

PËRCAKTIMI I MBETJEVE TË ENROFLOXACINËS NË VEZË PËRMES PËRDORIMIT TË PREMI®TEST DHE ELISA

SADIK HETA,¹ FATMIRA SHEHU.²

¹Agjencia e Ushqimit dhe Veterinarisë – Kosovë

²Universiteti Bujqësor i Tiranës, Fakulteti i Mjekësisë Veterinare, Departamenti i
Shendetit Publik Veterinar
e-mail: sadik.heta@rks-gov.net

Përmbledhje

Enrofloxacin është një antibiotik i rëndësishëm që përdoret në industrinë e shpendëve në Kosovë. Gjithashtu, mbetjet antibiotike janë një problem serioz shëndetësor në këtë industri. Ekzaminimi i mbetjeve antibakteriale në vezë është një subjekt veçanërisht i rëndësishëm. Qëllimi i këtij studimi është zbulimi i mbetjeve të enrofloxacinës në vezët e pulave nga pesë rajone të Kosovës (Prishtinë, Prizren, Ferizaj, Pejë dhe Gjiilan). Dy kite të ndryshme komerciale për shqyrtimin e enrofloxacinës dhe antibakterialëve të tjerë në vezë janë përdorur në përputhje me Vendimin 2002/657 / EC: enzyme-linked immunoabsorbant assay (ELISA) kit dhe testi mikrobiologjik (Premi®Test). Rezultatet e fituara përmes përdorimit të Premi® Test, zbuluan se vetëm 30/110 (27.2%) u kontaminuan me mbetje antibiotike. Ndërsa metoda ELISA tregoi se 60/110 (54.5%) mostra ishin pozitive për enrofloxacinën. Nga këto 33/110 (30%) i përkasin rajonit të Pejës, 18/110 (16.3%) i përkasin rajonit të Prishtinës dhe 9/110 (8.2%) në rajonin e Prizrenit. Mostrat nga Gjiilani dhe Ferizaj rezultuan negative. Një krahasim midis dy testeve (Premi®Test dhe ELISA) gjithashtu zbuloi ndjeshmërinë e pamjaftueshme të Premi®Test. Rezultatet e këtij studimi tregojnë përdorimin pa kontroll të enrofloxacinës në fermat e pulave në pesë rajone të Kosovës. Rritja e ndërgjegjësimit të mbarështuesve të shpendëve për rreziqet e mbetjeve antibiotike në produktet ushqimore me origjinë shtazore, së bashku me kohët e sakta të përputhshmërisë të eliminimit, janë shumë të rëndësishme për tu zbatuar. Aktualisht, Agjencia Kombëtare e Ushqimit dhe Veterinarisë në Kosovë është duke monitoruar mbetjet antibiotike në vezë, nëpërmjet një plan i ri kombëtar për monitorimin e mbetjeve në vezë.

Fjalëkyçe: Vezë, Premi®Test, Enrofloxacin, ELISA.

Abstract

Enrofloxacin is an important antibiotic in poultry industry in Kosovo. Also, antibiotic residue is a serious health problem in this industry. The screening of antimicrobial residues in eggs is an especially important subject. The aim of present study is detection of enrofloxacin residue in chicken eggs from five regions of Kosovo (Pristina, Prizren, Ferizaj, Peja and Gjiilan). Two different commercial kits for the screening of enrofloxacin and other antimicrobials in eggs were used in accordance with Decision 2002/657/EC: one enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit and microbiological tests (Premi®Test). Results obtained through the use of Premi®Test, found that only 30/110 (27.2%) samples were contaminated with antibiotics residues. While the ELISA method showed that 60/110 (54.5%) samples were positive for enrofloxacin. Of these 33/110 (30%) belong to the Peja region, 18/110 (16.3%) belong to the Pristina region and 9/110 (8.2%) in the region of

Prizren. Samples from Gjilan and Ferizaj proved to be negative. A comparison between two tests (Premi@Test and ELISA) also revealed insufficient sensitivity of Premi@Test. The results of this study show the use without control of enrofloxacin in poultry farms in five regions of Kosovo. The raising awareness of poultry breeders about the risks of antibiotic residues in food products of animal origin, along with the exact compliance withdrawal times can be very helpful. Currently, the National Agency of Food and Veterinary in Kosovo is monitoring antibiotic residues in eggs, through a new national plan for monitoring residues in eggs.

Key words: Eggs, Premi@Test, Enrofloxacin, ELISA.

Hyrje

Antibiotikët janë grupi më i rëndësishëm i barnave antimikrobiale, të përshkruara gjerësisht për njerëz dhe kafshë. Sipas Organizatës Botërore të Shëndetësisë (OBSH), rreth gjysma e antibiotikëve të prodhuar në mbarë botën konsumohen për aplikime jo njerëzore (World Health Organization, 2002).

Antimikrobikët përdoren nga industria e shpendëve për të nxitur rritjen dhe efikasitetin e ushqimit dhe për të zvogëluar sëmundjet bakteriale (Fabrega *et.al*, 2001).

Fluoroquinolonet (FQs) janë antibiotikë sintetikë shumë të efektshëm. Mekanizmi i tyre terapeutik i veprimit bazohet në frenimin e AND gyrase në speciet gram-negative dhe topoizomerazës IV në speciet gram-pozitive (Hernandez-Arteseros *et al*, 2002). Këto barna zakonisht përshkruhen për trajtimin dhe parandalimin e sëmundjeve infektive në kafshët e fermave.

Përmbushja e kriterëve të sigurisë ushqimore në lidhje me prodhimin e vezëve, kryet nëpërmjet kontrollit në zinxhirin prodhues të tyre. Ky kontroll implementohet në përputhje me kërkesat e gjurmueshmërisë dhe respektimit të rregulloreve për HACCP (European Commission, 2009).

Prodhimi sasi i vezëve të pulave në Kosovë në vitet e fundit është rritur ndjeshëm dhe plotëson rreth 95% të kërkesave për vezë, Duke vlerësuar interesin në rritje të prodhuesve vendorë në aspektin e përmbushjes së cilësisë së prodhimeve të tyre, në mënyrë që të prodhojnë një produkt të sigurt në aspektin e mbetjeve të antibiotikëve, theksojmë faktin se deri tani në Kosovë nuk ka pasur studim mbi këtë problematik,

Për të kontrolluar praninë e mbetjeve të substancave që nuk janë të autorizuara për përdorim, baza ligjore e përdorur në Kosovë është Udhëzimi Administrativ MA-Nr. 26/2005 "Mbi masat për monitorimin e substancave të caktuara dhe mbetjeve të tyre në kafshët e gjalla dhe produktet e tyre". Ky udhëzim bazohet në Direktivën e Këshillit 96/23 / EC. Për përcaktimin e limitit maksimal të mbetjeve, zbatohet Udhëzimi Administrativ MA-Nr. 14/2006 "Për përcaktimin e kufirit maksimal të mbetjeve".

Sipas direktivës 96/23 / EC, është shumë e rëndësishme që të përdoren metoda screening për të përcaktuar praninë e mbetjes së një medikamenti

mbi ose nën nivelin e interesit (MRL, prania). Këto teste karakterizohen nga aftësia për të analizuar një numër të madh të mostrave në mënyrë që të individualizohen ato të dyshimta dhe të vazhdohet më pas me përdorimin e testeve konfirmuese (Decision 2002/657/EC, European Food Safety Authority 2009, Kilinc B., Meyer C., Hilge V, 2007)

Materiali dhe metodat

-Rajonet e përfshira në studim:

Në këtë studim është përfshirë pjesa më e madhe e territorit të Kosovës në kuadër të Planit Kombëtar të monitorimit të mbetjeve antibiotike në vezë.

110 mostra të vezëve u mblodhën në fermat komerciale që i përkasin pesë rajoneve të Kosovës (Tabela 1)

Tabela 1. Nr. i kreveve / rajon në studim

Rajoni	Nr.
Prishtina	221700
Prizren	155400
Ferizaj	32400
Peja	263100
Gjilan	102200
Totali	774800

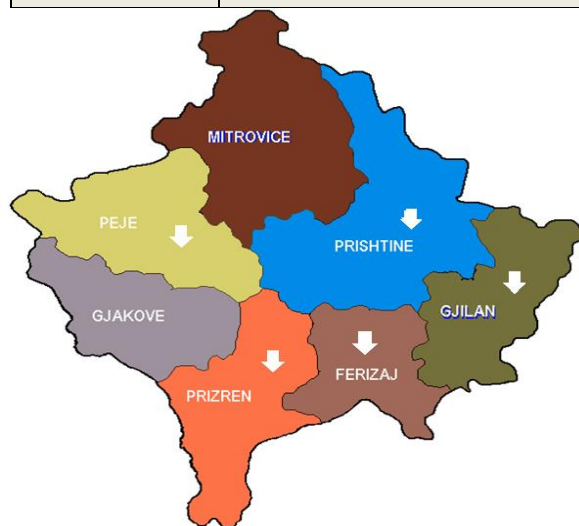


Figura 1. Harta e Kosovës me pesë rajonet e marra në studim

-Kampionimi

Marrja e mostrave është kryer duke respektuar Procedurat Standarde të Punës (SOP) për monitorimin dhe kontrollin e mbetjeve në ushqime. Çdo mostër u formua nga 1x12 njësi. Kampionimi u shoqërua me dokumentacionin përkatës, duke sjellë informacione të detajuara të rëndësishme për procesin e gjurmueshmërisë. Gjithashtu ky proces u krye me identifikimin e kodifikuar të kampioneve dhe transportin e menjëhershëm në temperaturë ftohëse 4⁰ C për në laboratorin e kontrollit.

Kontrolli laboratorik:

-Premi Test

Mostrat e vezëve u përpunuan paraprakisht përmes homogjenizimit (e verdha dhe albumina së bashku). Premi Test (test R-biopharma Premi) u aplikua duke zbatuar udhëzimet e prodhuesit. Një sasi prej 100 µl e mostrave të vezëve u inokulua në pusetë me terren të agarizuar së bashku me një numër të standartizuar të sporeve *Bacillus Stearothermophilus*. Para inkubimit në 64°C, ampulat që përmbanin mostrat e vezëve u trajtuan për 10 minuta në 80°C për të inaktivuar frenuesit natyrorë si enzima lizozimë e pranishme në albuminën e vezës. Inkubimi u ndoq deri në momentin e reagimit të kontroll negativit duke shfaqur ndryshimin kolorimetrik në të verdhë (3-4 orë).

-Enzyme Linked Immunoassay

Duke synuar vlerësimin kvantitativ të enrofloxacinës në mostrat të cilat rezultuan pozitive me Premi Test, u përdor teknika ELISA e cila u krye sipas udhëzimeve të prodhuesit (RIDASCREEN kit Enrofloxacin ELISA, R-biopharma, Gjermani).

Një sasi prej 4 g të secilës mostër u peshua dhe homogjenizua me mikser e më pas u homogjenizua duke shtuar 3 ml ujë të distiluar dhe 6 ml acetat etilik. Suspensionin i përfutur u vortexua për 10 min dhe centrifugua në 3000 g /10 min në temperaturën e dhomës. 4 ml supernatant i etil acetatit (që korrespondon me 2 g të mostrës) u transferua në një tjetër provë dhe u vendos në 60 ° C. Mbetja u rihollua në 1 ml isoctan/chloroform (2:3) (2:3) përzierje. Një gjysmë mililitër e tamponit të enrofloxacinës u shtur në këtë solucion dhe u kalua në vortex intensivisht për rreth 1 min.

Solucionin më pas u centrifugua në 3000g për 10 minuta në temperaturën e dhomës dhe 50 µl e supernatant u përdor për një pusetë në analizë. Absorbimi i mostrave u lexua në 450 nm dhe sasia e enrofloxacinës u llogarit në bazë të kurbës së kalibrimit.

Rezultatet dhe diskutime

Rezultatet e fituara përmes përdorimit të Premi Test, zbuluan se vetëm 30/110 (27.2%) mostra ishin të kontaminuara me mbetje antibiotike. Ndërsa

metoda ELISA tregoi se 60/110 (54.5%) mostra ishin pozitive për enrofloxacin.

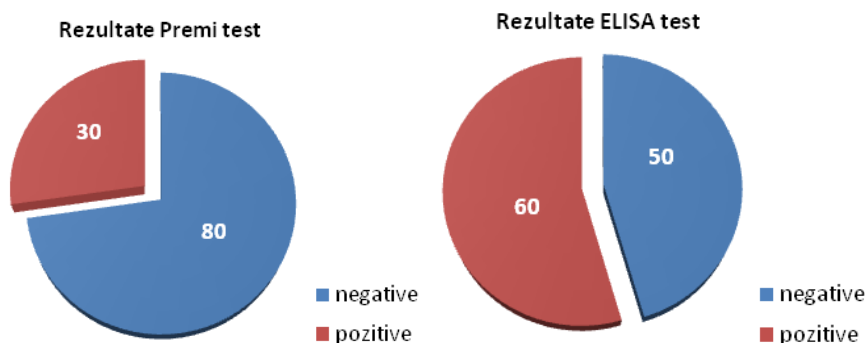


Figura 2: Paraqitja grafike e rezultateve me te dy metodat

Nga këto 33/110 (30%) i takojnë rajonit të Pejës, 18/110 (16.3%) i përkasin rajonit të Prishtinës dhe 9/110 (8.2%) rajonit të Prizrenit. Mostrat nga Gjilani dhe Ferizaj rezultuan negative.

Një krahasim midis dy testeve (Premi®Test dhe ELISA test) gjithashtu zbuloi ndjeshmërinë e pamjaftueshme të Premi®Test.

Rezultatet ELISA test sipas rajoneve

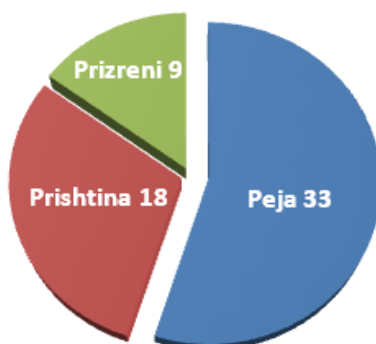


Figura 3. Paraqitje grafiike e rezultateve nga ELISA test për të gjitha rajonet

Niveli i lartë i përdorimit në kafshë dhe njerëz në një shkallë të keqpërdorimit në kuptimin e panevojshëm të përdorimit / përdorimit të quinoloneve me aktivitet të dobët në disa vende në zhvillim, është akuzuar për zhvillimin e shpejtë të rezistencës bakteriale ndaj këtyre agjentëve, që do të thotë një rrezik për shëndetin e njeriut (Botsoglou & Fletouris 2001; World Health Organization, 2002).

Procedura screening është hapi i parë në studimin e mostrave për të vërtetuar praninë ose mungesën e mbetjeve të antibiotikëve. Kjo metodë është ekonomike dhe jep mundësinë e testimit në një numër të madh të mostrave duke dhënë rezultate minimalisht fals pozitive dhe false. Gjithashtu, të gjitha

mostrat me prani të mbetjeve të antibiotikëve më shumë se niveli maksimal i mbetjeve (MRL) tregojnë pozitivitet.

Konkluzione

Sikurse u theksua me sipër Enrofloxacina i përket grupit të antibiotikëve të fuqishëm të njohur si fluoroquinolone që përdoren gjerësisht në mjekësinë njerëzore dhe veterinare. Këta antibiotikë kanë një spektër të gjerë të veprimit dhe efikasitet të lartë kundër sëmundjeve infektive (Smith *et.al*, 2007), duke qënë shumë të efektshëm në trajtimin e Gram pozitivëve, Gram negativëve dhe Mycoplasmave në proceset infektive.

Përdorimi i pakontrolluar i këtyre lëndëve antibakteriare çon në parametrat e cënuar të Sigurisë ushqimore duke ndikuar negativisht në shëndetin e njeriut. Ekzistojnë dy fusha kryesore shqetësuese për prezencën e mbetjeve të antibiotikëve në produktet ushqimore me origjinë shtazore në lidhje me shëndetin e njeriut (Donoghue, 2003). E para është mundësia e shfaqjes së reaksioneve alergjike dhe e dyta është zhvillimi i antibiotikorezistencës.

Në këto kushte nevojitet një shqyrtim i thellë ndaj përdorimit të duhur të medikamenteve veterinare në shpendari si dhe produkteve ushqimore të tyre (Huet *et.al*, 2006). Hapi i parë është monitorimi i kohës së eliminimit së preparateve të përdorura pasuar nga një edukim sistematik i fermerëve dhe mbikëqyrje e rregullt e shërbimit veterinar. Me qëllim që të zvogëlohet përdorimi i shpeshtë i barnave antibakteriale në shpend, shfaqja e mbetjeve në ushqim dhe antibiotikorezistenca bakteriale, veterinerët duhet të zhvillojnë metoda alternative të menaxhimit në fermë si vaksinimet

Mirënjohje

Ky studim u krye me mbështetjen e Ministrisë së Bujqësisë dhe Zhvillimit Rural dhe Agjencisë së Ushqimit dhe Veterinarisë - Kosovë.

Literatura

Botsoglou N.A., Fletouris D.J (2001): Drug residues in foods. Pharmacology Food Safety and Analysis. 1a ed

Decision **2002/657/EC**: Criteria and procedures to validate analytical methods, ensuring the quality and comparability of the results of official laboratories

Donoghue D.J (2003): Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns. Poultry Science; 82: 618–21

European Commission (2009): EUROPA/food safety/chemical safety of food residues of veterinary medicinal products control and monitoring

http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/control_en.htm

European Food Safety Authority, European Medicines Agency, Food and Drug Administration of USA. (2009)

Kilinc B., Meyer C., Hilge V (2007): Evaluation of the EEC four plate test and premi test for screening antibiotic residues in trout (*Salmo trutta*). International Journal of Food Science and Technology. 42: 625-628

Fabrega A., Sa´nchez-Céspedes J., Soto S., Vila J (2008): Quinolone resistance in the food chain. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 31: 307–15

Huet A.C., Charlier C, Tittlemier S.A (2006): Simultaneous determination of fluoroquinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Agric Food Chem*; 54: 2822-27

Hernandez-Arteseros J.A., Barbosa J., Compano R (2002): Analysis of quinolone residues in edible animal products *Journal of Chromatography A*, 945, 1-24

Smith J., Drum D., Dai Y., Kim J., Sanchez S., Maurer J., Hofacre C., Lee M (2007): Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 1404-1414

World Health Organization (2002): Use of antimicrobials outside human medicine and resultant antimicrobial resistance in humans