

Legal and practical aspects of antimicrobial residues control of milk

Różańska H., Osek J.: Department of Hygiene of Food of Animal Origin, National Veterinary Research Institute in Pulawy

The aim of this paper was to discuss the legal and practical aspects of the milk control for drug residues. Residues of antibacterial substances in milk cause problems for technology in dairy industry and create the potential hazard for consumers' health. Maximum residue limits (MRLs), the maximal concentrations of individual chemicals or group of chemicals, including pharmaceuticals and industry chemicals and also the permissible levels of antimicrobials are regulated by the legislation. We discuss here important issues connected with the routine control of those residues in milk, including present legislation, systems of control, and requirements for laboratories and for analytical methods applied.

Keywords: milk, antimicrobial substances, residues, MRLs.

Jednym z istotnych czynników determinujących bezpieczeństwo mleka surowego oraz jego przydatność technologiczną są pozostałości substancji przeciwbakteryjnych, w tym antybiotyków. Substancje te, z różnych przyczyn obecne w mleku, mogą być przyczyną reakcji alergicznych, sprzyjać generowaniu oporności bakterii jelitowych oraz zakłócać jakościową i ilościową równowagę mikroflory przewodu pokarmowego. Mogą również fałszować wyniki badań mikrobiologicznych mleka i produktów mlecznych (1, 2, 3, 4, 5, 6). Ponadto przez hamowanie wzrostu drobnoustrojów wchodzących w skład kultur

Prawne i praktyczne aspekty kontroli pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w mleku

Hanna Różańska, Jacek Osek

z Zakładu Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

starterowych mogą uniemożliwiać właściwy przebieg produkcji twarogów, fermentowanych napojów mlecznych i serów dojrzewających, co wiąże się z wymiernymi stratami ekonomicznymi dla przemysłu mleczarskiego (7, 8). Należy przy tym zaznaczyć, że termiczna obróbka stosowana w gospodarstwach domowych oraz w technologii produkcji przetworów mleczarskich w niewielkim stopniu lub wcale nie dezaktywuje pozostałości antybiotyków lub innych substancji o działaniu przeciwbakteryjnym (9, 10, 11, 12). Ustawa z 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia (13) w art. 3 pkt 44 definiuje środek spożywczy szkodliwy dla zdrowia lub życia człowieka m.in. jako taki, który zawiera produkty lecznicze weterynaryjne w ilościach przekraczających dopuszczalne poziomy lub zabronione określone w rozporządzeniach Unii Europejskiej. Unijne procedury określania maksymalnych limitów pozostałości (maximum residue limit – MRL) substancji farmakologicznie czynnych w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego podaje rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 470/2009 (14), natomiast poziomy tych

limitów znaleźć można w rozporządzeniu Komisji (UE) nr 37/2010 z 22 grudnia 2009 r. w sprawie substancji farmakologicznie czynnych i ich klasyfikacji w odniesieniu do maksymalnych limitów pozostałości w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego (załącznik 1; 15). W załączniku 2 do tego rozporządzenia zebrano substancje, których stosowanie u zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność, nie jest dozwolone, jak na przykład chloramfenikol, nitrofurany, metronidazol. Dla tych związków nie jest możliwe określenie poziomu pozostałości (MRL), który można by uznać za bezpieczny z punktu widzenia ochrony zdrowia konsumenta, natomiast definiuje się wymagany poziom wykrywalności stosowanych metod analitycznych (minimum required performance level – MRPL). Również wymagania niektórych importerów, w tym krajów Unii Celnej (Białoruś, Kazachstan i Rosja) należy rozumieć nie jako dopuszczalny poziom pozostałości, ale jako wymaganą czułość metod dla określonych substancji.

Jednym z elementów kontroli pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w surowcach i produktach pochodzenia

zwierzęcego, w tym mleka, jest krajowy program badań kontrolnych obecności substancji niedozwolonych oraz pozostałości chemicznych, biologicznych i produktów leczniczych u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego. Coroczne przygotowanie i realizacja programu w oparciu o dyrektywę 96/23/WE z 29 kwietnia 1996 r. (16) jest obowiązkiem wszystkich krajów członkowskich UE. Krajowe programy badań pozostałości podlegają ocenie laboratoriów referencyjnych UE oraz Komisji Europejskiej i zatwierdzane są co roku odrębnymi decyzjami. Liczba badanych próbek jest proporcjonalna do wielkości produkcji zwierzęcej w roku poprzednim. Prowadzenie monitorowania substancji niedozwolonych, pozostałości chemicznych, biologicznych, produktów leczniczych i skażeń promieniotwórczych u zwierząt, w ich wydzielinach i wydalinach, w produktach pochodzenia zwierzęcego, w wodzie przeznaczonych do pojenia oraz w środkach żywienia zwierząt jest zadaniem Inspekcji Weterynaryjnej (17). Szczegółowe zasady prowadzenia badań monitoringowych reguluje instrukcja Głównego Lekarza Weterynarii (18). Zasady postępowania administracyjnego w przypadku stwierdzenia obecności substancji zakazanych lub przekroczeń maksymalnego dopuszczalnego poziomu innych substancji uregulowano w rozporządzeniu ministra rolnictwa i rozwoju wsi z 28 lipca 2006 r. (19). W ramach programu badań kontrolnych pozostałości w 2015 r. zbadano ogółem 2130 próbek mleka surowego, w tym 250 w kierunku pozostałości substancji z grupy A6 (leki niedozwolone): 190 – chloramfenikolu, 50 – metabolitów nitrofuranów i 10 – nitroimidazoli i ich metabolitów. W kierunku obecności substancji z grupy B1 badano 1880 próbek mleka surowego, w tym na obecność substancji przeciwbakteryjnych, z użyciem metod przesiewowych i instrumentalnych metod potwierdzających w przypadku ewentualnych wyników dodatnich – 1750, 10 próbek w kierunku amfenikoli (florfenikol, florfenikolamina) oraz 120 próbek do badań ukierunkowanych na wybrane grupy substancji (penicyliny, cefalosporyny, sulfonamidy, makrolidy, fluorochinolony, aminoglikozydy, linkozamidy, tetracykliny). Badania w ramach krajowego programu kontroli pozostałości prowadzone są w 8 Zakładach Higieny Weterynaryjnej, tj. w Białymstoku, Gdańsku, Katowicach, Łodzi, Olsztynie, Poznaniu, Warszawie i we Wrocławiu, oraz w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii i w Zakładzie Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Instytut przygotowuje

również dla potrzeb Głównego Inspektoratu Weterynarii oraz Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi założenia do programu, a także nadzoruje merytorycznie jego realizację, między innymi poprzez opracowywanie i wdrażanie metod analitycznych, szkolenia personelu ZHW, wykonywanie badań potwierdzających oraz organizację badań biegłości (proficiency testing – PT). Zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z 28 stycznia 2002 r. (20) obowiązek przestrzegania wymogów prawa na każdym etapie produkcji, przetwarzania lub dystrybucji pasz i żywności spoczywa na zakładzie (producencie), natomiast obowiązkiem państwa członkowskiego UE jest monitorowanie i kontrolowanie skuteczności działań producenta w tym zakresie. Stąd też szczególnie istotna rola laboratoriów działających na potrzeby przemysłu mleczarskiego, które co roku wykonują badania setek tysięcy próbek mleka surowego. Celem tych badań jest w dużej mierze zapewnienie odpowiedniej jakości surowca mlecznego. Z drugiej strony, zgodnie z prawem, wyniki badań wykonywanych w tych laboratoriach mogą być wykorzystywane do celów kontroli urzędowej (21). Badania urzędowe lub takie, których wyniki mogą być do tych celów wykorzystywane, przeprowadzane są w laboratoriach urzędowych, do których należą Zakłady Higieny Weterynaryjnej, laboratoria państwowych instytutów badawczych, laboratoria weterynaryjne wchodzące w skład innych jednostek organizacyjnych Inspekcji Weterynaryjnej i inne laboratoria oraz w laboratoriach znajdujących się w rejestrze prowadzonym przez Głównego Lekarza Weterynarii, zgodnie z art. 25e ustawy o Inspekcji Weterynaryjnej, w tym laboratoria zakładów mleczarskich (22). Laboratoria ubiegające się o wpis do rejestru Głównego Lekarza Weterynarii zgodnie z ustawą muszą spełniać określone wymagania. Jednym z nich jest udział, z wynikiem pozytywnym, w badaniach biegłości organizowanych przez Krajowe Laboratorium Referencyjne (KLR) ds. pozostałości substancji przeciwbakteryjnych nie wcześniej niż w roku poprzedzającym datę złożenia stosownego wniosku oraz dalszy, systematyczny udział w takich badaniach w odniesieniu do metod zgłoszonych do rejestru. Brak uczestnictwa w badaniach biegłości lub dwukrotne uzyskanie wyniku niezadowalającego w kolejnych badaniach biegłości może skutkować wykreśleniem laboratorium z rejestru GLW. Drugim kryterium jest stosowanie odpowiednich metod analitycznych. W przypadku laboratoriów urzędowych, uczestniczących w krajowym programie badań kontrolnych

pozostałości, właściwe metody wskazuje Krajowe Laboratorium Referencyjne. Laboratoria z rejestru Głównego Lekarza Weterynarii mogą stosować dowolne testy komercyjne, pod warunkiem że znajdują się one w wykazie wyrobów do diagnostyki *in vitro* Głównego Lekarza Weterynarii (23). Warunkiem umieszczenia testu w wykazie jest teoretycznie spełnienie wymagań decyzji Komisji 2002/657/WE z 14 sierpnia 2002 r., wykonującej dyrektywę Rady 96/23/WE, dotyczącej wyników metod analitycznych i ich interpretacji (24), potwierdzone opinią Krajowego Laboratorium Referencyjnego (25). Nie istnieją w praktyce testy przesiewowe wykrywające wszystkie substancje na satysfakcjonujących poziomach. Problemu tego nie udało się skutecznie rozwiązać w żadnym kraju UE. O ile testy receptorowe niemal zawsze gwarantują wykrywanie określonych substancji na poziomie MRL lub niższym, o tyle testy mikrobiologiczne, wykorzystujące zjawisko hamowania wzrostu *Geobacillus stearothermophilus*, są bardzo czułe w odniesieniu do beta-laktamów, natomiast znacznie mniej w przypadku aminoglikozydów, makrolidów czy tetracyklin. Wobec braku jednolitych kryteriów dopuszczania takich testów do stosowania na uwagę zasługuje propozycja BFASFC (Belgian Federal Agency for the Safety of Food Chain; 26). Według tego dokumentu minimalne wymagania dla testów mikrobiologicznych to uzyskanie wyniku w maksymalnie 4 godziny, możliwość instrumentalnego odczytu wyniku (lub wynik odczytany wizualnie musi odpowiadać wynikowi z odczytu automatycznego), możliwość wykrywania szerokiego spektrum substancji, w tym 85% z listy 14 beta-laktamów na poziomie MRL lub niższym, 75% z listy 3 sulfonamidów i dapsonu również na poziomie MRL, chlortetracykliny i oksytetracykliny na poziomie $2 \times$ MRL, 35% z listy 16 innych substancji na poziomie $3 \times$ MRL. Ponadto test nie powinien dawać fałszywych wyników przy podwyższonej ogólnej liczbie drobnoustrojów lub komórek somatycznych w mleku. Termin przydatności zestawów testowych nie powinien być krótszy niż 3 miesiące, a producent powinien dostarczać świadectwo z kontroli seryjnej. Badania prowadzone przez Institute for Agricultural and Fisheries Research (ILVO) wykazały, że kryteria dotyczące poziomów wykrywalności wybranych testów mikrobiologicznych stosowanych w Belgii były w większości spełnione. Wadą testów przesiewowych, zarówno receptorowych, jak i mikrobiologicznych, jest brak możliwości określenia koncentracji stwierdzonych pozostałości, a więc możliwości oceny próbki jako zgodnej (poziom

poniżej MRL) lub niezgodnej. W efekcie sam wynik dodatni nie uprawnia do podjęcia decyzji administracyjnej. W przypadku testów mikrobiologicznych nie jest również możliwa identyfikacja substancji o działaniu przeciwbakteryjnym. Nie można zatem stwierdzić, czy są to pozostałości stosowanego niewłaściwie leku, czy niespecyficzne albo naturalne substancje hamujące, jak laktoferyny, laktoperoksydazy, lizozym lub substancje pochodzące z paszy. Wobec powyższego wydaje się konieczne przyjęcie takich rozwiązań, które umożliwią wykonanie badań potwierdzających, dających odpowiedź na pytanie, co i w jakiej koncentracji stwierdzono w badanej próbce, na przykład pobieranie kontrpróbek, które na żądanie hodowcy mogłyby być poddane badaniom potwierdzającym.

Na 17 lutego 2016 r. w wykazie wyrobów do diagnostyki *in vitro* Głównego Lekarza Weterynarii znajdowało się 12 testów mikrobiologicznych oraz 22 testy receptorowe, jedno-, dwu- lub czterokierunkowe. Analiza danych z badań biegłości wskazuje, że laboratoria mleczarskie często posługują się tylko testem mikrobiologicznym, pozwalającym wykrywać różne substancje o działaniu przeciwbakteryjnym lub tylko testem receptorowym ukierunkowanym na beta-laktamy albo kombinacją obu metod. Tymczasem analiza wykazu produktów leczniczych dopuszczonych do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej (27), jak też raportu na temat zużycia przeciwbakteryjnych produktów leczniczych weterynaryjnych w 2013 r. w Polsce (28) wskazuje, że szczegółową kontrolą powinny być objęte jeszcze inne grupy antybiotyków, w tym co najmniej tetracykliny i aminoglikozydy, które najczęściej wchodziły w skład preparatów przeznaczonych do leczenia *mastitis* u krów mlecznych. Zastrzeżenia co do spektrum kontrolowanych substancji zgłaszają także misje kontrolne z krajów importujących polską żywność, w tym przetwory mleczarskie. Musi to być brane pod uwagę przez producentów i inspektorów Inspekcji Weterynaryjnej nadzorujących zakłady.

Piśmiennictwo

1. Anon.: Hazards caused by antibiotic residues in food. Microbiological aspects. Twelfth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva, July 1–8, 1968.

2. Khaniki Gh.R.J.: Chemical contaminants in milk and public health concerns: a review. *Int. J. Dairy Sci.* 2007, 2, 104–115.
3. Nisha A.R.: Antibiotic residues – a global health hazard. *Veterinary World* 2008, 1, 375–377.
4. O’Keefe M., Kennedy O.: Residues – a food safety problem? *J. Food. Safety* 1998, 18, 297–319.
5. Raison-Peyron N., Messaad D., Bousquet J., Demoly P.: Anaphylaxis to beef in penicillin allergic patient. *Allergy* 2001, 56, 796–797.
6. Van Asselt E.D., van der Spiegel M., Noordam M.Y., Pikkemaat M.G., van der Fels-Klerx H.J.: Risk ranking of chemical hazards in food – a case study on antibiotics in the Netherlands. *Food Res. Int.* 2013, 54, 1636–1642.
7. Katla A.K., Kruse H., Johnsen G., Herikstad H.: Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, 67, 147–152.
8. Mullan W.M.A.: Inhibitors in milk. <https://www.dairy-science.info/inhibitors-in-milk/51-inhibitors-in-milk.html>. 2003. Dostęp: 2015.10.29.
9. Heshmati A.: Impact of cooking procedures on antibacterial drug residues in foods: a review. *J. Food Qual. Hazards Control* 2015, 2, 33–37.
10. Lokuwan J.: The effect of heating on multiple residues of tetracyclines in milk. *Thammasat Int. J. Sci. Tech.* 2002, 7, 17–21.
11. Roca M., Castillo M., Marti P., Althaus R.L., Molina M.P.: Effect of heating on the stability of quinolones in milk. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 5427–5431.
12. Roca M., Villegas L., Kortabitarte M.L., Althaus R.L., Molina M.P.: Effect of heat treatment on stability of β -lactams in milk. *J. Dairy Sci.* 2011, 94, 1155–1164.
13. Ustawa z 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia. Tekst jednolity. Dz.U. z 8 kwietnia 2015 r. poz. 594.
14. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 470/2009 z 6 maja 2009 r. ustanawiające wspólnotowe procedury określania maksymalnych limitów pozostałości substancji farmakologicznie czynnych w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego oraz uchylające Rozporządzenie Rady (EWG) nr 2377/90 oraz zmieniające dyrektywę 2001/82/WE Parlamentu Europejskiego i Rady i rozporządzenie (WE) nr 726/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady. Dz.U. L 152/11 z 16.6.2009.
15. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 37/2010 z 22 grudnia 2009 r. w sprawie substancji farmakologicznie czynnych i ich klasyfikacji w odniesieniu do maksymalnych limitów pozostałości w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej L. 15/1 20.1.2010.
16. Dyrektywa Rady 96/23/WE z 29 kwietnia 1996 r. w sprawie środków monitorowania niektórych substancji i ich pozostałości u żywych zwierząt i w produktach pochodzenia zwierzęcego oraz uchylająca dyrektywę 85/358/EWG i 86/469/EWG oraz decyzje 89/187/EWG i 91/664/EWG. Dz.U. L 125/10 z 23.5.1996.
17. Ustawa z 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej z 29 stycznia 2004 r. Dz.U. z 2 marca 2004 r. (z późn. zm.).
18. Instrukcja Głównego Lekarza Weterynarii nr GIWlab 830-9/13 z 15 marca 2013 r. w sprawie zakresu i sposobu realizacji krajowego programu badań kontrolnych substancji niedozwolonych, pozostałości chemicznych, biologicznych, produktów leczniczych u zwierząt, w produktach pochodzenia zwierzęcego oraz w wodzie przeznaczonej do pojenia zwierząt i paszach.
19. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 28 lipca 2006 r. w sprawie sposobu postępowania z substancjami niedozwolonymi, pozostałościami chemicznymi, produktami leczniczymi i skażeniami promieniotwórczymi u zwierząt i w produktach pochodzenia zwierzęcego. Dz.U. nr 147 poz. 1067.
20. Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego Rady z 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności. Dz.U. L 31 z 1.2.2002 r.
21. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 30 czerwca 2014 r. w sprawie wykazu badań laboratoryjnych, których wyniki są wykorzystywane do celów kontroli urzędowej. Dz.U. z 23 lipca 2014 r. poz. 965.
22. Rejestr laboratoriów prowadzony przez Głównego Lekarza Weterynarii zgodnie z art. 25e Ustawy o Inspekcji Weterynaryjnej, wykonujących badania mleka surowego w zakresie określania ogólnej liczby bakterii, liczby komórek somatycznych i pozostałości substancji przeciwbakteryjnych, których wyniki badań laboratoryjnych są wykorzystywane do celów kontroli urzędowej. www.wetgiw.gov.pl
23. Wykaz testów do diagnostyki *in vitro* GLW prowadzony zgodnie z art. 2 pkt 40 ustawy z 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt. Dz.U. z 2008 r., nr 213, poz. 1342 z późn. zm. www.wetgiw.gov.pl
24. Decyzja Komisji z 14 sierpnia 2002 r. wykonująca dyrektywę Rady 96/23/WE dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji (2002/657/WE). Dz.U. L 221 z 17.8.2002 r.
25. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 18 kwietnia 2012 r. w sprawie krajowych laboratoriów referencyjnych. Dz.U. z 4 maja 2012 r. poz. 480 (z późn. zm.).
26. Reybroeck W., Ooghe S.: FASFC acceptance criteria for microbiological inhibitor tests L fulfillment by new tests. Proc. Euroresidue VII, Egmont Aan Zee, the Netherlands, 14–16 May 2012, 197–201.
27. Przeciwbakteryjne produkty lecznicze weterynaryjne w 2013 roku w Polsce. Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Departament Bezpieczeństwa Żywności i Weterynarii, Warszawa 2014 rok. www.wetgiw.gov.pl
28. Urzędowy Wykaz Produktów Leczniczych Dopuszczonych do Obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej. Zał. nr 4: Wykaz produktów leczniczych weterynaryjnych dopuszczonych do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej. Dz.U. Min. Zdr. z 16.03.2015, poz. 15.