家畜衛試所研報No.41：135~146(2006)

抗生物質殘留種類之篩選與辨別的檢測系統評估

林文華*[1]、翁麗珍[2]、張春梵[3]、張正明[4]、宋華聰[2]

[1]行政院農業委員會家畜衛生試驗所
[2]行政院農業委員會動植物防疫檢疫局
[3]中國文化大學生物科技研究所
[4]國立台灣海洋大學食品科學系

摘要

抗生物質殘留分析常見採行瓊膠擴散試驗，並藉由微生物生長抑制進行篩選；本研究報告檢測試驗系統任務涵蓋初步篩選與後續辨別等二部分。初步篩選檢測研究採用菌膠呈色法之市售許可合格商品 Premi®Test 檢測套組，適用動物產品檢體之常用抗生物質殘留檢測，合計九類 34 種抗生物質涵蓋範圍的檢測結果顯示：乙內醯胺、四環素、胺基配醣苷、巨環素和磺胺劑等類的靈敏度檢測效能足以檢出法定最高殘留容許量濃度。後續辨別檢測研究採用四種培養基菌盤測試法之市售許可合格商品，默克公司抗生物質測試瓊膠培養基的編號暨酸鹼度[I] 10663 pH 6.0，[II] 105270 pH 7.2，[III] 10664 pH 8.0，與[IV] 10664 pH 8.0 等，並於[I,II,III]與[IV]培養基分別接種枯草桿菌 Bacillus subtilis ATCC 6633 芽孢與微小球菌 Sarcina lutea ATCC 9341 等敏感菌株；進行各類抗生物質族群類別之篩選和辨別的檢測結果顯示為四種菌盤敏感性高低順序：乙內醯胺類 IV >I >III >II (或 II> III)；四環素類 I> II> III> IV；胺基配醣苷類 III >II >I >IV；與巨環素類 IV> III> II> I。磺胺劑類檢測另加三甲苄氨嘧啶提高敏感度。

綜合本研究報告結果顯示，抗生物質殘留檢測之篩選與辨別的整合型系統建置應可有效達成實際任務目標。初步篩選型菌膠呈色法適合建置食品供應商的自發性預行檢測，後續辨別型四種培養基菌盤測試法適合建置主管機關的整合型篩選辨別檢測系統；檢測效能靈敏度最佳限值符合衛生署公告之動物用藥殘留標準的殘留容許量，有效確保動物產品符合最高殘留容許量法定標準。

關鍵詞：抗生物質；殘留；微生物學方法；瓊膠擴散試驗；篩選；辨別。

緒言

最近幾年國內消費者經過口蹄疫(FMD)、牛海綿狀腦部病變(BSE)、重症急性呼吸症候群(SARS)、戴奧辛和禽流感等危機的不斷考驗後，對於食品安全衛生的信心不足；因此，針對於現代牧場經營密集使用數量龐大的藥物，呈現不肯定的態度，針對食品安全的改革提昇趨向非常嚴格的要求態度。

動物專用藥品的眾多種類品項暨巨大應用數量，顯然成為食品安全的高度相關影響因子；依據理論任何投藥動物路徑均可導致殘留，合法投藥抗生物質於養殖場動物防止疾病的爆發與蔓延，常因缺乏明

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

家畜衛試所研報No.41：135~146(2006)

顯有效停藥時間、未依指定藥劑治療、飼料污染或非法使用未許可藥物，與使用未核准藥物(9,17,19)等，導致殘留出現於動物來源產品如牛乳、肉和蛋等，或是排出於體外危害食物鏈供需公衛安全與惡化耐藥性環境安全問題(3,24)。

食品的藥物殘留檢測策略的一般程序【篩選，辨別，定量，確認】；然而，現行檢測違反最高殘留容許量，常須依據事前指定已知的殘留藥物種類採用單種色層分析法定量確認；因此，導致忽略篩選辨別的有效程序，無法滿足繁多藥物種類與互異操作條件的分析需求與資源節約，容易遺漏其他未經事前指定檢測的藥物種類，再者，具備 HPLC 和 LC-MS/MS 高科技儀器實驗室屈指可數；故而依據指定種類的檢測策略常會誤導使用者造成藥物濫用猖獗，因為使用者事前知悉檢測項目策略即可規避藥物監控與違法改用其他等效的藥物種類，致使實驗室測試確認的結果報告嚴重瑕疵與品質保證受到懷疑。

篩選的分析法通常提供經濟型定性與不定性檢測結果。微生物學方法通常較適於大量檢體篩選，具備經濟方便與藥物種類範圍寬廣的特性(1,23)，可以排除大量偽陽性檢體，檢出特異族群藥物種類，續行前述陽性檢體辨別定量確認，連結整合建置完成整體分析檢測系統，解決現行抗生物質殘留檢測的欠缺。因此本研究報告主要利用微生物學篩選和辨別抗生物質的檢測評估，作為畜禽水產品抗生物質殘留的日常例行性篩選和辨別，以確保品質符合法令規定的最高殘留容許量標準要求規格。

材料與方法

溶劑　乙醇(ethanol; Merck)，氫氧化鈉 0.1 N (NaOH; Merck)，生理食鹽水 0.85 % (NaCl; Merck)，無菌去離子水。

抗生物質檢測標準　第一群乙內醯胺類(β-lactams)：安比西林(Ampicillin anhydrous; Sigma)；安默西林(Amoxicillin crystalline; Sigma)；配尼西林 G (Penicillin G Na Salt; Sigma)。第二群四環素類：羥四環黴素(Oxytetracycline HCl; Sigma)；脫氧羥四環黴素(Doxycycline HCl; Sigma)。第三群胺基配醣苷類：康黴素(Kanamycin sulfate 750 μG/mG; BioBasic, Inc.)；健他黴素(Gentamicin sulfate 600 μG/mG; MP Biomedials, Inc.)；新黴素(Neomycin sulfate 850 μG/mG; MP Biomedials, Inc.)。第四群巨環素類：泰黴素(Tylosin tartrate salt, 900 μG/mG; MP Biomedials, Inc.)；紅黴素(Erythromycin crystalline; MP Biomedials, Inc.)；史黴素(Spiramycin, crystalline; MP Biomedials, Inc.)。第五群磺胺劑類：三甲苄氨嘧啶(Trimethoprim, TMP; MP Biomedials, Inc.)；磺胺劑(Sulfadiazine Sulfathiazole; Sigma)。

抗生物質檢測標準溶液　抗生物質檢測標準《儲存溶液》先以溶劑配製。安比西林、安默西林、配尼西林 G；羥四環黴素、脫氧羥四環黴素；康黴素 0.0133 G 和健他黴素 0.017 G 溶於無菌去離子水 10 mL，新黴素 0.012 G；泰黴素 0.011 G，紅黴素 0.01 G；史黴素 0.01 G。三甲苄氨嘧啶溶於乙醇 0.01 G/10 mL；磺胺劑 Sulfadiazine 與 Sulfathiazole 各別溶於 0.1 N 氫氧化鈉溶液 0.01 G/10 mL。各種抗生物質檢測標準《工作溶液》再以無菌去離子水與儲存溶液配製六種連續稀釋試驗濃度。安比西林、安默西林、配尼西林 G；磺胺劑 Sulfadiazine 和 Sulfathiazole、與三甲苄氨嘧啶為 0.005，0.01，0.05，0.1，0.15 和 0.2 μG/mL。羥四環黴素和脫氧羥四環黴素為 0.05，0.1，0.6，1.2，1.8 和 2.4 μG/mL；泰黴素和史黴素為 0.05，0.1，0.15，0.2，0.25 和 0.3 μG/mL；康黴素、紅黴素、新黴素和健他黴素為 0.05，0.1，0.5，1.0，1.5 和 2.0 μG/mL。再將儲存溶液和試驗工作標準溶液移置 4℃備用。

菌膠呈色法的檢測套組　備置市售許可合格商品 Premi®Test 檢測套組(荷蘭 DSM 食品公司；DSM Food Specialities, Delft, Netherlands) (6)。

培養基菌盤測試法的培養基溶液與敏感性菌株　配製市售許可合格商品抗生物質檢測瓊膠(Merck antibiotic test agar, MATA)培養基溶液涵蓋 10663 pH 6.0， 105270 pH 7.2，與 10664 pH 8.0。備置抗生物質敏感性試驗菌株涵蓋枯草桿菌(Bacillus subtilis BGA ATCC 6633)芽孢與微小

球菌(Sarcina lutea ATCC 9341)。

篩選檢測：Premi®Test 菌膠呈色法　謹慎撕開 Premi®Test 檢測套組的生物培養基試驗管的完封鋁箔膜，確實避免損壞內部方式以微量吸管量取檢測標準抗生物質溶液滴注試驗管內培養基，室溫立置約 20 分鐘再以純水清洗液倒出避免損壞內部培養基，共計重複實施二次。蓋回試驗管鋁箔膜後置於 64℃恆溫培養控制器 3 小時，於陰性對照試驗管出現黃色變化時判讀結果。

辨別檢測：四種培養基菌盤測試法　四種培養基菌盤的組合製備如表所示：

1. 製備四種培養基菌盤　高壓蒸氣滅菌培養基溶液，冷卻至50℃適量傾注平整覆蓋直徑9公分培養皿，凝固移置4℃備用。
2. 接種培養基菌盤檢測菌種　接種培養基菌盤{I,II,III}枯草桿菌(Bacillus subtilis BGA ATCC 6633)芽孢，與{IV}微小球菌(Sarcina lutea ATCC 9341)。
3. 分析試驗　以無菌濾紙圓片貼於個別培養基菌層表面，並在濾紙圓片滴注各種不同濃度的標準溶液；磺胺劑限制使用培養基II，外加三甲　氨嘧啶。再將接種枯草桿菌(Bacillus subtilis BGA ATCC 6633)芽孢之培養基I、II和III置於30℃培養箱18小時；接種微小球菌(Sarcina lutea ATCC 9341)之培養基IV置於37℃培養箱24小時；針對個別菌盤觀察紀錄抑制圈大小。

菌盤	培養基	酸鹼值	接種敏感試驗菌株	培養條件
I	**10663**	**pH 6.0**	枯草桿菌***Bacillus subtilis*** **BGA ATCC-6633**	**30℃ 18**小時
II	**105270**	**pH 7.2**	同上	同上
III	**10664**	**pH 8.0**	同上	同上
IV	同上	同上	微小球菌***Sarcina lutea*** **ATCC-9341**	**37℃ 24**小時

結果

篩選檢測：菌膠呈色法　初步篩選檢測研究採用菌膠呈色法之市售許可合格商品 Premi®Test 檢測套組，適用動物產品檢體之常用抗生物質殘留檢測。檢測試驗的結果判定如圖一所示，陰性反應呈現變色轉成黃色或黃微紫色，陽性反應呈現維持紫紅色，顯示檢體的抗生素殘留量未高於最大殘留容許標準 MRL (maximum residue limits)濃度值。Premi®Test 檢測套組適合經濟有效地去除大量錯誤陽性檢體，省時簡便不需特別的專業訓練，一般基礎的實驗室就能進行，每天約可完成 40 件檢體檢測，可整合自動培養器提高檢驗流量。參照荷蘭 DSM 食品公司研究開發 Premi®Test 的產品規格，合計九類 34 種抗生物質涵蓋範圍的檢測結果顯示：乙內醯胺、四環素、胺基配醣苷、巨環素和磺胺劑等類的靈敏度檢測效能足以檢出法定最高殘留容許量濃度，市售許可合格商品檢測抗生物質種類評比涵蓋較廣套件，適於各種類型動物產品檢體之動物用藥抗生物質殘留的初步篩選。

辨別檢測：四種培養基菌盤測試法　四種培養基菌盤測試法使用枯草桿菌 Bacillus subtilis ATCC 6633 芽孢與微小球菌 Sarcina lutea ATCC 9341 等敏感菌株，檢測結果顯示具有抗生物質族群類別篩選和辨別的檢測功能特性。各類抗生物質的四種培養基菌盤敏感性高低順序：乙內醯胺類 IV >I >III >II (或 II> III)；四環素類 I> II> III> IV；胺基配醣苷類 III >II >I >IV；與巨環素類 IV> III> II> I；如表一與圖二所示。磺胺劑類檢測另加三甲苄氨嘧啶(TMP)提高敏感度，如表二與圖三所示。

四種培養基菌盤測試法的各類抗生素之檢出最低敏感度限值，相較低於我國行政院衛生署公告之動物用藥殘留標準的殘留容許量(如表三)，相近於藥物食品檢驗局專輯收錄檢驗方法(如表四)，適於作為動

家畜衛試所研報No.41：135~146(2006)

物產品抗生物質乙內醯胺類、四環素類、胺基配醣苷類、巨環素類和磺胺劑類等殘留的日常例行性篩選和辨別，以確保品質符合法令規定的最高殘留容許量標準要求規格。

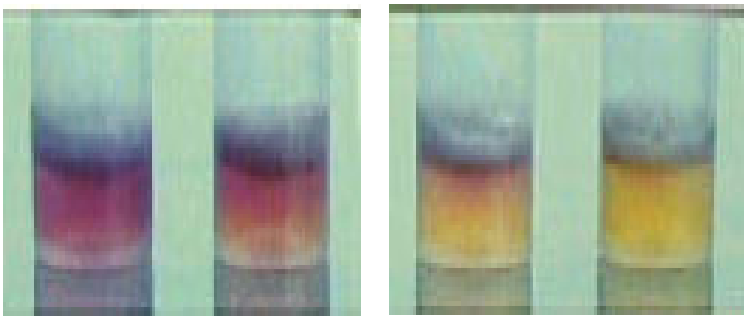
討論

動物產品抗生物質殘留的檢測，常見應用微生物學方法的瓊膠擴散試驗(2,11,12,14,15,20,21,22)，然而目前尚無檢測方法能夠完全滿足廣大抗生素族群類別的篩選和辨別。本實驗研究報告主要在於建置經濟簡便型大量檢體篩選適用和抗生物質種類範圍寬廣的整合系統，短時間內快速排除大量偽陽性檢體，檢出特異族群抗生物質種類，以利陽性檢體續行識別定量確認，完成整體檢測系統分析，補足現行殘留藥物種類量確認採取事前指定忽略篩選辨別過程，進而遺漏其他種類抗生藥物種類殘留檢測的缺失。

微生物學和族群特異性的篩選試驗適用於區別檢體抗生物質的殘留是否違反殘留容許量。菌膠呈色法 Premi®Test 塑膠試管檢測套組是新型市售許可合格產品，混合嗜熱性細菌 Bacillus stearothermophilus 芽孢於染劑指示劑bromocresol purple的固體培養基進行 64℃培養，未見存在抑制性物質則菌株生長酸性產物導致酸鹼指示劑紫紅色變為黃色，適用肉品、內臟、魚產、蛋品等食物微量殘留抗生物質的快速定性篩選檢驗(18)。菌膠呈色法套組係由荷蘭 DSM 食品公司(DSM Food)開發，雖可廣效篩選檢出一般常用的抗生物質共九類 34 種，具備各型檢體適用的快速簡便、靈敏準確與經濟廣效等效能優點，仍有效能缺點在於缺乏抗生素族群的指標特性，試驗結果僅為非特異性判定的陽性或陰性，因此較為適於自主先期檢驗。四種培養基菌盤測試法是歐盟英國等國家實施抗生物質殘留篩選的現行參考試驗(8)；原始設計針對五種不同族群抗生物質：乙內醯胺類、四環素類、胺基配醣苷類、巨環素類和磺胺劑類，其中磺胺劑最高殘留容許量的檢測敏感度初步改良失敗(4, 16)，直至添加三甲苄氨嘧啶(TMP)始能達成有效檢測敏感度(10)。三甲苄氨嘧啶促進磺胺劑敏感性的協同作用係由 Gudding 最初證明(7)，本試驗報告結果顯示添加三甲苄氨嘧啶 0.05 ppm 的磺胺劑檢測最低限值 0.01 ppm；添加 0.1 ppm 的對應限值 0.005 ppm；因之推算三甲苄氨嘧啶理想實施濃度 0.1 ppm。

本報告整合菌膠呈色法和四種培養基菌盤測試法兩者市售許可合格產品套組優點的實驗結果顯示，初步證明整合檢測系統對於多數抗生物質如乙內醯胺類、四環素類、胺基配醣苷類、巨環素類和磺胺劑類檢測的敏感性足以符合我國法令規定之最高殘留容許量標準要求規格，且具族群類別篩選和辨別的功能特性，適用於動物產品抗生物質殘留的日常例行性大量篩選監測。針對合法或違法使用抗生物質殘留檢體的實驗室分析結果是食物品質保證整體管理的重要環節，達成標準運作步驟嚴格要求的堅定品質義務。基於減低動物用藥物的傷害及避免其影響食物鏈的可能性，初始農場生產到最終食物產品應該建置密集管控的品管系統，發展創新適用方法由實驗室優秀完訓人員執行測試，確保食物鏈品質安全(24)。

動物用藥的常用抗生物質範圍廣雜，不同族群的各種藥物均需特殊萃取與檢測步驟，導致費用成本昂貴難以檢測，微生物學篩選方法可去除大量錯誤陽性檢體，作為治療藥物種類特殊族群指標(24)。微生物學試驗足可達成族群辨別程度，藉由實務教育完訓人員達成目視觀察判讀；微生物學抑制試驗雖然適於大量篩選，也可低於最高殘留容許量的陽性檢體，抗生物質最高殘留容許量以上的任何檢體殘留濃度檢測不能遺漏(5)。採用各種精確有效的篩選試驗必須齊備敏感性與特異性，以及嚴格的限值效能(13)。



陽性反應　　陰性反應

圖一　菌膠呈色法試驗結果判讀

表一　抗生物質族群常用品項的四種培養基菌盤敏感性高低順序

抗生素族群	抗生素名稱	培養基菌盤測試敏感性高低	辨別序碼
乙內醯胺類	Ampicillin	IV ＞I ＞III ＞II	**4132**
β-lactams	Amoxicillin	IV ＞I ＞II ＞III	**(--23)**
	Penicillin G	同上	同上
四環素類	Oxytetracycline	I ＞II ＞III ＞IV	**1234**
tetracycline	Doxycycline	同上	同上
胺基配醣苷類	Kanamycin	III ＞II ＞I ＞IV	**3214**
aminoglycosides	Gentamycin	同上	同上
	Neomycin	同上	同上
巨環素類	Tylosin	IV ＞III ＞II ＞I	**4321**
macrolides	Erythromycin	同上	同上
	Spiramycin	同上	同上

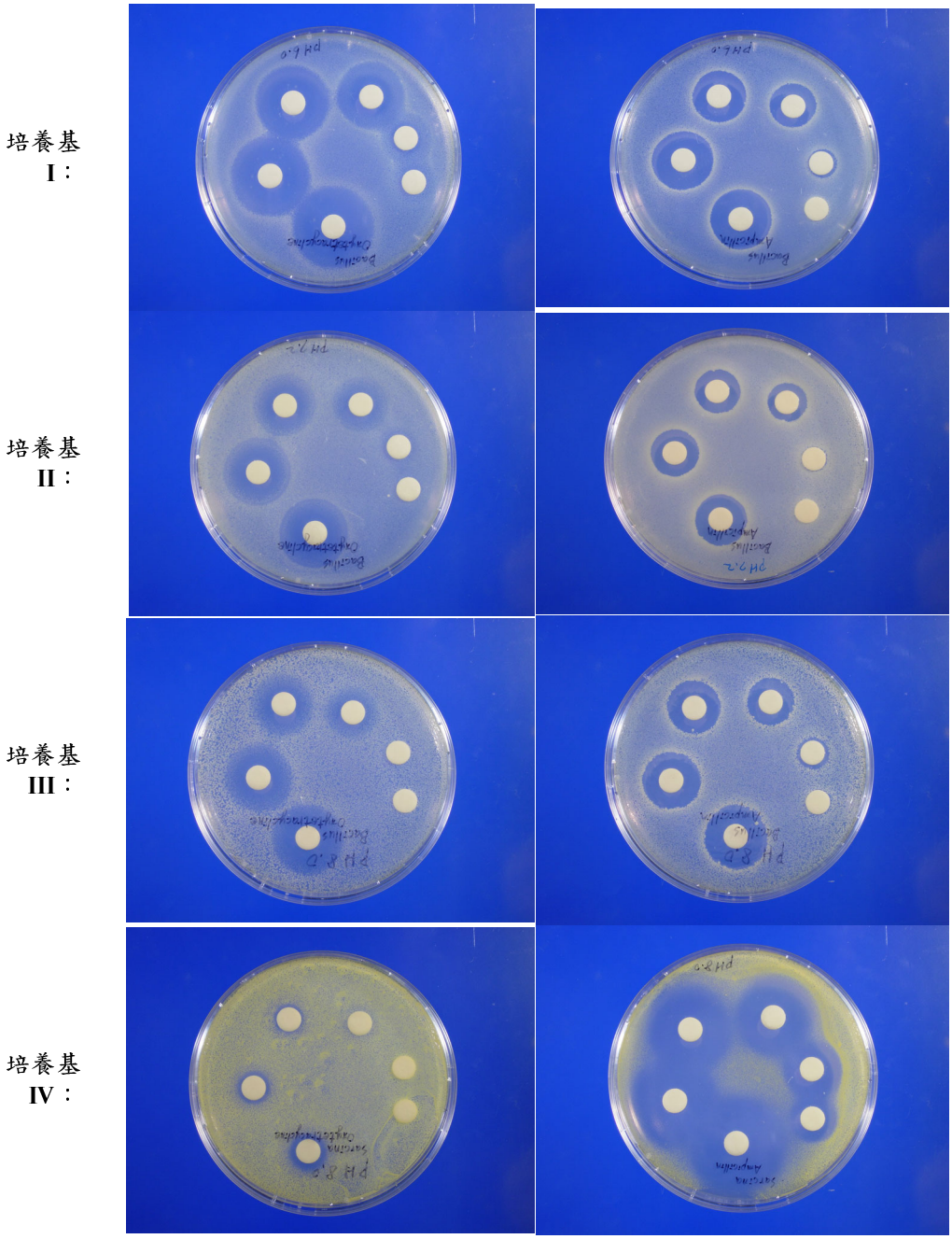
表二　磺胺劑添加三甲苄氨嘧啶的培養基菌盤抑制圈量測分析

三甲苄氨嘧啶濃度(ppm)	磺胺劑名稱	磺胺劑濃度(ppm)：培養基菌盤II滴加TMP檢測抑菌圈					
		0.2	**0.15**	**0.1**	**0.05**	**0.01**	**0.005**
0.01	sulfadiazine	0	0	0	0	0	0
	sulfathiazole	0	0	0	0	0	0
0.05	sulfadiazine	1.1	1.0	0.8	0.7	0.7	0
	sulfathiazole	0.9	0.8	0.6	0.4	0	0
0.10	sulfadiazine	2.7	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
	sulfathiazole	2.3	2.2	1.8	1.8	1.8	1.8
0.15	sulfadiazine	3.7	3.2	3.2	3.0	3.0	3.0
	sulfathiazole	3.8	3.4	2.9	2.9	2.9	2.9
0.20	sulfadiazine	4.4	4.4	4.0	4.0	4.0	3.7
	sulfathiazole	4.3	3.9	3.8	3.7	3.5	3.3

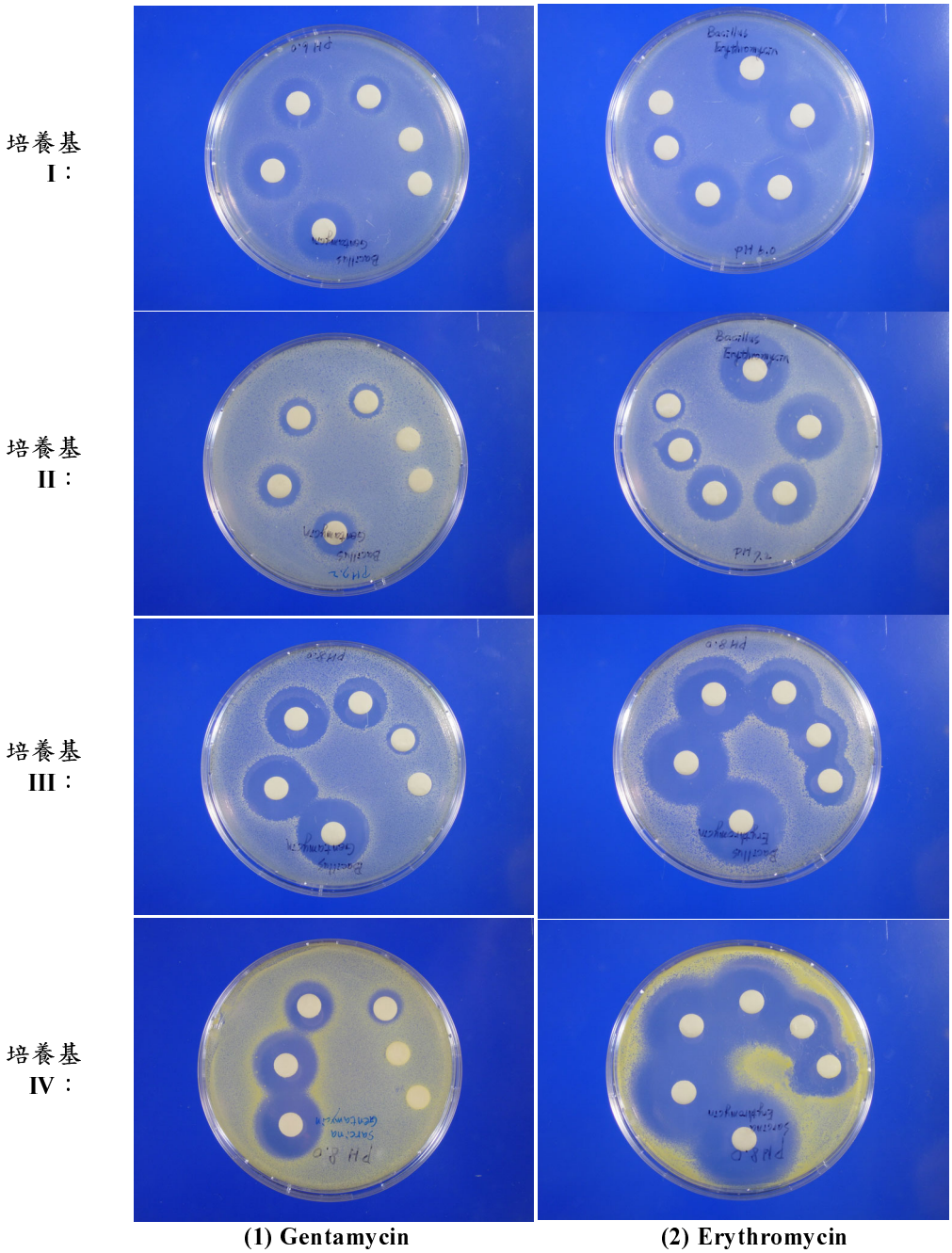
註：

1. 行政院衛生署公告訂定之「動物用藥殘留標準」殘留容許量，Sulfadrugs 0.1 ppm，TMP 0.05 ppm。
2. 本法檢測最低限值：添加 TMP 0.05 ppm 的 Sulfadrugs 檢測最低限值 0.01 ppm；添加 0.1 ppm 對應限值 0.005 ppm。

家畜衛試所研報No.41：135~146(2006)

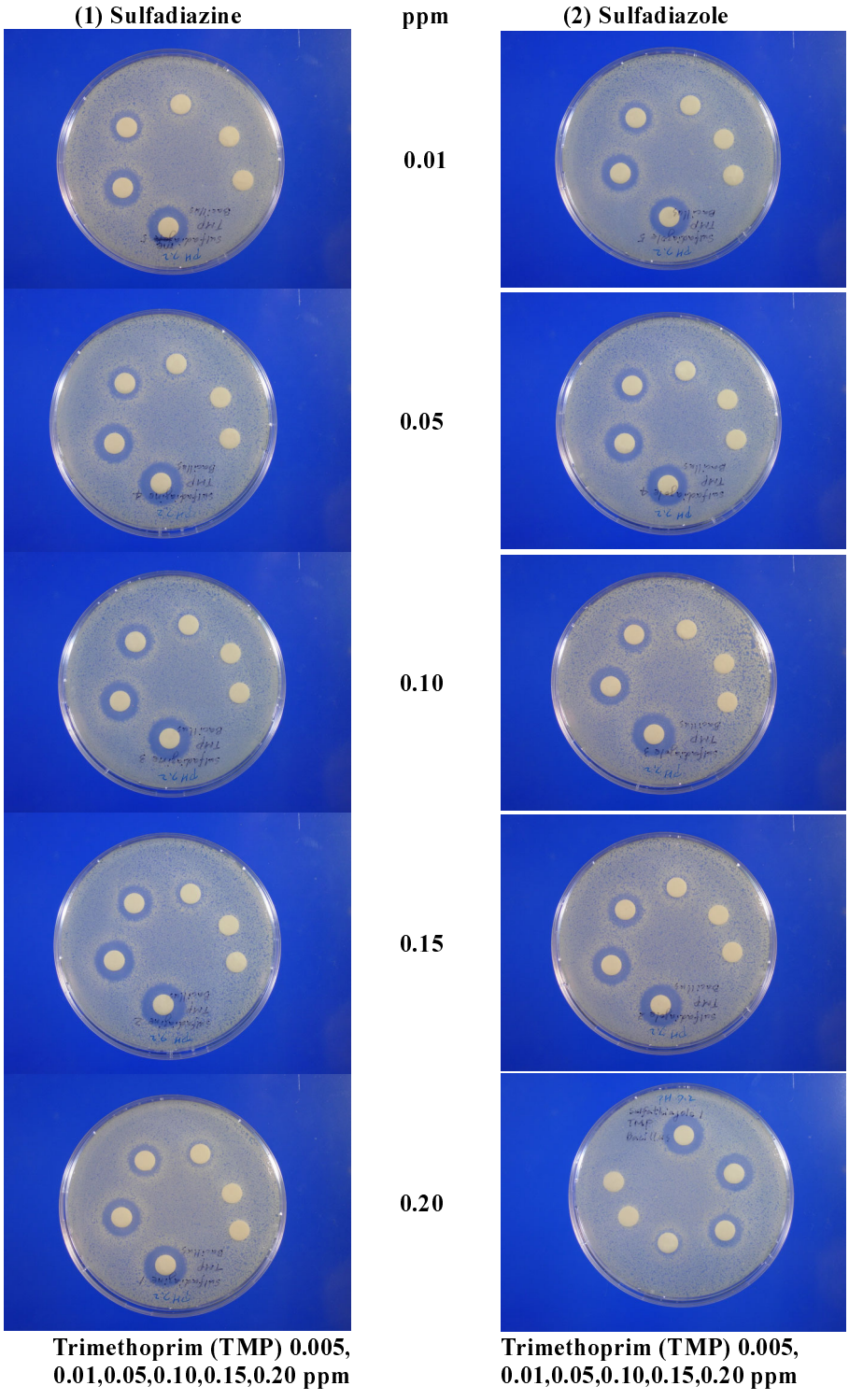


圖二　抗生物質常用品項(A) Oxytetracyclin與Ampicillin標準溶液的四種培養基菌盤抑制圈分析。



圖二　抗生物質常用品項(B) Gentamycin與Erythromycin標準溶液的四種培養基菌盤抑制圈分析。

家畜衛試所研報No.41：135~146(2006)



圖三　抗生物質常用品項磺胺劑標準溶液添加三甲苄氨嘧啶的四種培養基菌盤抑制圈分析。

表三　四種培養基菌盤檢測法的各類抗生物質檢測最低限值

抗生素名稱	四種培養基指標菌盤的最低檢測限值(ppm) I:10663 pH 6.0 *Bacillus subtilis*	II:105270 pH 7.2 *Bacillus subtilis*	III:10664 pH 8.0 *Bacillus subtilis*	IV:10664 pH 8.0 *Sarcina lutea*	行政院衛生署公告訂定之「動物用藥殘留標準」的殘留容許量(ppm)		
Ampicillin	＜0.005	＜0.01	＜0.005	＜0.005	肌肉、肝、腎、脂	牛、豬	0.01
					乳	牛	
					肌肉	魚	0.05
Amoxicillin	＜0.005	＜0.01	＜0.01	＜0.005	肌肉、肝、腎、脂	牛、豬、綿羊、山羊、家禽類	0.01
					乳	牛、綿羊	
					肌肉	魚	0.05
Penicillin G	＜0.005	＜0.005	＜0.01	＜0.005	肌肉、肝、腎、脂	牛	0.05
					肌肉、肝、腎、脂	豬、綿羊、雞、雉、鵪鶉	0
					乳	綿羊	
					蛋	雞、雉、鵪鶉	
					肌肉、肝、腎、脂	火雞	0.01
Oxy Tetra cycline	＜0.05	＜0.05	＜0.6	＜1.2	肌肉	牛、豬、綿羊、家禽類、魚(2)、大明蝦(2)	0.2
					肝	牛、豬、綿羊、家禽類	0.6
					腎		1.2
					蛋	家禽類	0.4
					乳	牛、綿羊	0.1
Doxy cycline	＜0.05	＜0.05	＜0.05	＜0.6	同Oxytetracycline		
Kana mycin	＜0.5	＜0.1	＜0.1	＜1.5	—		
Genta mycin	＜0.5	＜0.1	＜0.05	＜0.5	肌肉、脂	牛、豬	0.1
					肝		2
					腎		5
					乳	牛	0.2
Neo mycin	＜1.0	＜0.5	＜0.5	＜1.0	肌肉、脂、乳	牛	0.5
					肝		15
					腎		20
					肌肉、肝、脂	豬、綿羊、山羊、火雞、雞、鴨	0.5
					腎		10
					蛋	雞	0.5
Tylosin	＜0.25	＜0.1	＜0.05	＜0.05	肌肉、肝、腎、脂	牛、豬、雞、火雞	0.2
					蛋	雞、火雞	
					乳	牛	0.05
Erythro mycin	＜0.05	＜0.05	＜0.05	＜0.05	肌肉、肝、腎、脂	牛、豬、綿羊、山羊、家禽類	0.3
					乳	牛、綿羊	0.04
					蛋	家禽類	0.3
Spira mycin	＞0.3	＜0.15	＜0.05	＜0.05	肌肉	牛、豬、雞	0.2
					肝		0.6

家畜衛試所研報No.41：135~146(2006)

表四　四種培養基菌盤檢測法與行政院衛生署藥物食品檢驗局專輯收錄檢驗方法的各類抗生素檢測敏感度比較

抗生素名稱	四種培養基指標菌盤的最低檢測限值(ppm)				行政院衛生署藥物食品檢驗局抗生物質類別之檢驗敏感度(ppm)
	I:10663 pH 6.0 *Bacillus subtilis*	**II:105270 pH 7.2 *Bacillus subtilis***	**III:10664 pH 8.0 *Bacillus subtilis***	**IV:10664 pH 8.0 *Sarcina lutea***	
乙內醯胺類：					
Ampicillin	＜0.005	＜0.01	＜0.005	＜0.005	0.0025
Amoxicillin	＜0.005	＜0.01	＜0.01	＜0.005	0.0025
Penicillin G	＜0.005	＜0.005	＜0.01	＜0.005	0.0025
四環素類：					
Oxytetracycline	＜0.05	＜0.05	＜0.6	＜1.2	0.05
Doxycycline	＜0.05	＜0.05	＜0.05	＜0.6	0.01
胺基配醣苷類：					
Kanamycin	＜0.5	＜0.1	＜0.1	＜1.5	0.1
Gentamycin	＜0.5	＜0.1	＜0.05	＜0.5	0.1
Neomycin	＜1.0	＜0.5	＜0.5	＜1.0	0.1
巨環素類：					
Tylosin	＜0.25	＜0.1	＜0.05	＜0.05	0.1
Erythromycin	＜0.05	＜0.05	＜0.05	＜0.05	0.05
Spiramycin	＞0.3	＜0.15	＜0.05	＜0.05	0.1

參考文獻

1. Aerts, M. M. L., Hogenboom, A. C. and Brinkman, U. A. Th. 1995. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. J. Chromatogr. 667: 1-20.
2. Bogaerts, R. and Wolf, F. 1980. A standardized method for the detection of residues of anti-bacterial substances in fresh meat. *Fleischwirtsch.* 60:672-674.
3. Botsoglu, N. A. and Fletouris, D. J. 2001. Ageneral view of drug usage. In: Drug residues in foods pharmacology, food safety, and analysis (Botsoglu, N.A. and Fletouris, D.J., eds.), Marcel Dekker Inc., New York. USA. p. 1-10；269-295.
4. Chang, C. S., Tai,T. F. and Li, H. P. 2000. Evaluating the applicability of the modified four-plate test on the determination of antimicrobial agent residues in prok. *Journal of food and drug analysis* 8:25-34.
5. Croubles, S., Baert, K., Okerman, L., Robbrecht, V., Aerden, L. and DeBacker, P. 1999. The detection of residues of doxycycline in porcine kidney and muscle tissue: correlation between results of microbiological screening and confirmation tests. Vlaams Diergeneesk. Tijdschr. 68, 22- 26.
6. DSM Food Specialities, Delft, Netherlands. 網址：www.premitest.com
7. Gudding, R. 1976. An improved bacteriological method for the detection of sulfonamide residues in food. *Acta Vet.* 17:458-464.
8. Heitzman, R. J. editor. 1994. Veterinary drug – residues in food-producing animals and their products: Reference materials and methods. *Oxford: Blackwell Scientific Publications.* Pp Sg

3/1-8.

9. Higgins, H. C., McEvoy, J. D. G., Lynas, L. and Fagan, N. P. 1999. Evaluation of a single plate microbiological growth inhibition assay as a screening test for the presence of antimicrobial agents in compound animal feedingstuffs at therapeutic and contaminating concentrations. Food Addit. Contam. 16: 543-554.
10. Hussein K. 2004. Experimental design for the microbiological four-plate test for the detection of sulphadimidine residues at the levels of concern. *Bull.Vet. Inst. Pulawy*. 48:403-407.
11. Johnston, R. W., Reamer, R. H., Harris, E. W. and Fugate, H. G. 1981. A new screening method for the detection of antibiotic residues in meat and poultry tissues. *J. Food Prot.* 44:828-831.
12. Koenen-Dierick, K., Okerman, L., De Zutter, L.., Degroodt, J. M., van Hoof, J. and Srebrink, S. 1995. A one plate microbiological screening test for antibiotic residue testing in kidney tissue and meat: an alternative to the EEC four-plate method? *Food Addit. Contam.* 12:77-82.
13. Korsrud GO, Salisbury CDC, Rhodes CS, Papich MG, Yates WDG, Bulmer WS, MacNeil JD, Landry, DA, Lambert G, Yong MS and Ritters L. 1998. Depletion of penicillin G residues in tissues, plasma, and injection sites of market pigs injected intramuscularly with procaine penicillin G. *Food Addit. Contam.* 15:421-426.
14. MAF. 2001. Decree on microbiological detection of antimicrobial drugs in meat inspection. 21/EEO/2001.
15. Nouws. J. F. M., Broex, N. J. G., Den Hartog, J. M. P. and Driessens, F. 1988. The New Dutch Kidney Test. *Arch. Lebensmittelhyg.* 39:133-156.
16. Okerman, L., van Hoof, J. and Debeuckelaere, W. 1998. Evaluation of the European Four-plate test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets. *J. AOAC. Int.* 81:51-56.
17. Paige, J. C. 1994. Analysis of tissue residues. FDA Vet. 9, 4-6.
18. Stead, S., Sharman, M., Tarbin, J. A., Gibson, E., Richmond, S., Stark, J and Geijp, E. 2004. Meeting maximum residue limits: an improved screening technique for the rapid detection of antimicrobial residues in animal food products. *Food Addit. Contam.* 21:216-221.
19. Sundlof, S. F. 1989. Drug and chemical residues in livestock. Clin. Toxicol. 5: 411- 449.
20. USDA. 1983. United States Department of Agriculture. How to performthe Live Animal Swab Test for antibiotic residues. USDA, Handbook No. 601, Washington, D. C., USA.
21. USDA. 1984. United States Department of Agriculture. Performing the Calf Antibiotic and Sulfa Test. A Self-Instructional Guide, Food Safety and Inspection Service, Washington, D. C., USA.
22. USDA. 1994. United States Department of Agriculture. Fast Antimicrobial Screen Test, For detection and of antibiotic and sulfonamide residues in livestock kidney tissue. A self-instructional guide. Food Safety and Inspection Service, Washington, D. C., USA.
23. van Hoof, N., de Wasch, K., Noppe, H. and de Brabender, H. F. 2004. The rapid detection of veterinary drug residues. In: Pesticide, veterinary and other residues in food (Watson, D. H., ed.), Woodhead publishing Ltd., Cambridge. England. P. 224-246.
24. Woodward, K. N. 2004.The toxicity of particular veterinary drug residues. In: Pesticide, veterinary and other residues in food (Watson, D. H., ed.), Woodhead publishing Ltd., Cambridge. England. P. 175-195; 224- 248.

Exp.Rep AHRI.,No.41：135~146(2006)

Assessment on Screening and Differential Detection System for Categorized Antimicrobial Substance Residues

Lin WH*[1], Weng LJ [2], Chang CF [3], Chang CM [4], Sung HT [2], Chao PH [1]

[1] Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan
[2] Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei, Taiwan.
[3] Graduate Institute of Biotechnology, Chinese Culture University, Taipei, Taiwan.
[4] Department of Food Science, National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan.

Summary The detection of antibiotics residue is generally analyzed by the growth inhibition ring of sensitive microbial strains revealed on agar plate diffusion test. An integrated efficient detection system of initial screening detection and subsequent differential detection is performed in this research report. The initial screening detection adopts microbial gel coloring method (MGCM) with permitted commercial package on antibiotic residue detection over various animal products. The Premi®Test kit by Dutch DSM food company effectively covers 9 antibiotics classes with 34 drugs of routine usage including beta-lactams, tetracyclines, aminoglycosides, and sulfa drugs. Our detection result with Premi®Test kit revealed superior detection sensitivity on antibiotic residue classes as to be more sensitive than allowed maximal residue quantity of government regulation. Moreover, the subsequent differential detection adopts four plate test (FPT) with permitted microbial media and sensitive microbial strains on antibiotic residue detection over various animal products. Merck antibiotic test agars (MATA) are respectively applied on four plates with catalog numbers of [I] 10663 pH 6.0, [II] 105270 pH 7.2, [III] 10664 pH 8.0, and [IV] 10664 pH 8.0 in which plates [I, II, III] are inoculated with Bacillus subtilis ATCC 6633 and plate [IV] with Sarcina lutea ATCC 9341. Screening and differential detection among several routine antibiotics classes can be accomplished by respective sensitivity ranking pattern of antibiotic residue with FPT inhibitory ring sizes including beta-lactams [IV >I >III >II (or II> III)], tetracyclines [I >II >III >IV], aminoglycosides [III >II >I >IV], macrolides [IV >III >II >I].

In conclusion, the integrated detection system of initial screening detection and subsequent differential detection may be evidently efficient in fulfilling practical goal of antibiotic residue detection over various animal products. Initial screening detection of MACM may be established as voluntary pre-detection by food product suppliers. Subsequent differential detection of FPT may be established as surveillance detection as of integrated detection system by regulatory institutions. Methodology performance of best detection limit is effectively within allowed veterinary drug residue limit supervised by the Department of Health which in turn efficiently assures regulatory compliance on legal standards in allowed maximal antibiotics residue quantity.

Key words: antimicrobials； residue； microbiological method； screening； differential; microbial gel coloring method; four plate method.

*Corresponding Author
Animal Health Research Institute