

J 57

MAA- JA METSÄTALOUSHALLITUS

ASETUS nro 21/EEO/2001

Päivämäärä 4.6.2001

Dnro 994/00/2001

Voimaantulo- ja voimassaoloaika 18.6.2001 - toistaiseksi

Kumoaa

Antibioottien ja kemoterapeuttien osoittamisesta lihan tarkastuksessa 14 päivänä toukokuuta 1982 annettu maa- ja metsätalousministeriön yleiskirje n:o 198

Valtuutussäännökset

Laki eläimistä saatavien elintarvikkeiden elintarvikehygieniasta (1195/1996, muut. 1121/1998, 803/1999, 664/1999 ja 1112/2000) 55 § ja 56 §

Asetus eläimistä saatavien elintarvikkeiden elintarvikehygieniasta (1336/1996, muut. 683/1998 ja 102/2001) 1 §

Asia

MIKROBILÄÄKEAINEIDEN OSOITTAMINEN LIHANTARKASTUKSESSA MIKROBIOLOGISELLA MENETELMÄLLÄ

1 §

Asetuksen soveltamisala

Maa- ja metsätalousministeriö antaa tässä asetuksessa ja sen liitteessä säännökset lihan tarkastuksen yhteydessä tapahtuvasta mikrobilääkeaineiden osoittamisesta mikrobiologisella menetelmällä sekä siihen liittyvästä näytteenotosta. Tämän asetuksen mukaista tutkimusmenetelmää käytetään nautaeläinten, sian, lampaan ja vuohen lihan tarkastuksessa. Menetelmää voidaan soveltuvin osin käyttää myös porojen ja muiden tarhattujen nisäkkäiden lihan tarkastuksessa.

2 §

Määritelmät

Tässä asetuksessa tarkoitetaan

1. mikrobilääkeaineella

mikrobien (bakteerit, sienet, virukset, alkueläimet) lisääntymistä estävää tai mikrobeja tappavaa lääkeainetta, joka on joko mikro-organismien tuottama antibiootti tai kemiallisesti valmistettu aine;

2. jäämän enimmäismäärällä

(JEM, MRL) lääkeaineen sallittua enimmäismäärää eläimistä saatavassa elintarvikkeessa. Enimmäismäärät on annettu Euroopan unionin neuvoston asetuksessa (ETY) Nro 2377/90, annettu 26. päivänä kesäkuuta 1990, yhteisön menettelystä

eläinlääkejäämien enimmäismäärien vahvistamiseksi eläinperäisissä elintarvikkeissa, muutoksineen;

3. lihalla

kaikkia nauta- ja kavioeläinten, sikojen, lampaiden ja vuohien elintarvikkeeksi soveltuvia osia;

4. penisillinaasiherkällä penisilliinillä

V- ja G-penisilliiniä, ampisilliinia ja amoksisilliinia;

5. makrolidilla

makrolidiryhmään kuuluvia lääkkeitä, kuten erytromysiiniä, spiramysiiniä ja tylosiinia;

6. aminoglykosidilla

aminoglykosidiryhmään kuuluvia lääkkeitä, kuten streptomysiiniä, dihydrostreptomysiiniä, gentamysiiniä ja tobramysiiniä; sekä

7. sulfonamidilla

sulfonamidiryhmään kuuluvia lääkkeitä, kuten sulfadoksiinia, sulfadiatsiinia ja sulfametatsiinia.

3 §

Suhde muihin säädöksiin

Lihantarkastuksesta ja lihan arvostelusta säädetään lihahygienia-asetuksesta 19 päivänä huhtikuuta 2001 annetussa maa- ja metsätalousministeriön asetuksessa nro 16/EEO/2001 (lihahygienia-asetus). Lihan arvostelusta ja toimenpiteistä lihantarkastuksen yhteydessä 4 päivänä maaliskuuta 1996 annetussa maa- ja metsätalousministeriön ohjeessa nro 9/EEO/1996 muutoksineen annetaan suosituksia siitä, milloin tutkimus mikrobilääkkeiden käytön osoittamiseksi suoritetaan. Vieraista aineista eläimistä saatavissa elintarvikkeissa 21 päivänä maaliskuuta 2001 annetussa maa- ja metsätalousministeriön asetuksessa nro 13/EEO/2001 (vierasaineasetus) annetaan säännökset vieraiden aineiden esiintymisen valvonnasta sekä eräiden vierasaineiden sallituista enimmäismääristä eläimistä saatavissa elintarvikkeissa.

Lihantarkastukseen liittyviä tutkimuksia tekevien laboratorioiden pätevydestä säädetään eläimistä saatavien elintarvikkeiden tutkimuksia tekevästä laboratorioista 13 päivänä toukokuuta 1998 annetussa maa- ja metsätalousministeriön päätöksessä (340/1998, muutoksineen).

Epäiltäessä antimikrobisten aineiden esiintymistä on lihahygienia-asetuksen liitteen 3, luvun 2, kohdan 17 mukaan suoritettava niiden varalta tutkimus. Tutkimus on lisäksi aina suoritettava bakteriologisen tutkimuksen yhteydessä.

Lisahygienia-asetuksen liitteen 3, luvun 3, kohdan 22 alakohdan q mukaan ruho sivutuotteineen hylätään, jos ruhosta on laboratoriotutkimuksella todettu positiivinen lääkejäämätulos. Ruhoa ei kuitenkaan hylätä silloin jos mikrobiologisella tutkimuksella löydetään positiivinen lääkejäämätulos vain munuaisesta ja samanaikaisesti tehty tutkimus lihaksesta on negatiivinen.

Lihahygienia-asetuksen liitteen 3, luvun 3, kohdan 25 alakohdan d mukaan sisäelimet hylätään jos munuaisesta tehdyssä mikrobiologisessa tutkimuksessa on todettu positiivinen lääkejäämäntulos. Sisäelimet hylätään, vaikka lihaksesta otettu näyte olisi negatiivinen.

4 §

Voimaantulo- ja siirtymäsäännös

Tämä asetus tulee voimaan 18 päivänä kesäkuuta 2001.

Tätä asetusta sovelletaan sen voimaantulon jälkeen otettuihin näytteisiin.

Maa- ja metsätalousministeri
Kalevi Hemilä

Eläinlääkintötarkastaja
Susanna Kangas

SISÄLLYSLUETTELO

LIITE

MIKROBILÄÄKEAINEIDEN OSOITTAMINEN LIHANTARKASTUKSESSA

1. YLEISTÄ

2. VÄLINEET JA TARVIKKEET

- 2.1 Välineet ja reagenssit
- 2.2 Trimetopriimiliuos
- 2.3 Itiösuspensio
- 2.4 Elatusaine
- 2.5 Tutkimusmaljojen valmistus
- 2.6 Penisillinaasikiekon valmistus

3. NÄYTTEENOTTO

4. NÄYTTEEN TUTKIMINEN

5. TULOSTEN LUKEMINEN

6. TULOKSEN ARVIOINTI

LIITE

MIKROBILÄÄKEAINEIDEN OSOITTAMINEN LIHANTARKASTUKSESSA

1. YLEISTÄ

Tällä menetelmällä osoitetaan mikrobilääkeaineiden JEM:n ylittäviä pitoisuuksia lihassa

lihantarkastuksen yhteydessä.

Mikrobilääkeainejäämien esiintymistä lihassa tutkitaan agardiffuusiomenetelmällä, jossa näytteen sisältämät mikrobin kasvua estävät aineet leviävät ympäröivään elatusaineeseen estäen testibakteerin kasvun. Jos näyte sisältää bakteerien kasvua estävää ainetta, näytteen ympärille muodostuu estovyöhyke, jonka leveys mitataan.

Munuaisissa on yleensä korkeammat jäämäpitoisuudet kuin lihaksessa. Suuri osa mikrobilääkeaineista voidaan osoittaa munuaista tutkimalla sellaisina pitoisuuksina, jotka kuvaavat JEM:n ylittäviä pitoisuuksia lihaksessa. Munuaisnäytettä tutkimalla voidaan osoittaa lihan sisältämät mikrobilääkeaineet herkemmin kuin tutkimalla lihasta.

Menetelmä on kuitenkin penisilliinille niin herkkä, että lihaksesta tehtävällä tutkimuksella voidaan osoittaa JEM:n tasolla olevia pitoisuuksia. Munuaisista tehty tutkimus mittaa penisilliiniä pitoisuuksina, jotka vastaavat lihaksessa JEM:n alle jääviä pitoisuuksia. Lisäksi aminoglykosidien tiedetään aiheuttavan pitkäaikaisia jäämiä munuasiin. Eräitä mikrobilääkeaineita, kuten sulfonamideja ja makrolideja ei menetelmällä kuitenkaan voida luotettavasti todeta, koska menetelmä ei ole tarpeeksi herkkä näille aineille.

2. VÄLINEET JA TARVIKKEET

2.1. Välineet ja reagenssit

Välineet:

Steriilejä petrialjoja (Æ 90 mm)

Steriilejä pipettejä, mikropipettejä ja mittapulloja

Steriilejä korkkiporia (Æ 9 mm), veitsiä ja pinsettejä

Steriilejä suodatinpaperikiekkkoja (Æ 6 mm)

Lämpökaappi (+30°C ± 1°C)

Estovyöhykkeen mittausslaite (työntötulkki, tarkkuus 0,1 mm)

Välineet tutkimustulosten kirjaamiseksi

Reagenssit:

Trimetopriimiliuos

Penisilliinitabletteja, joissa on 5 m g G-penisilliiniä.

Miljoona yksikköä ml:ssa penisillinaasia sisältävää liuosta.

2.2. Trimetopriimiliuos

Trimetopriimin kantaliuos valmistetaan liuottamalla 60 mg puhdasta trimetopriimiä 20 ml:aan etanolia ja edelleen 80 ml:aan steriiliä, tislattua vettä. Trimetopriimi on hitaasti liukeneva. Kantaliuos voidaan hankkia esimerkiksi apteekista. Liuos säilytetään valolta suojattuna huoneenlämmössä, jolloin sen säilyvyys on noin 2 viikkoa.

Käyttöliuos valmistetaan laimentamalla kantaliuosta steriiliin tislattuun veteen suhteessa 1:100. Käyttöliuoksen säilyvyys on noin 2-3 päivää.

2.3. Itiösuspensio

Menetelmässä käytetään testiorganismina *Bacillus subtilis* BGA-kantaa. *Bacillus subtilis* BGA-kannan itiösuspensiota on saatavissa kaupallisena valmisteena.

Menetelmässä käytetyn itiösuspension konsentraation tulee olla $8 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ itiötä / ml. Konsentraatio tulee tarkistaa ennen itiösuspension käyttöä.

2.4. Elatusaine

Elatusaineina käytetään testiagareita pH 6,0 ja pH 8,0. Molempia elatusaineita on saatavana kaupallisina valmisteina.

Tutkimuksessa käytettävän elatusaineen, jonka pH on 6,0, koostumus on seuraava:

Lihapeptoni 3,45 g

Kaseiinipeptoni 3,45 g

NaCl 5,1 g

Agar-agar 13,0 g

Tislattu vesi ad 1000,0 ml

Tutkimuksessa käytettävän elatusaineen, jonka pH on 8,0, koostumus on seuraava:

Lihapeptoni 3,45 g

Kaseiinipeptoni 3,45 g

NaCl 5,1 g

Agar-agar 13,0 g

Trinatriumfosfaatti-12-hydraatti 2,4 g

Tislattu vesi ad 1000,0 ml

Elatusaineen pH säädetään tarvittaessa 1 mol/l HCl:llä arvoon 6,0 ja 1 mol/l NaOH:lla arvoon 8,0. Sellaisia kaupallisia agareita, joilla on vastaava koostumus ja joiden pH on valmiiksi säädetty arvoihin 6,0 ja 8,0, voidaan pH:n tarkistuksen jälkeen käyttää menetelmässä.

2.5. Tutkimusmaljojen valmistus

Elatusaineisiin, joiden lämpötila on säädetty $+47 \pm 2^\circ\text{C}$ lämpötilaan, lisätään 0,1 ml *Bacillus subtilis* BGA itiösuspensiota 100 ml elatusainetta kohti. Siihen elatusaineeseen, jonka pH on 8,0, lisätään trimetopriimi-käyttöliuosta 1 ml/100 ml elatusainetta, jolloin trimetopriimikonsentraatioksi tulee 0,06 mg/ml. Tämän jälkeen elatusaineet valetaan maljoiksi. Maljalle mitataan 10 ml elatusainetta. Valmiit maljat säilytetään jääkaapissa muovipussissa teipillä suljettuina. Säilyvyys on tällöin 5

vuorokautta. Sellaisia maljoja, joissa on vähäisintäkin bakteerikasvua, ei saa tutkimuksessa käyttää.

Jokaisen elatusaine-erän toimivuus on tarkistettava. Tämä tapahtuu siten, että ainakin yhdelle kutakin elatusaine-erää edustavalle maljalle asetetaan G- penisilliiniä sisältävä tabletti. Penisilliinitabletin tulisi aiheuttaa pH 6 -maljalla 14,5-21 mm ja pH 8 -maljalla 13,5-20 mm estovyöhyke. Jos estovyöhykkeen koko ei ole asetetuissa rajoissa, on kyseessä oleva elatusaine-erä hylättävä.

2.6. Penisillinaasikiekon valmistus

Miljoona yksikköä ml:ssa penisillinaasia sisältävää liuosta laimennetaan 1 ml 7 ml:aan steriiliä, tislattua vettä. Tätä liuosta imeytetään pipetillä suodatinpaperikiekkoon 0,04 ml, jolloin kiekkossa on 5000 yksikköä penisillinaasia.

3. NÄYTTEENOTTO JA NÄYTTEEN LÄHETTÄMINEN

1. Munuais- ja lihasnäyte on otettava teurastetusta eläimestä mahdollisimman pian teurastuksen jälkeen. Näytteeksi otetaan vähintään yksi kolmasosa munuaisesta. Lihasnäyte on otettava silloin, kun esitietojen tai muiden tietojen perusteella tiedetään tai epäillään eläimelle käytetyn penisillinaasiherkkää penisilliiniä tai aminoglykosidia. Näyte otetaan ehjistä lihaksesta, joka ei sisällä merkittävästi rasvaa. Näytteitä ei saa ottaa muuttuneista kohdista. Näytteet on merkittävä selkeästi ja pidettävä erillään toisistaan.

2. Näytteet on otettava ja tutkimus on suoritettava aseptisesti mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen. Jos tutkimuksen suorittaminen kuitenkin viivästyy, näytteet on jäädytettävä. Munuaisnäyte ei kuitenkaan saa jäätyä, eikä sitä saa pakastaa. Korkkiporanäytteen ottamisen helpottamiseksi voidaan lihasnäyte kuitenkin pakastaa.

3. Jos näytteet joudutaan lähettämään muuhun kuin teurastamon yhteydessä sijaitsevaan laboratorioon, on näytteet ennen lähettämistä jäädytettävä ja pakattava muovipussiin kukin näyte erikseen. Näytteet pakataan ja lähetetään siten, että niiden lämpötila ei kuljetuksen aikana olennaisesti muutu, esim. kylmävaraajilla varustetussa kylmälaukussa, mahdollisimman nopeaa kuljetustapaa käyttäen.

4. Jos eläintä epäillään tai tiedetään lääkityn sulfonamideja tai makrolideja sisältävillä lääkevalmisteilla, tehdään tämän asetuksen mukainen tutkimus ja sen lisäksi lihas- ja munuaisnäytteet lähetetään suoraan Eläinlääkintä- ja elintarviketutkimuslaitokseen kemiallisiin tutkimuksiin sulfonamidien tai makrolidien osoittamiseksi.

4. NÄYTTEEN TUTKIMINEN

1. Tutkittavasta munuaisesta tai lihaksesta korkkiporalla otetusta näytepalasta leikataan kaksi noin 2 mm:n paksuista kiekkoa. Munuaisnäytteessä kiekkossa tulee olla jokseenkin yhtä paljon munuaisen kuori- ja ydinkerrosta. Näytekiekot asetetaan kummallekin (pH 6,0 ja pH 8,0) elatusainemaljalle. Munuaiskiekko asetetaan maljalle munuaisen ydinkerros vasten agarია.

2. Elatusaineelle, jonka pH on 6,0, asetetaan tutkittavana olevan näytepalan viereen 2-3 mm:n etäisyydelle siitä penisillinaasia sisältävä suodatinpaperikiekko.

3. Näytteiden asettamisen jälkeen levyjä inkuboidaan 1 tunti huoneenlämmössä, jonka kuluttua ne siirretään 18-24 tunniksi $+ 30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ lämpötilaan.

4. Tutkittava näyte on aina säilytettävä jääkaapissa kokeen suorittamisen ajan mahdollista uusintatutkimusta varten. Uusintatutkimusta varten voidaan myös ottaa uudet näytteet eläimestä.

5. Näytteen tutkimisen uusimista suositellaan silloin, kun saadaan positiivinen tulos ja eläimen lääkitystä ei ole ilmoitettu esitiedoissa. Lisäksi näyte voidaan lähettää EELAan jatkotutkimuksiin.

5. TULOSTEN LUKEMINEN

1. Välittömästi inkuboinnin jälkeen mitataan estovyöhykkeen koko näytepalan reunasta estovyöhykkeen reunaan työntötulkia käyttäen. Estovyöhykkeeksi luetaan näytteen ympärillä oleva kirkas vyöhyke. Estovyöhykkeeksi luettavalla kirkkaalla alueella ei saa esiintyä varsinaisen testiorganismin kasvua. Estovyöhyke mitataan sen leveimmältä kohdalta.

2. Kirkkaan vyöhykkeen ulkopuolella saattaa kuitenkin toisinaan esiintyä, selvästi erottuva, jonkin verran himmeämpi vyöhyke. Tällöin estovyöhykkeeksi luetaan kirkkaan alueen lisäksi myös edellä mainittu himmeä vyöhyke.

3. Jos kirkas vyöhyke puuttuu kokonaan ja näytteen ympärillä on pelkästään himmeä vyöhyke, ei näytteen katsota sisältävän mikrobilääkeaineita.

4. Penisillinaasi estää penisillinaasierkkien penisilliinien vaikutusta. Esto havaitaan siitä, että näytekappaleen ympärillä esiintyvä estovyöhyke on menettänyt pyöreän muotonsa penisillinaasikiekon läheisyydessä. Jos penisillinaasikiekon havaitaan muuttavan estovyöhykkeen muotoa, näytteen katsotaan sisältävän penisillinaasierkkää penisilliiniä.

5. Elatusaineella, jonka pH on 6,0, aiheuttaa tetrasykliini suuremman estovyöhykkeen kuin elatusaineella, jonka pH on 8,0. Aminoglykosidi- ja makrolidiryhmän lääkeaineet taas puolestaan antavat suuremman estovyöhykkeen elatusaineella, jonka pH on 8,0.

6. TULOKSEN ARVIOINTI

1. Jos munuaispalan ympärillä molemmilla tai jommalla kummalla elatusaineella on yli 2 mm:n estovyöhyke, katsotaan näytteen sisältävän mikrobilääkeaineita yli JEM:n. Tutkimustulos on tällöin positiivinen. Jos estovyöhyke on 2 mm tai pienempi molemmilla levyillä on koetulos negatiivinen.

2. Kuitenkin silloin, kun näytteen sisältämän mikrobilääkeaineen todetaan olevan penisillinaasille herkkä, arvioidaan tulos lihasnäytteen tuloksen perusteella noudattaen edellä olevan kohdan 1 estovyöhykerajoja. Jos eläimelle on ilmoitettu annetun aminoglykosidiryhmään kuuluvia lääkeaineita, arvioidaan tulos tämän lääkeaineen osalta lihasnäytteen perusteella.