

Badania biegłości w zakresie pozostałości substancji przeciwbakteryjnych, organizowane przez Krajowe Laboratorium Referencyjne w latach 2013–2016

Hanna Różańska, Jacek Osek

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

Pozostałości antybiotyków lub innych substancji o działaniu przeciwbakteryjnym w żywności pochodzenia zwierzęcego stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Z tego względu ich obecność musi być systematycznie kontrolowana, a poziom nie powinien przekraczać maksymalnych dozwolonych stężeń, określonych rozporządzeniem 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 zwierzęcego pochodzenia (1). Dla właściwej kontroli obecności antybiotyków zarówno w surowcach, jak i produktach zwierzęcego pochodzenia niezbędne jest stosowanie odpowiednich metod, co może zostać zweryfikowane m.in. poprzez udział w badaniach biegłości (proficiency test – PT). Badania te są istotnym, bezstronnym narzędziem potwierdzania kompetencji laboratorium, ważnym z punktu widzenia jednostek certyfikujących, inspekcyjnych oraz klientów. Celem tego opracowania jest przedstawienie wyników badań biegłości w zakresie wykrywania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych metodami przesiewowymi, organizowanych przez Krajowe Laboratorium Referencyjne (KLR) w latach 2013–2016.

Organizacja badań

Organizatorem badań biegłości był Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, na mocy rozporządzenia ministra rolnictwa i rozwoju wsi z 8 kwietnia 2012 r. pełniący rolę Krajowego Laboratorium Referencyjnego w zakresie pozostałości substancji przeciwbakteryjnych (grupa B1; 2). Jednym z jego zadań, zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady nr 882/2004/WE (3) oraz ustawą o Inspekcji Weterynaryjnej z 29 stycznia 2004 r. (4), jest organizacja badań porównawczych dla krajowych

laboratoriów urzędowych oraz zapewnienie odpowiedniego późniejszego wykorzystania wyników tych badań. Obowiązek uczestnictwa w badaniach biegłości dotyczy zarówno laboratoriów urzędowych (w tym Zakładów Higieny Weterynaryjnej), jak i innych laboratoriów wykonujących badania, których wyniki mogą być wykorzystane do celów kontroli urzędowych. Zgodnie z rozporządzeniem ministra rolnictwa i rozwoju wsi z 30 czerwca 2014 r. (5) wyniki badań mleka surowego w kierunku obecności substancji hamujących mają własny taki charakter, zatem również laboratoria tego typu mają obowiązek regularnego uczestnictwa w badaniach biegłości organizowanych przez Krajowe Laboratorium Referencyjne. Szczegółowo regulują te kwestie art. 25a i 25e ustawy o Inspekcji Weterynaryjnej. W myśl zapisów ustawy udział (z wynikiem pozytywnym) w badaniach biegłości jest jednym z wymagań dotyczących zatwierdzenia laboratorium do wykonywania określonych badań, a w przypadku laboratoriów mleka surowego – wpisania do rejestru prowadzonego przez Głównego Lekarza Weterynarii (GLW; 6). Brak regularnego udziału w badaniach biegłości lub uzyskanie niezadowolających wyników w dwóch kolejnych rundach badania biegłości może skutkować cofnięciem zatwierdzenia lub skreśleniem laboratorium z rejestru. Informacje o programie badań biegłości w zakresie pozostałości substancji przeciwbakteryjnych dostępne są na stronie www.piwet.pulawy.pl w zakładce: badania biegłości. Można tam znaleźć regulamin uczestnictwa w badaniu biegłości, harmonogram na dany rok, formularze zgłoszeniowe, karty wyników i inne dokumenty związane z organizacją badań biegłości. Dokumenty są aktualizowane na początku każdego roku. Program badań biegłości w zakresie pozostałości substancji przeciwbakteryjnych ma charakter otwarty, co oznacza, że mogą w nich uczestniczyć nie tylko laboratoria urzędowe i laboratoria z rejestru Głównego Lekarza Weterynarii, ale również inne podmioty. Udział w badaniu biegłości

Proficiency testing for residues of antibacterial substances organized by National Reference Laboratory in years 2013–2016

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

Proficiency tests (PTs) are important tool for evaluation the competences of laboratories licensed for testing foods. The aim of this paper was to present a legal background for performing proficiency tests for residues of antibacterial substances in foods of animal origin, in their organization by National Reference Laboratory and the results obtained by participated laboratories during years 2013–2016. In general, 5084 results were obtained and only 106 (2.1%) were evaluated as the non-compliant.

Keywords: antibacterial substances, food, proficiency testing.

dla laboratoriów Inspekcji Weterynaryjnej jest bezpłatny. Pozostałe podmioty płacą według stawek określonych w regulaminie uczestnictwa. Zwykle Państwowy Instytut Weterynaryjny w Puławach organizuje w ciągu roku dwie rundy badań biegłości, z uwzględnieniem różnych matryc i substancji. W przypadku laboratoriów urzędowych i laboratoriów z rejestru GLW, które uzyskały niezadowolające wyniki badania biegłości, organizowane są, zgodnie z zapisem ustawy o Inspekcji Weterynaryjnej, rundy dodatkowe.

Zgłoszenia uczestnictwa w badaniach biegłości w zakresie pozostałości substancji przeciwbakteryjnych należy dokonywać drogą elektroniczną, w przewidzianym w harmonogramie badań terminie, przesyłając na adres pt.sh@piwet.pulawy.pl wypełniony formularz zgłoszeniowy, dostępny na stronie www.piwet.pulawy.pl w zakładce: badania biegłości – Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego – pozostałości substancji hamujących. Uczestnicy są informowani e-mailem o otrzymaniu zgłoszenia oraz otrzymują kod uczestnictwa w danej rundzie badań biegłości. Kody zapewniają laboratoriom anonimowość, a odkodowane listy uczestników przekazywane są, wraz ze sprawozdaniami z PT, do Głównego Inspektoratu Weterynarii i Departamentu Bezpieczeństwa Żywności i Weterynarii Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Wyniki analiz próbek kontrolnych należy przesłać drogą elektroniczną, w terminie podanym w harmonogramie badań, na adres e-mail organizatora, korzystając z formularzy kart wyników dostępnych na ww. stronie WWW. Uczestnik może raportować wyniki uzyskane dowolną liczbą metod, przy czym

dla każdej z nich powinien użyć odrębnej karty wyników. Wymaga się, aby laboratoria urzędowe poddawały ocenie w PT metody akredytowane i zgłaszane do akredytacji, natomiast laboratoria z rejestru GLW – metody wpisane do tego rejestru.

Przygotowanie próbek kontrolnych

Próbki kontrolne przygotowuje się przez organizatora badań biegłości według opracowanego wcześniej schematu. W tym celu próbki tkanek zwierzęcych, jaj lub wody fortyfikowane są wybranymi substancjami w taki sposób, aby otrzymana koncentracja substancji czynnej była zbliżona do wartości MRL lub możliwie najniższa. Następnie próbki poddawane są badaniom jednorodności i stabilności, zgodnie z odpowiednim, uznanym międzynarodowo schematem (7). Dla oceny jednorodności przygotowanego materiału badaniom poddaje się, w dniu przygotowania, po 10 próbek z każdej grupy, przez wykonywanie dwóch równoległych oznaczeń. Próbki tkanek, jaj i wody badane są opracowaną w KLR „Mikrobiologiczną, skriningową metodą wykrywania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych – 5-płytkową”. W przypadku próbek mleka stosowane są trzy metody: „Mikrobiologiczna metoda wykrywania

substancji przeciwbakteryjnych – Delvotest SP-NT” oraz dwa testy receptorowe: Charm ROSA MRL BL/TET, przeznaczony do wykrywania beta-laktamów i tetracyklin oraz 4Sensor, służący do wykrywania beta-laktamów, tetracyklin, streptomycyny/dihydrostreptomycyny i chloramfenikolu. Wszystkie metody mają akredytację Polskiego Centrum Akredytacji (certyfikat AB 485). Jako kryterium jednorodności próbek przyjęto 100% zgodność wszystkich wyników. Badania stabilności analitu w próbkach kontrolnych wykonywane są w dniu następnym po dacie dostarczenia próbek do laboratoriów uczestniczących w PT. Badaniom, przy zastosowaniu wyżej opisanych metod, poddaje się po 3 losowo wybrane próbki z każdej grupy, przez wykonanie dwóch równoległych oznaczeń. Kryterium, jak przy jednorodności, stanowi 100% zgodność uzyskanych wyników. Próbki kontrolne przesyłane są do uczestników PT pocztą kurierską, w warunkach umożliwiających zachowanie właściwej temperatury. Do czasu ekspedycji próbki przechowywane są, w zależności od rodzaju, w stanie zamrożonym albo schłodzonym. Po otrzymaniu próbek laboratorium powinno ocenić ich przydatność do badań. W przypadku, kiedy jakość ta budzi wątpliwości, uczestnik może odstąpić od badania, niezwłocznie powiadamiając

organizatora badań biegłości o zaistniałej sytuacji.

Kryteria oceny wyników

Kryterium oceny wyników uzyskanych przez laboratoria uczestniczące w PT jest, ze względu na jakościowy charakter stosowanych metod, zgodność z wynikiem przypisanym. Przyjęto, że laboratorium uzyskuje niezadowalający rezultat badań biegłości, jeśli jako niezgodny oceniony będzie nawet tylko jeden z nadesłanych wyników. Laboratorium, które uzyskało niezadowalający wynik PT zobowiązane jest do przeprowadzenia analizy przyczyn uzyskania takiego wyniku oraz, jeśli to okaże się konieczne, podjęcia w przewidzianym terminie działań korygujących, o czym należy powiadomić KLR. Dla laboratoriów urzędowych oraz laboratoriów z rejestru Głównego Lekarza Weterynarii obligatoryjny jest w takich przypadkach udział w dodatkowej rundzie badań biegłości.

Analiza wyników PT organizowanych w latach 2013–2016

W omawianym okresie zorganizowano 9 rund badań biegłości (z uwzględnieniem rund dodatkowych). Wyniki zebrano w tabelach 1 i 2. Analizie poddano ogółem

Tabela 1. Zestawienie wyników badań biegłości z wykorzystaniem próbek mleka

Runda badania biegłości	Liczba uczestników	Liczba wyników (ogółem)	Liczba wyników niezgodnych			Liczba laboratoriów z niezadowalającym wynikiem badania biegłości
			Ogółem (%)	M*	R**	
I/2013	69	376	27 (7,2)	11	16	18
II/2013	83	384	6 (1,2)	4	2	4
I/2014	51	507	13 (2,6)	7	6	9
D/2014	130	797	18 (2,6)	7	11	9
I/2015	101	875	14 (1,6)	6	8	9
D/2015	10	57	0	0	0	0
II/2015	118	742	11 (1,5)	8	3	6
D/2016	6	45	0	0	0	0
I/2016	132	1171	13 (1,1)	3	10	7
Razem		4954	102 (2,1)	46	56	

* metody mikrobiologiczne ** metody receptorowe

Tabela 2. Zestawienie wyników badań biegłości z wykorzystaniem innych matryc

Runda badania biegłości	Liczba uczestników	Rodzaj próbki	Liczba wyników	Liczba wyników niezgodnych (%)	Liczba laboratoriów z niezadowalającym wynikiem badania biegłości
I/2013	8	mięso mielone	16	0	0
II/2013	9	żółtka jaj	18	0	0
I/2014	8	woda	30	0	0
D/2014	10	mięso mielone	33	0	0
II/2015	9	ryba (karp)	27	4 (14,8)	3
D/2016	2	ryba (karp)	6	0	0
Razem			130	4	3

5084 wyniki, w tym 4954 wyniki badań próbek mleka, oraz 130 innych matryc. Spośród nadesłanych wyników 106 (2,1%) oceniono jako niezgodne, przy czym 102 z nich dotyczyły próbek mleka (2,0%), a 4 mięsa rybiego, w którym nie stwierdzono oksytetracykliny w stężeniu 200 ppb (3 wyniki) oraz ciprofloksacyny w stężeniu 100 ppb (1 próbka). Wszystkie laboratoria badające mleko posługiwały się komercyjnymi zestawami diagnostycznymi, mikrobiologicznymi i/lub receptorowymi. Wyniki niezgodne w 46 badaniach uzyskano przy użyciu testów mikrobiologicznych, a w 56 receptorowych. W przypadku metod mikrobiologicznych najczęściej pojawiał się problem wyników fałszywie ujemnych, to jest niewykrycia substancji przeciwbakteryjnych w fortyfikowanych próbkach, natomiast w metodach receptorowych zwykle niezgodności dotyczyły wykrywania antybiotyków beta-laktamowych, rzadziej tetracyklin. Analiza oparta na wyjaśnieniach otrzymanych z laboratoriów wskazuje, że podstawową przyczyną uzyskiwania wyników niezgodnych były błędy popełniane przez personel wykonujący badania,

np. niewłaściwa interpretacja wyniku lub błędne wypełnienie karty wyników przez wpisanie innego rezultatu niż faktycznie otrzymany w laboratorium (tab. 1, 2).

Podsumowanie

Analiza wyników badań biegłości w zakresie pozostałości substancji przeciwbakteryjnych, organizowanych przez Krajowe Laboratorium Referencyjne w latach 2013–2016 wskazuje na wysoki poziom kompetencji laboratoriów w tym zakresie. Wyniki niezgodne występowały relatywnie rzadko. Należy zaznaczyć, że uzyskanie wyniku niezadowolającego w badaniach biegłości, o ile nie zdarza się permanentnie, nie dyskwalifikuje laboratorium. Wręcz przeciwnie, może uchronić przed popadaniem w rutynę i, przez podjęcie działań korygujących, popełnianiem błędów w przyszłości.

Piśmiennictwo

1. 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. Dz.U. UE L. 15/1 z 20.01.2010 r.

2. 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.).
3. Rozporządzenie (WE) nr 882/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z 29 kwietnia 2004 r. w sprawie kontroli urzędowych przeprowadzanych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regulami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt. Dz.U. UE L 191/1 z 30.04.2004 r.
4. Ustawa z 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej. Dz.U. z 2.03.2004 r. (z późn. zm.).
5. 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.
6. 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
7. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC Technical Report). *Pure App. Chem.* 2006, **78**, 145–196.

Dr Hanna Różańska,
e-mail: bruna@piwet.pulawy.pl