

REZUMAT

Teza de doctorat intitulată „**EVALUAREA REZIDUURILOR DE ANTIBIOTICE ȘI XENOBIOTICE ELEMENTARE ÎN LAPTE ȘI PRODUSE DE LAPTE ȘI A RISCULUI LOR PENTRU CONSUMATORI**” are caracter de originalitate prin aplicarea unor metode noi de analiză, determinarea toxicelor pe întreg fluxul tehnologic de procesare a laptelui și evaluarea riscului pe care-l reprezintă concentrațiile obținute.

Teza cuprinde un număr de 238 pagini și este structurată în două părți.

Partea bibliografică se extinde pe un număr de 64 pagini, fiind sistematizată în trei capitole ce prezintă date din literatura de specialitate referitoare la: matricile alese pentru investigații, antibioticoterapia și evaluările de risc ale reziduurilor de antibiotice, precum și ecotoxicologia xenobioticelor elementare (*Pb, Cd, Hg, Ni, Cu, Zn*).

Partea a doua, de *Contribuții personale* se desfășoară pe un număr de 116 pagini și cuprinde patru capitole, în care se prezintă scopul și importanța cercetărilor, materialele și metodele de lucru, rezultatele obținute și discuțiile aferente, precum și concluziile generale care s-au desprins din cercetările efectuate.

Datele prezentate sunt susținute de 13 tabele și 18 figuri inserate în partea de *Studiu bibliografic*, 39 tabele și 48 figuri inserate în partea de *Contribuții personale*. Lista bibliografică însumează 270 titluri din literatura autohtonă și internațională, legislație specifică domeniului de siguranță alimentară, standarde ale unor metode de lucru și fișiere internet cu conținut de specialitate. În conținutul tezei se regăsesc date proprii publicate în lucrările științifice susținute în cadrul Simpozioanelor cu participare internațională organizate de Facultatea de Medicină Veterinară Iași, precum și în Revista Română de Medicină Veterinară.

Importanța temei alese vine din faptul că, în cantități mici și prin aport îndelungat, antibioticele pot avea efecte nedorite asupra omului și animalelor. Efectele nedorite asupra sănătății consumatorului pot fi directe și se manifestă sub forma reacțiilor de ordin alergic sau chiar toxic. Efectele indirecte sunt, de asemenea, importante datorită creării de

microorganisme rezistente la antibiotice. Unele studii au arătat că laptele poluat cu reziduuri de antibiotice obținut de la 20 vaci a întârziat sau oprit procesele fermentative ale celui recoltat de la 25.000 vaci. Mai mult, probele ce conțin reziduuri de antibiotice sunt însoțite de creșteri ale populației celulelor somatice și ale numărului total de germeni.

Prezența xenobioticelor elementare în lapte este, de asemenea, nefastă pentru că multe din ele au caracter cumulativ și pun în pericol sănătatea animalelor tinere și a omului. Trebuie, de asemenea, menționat efectul cancerigen și mutagen pe care acestea îl pot dezvolta la consumatori.

Principalele obiective transpuse în realizarea acestei lucrări au fost:

- ✎ Monitorizarea reziduurilor de antibiotice și xenobiotice elementare în lapte și derivate lactate, în concordanță cu cele mai recente norme privind metodologia de lucru și interpretarea rezultatelor.
- ✎ Aprecierea sezonality contaminărilor cu antibiotice și xenobiotice elementare și investigarea corelațiilor cu alți factori de risc.
- ✎ Analiza variației conținutului de antibiotice și xenobiotice elementare în probele de lapte recoltate de la două grupuri diferite de surse: *centrele de colectare* și *fermele de bovine*.
- ✎ Evaluarea riscului la care sunt expuși consumatorii, pe baza comparării concentrațiilor determinate în acest studiu cu dozele zilnice acceptabile sau cu limitele săptămânale (provizorii) tolerabile stabilite de Organizația Mondială a Sănătății pentru fiecare antibiotic (cu excepția penicilinelor) și xenobiotic elementar determinat. În cazul cuprului și zincului s-a urmărit modul în care concentrațiile determinate pot satisface necesarul zilnic pentru copii și adulți.

Materialul de studiu a fost reprezentat de *probe de lapte* recoltate de la mai multe *centre de colectare* și *două unități zootehnice* din zona de Nord a Moldovei; au fost recoltate și produse lactate rezultate în urma prelucrării laptelui pe diferite fluxuri tehnologice.

Metodele de lucru au fost aplicate conform standardelor în vigoare armonizate cu legislația comunitară. Identificarea reziduurilor de antibiotice în probele de lapte s-a realizat folosind *testul calitativ microbial* bazat pe sensibilitatea tulpinii de *Bacillus stearothermophilus*, varietatea *calidolactis*, ATCC 10149. Pentru confirmarea eșantioanelor contaminate s-a utilizat, într-o primă etapă, un *test semicantitativ* ce folosește receptorii microbieni pentru identificarea familiilor de antibiotice din probele investigate. Confirmarea cantitativă a reziduurilor de antibiotice a fost realizată folosind o metodă *imunoenzimatică competitivă*. Pentru analiza reziduurilor de antibiotice din produsele lactate s-a utilizat inițial *testul semicantitativ* pentru identificarea probelor pozitive, acestea fiind confirmate cantitativ după aplicarea *metodei imunoenzimatice competitive*.

Determinarea xenobioticelor elementare (*Pb, Cd, Hg, Ni, Cu, Zn*) din probele de lapte și produse lactate a fost efectuată prin metoda *spectrofotometriei de absorbție atomică* utilizând un *spectrofotometru cu autosempler și cuptor de grafit* pentru detecția plumbului, cadmiului, cuprului și nichelului, *flacăra* pentru zinc și *generator de hidruri* pentru mercur. Mineralizarea probei de lucru s-a făcut pe cale umedă iar rezultatele obținute au fost exprimate în $\mu\text{g/kg}$.

În conformitate cu obiectivele propuse, s-a urmărit stabilirea unor corelații dintre contaminarea laptelui cu antibiotice și xenobiotice elementare (*Pb, Cd, Hg, Ni, Cu, Zn*) și alți factori de risc (creșterea populațiilor de celule somatice și de germeni microbieni). Determinarea *celulelor somatice* s-a realizat *microscopic*, folosind un echipament computerizat de colorare și citire a lamelor. Determinarea *numărului total de germeni* a avut la bază folosirea unui dispozitiv specializat în numărarea populațiilor bacteriene, care cuantifică modificările de culoare din tuburile speciale de test.

Pentru o interpretare cât mai corectă a datelor de investigație, au fost folosiți o serie de indicatori statistici de bază. Dintre aceștia, cei mai la îndemână au fost: indicatorii minimum și maximum, media aritmetică, abaterea standard, coeficientul de variație, intervalul de încredere al mediei, testul χ^2 (*chi-pătrat*) pentru determinarea concordanței, coeficientul de corelație Pearson, coeficientul de sezonabilitate, testul *Student* sau *T – testul* pentru analiza variației seriilor de date.

Examenul calitativ al reziduurilor de antibiotice din 2785 probe de lapte, într-o perioadă de patru ani (2006 – 2009), a dus la identificarea a 124 probe pozitive (4,45%) și 130 probe dubioase (4,67%). După aplicarea tratamentului termic s-a confirmat prezența antibioticelor în 109 probe pozitive (87,9%) și 24 probe dubioase (18,46%), diferența fiind reprezentată de probele fals-pozitive, datorate unor inhibitori naturali termolabili (*lactoferina, lactoperoxidaza, lizozimul*).

Principalele familii de antibiotice identificate au fost betalactamicele (în 27,90% din probe) în concentrații medii de 26,65 $\mu\text{g/kg}$, gentamicina/neomicina (în 25% din probe) în concentrații medii de 198,68 μg gentamicină/kg și 2048,53 μg neomicină/kg, tetraciclina (în 24,42% din probe) în concentrații medii de 271,43 $\mu\text{g/kg}$, gentamicina /streptomicina (în 15,11% din probe) în concentrații medii de 198,68 μg gentamicină/kg și 280,61 μg streptomicină/kg și macrolidele (în 7,56% din probe) în concentrații medii de 97,87 μg tilozină/kg.

Probele de lapte cu reziduuri de antibiotice au prezentat sezonabilitate scăzută în lunile ianuarie ($cs_i = 0,51$) și iulie ($cs_i = 0,59$), și crescută în aprilie ($cs_i = 1,77$) și mai ($cs_i = 1,43$).

S-a constatat o corelație puternică între prezența reziduurilor de antibiotice și creșterea numărului de celule somatice, diferențele dintre frecvențele observate și cele așteptate fiind de 49,54 pentru corelația cu clasa de celule somatice cu mai mult de 600.000 celule/ml și de 30,31

pentru corelația cu clasa de celule somatice cu 400.000 – 600.000 celule/ml. Analiza indicatorilor *chi-pătrat* arată o corelație mai puternică între prezența reziduurilor de antibiotice și numărul crescut de celule somatice, față de contaminarea cu antibiotice și numărul crescut al germenilor microbieni din probele investigate.

Analiza reziduurilor de antibiotice din produsele lactate (lapte de consum pasteurizat, lapte bătut, iaurt, smântână, brânză și cașcaval) a dus la identificarea grupei gentamicină/neomicină în câte o probă de smântână și brânză, neomicina fiind ulterior determinată în concentrații de 27,71 $\mu\text{g/kg}$ în smântână și 32,90 $\mu\text{g/kg}$ în brânză. Macrolidele au fost identificate în câte o probă de brânză și cașcaval, tilozina fiind ulterior determinată în concentrații de 51,31 $\mu\text{g/kg}$, respectiv 52,79 $\mu\text{g/kg}$. Tetraciclinele au fost identificate în două probe de brânză și în câte una de smântână și cașcaval, fiind determinate în concentrații de 22,97 $\mu\text{g/kg}$ și 25,21 $\mu\text{g/kg}$ în probele de brânză, 23,74 $\mu\text{g/kg}$ în smântână și 24,35 $\mu\text{g/kg}$ în cașcaval.

Probele de lapte supuse investigațiilor de confirmare cantitativă provin din eșantioanele considerate neconforme încă de la aplicarea testului calitativ microbian, nefiind astfel dirijate consumului uman. Concentrațiile determinate pentru majoritatea reziduurilor de antibiotice nu depășesc dozele zilnice acceptabile stabilite de Organizația Mondială a Sănătății de a fi preluate din substraturi alimentare.

În produsele lactate, reziduurile de antibiotice au fost identificate în perioada 2006-2007, prezența acestora datorându-se unui sistem *HACCP* de prevenire a riscurilor incomplet operațional la acea vreme la nivelul unității procesatoare. Cantitățile determinate în acest studiu au fost la niveluri care nu influențează nici dezvoltarea culturilor lactice, nici sănătatea consumatorilor.

Reziduurile de xenobiotice elementare au fost determinate dintr-un total de 98 probe de lapte, fiind analizate câte 28 probe în anii 2006 – 2008 și 14 probe în anul 2009 pentru fiecare metal în parte. *Plumbul* a fost identificat în 71,43 – 85,71% din probe în concentrații medii de 2,49 -3 $\mu\text{g/kg}$, situate sub limita maximă admisă. *Cadmiul* și *mercurul* fie au lipsit din probele analizate, fie s-au aflat în cantități mai mici decât limitele de detecție ale metodei. *Nichelul* a fost determinat în toate probele investigate în concentrații medii cuprinse între 11,24 – 11,90 $\mu\text{g/kg}$, mai mici decât dozele provizorii tolerabile stabilite de către Organizația Mondială a Sănătății.

Cuprul a fost determinat în toate probele investigate în concentrații medii cuprinse între 237,10 – 303,43 $\mu\text{g/kg}$, considerate normale pentru laptele de vacă. *Zincul* a fost determinat în toate probele investigate în concentrații medii cuprinse între 2051,21 – 2628,64 $\mu\text{g/kg}$, suficiente pentru asigurarea necesarului zilnic uman.

Xenobioticele investigate au prezentat sezonabilitate crescută toamna (cs_i fiind cuprins între 1,00 – 1,21) și iarna (cs_i fiind cuprins între 1,09 – 1,34), și scăzută primăvara (cs_i fiind cuprins între 0,58 – 0,92).

Analiza coeficientului Pearson a arătat lipsa corelației sau existența uneia slabe între concentrațiile reziduurilor de xenobiotice elementare și variațiile populațiilor de celule somatice și germeni microbieni în probele investigate.

Investigarea xenobioticelor elementare în produsele lactate permite următoarele concluzii:

- ✦ *Plumbul* a fost determinat în concentrații medii care au variat între 2,45 – 2,83 $\mu\text{g/kg}$ în laptele pasteurizat și 3,87 – 4,28 $\mu\text{g/kg}$ în cașcaval. Concentrația maximă de plumb determinată în cașcaval se încadrează în consumul uman săptămânal tolerabil de 25 $\mu\text{g/kg}$.
- ✦ *Nichelul* a fost determinat în concentrații medii care au variat între 11,88 – 12,13 $\mu\text{g/kg}$ în laptele pasteurizat și 16,10 – 16,55 $\mu\text{g/kg}$ în cașcaval. Concentrația maximă de nichel determinată în cașcaval nu constituie un risc pentru sănătatea consumatorului, fiind cu mult mai mică decât doza zilnică acceptabilă de 300 μg pentru un individ de greutate medie.
- ✦ *Cuprul* a fost determinat în concentrații medii care au variat între 244,52 – 277,25 $\mu\text{g/kg}$ în laptele pasteurizat și 1246,05 – 1332,71 $\mu\text{g/kg}$ în cașcaval. Concentrațiile determinate în probele de cașcaval pot asigura, în asociere cu alte surse, necesarul zilnic de 1 – 1,6 mg pentru copii și 1,5 – 2 mg pentru adulți.
- ✦ *Zincul* a fost determinat în concentrații care au variat între 2348,18 – 2434,43 $\mu\text{g/kg}$ în laptele pasteurizat și 11772,49 – 12334,12 $\mu\text{g/kg}$ în smântână. Majoritatea concentrațiilor medii ale zincului determinate în produsele investigate pot satisface necesarul zilnic de 3 – 10 mg pentru copii și 10 – 15 mg pentru adulți.

S-a urmărit evaluarea comparativă a calității laptelui pe seama constituirii a două grupuri de investigații – grupul „*centre de colectare*” și grupul „*ferme*”, în funcție de sursa de recoltare a probelor. A fost folosit *testul Student (T-testul)* pentru analiza variației datelor de investigație. A fost confirmată susceptibilitatea că laptele provenit de la centrele de colectare poate avea o încărcătură mai mare de antibiotice, comparativ cu cel recoltat de la ferme. De asemenea, în probele recoltate de la centrele de colectare au fost determinate concentrații mai mari de plumb și nichel, și mai mici de cupru și zinc.

Rezultatele obținute în acest studiu au fost comparate cu cele publicate în alte lucrări de specialitate de pe plan național și internațional, fiind confirmate niveluri normale de contaminanți în laptele materie primă.

Cercetările efectuate ne îndreptățesc să facem câteva propuneri referitoare la asigurarea calității toxicologice a laptelui materie primă și produselor finite:

- ✦ Este obligatorie implementarea din partea unităților de procesare a unui sistem mai riguros de control a calității laptelui la recepția sa în centrele de colectare, analiza variației

conținutului de antibiotice demonstrând faptul că laptele livrat din gospodăriile populației prezintă o susceptibilitate mai mare de contaminare decât cel livrat de către ferme.

- Este oportună educarea crescătorilor de animale cu privire la modalitățile de folosire a preparatelor medicamentoase pe bază de antibiotice, mulți dintre aceștia fiind tentați să utilizeze asocieri de antibiotice pentru tratamentul oricărei infecții banale, chiar în afara recomandărilor medicului veterinar; de asemenea, este importantă respectarea timpilor de eliminare în lapte corespunzători fiecărui antibiotic.
- Este indicată implementarea unui management periodic de control toxicologic a calității laptelui și bazei furajere prin recoltarea de probe de la fiecare furnizor în parte, în acest fel neconformitățile fiind mai rapid identificate și eliminate.