

ANTIBAKTERIAALSETE SAASTEAINETE MIKROBIOLOOGILINE SEIRE LIHAS

A. Kolk, M. Minjajev

Eesti põllumajanduse üheks prioriteediks on peetud toodangu vaba realiseerimist Euroopa Liidus. Viimastel aastatel on aga toodangumahud sedavõrd vähenenud, et üha enam põllumajandussaadusi imporditakse ja kahjuks kehtib see ka liha kohta. Seda pakutakse ja ka ostetakse kõikidelt kontinentidelt peale Antarktika ja Aafrika. Importliha kasutavad oma toodete valmistamiseks ka kõige prestiiž semad ettevõtted, liha ning lihatoodete eksport Euroopa Liitu on peaaegu olematu.

Nii Euroopa Liitu astumisel kui ka sinna toodangu eksportimisel kolmandatest maadest (näit. Eestist) on kohustuslikuks eeltingimuseks tõhus loomade ja liha veterinaarkontroll ja selle riiklik järelevalve. Järelevalve üheks tähtsamaks ja kallimaks komponendiks on toiduainetes leiduvate saasteainete riiklik seireprogramm. Tegelikult on selline programm samavõrd oluline ka meie endi toiduohutuse seisukohalt, sest odav imporditav liha ja lihatooted võivad olla enamgi saastunud kui meie oma toodang.

Riikliku seireprogrammi üheks osaks on veterinaarravimite, sealhulgas antibakteriaalsete saasteainete jääkide seire nii lihas kui ka teistes loomsetes toiduainetes. Antibiootikumid, sulfoonamiidid ja teised antibakteriaalse toimega ravimid on veterinaarias üheks kõige enam kasutatavaks ravimite rühmaks, kuid neid lisatakse mõnikord söötadele, saavutamaks loomade kiiremat kasvu. Tänapäevased prolongeeritud toimega antibiootikumid võivad oma ravikontsentratsiooni säilitada looma organismis mitte ainult loetud tunde, vaid päevi ja isegi nädalaid. Kui loom tapetakse sel perioodil, siis jääb liha nende ainetega saastatuks. Sellise liha söömisel inimese organismi ülekanduvad antibiootikumide kogused on küll väga väikesed, ent siiski suudavad need esile kutsuda allergiaid, põhjustada patogeensete mikroobide ravimiresistentsust, kahjustada vereloomet ja muid elulisi funktsioone (Kiivet, 1992). Seepärast on ravimitele kehtestatud kohustuslikud ooteajad, mille vältel on looma tapmine lihaks ja piima kasutamine toiduks keelatud. Nii Eesti kui ka paljude teiste maade kogemused näitavad siiski, et kahjuks ei peeta keeluaegadest alati kinni.

Materjal ja meetodid

Esimest korda teostati suurem antibiootiliste ravimijääkide seireprogramm koostöös Rakvere Lihakombinaadiga aprilli- ja maikuul 1995. Kasutati järgmist nn. **Põhjamaade meetodit** (Anonym, 1987). Ettevalmistatud söötmele, milleks on *Bac. subtilise* ATCC 6633 eossuspensiooniga lauskülvatud agarplaat, asetatakse veise või sea neeru kettakujuline tükike. Kasutatakse kahesuguse pH-ga söötmeid: sööde pH-ga 6,0 sobib penitsilliinide ja tetratsükliinide, sööde pH-ga 8,0 sobib aminoglükosiidide (streptomütsiin, neomütsiin jt.) ja erütromütsiini jääkide avastamiseks (Anonüüm, 1995). Kui viimasele söötmele lisada trimetoprimi nii, et selle lõppkontsentratsiooniks söötmes oleks 0,06 µg/ml, siis soovatakse seda sulfoonamiidide jääkide detekteerimiseks. Neeruproovidega agarplaate hoitakse 1 tund toatemperatuuril, seejärel inkubeeritakse 30° C juures 24 tundi. Tulemusi hinnatakse järgmiselt:

- a) kui neeruproovi ümber on tekkinud vähemalt 4 mm laiune mikroobide kasvu pärssiv tsoon, siis loetakse proov positiivseks,
- b) kui pärssiv tsoon puudub või on kitsam kui 2 mm, siis loetakse proov negatiivseks,
- c) kui tsooni laius on 2...4 mm, siis soovatakse proovi korrata.

Kirjeldatud meetodil kontrolliti 371 veise ja sea liha, positiivseteks osutus 3 (1 lehma ja 2 peekoni) proovi ehk kokku ainult 0,8 % uuritutest. Selline meetodika seab ajalised kitsendused liha edasisele kasutamisele. Terve ööpäeva jooksul alates proovi võtmisest ei tohi kõiki neid rümpasid ei töödelda ega müüa, sest proovi tulemused pole veel teada. Seepärast püüdsime leida kiiremat ja tõhusamat meetodit.

Valisime võrdluskatseteks suhteliselt uue ja võimalikult kiire ning tundliku meetodi, nimelt USA Põllumajandusministeeriumi Toiduohutuse ja Inspeksiooniteenistuse (USDA FSIS) poolt 1994. aasta detsembris kinnitatud FAST-testi (Anonym, 1994; Dey *et al.*, 1996).

Selles testis kasutatakse vaid üht söödet, mille koostis on järgmine:

Müller-Hintoni agar	38,0 g
glükoos	7,0 g
broom-kresool purpuri 0,04 % lahus	70,0 ml
destilleeritud vesi	1000,0 ml.

Söödet steriliseeritakse 121 °C juures 15 minutit, lastakse jahtuda kuni 48 °C ja valatakse väikestele Petri tassidele diameetriga 60 mm (Anonym, 1990). Söötme pH on 7,2, testkultuuriks on *Bac. megaterium* ATCC 9885. Selle eossuspensioonisse kastetud vatitampooniga viirutatakse tahkunud söötme pinda, pöörates plaati 4

korda ¼ pöoret. Söötmele asetatakse 5 µg neomütsiiniga kettake (N5-disk) ning uuritava neeru lõikes niiskunud tampoon. Viimaseid võib olla kaks, kumbki erinevalt loomalt. Plaate hoitakse termostaadis 44±1 °C juures ainult **6 tundi**.

Tulemusi hinnatakse järgmiselt:

- esmlt kontrollitakse N5-diski ümber moodustunud mikroobide kasvu pärssiva vöö läbimõõtu, see peab olema 20...26 mm; kui pidurdustsoon on suurem või väiksem, siis tuleb testi korrata;
- kui tampooni(de) ümber on pärssiv vöö tekkinud, siis on tulemus positiivne, selle puudumisel aga negatiivne.
- Söötme värvus on algselt violetne, 6 tunni möödudes hakkab tekkima kollakas toon. Kui sööde peaks omandama mõne muu värvtooni, siis on selle looma lihakasutamine keelatud.

Katsete tulemused ja arutelu

Ajavahemikus 07.08.96...30.10.96 teostati Rakvere Lihakombinaadis võrdluskatsed mõlema meetodiga. Kokku testiti Põhjamaade meetodiga 500 veise ja sea neeru, neist uuriti paralleelselt FAST-testiga 245 neeruproovi (tabel 1). Testitud loomad pärinesid peaaegu kogu Eesti mandriosast. Veiste proove uuriti kokku 321, neist FAST-testiga 154, ja sigade proove kokku 179, neist FAST-testiga 91. Töö algetapil kasutati ainult Põhjamaade testi, seejärel kasutati USA firma Editec Inc. steriilseid FAST-testi agarplaate säilivusajaga 6 kuud ja samuti kombinaadi laboratooriumis valmistatud FAST-testi agarplaate. Mingeid erinevusi plaatide kvaliteedis ei ilmnenu.

Tabel 1. Testitud loomade jaotus / *Distribution of tested animals*

Maakond <i>County</i>	Veis <i>Cattle</i>	Siga <i>Swine</i>	Kokku <i>Total</i>
Harju	37	63	100
Lääne-Viru	69	16	85
Järva	25	39	64
Võru	63	–	63
Viljandi	4	47	51
Rapla	36	14	50
Jõgeva	45	–	45
Tartu	24	–	24
Ida-Viru	10	–	10
Põlva	5	–	5
Pärnu	2	–	2
Lääne	1	–	1
Kokku <i>Total</i>	321	179	500

Testide võrdluskatsete tulemused on esitatud tabelis 2. Uuritud 91 sea proovist osutus FAST-testi põhjal positiivseks 6 (6,6 %), Põhjamaade testiga uuritud 179 seast positiivseid ei leidunud, ehkki nende hulgas olid ka eelnimetatud 91 siga.

Uuritud 154 veisest osutus FAST-testiga positiivseks 4 proovi (2,6 %), Põhjamaade testiga uuritud 321 veise proovist oli positiivseid ainult 2 (0,6 %), ehkki nende hulgas oli eelnimetatud 154 veist. Seega nii sigade kui ka veiste liha uurimisel osutus FAST-test mitmekordselt tundlikumaks. Suhteliselt suur positiivsete proovide protsent on osaliselt seletatav Rakvere Lihakombinaadi poolt pakutava kõrge kokkuostuhinnaga ja regulaarse seire puudumisega, mistõttu loomaomanikud püüavad võimalikult kõiki (sealhulgas antibiootikumidega ravitud loomi) müüa just sellele kombinaadile. Seni pole Eestis meile teadaolevalt rakendatud sanktsioone ravimite keeluaegu ignoreerinud loomaomanike suhtes.

Tabel 2. FAST-testi ja Põhjamaade testi võrdluskatsete tulemused / *Results of comparative investigation of FAST-test and Nordic test*

Looma omanik <i>Owner of animal</i>	Looma liik <i>Species</i>	FAST-test		Põhjamaade test <i>Nordic test</i>					
		N5-diski pärssiva vöö laius mm <i>Inhibition zone around N5-disc, mm</i>	Proovitamponi pärssiva vöö laius mm <i>Inhibition zone around swab, mm</i>	Proovi pärssiva vöö laius söötmeal pH 6,0 <i>Inhibition zone around sample on agar with pH 6,0</i>			Proovi pärssiva vöö laius söötmeal pH 8,0 <i>Inhibition zone around sample on agar with pH 8,0</i>		
				< 2 mm	2-4 mm	> 4 mm	< 2 mm	2-4 mm	> 4 mm
AS VMV, Lääne-Viru mk.	Siga	25	6	–	–	–	–	–	–
AS TAC Ettevõtted, Järva mk.	Siga	23	7	–	–	–	–	–	–
AS Nurme, Järva mk.	Siga	24	5	–	–	–	–	–	–
OÜ Hinnu Seafarm, Harju mk.	Siga	25	7	–	–	–	2*	–	–
OÜ Hinnu Seafarm, Harju mk.	Siga	25	7	–	–	–	2*	–	–
OÜ Estonia, Järva mk.	Siga	24	–	–	–	–	2*	–	–
OÜ Hinnu Seafarm, Harju mk.	Siga	23	5	–	–	–	–	–	–
M. Järvesoo, Jõgeva mk.	Veis	24	12	–	–	–	–	–	7
K. Pikareva, Võru mk.	Veis	Ei toimunud	Ei toimunud	–	–	–	–	3	–
OÜ Tammsaare, Järva mk.	Veis	26	8	–	–	–	–	–	–
AS Raliko, Võru mk.	Veis	24	9	–	–	–	–	–	–
PÜ Sadala, Jõgeva mk.	Veis	24	8	–	–	–	–	–	9
		Kokku positiivseid proove <i>Total number of positive samples</i>	10					1	2

* Ei loeta positiivseks

Järeldused

1. Rakvere Lihakombinaadis tapetud 12 maakonnast pärineva 154 veise lihast sisaldasid FAST-testi põhjal antibakteriaalseid saasteaineid 4 (2,6 %), 5 maakonnast pärit 91 sea lihast – 6 (6,6 %).
2. FAST-test on 4 korda kiirem ja oluliselt tundlikum kui seni kasutatav Põhjamaade test.
3. FAST-testi teostamine ei eelda ranget steriilsuse nõuet, agarplaadid on väga pika säilivusega (6 kuud).
4. Loomaomanikke ja veterinaararstkonda on vaja teavitada seireprogrammi käivitumisest ja ravimite keeluaegade ignoreerimisest tulenevatest tagajärgedest ning sanktsioonidest.

Ettepanek

Riigi Veterinaaria- ja Toiduinspeksioonil kaaluda võimalust FAST-testi kasutamise kooskõlastamiseks EL Ministrite Nõukogu 6. Peadirektoraadis.

Kirjandus

- Anonym. Antibacterial substances. Detection by microbiological method in kidney and muscle from slaughter animals. Nordic Committee of Food Analysis No. 121, 1987.
- Anonym. FAST Antimicrobial Screen Test (FAST): For Detection of Antibiotic and Sulphonamide Residues in Livestock Kidney Tissue. A Self-Instructional Guide. 1994. USDA Food Safety and Inspection Service.
- Anonym. Mueller-Hinton agar. The OXOID MANUAL, 6th ed., 1990, p. 161.
- Anonüüm. Antibakteriaalsed ained. Määramine tapetud loomade neerus ja lihastes. – Riigi Veterinaarlaboratoorium. Meetod nr. RVL 1/95, 1995.
- Dey P. B., White A. Clarence. Fast Antimicrobial Screen Test (FAST) for antimicrobial residue detection in meat. Laboratory Communication No. 79, p. 8.
- Kiivet R. A. Antibakteriaalsete ravimite kõrvaltoimed. – Tartu, lk. 3...33, 1992.

Microbiological screening of residues of antibacterial drugs in meat

A. Kolk, M. Minjajev

Summary

Two antimicrobial screen tests were used simultaneously in detecting of residues of antibiotics and sulphonamids in a big Estonian meat processing plant. The tests in comparative trial were the fast antimicrobial screen test (FAST) based on inhibition of the growth of *Bac. megaterium* and the test recommended by the Nordic Committee of Food Analysis based on *Bac. subtilis* (Nordic test).

Altogether the kidneys of 500 cattle and swine were tested. The animals originated from 12 out of 15 counties of Estonia. The Nordic test allowed to detect 0-0.6 % positive samples whereas by the FAST test 2.6-6.6 % positive samples were detected.

The FAST test has considerably higher sensitivity and it is easier to perform if compared with the Nordic test. The prepared FAST agar plates can be stored refrigerated up to 6 months, the test does not require strictly sterile conditions.

The farmers and veterinarians have to be informed about the screening program as well as about sanctions if the withdrawal times are ignored.