

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů

Studijní program: B 4131 Zemědělství

Studijní obor: Trvale udržitelné systémy hospodaření v krajině

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Problematika výskytu inhibičních látek
v kravském mléce
(Residues of inhibitors in cow's milk)**

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Eva SAMKOVÁ, Ph.D.

Vypracovala:

Veronika STŘELEČKOVÁ

České Budějovice

2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Veronika STŘELEČKOVÁ**
Osobní číslo: **Z09342**
Studijní program: **B4131 Zemědělství**
Studijní obor: **Trvale udržitelné systémy hospodaření v krajině**
Název tématu: **Problematika výskytu inhibičních látek v kravském mléce**
Zadávací katedra: **Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Inhibiční látky a jejich rezidua (RIL) jsou jedny z ukazatelů kvality mléka, které určují jeho zdravotní nezávadnost či vhodnost pro další zpracování.

Cílem bakalářské práce bude zpracovat literární přehled na téma inhibiční látky, jejich rozdělení, nejvýznamnější druhy a četnost výskytu, včetně posouzení příčin výskytu v mléce. Zároveň popíšete základní problémy, které RIL způsobují a uvedete nejčastější metody jejich stanovení.

Bakalářská práce je součástí řešení projektu OP VK CZ.1.07/2.3.00/09.0081 a bude vypracována na základě pokynů uvedených na www.zf.jcu.cz/studenti/informace-pro-studujici/ podle následující osnovy:

1. Úvod - význam řešené problematiky včetně uvedení cílů práce
2. Literární přehled - současný stav poznání problematiky s ohledem na cíle práce, zpracovaný na základě studia vědecké a odborné literatury, případně grafické či tabulkové porovnání výskytu RIL v České republice a v evropských zemích
3. Závěr - shrnutí získaných informací, návrhy a doporučení vyplývající z problematiky
4. Summary - přehled a nejdůležitější výsledky včetně klíčových slov (v anglickém jazyce)
5. Seznam literatury - podle zásad ČSN 01 0197, ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2.

Rozsah grafických prací: 5-10 stran (tabulky, grafy)
Rozsah pracovní zprávy: 25-30 stran textu
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- COLAK H. et al.: Some residues and contaminants in milk and dairy products. *Asian Journal of Chemistry*, 2007, 19 (3): 1789-1796.
- LEE M.H. et al.: Public health risks: Chemical and antibiotic residues - Review. *Asian-Australasian Journal Of Animal Sciences*, 2001, 14 (3): 402-413.
- NAVRÁTILOVÁ, P.: Problematika reziduí inhibičních látek v syrovém kravském mléce. *Veterinářství*, 2002, 52 (478-481). <http://www.vetweb.cz/projekt/clanek.asp?cid=1651&pid=2>
- Databáze CASLIN, Česká zemědělská bibliografie, CAB Abstracts, PROQUEST, dostupné na: <http://www.lib.jcu.cz/cs/databaze>
- Publikace v časopisech *Mlékařské listy*, *Náš chov*, *Výzkum v chovu skotu* a ve sbornících z odborných konferencí - př. *Den mléka* (Praha: ČZU), *Ingrový dny* (Brno: MENDELU) a vybrané sborníky vydávané VÚCHS v Rapotíně a VÚŽV v Praze-Uhřetěvsi
- *Zákony, vyhlášky a nařízení legislativy ČR a EU týkající se zásad a požadavků na jakost a zdravotní nezávadnost živočišných produktů*

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Eva Samková, Ph.D.
Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů
Konzultant bakalářské práce: RNDr. Marcela Vyleťelová, Ph.D.
VUCHS, s.r.o., Vikýřovice, odd. mikrob.

Datum zadání bakalářské práce: 14. března 2011
Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2012

prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentů 13
370 01 L.S. ke Budějovicím

prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 14. března 2011

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Problematika inhibičních látek v kravském mléce“ vypracovala samostatně a použila jen zdrojů, které cituji a uvádím v příloženém seznamu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 30. 4. 2012

Podpis studenta.....

Děkuji paní ing. Evě Samkové, Ph.D. za odborné vedení, rady a pomoc, které mi poskytla při zpracovávání této bakalářské práce.

Dále velmi děkuji paní MVDr. Lucii Hasoňové, Ph.D. za ochotu a cenné připomínky.

ABSTRAKT

Mléko, u nás nejčastěji používané mléko kravské, je velmi důležitou potravinou. Jeho význam spočívá v obsahu hodnotných bílkovin, lehce stravitelného mléčného tuku, laktózy, vitamínů a minerálních látek.

Kvalitu syrového kravského mléka charakterizuje soubor znaků, mezi které patří např. celkový počet mikroorganismů, počet somatických buněk, obsah základních složek (tuk, bílkovina, laktóza, tukuprostá sušina), bod mrznutí či výskyt nežádoucích cizorodých a inhibičních látek.

Rezidua inhibičních látek (RIL) jsou jedním z hlavních kritérií hygienické jakosti syrového mléka, kde se mohou vyskytovat např. v důsledku prevence a léčby mastitid. Mezi největší rizika přítomnosti RIL v potravinách a surovinách živočišného původu, tedy i mléka patří riziko vzniku a šíření bakteriální rezistence, narušení střevní mikroflóry, alergické reakce a toxické účinky RIL jak v humánní, tak veterinární medicíně.

Inhibiční látky mají tlumivý vliv na rozvoj a aktivitu mikroorganismů. V mlékárenském průmyslu především ovlivňují aktivitu mlékařských kultur, tím způsobují značné problémy ve výrobě. Jejich přítomnost v mléce způsobuje problémy při výrobě sýrů, zakysávání jogurtů a dalších fermentačních procesech při zpracování mléka.

Prevence výskytu RIL závisí především na dodržování základních chovatelských a veterinárních opatření při používání léčiv a přípravků, na technologické kázní v prvovýrobě a pravidelné a striktní kontrole mléka na přítomnost RIL od prvovýroby až po zpracování, kdy se využívá různých screeningových metod jejich detekce.

Je velmi důležité zabývat se problematikou RIL v mléce v souvislostech norem kvality, legislativy národní a legislativy Evropské unie a sledovat metody, které se používají při jejich zjišťování, detekci a ověřování.

Klíčová slova:

inhibiční látky, rezidua, maximální reziduální limity, kontaminanty

ABSTRACT

Milk, in our territory frequently used cow's milk, is very important nutrient. Its importance consists in the contents of valuable proteins, easily digestible milk fat, lactose, vitamins and minerals.

The quality of raw cow's milk is characterised by many indicators, for example total number of microorganisms, number of somatic cells, content of basic constituents (fat, protein, lactose, non-fat solids), freezing point or occurrence of undesirable foreign and inhibitory substances.

Residuals of inhibitory substances (RIS) are one of the main criteria of raw milk hygienic quality, where they can appear for example due to prevention and treatment of mastitis. The risk of occurrence and spread of bacterial resistance, disruption of intestinal microflora, allergic reactions and RIS toxic effects, both in human and veterinary medicine, belong among the biggest risks of RIS presence in food and raw materials of animal origin, including milk.

Inhibitory substances have an inhibiting effect on development and activity of microorganisms and in particular in milk industry they affect the activity of dairy cultures causing significant production problems. Their presence in milk causes problems when producing cheese, during fermentation of yoghurts and other fermentation during milk processing.

Prevention of RIS occurrence depends especially on adherence to basic breeding and veterinary measures when using drugs and medicines, on technology discipline in primary production and regular and strict control of RIS contents in milk from the primary production up to processing when various screening detection methods are used.

It is very important to deal with the matter of RIS in milk in connection with quality standards, national legislation and European Union legislation and to control methods used for their detection and verification.

Key words:

inhibitory substances, residues, maximum residual limits, contaminants

SEZNAM ZKRATEK

ADI	Akceptovatelný denní příjem
ATB	Antibiotika
BMK	Bakterie mléčného kysání
CPM	Celkový počet mikroorganismů
ČMK	Čisté mlékařské kultury
ČSN	Česká státní norma
ELFO	Elektroforéza
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency
IDF	International Dairy Federation
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
HPLC/DAD	High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection
HPLC/MS/MS	High-Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry
IL	Inhibiční látky
MRL	Maximum residue level
NRL	Národní referenční laboratoř
OL	Ochranná lhůta
PSB	Počet somatických buněk
PNC	Penicilin
RIA	Radio Imunno Assay
RIL	Rezidua inhibičních látek
SVÚ	Státní veterinární ústav

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	CÍL PRÁCE	9
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1	Rozdělení inhibičních látek	11
3.1.1	Přirozené inhibiční látky	11
3.1.2	Kontaminanty.....	13
3.2	Výskyt a hodnocení inhibičních látek v mléce	17
3.2.1	Maximální reziduální limity.....	19
3.3	Rizika spojená s výskytem RIL v mléce	21
3.3.1	Technologická rizika RIL.....	21
3.3.2	Hygienická rizika RIL	22
3.4	Prevence výskytu RIL v mléce	23
3.4.1	Zásady prevence výskytu RIL v prvovýrobě.....	23
3.4.2	Zásady prevence výskytu RIL v mlékárenském průmyslu	27
3.5	Testy a metody detekce RIL v mléce	28
3.5.1	Plošné monitorování - screeningové metody	28
3.5.1.1	Selektivní rychlotesty	29
3.5.1.2	Širokospektrální rychlotesty	33
3.5.1.3	Mikrobiologické plotnové metody	37
3.5.2	Cílené vyšetřování	38
3.5.2.1	Fyzikálně chemické metody.....	38
3.5.2.2	ELISA metody.....	40
3.6	Organizace kontroly kvality mléka.....	41
3.6.1	Zkušební mléčné laboratoře	42
3.6.2	Národní referenční laboratoř Jihlava.....	43
3.7	Legislativa	44
4	ZÁVĚR	47
5	SEZNAMY POUŽITÝCH ZDROJŮ	48
5.1	Seznam použité literatury	48
5.2	Seznam tabulek.....	53
5.3	Seznam grafů	53
5.4	Seznam obrázků.....	54

1 ÚVOD

Kravské mléko, ale i mléčné výrobky, jsou velice hodnotným a dobře vstřebatelným zdrojem vápníku (využitelnost až 30 %). Z dalších minerálních látek obsažených v kravském mléce můžeme jmenovat např. měď, železo, hořčík, mangan, fosfor, draslík, selen, sodík a zinek. Mléko obsahuje také řadu vitamínů: vitaminy A (retinol), B₁ (thiamin), B₂ (riboflavin), B₃ (niacin), B₅ (kyselina panthotenová), B₆ (pyridoxin), B₁₂ (kobalamin), C (kyselina askorbová), D (kalciferol), E (tokoferol), K (fylochinon) a foláty, které řadíme mezi významné bioaktivní složky potravy, protože přispívají ke správné výživě všech generací (WATZKOVÁ a kol., 2010).

Základní podmínkou kvality mléka a mléčných výrobků a jejich zdravotní nezávadnosti je nákup hygienicky nezávadné suroviny. Surové kravské mléko musí pocházet od výrobců, kteří splní požadavky na produkci a dodávky mléka pro lidskou výživu.

Při tvorbě mléka, během dojení, při ošetřování mléka po nadojení, ale i při jeho dalším zpracování včetně balení mohou do mléka přecházet nežádoucí, tzv. cizorodé látky. Mezi tyto zahrnujeme látky přídatné, znečišťující a rezidua cizorodých látek úmyslně používaných v zemědělské a potravinářské výrobě. Závažným problémem je výskyt reziduí inhibičních látek, jejichž přítomnost v syrovém kravském mléce zvyšuje zdravotní rizika u spotřebitele, přináší technologické problémy při zpracování mléka, ale může mít i negativní dopad na životní prostředí.

Výskyt reziduí inhibičních látek v mléce souvisí s rozšířeným používáním veterinárních léčiv, s nedodržováním ochranných lhůt, se změnou metabolismu nemocného zvířete, popř. s nedůsledným vylučováním mléka léčených zvířat z dodávky. Jedním z problémů v lékařství je rostoucí rezistence patogenních mikroorganismů k antimikrobiálním látkám. Vznikající počet rezistentních kmenů bakterií je způsoben neuváženým podáváním antibiotik k léčbě infekcí v humánní i ve veterinární medicíně. Více než polovina celkové spotřeby antibiotik nachází využití právě v zemědělství.

Mezi nejdůležitější preventivní opatření výskytu reziduí inhibičních látek v mléce v první řadě patří striktní dodržování zootechnických a veterinárních zásad používání léčiv, zejména antibiotik a sulfonamidů a v druhé řadě používání screeningových metod detekce reziduí inhibičních látek jak v prvovýrobě, tak i v příjmových laboratořích mlékáren.

2 CÍL PRÁCE

1. Literární přehled na téma inhibiční látky, jejich rozdělení, nejvýznamnější druhy a četnost výskytu.
2. Popis základních problémů způsobovaných rezidui inhibičních látek.
3. Seznámení se s nejčastěji používanými metodami detekce inhibičních látek.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

Zdravotní nezávadnost, jakost a nutriční hodnota mléčných výrobků je podmíněna nákupem hygienicky nezávadné suroviny. Jedním z hlavních kritérií hygienické jakosti syrového mléka je absence reziduí látek, které se do mléka dostávají v důsledku prevence a tlumení mastitid, a minimální kontaminace mléka látkami z vnějšího prostředí (NAVRÁTILOVÁ, 2002).

Pojmem inhibiční látky jsou označovány látky mající tlumivý vliv na rozvoj a aktivitu mlékařských kultur a zákysů (HOLEC, 1994).

GAJDŮŠEK (1994) uvádí, že syrové mléko vždy obsahuje přirozené inhibiční látky, které jsou za normálních podmínek pasterací mléka inaktivovány. Při zvýšených koncentracích však nejsou inaktivovány zcela a zhoršují kysací schopnost mléka. Zvýšené koncentrace přirozených inhibičních látek jsou zjišťovány v mastitidním mléce, mlezivu nebo mléce starodojných krav, ale i po vakcinaci dojnic. Podle GAJDŮŠKA (1994) všechna tato mléka mají také více nebo méně změněné složení a vlastnosti a tím i horší zpracovatelnost.

Podle NAVRÁTILOVÉ (2002) je dalším z problémů rostoucí rezistence patogenních mikroorganismů k antimikrobiálním látkám. Vzrůstající počet rezistentních kmenů bakterií je způsoben neuváženým podáváním antibiotik k léčbě infekcí v humánní i ve veterinární medicíně. Důležitým krokem k prevenci přítomnosti antimikrobiálních látek v mléce jsou důsledná opatření v prvovýrobě mléka a využívání screeningových metod detekce reziduí inhibičních látek (RIL).

Výše technologických i hygienických rizik RIL závisí na druhu antibiotik (ATB), na jejich biologických zvláštěnostech i na jejich koncentraci v mléce (NAVRÁTILOVÁ, 2002).

Rezidua antibiotik ohrožují lidskou populaci jako významné alergeny. I když se tvrdí, že alergizují jen parenterálně aplikovaná antibiotika, nelze vyloučit, že cirkulace reziduí antibiotik vede k permanentní alergizaci. Je třeba si uvědomit, že většina antibiotik je vysoce termorezistentních, takže mohou zůstat v mléce i po účinné pasteraci. Nelze opomenout ani potenciální nebezpečí vzniku bakteriální rezistence vůči antibiotikům. Vznik a šíření rezistence je největší v zemích, kde jsou antibiotika laikům volně dostupná (RYŠÁNEK, 2007).

3.1 ROZDĚLENÍ INHIBIČNÍCH LÁTEK

Jakost mléka je charakterizována souborem vlastností (smyslových, fyzikálních, mikrobiologických, hygienických a technologických), chemickým složením a výživovou hodnotou. Jedním z nejdůležitějších sledovaných znaků hygienické jakosti mléka je přítomnost RIL.

Mezi rezidua zahrnujeme veškeré látky obsažené ve farmakokinetickém přípravku nebo jejich metabolity, které zůstávají v mase nebo dalších potravinách pocházejících ze zvířat po podání příslušného přípravku (NAVRÁTILOVÁ, 2011).

Pod pojmem inhibiční látky rozumíme látky, které svými baktericidními, případně bakteriostatickými účinky znesnadňují nebo úplně znemožňují zpracování mléka na mléčné výrobky, při jejichž výrobě se používají čisté mlékařské kultury (ČMK). Obecně tak můžeme označit látky, které mají tlumivý vliv na rozvoj a aktivitu těchto mlékařských kultur a v případě, že se nachází v mléce ve vyšších než v minimálních koncentracích (vzhledem k použitým ČMK), projeví se jejich účinek během technologického zpracování mléka (NAVRÁTILOVÁ, 2002).

Jedná se o řadu zpravidla cizorodých substancí typu antibiotik, ostatních léčiv, dezinfekčních a sanitačních prostředků, těžkých kovů, chlorovaných syntetických látek, jiných chemikálií, přirozených inhibitorů, atd. (DOLEŽAL a kol., 2000).

Inhibiční látky v mléce můžeme rozdělit na látky přirozeně se vyskytující a kontaminanty (SAMKOVÁ, 2010).

3.1.1 Přirozené inhibiční látky

Složení mléka a obsah jeho jednotlivých složek se v průběhu laktace mění, charakteristicky se vyvíjí od porodu až do zaprahnutí. Některé druhy nezralých mlék mohou mít inhibiční účinek, např. mlezivo produkované těsně před porodem a prvních 10 dní po porodu nebo mléko starodojné - v posledních týdnech před zaprahnutím, kdy se vlastnosti zralého mléka podstatně mění (HOLEC, 1989).

Dle URBANA (1997) jsou mlezivem mláďeti zajišťovány jak živiny, tak především protilátky a jiné biologicky aktivní látky nutné pro jeho přežití a odolnost. Složení mleziva se po porodu rychle mění, např. obsah imunoglobulinů klesne za 12 hodin na 40 %, po 48 hodinách na 10 % a po 72 hodin až na 2 % původního množství, které se pohybuje cca 6 %.

Nespecifické antibakteriální faktory (obranný systém mléčné žlázy), které jsou zvýšené u mastitid a mleziva, mohou způsobit falešně pozitivní výsledky testů, zejména při testování jednotlivých krav (HONKANEN-BUZALSKI, 2000).

Mezi přirozené inhibiční látky v mléce řadíme některé antibakteriální složky mléka, které jsou součástí ochranného systému mléčné žlázy např. specifické imunoglobuliny, lysozym, laktoferin, laktoperoxidázový systém (SAMKOVÁ, 2010).

Obranný systém mléčné žlázy (Tab. 1.):

Imunoglobuliny (Ig) patří mezi glykoproteiny, mají schopnost vázat antigen a plní tak v organismu obrannou funkci (usnadňují fagocytózu, rozrušují buňky nebo neutralizují toxiny). Imunoglobuliny rozdělujeme na:

IgG - IgG1 - 73 % Ig, v mlezivu je ještě zvýšený, IgG2 - 2,5 % Ig;

IgA - 18 % Ig je předáván mateřským mlékem;

IgM - 6,5 % Ig;

IgE (<http://www.Colostrum-Info.cz/>; staženo 2. 2. 2012).

Lysozym (muramidáza) - je enzym ze skupiny hydroláz, má schopnost narušovat stěnu některých bakterií v důsledku štěpení glykosidické vazby mukoproteinů obsažených v této stěně, zvyšuje baktericidní aktivitu fagocytů. Často působí ve spojení s imunoglobuliny nebo laktoferinem.

Laktoferin - globulární glykoprotein, jeho bakteriální účinky spočívají ve schopnosti odnímat některým bakteriím železo. Téměř všechny bakterie potřebují železo ke svému množení. Laktoferin toto železo navíc odevzdává červeným krvinkám (<http://www.Colostrum-Info.cz/>; staženo 2. 2. 2012).

Laktoperoxidázový systém tvoří:

- laktoperoxidáza - přirozený enzym mléka patřící do skupiny oxidoreduktáz. V přítomnosti thiokyanátu katalyzuje laktoperoxidáza rozklad peroxidů na další produkty, které mají baktericidní účinky;

- thiokyanát - tvoří se při krmení zeleným objemným krmivem, nejčastěji z luštěnin;

- peroxid vodíku - produkt některých bakterií - např. streptokoků.

Tabulka 1. Obsah jednotlivých složek obranného systému mléčné žlázy

Složka	Obsah (g/l), (*g/kg)		Zdroj
	Mléko	Mlezivo	
Imunoglobuliny	0,65 0,6	20-120 32	SAMKOVÁ (2010) URBAN (1997)
Lysozym	0,1-0,2		SAMKOVÁ (2010)
Laktoferin	0,2 0,01*	7 1,1250*	SAMKOVÁ (2010) VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ (2009)
Laktoperoxidázový systém	0,03		SAMKOVÁ (2010)

Ostatní přirozené látky s inhibičním účinkem:

Somatické buňky jsou buňky z vemene obsažené v mléce, tvořené především buňkami bílé krevní řady: makrofágy, neutrofilními granulocyty, lymfocyty, dále buňkami sekrečního epitelu, epitelovými buňkami mléčných cisteren, ze strukového kanálku a z kůže struku (SAMKOVÁ, 2010). V menším zastoupení to jsou eozinofily, bazofily, erytrocyty, histiocyty, plazmatické buňky, žírné buňky.

Při zánětech mléčné žlázy dochází ke zvýšení obsahu přirozených antibakteriálních látek, zvýšení počtu somatických buněk, které mohou následně působit inhibičně (SAMKOVÁ, 2010).

Volné mastné kyseliny - zvýšený obsah v individuálních vzorcích mléka signalizuje metabolické problémy (energetický deficit ve výživě, negativní energetickou bilanci v první fázi laktace, ketózy) nebo zdravotní problémy dojnic jako jsou mastitidy (<http://www.csmch.cz>, staženo 4. 2. 2012).

Volné mastné kyseliny v mléce mají výrazně antimikrobiální účinek a vliv na výsledek positivity testu. Objevuje se to zejména tehdy, kdy je mléčný tuk degradován během nevhodného skladování. Mléka, která obsahují vysoká množství mléčné bílkoviny a tuku, mohou vykazovat falešně pozitivní výsledky RIL. Také mléka dojnic po vakcinaci obsahují identifikovatelná množství přirozených obranných látek, které mohou mít vliv na pozitivní výsledek testu RIL (SEYDLOVÁ, 1998).

Příkladem působení přirozených inhibičních látek je baktericidní fáze mléka, jejíž délka a účinnost je individuální, závisí např. na zdravotním stavu dojnic a trvá 0,5-6 hodin po nadojení. Z důvodu působení těchto látek se tedy čerstvě nadojené mléko, bez inaktivace záhřevem chová, jako mléko pozitivní na RIL. Tyto látky jsou snadno degradovatelné pasterací záhřevem na 82-83 °C po dobu 3 minut (SEYDLOVÁ, 1998).

3.1.2 Kontaminanty

Veterinární léčiva jsou farmakologicky a biologicky aktivní chemické látky určené především k léčbě a prevenci onemocnění u zvířat. V současné době jsou tato v živočišné výrobě využívána ve velkém měřítku (BOTSOGLOU a FLETOURIS, 2001).

Nejvýznamnější a nejpoužívanější skupinu veterinárních léčiv tvoří antimikrobiální látky, zejména antibiotika a chemoterapeutika.

Rezidua inhibičních látek, která se do mléka dostávají z vnějšího prostředí, jsou tzv. cizorodé, kontaminující látky. Nejvýznamnějším zdrojem RIL jsou látky, které mají i v malých koncentracích silný inhibiční účinek - antibiotika, sulfonamidy a další biologicky aktivní látky (NAVRÁTILOVÁ, 2002).

Antibiotika (ATB)

Podle VOTAVY (2005) je termínem antibiotikum označován lék, který usmrcuje některé mikroorganismy nebo brání jejich růstu. Ačkoliv se dříve termín užíval jen pro antimikrobiální látky přírodního původu (a pro ostatní se užíval termín chemoterapeutika), v současné době se velmi často užívá pro všechny látky s tímto účinkem bez ohledu na jejich původ. ATB tvoří 2 hlavní skupiny – skupina bakteriostatická (např. sulfonamidy, tetracykliny) a skupina baktericidní (např. peniciliny, cefalosporiny).

První využití ATB ve veterinární medicíně, při léčbě mastitid je zaznamenáno již v roce 1938, kdy byl použit sulfonamid, v roce 1948 penicilin G (NAVRÁTILOVÁ, 2011).

Rozdělení ATB pro potravinová zvířata bylo poprvé prezentováno v roce 2006 na jednání Světové organizace pro zdraví zvířat - Office of international education (OIE) skupiny pro antimikrobiální rezistenci. Na základě dvou kritérií, (1. více než 50 % členských zemí považuje danou antimikrobiální třídu za důležitou, 2. jednotlivé substance v rámci třídy jsou nezastupitelné pro určité infekce anebo je pro ně jen velmi málo alternativních látek), byla veterinární ATB rozdělena do třech kategorií (Tab. 2.):

1. Veterinární kriticky významná ATB - splněna obě kritéria;
2. Veterinární vysoce významná ATB - splněno jedno ze dvou kritérií;
3. Veterinární významná ATB - není splněno ani jedno kritérium.

Tabulka 2. Rozdělení ATB pro potravinová zvířata (<http://www.vri.cz>, staženo 2. 2 2012)

Kriticky významná ATB	Vysoce významná ATB	Významná ATB
Aminoglykosidy	Ansamiciny	Novobiocin
Beta-laktamy	Fosfomyciny	
Cefalosporiny	Linkosamidy	
Makrolidy		
Amfenikoly		
Chinolony		
Tetracykliny		
Sulfonamidy		

ATB jsou v chovu mléčného skotu široce používána při léčbě onemocnění. Nejvíce používaná jsou beta-laktamová ATB samotná nebo v kombinaci s aminoglykosidy, aminoglykosidová ATB a méně často tetracyklinová ATB. Rezidua těchto léčiv v mléce patří mezi nejčastěji detekovaná v ČR a ostatních zemích. K nejčastěji používaným aminoglykosidovým ATB v produkci potravin u zvířat patří gentamycin, neomycin, dihydrostreptomycin a streptomycin. Všechny aminoglykosidy mají známé toxikologické účinky, jako jsou ototoxicita a nefrotoxicita (COLAK, 2007). Screeningové testy nedetekují aminoglykosidová ATB s vyhovující citlivostí vzhledem k MRL.

Beta-laktamy a cefalosporiny působí baktericidně tím, že brzdí syntézu buněčné stěny mikroorganismů. Organismy rezistentní vůči těmto lékům si vyrábějí enzym beta-laktamázu, obvykle mezi ně patří gramnegativní bakterie (G-). Penicilin G má úzké spektrum na grampozitivní bakterie (G+), které vytváří penicilinázu (specifický typ beta-laktamázy). Ampicilin, amoxicilin, carbanicilin, carbenicilin-indanyl, mezlicilin a ticarcilin mají široké spektrum a jsou na penicilinázu citlivé. Oxacilin, kloxacilin, dikloxacilin a nafcilin mají úzké spektrum, ale rezistenci vůči penicilináze. Cefalosporiny mají široké antibakteriální spektrum a používají se k tlumení nákaz, včetně mastitid (LEE, 2001).

Tetracykliny jsou ATB s širokým spektrem antimikrobiálního účinku čteně využívaná v živočišné výrobě. Ve veterinární praxi se u hospodářských zvířat rutinně používají především oxytetracyklin, chlortetracyklin, tetracyklin a doxycyclin. (NAVRÁTILOVÁ a kol., 2007). Kvantitativní obsah tetracyklinů v mléce závisí na počtu aplikací přípravku a je také ovlivněn užitkovým typem skotu (SHALAK, 2010). Tetracykliny jsou bakteriostatické se širokým spektrem léčebných koncentrací (LEE, 2001).

Podle HOLCE (1994) mléčná žláza při léčbě v laktaci vylučuje až 80 % aplikovaných ATB. Koncentrace podléhá dynamickým zákonům eliminace těchto látek z organismu. Nejvyšší je krátce po aplikaci, pak se postupně snižuje až do praktického vymizení. Nejčastěji dochází ke kontaminaci mléka ATB po intramamární příp. intracisternální léčbě chorob mléčné žlázy. Obecně preparáty rozpuštěné ve vodě nebo v jednoduchých olejových suspenzích mají kratší vylučovací dobu, než ATB rozptýlené v tucích. U depotních forem preparátů trvá vylučování nepoměrně déle. Při aplikaci ATB pouze do jedné nebo několika čtvrtí přecházejí tyto i do mléka neléčených čtvrtí, a to tak, že po resorpci do krevního oběhu se vylučují mlékem i ze čtvrtí neléčených, a to až v téměř stejných koncentracích, jako ze čtvrtí léčených (HOLEC, 1994).

SEYDLOVÁ (1998) uvádí, že kontaminanty se dostávají do mléka krevním oběhem a dále poté cestou galaktoforézy. Jejich vylučování závisí na koncentraci účinné látky, způsobu dávkování, místě a četnosti aplikace a stanovené ochranné lhůtě (OL). Důležitý faktor ovlivňující dobu vylučování je míra postižení tkáně při intramamární aplikaci. Čím je narušení tkáně vyšší, tím stoupá pravděpodobnost delší doby záchytu RIL, než stanoví OL. Je prokázáno, že při opakovaném antibiotickém ošetření mléčné žlázy jsou RIL v mléce rovněž déle, než uvádí OL. Tato je stanovována z aplikací léčiv zdravým zvířatům, u nemocných je vylučování i přetrvávání podstatně delší. Podle SEYDLOVÉ (1998) se nálezy RIL mohou vyskytovat při aplikaci děložních čípků do dlouhodobě postižené tkáně. Do mléka se dostávají i ATB aplikovaná na povrch těla dojnice (hnisavá ložiska, ošetření paznehtů) ve formě ATB mastí a dezinfekčních sprejů. Jsou známy i případy, kdy hromadný postřik proti vším způsobil pozitivní nález RIL.

Sulfonamidy

Působí bakteriostaticky, mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici syntézy kyseliny dihydrolistové. Spektrum účinku je obvykle středně široké, liší se farmakokinetickými vlastnostmi. Mechanismus vylučování sulfonamidů z mléčné žlázy je obdobný jako u ATB. Citlivost kysacích kultur k sulfonamidům však není tak vysoká, jako u ATB (HOLEC, 1994).

NAVRÁTILOVÁ (2008) uvádí, že pro léčiva, která jsou registrována pro používání u potravinových zvířat, se předepisují takové OL, během kterých by se množství reziduí mělo snížit na hladinu neohrožující zdraví konzumenta (<MRL).

Ostatní inhibiční látky

Fytoncidy jsou látky rostlinného původu, tzv. rostlinná antibiotika vyšších rostlin. Patří mezi ně silice, alkaloidy, třísloviny, enzymy. Vyskytují se např. u hořčice rolní či řepky olejky. Je prokázán negativní vliv zvýšených obsahů glukosinolátů z vysokých dávek zkrmovaných řepkových výlisků, lisovaných za studena. Glukosinoláty, či přesněji řečeno řada produktů jejich enzymového či chemického štěpení, jsou významnými škodlivými složkami krmiv. To se týká především semene řepky a některých příbuzných olejnin. Předávkování má vliv na neúměrné prodlužování baktericidní fáze mléka a průkaz RIL. Je prokázáno, že konkrétně obsahy řepkových produktů v krmné dávce by měly být přísně limitovány (SEYDLOVÁ, 1998).

Mykotoxiny jsou škodlivé látky produkované zejména plísněmi, (tzn. mikroskopickými vláknitými houbami). Je známo více než 350 druhů toxinogenních plísní, z nichž řada produkuje více než jeden mykotoxin. Mykotoxiny jsou často členěny podle hlavních producentů, kterými jsou plísně rodů *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Např. plísně rodu *Aspergillus* produkují aflatoxiny a do mléka se dostávají zkrmováním zaplísněných krmiv. Silně zaplísněná krmiva tak mohou být příčinou přechodu nevhodných až škodlivých látek do mléka a působit v něm inhibičně (HOLEC, 1994).

Pesticidy mohou také působit inhibičně. Jak HOLEC (1994) uvádí, ale až v takových koncentracích, které se v mléce vyskytnou v ojedinělých havarijních případech.

Sanitační prostředky, nevhodné jsou především prostředky na bázi fenolu a formalínu. Podle HOLEC (1994) přecházejí z nedokonale opláchnutých zařízení, ale i z povrchu struků zbytky čistících a dezinfekčních látek do mléka, jejichž škodlivost se může projevit inhibicí mlékařských kultur. Mechanismus průniku těchto látek do mléka spočívá v opláchnutí jejich ulpívajícího filmu z povrchů nejrůznějších zařízení do mléka. Takové situace nastávají při nesprávném sanitačním režimu ve výrobě, transportu i zpracování mléka.

3.2 VÝSKYT A HODNOCENÍ INHIBIČNÍCH LÁTEK V MLÉCE

Z více než 90 % je výskyt RIL zapříčiněn používáním veterinárních léčiv, nejčastěji ATB a chemoterapeutik, která se využívají k léčbě zvířat, příp. v medikovaných krmných směsích, dále to mohou být antiparazitární léčiva, antipyretika, analgetika aj. (SAMKOVÁ, 2010).

Dle NAVRÁTILOVÉ (2012) jsou příčiny pozitivních nálezů RIL v mléce následující:

- asi 95 % pozitivního záchytu RIL způsobují ATB jako důsledek léčby mastitid a jiných onemocnění u dojnic;
- 2,5 % může být způsobeno jinými léčivy, např. sulfonamidy, případně dezinfekčními a čisticími prostředky;
- 1 % mykotoxiny z krmiv;
- 1 % agrochemikálie - herbicidy, pesticidy;
- 0,5 % fytoncidy.

Podle NAVRÁTILOVÉ (2011) jsou hlavní důvody pro kontrolu mléka na RIL především:

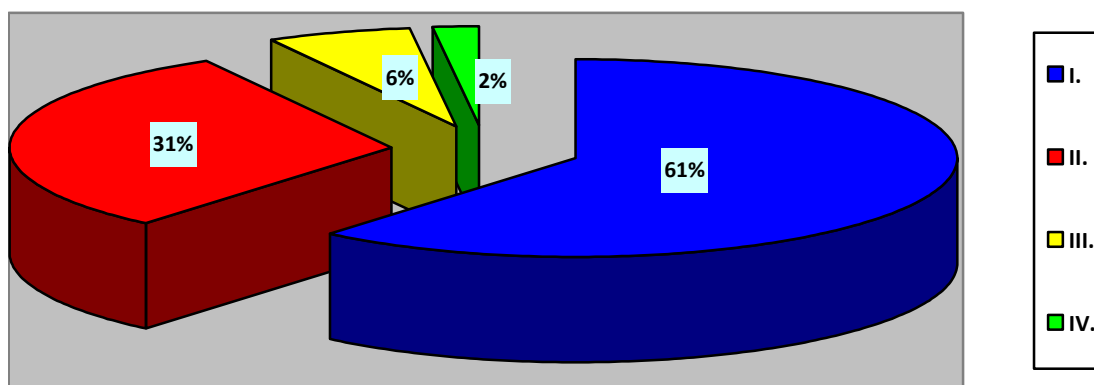
- etické (zabránění nedobrovolné expozici konzumentů terapeutickým dávkám léčiv v potravinách);
- hygienické (ochrana před možnými škodlivými účinky reziduí na zdraví konzumenta);
- technologické (prevence narušení fermentačních procesů v mlékárenském průmyslu);
- ekologické.

Nejčastější příčiny nálezů RIL v mléce představuje Tab. 3. a Graf 1. (SEYDLOVÁ, 1998).

Tabulka 3. Důvody pozitivních nálezů RIL v mléce

Důvody pozitivního nálezu	
I.	Nedodržení ochranné lhůty po aplikaci ATB Záměna ATB určených k aplikaci v době zaprahlosti na léčení v době laktace Nedostatečné označení léčených dojnic
II.	Krátké období stání na sucho, předčasné otelení Individualita vylučování ATB po ochranné lhůtě
III.	Injekční aplikace Ostatní ošetření Zbytky dezinfekčních prostředků Zbytky prostředků k hubení hmyzu či ochraně rostlin
IV.	Nespecifická inhibice

Graf 1. Důvody pozitivních nálezů RIL v mléce

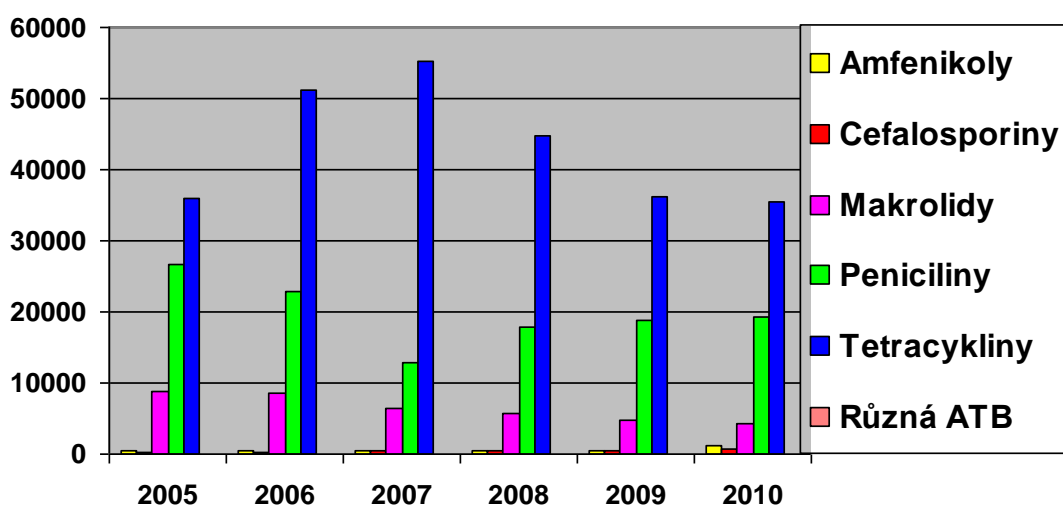


Vývoj používání různých druhů ATB ve veterinární medicíně sleduje Tab. 4. a Graf 2. Současný stav v ČR z hlediska výskytu inhibičních látek v mléce kontinuálně klesá, přičemž některé země EU vykazují frekvenci výskytu pozitivních záchytů IL v rozmezí 0,10-0,20 %. (DOLEŽAL a kol., 2000).

Tabulka 4. Spotřeba ATB v kg, v letech 2005-2010 (NAVRÁTILOVÁ, 2011)

	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Amfenikoly	442	408	530	362	525	1116
Cefalosporiny	338	291	420	547	474	600
Makrolidy	8874	8550	6509	5762	4672	4174
Peniciliny	26591	22935	12964	17865	18770	19247
Tetracykliny	35874	51245	55296	44856	36169	35564
Různá ATB	45	46	30	38	29	34

Graf 2. Spotřeba ATB v kg, v letech 2005-2010



Při sledování vývoje kvality výroby mléka v letech 2003-2010 (Tab. 5.), je zřejmý pokles počtu zachycených pozitivních nálezů RIL. Celkové procentuální zastoupení pozitivních vzorků v rozborech zaměřených na kontrolu kvality mléka se pohybuje na přibližně stejné úrovni.

Tabulka 5. Výsledky rozborů syrového mléka (HLAVÁČEK, 2012).

	<u>2003</u>	<u>2004</u>	<u>2007</u>	<u>2010</u>	<u>2011*</u>
Počet stád nad 20 ks	2967	2747	1787	1347	1220
Počet dojnic	447462	422518	331574	503165	419614
Průměr dojnic ve stádě	150,8	153,8	186,0	374	344
RIL – vyšetřené vzorky	103480	106488	33930	46319	29983
RIL - pozitivní	251	195	76	63	30
RIL - % pozitivní	0,24	0,18	0,20	0,14	0,10
	<u>2003</u>	<u>2004</u>	<u>2007</u>	<u>2010</u>	<u>2011*</u>
Počet stád do 20 ks	1277	1130	547	349	349
Počet dojnic	13861	12649	6321	8024	8329
Průměr dojnic ve stádě	10,9	11,2	12,0	23	24
RIL - vyšetřené vzorky	40000	39170	294	13637	84590
RIL - pozitivní	41	30	10	8	5
RIL - % pozitivní	0,10	0,08	0,10	0,06	0,10

* leden - září

3.2.1 Maximální reziduální limity

Maximálním reziduálním limitem (MRL) se rozumí maximální koncentrace rezidua vytvořená po aplikaci veterinárního léčivého přípravku, která je stanovena jako bezpečná pro konzumenta v potravinách, vyjádřena v mg/kg nebo µg/kg suroviny, kterou lze uznat v potravinách za legálně povolenou nebo přijatelnou. Při překročení MRL se potravina nebo suroviny nepovažuje za zdravotně nezávadnou (NAVRÁTILOVÁ, 2011).

Klasifikace farmakologicky účinných látek podle MRL v potravinách živočišného původu uvádí Nařízení Komise (EU) č. 37/2010. U potravinových zvířat smí být použita výlučně taková léčiva, která obsahují farmakologicky aktivní látky, pro které EMA (Evropská agentura pro léčiva) v souladu s Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009 stanovila pro daný druh léčiva MRL (NAVRÁTILOVÁ, 2012).

Předpisy EU stanovují v mléce MRL u řady substancí. V současnosti však neexistuje metoda umožňující detekovat všechny tyto substance ve stanovených hladinách. Proto byl IDF (International Dairy Federation) vyvinut tzv. integrovaný systém kontroly ATB v mléce, jehož cílem je zajištění kvalitní suroviny pro mlékárenské zpracování a zabezpečení zdravotní nezávadnosti mléka a mléčných výrobků pro spotřebitele (NAVRÁTILOVÁ, 2002).

Vzhledem k exportu mléčných výrobků i do zemí mimo EU, např. Ruské federace, je nutné sledovat a řídit se požadavky těchto odběratelů, viz. Tab. 6.

Tabulka 6. Požadavky na hygienické limity RIL v syrovém mléce EU / RF

Antibiotika	MRL - Požadavky RF (µg/kg)	MRL- Požadavky EU (µg/kg)	
Chloramfenikol	10	Nepovolen	
Tetracyklinová ATB	10	Chlortetracyklin	100
		Oxytetracyklin	100
		Tetracyklin	100
Streptomycin	500	Streptomycin	200
		Dihydrostreptomycin	200
Beta-laktamová ATB	10		4
		Penicilin	4
		Amoxycilin	4
		Ampicilin	30
		Kloxacilin	30
		Dikloxacilin	30
		Nafcilin	30
		Oxacilin	

3.3 RIZIKA SPOJENÁ S VÝSKYTEM RIL V MLÉCE

3.3.1 Technologická rizika RIL

Podle HOLCE (1989) inhibiční látky značně ovlivňují a narušují technologické vlastnosti mléka, jako jsou sýřitelnost a kvasnost, kterých se využívá při výrobě sýrů a fermentovaných mléčných výrobků. Kontaminace mléka RIL může způsobit inhibici růstu anebo uhynutí bakterií mléčného kvašení (BMK), které se používají při výrobě másla, jogurtů, sýrů a zakysaného mléka. Tím se naruší průběh sýření, zakysávání a zrání mlékářských technologií. Například při výrobě másla a kyselé smetany narušují rezidua ATB zrání smetany. Nežádoucí mikroflóra se přítomností ATB většinou neničí a inhibice máslové kultury umožňuje větší rozmnožení této nežádoucí mikroflóry. Při nedostatečném růstu kultury se nedostatečně vyvíjí i diacetyl, ovlivňující příjemnou vůni másla. Chuť takového másla je většinou nečistá a prázdná (HOLEC, 1989).

ŠVIRÁKOVÁ a kol. (2005) potvrzuje schopnost BMK používaných v potravinářství inhibovat růst nežádoucích mikroorganismů, patogenů a mikroorganismů způsobujících kažení potravin, produkcí různých druhů antimikrobiálních látek, čímž zvyšují mikrobiální bezpečnost potravin. Antimikrobiální vlastnosti mohou mít kromě kysavých kultur též laktobacily. Kromě produkce kyseliny mléčné a CO₂, jsou některé BMK schopny produkovat i jiné antimikrobiální látky (bakteriociny, diacetyl, peroxid vodíku, ethanol, organické kyseliny). Podle ŠVIRÁKOVÉ a kol. bakteriocin nisin, produkováný kmenem *Lactococcus lactis* inhibuje řadu gram pozitivních bakterií včetně druhů a rodů nežádoucích a patogenních (*Listeria*, *Staphylococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*).

Vliv přítomnosti reziduí tetracyklinu (v koncentracích nižších a blízkých stanovenému MRL) na aktivitu základních mlékařských kultur - smetanové a jogurtové v syrovém kravském mléce sledovali KOSTELNÍKOVÁ a kol. (2008). Z výsledků hodnocení kysací aktivity smetanové kultury u 14 bazénových vzorků syrového kravského mléka s koncentracemi tetracyklinu v rozmezí 0,075-0,45 mg.l⁻¹ vyplynulo, že se vzrůstající koncentrací tetracyklinu klesá titrační kyselost vzorků, i u nejnižších koncentrací tetracyklinu dochází k inhibici růstu a aktivity smetanové kultury. K téměř úplné inhibici dochází při koncentracích 0,40 a 0,45 mg.l⁻¹. Bylo potvrzeno, že koncentrace, které inhibují BMK, bifidobakterie a bakterie propionového kysání, jsou všeobecně vyšší než stanovené MRL. Na aktivitu jogurtové kultury inhibiční účinek tetracyklinu (celkem 7 koncentrací - 0,025-0,2 mg.l⁻¹) neměl velký vliv. Žádná ze zvolených koncentrací tetracyklinu u jogurtové kultury nezpůsobila úplnou inhibici mikroorganismů.

3.3.2 Hygienická rizika RIL

NAVRÁTILOVÁ (2012) uvádí jako hlavní hygienická rizika spojená s výskytem RIL:

- riziko vzniku a šíření bakteriální rezistence;
- negativní vliv na střevní mikroflóru;
- alergické reakce;
- toxické účinky.

Příjem reziduí veterinárního léčiva s účinnou látkou antimikrobní povahy může představovat dvojí riziko pro lidské zdraví. První rizikový faktor spočívá v narušení kolonizace normální intestinální flóry. Druhý faktor představuje možné zvýšení populace rezistentních bakterií a to buď v důsledku získání rezistence dříve citlivých kmenů, nebo relativním zvýšením podílu méně citlivých mikroorganismů (NOVOTNÁ a kol., 2006).

Rezistence vůči ATB se vyskytuje ve dvou typech a to jako primární a získaná:

- Primární rezistence (poměrně vzácná) vůči určitému ATB je dána druhem bakterie a jeho přirozenými vlastnostmi. Bez jakékoli genetické změny je takový druh bakterie rezistentní prostě proto, že pro dané ATB nenese zásahové místo. Například některé gramnegativní bakterie jsou ve srovnání s grampozitivními podstatně méně citlivé na penicilin, jsou však citlivé vůči antibiotikům jiným.
- Získaná rezistence (tj. většina rezistencí) vzniká jako důsledek mutací nebo různých genetických přenosů. Bakterie, kterou původně ATB zabíjelo, najednou začne být odolná (<http://www.vesmir.cz/clanek/rezistence-na-antibiotika>, staženo 5. 2. 2012).

Závažnou otázkou je posuzování alergických reakcí u konzumentů mléka s rezidui ATB. ATB se širokým spektrem účinnosti (tetracykliny, neomycin, streptomycin, bacitracin atd.) nejsou z hlediska senzibilizace (zvýšení citlivosti) velkým potenciálním nebezpečím, přítomnost penicilinu v mléce je ale závažná (ROSIVAL a kol., 1998).

Alergie jsou vyvolány po předchozí senzibilizaci i malou dávkou ATB (nejčastěji u penicilinů). Klinické projevy jsou vyrážky, edémy, horečka, fotodermatózy (kožní onemocnění vyvolané účinkem světla), záchvaty bronchiálního astmatu až anafylaktický šok (vystupňovaná alergická reakce na cizorodé látky, alergeny, doprovázená poruchami krevního oběhu a dýchání). Nebezpečné formy jsou spojeny zejména s parenterálním podáním ATB. V důsledku lokálního podání se lze setkat také s kontaktní alergií (neomycin). Vzácné nejsou ani toxické reakce, na kterých se podílí pomocné látky přítomné v lékových formách (<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Antibiotika>, staženo 5. 2. 2012).

HAUBERT, PROUZA (1991) uvádí, že senzibilizace organismu může vést až k vážným alergickým reakcím, např. rezidua penicilinu mohou vyvolat alergické reakce

s letálním koncem. Největším nebezpečím je ale vznik rezistentních saprofytických a patogenních mikroorganismů, kdy se při léčbě ukazují běžná ATB nebo sulfonamidy jako zcela neúčinná. Dle FOXE (2006) i nízké koncentrace některých ATB, např. $3 \cdot 10^{-6}$ mj. penicilinu mohou u alergiků vyvolat dramatické klinické reakce.

Rezidua inhibičních látek se hromadí nejvíce v játrech a ledvinách, u lipofilních sloučenin (např. pesticidy) v tukové tkáni. Vzhledem k jejich kumulaci v organismu a často dlouhému vylučování se mohou příznaky vyskytovat i po delší době. Řada cizorodých látek má přitom karcinogenní, hepato-, nefro- či neurotoxické účinky, přispívají ke snížené obranyschopnosti organismu a způsobují poruchy reprodukce (SAMKOVÁ, 2010).

3.4 PREVENCE VÝSKYTU RIL V MLÉCE

3.4.1 Zásady prevence výskytu RIL v prvovýrobě

Efektivní přístup prevence výskytu je zavedení HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) - systému kritických kontrolních bodů. Program vymezuje 10 kritických kontrolních bodů, včetně screeningových testů jako prevence reziduí ATB. Těchto 10 bodů je zaměřeno především na choroby, prevenci a řízení léčby ATB, přičemž jeden bod je zaměřen na použití screeningových testů inhibičních látek (SISCHO, 1996).

Jednou z nejčastějších příčin zhoršení kvality mléka a tím přímých a nepřímých ekonomických ztrát v chovech jsou mastitidy. Výskyt tohoto onemocnění ovlivňuje mnoho faktorů, především hygiena, ošetřování, krmění a výživa, technologie a hygiena dojení, stádium laktace a další. Mastitidy vedou ke snížení produkce mléka, jeho znehodnocení (musí být vyloučeno z dodávky), snížení výkupní ceny v důsledku poklesu jeho kvality (zařazení do nižší kategorie), zvýšení nákladů na léčiva a veterinární ošetření.

Mezi nejčastější patogeny mléčné žlázy se zařadila *Escherichia coli*, na vzestupu jsou i mastitidy vyvolané *Streptococcus uberis* (HUML a PAŠKOVÁ, 2003).

Mastitidy lze epidemiologicky rozdělit do dvou skupin:

1. infekční (primárním rezervoárem patogenů je infikovaná mléčná žláza);
2. environmentální (primárním rezervoárem původců je životní prostředí zvířat).

Prevenčí infekčních mastitid je především dezinfekce struků po dojení, léčba krav v době zaprahlosti, vyřazování nemocných kusů, terapie klinických případů mastitid a správné seřízení dojícího aparátu. Terapie v době zaprahlosti je účinná pouze u části případů, způsobených environmentálními streptokoky (HUML a PAŠKOVÁ, 2003).

Pro volbu účinné léčby je jedním ze základních předpokladů průkaz původce mastitidy a stanovení jeho citlivosti k ATB (NOVOTNÁ a kol., 2006).

Mastitida jako nejčastější onemocnění dojníc vyžaduje v mnoha případech terapii antibiotickými přípravky, a to buď pouze intramamárními nebo i v kombinaci s parenterálními (podle klinického stavu zvířete). Používání ATB při léčbě mastitid by se mělo řídit pravidly, která stanovuje antibiotická politika. Antibiotická politika (1999) je soubor opatření pro účinné a bezpečné používání ATB. Jejím cílem je zajistit vysokou odbornou úroveň antimikrobní léčby, omezit vznik a šíření rezistentních mikroorganismů a tak zachovat co nejdelší účinnost ATB. V příloze antibiotické politiky je uvedena kategorizace veterinárních antibiotických léčiv na volná a s indikačním omezením (NOVOTNÁ a kol., 2006). Odpovědnost za provádění nese Státní veterinární správa ČR a Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv (HERA a kol., 2002).

V řadě studií byla při hodnocení výskytu mastitid prokázána různá frekvence výskytu jednotlivých skupin mikroorganismů na kůži struků v období stání na sucho, po porodu a následné laktaci. K ovlivnění dochází také používáním různých desinfekčních prostředků, ale i ATB v době zaprahlosti, stavem mléčné žlázy během jednotlivých fází laktace a úrovni imunitní odpovědi daného jedince. Různorodost spektra původců byla zaznamenána rovněž vzhledem k počtu prodělaných laktací (SMOLA a HAAS, 2003).

V období zaprahování můžeme vyléčit jak klinické, tak subklinické mastitidy a pokusit se tak zachránit březí dojnice i s chronickým onemocněním mléčné žlázy. Způsob zaprahování ovlivňuje zdravotní stav mléčné žlázy. Aplikace ATB v době zaprahování může eliminovat až 80 % existujících infekcí a může být i významným preventivním opatřením nových infekcí získaných v době tzv. stání na sucho (SEYDLOVÁ, 2011). Pokud v průběhu laktace nebyly zaznamenány žádné problémy se zdravotním stavem mléčné žlázy a počet somatických buněk (PSB) dosahoval hodnot do 200 tisíc v 1 ml mléka, tak podle SEYDLOVÉ (2011) lze volit neantibiotický způsob zaprahování. Pokud jsou hodnoty PSB vyšší než 200 tisíc v 1 ml, ale bez klinického nálezu mastitidy, je vhodné aplikovat do jednotlivých struků ATB určené k zaprahování, zvolené podle citlivosti na zjištěné patogeny a doplnit jej strukovou zátkou neantibiotického prostředku. Pokud je zjištěna aktuálně mastitida, je nutné se pokusit ji přeléčit ATB určenými na léčbu v laktaci a teprve nato dojnici zaprahnout ATB na zaprahování a aplikovat neantibiotický prostředek.

V současné době je v ČR (NOVOTNÁ a kol., 2006) registrováno celkem 45 intramamárních antibiotických přípravků. Jedná se o přípravky jednosložkové i kombinované, určené buď pro laktující krávy (celkem 24 přípravků) nebo krávy v období zaprahlosti (celkem 21 přípravků). U přípravků určených pro období zaprahlosti jsou účinné látky zaměřené spíše na grampozitivní zárodky a mají prodlouženou dobu působení účinné koncentrace (a také delší OL) - v této skupině jsou nejčetnější přípravky

obsahující jako účinnou látku kloxacilin. Z účinných látek jsou ve všech intramamárních přípravcích nejčastěji zastoupena beta-laktamová ATB (zejména kloxacilin), ale zastoupena jsou i ATB z jiných tříd (aminoglykosidy, cefalosporiny, tetracykliny), z dalších antimikrobních látek najdeme mezi intramamárními léčivy - kolistin, novobiocin, linkomycin, pirlimycin a také kombinaci sulfonamid - trimetoprim (NOVOTNÁ a kol., 2006).

Skutečnost, že nejčastější příčinou RIL v mléce jsou antibiotické přípravky, potvrzuje více autorů. Např. NAVRÁTILOVÁ (2012) mluví o 95 %, HAUBERT (1991) o 80 %, DOLEŽAL a kol. (2000) uvádí, že 90 až 99 % nálezů RIL v mléce má svůj původ především v léčbě ATB (z toho neznámá 50 % penicilinové) a následném pochybení personálu při dojení. Byl uveden případ, kdy jedna penicilinem ošetřená čtvrt' podojená do bazénu znehodnotila celý nádoj 100 kusového stáda (DOLEŽAL a kol., 2000).

Pro minimalizaci nebo eliminaci rizik spojených s rezidui je nutné pro každé veterinární léčivo stanovit správnou ochrannou lhůtu (OL). OL se rozumí interval mezi posledním podáním (aplikací) veterinárního léčivého přípravku zvířatům za normálních podmínek použití a výrobou potravin z takových zvířat k zajištění, že takovéto potraviny neobsahují rezidua v množství přesahujícím MRL. Je nutné, aby každá antimikrobní účinná látka obsažená v těchto přípravcích měla stanoven MRL. Dle NOVOTNÉ a kol. (2006) je hlavní farmakologický účinek v případě antimikrobních látek zaměřen proti bakteriím a proto je MRL založeno na mikrobiologickém akceptovatelném denním příjmu (ADI).

Důvody pro stanovení a dodržování OL jsou toxikologické, technologické a etické. OL se zavádí pro jednotlivou lékovou formu, druh zvířete a surovinu. Pokud není u příslušného léčiva pro daný druh nebo kategorii zvířat OL stanovena, stanoví veterinární lékař nejméně standardní OL - pro mléko platí 7 dnů (NAVRÁTILOVÁ, 2011). OL se zabývá mimo jiné Zákon č. 332/2008 Sb. o veterinární péči., dále EMEA/CVMP/473/98.

Převládajícím zdrojem kontaminace mléka je intramamární aplikace. Další cesty kontaminace mléka představují perkutánní, intrauterinní, subkutánní, intramuskulární a intravenózní aplikace léčiv (NAVRÁTILOVÁ a kol., 2007).

HAUBERT a kol. (1991) uvádí, že při aplikaci vyšších dávek přípravku, než je uvedeno v návodu nebo při opakovaném intramamárním ošetření mléčné žlázy jsou rezidua v tkáních a v produktech déle, než je stanovená OL, protože OL jsou stanovovány u zdravých zvířat, u nemocných je doba vylučování i přetrvávání delší.

Je třeba zdůraznit, že přesně stanovená OL se řídí nejen typem antimikrobní látky, eventuálně kombinacemi antimikrobních látek v přípravku, ale závisí také na přesném složení přípravku a jeho farmakokinetických a farmakodynamických vlastnostech (NOVOTNÁ a kol., 2006).

Na trhu v ČR jsou v současné době dostupné registrované intramamární přípravky indikované v laktaci - zde je OL kratší v porovnání s přípravky aplikovanými v době zaprahnutí. U těchto přípravků se OL pohybuje v rozmezí 3-10 dojení. U přípravků indikovaných v době zaprahnutí, je OL je specifikována ve vztahu k délce zaprahnutí a předpokládaném termínu otelení (NOVOTNÁ a kol., 2006).

Studie perzistence ATB v organismu krav po léčbě mastitid doložily, že v 15-30 % případů dochází k překročení OL o 1 až 7 dnů. Toto platí jak na ATB v laktaci, tak na dlouze působící ATB při terapii během zaprahnování vemene (DOLEŽAL a kol., 2000).

Prevence záchyty RIL v mléce spočívá především v pečlivé evidenci zvířat ošetřených ATB, vyřazování jejich mléka, dodržování OL léčiv, ale zejména v individuální kontrole přeléčených krav na RIL před zařazením jejich mléka zpět do dodávky. To lze zajistit v dostupných laboratořích nebo stájovými testy (DOLEŽAL a kol., 2002).

Dle NAVRÁTILOVÉ (2012) mohou být ATB přítomna v mléce jako původní nezměněná forma, bioaktivní metabolit, inaktivní metabolit, látky vznikající při metabolismu nebo odvozené metabolity.

Tzv. pětibodový antimastitidní program zahrnuje nejdůležitější preventivní opatření, mezi která patří především:

1/ dezinfekce struků, při prokazatelném zvýšení frekvence prostředových patogenů je nutné vybírat bariérové typy preparátů;

2/ terapie při zaprahnování, nepodceňovat význam bakteriologického vyšetřování a stanovení citlivosti patogenů na ATB. VYLETĚLOVÁ (2003) uvedla za 10 let snížení citlivosti mastitidních patogenů k nejčastějším ATB u všech patogenů. Hlavní rozdíly v citlivosti byly pro neomycin, novobiocin a tetracyklin. U novobiocinu vzrostl výskyt rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* z 2 na 29 %, u *Streptococcus agalactiae* z 36 na 92 % a *Streptococcus uberis* ze 7 na 68 %;

3/ důsledné korektury dojící techniky;

4/ terapie v laktaci;

5/ mezidezinfekce dojícího stroje (zpětný proplach i vodou je významný v kombinaci s ponořením strukových návleček do dezinfekčního roztoku), přístupy air-wash a back-flush, nejlepší technické řešení tzv. zpětného proplachu.

V ekologických chovech se vedle důsledné prevence uplatňuje také redukce nemocných kusů a homeopatická léčba. Seriózní projekty naznačily, že při dobré prevenci, homeopatické terapii s omezeným použitím ATB lze stav stáda z hlediska mastitid udržet na dobré úrovni. Pokud se však jedná o klinické případy mastitid, účinnost homeopatické léčby je nižší a v těchto případech je lepší ATB použít (HANUŠ a kol., 2007).

Mléko s nálezem klinické mastitidy vykazuje při vyšetření na RIL dubiosní výsledky z důvodu imunitní odpovědi organismu a obsahu endotoxinů. Jistým podstupněm pozitivního nálezu RIL v mléce je náhlé snížení kysací aktivity mléka. Jde zejména o mléka mastitidní nebo mléka od dojníc s metabolickými nebo sekrečními poruchami (SEYDLOVÁ, 1998).

TICHÁČEK a kol. (2007) shrnuje prevenci RIL do následujících bodů:

- podávání ATB cíleně a pod kontrolou veterinárního lékaře, označení léčených dojníc;
- informovanost ošetřujícího personálu;
- změny v technologii dojení - léčené dojnice dojit nakonec, vyloučit potrubní dojení, dojit do konví, v dojárně léčené dojnice separovat do samostatné skupiny, dojit odděleně, nemísit nádoje, výluka mléka léčených dojníc;
- čištění a dezinfekce dojicích jednotek po každé léčené dojnici;
- kontrola léčených dojníc před obnovením dodávky stájovým testem;
- kontrola cisternových vzorků, laboratorní a praktické dohledání původců či příčin RIL.

Dále TICHÁČEK a kol. (2007) doporučuje zabránit krmení medikovaných a případně plesnivých krmiv, eliminovat možnost průniku sanitačních roztoků do mléka, neošetřovat chemicky krmiva před krmením, zabránit případně průniku chemikálií do připravených krmiv.

Velice významným faktorem v prevenci RIL je zásada zdravotní optimalizace chovaných dojníc spolu s dobrou organizací chovu (SEYDLOVÁ, 1998).

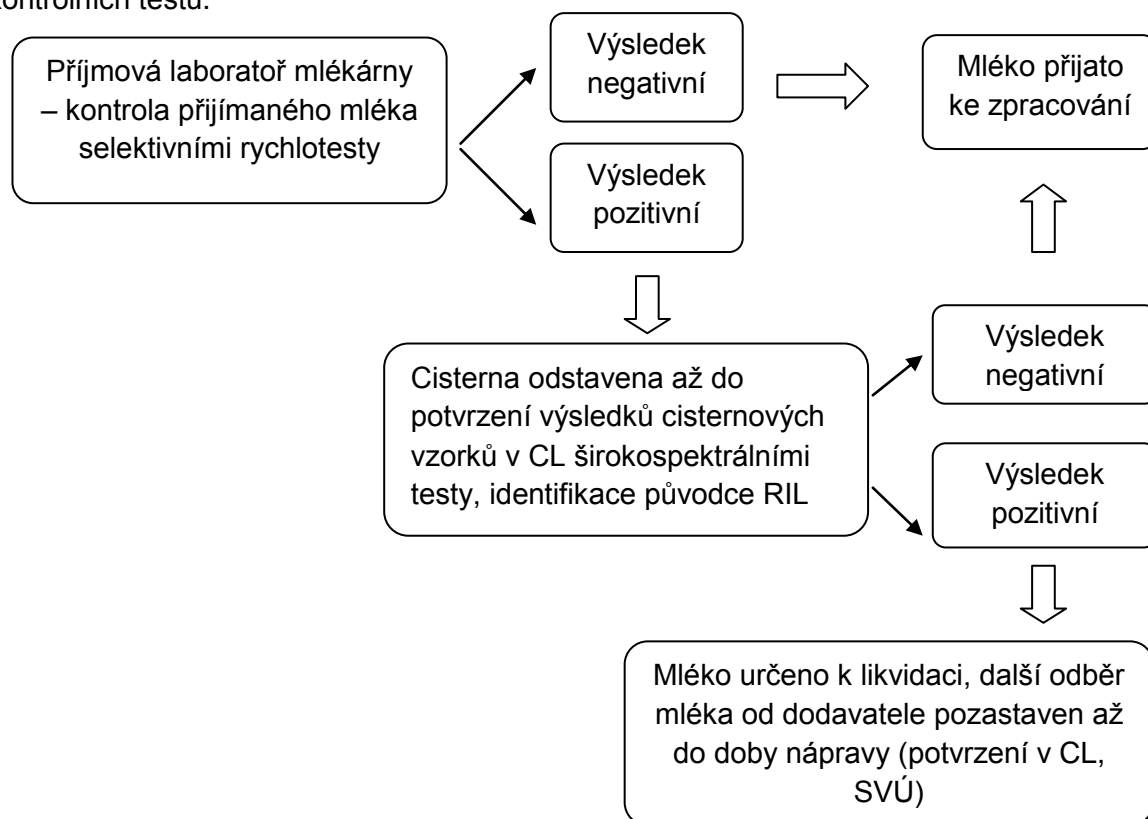
3.4.2 Zásady prevence výskytu RIL v mlékárenském průmyslu

Integrovaný systém kontroly ATB v mléce, jehož cílem je zajištění kvalitní suroviny pro mlékárenské zpracování a zabezpečení zdravotní nezávadnosti mléka a mléčných výrobků pro spotřebitele využívá HACCP konceptu k minimalizaci rizik. Zahrnuje dvě hlediska - jednak aplikaci různých metod detekce RIL v mléce a mléčných výrobcích a také současně rozdělení zodpovědnosti za zdravotní nezávadnost od prvovýroby mléka, zpracovatele až po kontrolu potravin (NAVRÁTILOVÁ, 2002).

Základním cílem stanovení inhibičních látek v mléce je zabezpečení zdravotní nezávadnosti výrobků pro spotřebitele a jistota kvalitního technologického zpracování suroviny (NAVRÁTILOVÁ, 2002).

Mléko je na přítomnost RIL monitorováno v různých místech výrobního procesu, v prvovýrobě, v mlékárně, v centrálních laboratořích (CL) a státních laboratořích (SVÚ), popř. v dalších akreditovaných laboratořích (NAVRÁTILOVÁ, 2002).

System kontrol a vyšetření mléka na RIL v mlékárenském závodě: v následném schématu jsou znázorněny cesty syrového mléka závisející na výsledcích jednotlivých kontrolních testů.



3.5 TESTY A METODY DETEKCE RIL V MLÉCE

Metody stanovení RIL v mléce lze rozdělit do dvou na sobě závislých kroků:

1. plošné monitorování - používají testy umožňující rychlé stanovení přítomnosti RIL
2. cílené vyšetřování - používají metody na identifikaci a confirmaci inhibiční látky (zjištění konkrétního druhu a koncentrace léčiva)

3.5.1 Plošné monitorování - screeningové metody

- provádí se: 1/ komerčně vyráběnými selektivními rychlotesty;
- 2/ komerčně vyráběnými širokospektrálními rychlotesty;
- 3/ plotnovými metodami

Použití screeningových metod je rozšířené zejména v prvovýrobě a v mlékárnách. V prvovýrobě mléka může veterinární lékař nebo zootechnik testem prováděným přímo u lécené dojnice zkontrolovat hladinu ATB po ukončení OL a tím zabránit případnému znehodnocení celé dodávky mléka. V příjmových laboratořích mlékáren je těmito metodami kontrolována surovina pro výrobu, především vyšetřením cisternových vzorků.

Podle NAVRÁTILOVÉ a kol. (2007) by plošné monitorování nemělo být zaměřeno jen na beta-laktamová ATB, ale i na skupinu tetracyklinových ATB.

3.5.1.1 Selektivní rychlotesty

Selektivní rychlotesty umožňují velice rychlou detekci RIL, ale pouze kvalitativní stanovení. Jedná se o receptorovou analýzu, umožňující detekci beta-laktamových ATB spolu s cefalosporiny, tetracyklinů a aminoglykosidů, tylosinu, sulfonamidů, chinolonů a chloramfenikolu, viz. Tab. 7. -13. Jak uvádí JEŘÁBKOVÁ (2011), většina těchto testů detekuje pouze jednu skupinu ATB, jen některé testy umožňují detekci obou skupin najednou (např. Twinsensor BT, Charm Rosa Test). Některé testy detekují i tři skupiny léčiv současně (tetracykliny + beta-laktamy spolu s cefalosporiny + sulfonamidy).

Tabulka 7. Selektivní testy - Twinsensor BT

TWINSENSOR BT	
CHARAKTERISTIKA	Test ve formátu ponorného proužku pro selektivní detekci ATB, umožňuje současnou detekci ATB beta-laktamových spolu s cefalosporiny a tetracyklinová ATB.
PRINCIP	Receptorová analýza. Test se skládá ze dvou prvků. 1. mikrojamka obsahující přesné množství obou receptorů a protilátek vázaných na částice zlata, 2. ponorný proužek vytvořený z membrán, tvořících testovací linky umístěné z obou stran kontrolní Twinsensor BT linky. Linka zachytávající peniciliny se nachází pod kontrolní linkou, zatímco linka specifická pro tetracykliny nad kontrolní linkou.
DOBA STANOVENÍ	6 minut
VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKU	1. vizuální - kvalitativní (ANO-NE), porovnáváním poměru zabarvení kontrolní a testovací linky. 2. semikvantitativní - pomocí čtecího zařízení ReadSensor.
TYPY TESTU	<i>BT 00660+</i> detekce tetracyklinových ATB - 100 µg/kg (100 ppb) <i>BT 00620-</i> detekce tetracyklinových ATB - 10 µg/kg (10 ppb)

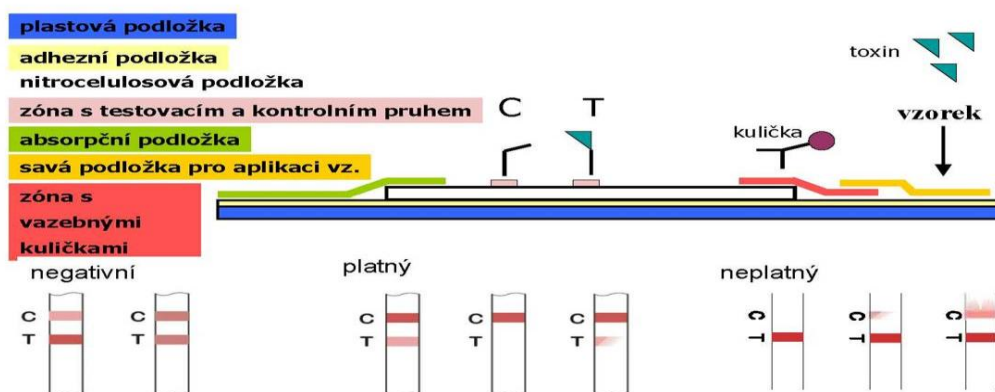
Obr. 1., 2. Inkubátor, čtecí zařízení s tiskárnou k testu Twinsensor BT



Tabulka 8. Selektivní testy CHARM ROSA test

CHARM ROSA	
CHARAKTERISTIKA	Kombinovaný test umožňující detekci většiny používaných beta-laktamových a 3 základních typů tetracyklinových ATB na hranici limitu nebo i pod limitem MRL.
PRINCIP	Jednokroková, stripová analýza. Strip obsahuje receptory a protilátky a ponorný proužek vytvořený z membrán, zachytávajících ATB.
DOBA STANOVENÍ	8 minut
VYHODNOCENÍ VÝSLEDKU	1. vizuální - kvalitativní (ANO-NE) porovnáváním poměru zabarvení kontrolní a testovací linky. 2. semikvatitativní - pomocí čtecího zařízení ROSA Reader.
TYPY TESTU	<ul style="list-style-type: none"> - MRL BL/TET Test (beta-laktamová ATB spolu s cefalosporiny + tetracykliny) - MRL Beta-laktam Test - Tetracycline Test - Enroflox Test (pouze detekce enrofloxacinu) - Sulfonamide Test - Streptomycine Test - Chloramfenikol Test

Obr. 3. Testovací stripy Charm ROSA (zdroj:<http://www.rhinestone.webnode.cz>)



Tabulka 9. Citlivost testů Twinsensor BT testů a Charm Rosa testu

ppb (µg/kg)	MRL	Twin 00660 +	Twin 00620	Charm Rosa
Beta-laktamová ATB				
Penicilin G	4	2-3		2-3
Ampicilin	4	3-5		2,5-4
Amoxicilin	4	3-5		2,5-4
Kloxacilin	30	6-8		25-35
Méně častá ATB				
Cefazolin	50	18-22		8-16
Cefoperazone	50	3-4		4-8
Ceftiofur	100	10-15		20-50
Cephapirin	60	6-8		4-8
Tetracyklinová ATB				
ppb (µg/kg)	MRL	Twin 00660 +	Twin 00620	Charm Rosa
Chlortetracyklin	100	45-55	6-7,5	50-100
Doxycyklin	100	20-40	2,5-5	neuveden
Oxytetracyklin	100	56-75	7,5-10	50-100
Tetracyklin	100	75-100	10-12	20-40

1 ppb přibližně odpovídá koncentraci 1mg látky v 1 m³ roztoku

Tabulka 10. Selektivní testy ROSA testy - BETA STAR, TETRA STAR

ROSA TESTY	
CHARAKTERISTIKA	V současné době jsou k dispozici tyto testy: beta-laktamový, tetracyklinový, sulfonamidový, kombinovaný (beta + tetra), quinolonový, aflatoxinový.
PRINCIP	Navázání specifického receptoru a ATB a následné přenesení na imunochromatografické médium.
DOBA STANOVENÍ	3 minuty
VYHODNOCENÍ VÝSLEDKU	Negativní - testovací linka (spodní) je zřetelnější než linka referenční. Pozitivní - testovací linka slabší než referenční (horní), jednoznačně pozitivní - testovací linka zmizí úplně.
TYPY	BETA STAR - rychlé prokázání beta-laktamových ATB TETRA STAR - test k rychlému prokázání tetracyklinových ATB


Tabulka 11. Selektivní testy - DELVO-X-PRESS

DELVO-X-PRESS test	
CHARAKTERISTIKA	Enzymatický, screeningový test ke stanovení beta-laktamových ATB.
PRINCIP	Kvalitativní kompetitivní recepce enzymu na receptor.
DOBA STANOVENÍ	6 minut
VYHODNOCENÍ VÝSLEDKU	Hodnoty přístroje: ≤ 25 negativní výsledek ≥ 26 pozitivní výsledek

Tabulka 12. Selektivní testy - PENZYME test

PENZYME test	
CHARAKTERISTIKA	Enzymatický, screeningový test ke stanovení beta-laktamových ATB. Běžně se používá pro testování kozího mléka.
PRINCIP	Pokud mléko obsahuje beta-laktamová ATB, enzym karboxypeptidáza způsobuje změnu barvy média, jelikož ATB udržují enzym stabilní a neaktivní.
VYHODNOCENÍ VÝSLEDKU	Negativní - barva média růžová až oranžová. Pozitivní - barva média se mění na žlutou.

Tabulka 13. Selektivní testy - SNAP test

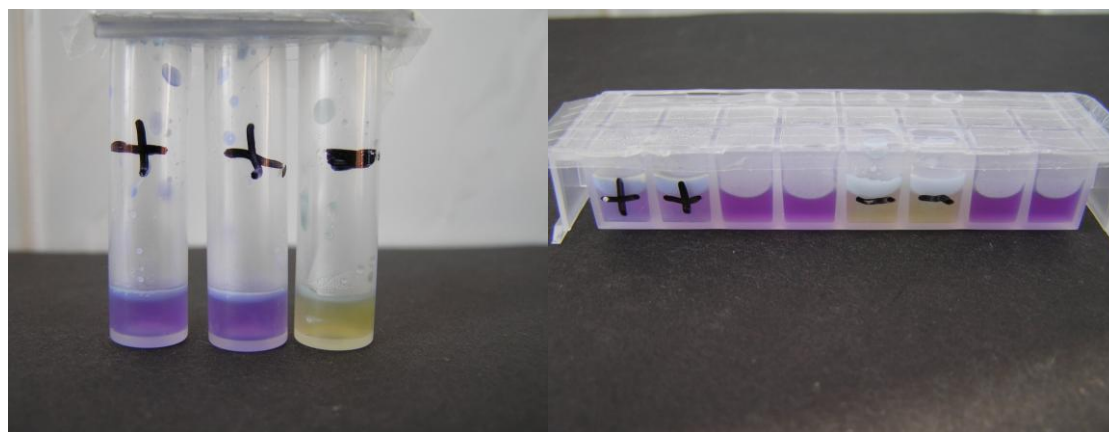
SNAP test	
CHARAKTERISTIKA	SNAP [®] BETA-LACTAM TEST- detekuje beta-laktamová ATB. SNAP [®] TETRACYKLIN TEST KIT- detekuje tetracyklin, chlortetracyklin a oxytetracyklin. SNAP [®] duo Beta-tetra - detekuje beta-laktamová ATB i tetracykliny.
PRINCIP	Enzymatické vázání receptoru testu, na hladině MRL nebo nižších.
DOBA STANOVENÍ	6-10 minut
VYHODNOCENÍ VÝSLEDKU	 <p>Negativní výsledek: zkušební políčko je tmavší nebo stejné než kontrolní. Pozitivní výsledek: zkušební políčko je světlejší než políčko kontrolní.</p>

3.5.1.2 Širokospektrální rychlotesty

Tabulka 14. Širokospektrální testy - DELVOTEST SP - NT

DELVOTEST SP - NT	
CHARAKTERISTIKA	Standardní difuzní test pro spolehlivé stanovení RIL v mléce a mléčných výrobcích Umožňují detekci širokého spektra ATB, sulfonamidů i dezinfekčních látek.
PRINCIP	Agarové živné médium (umístěné v ampulích či mikrotitračních destičkách) obsahuje přesně definované množství spor mikroorganismů <i>Bacillus stearothermophilus</i> v. c. C953, který je velice citlivý na rezidua inhibičních látek. V případě negativního vzorku mléka se uvedený kmen během inkubace pomnožuje, produkuje kyseliny, mění se pH média, což způsobuje změnu zbarvení média.
DOBA STANOVENÍ	3 hodiny - nekonzervované vzorky při 64 °C. 3,5 hodiny u konzervovaných např. Heschenovým činidlem.
VYHODNOCENÍ VÝSLEDKU	Pozitivní - médium zůstává fialové až modrofialové. Negativní - barva média se mění žlutou.
TYPY TESTU	DELVOTEST SP- NT 5 PACK - mikrotitrační destičky DELVOTEST SP- NT ampule

Obr. 4., 5. Vzorek pozitivní (+) a negativní (-) na testu Delvotest ampule a mikrodestička



Interpretace výsledků:

Odečet výsledků Delvotestu SP provádíme po 3 hodinové inkubaci při teplotě 64°C ± 0,5°C, kdy hodnotíme zbarvení spodních 2/3 agarového média viz. obrázek:

Pozitivní výsledek fialové až modrofialové zbarvení:

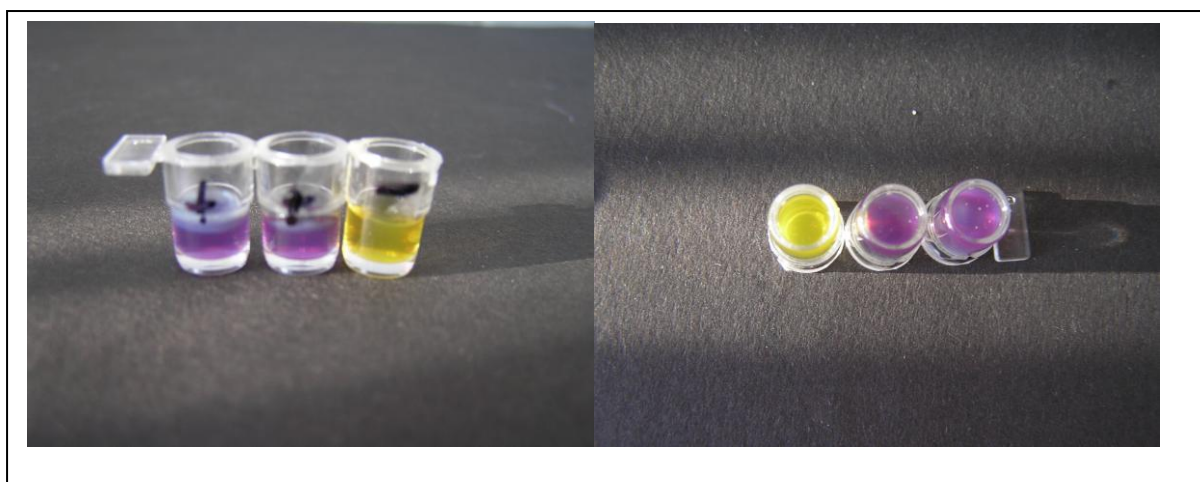
Negativní výsledek žluté až žlutozelené zbarvení:



Tabulka 15. Širokospektrální testy - ECLIPSE

ECLIPSE	
CHARAKTERISTIKA	Standardní difuzní test pro spolehlivé stanovení RIL v mléce a mléčných výrobcích. Umožňují detekci širokého spektra ATB, sulfonamidů.
PRINCIP	Spočívá v inhibici mikrobiálního růstu a agarové difuze spojené se změnou barvy indikátoru v důsledku změny pH agaru, způsobené růstem testačního kmene (<i>Bacillus stearotherophilus</i>).
DOBA STANOVENÍ	2,15-2,45 hodiny při 64 °C.
VYHODNOCENÍ VÝSLEDKU	Pozitivní - agar barvu nemění, zůstává modrofialová. Negativní - změna barvy agaru z modrofialové na žlutavou.
TYPY TESTU	ECLIPSE 50 ECLIPSE 100

Obr. 6., 7. Vzorek pozitivní (+) a vzorek negativní (-) na testu Eclipse 50, mikrodestička



Tabulka 16. Širokospektrální testy - CHARM FARM test

CHARM FARM test	
CHARAKTERISTIKA	Detekují široké spektrum RIL, na úrovni MRL především beta-laktamová a sulfonamidová léčiva.
PRINCIP	Založen na inhibici růstu mikrobiální kultury.
DOBA STANOVENÍ	3 hodiny
VYHODNOCENÍ VÝSLEDKU	Vizuálně, podle barevného klínu.
TYPY TESTU	960 - lámací destička Vial - mikroampule

Tabulka 17. Širokospektrální testy - KALIDOS NEW

KALIDOS NEW	
CHARAKTERISTIKA	Test je založený na mikrobiální inhibici. Umožňují detekci širokého spektra ATB, sulfonamidů.
PRINCIP	Nejsou-li v mléce přítomné žádné IL, nebo je jejich koncentrace nižší, než je hodnota limitu detekce, spóry bacila vyklíčí, rozrostou se a budou metabolizovat cukr. Kyselina vytvářená při fermentaci glukózy mění nachovou barvu bromkresolového indikátoru na intenzivní žlutou. Při přítomnosti inhibičních látek je klíčení a růst spór bacila inhibován. Nedochozí ke kvašení glukózy, kyselina se neprodukuje a indikátor pH si zachovává nachovou barvu.
DOBA STANOVENÍ	2,5-3 hodiny při 65 °C.
VYHODNOCENÍ VÝSLEDKU	Pozitivní - agarové médium barvu nemění, zůstává nachová. Negativní - změna barvy agarového média na žlutou.
TYPY TESTU	Ampule - rozlomitelné zkumavky Mikrodestičky

Obr. 8. Vzorek pozitivní (+) a vzorek negativní (-) na testu Kalidos New



Princip, vyhodnocení výsledků a použití jsou v celé skupině širokospektrálních testů velmi podobné. Při odečítání testů posuzujeme hlavně dolní 2/3 agaru, horní mohou ovlivňovat přirozené inhibitory, somatické buňky či alkalita vzorku. Při detekci širokospektrálními testy je důležité použití negativní kontroly, což je vzorek mléka bez obsahu ATB, dodávaný v sušeném stavu spolu s testem, především z důvodu stanovení optimální doby inkubace. Doporučuje se též použití kontroly pozitivní. Při stanovování RIL se používané testy liší zejména podle limitu detekce. Limit detekce je definován jako minimální množství ATB schopné zcela inhibovat růst bakterií za daných podmínek testu.

Citlivost jednotlivých testů se liší vzhledem k MRL a je uváděna výrobcem (Tab. 18.).

Tabulka. 18. Citlivost širokospektrálních testů (dle výrobce v mg/kg)

Léčivo	Delvotest SP - NT	Eclipse	MaxSignal	Kalidos New	MRL
Beta-laktamová ATB					
Penicilin G	0,002-0,003	0,004	0,002-0,003	0,002-0,004	0,004
Ampicilin	0,006-0,008	0,005	0,002-0,004	0,03-0,004	0,004
Cefapirin	0,006-0,008	0,008	0,006-0,009	neuvádí	0,006
Kloxacilin				0,015-0,40	0,030
Tetracyklinová ATB					
Tetracyklin	0,800	0,150	0,050-0,100	0,100-0,200	0,100
Oxytetracyklin	0,800	0,150	0,050-0,100	0,100-0,200	0,100
Aminoglykosidová ATB					
Neomycin	0,300-0,600	2,00	0,450-0,500	neuvádí	1,500
Gentamycin	0,200	neuvádí	0,100-0,150	neuvádí	0,100
Streptomycin	neuvádí	3,00	0,100-0,200	0,400-0,800	0,200

Použití širokospektrálních testů:

- prvovýroba - kontrola mléka přelčených dojnic před jeho zařazením do dodávek;
- centrální laboratoře, Státní veterinární ústavy a zpracovatelské závody:
 - kontrola bazénových vzorků dodavatelů;
 - kontrola negativity finálních mlékárenských výrobků;
 - potvrzení pozitivních výsledků rychlotestů používaných pro kontrolu přijímaného mléka.

Výhodou těchto metod je široké detekční spektrum, jednoduchost, nízká nákladnost, možnost screeningového vyšetření více vzorků najednou. Nevýhodou je nemožnost identifikace ATB, jsou pouze kvalitativní, mají dlouhou inkubační dobu. Jsou vysoce citlivé vůči beta-laktamovým ATB a především penicilinu, cefalosporinům, sulfonamidy, tetracykliny, méně citlivé k ostatním antimikrobiálním látkám jako jsou aminoglykosidy, makrolidy.

Z porovnání jednotlivých testů vyplývá, že žádný test nedetekuje rezidua všech léčiv s vyhovující citlivostí vzhledem k MRL, je vhodné používat více testů a metod a jejich vzájemné kombinace (JEŘÁBKOVÁ, 2011).

Testy nejsou citlivé pro chloramfenikol (BOTSOGLOU a FLETOURIS, 2001).

NAVRÁTILOVÁ (2010) doporučuje kombinovat různé metody detekce: mikrobiologické metody, identifikační fyzikálně-chemické metody a jejich vzájemné kombinace.

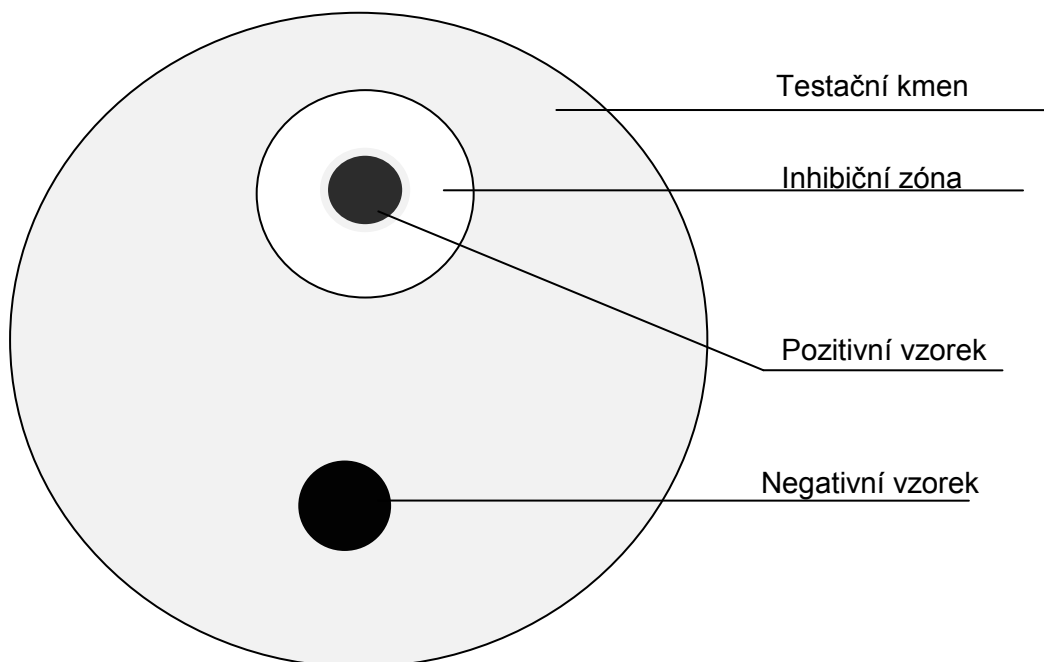
3.5.1.3 Mikrobiologické plotnové metody

Princip metody - plotnové metody umožňují skupinovou identifikaci inhibiční látky, provádí se jako agar difuzní test. Vzorky se umístí na plotnu s půdou inokulovanou testovacím kmenem. Difuze antibakteriální látky se projeví formou tvorby zón inhibice růstu testovacího mikroorganismu. Podle velikosti inhibiční zóny je možný i odhad přibližné koncentrace RIL.

Tabulka 19. Plotnové metody- metoda čtyř ploten (č. 1-4), metoda šesti ploten (č. 1-6), pro mléko a mléčné výrobky

Plotna	Použitý kmen	Detekce	Inkubace	Vyhodnocení inhibiční zóny
č. 1.	<i>Bacillus subtilis</i>	tetracykliny	30 °C 18-24 hod	negativní <2mm pozitivní ≥2mm
č. 2.	<i>Bacillus subtilis</i>	aminoglykosidy	30 °C 18-24 hod	negativní <2mm pozitivní ≥2mm
č. 3.	<i>Kocuria rhizophila</i>	makrolidy beta-laktamy	37 °C 18-24 hod	negativní <2mm pozitivní ≥2mm
č. 4.	<i>Bacillus subtilis</i>	sulfonamidy	30 °C 18-24 hod	negativní <2mm pozitivní ≥2mm
č. 5.	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> v. c. C953	beta-laktamy aminoglykosidy	64 °C 5 hodin	negativní <1mm pozitivní ≥1mm
č. 6.	<i>Escherichia coli</i>	chinolony	37 °C 18-24 hod	negativní <2mm pozitivní ≥2mm

Obr. 9. Schéma plotnové metody



3.5.2 Cílené vyšetřování

Předpokládaná oblast použití je dohledávání druhu inhibiční látky jako druhý krok po plošném monitorování. Kromě již zmíněných stanovení v mléce lze systém (resp. jeho modifikaci) použít i pro jiné oblasti, jako např. potraviny, krmivo, sérum, tkáně atd.

3.5.2.1 Fyzikálně chemické metody

Mezi nejčastěji používané fyzikálně chemické metody patří: (Tab. 20-23)

- ELFO - gelová elektroforéza s mikrobiální detekcí;
- RIA - CHARM II.;
- HPLC/DAD, HPLC/ MS, HPLC/ MS/ MS.

Tabulka 20. Fyzikálně chemické metody - ELFO - gelová elektroforéza s mikrobiální detekcí

ELFO - gelová elektroforéza s mikrobiální detekcí	
DETEKCE	skupinová identifikace RIL, specifikace RIL.
PRINCIP	Molekuly ATB dle své polaritě a velikosti migrují v elektrickém poli a po skončení dělení jsou mikrobiologicky detekovány. Mikrobiální testační kmen je volen podle výsledků plotnových metod. Exaktnost metody je možné zvýšit lyofilizací materiálu.
VÝHODY	Metoda umožňuje specifikaci RIL (např. NRL Jihlava).
NEVÝHODY	Složitá příprava vzorků i provedení, časová náročnost.

Tabulka 21. Fyzikálně chemické metody - RIA – CHARM II. analyzátor

RIA - CHARM II. analyzátor	
DETEKCE	Léčiva na bázi ATB, aflatoxiny, pesticidy, alkalickou fosfatázu. NRL Jihlava touto metodou stanovuje beta-laktamová ATB + cefalosporiny, tetracyklinová ATB, kloxacilin, gentamycin + neomycin, chloramfenikol, erytromycin + tylan, sulfonamidy, streptomycin.
PRINCIP	Analyzátor změří CPM vzorku (count per minute) - hodnotu porovná s CPM kontrolního bodu (nastaven na hodnotu MRL) stanovovaného ATB nebo sulfonamidu a vzorek vyhodnotí.
VÝHODY	Stanovení léčiv nad nebo pod MRL.
NEVÝHODY	Finanční náročnost, u mléčných výrobků složitější příprava vzorku.

Obr. 10. Analyzátor CHARM II., zdroj: <http://www.bentleyczech.cz>



Tabulka 22. Fyzikálně chemické metody - HPLC/ MS/ MS, HPLC/ MS,

HPLC/ MS/ MS, HPLC/ MS	
DETEKCE	Fyzikálně-chemická metoda, cílené vyšetřování veterinárních léčiv.
PRINCIP	Metody kapalinové chromatografie v kolonovém provedení, tzv. vysokoúčinná chromatografie.
VÝHODY	Cílené stanovení inhibičních látek - konfirmační stanovení RIL.
NEVÝHODY	Vyšší finanční nákladnost a časová náročnost.

Obr. 11. Kapalinový chromatograf HPLC, zdroj <http://ecom-sro.trade.cz/>



3.5.2.2 ELISA metody

Tabulka 23. ELISA metody

ELISA metody (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	
DETEKCE	Stanovení: streptomycin, neomycin, gentamycin, tetracyklin, chinolony, sulfonamidy, chloramfenikol, penicilin. Metody umožňují kvalitativní i kvantitativní stanovení inhibiční látky (dle použitého testu). Výsledky jsou odečítány pomocí speciálního spektrofotometru (Jeřábková, 2011).
PRINCIP	Imunochemická metoda - identifikuje antigen (analyt) ve vzorku prostřednictvím jeho biospecifické interakce s protilátkou.
MODIFIKACE TESTU	ELISA přímá - detekce antigenu ELISA nepřímá - detekce specifických látek ELISA sendvičová přímá - detekce antigenu ELISA sendvičová nepřímá - detekce specifických látek
PRVKY ELISA testu	1. antigen - detekovaný v testovaném vzorku - známý, komerčně připravovaný 2. protilátka - detekovaná v testovaném séru - známá, komerčně připravovaná 3. konjugát - jedná se o protilátku proti protilátce 4. substrát - chemická látka, která reaguje s enzymem
VÝHODY	Zpracování velkého množství vzorků a vytvoření kalibrační závislosti a proměření slepých vzorků současně na jedné mikrotitrační destičce.
NEVÝHODY	Vyšší finanční nákladnost.

ELISA metody se používají zejména na stanovení streptomycinu v monitoringu CL (cizorodých látek) SVS ČR, neboť ten na úrovni MRL není detekovatelný předchozími screeningovými metodami. Dále jsou tyto metody používány rovněž při stanovení chloramfenikolu, který na hladině < 0,1 ppb také není detekovatelný předchozími screeningovými metodami. Pro export do RF se používá detekce RIA metodou na hladině < 0,1 ppb, pro mléčné výrobky detekce RIA metodou na hladině < 0,3 ppb (JEŘÁBKOVÁ, 2011).

3.6 ORGANIZACE KONTROLY KVALITY MLÉKA

Počátky kontroly reziduí ATB v mléce a jejich další vývoj iniciovali sami zpracovatelé mléka. První mikrobiologický test obsahující kmen *Bacillus subtilis* pro detekci reziduí v mléce byl vyvinut již v roce 1952, v roce 1959 vyvinuta RIA analýza a v roce 1967 BR test, který je založen na růstu testačního kmene a následné změně pH a změně barvy média (NAVRÁTILOVÁ, 2011).

Mezinárodní mlékařská federace IDF se již v roce 1968 zasadila o vydání Dokumentu č. 42. - Rezidua chemických látek v mléce. Tento dokument byl skupinou expertů - Skupina A₄, zabývajících se řešením problému reziduí a kontaminantů v mléce, revidován a výsledkem byl v roce 1979 Dokument č. 113., který byl revidován v letech 1985-1990. V roce 1991 vydána Special Issue 9701, zde byl při revizi v roce 1997 zapracován systém kritických bodů - HACCP a navržen systém kontroly RIL v mléce (NAVRÁTILOVÁ, 2011).

Systém doporučuje aplikaci různých metod při detekci ATB a stanovuje odpovědnost jednotlivých subjektů v celém technologickém procesu výroby a zpracování mléka za zdravotní nezávadnost mléka a mléčných výrobků (HONKANEN-BUZALSKI a REYBROECK, 2000). Tento systém s určitými změnami existuje dodnes.

Požadavky na kvalitu mléka (ČSN 57 0529, 1993)

Mléko nesmí být získáno od dojníc

- a) kterým byla podána krmiva obsahující látky nepříznivě ovlivňující normální složení a jakost mléka;
- b) které měly přístup k cizorodým látkám nebo byly vystaveny silné expozici těchto látek;
- c) u kterých jsou stanovena ochranná a zdlavací opatření při výskytu nákazy nebo jiného hromadného onemocnění zvířat, nestanoví-li orgány SVS jinak;
- d) do 5 dnů po otelení.

Z dodávek pro mlékárenské ošetření a zpracování musí být vyloučeno:

- a) mléko s obsahem cizorodých látek (látek nebo reziduí s farmakologickými a hormonálními účinky, antibiotik, čistících a dezinfekčních prostředků apod., nebo látek, které způsobují technologické a organoleptické vady mléka), které mohou ohrožovat zdraví lidí, a to ve vyšším množství než přípouští směrnice MZ;
- b) mléko od dojnic léčených nebo ošetřovaných ATB a dalšími přípravky a látkami, které se vylučují mlékem, a to po dobu léčby a stanovených ochranných lhůt pro jednotlivé přípravky.

Biotechnologické postupy péče o zvířata a dojení vedoucí k vyšší kvalitě mléka jsou velmi důležité pro podporu kvality a bezpečnosti mléčného potravinového řetězce.

Důležité je produkovat mléko:

- bez RIL (zejména ATB), s co nejnižším počtem PSB, s co nejnižším počtem CPM, s redukcí případných patogenů (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*), coliformních bakterií, psychrotrofních, termorezistentních nebo sporulujících mikroorganismů.

V našich podmínkách je povinnost veškeré konzumní a zpracovávané mléko tepelně ošetřit, pasterovat (HANUŠ a kol., 2009).

RIL v potravinách a surovinách živočišného původu se ve světě sledují již dlouho, v ČR systematicky od roku 1980. Termín inhibiční látky se používá proto, že k diagnostice se běžně používají mikrobiologické metody, při kterých se tyto látky projevují inhibicí růstu citlivého mikroorganismu. Chemické metody detekce jsou přesnější a citlivější, ale vzhledem k vysokým nárokům se i v nejvyspělejších státech k běžné detekci používají metody mikrobiologické.

3.6.1 Zkušební mléčné laboratoře

Mezi rutinní akreditované zkušební mléčné laboratoře zabývající se detekcí a stanovováním RIL v mléce patří: Laboratoř pro rozbor mléka Buštěhrad

Laboratoř pro rozbor mléka Brno

Centrální laboratoř České Budějovice

Laboratoř pro rozbor mléka Buštěhrad má dle aktuálního Osvědčení o akreditaci akreditovány 2 metody detekce inhibičních látek:

- detekce reziduí inhibičních látek v mléce širokospektrálním testem ECLIPSE 50;
- detekce reziduí inhibičních látek v mléce širokospektrálním testem DELVOTEST.

Laboratoř pro rozbor mléka Brno, akreditovala metody stanovení RIL:

- průkaz reziduí inhibičních látek screeningovými testy (ECLIPSE, TWINSENSOR BT).

Centrální laboratoř MADETA a.s. České Budějovice má dle aktuálního Osvědčení o akreditaci akreditovány 3 metody na stanovení RIL:

- detekce reziduí inhibičních látek selektivním testem (TWINSENSOR BT);
- detekce reziduí inhibičních látek komerčně dodávaným testem (DELVOTEST SP - NT);
- detekce reziduí inhibičních látek komerčně dodávaným testem (ECLIPSE 50).

Stanovení inhibičních látek ve vzorcích rozborovaných pro účely proplácení se provádí pokaždé při mikrobiologickém vyšetření, ale i namátkově při rozboru na chemické složení mléka. Používaná metoda je např. v centrální laboratoři MADETA a.s. stanovení RIL komerčně dodávaným testem DELVOTEST SP - NT, mikrodestičky.

Při pozitivním záchytu RIL v laboratoři nebo v příjmové laboratoři mlékáren se výsledek v CL potvrzuje DELVOTESTEM SP - NT ampule. CL, potvrzené pozitivní vzorky zamrazuje a uchovává a zákazník má posléze možnost dohledání konkrétního RIL v Národní referenční laboratoři (NRL) pro RIL SVÚ v Jihlavě. K tomuto účelu NRL Jihlava používá různé akreditované metody, širokospektrální screeningové testy pro potvrzení positivity vzorku, plotnové metody a metodu ELFO s autobiografickou detekcí na identifikaci inhibiční látky. Metodou RIA, systémem CHARM II. - stanovuje semikvantitativní množství inhibiční látky. Metoda umožňuje rozhodnout, zda vzorek vyhovuje Nařízení Komise (EU) č. 37/ 2010.

Počet zachycených reziduí inhibičních látek na závodech MADETY a.s. uvádí Tab. 24. Počet záchytů IL ve vzorcích určených k proplácení je již delší dobu nulový, především díky citlivým rychlotestům, kterými je kontrolována každá cisterna v mlékárně.

Tabulka 24. Záchyt RIL v CL České Budějovice a jejich specifikace v NRL Jihlava

	2008	2009	2010	2011
Záchyt a potvrzení CL	5	16	6	6
Dohledání RIL SVÚ Jihlava	1	3	1 (kloxacilin)	1 (PNC)

3.6.2 Národní referenční laboratoř Jihlava

Národní referenční laboratoř pro mykotoxiny a další přírodní toxiny, barviva, antibakteriální (inhibiční) látky a rezidua veterinárních léčiv, SVÚ Jihlava, je akreditovaná laboratoř. Akreditace znamená uznání způsobilosti zkušební laboratoře vnitrostátním akreditačním orgánem, Českým institutem pro akreditaci, o.p.s., k provádění zkoušek a vzorkování vymezených v Osvědčení o akreditaci (OA).

Aktuální Příloha OA NRL obsahuje metody stanovování a detekce RIL v mléce:

- stanovení reziduí inhibičních látek. Metoda s kmenem *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953;
- stanovení reziduí inhibičních látek 4plotnovou metodou;
- identifikace reziduí antibiotik elektroforézou autobiografickou detekcí;
- stanovení reziduí inhibičních látek komerčně dodávanými testy - DELVOTEST SP - NT, ECLIPSE 50, PREMI TEST;
- semikvantitativní stanovení reziduí inhibičních látek RIA metodou CHARM II.;
- další konfirmační metody RIL (HPLC/MS/MS).

3.7 LEGISLATIVA

Po vstupu České republiky do Evropské unie je platná evropská legislativa nadřazena legislativě národní. Mezi legislativu, týkající se problematiky RIL a potravin živočišného původu patří i tzv. **hygienický balíček** (2006), který obsahuje:

- **Nařízení Evropského parlamentu a rady č. 852/2004** ze dne 29. dubna, o hygieně potravin,
- **Nařízení Evropského parlamentu a rady č. 853/2004** ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví specifické hygienické předpisy pro potraviny živočišného původu,
- **Nařízení Evropského parlamentu a rady č. 854/2004** ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví specifická pravidla pro organizaci úředních kontrol výrobků živočišného původu určených pro lidskou spotřebu,
- **Nařízení Evropského parlamentu a rady č. 882/2004** ze dne 29. dubna 2004, o úředních kontrolách za účelem ověřování, zda se dodržují právní předpisy o krmivech a potravinách a ustanovení o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat,
- **směrnici Evropského parlamentu a rady č. 2004/41/EHS** ze dne 21. dubna 2004, která ruší směrnice týkající se hygieny potravin a zdravotní nezávadnosti pro produkci a uvádění do oběhu potravin živočišného původu určených pro lidskou spotřebu a pozměňuje směrnici rady č. 89/662/EHS a 91/67/EHS a rozhodnutí rady č. 92/118/EHS.

Jakýmsi základem hygienického balíčku je Nařízení č. 852/2004. Stanovuje totiž obecné hygienické předpisy pro všechny fáze výroby, zpracování a distribuce potravin. Zásadou je, že provozovatelé potravinářských podniků musejí dodržovat principy HACCP ve všech potravinářských provozech s výjimkou zemědělské prvovýroby.

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009 ze dne 6. května 2009, kterým se stanoví postupy Společenství **pro stanovení limitů reziduí farmakologicky účinných látek v potravinách živočišného původu.**

Nařízení Komise (EU) č. 37/2010 ze dne 22. prosince 2009 o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních reziduálních limitů (MRL) v potravinách živočišného původu. Farmakologicky účinné látky jsou uvedeny v jediné příloze a jsou abecedně řazeny. Jsou vytvořeny dvě tabulky:

1. látky povolené (antibiotika, sulfonamidy, ostatní veterinární léčiva - MRL stanoven, farmakologicky účinné látky - MRL nestanoven)

2. látky zakázané (podražec a výrobky z něj, kolchicin, chloramfenikol, chlorpromazin, dapson, dimetridazol, metronidazol, nitrofurany včetně furazolidonu, ronidazol)

V ČR byly požadavky na syrové kravské mléko plně harmonizovány s předpisy EU. Základní legislativní normou pro systém HACCP a zajištění bezpečnosti potravin pro všechny úseky potravního řetězce je **Zákon o potravinách a tabákových výrobcích č. 110/1997 Sb.**, který je po novele z roku 2004 také zcela harmonizován s předpisy EU a při tom respektuje i některé specifiky výroby potravin v ČR. Úplné znění tohoto zákona je **Zákon č. 224/2008 Sb.** S tímto předpisem souvisí prováděcí předpis:

Vyhláška č. 277/2010 ze dne 15. října 2010 (ruší vyhlášku č. 44/2004 Sb.), kterou se stanoví nejvyšší přípustné zbytky veterinárních léčiv a biologicky aktivních látek používaných v živočišné výrobě v potravinách a potravinových surovinách.

V surovinách a potravinách živočišného původu smí být přítomny jen hodnoty MRL původní substance nebo metabolitu veterinárních léčiv. MRL se rozumí maximální množství (vyjádřeno v mg/kg suroviny) zbytků veterinárních léčiv a biologicky aktivních látek použitých v živočišné výrobě, které je přípustné v surovině živočišného původu nebo na ní. Při překročení nejvyššího přípustného množství reziduí se potravina nebo surovina nepovažuje za zdravotně nezávadnou: §2 zákona č.110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích.

Zákon č. 166/1999 Sb. ze dne 13. července 1999 o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů- (veterinární zákon), úplné znění - **Zákon č. 332/2008 Sb.** Prováděcí předpisy:

Vyhláška č. 291/2003 Sb., o zákazu podávání některých látek zvířatům, jejichž produkty jsou určeny k výživě lidí, a o sledování (monitoringu) přítomnosti nepovolených látek, reziduí a látek kontaminujících, pro něž by živočišné produkty mohly být škodlivé pro zdraví lidí, u zvířat a v jejich produktech, ve znění pozdějších předpisů (poslední aktualizace vyhláškou č. 129/2009 Sb.).

Vyhláška 289/2007 Sb. o veterinárních požadavcích na mléko a mléčné výrobky

Dodržování stanovených povinností dozorují tyto státní orgány:

- orgány Státní veterinární správy ČR
- Státní zemědělská a potravinářská inspekce
- Orgány ochrany veřejného zdraví (Krajské hygienické stanice)
- Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Základní normou týkající se jakosti a zdravotní nezávadnosti živočišných produktů je **ČSN 57 0529 Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování** (1998). Tato norma platí pro syrové kravské mléko určené k mlékárenskému ošetření a zpracování a stanovuje základní požadavky a znaky jakosti.

Požaduje v čl. 2.3.6.: „*Stanovení reziduí látek inhibujících růst mlékárenských kultur musí být negativní*“.

4 ZÁVĚR

Současná celosvětová snaha o zvyšování kvality potravin se týká i mléka a mléčných výrobků. Jednou z nejčastějších příčin zhoršení kvality mléka jsou mastitidy. Proto je jejich výzkumu, diagnostice, léčbě a prevenci věnována velká pozornost ve všech chovatelsky vyspělých zemích. Vzhledem k existující závislosti mezi ukazateli kvality, výkupní cenou a odbytem mléka a celkovou ekonomikou chovu je důležité zaměřit se především na prevenci mastitid a tím i přítomnosti reziduí inhibičních látek v mléce.

Prevence nálezů RIL v mléce spočívá ale zejména v preventivní práci v prvovýrobě. Všechny případy pozitivních nálezů RIL se nedají zpětně dohledat. 95-98 % případů odpovídá specifickým inhibicím - přítomnosti antibiotik a sulfonamidů. Technologická nekázeň v podobě nedodržení ochranné lhůty, záměny ATB aplikovaných na zaprahnutí s aplikací v laktaci, až nedostatečné označení léčených dojníc nebo dokonce jejich záměna jsou výraznými rizikovými faktory. Kratší období stání na sucho po aplikaci ATB než stanoví ochranná lhůta, může být důvodem positivity RIL po otelení. Pouze 2 % reprezentují nespecifické inhibice, kam patří přirozené inhibitory.

V praxi používaná antibiotika mají stanovenou ochrannou lhůtu, po kterou není možné prodávat mléko do mlékárny. Před jeho opětovným zařazením do dodávky mlékárně je nutné provést vyšetření na obsah reziduí inhibičních látek. V současné době je zdůrazňován velký význam používání screeningových metod detekce inhibičních látek, tzv. rychlotestů (např. Twinsensor BT, Charm Rosa Test) v kombinaci s klasickými mikrobiálními testy (Delvotest SP - NT, Eclipse 50), s ohledem na citlivost testu a jeho schopnost záchytu jednotlivých druhů ATB.

Důvody ke kontrolám přítomnosti RIL v syrovém kravském mléce jsou zejména

- etické (nevystavovat konzumenty nedobrovolné expozici terapeutických dávek léčiv v potravinách);
- hygienické (ochrana před možnými škodlivými účinky reziduí na zdraví);
- technologické (prevence narušení fermentačních procesů v mlékárenském průmyslu);
- ekologické (ovlivnění flóry v ekosystému)
- v neposlední řadě také finanční.

Stěžejním problémem výskytu RIL je jejich vliv na lidský organismus. Přítomnost RIL v mléce způsobuje zdravotní rizika u konzumentů, Ta spočívají zejména v příjmu malých opakovaných dávek ATB. Tyto dávky mohou ovlivnit složení střevní mikroflóry, provokovat alergické reakce, vyvolat imunosupresivní účinky, způsobit rezistenci mikroorganismů. V mlékárenském průmyslu mléko kontaminované RIL působí značné technologické problémy při výrobě kysaných mléčných výrobků.

5 SEZNAMY POUŽITÝCH ZDROJŮ

5.1 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BOTSOGLOU N. A., FLETOURIS D. J.: Drug residues in Foods. *Pharmacology, Food Safety and Analysis* New York, Marcel Dekker, 2001, 541-548.
2. BROSCHE J.: Prezentace firem. *Mlékařské listy*, 2010 (119), 45.
3. COLAK H., HAMPIKYAN H., BINGOL E. B.: Some residues and contaminants in milk and dairy products. *Asian Journal of Chemistry*, 2007, 19 (3): 1789-1796.
4. ČSN 57 0529 Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování. 2.vyd. Praha, Český normalizační institut 1993, 8 s.
5. DOLEŽAL O., HLÁSNÝ J., JÍLEK F., HANUŠ O., VEGRICHT J., PYTLOUN J., MATOUŠ E., KVAPILÍK J.: *Mléko, dojení, dojírny*. 1. vyd. Praha: Agrospoj, 2000. 241 s, 39-42.
6. FOX P. F., KELLY A. L.: Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects, *International Dairy Journal*, 2006,16 (6), 500-516.
7. GAJDŮŠEK, S.: Problémy v technologické zpracovatelnosti mléka, zejména v jeho kysací schopnosti. In: Sborník ze semináře "*Inhibiční látky v mléce.*", VÚCHS Rapotín 1994. s. 19-20.
8. HAUBERT V, BROUZA M., LÁTOVÁ J.: Inhibiční látky v potravinách - současné problémy. *Veterinářství*, 1991 (41): 127-128.
9. HERA A., BILLOVÁ V., NOVOTNÁ P.: Antibiotická politika ve veterinární medicíně. *Veterinářství*, 2002 (52): 248-251.
10. HLAVÁČEK J.: Přímý prodej syrového mléka v novele veterinárního zákona. In *Produkce a zdravotní nezávadnost mléka III*, České Budějovice: JU ZF, 2012, 11-22.
11. HOLEC J., MATYÁŠ Z., LUKÁŠOVÁ J., POLÁK P.: *Hygiena a technologie mléka a mléčných výrobků*. 2.vyd. Brno, Vysoká škola veterinární 1989. 362 s, 30-40.
12. HOLEC J.: Výskyt inhibičních látek v mléce a jeho hygienická a technologická rizika. In: *Inhibiční látky v mléce*. VÚCHS Rapotín, 1994, s. 11-15.
13. HONKANEN - BUZALSKI T., SUHREN G.: Residues of Antimicrobial Agents in Milk and Their Significance to Public Health and Milk Processing, *Quality & Safety of Raw Milk*, 2000 (345): 1-12.
14. HONZLOVÁ A.: Metodický pokyn na stanovení reziduí inhibičních látek ve tkáních, mléce, vejcích a potravinách. Státní veterinární ústav Jihlava, 2008.
15. HUML O., PAŠKOVÁ J.: Environmentální mastitidy v chovech skotu. In *Mastitidy skotu*. Brno: MZLU, 2003.

16. JEŘÁBKOVÁ J.: Screeningové testování inhibičních látek v mléce. In *Seminář RIL, IR a NIR technologie*. Brno: MZLU, 2011, 1-15.
17. KANG J. H., JIN J. H., KONDO F.: False positive Outcome and Drug Residue in Milk Samples Withdrawal Times. *Journal of dairy science*, 2005 (88): 908-913.
18. KROUTILÍK J.: Výživa a zpracování mléka v ČR. In *Výživa dojnic a kvalita mléka*. Pohořelice, 2007, 19-26.
19. LEE M. H., LEE H. J., RYU P. D.: Public Health Risks: Chemical and Antibiotic Residues - Review. *Asian: Australasian Journal of Animal Sciences*, 2001, 14 (19): 402-413.
20. NAVRÁTILOVÁ P.: Rezidua antimikrobiálních látek v mléce a jejich význam. In *Seminář RIL, IR a NIR technologie*. Brno: MZLU, 2011, 1-11.
21. NAVRÁTILOVÁ P.: Problematika reziduí inhibičních látek v syrovém kravském mléce. *Veterinářství*, 2002, (52): 478-481.
22. NAVRÁTILOVÁ P.: Rezidua inhibičních látek v mléce. In *Produkce a zdravotní nezávadnost mléka III*. České Budějovice: JU ZF, 2012, 11-22.
23. ROSIVAL L., SZOKOLAY A., BÁTORA V., KALÁČ J., MAĎARIČ A., MALKUS Z., POLSTER M., PRÍBELA A., SZOKOLAYOVÁ J., UHNÁK J., WOLF A.: *Cudzorodé latky v požívatinách*. 2. vyd. Martin: OSVETA, 1998. 611 s, 225-229.
24. SAMKOVÁ E.: Inhibiční látky v mléce. In *Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků*. Brno: MZLU, 2010.
25. SEYDLOVÁ R.: Inhibiční látky v mléce. *Mlékařské listy*, 1998, (45), 1998, 9-10.
26. SEYDLOVÁ R.: Lze řešit zdravotní stav mléčné žlázy v období zaprahování. *Náš chov*, 2011, (2): 72-74.
27. SEYDLOVÁ R., SNÁŠELOVÁ J.: Současný stav mikrobiologické a bakteriologické kvality syrového mléka. *Mlékařské listy*, 2010, (121): XXXI-XXXV.
28. SISCHO W.: Quality Milk Tests for Antibiotic Residues. *Journal of dairy science*, 1996,(79):1065-1073.
29. SMOLA J., HAAS D: Nové aspekty v etologii mastitid. In *Mastitidy skotu*. Brno: MZLU, 2003.
30. ŠVIRÁKOVÁ E., DAVID C., ŽÁČKOVÁ P., PLOCKOVÁ M: Vliv Nis⁺ a Nis⁻ kmenů *Lactococcus lactis* na růst *Bacillus cereus* DMF 2008 v modelovém systému mléka. *Mlékařské listy*, 2005 (93): 15-16.
31. TICHÁČEK A., BJELKA M., Hanuš O., KOPUNECZ P., OLEJNÍK P., PAVLATA L., PECHOVÁ A., PONÍŽIL A.: *Poradenství jako nástroj bezpečnosti v prvovýrobě mléka - (Metodika pro praxi)*. 1. vyd. Šumperk: AGRITEC, 2007. 86 s.
32. URBAN F.: *Chov dojeného skotu*. 1. vyd. Praha: APROS, 1997. 289 s., 142-143.

33. VOTAVA M.: *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. vyd. Brno: Neptun, 2005. 351 s.
34. VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J.: *Chemie potravin*. 3. vyd. Tábor: OSSIS. 2009. 580 s, 53-56.
35. VYHNÁLKOVÁ J., JEŘÁBKOVÁ J.: Význam reziduí inhibičních látek v mléce. In *Nové poznatky v technologii výroby a zpracování mléka*. České Budějovice: JU ZF, 1996.
36. WATZKOVÁ J., ŘÍHA J., KŘÍŽOVÁ L., TŘINÁCTÝ J.: Průzkum spotřebitelských postojů k mléku a mléčným výrobkům. *Mlékařské listy*, 2010 (121): XII.

Internetové zdroje:

37. Antibiotika [online]. 2012 [cit. 2012-02-05]. Dostupné:
<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Antibiotika>
38. BILLOVÁ V., HERA A., NOVOTNÁ P.: Minimalizace rizik používání vybraných skupin antimikrobiálních léčiv u potravinových zvířat [online]. 2007 [cit. 2012-02-04].
Dostupné: http://www.vri.cz/userfiles/file/Ved_Vyb/Billova.pdf
39. Colostrum [online]. 2011 [cit. 2012-02-02]. Dostupné:
<http://www.colostrum-info.cz/on-line>
40. HANUŠ O., GENČUROVÁ V.: Interpretace rozborů mléka pro účely zpeněžování a kontroly užítkovosti [online]. 2007 [cit. 2001-06-22]. Dostupné:
http://www.vuchs.cz/publikace/prezentace-a-postery/_prezentace/2007_12_05_Skalsky_Dvur.pdf
41. HANUŠ O., VYLETĚLOVÁ M., NEJESCHLEBOVÁ L., KOPECKÝ J., JEDELSKÁ R.: Dopady zdravotního stavu mléčné žlázy a souvisejících faktorů na kvalitu a bezpečnost kravského mléka jako potravinářské suroviny [online]. 2007 [cit. 2011-06-22]. Dostupné:
http://www.vuchs.cz/publikace/prezentace-a-postery/_prezentace/2007_04_26_Zilina.pdf
42. HANUŠ O., VEGRICHT J., BJELKA M., MACHÁLEK A.: Hodnocení kvality mléka [online]. 2007 [cit. 2011-06-22]. Dostupné: http://vuchs.cz/publikace/prezentace-a-postery/_prezentace/2007_03_23_Pohorelice.pdf
43. HANUŠ O.: Základy prvovýroby mléka pro kvalitní mléčnou produkci [online]. 2008 [cit. 2011-06-22]. Dostupné: http://www.vuchs.cz/publikace/prezentace-a-postery/_prezentace/2008_10_30_Ceske_Budejovice.pdf
44. HANUŠ O., VYLETĚLOVÁ M., VORLÍČEK Z., SOJKOVÁ K., KOPECKÝ J., NEJESCHLEBOVÁ L.: Postupy a výsledky hygienické kvality mléka krav a malých přežvýkavců [online]. 2009 [cit. 2011-06-22]. Dostupné:
http://www.vuchs.cz/publikace/prezentace-a-postery/_prezentace/2009_05_21_Brno.pdf

45. HLAVÁČEK J. - Prvovýroba mléka a vajec z pohledu kontroly podmíněnosti při veterinárně-hygienickém dozoru [online]. 2010. Dostupné na: www.zeraagency.eu/hlavacek_jiri_syrove_mleko_dozor_cc2010.p
46. Kapalinový chromatograf [online]. 2011 [cit. 2011-07-11]. Dostupné: <http://ecom-sro.trade.cz/kapalinovy-chromatograf-hplc-gradientni-analyticky>
47. KOSTELNÍKOVÁ D.: Technologické procesy a rezidua antimikrobiálních látek v mléce [online]. 2008 [cit. 2011-07-19]. Dostupné: <http://konference2008.ptacisvet.cz/4download/sbornik2008.pdf>
48. Laboratoř pro rozbor mléka Buštěhrad [online]. 2011 [cit. 2011-07-25]. Dostupné: <http://www.cmsch.cz/laborator-pro-rozbor-mleka-bustehrad>
49. Laboratoř pro rozbor mléka Buštěhrad, Osvědčení o akreditaci [online]. 2011 [cit. 2011-07-25]. Dostupné: <http://www.cmsch.cz/cs/osvedceni-o-akreditaci-lrm-bustehrad>
50. NAVRÁTILOVÁ P.: Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk - a review. *Czech J. Food Sci.*, (26), str. 393-401, 2008 [cit. 2011-07-18]. Dostupné na <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/03093.pdf>
51. Normy a legislativa [online]. 2009 [cit. 2011-06-24]. Dostupné: <http://eagri.cz/public/web/mze/zemedelstvi/legislativa/zivocisne-komodity/>
52. NOVOTNÁ P., POKLUDOVÁ L., BUREŠ J., HERA A.: Problematika terapie mastitid s ohledem na zásady správného používání antibiotik [online] In *Mastitidy skotu*. 2006 [cit. 2011-07-22]. Dostupné: http://www.buiatrie.cz/attachments/038_Mastitidy%20skotu_1111-2006.pdf
53. O. K. servis - BioPro.cz: Stanovení reziduí inhibičních látek [online]. 2010 [cit. 2011-06-24]. Dostupné: <http://www.biopro.cz/Diagnostika/Diagnostika-pro-kontrolu-kvality-potravin/Stanoveni-rezudii-inhibicnich-latek-v-mlece-a-mase/>
54. Sbírka právních předpisů [online]. 2010 [cit. 2012-19-03]. Dostupné na: <http://esipa.cz>
55. ROSA testy [online]. 2011 [cit. 2011-07-10]. Dostupné: <http://bentleyczech.cz/>
56. RYŠÁNEK D.: Vliv mastitid na jakost a zdravotní nezávadnost mléka [online]. 2007 [cit. 2011-07-24]. Dostupné: http://www.vri.cz/userfiles/image/pracovnici/Rysanek/kapit_predn/Vliv_mastitid_na_jakost_mleka.pdf47
57. SHALAK M. V., MARUSITCH A. G., KAMINSKAJA O. V.: Vliv přípravků tetracyklinové řady na obsah antibiotik v mléce [online]. 2009 [cit. 2011-08-04]. Dostupné: <http://asau.ru/doc/nauka/conf/2010/part3/seminar6.pdf>

58. SPÍŽEK J.: Rezistence na antibiotika [online]. Přírodovědecký časopis Vesmír 78, 27, 1999 [cit. 2012-02-05]. Dostupné: <http://www.vesmir.cz/clanek/rezistence-na-antibiotik>
59. STEJSKAL V., HAJŠLOVÁ J., KOCOUREK V.: Bioanalytické metody pro hodnocení bezpečnosti zemědělských surovin a produktů [online]. 2008 [cit. 2011-07-11]. Dostupné: <http://www.phytopsanitary.org/projekty/2008/Projekt2.pdf> 11.7.2011
60. SVÚ Jihlava, Osvědčení o akreditaci [online]. 2011 [cit. 2011-07-25]. Dostupné: <http://www.svujihlava.cz/soubory/109cz.pdf>
61. ÚSTAV PRO STÁTNÍ KONTROLU VETERINÁRNÍCH BIOPREPARÁTŮ A LÉČIV - Veterinární zákon a související předpisy [online]. 2009, [cit. 2011-07-14]. Dostupné: <http://www.uskvbl.cz/cs/informace/legislativa/veterinarni-zakon-a-souvisejici-pedpisy>
62. Volné mastné kyseliny [online], 2004 [cit. 2012-02-04]. Dostupné: <http://www.cmsch.cz/store/2010-minoritni-slozky-mleka.pdf>

5.2 SEZNAM TABULEK

- Tab. 1. Obsah jednotlivých složek obranného systému mléčné žlázy
- Tab. 2. Rozdělení ATB pro potravinová zvířata
- Tab. 3. Důvody pozitivního nálezu inhibičních látek v mléce
- Tab. 4. Spotřeba ATB v letech 2005-2010
- Tab. 5. Syrové mléko - výsledky rozborů syrového mléka
- Tab. 6. Požadavky na hygienické limity RIL v syrovém mléce EU / RUSKÁ FEDERACE
- Tab. 7. Selektivní testy - TWINSENSOR BT
- Tab. 8. Selektivní testy - CHARM ROSA test
- Tab. 9. Citlivost testů Twinsensor BT a Charm ROSA® TEST
- Tab. 10. Selektivní testy - ROSA testy-BETA STAR, TETRA STAR
- Tab. 11. Selektivní testy - DELVO - X - PRESS
- Tab. 12. Selektivní testy - PENZYME test
- Tab. 13. Selektivní testy - SNAP test
- Tab. 14. Širokospektrální testy - DELVOTEST SP - NT
- Tab. 15. Širokospektrální testy - ECLIPSE
- Tab. 16. Širokospektrální testy - CHARM FARM test
- Tab. 17. Širokospektrální testy - KALIDOS NEW
- Tab. 18. Citlivost širokospektrálních testů
- Tab. 19. Plotnové metody-metoda čtyř ploten (č. 1.-4.), metoda šesti ploten (č. 1.-6.), pro mléko a mléčné výrobky
- Tab. 20. Fyzikálně chemické metody - ELFO-gelová elektroforéza s mikrobiální detekcí
- Tab. 21. Fyzikálně chemické metody - RIA-CHARM II. Analyzátor
- Tab. 22. Fyzikálně chemické metody - HPLC/DAD, HPLC/MS, HPLC/MS/MS
- Tab. 23. ELISA metody
- Tab. 24. Záchyt RIL v CL České Budějovice a jejich specifikace v NRL Jihlava
- Tab. 25. Používané koncentrace antibiotik a sulfonamidů na jednotlivých plotnách

5.3 SEZNAM GRAFŮ

- Graf 1. Důvody pozitivních nálezů RIL v mléce
- Graf 2. Spotřeba ATB v letech 2005-2010

5.4 SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1., 2. Inkubátor, čtecí zařízení s tiskárnou k testu Twinsensor BT
- Obr. 3. Testovací stripy Charm ROSA® TEST
- Obr. 4., 5. Vzorek pozitivní (+) a negativní (-) na testu Delvotest SP - NT, ampule a mikrodestička
- Obr. 6., 7. Vzorek pozitivní (+) a vzorek negativní (-) na testu Eclipse 50, mikrodestička
- Obr. 8. Vzorek pozitivní (+) a vzorek negativní (-) na testu Kalidos New
- Obr. 9. Schéma plotnové metody
- Obr. 10. Analyzátor CHARM II.
- Obr. 11. Kapalinový chromatograf HPLC