

Monitorizarea reziduurilor de antibiotice din miere

Monitoring antibiotic residues in honey

Drd.Ing. Monica Cristina Cara¹, Drd.Med. Vet. Gheorghita Simion¹,
Drd.ing. Panfiloiu Mirabela², Drd.Chim-Fiz. Harieta Pîrlea³

¹ Direcția Sanitar Veterinară și Pentru Siguranța Alimentelor Timiș

² S.C. Antarctica, Timisoara

³ Universitatea Politehnică Timișoara

Rezumat

După antibioticele pe bază de betalactamice, în medicina veterinară cel mai folosit antibiotic este streptomycina. Concentrațiile mari de streptomycină pot avea efecte ototoxice și nefrotoxice. În concentrații mici – găsite în alimente – pot cauza alergii, pot distruge flora intestinală și pot da rezistență la anumite microorganisme. În 1948 clortetraciclina a fost izolată de Duggan și a fost primul antibiotic din clasa tetraciclinelor. În lucrarea de față se prezintă ca studiu de caz monitorizarea reziduurilor de antibiotice din mierea de albine în județul Timiș, în perioada 2006-2008. S-au determinat reziduuri de tetraciclina și streptomycină din miere prin metoda Elisa, metodă cantitativă de decelare. Godeurile prezente în kit sunt captușite cu tetraciclina, respectiv anticorpi anti-streptomycină. După adăugarea standardelor, probelor și a reactivilor necesari, antibioticul liber și cel imobilizat competiționează cu anticorpul de antibiotic adăugat (reacție imunoenzimatică de competiție). Orice anticorp nelegat este eliminat în faza de spălare. Enzimele conjugate legate transformă culoarea cromogenului în albastru. Adăugarea soluției de stopare, schimbă culoarea din albastru în galben. Citirile se fac fotometric la lungimea de undă de 450 nm. Absorbanța este invers proporțională cu concentrația de antibiotic din probă.

Cuvinte cheie: monitorizare, antibiotic, reziduu, miere

Abstract

Next to the β -lactam antibiotics in veterinary medicine, streptomycin is one of the mostly used antibiotics. High concentration of streptomycin could lead to ototoxic and nephrotoxic effects. Low concentration – as found in food – may cause allergies, destroy the intestinal flora and favor immunity to some pathogenic microorganisms. In 1948 chlortetracycline was isolated by Duggan as a metabolite and this was the first antibiotic substance of the group of tetracyclines. In the present paper there are presented the monitoring of the antibiotic residues in honey from Timiș County. The residues of tetracycline and streptomycin in honey were determined by the method ELISA – a quantitative method of detection. The microtitre wells are coated with tetracycline and anti-streptomycin antibodies. Free antibiotic and immobilized antibiotic compete with the added antibiotic antibody (competitive immunoassay reaction). Any unbound antibody is then removed in a washing step. Bound conjugate enzymes convert the colorless chromogen into a blue product. The addition of the stop reagent leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorption is inversely proportional to the antibiotic concentration in the sample.

Key words: monitoring, antibiotic, residues, honey

Introducere

După antibioticele pe bază de betalactamice, în medicina veterinară cel mai folosit antibiotic este streptomycina.

Concentrațiile mari de streptomycină pot avea efecte ototoxice și nefrotoxice. În concentrații mici, găsite în alimente, pot cauza alergii, pot distruge flora intestinală și pot da rezistență la anumite microorganisme.

În 1948 clortetraciclina a fost izolată de Duggan și a fost primul antibiotic din clasa tetraciclinelor. Mierea este folosită cu precădere în industria alimentară pentru

calitățile nutritive, terapeutice și dietetice cu valoare deosebită.

Mierea este cel mai dulce produs al naturii fiind realizată prin prelucrarea nectarului florilor sau a manei plantelor.

Compoziția chimică a mierii constă în: apă, glucoză, fructoză, zaharoză, dextrină, vitamine din grupa B, C, provitamina A, P, K, acidul pantotenic, folic, săruri minerale de Ca, Na, P, Al, Fe, Si, Mg și unele microelemente ca: Ni, Ag, Vd, Cr.

Proteinele sunt prezente în miere în cantități mici sub formă de aminoacizi liberi cum ar fi: lizină, valina, treonina, triptofan, leucina ș.a [1].

Prin păstrare mierea depune cristale care constau din levuloză, lichidul rămas constând mai ales din dextroză [4].

Toate aceste substanțe bioactive au acțiune tonifiantă, energizantă în stări de convalescență și anemii. Mierea este un aliment unic în ceea ce privește acceptarea sa de către consumator.

Ea este privită ca un produs natural care nu suferă nici un alt tratament din partea omului [2].

Controlul calității este considerat marca industriei alimentare, condiție esențială pentru ca un produs să fie competitiv.

Cea mai mică abatere în ceea ce privește gustul, culoarea, aroma sau consistența mierii față de calitatea obișnuită a unui sortiment îl va destina rebutării sau declasării.

Pentru a stabili norme care să asigure mierea de cea mai bună calitate posibilă, trebuie luate în considerație anumite proprietăți fizice și chimice.

În ultimii ani s-a manifestat un interes crescut pentru compoziția mierii românești și locul care i-ar putea fi atribuit în raport cu normele propuse de U.E.

Exportul de miere în străinătate, mai ales în Uniunea Europeană, a ridicat câteva probleme referitoare la alinierea la normele de calitate ale U.E. Astfel, procesatorii de miere au fost obligați să solicite laboratoarelor sanitare veterinare autorizate efectuarea analizelor de calitate impuse pentru loturile destinate exporturilor, fiind stabilite măsuri de supraveghere și control ale unor substanțe: streptomycină, tetraciclină, sulfamide.

Caracteristicile mierii

Culoarea mierii este dată de pigmenții vegetali pe care îi conține.

Culoarea mierii se deschide în timpul învechirii (pigmenții își accentuează culoarea), sub influența temperaturii crescute (lichefierea), prin păstrarea îndelungată la lumină (ambalaje transparente) sau în ambalaje corodabile (din fier). Consistența mierii (vâscozitatea) este determinată de relația substanțe glucidice – apă, care la rândul ei este dependentă de raportul dintre fructoză și glucoză.

La mierile florale, fluiditatea prelungită este consecința predominării fructozei față de glucoză. Cristalizarea mierii este determinată de creșterea ponderii glucozei, în sensul egalării sau mai rar al depășirii fructozei.

Mierea de calitate superioară conține 18% apă și 82 % substanță uscată.

În componența substanței uscate 94,6% reprezintă zaharurile și 3,6% alte substanțe.

Din greutatea mierii florale zaharurile simple (fructoza și glucoza) reprezintă 70-75 % pe când dizaharidele (zaharoza și maltoza) doar 5%. [3]

Bolile albinelor și tratarea lor cu antibiotice

În apicultură prevenirea bolilor trebuie să corespundă următoarelor principii:

1. Selectarea de rase rezistente

2. Aplicarea unor practici favorizând o bună rezistență la boli și prevenirea infecțiilor, ca de exemplu: înnoirea regulată a mătcilor, controlul sistematic al stupilor pentru a detecta orice formă de boală, controlul puietului mascul din familiile de albine, dezinfectarea materialelor și a echipamentelor, distrugerea materialelor sau a surselor de contaminare, reînnoirea regulată a cerii de albine și constituirea unor rezerve suficiente de miere și polen în familiile de albine.

Antibioticele se folosesc la tratarea bolilor bacteriene. Bolile provocate de bacterii sunt: loca europeană, loca americană, salmoneloză și septicemia. [8].

Loca europeană

Etiologia acestei boli este complexă, în intestinul larvelor bolnave sau moarte de această boală se găsește o floră bacteriană formată din *Bacillus Alvei*, *Bacillus Orpheus*, *Bacterium Eurydice*, *Streptococcus Pluton* și *Streptococcus Apis*.

Această boală afectează puietul necăpăcit. Ea apare în principal primăvara înaintea culesului de salcâm. Infecția apare pe cale bucală, prin intermediul hranei administrate puietului de către albinele doici.

Microbii introduși în intestinul larvelor se înmulțesc pe seama hranei existente în intestinul acestora și elimină toxine care se răspândesc prin peretele intestinal în tot organismul, provocând grave perturbări fiziologice și în final moartea larvelor. În stupa boala poate fi transmisă prin trântori, inventar nedezinfectat, etc.

În combaterea acestei boli se recomandă: unificarea familiilor slabe, schimbarea mătcilor, dezinfectia stupilor și efectuarea tratamentului medicamentos [6].

Această boală poate fi tratată cu una din următoarele substanțe:

- **Oxitetraciclină (tetraciclină)** 0,5—0,75 g la litru de sirop; se fac câte 4-5 administrări

de câte 250-500 ml sirop la interval de 4-5 zile.

- **Locamicin** se amestecă 2,5 g la 1 kg zahăr pudră; constă în pudrarea ramelor cu 80-100g amestec de 3 ori, la 3 zile și de încă 2 ori la interval de 5-7 zile [7].

- **Streptomicina** 0,5 g la litru de sirop; se administrează ~ 100 ml sirop pentru o ramă la 5-7 zile.

Datorită creșterii exigenței privind nivelul antibioticelor din mierea destinată exportului folosirea acestora trebuie făcută cu discernământ, Uniunea Europeană prin legislația în vigoare, coborând limitele maxime admise cât mai jos, asigurând astfel protecția consumatorului.

Loca Americana

Agentul etiologic al acestei boli este *Bacillus larvae* care dă naștere la spori când condițiile de viață ale familiilor de albine sunt neprielnice.

Loca Americana afectează puietul căpăcit. Ea apare după culesul la salcâm. Contaminarea se realizează prin hrănirea larvelor în varstă de 2-3 zile de către albinele doici contaminate.

Combaterea bolii se face prin distrugerea familiilor slabe sau numai a fagurilor cu semn de boală din familiile puternice.

Tratamentul familiilor bolnave se face cu oxitetraciclină sau cu locamicin administrate ca și pentru loca europeană sau prin administrarea de negamicin și eritromicina. [5].

Pentru tratarea bolilor puietului de albine se aplică tratamente cu antibiotice. S-a constatat că antibioticele reduc rezistența albinelor față de bolile micotice.

Salmoneloza

Agentul etiologic este *Bacillus paratyphi* alvei întâlnit în tubul digestiv al albinelor sănătoase și care devine patogen atunci când rezistența naturală a familiei scade sub acțiunea unor factori neprielnici.

În aceste situații se înmulțesc rapid, pătrunde în hemolimfă și determină moartea prin septicemia. Această boală apare de obicei primavara și mai rar vara. Albinele bolnave prezintă abdomenul balonat, nu pot zbura, paralizează și mor.

Combaterea acestor boli se realizează prin măsuri de igienă, prin asigurarea unui cules abundent sau prin hrăniri stimulative cu sirop de zahăr precum și prin întărirea periodică a familiilor de albine bolnave.

Tratamentul constă în administrarea de oxitetraciclină sau streptomicină ca în cazul locei europene.

Vindecarea are loc în decurs de 10-20 de zile de la aplicarea tratamentului.

Septicemia

Agentul patogen este *Bacillus apisepeticus*, care se întâlnește frecvent în interiorul stupilor, însă devine virulent numai în cazul când rezistența naturală a familiei scade.

Boala apare la albinele adulte în orice perioadă a anului, fiind favorizată de umiditatea crescută din stupi, de lipsa de cules, etc. [7].

Boala poate fi prevenită prin îmbunătățirea condițiilor de întreținere, prin întărirea și stimularea familiilor de albine, precum și prin schimbarea mătcilor.

Deși nu există un tratament specific septicemiei, s-a constatat că antibioticele (oxitetraciclina) împiedică apariția altor complicații. [6].

Antibioticele pot fi administrate și în cazul virozelor. Se poate administra oxitetraciclină (teramicina), micocidin.

Scopul lucrării

Scopul lucrării îl constituie:

- monitorizarea reziduurilor de antibiotic: tetraciclina și streptomicina din mierea de albine.

Rezultate și discuții

Pentru efectuarea investigațiilor s-a utilizat o mostră de miere de albine provenită din județul Timiș.

Această probă a fost analizată timp de 30 de zile, cu testul screening Elisa furnizat de R-biopharm [10], urmărind evoluția tetraciclinei în timp.

Probele s-au prelucrat în vederea analizării conform protocolului de lucru furnizat de către firma producătoare a chitului.

Cu ajutorul programului Ridawin s-au calculat valorile concentrației în funcție de absorbantă, înregistrând totodată graficul semilogaritm și calculând concentrația reală de tetraciclină din probă. Curba de calibrare ar trebui să fie liniară în domeniul 0,150-1,350 μg/kg (ppb), iar concentrațiile de tetraciclină în μg/kg corespunzătoare absorbanței fiecărei probe se pot citi de pe curba de calibrare [10].

Pentru a obține concentrația reală de tetraciclină în probă, valoarea obținută trebuie

multiplicată cu factorul de diluție conform metodei de lucru prezentate, respectiv cu 50 [10].

În tabelul 1 este prezentată concentrația de tetraciclină detectată în funcție de timp.

Tabelul 1.

Concentrația de tetraciclină în funcție de timp

Ziua	Concentrația tetraciclinei (ppb)
1	199.00
2	198.88
3	198.74
4	198.61
5	198.00
6	197.87
7	197.74
8	197.60
9	197.42
10	196.00
11	195.71
12	195.20
13	195.00
14	194.70
15	194.13
16	193.98
17	193.72
18	193.00
19	193.76
20	192.98
21	192.74
22	192.51
23	192.39
24	192.00
25	191.88
26	191.75
27	191.62
28	190.33
29	189.86
30	189.79

Rezultatele obținute au fost reprezentate grafic (fig.1), urmărindu-se evoluția concentrației de tetraciclină. Se poate observa că, concentrația de tetraciclină scade liniar, având ecuația de regresie liniară: $y = -0,322x + 199,5$.

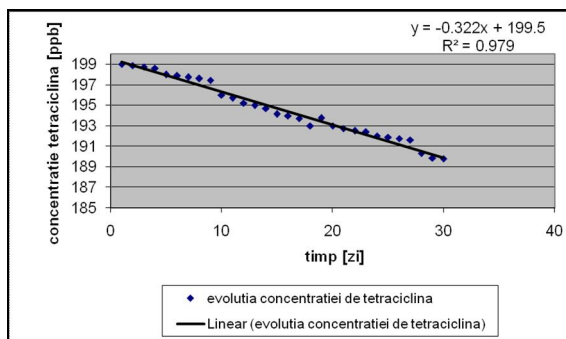


Fig. 1 - Evoluția concentrației de tetraciclină

Pentru a urmări evoluția streptomicinei în funcție de temperatură s-a analizat o mostră

de miere, testată inițial pentru a vedea dacă este lipsită de substanțe antimicrobiene.

Această probă a fost apoi fortificată cu 20 ppb, 30 ppb și 40 ppb de streptomicină. După pregătire, probele s-au păstrat timp de 30 minute în condiții diferite de temperatură (0, 10, 20, 30, 40, 50°C), analizându-se în continuare cu chitul Elisa pentru determinarea streptomicinei [9].

Pregătirea probelor, prepararea reactivilor și a standardelor s-a făcut în conformitate cu protocolul de lucru existent în chit [9].

Soluțiile standard prevăzute în kit sunt concentrate și trebuie diluate 1:10 (1+9) cu soluție tampon. Pentru determinarea propriu zisă Elisa se respectă protocolul de lucru și se măsoară absorbanta la 450 nm, față de un blank de aer.

Valorile medii ale absorbantei standardelor și respectiv, probelor se împart la valoarea absorbantei primului standard (zero standard) și se înmulțesc cu 100 [9].

Programul Ridawin va calcula valorile concentrației în funcție de absorbantă, înregistrând și graficul semilogaritm și calculând concentrația reală de streptomicină din probă în $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Curba de calibrare ar trebui să fie liniară în domeniul 2-32 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb), iar concentrațiile de streptomicină în $\mu\text{g}/\text{kg}$ corespunzătoare absorbantei fiecărei probe se pot citi de pe curba de calibrare.

Pentru a obține concentrația reală de streptomicină în probă, valoarea obținută trebuie multiplicată cu factorul de diluție pentru miere, 20.[9]

Rezultatele experimentale obținute sunt tabelate în tabelul 2.

Tabelul 2

Concentrația de streptomicină în funcție de temperatură

Temperatură (°C)	Concentrația de streptomicină (ppb)		
	20 ppb	30 ppb	40 ppb
0(°C)	18.3	28.8	38.1
10(°C)	19.5	29.2	39.4
20(°C)	19.8	30.1	40.0
30(°C)	20.1	29.9	39.8
40(°C)	18.9	28.5	39.2
50(°C)	18.1	28.0	38.5

În figurile 2, 3 și 4 sunt reprezentate grafic rezultatele experimentale pentru cele trei concentrații de streptomicină luate în studiu.

Din figuri, se observă că cele trei curbe au alură polinomială cu R^2 cuprins între 0,846 și 0,961.

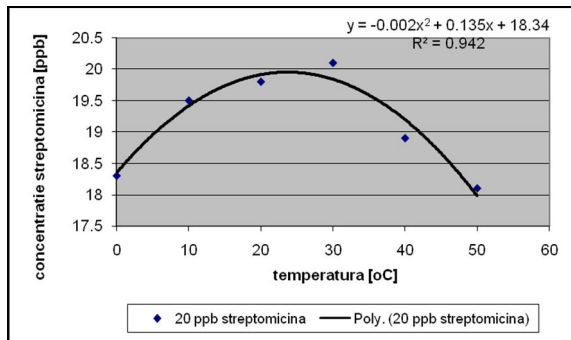


Fig. 2 Evoluția concentrației de streptomicină (20 ppb) în funcție de temperatură

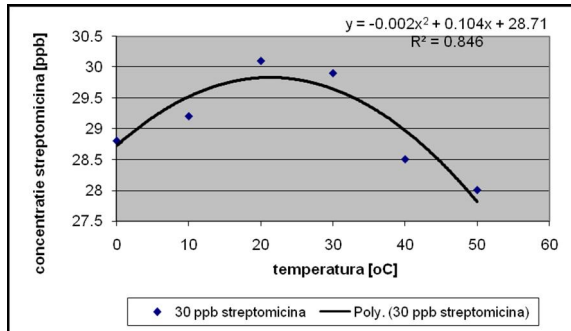


Fig. 3. Evoluția concentrației de streptomicină (30 ppb) în funcție de temperatură

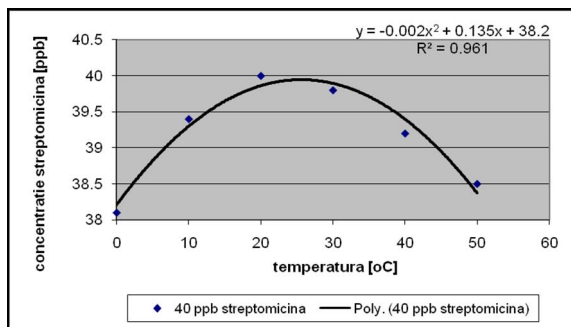


Fig.4. Evoluția concentrației de streptomicină (40 ppb) în funcție de temperatură

De asemenea, s-a urmărit evoluția concentrației de streptomicină în timp în funcție de temperatură, comparativ pentru 20 ppb, 30 ppb, respectiv 40 ppb de streptomicină.

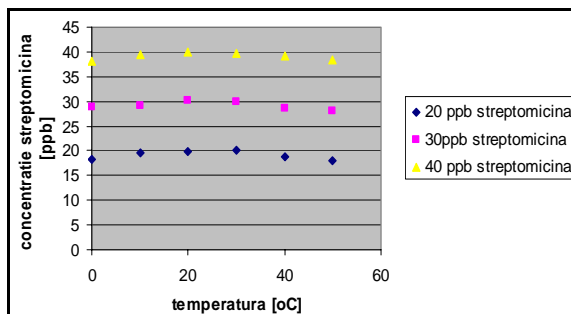


Fig.5. Evoluția concentrației de streptomicină în funcție de temperatură

Concluzii

1. Punându-le în același grafic se poate observa un comportament similar al curbelor pentru toate cele trei concentrații de streptomicină urmărite, iar variația este de câteva unități de ppb față de concentrația inițială.
2. Datorită creșterii exigenței privind nivelul antibioticelor din mierea destinată exportului folosirea acestora trebuie făcută cu foarte mare discernământ. În acest sens, s-a stabilit Planul Anual de Supraveghere Sanitară Veterinară a acestor reziduuri
3. Pentru a elimina riscul contaminării produselor alimentare cu reziduurile de tetraciclină și streptomicină este necesară monitorizarea lor.

Bibliografie

1. **Bălan, O. (1999).** Materii prime și materiale pentru industria alimentară, Tipografia Universității Tehnice „Gh. Asachi” Iași.
2. **Bratu, Iuliana (1998).** Studiu asupra factorilor ce influențează culoarea diferitelor sortimente de miere din România, *Buletin Științific, Sibiu*, vol.IV, p.27-30.
3. **Bura, M., Pătruică, S., Bura, V.A. (2008).** “Tehnologia apicolă”, Editura Ferma, 2008
4. **Ghimicescu, G. (1977)** Chimia și analiza alimentelor, băuturilor și condimentelor, Editura Junimea, Iași.
5. **Lazăr, S., Vornicu, C. O. (2009)** “Albinele și sănătatea lor”, Editura Alfa.
6. **Niță, M., Dinu, L., Adriana Camelia Mitea (2010).** “Apiterapia”, Editura Aius.
7. **Ritter Wolfgang (2010).** Bolile albinelor, Editura MAST.
8. **Stănescu, V. (1994).** “Medicina Legală Veterinară”, Editia I, Editura ALL, 1994
9. *** Rbiopharm - *Protocol de lucru* Elisa streptomicină.
10. *** Rbiopharm - *Protocol de lucru* Elisa tetraciclină.