultatima dobijenim validacijom modifikovane metode STAR protokol, može se uočiti da i komercijalne metode daju zadovoljavajuću osetljivost za detekciju beta-laktamskih antibiotika u mleku, Međutim, ove metode zahtevaju dodatna ulaganja u opremu. Princip Penzyme S<sup>®</sup> testa je inaktivacija DD-karboksipeptidaze, antimikrobnim supstancama iz mleka, za razliku od modifikovane metode STAR protokol, i Delvotest<sup>®</sup> koji su zasnovani na osetljivosti *G. stearothermophilus*. Podaci drugih autora za osetljivost Delvotest<sup>®</sup> ukazuju na to da je različite predstavnike beta-laktamske grupe antibiotika moguće detektovati ispod, ili na nivou MRL (Sierra i sar., 2009). U Tabeli 4. dat je uporedni prikaz limita detekcije metode za predstavnike antibiotika, koji su

korišćeni u validaciji modifikovane metode STAR protokol, sa podacima o osetljivosti drugih metoda za detekciju beta-laktamskih antibiotika u mleku.

Tabela 4. Upporedni prikaz limita detekcije različitih metoda za ispitivanje beta-laktamskih antibiotika u sirovom kravljem mleku

Table 4. Comparative review of different methods' detection limits for beta-lactams in raw cow milk

Antibiotik / Antibiotic	CCB/ Limit detekcije za ispitivani antibiotik ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) / CCB/Detection limit for antibiotic tested ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			
	Modifikovani STAR protokol / Modified STAR protocol	Delvotest (Petrović i sar., 2008)	Penzim S Penzyme S test (Petrović i sar.)	Delvotest (Sierra i sar. 2009)
Amoksicilin / Amoxicillin	3,20	2,0	3,0	4,0
Ampicilin / Ampicillin	3,18	2,0	2,0	4,0
Oksacilin / Oxacillin	20,25	NT	NT	7,0
Penicilin G / Penicillin G	3,15	2,5	4,0	2,0
Kloksacilin / Cloxacillin	20,23	30,0	30,0	23,0
Dikloksacilin / Dicloxacillin	20,36	NT	NT	21,0

NT – nije testirano / not tested

### Zaključak / Conclusion

Modifikovana metoda STAR protokol dala je zadovoljavajuće rezultate, kada su u pitanju osetljivost, ponovljivost i reproduktivnost, za beta-laktamsku grupu antibiotika. Sposobnost detekcije, izražena preko CCB, manja je od MRL vrednosti za svaki ispitani antibiotik iz beta-laktamske grupe, što je još jedan pokazatelj primenljivosti ove metode za *screening* beta-laktamskih antibiotika u mleku. Modifikovana metoda STAR protokol, zasnovana je na principima klasične mikrobiologije, tako da je moguće ispitati velik broj uzoraka u samo jednom danu, u laboratorijskim uslovima koji su uobičajeni za druge klasične mikrobiološke metode. Modifikovana metoda STAR protokol je ekonomski isplativija u odnosu na komercijalne trijažne metode, a ima sličnu osetljivost. U slučaju pojave zone inhibicije, potrebno je da se izvrši konfirmacija, koja uključuje identifikaciju i kvantifikaciju beta-laktamskih antibiotika u uzorku nekom od konfirmativnih metoda. Zbog mogućnosti koje modifikovana metoda STAR protokol pruža, kao što su: mogućnost detekcije velikog broja beta-laktamskih antibiotika ispod nivoa MRL, dobra osetljivost, minimalna verovatnoća nalaza lažno negativnih rezultata, mogućnost ispitivanja velikog broja uzoraka u jednom danu, jednostavni uslovi izvođenja i ekonomska isplativost, ova metoda je dobar izbor kada je u pitanju monitoring rezidua antibiotika u sirovom mleku.

Kontinuirano praćenje prisustva ostataka antibiotika u mleku stvara mogućnost da se spreče gubici u industriji mleka, kao i da se obavežu primarni

proizvođači da poštuju period karence lekova kod muznih krava, a na taj način bi se potrošačima ponudili bezbedni i higijenski ispravni proizvodi.

**NAPOMENA / ACKNOWLEDGMENT:**

Predstavljani rezultati su proistekli iz rada na realizaciji Projekta III-46009, koji, u okviru Programa istraživanja u oblasti tehnološkog razvoja, finansira Ministarstvo Prosvete i Nauke Republike Srbije.

**Literatura / References**

1. Alanis Alfonso J. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post- Antibiotic Era? Review Article. Arch Med Res 2005; 36(6): 697-705.
2. Althaus RL, Molina P, Molina A, Torres A, Fernandez N. Detection limits of antimicrobial agents in ewe milk by Delvotest® test. Ilchwissenschaft 2002; 57: 660-4.
3. Aureli P, Ferrini AM, Manonni V. Presumptive identification of sulfonamide and antibiotic residues in milk by microbial inhibitor tests. Food Control 1996; 7, 165-8.
4. Ašanin R, Žutić M, Ašanin J, Mišić D, Žutić J, Jakić-Dimić D, Milić N, Nišavić J. Ispitivanje prisustva novih oblika rezistencije na neke antibiotike kod sojeva *E. coli* izolovanih od prasadi. Veterinarski glasnik 2009; 63(5-6): 311-20.
5. Bogialli S, Capitolino V, Curini R, Di Corcia A, Nazzari M, Sergi M. Simple and rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for determining amoxicillin and ampicillin in bovine tissues and milk, J Agricul Food Chem 2004; 52: 3286.
6. Bagcigil FA, Moodley A, Baptiste KE, Jensen VF, Guardabassi L. Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality of methicillin- and erythromycin-resistant staphylococci in the nasal cavity of domestic animals. Vet Microbiol 2007; 121: 307-15.
7. Commission Decision. Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C(2002) 3044) (Text with EEA relevance) (2002/657/EC) 2002.
8. Commission Regulation (EC) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin.
9. CRL Fougères, ECropean Union Reference Laboratory for Antimicrobial and Dye Residues in Food
10. Ćupić VN, Dobrić S, Trailović DR, Pejčić ZS. Savremeni pravci razvoja i upotrebe antimikrobnih lekova u veterinarskoj medicini. Veterinarski glasnik 2004; 58(5-6): 577-94.
11. Fetsch A, Kraushaar B, Krause G, Guerra-Román B, Alt K, Hammerl JA, Käsbohrer A, Braeunig J, Appel B, Tenhagen BA. Methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* from farm to fork impact on food safety. Tehnologija mesa 2011; 52(1): 60-5.
12. Gaudin V, Maris P, Fuselier R, Ribouchon JL, Cadieu N, Rault A. Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a five-plate test, for the screening of antibiotic residues in milk. Food Additives and Contaminants 2004; 21(5): 422-33.
13. Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. Review Article. Int J Food Microbiol 2010; 141(Supplement): S15-S28.



14. Molina MP, Althaus RL, Torres A, Peris C, Fernandez N. Evaluation of screening test for detection of antimicrobial residues in ewe milk. J Dairy Sci 2003b; 86: 1947-52.
15. Montero A, Althaus RL, Molina A, Berruga I, Molina MP. Detection of antimicrobial agents by a specific (Eclipse100®) for ewe milk. Small Ruminant Res 2005; 57(2-3): 229-37.
16. Petrović JM, Katić VR, Bugarski DD. Comparative Examination of the Analysis of  $\beta$ -Lactam Antibiotic Residues in Milk by Enzyme, Receptor-Enzyme, and Inhibition Procedures. Food Anal Methods 2008; 1: 119-25.
17. Phillips I. Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health International. J Antimicrob Agents 2007; 30(2): 101-7.
18. Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama ("Sl. list SRJ", br. 5/92, 11/92 - ispr. i 32/2002).
19. Rashid M, Weintraub A, Carl EN. Effect of new antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. Anaerobe (in Press). doi:10.1016/j.anaerobe.2011.11.005
20. Sierra D, Sánchez A, Contreras A, Luengo C, Corrales JC. Detection limits of four antimicrobial residue screening tests for [beta]-lactams in goat's milk. J Dairy Sci 2009; 92(8): 3585-91.
21. Spirić A, Radičević T, Đorđević V, Stefanović S. Analitičke metode u funkciji kontrole bezbednosti hrane. Tehnologija mesa 2005; 46(1-2): 80-6.
22. Velebit B, Lilić S, Borović B. Ispitivanje rezistentnosti bakterija *Salmonella* spp. izolovanih sa trupova goveda prema antimikrobnim supstancama. Tehnologija mesa 2010; 51(2): 154-8.

ENGLISH

**EVALUATION OF SENSITIVITY OF MODIFIED STAR PROTOCOL  
MICROBIOLOGICAL METHOD FOR BETA- LACTAME ANTIBIOTICS DETECTION  
IN RAW COW MILK**

**Branka Borovic, Danka Spiric, B. Velebit, Vesna Djordjevic, Brankica Lakicevic,  
Tatjana Baltic, Aurelija Spiric**

Antibiotic residues when present in animal tissues, through food chain, can enter human body, causing allergic reactions or facilitating the development of resistant bacterial strains. In order to determine the presence of antibiotics in animal tissues, it is appropriate to use convenient, reliable and sensitive methods. Microbiological methods applied for the detection of antibiotic residues in primary products of animal origin are based on the sensitivity of specific bacterial strains to a particular group of antibiotics. Regulations on the amount of pesticides, metals and metalloids and other toxic substances, chemotherapeutics, anabolics and other substances which can be found in food ("Off. Gazette", No. 5/92, 11/92 - corr. and 32/02), state that milk and milk products can be used in commercial purposes only if not contain antibiotics in quantities that can be detected by reference methods. The applied method is modified STAR (Screening test for detection of antibiotics) protocol, regulated by the CRL (Community Reference Laboratory) Fougères, France, in which the initial validation of the method had been carried out.

In accordance with the demands of Regulative Commission EC N°657/2002, the sensitivity of modified STAR protocol for beta lactam antibiotics group was examined, that is, there was carried out a contracted validation of the method, which initial validation had been performed at CRL.

In a couple of series of experiments, 20 blank samples of raw cow milk originating from animals not treated by antibiotics, had been examined. By the beginning of the experiment samples were stored in a freezer at -20°C. Samples of raw cow milk enriched by working solutions of seven beta-lactam antibiotics, in order to obtain concentrations at the level of 0.5, 1 and 1.5 MRL (Maximum Residue Limit) for each given antibiotic (Commission Regulation EC No. 37/2010).

For detection of beta-lactam antibiotics, there was used Kundrat agar test with previously inoculated *G.stearothermophilus* ATCC 10149 strain. Aliquots of 30 µl of working solution at 0.5, 1 and 1.5 MRL concentration level, for each antibiotic, were inflicted on two paper disks placed on inoculated Kundrat agar surface. Petri plates with Kundrat agar previously inoculated with *G.stearothermophilus*, on which the samples were deposited, were incubated for 12-15h at 55°C. The obtained width of microorganisms growth inhibition zone, that is supposed to be at least 2.0 mm, measured from the disc edge, demonstrated the capability to detect all the tested 7 antibiotics from the beta lactam group at a level below the MRLs. Consequently, this proves that use of this method it is possible to meet the demands of Regulative Commission EC N°. 37/2010.

Key words: milk, antibiotics, residue, microbiological methods, STAR protocol

## РУССКИЙ

### ИСПЫТАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННОГО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА STAR ПРОТОКОЛ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ В СЫРОМ МОЛОКЕ КОРОВ

Бранка Борович, Данка Спирич, Б. Велебит, Весна Джорджевич,  
Бранкица Лакичевич, Татьяна Балтич, Аурелия Спирич

Употребляя в пищу продукты животного происхождения, остатки антибиотиков в тканях животных могут попасть в организм человека и иногда вызывают аллергические реакции или способствуют развитию устойчивых бактериальных штаммов. Чтобы точно определить количество антибиотиков в тканях, необходимо использовать надежные и достаточно чувствительные методы. Микробиологические методы для обнаружения антибиотиков в продуктах животного происхождения, в первично переработанном виде, основываются на чувствительности отдельных групп бактерий к определенной группе антибиотиков. Правилами определяется количество пестицидов, металлов, металлоидов и других ядовитых веществ, химиотерапевтических средств, анаболических стероидов и других веществ, которые можно найти в продуктах питания ("SI. list SRJ", br. 5/92, 11/92 - ispr. i 32/02). Предписано, что молоко и молочные продукты, мясо и мясные продукты, яйца и яичные продукты, свежую рыбу и мед можно употреблять, если они содержат антибиотики в таких количествах, которые можно доказать эталонными методами. Метод представляет собой модифицированный STAR протокол (сортировочный тест для обнаружения антибиотиков), который предписан CRL-ом (Community Reference

Laboratory), Фужер, Франция, где выполняется проверка метода. В соответствии с требованиями регламента Комиссии N° 657/2002, мы испытывали чувствительность модифицированного протокола STAR для обнаружения антибиотиков бета-лактаманной группы, то есть сделали укороченную проверку метода, первоначальная валидация которого сделана CRL-ом. В серии экспериментов мы использовали 20 "холстых" образцов сырого молока коров, тех животных, которые не принимали антибиотики. До начала эксперимента образцы хранили в морозильной камере при -20°C. Образцы сырого молока обогащены рабочим раствором семи антибиотиков бета-лактаманной группы, чтобы получить концентрацию в 0,5, 1 и 1,5 ПДК (предельно допустимая концентрация) для каждого антибиотика (регламент Комиссии ЕС номер 37/20210). Чтобы обнаружить бета-лактаманые антибиотики мы использовали агар Кюндрат инокулированный штаммом *G. Stearothermophilus* ATTC 10149. По 30 µл рабочего раствора, концентрация которого соответствует 0,5, 1 и 1,5 MRL для каждого антибиотика, поставили на двух бумажных дисках, которые находятся на поверхности инокулированного штамма. Чашки Петри с агаром Кюндрат инокулированным *G. stearothermophilus*, на которые они поставили образцы, инкубировали в течение 12-15ч, при 55°C. В результате ширина зоны ингибирования роста, которая по меньшей мере должна быть 2 мм от края диска с образцом, показали, что обнаружение всех семи испытанных антибиотиков бета-лактаманых групп возможно когда их уровень ниже ПДК. Таким образом подтвердили, что использованием метода "Пять плит" – STAR протокол можно удовлетворить требования регламента Комиссии ЕС N° 37/2010.

Ключевые слова: молоко, антибиотики, резидуа, микробиологические методы, STAR протокол

