

REZUMAT

al tezei de doctorat intitulată

OPTIMIZAREA METODELOR DE EVALUARE RAPIDĂ A UNOR INHIBITORI DIN LAPTELE DE COLECTURĂ

elaborată de **Drd. Doctor medic veterinar Pop (Popa) Mihaela**

sub îndrumarea științifică a D-nei **Prof. univ. Dr. Maria Crivineanu**

Cuvinte cheie: lapte, inhibitori, substanțe antibacteriene, antibiotice, teste rapide, Delvotest SP NT 100, radioimunoanaliză, test ELISA.

Teza de doctorat este structurată în două părți principale distincte (*Studiu bibliografic* și *Cercetări proprii*), alături de cuprins, rezumat, introducere și bibliografie.

PARTEA I, STUDIU BIBLIOGRAFIC, cuprinde două capitole, respectiv:

CAPITOLUL I - LAPTELE, COMPONENT DE BAZĂ AL ALIMENTAȚIEI UMANE descrie aspectele esențiale ale importanței laptelui în dieta umană echilibrată, precum și principalele caracteristici ale laptelui, fiind structurat în următoarele subcapitole: *Alimentația și sănătatea, Importanța laptelui, Caracteristicile organoleptice ale laptelui* (Aspectul și consistența laptelui, Culoarea laptelui, Gustul laptelui, Mirosul laptelui), *Caracteristicile fizico-chimice ale laptelui, Compoziția chimică a laptelui* (Apa, Lipidele, Glucidele, Proteinele, Substanțele minerale, Vitaminele, Enzimele), *Parametrii de calitate pentru acceptarea laptelui crud în unitățile de tratare și/sau procesare, Managementul asigurării calității laptelui*.

CAPITOLUL II - SUBSTANȚELE INHIBITOARE DIN LAPTE prezintă aspecte legate de principalele substanțe inhibitoare care pot fi prezente în lapte, precum și aspectele negative ale reziduurilor substanțelor antibacteriene din lapte asupra sănătății omului și prelucrării industriale a laptelui, fiind structurat în următoarele subcapitole: *Considerații generale privind prezența substanțelor inhibitoare în lapte, Clasificarea substanțelor antibacteriene, Spectrul de acțiune, Mecanismele de acțiune, Farmacocinetică, Siguranța alimentelor și xenobioticele chimice, Consecințele prezenței substanțelor inhibitoare în lapte*

asupra consumatorului (Efectele negative ale reziduurilor de antibiotice asupra omului, Implicații de ordin tehnologic, Limite maxime admise ale reziduurilor de antibiotice în lapte).

PARTEA A II-A, CERCETĂRI PROPRII, cuprinde trei capitole, respectiv *Materiale și metode de lucru, Rezultate și discuții, Concluzii și recomandări*.

Cele trei scopuri principale ale acestei teze de doctorat au fost reprezentate de:

- monitorizarea prezenței sau absenței reziduurilor unor substanțe antibacteriene (în principal antibiotice) în laptele crud prin teste rapide bazate pe metode microbiologice (teste calitative microbiene);
- identificarea grupelor de antibiotice și respectiv sulfamide ale căror reziduuri au fost identificate în probele pozitive, utilizând radioimunoanaliza (testul semicantitativ Charm II bazat pe receptori microbieni);
- cuantificarea reziduurilor de substanțe antibacteriene (prin metoda imunoenzimatică ELISA) și compararea valorilor obținute cu limitele maxime admise de legislația națională și europeană în vigoare.

CAPITOLUL III - MATERIALE ȘI METODE DE LUCRU

Pentru desfășurarea studiilor, au fost recoltate probe de lapte crud din cinci centre de colectare și două ferme de bovine situate în jurul orașului București (județul Ilfov), care furnizează în mod constant lapte crud pentru consum oamenilor din București, dar și lapte materie primă către unități de procesare. Probele destinate determinării reziduurilor de substanțe inhibitoare din lapte au fost prelevate respectând anumite reguli de recoltare, etichetare, ambalare, transport și timp de intrare a probelor în lucru.

Cercetările au fost efectuate în cadrul unui interval de 6 ani, între 2008 și 2013, pe un număr de 2214 probe de lapte crud recoltat din cinci centre de colectare și două ferme situate în jurul orașului București, după cum urmează: 421 probe în anul 2008, 378 probe în anul 2009, 397 probe în anul 2010, 227 probe în anul 2011, 404 probe în anul 2012 și 387 probe în anul 2013.

În scopul determinării reziduurilor de substanțe inhibitoare din probele de lapte crud s-a apelat la o succesiune de etape de lucru, respectiv:

1. Testul calitativ microbian

S-a utilizat pentru screeningul (monitorizarea) substanțelor inhibitoare prezente în laptele crud. Fiind un test calitativ, acesta nu dă informații precise asupra substanței inhibitoare în cauză și nici asupra cantității în care ea se găsește în probă, însă prezintă avantaje majore: depistează probele pozitive, le poate elimina pe cele negative, este relativ

ieftin, nu necesită aparatură costisitoare, se poate aplica atât în condiții de teren, cât și de laborator, iar rezultatele sunt furnizate în aproximativ 3 ore. Acest test a permis identificarea prezenței celor mai multe dintre substanțele antibacteriene utilizate în terapia veterinară și cu risc sporit de contaminare a laptelui.

Testul utilizat în acest studiu (Delvotest SP NT 100) a permis identificarea prezenței în probele de lapte crud analizate a următoarelor substanțe antibacteriene: penicilină G, cloxacilină, dicloxacilină, oxacilină, nafcilină, ampicilină, amoxicilină, cefapirină, cefalonium, cefalexină, cefacetril, cefoperazonă, ceftiofur, tetraciclină, oxitetraciclină, clortetraciclină, tilozină, eritromicină, lincomicină, spiramicină, gentamicină, neomicină, dihidrostreptomycină, kanamicină, cloramfenicol, sulfametazină, sulfadimetoxină, sulfatiazol, sulfadiazină, dapsonă, trimetoprim, fiind considerat la ora actuală cel mai performant test de acest tip.

2. Testul semicantitativ Charm II bazat pe receptori microbieni

Acest test a fost utilizat în cazul probelor care au reacționat pozitiv la testul calitativ microbian și se bazează pe legarea ireversibilă a grupărilor funcționale ale substanțelor antibacteriene din probă de situsurile receptoare ale bacteriilor testate. Testul implică și utilizarea de substanțe antibacteriene marcate radioactiv cu ^{14}C sau ^3H care competiționează cu inhibitorii din probă.

3. Testul cantitativ imunoenzimatic

Testul ELISA a fost utilizat ca o metodă cantitativă de determinare a reziduurilor de substanțe antibacteriene din lapte. Metoda imunoenzimatică competitivă se bazează pe reacția antigen-anticorp, iar rezultatele obținute pot fi cuantificate în scopul aprecierii cantitative a reziduurilor de substanțe inhibitoare din probele de lapte analizate. În cadrul cercetărilor efectuate, au fost utilizate kituri pentru determinarea substanțelor antibacteriene furnizate de firmele R-Biopharm (Germania) și Bioo Scientific (S.U.A.).

CAPITOLUL IV - REZULTATE ȘI DISCUȚII

Utilizând **testul calitativ microbian Delvotest SP NT 100**, în intervalul 2008-2013 au fost analizate 2214 probe de lapte crud recoltate din cinci centre de colectare și două ferme situate în jurul orașului București (județul Ilfov). Dintre cele 2214 probe analizate, 2032 probe (91,78%) au furnizat rezultate negative, 94 probe (4,25%) au furnizat rezultate dubioase, în timp ce 88 probe (3,97%) au furnizat rezultate pozitive.

În scopul depistării eventualelor reacții fals-pozitive și pentru a clarifica situația probelor dubioase, probele care au furnizat rezultate pozitive și dubioase în urma aplicării

inițiale a testului Delvotest SP NT 100 au fost reanalizate după tratarea termică timp de 10 minute la 82°C. În urma retestării probelor care inițial prezentaseră reacție pozitivă și dubioasă, după tratamentul termic, a fost stabilit un număr de 84 probe (3,79% din total) care la prima testare au prezentat reacție-fals pozitivă, acestea fiind considerate în final probe negative.

Astfel, în urma utilizării testul calitativ microbian Delvotest SP NT 100, din cele 2214 probe de lapte crud analizate, 2116 probe (95,57% din total probe analizate) au prezentat rezultat negativ, în timp ce 98 probe (4,43% din total probe analizate) au fost detectate ca fiind pozitive, respectiv au conținut reziduuri de substanțe antibacteriene în concentrație mai mare decât limita de detecție a metodei.

În ceea ce privește corelarea probelor pozitive cu sezonul, din analiza datelor obținute a reieșit faptul că, pe parcursul intervalului luat în studiu, cel mai mare număr de probe pozitive a fost înregistrat în lunile de primăvară (perioada martie-mai). În urma prelucrării statistice a rezultatelor obținute, s-a observat o descreștere treptată a numărului de probe pozitive pentru reziduurile de substanțe antibacteriene către începutul verii și pe parcursul acesteia, precum și o nouă creștere la începutul toamnei, însă nu la nivelurile înregistrate în lunile de primăvară. Comparativ cu luna octombrie, dinamica probelor pozitive a manifestat o linie descendentă pe parcursul iernii, în acest anotimp contaminarea cu reziduuri de substanțe antibacteriene situându-se la cel mai mic nivel per ansamblul întregului an.

Determinarea semicantitativă a reziduurilor de substanțe antibacteriene din probele de lapte crud a fost realizată **prin metoda de radioimunoanaliză Charm II**, scopul fiind acela de a identifica grupele de substanțe antibacteriene în care se încadrează reziduurile prezente în probele determinate ca fiind pozitive în urma aplicării testului calitativ microbian.

Metoda utilizată a permis încadrarea substanțelor antibacteriene prezente ca reziduuri în probele de lapte crud analizate în 7 grupe distincte: aminoglicozide tip I, aminoglicozide tip II, amfenicoli, betalactamine, macrolide/lincosamide, tetraciclone, sulfamide.

În urma efectuării analizelor, din cele 98 probe analizate, 69 probe (70,41%) au fost contaminate cu o singură clasă de substanțe antibacteriene, iar 29 probe (29,59%) au conținut reziduuri de substanțe antibacteriene încadrate în două grupe diferite.

În ansamblul perioadei luate în studiu, în probele pozitive contaminate cu o singură grupă de substanțe antibacteriene, antibioticele betalactamice au fost identificate în 38 probe (55,07%), tetraciclonele în 11 probe (15,94%), aminoglicozidele tip I (neomicină, gentamicină) în 5 probe (7,25%), aminoglicozidele tip II (streptomycină, dihidrostreptomycină, gentamicină) în 7 probe (10,14%), macrolidele/lincosamidele în 5 probe (7,25%), iar

sulfamidele în 3 probe (4,35%). Antibioticele din grupa amfenicolilor nu au fost identificate în nicio probă analizată.

În privința probelor în care s-au identificat reziduuri de substanțe antibacteriene aparținând a două grupe diferite, s-a remarcat frecvența foarte mare a asocierii betalactaminelor cu aminoglicozidele, știut fiind faptul că aceste două grupe de antibiotice își completează foarte bine spectrul de activitate; din totalul asocierilor determinate în cadrul experimentelor, această combinație a fost identificată în 20 din cele 29 probe analizate. De asemenea, au fost identificate și probe în care s-au determinat asocieri între diverse aminoglicozide, precum și asocieri între aminoglicozide și tetracicline, acest lucru fiind în strânsă legătură cu utilizarea acestor antibiotice în tratamentul mamitelor la vacile de lapte.

Conform rezultatelor globale, au fost identificate 60 probe de lapte conținând reziduuri de antibiotice din grupa betalactaminelor (47,24%), 40 de probe de lapte conținând reziduuri de aminoglicozide (31,50%), 15 probe de lapte conținând reziduuri de tetracicline (11,81%), 9 probe de lapte conținând reziduuri de macrolide / licosamide (7,09%) și 3 probe de lapte conținând reziduuri de sulfamide (2,36%). Nu au fost identificate probe de lapte care să conțină reziduuri de antibiotice din grupa amfenicolilor.

În ansamblu, în perioada 2008-2013, **prin tehnica ELISA** s-au determinat cantitativ reziduuri de substanțe antibacteriene în 127 probe de lapte crud. Dintre aceste 127 probe, 60 probe au fost pozitive pentru reziduuri de *betalactamine*; cea mai mică valoare a reziduurilor a fost de 6 µg/kg, iar cea mai mare valoare a fost de 74 µg/kg, cu o medie de 26,13 µg/kg.

Deși kitul ELISA utilizat în acest studiu nu a permis determinarea fiecărui reprezentant al clasei betalactaminelor, ci doar a grupei în ansamblu, nivelurile determinate pot fi considerate mari, ținând cont de faptul că limitele maxime admise în lapte pentru penicilină G, ampicilină și amoxicilină sunt de 4 µg/kg, în condițiile în care aceste antibiotice sunt recunoscute ca fiind cele mai utilizate betalactamine în terapeutică.

În privința reziduurilor de *aminoglicozide*, în cadrul perioadei luate în studiu s-au analizat 40 probe pozitive. Este de remarcat faptul că metoda utilizată a permis identificarea exactă a antibioticului aminoglicozidic; astfel, în probele analizate au fost identificate antibioticele gentamicină, streptomycină / dihidrostreptomycină și neomicină.

Reziduurile de gentamicină au fost determinate în 7 probe de lapte; cea mai mică valoare a reziduurilor a fost de 179 µg/kg, iar cea mai mare valoare a fost de 287 µg/kg, cu o medie de 221,14 µg/kg. Toate cele 7 probe au prezentat reziduuri peste limita maximă admisă (100 µg/kg).

Reziduurile de neomicină au fost determinate în 12 probe de lapte; cea mai mică

valoare a reziduurilor a fost de 309 µg/kg, iar cea mai mare valoare a fost de 2.280 µg/kg, cu o medie de 849,83 µg/kg. Este de remarcat faptul că doar două probe au prezentat valori ale reziduurilor de neomicină mai mari decât limita maximă admisă (1.500 µg/kg).

În ansamblu, în perioada 2008-2013 s-au înregistrat 21 probe pozitive pentru reziduuri de streptomicină / dihidrostreptomicină; cea mai mică valoare a reziduurilor a fost de 302 µg/kg, iar cea mai mare valoare a fost de 673 µg/kg, cu o medie de 409,95 µg/kg. Toate cele 21 probe au prezentat reziduuri peste limita maximă admisă (200 µg/kg). Nici în cazul reziduurilor de streptomicină / dihidrostreptomicină nu s-a putut observa o tendință clară de evoluție în sens descrescător a concentrațiilor determinate în decursul celor șase ani de studiu.

Pe parcursul celor 6 ani de studiu s-au înregistrat 15 probe pozitive pentru reziduuri de *tetraciline*; cea mai mică valoare a reziduurilor a fost de 113 µg/kg, iar cea mai mare valoare a fost de 443 µg/kg, cu o medie de 224,27 µg/kg. Toate cele 15 probe au prezentat reziduuri peste limita maximă admisă (100 µg/kg).

Din cele 127 probe pozitive pentru reziduuri de substanțe antibacteriene, *macrolidele* au fost identificate și cuantificate în 9 probe de lapte crud.

Reziduurile de tilozină au fost determinate în 6 probe de lapte; cea mai mică valoare a reziduurilor a fost de 62 µg/kg, iar cea mai mare valoare a fost de 113 µg/kg, cu o medie de 88,17 µg/kg. Toate cele 6 probe au prezentat reziduuri peste limita maximă admisă (50 µg/kg).

Reziduurile de eritromicină au fost determinate în 3 probe de lapte; cea mai mică valoare a reziduurilor a fost de 59 µg/kg, iar cea mai mare valoare a fost de 97 µg/kg, cu o medie de 78 µg/kg. Toate cele 3 probe au prezentat reziduuri peste limita maximă admisă (40 µg/kg).

Reziduurile de *sulfamide* au fost determinate în 3 probe de lapte; cea mai mică valoare a reziduurilor a fost de 75 µg/kg, iar cea mai mare valoare a fost de 180 µg/kg, cu o medie de 125,33 µg/kg. Din cele trei probe pozitive, doar două probe au prezentat reziduuri peste limita maximă admisă (100 µg/kg).

CAPITOLUL V. CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI prezintă un număr de 17 concluzii și recomandări desprinse din rezultatele obținute.