

ДЕЛЬВОТЕСТ - стандартные диффузионные тесты для определения остаточных количеств антибиотиков и сульфамидных веществ в молоке

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственное лечение молочного скота от различных заболеваний вызывает появление остаточных количеств медицинских препаратов в молоке в течение определенного периода времени, что крайне нежелательно как с точки зрения здравоохранения, так и по технологическим причинам, специфическим для молочной промышленности. Таким образом, имеется объективная необходимость в простой и надежной системе оценки молока как для молочной индустрии, так и для производителей молока, которые должны стремиться исключить попадание остатков лечебных препаратов в молоко. Исходя из этого, Компания «DSM Food Specialties» разработала стандартный тест для определения остаточных количеств антибиотиков и сульфамидных веществ название "ДЕЛЬВОТЕСТ" молоке, получивший патентованное отличающийся исключительными преимуществами. "Дельвотест" вошел в российский ГОСТ Р 51600-2000 "Молоко. Методы определения антибиотиков".

ВИДЫ ТЕСТОВ

- "ДЕЛЬВОТЕСТ П" и "ДЕЛЬВОТЕСТ П МИНИ" ампульные тесты для ограниченного количества проб.
- "ДЕЛЬВОТЕСТ П 5 ПАК" (на 6x16 чашек) тесты на чашках для анализа большого количества проб (одновременно не менее 15).

Каждый из вышеуказанных видов тестов имеет модификацию для высокочувствительного определения сульфамидных веществ. Эти модификации обозначаются буквами "СП" (вместо "П").

ОСНОВНЫЕ ПРЕИМУЩЕСТВА

- 1. Надежность и точность.
- 2. Очень высокая чувствительность к пенициллиновым веществам.
- 3. Достаточно высокая чувствительность к большинству других антибактериальных веществ.
- 4. Простота выполнения анализов и легкость определения их результатов.
- 5. Длительный срок хранения.

<u>ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ АМПУЛЬНЫХ ТЕСТОВ</u>

Для инкубационной выдержки ампул (поддержания постоянной температуры) разработан оригинальный сухой нагреватель, работающий от сети переменного тока напряжением 220 В (имеются модификации сухого нагревателя с питанием 12 В постоянного тока), имеющий ряд серьезных эксплуатационных преимуществ перед стандартными водяными банями. Контроль температуры в полости нагрева ампул осуществляется электрическим термометром с дисплеем на жидких кристаллах. Контроль времени осуществляется электронным таймером с аналогичным дисплеем. Комплект для ампульного теста включает в себя также шприц и достаточное количество одноразовых пипеток для отбора проб объемом 0,1 мл.



УСЛОВИЯХ РАНЕНИЯ

Ампулы и закрытые бутылочки с таблетированными питательными средами должны храниться при температуре от 6 до 15 °C. Хранение при температуре ниже 5 °C может привести к разжижению агаровой среды. После вскрытия герметично укупоренных бутылочек с питательными таблетками их следует хранить в охлажденных условиях, однако перед использованием они должны выдерживаться при комнатной температуре для предотвращения конденсации влаги на таблетках.

<u>МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ ИЗМЕРЕНИЯХ</u>

В связи с тем, что "ДЕЛЬВОТЕСТ" чрезвычайно чувствителен к антибактериальным веществам, необходимо исключить вероятность загрязнения проб и тестов такими препаратами, как антибиотики, дезинфицирующие и моющие средства и т.д. через руки оператора или используемые материалы. Для этого необходимо обеспечить выполнение следующих условий:

- работа должна производиться на чистом столе или на чистой бумажной салфетке;
- оператор должен тщательно мыть руки;
- исключить вероятность касания концов одноразовых пипеток;
- пинцеты для питательных таблеток должны быть абсолютно чистыми;
- раскрошившиеся таблетки и их кусочки удаляются, при этом в комплектах всегда имеется небольшой их резерв.

СОСТАВ КОМПЛЕКТА ПРЕПАРАТОВ

В состав комплекта входят:

- 4 блока ампул (для модификации МИНИ 1 блок) по 25 штук каждый, содержащих твердую фиолетовую агаровую среду, включающую стандартизованное количество спор Bacilus Stearotermophilus var. Calidolactis C953;
- бутылочка со 110 питательными таблетками (для МИНИ-около 30);
- шприц-дозатор для отбора проб молока;
- 100 штук одноразовых пипеток (для МИНИ 25) для отбора проб молока;
- пинцет.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

- 1. Включить сухой нагреватель для нагрева до заданной температуры 64 +/-0,5 "С.
- 2. Если бутылка с питательными таблетками хранилась в холодильнике, то перед откупориванием ее необходимо выдержать в течение 20 мин. при комнатной температуре.
- 3. С помощью ножниц отрезать требуемое количество ампул, при этом не допускать повреждения фольги оставшихся ампул.
- 4. Промаркировать ампулы для обеспечения их безошибочной идентификации.
- 5. Вскрыть ампулы прокалыванием алюминиевого герметичного уплотнения с помощью шприца.
- 6. Вскрыть бутылочку с питательными таблетками, поместить укупорочный колпачок на стол в положении "вниз донышком" и с помощью пинцета удалить белую капсулу с силикагелем, а также "медленно" извлечь прокладку из вспененного материала.
- 7. Пересыпать нужное количество таблеток в колпачок.
- 8. С помощью пинцета поместить по одной питательной таблетке в каждую ампулу.
- 9. Вернуть в бутылочку оставшиеся таблетки и прокладку из вспененного материала и силикагелевую капсулу, после чего плотно закрыть бутылочку.
- 10. Закрепить одноразовую пипетку на шприце.
- 11. Оттянуть полностью поршень шприца и вставить конец пипетки (около 1 см) в первую пробу молока (так называемую "контрольную"), после чего позволить поршню медленно возвратиться в первоначальное положение под действием пружины.
- 12. Пробу молока из пипетки (0.1 мл +/- 10%) ввести в соответствующую ампулу непосредственно на агаровую среду и питательную таблетку.
- 13. Для каждой пробы молока использовать новую одноразовую пипетку.
- 14. Контролировать температуру сухого термостата (должна быть 64.0 + -0.5 °C).
- 15. Выдерживать ампулу в термостате в течение требуемого времени в соответствии с таблицей І.
- 16. Определить результаты теста по изменению цвета среды в нижней (2/3) части ампулы. Узким темным слоем на поверхности агаровой среды в ампуле, если он появляется, следует пренебречь.

Определение результата должно производиться немедленно после извлечения ампулы из нагревателя. При использовании отрицательной ("контрольной пробы") она должна оцениваться первой. Если цвет остался в значительной степени фиолетовым, то ампулу необходимо немедленно вернуть в нагреватель и продолжить выдержку до появления соответствующего желтого цвета. Извлечение ампулы из нагревателя приводит к снижению ее температуры, поэтому время оценки цвета должно быть как можно более коротким.



ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ТЕСТА

Чувствительность теста к антимикробиальным веществам снижается при увеличении времени выдержки. На рис.1 показано, что этот эффект значительно отличен для разных видов препаратов.

Концентрация

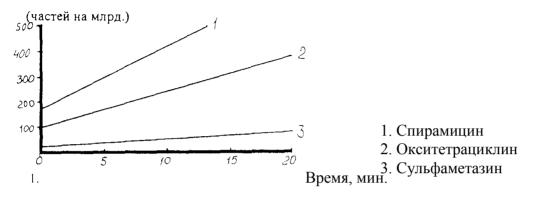


Рис.1 Влияние увеличения времени выдержки на чувствительность ДЕЛЬВОТЕСТСП".

Для использования "ДЕЛЬВОТЕСТ" на уровне предельных величин обнаружения оценка результата должна производиться в то же время, когда "контрольная проба" (гарантировано свободная от антибиотиков) приобретает бледно желтый цвет. Эта оценка результатов может производиться также чуть позже этого времени или в определенный фиксированный момент времени. Из вышесказанного понятно, что в таких случаях обнаруживаемые концентрации будут выше предельных. В зависимости от требований результат анализа может оцениваться в наиболее подходящий момент времени. Это показано в Таблице I.

Для обнаружения минимального уровня чувствительности необходимо определить время выдержки, которое требуется для очевидного изменения цвета среды, когда испытываемая "контрольная" проба свободна от антибиотиков молока. Так как "ДЕЛЬВОТЕСТ" является стандартизованным тестом, то достаточно определять это время лишь периодически (например, один раз в две недели). Точным временем является время, когда фиолетовый цвет в нижних 2/3 частях среды полностью исчезнет. В этот момент цвет является не выраженным желтым, а бледножелтым. Когда выдержка продолжается более этого времени, то цвет будет изменяться на желтый.

Цвет отрицательноый "контрольной" пробы всегда должен быть выражен желтым, когда оценка результата производится в установленное фиксированное время. Это время для "ДЕЛЬВОТЕСТА П" установлено - 2,5 часа, а для "ДЕЛЬВОТЕСТ СП" - 2,75 или 3 часа.

Необходимо всегда иметь ввиду, что "ДЕЛЬВОТЕСТ" не является количественным методом измерения. Хотя тест стандартизируется по своим параметрам непосредственно после изготовления, условия и время проведения анализов могут влиять на изменение его чувствительности. Таким образом, значения, приведенные в таблице 1, должны рассматриваться как приблизительные и не претендующие на абсолютную точность при каждом анализе.



СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Агаровая среда содержит стандартизованное количество спор микроорганизма Bacilus Stearotermophilus var. Calidolactis C953 Этот вид бактерий был выбран из-за их высокой чувствительности к большинству антибиотиков, и особенно пенициллина и других беталактамных веществ. При хранении в холодных условиях споры сохраняют свою жизнеспособность в течение многих месяцев.

При добавлении специального таблетированного питательного вещества и повышении температуры до 64 °C споры быстро размножаются, что приводит к образованию кислоты. Когда количество этой кислоты становится достаточным, происходит изменение цвета индикаторной среды с фиолетового на желтый.

Вместе с тем, если проба молока содержит ингибирующие вещества, например остатки антибиотиков, то они будут диффундировать в агаровую среду и, когда их концентрация станет достаточно высокой, они задержат процесс размножения бактерий и, соответственно, образования кислоты. В этом случае цвет теста не изменится на желтый: он останется фиолетовым, если концентрация ингибитора выше предела обнаружения для этого ингибитора, и он будет иметь цвет между фиолетовым и желтым, если концентрация ингибитора близка к пределу обнаружения.

Поведение "рабочих" микроорганизмов, которое включает в себя размножение, развитие и образование кислоты, зависит от температуры выдержки. Как слишком высокая, так и слишком низкая температура вызывают замедление этих процессов, что приводит к увеличению длительности анализа. Отклонения от оптимальной температуры также могут влиять на чувствительность теста по отношению к определенным веществам.

ОТБОР ПРОБ

Проба молока должна быть "представительной" для той партии молока, которая анализируется. Перемешивание исходного молока должно вестись осторожно во избежание образования пены и воздушных пузырьков.

"ДЕЛЬВОТЕСТ" разработан для анализа объема пробы молока 0,1 мл. Чувтвительность метода не слишком зависит от точности этого объема, однако желательно, чтобы отклонение составляло не более 10%. Одноразовые пипетки ампульного теста и шприц-дозатор при соблюдении требований инструкции обеспечивают подачу точной пробы. Уровень молока в пипетке в этом случае совпадает с нижним пластмассовым ободком. Капли, образующиеся на конце пипетки, должны быть удалены о внутренний кран пробирки с молоком. Проба не должна содержать пены и пузырьков воздуха. Ни в коем случае нельзя одной и той же пипеткой отбирать более чем одну пробу. При столь малом объеме пробы даже одна остающаяся капля от предыдущей пробы, содержащей антибиотики, может исказить результат анализа. Следует манипулировать поршнем шприца не слишком быстро, что практически исключает его загрязнение, в связи с чем он может использоваться многократно.

КОНТРОЛЬНЫЕ ПРОБЫ

Для обеспечения максимально корректных условий анализов или для уточнения оптимального времени выдержки можно параллельно с пробами молока производить периодически исследования "контрольной" пробы. Она представляет собой молоко, которое гарантированно свободно от каких-либо ингибирующих веществ. Эталонные "контрольные" (отрицательные) пробы могут поставляться вместе с "ДЕЛЬВОТЕСТОМ".

В качестве такой пробы нельзя использовать воду.



сайт: тесты-антибиотики.рф

ПРЕДЕЛЫ ОБНАРУЖЕНИЯ

В таблице 1 представлены пределы обнаружения антибактериальных веществ для "ДЕЛЬВОТЕСТ П" и "ДЕЛЬВОТЕСТ СП", при этом определение результата происходило в момент, когда фиолетовый цвет "контрольной" пробы изменился на бледный желтый (контрольное время) и когда проходило фиксированное время:

- для "ДЕЛВОТЕСТ П"; 2,75 - 3 часа - для "ДЕЛВОТЕСТ СП".

Таблица I Минимальные уповни обнапужения антибактепиальных вешеств

<u>Таблица І. Минима.</u>	приве уровии с	"ДЕЛВОТЕСТ	-	"ДЕЛВОТЕСТ СП"	
		дельотести		devidorect cir	
Антибиотик (мг/л молока)	Контрольное время	2,5 часа	Контрольное время	2,75 часа	3 часа
Пенициллин 0	0,0025	0,003	0,002	0,0025	0,0025
Пенициллин 0 (в Межд.Ед./мл)	0,004	0,005	0,003	0,003-0,004	0,003-0,004
Клоксацидлин	0,015-0,025	0,025	0,015	0.015-0,025	0,02-0,025
Диклоксациллин	0,015	0,02	0,01	0,01-0,015	0,01-0,015
Оксациллин	0,01	0,01-0,015	0,005	0,01	0,01
Нафциллин	0,005-0,01	0,01	0,005	0,005-0,008	0,01
Ампициллин	0,003-0,004	0,005	0,002-0,003	0,003-0,004	0,003-0,005
Амоксициллин	0,004	0,005-0,006	0,002	0,003-0,004	0,003-0,005
Цефалексин	0,04-0,06	0,06-0,1	0,04-0,06	0,06-0,1	0,06-0,1
Цефалониум	0,01-0.015	0,015-0,02	0,005-0,01	0,01-0.02	0,015-0,025
Цефапирин	0,005	0,008-0,01	0.005	0,005-0,008	0,005-0,01
Цефаперазон	0,04-0,06	0,08	0,04	0,06-0,1	0,06-0,1
Цефацетрил	0,02-0,03	0,03-0,04	0,02	0.02-0,04	0,02-0,04
Тетрациклин	0,05-0,1	0,2-0,3	0,1	0,2-0,4	0,3-0,6
Окситетрациклин	0,05-0,2	0,3	0,1	0,2-0,4	0,4-0,5
Хлортетрациклин	0,05-0,1	0,25-0,3	0,1-0,15	0,2-0,4	0,3-0,6



Спирамицин	1,0-5,0	5,0- не ч.	0,2	0,35-0,75	не ч.
Дигидростреп- томицин	2,0-5,0	не ч.	0,3-0,5	1,5-3,0	2,5-10,0
Гентамицин	0,2-0,8	1,0-4,0	0,1-0,3	0,2-0,4	0,4-0,5
Канамицин	7,5-не ч.	не ч.	2,5	7,5	не ч.
Эритромицин	0,3-1,0	0,5-1,5	0,05	0,1-0,15	0,25
Тилозин	0,04-0,15	0,1-0,3	0,01-0,02	0,03-0,05	0,1
Линкомицин	0,1-0,3	0,4-1,0	0,1	0,2	0,3-0,4
Хлорамфеникол	2,5-5,0	5,0-7,5	2,5	7,5	7,5-10,0
Сульфаметазин	не ч.	не ч.	0,025	0,05-0,1	0,1-0,2
Сульфадиметоксин	не ч.	не ч.	0,05	0,05-0,1	0,1
Сульфатиазол	не ч.	не ч.	0,05	0,05-0,1	0,1-0,15
Сульфадиазин	не ч.	не ч.	0,05	0,05-0,1	0,1
Дапсон	не ч.	не ч.	0,001	0,001-0,004	0,001-0,004
Триметоприм	0,02-0,05	0,5-0,15	0,05	0,1-0,3	0,5

Примечание: "не ч."- не чувствительно, предел обнаружения - выше 10 частей/млн.

ХРАНЕНИЕ ПРОБ МОЛОКА

Если нет возможности протестировать пробу молока в течение нескольких часов после ее получения, то проба должна храниться в холодном месте, а если тестирование откладывается на другой день, то пробы необходимо хранить глубоко замороженными.

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Подтверждение наличия антибиотиков группы бета-лактамов в пробе молока, признанной "положительной", осуществляется следующим образом: смешиваются 1 мл пробы молока с 0,1 мл раствора, содержащего 10 Международных Единиц

пенициллиназы типа 1 (например, ВасШиз сегеш) и 1 мл воды, после чего 0,1 мл этой смеси исследуется "ДЕЛЬВОТЕСТОМ". Если тест дает желтый цвет, то это считается подтверждением присутствия бета-лактамных антибиотиков (пенициллин O. ампициллин, цефапирин, цефуроксим и др.) в пробе молока.

Подобным же образом, можно подтвердить присутствие остатков сульфамидных и других подобных ингибирующих веществ, тестируя 0,1 мл пробы, представляющей собой смесь 1 мл пробы молока и 0,1 мл содового раствора, содержащего 1 мг натриевой соли раминобензойной кислоты. Желтый цвет повторного теста подтверждает присутствие сульфамидов, сульфонов или антифолатов в пробе молока.



АНОРМАЛЬНОЕ МОЛОКО

Следует отметить, что существует весьма незначительная вероятность того, что результат теста окажется некорректным из-за присутствия в молоке природных ингибирующих веществ. Эти вещества имеются в повышенных количествах в вымени коров в период их отела (в молозиве), в случае заболевания маститами, в конце лактационного периода или как часть защитной реакции коров против инфекций. Эти вещества имеют антибактериальную активность и вызывают ингибирование во всех системах бактериальных анализов.

Наилучшей демонстрацией этого является использование дисковой пробы, где присутствие природных ингибирующих веществ в молоке приводит к образованию зоны ингибирования диаметром 1-3 мм вокруг диска. Это показывает, что в течение времени, необходимого для выполнения теста, происходит движение этих веществ (диффузия) от диска в агаровую среду только на очень небольшое расстояние. То же самое можно ожидать при выполнении "ДЕЛЬВОТЕСТА", только в этой системе анализов вещества диффундируют от молочной пробы в агаровую среду вниз на несколько миллиметров. Бактериальные споры внутри этой узкой полосы будут ингибированы этими веществами, однако в нижней части агаровой среды споры Bacilus Stearotermophilus var. Calidolactis C953 не будут подвергаться такому ингибированию, и их поведение будет иметь обычный характер, то есть будет выделяться кислота при отсутствии антибиотиков, и будет подавляться выделение кислоты, если в молоке присутствуют остатки антибиотиков. Из этого следует, что узкая фиолетовая полоса сверху желтого агарового слоя может служить показателем присутствия природных ингибирующих веществ в пробе молока. Таким образом, такая полоса не должна приниматься во внимание, и результат теста на наличие антибиотиков должен оцениваться как отрицательный. Это явление обычно имеет место в пробах молока от отдельных коров или в пробах молока из фермерских резервуаров, в которые собрано молоко от большого количества коров в стаде, отелившихся приблизительно в одно и то же время или страдающих маститом.

ИССЛЕДОВАНИЯ ДРУГИХ ВИДОВ ПРОБ ПРОДУКТОВ

"ДЕЛЬВОТЕСТ" может использоваться для исследования других (жидких) продуктов на наличие антибиотиков. Не возникает никаких проблем при тестировании:

- восстановленного молока;
- обезжиренного молока;
- прошедших тепловую обработку молока;
- сыворотки.

Молоко от других видов животных (овец, коз, буйволиц), сливки, йогурт, шоколадное молоко, кремы и др., а также моча, сок сырого мяса, сыворотка крови, в принципе, могут тестироваться, если такие препятствующие факторы, как жир, кислота или красители будут нейтрализованы.

Во многих случаях это достигается изменением методики тестирования следующим образом: проба подается на исследование на 15 минут, а затем удаляется с помощью пипетки; добавляется питательная таблетка и начинается выдержка. Время тестирования и определение результата аналогичны стандартной процедуре. Вместе с тем, рекомендуется использовать отрицательную контрольную пробу того же типа продукта с гарантированным отсутствием ингибиторов, чтобы определить требуемое время выдержки.



сайт: тесты-антибиотики.рф

<u>ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К МОЮЩИМ И ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИМВЕЩЕСТВАМ</u>
Вероятность получения ошибочной положительной реакции из-за возможного загрязнения пробы моющими или дезинфицирующими веществами может иметь место только в случае высокой концентрации этих веществ. Если же они применяются для мойки доильного оборудования и обработки вымени, то их конечная концентрация в молоке обычно слишком мала, чтобы повлиять на процедуру тестирования. Обычно "ДЕЛЬВОТЕСТ" ингибируется такими веществами только при концентрации 0,1% (100 частей на млн.) или выше. Некоторые примеры приведены в таблице 2.

Консерванты, используемые для сохранения молока при переносе анализов на более позднее время, обычно делают молоко непригодным для тестирования. Однако и для таких препаратов "ДЕЛЬВОТЕСТ" эффективен, например, для азида натрия. В этом случае разбавление 1:1 позволяет нейтрализовать его действие.

Таблица 2. Концентрации некоторых моющих и дезинфицирующих веществ, дающих положительный результат при тестировании

положительный результат при тестировании	I		
Активный хлор	200 частей на млн.		
Иод	150 частей на млн.		
Перекись водорода (30%)	600 частей на млм.		
Цетримид (четвертичный бромид аммония)	100 частей на млн.		
Фармкват (5% четвертичный хлорид аммония)	10000 частей на млн.		
Родалон (четвертичный хлорид аммония)	30 частей на млн.		
Нироклар (на основе фософрной кислоты)	500 частей на млн.		
Калгонайт (5%дихлоро-изо-цианурат калия)	100 частей на млн.		
Сублимат (ртутный хлорид)	10 частей на млн.		
Дихромат калия	20 частей на млн.		
Азид натрия	50 частей на млн.		

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая изготавливаемая партия "ДЕЛЬВОТЕСТ" подвергается специальному цифровому кодированию и контролю на время инкубациии, требуемого для тестирования отрицательной контрольной пробы молока, и на чувствительность к некоторым антибактериальным веществам. Пробы от каждой партии резервируются для сравнения.

Таблетки с питательной средой должны использоваться с соответствующим тестом, однако они имеют свою индивидуальную кодировку. Ни в коем случае нельзя использовать таблетки из ранее выпущенных комплектов тестов. Если по каким-либо причинам в комплекте не хватило таблеток, следует обратиться к поставщику "ДЕЛЬВОТЕСТА" для получения новой бутылочки с таблетками, при этом необходимо обязательно указать код теста.

В течение срока годности теста время инкубационной выдержки постепенно увеличивается, но весьма незначительно. Тесты, срок годности которых близок к истечению, могут требовать несколько большей длительности инкубации, чем свежие тесты.



ДОКАЗАТЕЛЬНОСТЬ ТЕСТА И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Из вышесказанного очевидно, что не могут быть полностью исключены различные причины, приводящие к ошибочным результатам тестирования. Как видно из таблиц, уровни чувствительности не являются абсолютно точными величинами. Изменения таких параметров, как температура и время выдержки, могут влиять на них. Оценка изменения цвета, особенно в случае "порогового" состояния "желтый-фиолетовый", может быть различна для разных людей. Важно иметь ввиду, что результат отдельного биологического теста никогда не должен рассматриваться как абсолютно доказательный. Таким образом, в случае каких-либо сомнений тест следует повторить, желательно вместе с контрольным (на пробе молока, свободного от антибиотиков), после чего результат целесообразно сравнить с данными утвержденного аналитического метода.

Так как "ДЕЛЬВОТЕСТ" является биологическим тестом, «DSM Food Specialties» не может нести ответственность за все неблагоприятные последствия его использования, за исключением замены доказано дефектных тестов.

За дополнительной информацией и по вопросам приобретения тестов DSM Devlotest обращайтесь в компанию «Альфа-Столица»:

г. Уфа, бульвар Ибрагимова, дом 19 Контактный телефон: +7 (347) 272-03-83

> E-mail: <u>test-moloko@mail.ru</u> Сайт: <u>тесты-антибиотики.рф</u>