

Antibiotics residues in food – still actual problem

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

The aim of this article was to present a serious problem of antibiotics residues in food. Antimicrobials, which are used for food animals treatment, may remain in meat, milk and eggs. This represents an important risk for consumers health and the maximum residue limit (MRL), of antibiotics in food of animal origin, must be observed. Here, the current regulations, methods of antibiotics detection in food and efficacious control systems were presented and described.

Keywords: food animals, antibiotics, MLRs.

Niedawne doniesienia medialne ponownie zwróciły uwagę opinii publicznej na problem właściwego stosowania antybiotyków w hodowli i leczeniu zwierząt

Pozostałości antybiotyków w żywności – ciągle aktualny problem

Hanna Różańska, Ewelina Skrzypiec, Jacek Osek

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

gospodarskich oraz występowania ich pozostałości w żywności pochodzenia zwierzęcego. Konsument oczekuje bezpiecznej żywności, to jest takiej, w której nie występują szkodliwe dla zdrowia czynniki biologiczne, chemiczne lub fizyczne, albo ich poziom nie przekracza wartości uznanych za bezpieczne. Ustawa z 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia (1) w art. 3 pkt. 44 definiuje środek spożywczy szkodliwy dla zdrowia lub życia człowieka między innymi taki, który zawiera weterynaryjne produkty lecznicze w ilościach przekraczających dopuszczalne poziomy

lub zabronione, określone w rozporządzeniach Unii Europejskiej.

Zapewnienie bezpiecznej żywności wymaga stałej kontroli szkodliwych substancji chemicznych i biologicznych, ciągłego doskonalenia metod badania i programów kontroli, a przede wszystkim określenia wartości granicznych, bezpiecznych dla człowieka. Unijne procedury określania maksymalnych limitów pozostałości substancji farmakologicznie czynnych w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego zostały określone w rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady (WE)

nr 470/2009 z 6 maja 2009 r. (2), a ich wartości podano w rozporządzeniu Komisji (WE) nr 37/2010 z 22 grudnia 2009 r. (3). Należy zaznaczyć, że termin MRL (maximum residue limit – maksymalny dopuszczalny poziom pozostałości) dotyczy wyłącznie leków dopuszczonych do stosowania u zwierząt, od których pozyskuje się żywność i ma zastosowanie na obszarze Unii Europejskiej. Dla substancji zabronionych do stosowania u zwierząt rzeźnych ma zastosowanie termin MRPL (minimum required performance level), określający minimalne wymagania dla czułości stosowanych metod analitycznych. Podobnie należy rozumieć wymagania określone w przepisach Unii Celnej (Federacja Rosyjska, Kazachstan i Białoruś). Także inne kraje mają swoje, często różne od limitów określonych w UE, wartości dopuszczalnych poziomów pozostałości. Sposób postępowania w przypadku stwierdzenia przekroczeń zawartości leków weterynaryjnych w surowcach i produktach pochodzenia zwierzęcego reguluje w Polsce rozporządzenie ministra rolnictwa i rozwoju wsi z 28 lipca 2006 r. (4).

Za główne przyczyny występowania pozostałości antybiotyków lub, szerzej, substancji przeciwbakteryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego należy uznać nieprzestrzeganie okresów karencji, niewłaściwe dawkowanie, samowolne stosowanie antybiotyków przez hodowców, a także nieodpowiednie używanie preparatów myjąco-dezynfekcyjnych w procesie doju mleka. Należy pamiętać, że okres karencji jest pewną wartością statystyczną, ustaloną na podstawie badań prowadzonych na ograniczonej liczbie zwierząt i zależy od wielu czynników, takich jak: wiek, płeć, masa ciała, stan fizjologiczny zwierzęcia, dawka i sposób podania leku, sposób żywienia itp. W populacji leczonych zwierząt mogą więc znaleźć się takie, które metabolizują lek dłużej, niż wynikałoby to z informacji producenta. Istotne znaczenie ma właściwe dawkowanie. Antybiotyku nie da się podać na zapas, gdyż warunkiem skuteczności terapii jest osiągnięcie odpowiedniego jego poziomu we krwi zwierzęcia przez odpowiedni czas i związane leku ze specyficznymi dla niego receptorami. Nadmiar nie ma znaczenia terapeutycznego, natomiast wydłuża czas usuwania leku z organizmu. Niekiedy zdarza się samodzielne stosowanie antybiotyków przez hodowców, z pominięciem lekarza weterynarii. Liczy się tu aspekt finansowy, ponieważ koszty opieki weterynaryjnej mogą być wysokie. Stwarza to sytuację, kiedy mimo braku jakichkolwiek dowodów leczenia (zapisów), w tkankach zwierzęcia lub w mleku stwierdza się obecność pozostałości. Innym problemem jest właściwe stosowanie preparatów

myjąco-dezynfekcyjnych w procesie doju. Badania wykazały, że jeśli preparaty te stosowane są w zalecanych stężeniach i odpowiednio wypłukane, nie stwarzają ryzyka występowania pozostałości substancji hamujących, jednakże zbyt wysokie koncentracje użytych środków mogą powodować taki problem (5).

Obecność pozostałości substancji o działaniu przeciwbakteryjnym w żywności niesie określone skutki zdrowotne i ekonomiczne. Do najważniejszych zagrożeń należy możliwość wywołania reakcji alergicznych w różnej formie, od wstrząsu anafilaktycznego po atopowe zapalenie skóry. Ryzyko wystąpienia tego rodzaju reakcji nie zależy od dawki. Notowano je w przypadku spożycia żywności zawierającej pozostałości antybiotyków w stężeniach wielokrotnie niższych od przyjętych wartości MRL. Przyjmuje się, że w populacji ludzi 5–10% stanowią osoby nadwrażliwe, zatem nie wolno bagatelizować znaczenia żywności jako źródła alergenów pokarmowych. Alergie najczęściej wywołują antybiotyki beta-laktamowe, rzadko inne (6, 7, 8, 9, 10, 11). W przypadku stężeń antybiotyków występujących w formie pozostałości trudno mówić o ostrej toksyczności, jednakże przyspłaszcza się, że nitrofurany mogą działać rakotwórczo, chloramfenikol może powodować niedokrwistość aplastyczną, natomiast aminoglikozydy mogą działać nefrotoksycznie (7, 10). Ważnym niepożądanym efektem obecności pozostałości antybiotyków w żywności jest możliwość oddziaływania na jakościową i ilościową równowagę mikroflory przewodu pokarmowego oraz generowanie oporności drobnoustrojów (10, 11, 12, 13). Bardzo istotnym problemem może być także wpływ pozostałości substancji przeciwbakteryjnych na wyniki badań mikrobiologicznych surowców i produktów pochodzenia zwierzęcego poprzez hamowanie wzrostu drobnoustrojów patogennych oraz wpływ na ich cechy hodowlane i biochemiczne, co w efekcie może utrudnić lub nawet uniemożliwić właściwą identyfikację zagrożenia mikrobiologicznego, a co za tym idzie ocenę sanitarno-weterynaryjną (14). Surowce mleczne, zawierające pozostałości substancji o działaniu przeciwbakteryjnym, są nieprzydatne do produkcji serów dojrzewających, twarogów i napojów mlecznych fermentowanych, wskutek niszczenia drobnoustrojów wchodzących w skład zakwasów mleczarskich (5, 8, 15). To samo dotyczy wędlin surowych fermentowanych (9, 16). Należy nadmienić, że antybiotyki są w niewielkim stopniu inaktywowane w trakcie kulinarnej obróbki żywności lub mrożenia (7, 17, 18, 19, 20).

Istnieje wiele form i programów kontroli występowania pozostałości antybiotyków w żywności. W Polsce istotną

rolę w tym zakresie spełnia krajowy program kontroli obecności substancji niedozwolonych oraz pozostałości chemicznych, biologicznych i produktów leczniczych u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego, konstruowany i realizowany w oparciu o dyrektywę Rady 96/23/EC z dnia 29 kwietnia 1996 r. (21). Program opracowywany jest co roku przy współudziale Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach i obejmuje m.in. badanie ponad 10 000 próbek w kierunku obecności substancji przeciwbakteryjnych, wykonywane w 7 Zakładach Higieny Weterynaryjnej (Białystok, Gdańsk, Katowice, Łódź, Olsztyn, Poznań i Warszawa) oraz w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym. Analiza wyników uzyskanych w okresie 2005–2012 wskazuje, że liczba próbek dodatnich jest niewielka i sięga ok. 0,3%. Odpowiada to danym z innych krajów europejskich (22). Drugim istotnym elementem nadzoru jest rutynowa działalność Inspekcji Weterynaryjnej. W każdym przypadku podejrzenia występowania pozostałości wskutek, np. niewłaściwego leczenia, inspektorzy Inspekcji Weterynaryjnej mają możliwość pobrania próbek do badań w tym kierunku. W zależności od bieżących potrzeb organizowane mogą też być dodatkowe, regionalne lub ogólnopolskie programy badań. W 2012 r. taki program obejmował jaja kurze, mleko, a obecnie wodę. Bardzo ważnym elementem nadzoru są tzw. badania producenckie, dotyczące zwłaszcza zakładów mleczarskich, zakładów produkujących żywność dla dzieci lub wynikające ze szczególnych wymagań importerów. Niestety, w obowiązującym stanie prawnym wyniki tych badań, których wykonuje się kilkaset tysięcy rocznie, nie zawsze są udostępniane Inspekcji Weterynaryjnej, co wpływa na szersze prowadzenie oceny ryzyka w tym zakresie.

Wykrywanie pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w żywności wykonywane jest metodami przesiewowymi (skriningowymi) oraz metodami potwierdzającymi. Te pierwsze charakteryzują się niskim kosztem i krótkim czasem badania, co pozwala na analizę dużej liczby próbek i wyselekcjonowanie próbek potencjalnie niezgodnych. Z reguły nie jest do tego potrzebne jakieś specjalnie kosztowne wyposażenie laboratorium. Mankamentem jest fakt, że wynik badania jest zwykle tylko jakościowy, co oznacza, że stwierdzono występowanie, niekiedy nawet konkretnych, substancji o działaniu przeciwbakteryjnym, ale nie wiadomo (z wyjątkiem substancji zakazanych, np. chloramfenikolu lub nitrofurany, których żadna ilość nie może być tolerowana), czy dopuszczalne stężenie (MRL) zostało przekroczone. Dlatego

też, dla podjęcia decyzji administracyjnej, niezbędne jest zastosowanie metod instrumentalnych, pozwalających na pełną identyfikację i określenie stężenia substancji. Zwykle w charakterze metod potwierdzających stosuje się różne techniki chromatograficzne w połączeniu ze spektrometrią mas (23).

Spośród metod skringowych najczęściej stosuje się techniki mikrobiologiczne, w których wykorzystywane jest zjawisko hamowania wzrostu wyselekcjonowanych drobnoustrojów (szczepów testowych) przez substancje przeciwbakteryjne obecne w badanym materiale (24, 25). Metody mikrobiologiczne mogą mieć formę płytkową, probówkową lub mikroplatkową. W testach płytkowych obecność substancji przeciwbakteryjnych uwidacznia się powstaniem, po inkubacji, stref zahamowania wzrostu wokół badanego materiału, który może być nakładany na pożywkę agarową w różny sposób, w formie wycinków tkanek, nasączonych w nich krążków lub nakropiony do studzienek. Przykładem płytkowej metody mikrobiologicznej jest klasyczna europejska metoda 4-płytkowa, opracowana już w 1980 r., w której wykorzystywane są 2 szczepy testowe: *Bacillus subtilis* i *Kocuria rhizophila*, oraz 4 pożywki o zróżnicowanym składzie i pH. W Polsce do badania tkanek zwierzęcych i jaj aktualnie stosowana jest metoda 5-płytkowa, opracowana w instytucie RIKILT w Wageningen, w Holandii (26). Wykorzystuje się w niej, jako szczepy testowe, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Kocuria rhizophila* i *Yersinia ruckeri* oraz 5 płytek z pożywkami o różnym składzie i pH. Zróżnicowanie szczepów testowych, pożywek i warunków inkubacji pozwala na wstępne rozróżnienie beta-laktamów, tetracyklin, aminoglikozydów, makrolidów, chinolonów i sulfonamidów. Należy pamiętać, że uzyskany wynik jest tylko wskazówką, a ewentualne rezultaty dodatnie muszą być potwierdzone metodami instrumentalnymi (23).

W przemyśle mleczarskim duże znaczenie mają szybkie testy mikrobiologiczne (w formie probówkowej lub mikroplatkowej), wykorzystujące *Geobacillus stearothermophilus*, jako szczep testowy. Drobnoustroj ten szybko rośnie w temperaturze 64°C, a wyniki otrzymuje się po 2,5–3 godzinach, co jest bardzo istotne przy ocenie surowca mlecznego. W handlu dostępnych jest wiele tego rodzaju testów, a jednym z przykładów jest stosowany w Polsce w badaniach urzędowych Delvotest. Inną grupę szybkich testów wykorzystywanych w przemyśle mleczarskim stanowią testy receptorowe, ukierunkowane na jedną, dwie lub nawet 4 grupy substancji. Zalecane tych metod jest bardzo krótki, z reguły

kilkuminutowy, czas badania oraz zwykle bardzo wysoka czułość (24).

Wszystkie metody stosowane do wykrywania pozostałości antybiotyków w żywności pochodzenia zwierzęcego muszą spełniać określone wymagania, zawarte w decyzji Komisji 2002/657/WE z 14 sierpnia 2002 r. (27), a także być właściwie zwalidowane, to jest sprawdzone pod kątem przydatności w konkretnym laboratorium. Wymagany zakres walidacji jest również określony we wspomnianej decyzji. W odniesieniu do metod skringowych wymagania dotyczące walidacji zawarte są też w wytycznych Wspólnotowych Laboratoriów Referencyjnych z 2010 r. (28).

W Polsce, zgodnie z ustawą o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt (29), wszystkie dostępne testy, używane do wykrywania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych, powinny znaleźć się w wykazie wyrobów do diagnostyki *in vitro*, prowadzonym przez Głównego Lekarza Weterynarii. Warunkiem jest uzyskanie pozytywnej opinii Krajowego Laboratorium Referencyjnego, to jest Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Wykaz ten dostępny jest na stronie internetowej Głównego Inspektora Weterynarii w zakładce: diagnostyka weterynaryjna.

Podsumowując, należy stwierdzić, że chociaż niebezpieczeństwo związane z występowaniem pozostałości antybiotyków czy innych substancji o działaniu przeciwbakteryjnym w żywności jest znikome, to nie może być lekceważone. Substancje te są i będą stosowane u zwierząt hodowlanych, ale rozsądne ich używanie, połączone z odpowiednią edukacją lekarzy weterynarii i samych hodowców, znacznie ogranicza potencjalne zagrożenie dla konsumentów (30, 31).

Piśmiennictwo

1. Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia. Tekst jednolity. *Dz.U.* 2009.98.817.
2. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 470/2009 z dnia 6 maja 2009 r. ustanawiające wspólnotowe procedury określania maksymalnych limitów pozostałości substancji farmakologicznie czynnych w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej* L152/11, 16.6.2009.
3. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 37/2010 z dnia 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 Wspólnot Europejskich* L15/1 20.1.2010.
4. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 20 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.
5. Mullan W.M.A.: Inhibitors in milk. 2009. www.dairy-science.info/inhibitors.htm.
6. Doyle M.E.: Veterinary drug residues in processed meats – potential health risk. FRI Briefings. Food Research Institute, University of Wisconsin, Madison, March 2006.

7. Movassagh M.H., Karami A.R.: Beta-lactam antibiotics residues in pasteurised milk by Beta Star test in the north west region of Iran. *ARPN J. Agri. Biol. Sci.* 2011, 6, 7-10.
8. Khaskheli M., Malik R.S., Arain M.A., Soomro A.H., Arain H.H.: Detection of β -lactam antibiotic residues in market milk. *Pak. J. Nutr.* 2008, 7, 682-685.
9. Holley R.A., Blaszyk M.: Antibiotic challenge of meat starter cultures and effects upon fermentations. *Food Res. Int.* 1998, 30, 513-522.
10. Nisha A.R.: Antibiotic residues – a global health hazard. *Vet World.* 2008, 1, 375-377.
11. Tollefson L.: Antibiotic use in food animals: controlling the human health impact. *J. AOAC Int.* 2000, 83, 245-254.
12. Kaur R., Pathania R.: Drug resistance in food animals – a public health concern. *Online Vet. J.* 2010, 5, Article 48.
13. O’Keeffe M., Kennedy O.: Residues – a food safety problem? *J. Food Safety* 1998, 18, 297-319.
14. Różańska H.: Wpływ pozostałości antybiotyków na wyniki badań mikrobiologicznych mięsa. Praca doktorska. Państwowy Instytut Weterynaryjny, Puławy, 1999.
15. Adetunji V.O.: Effects of processing on antibiotic residues (streptomycin, penicillin-G and tetracycline) in soft cheese and yoghurt processing lines. *Pak. J. Nutr.* 2011, 10, 792-795.
16. Kjeldgaard J., Cohn M.T., Casey P.G., Hill C., Ingmer H.: Residual antibiotics disrupt meat fermentation and increase risk of infection. *mBio.* 2012, 3: doi:10.1128/mBio.0019-12.
17. Movassagh M.H.: Detection of beta lactam antibiotics residues in Iranian ultra high temperature milk by Beta Star test. *Ann. Biol. Res.* 2011, 2, 95-98.
18. Javadi A., Mirzale H., Khatibi S.A.: Effect of roasting, boiling and microwaving cooking method on sulfadiazine + trimetoprim residues in edible tissues of broiler by microbial inhibition method. *Afr. J. Microb. Res.* 2011, 5, 96-99.
19. Paszkiewicz W.: Jakość mleka pasteryzowanego znajdującego się w handlu. *Med. Weter.* 2009, 65, 131-133.
20. Shareef A.M., Jamel Z.T., Yonis K.M.: Detection of antibiotic residues in stored poultry products. *Iraqi. J. Vet. Sci.* 2009, 23, 45-48.
21. Dyrektywa Rady 96/23/EC z dnia 29 kwietnia 1996 r. o środkach przyjętych dla monitorowania pewnych substancji i ich pozostałości u zwierząt żywych i w produktach zwierzęcego pochodzenia. *Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich* L125, 23.5.1996.
22. European Food Safety Authority. Technical Report of EFSA. Report for 2009 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. Supporting Publications 2011, 158.
23. Posytniak A.: Występowanie antybiotyków w żywności – aspekty prawne i analityczne kontroli pozostałości. *Życie Wet.* 2011, 86, 717-720.
24. Myllyniemi A.-L.: Development of microbiological methods for the detection and identification of antimicrobial residues in meat. Academic Dissertation. University of Helsinki, Finland, 2004.
25. Pikkemaat M.G.: Microbial screening methods for the detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 395, 893-905.
26. Pikkemaat M.G., Rapallini M.L.B.A., Zuidema T., Elferink J.W.A., Oostra-van Dijk S., Driessen-van Lankveld W.D.M.: Screening methods for the detection of antibiotic residues in slaughter animals: comparison of the European Union Four-Plate Test, the Nouis Antibiotic Test and the Premi[®] Test (applied to muscle and kidney). *Food Addit. Contam. A.* 2010, 28, 26-34.
27. Decyzja Komisji 2002/657/WE z dnia 14 sierpnia 2002 r. wykonująca Dyrektywę Rady 96/23/WE dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji. *Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich* L221, 17.08.2002.
28. Community Reference Laboratories (CRLs) 20/1/2010. Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (Initial validation and transfer).
29. Ustawa z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt. Tekst jednolity. *Dz. U.* 2010.78.513.
30. Muhammad F., Akhtar M., Zia-Ur-Rahman, Javed I., Anwar I.: Role of veterinarians in providing residue-free animal food. *Pak. Vet. J.* 2009, 29, 42-46.
31. Pejsak Z., Trusczyński M.: Racjonalna antybiotykoterapia u zwierząt. *Życie Wet.* 2013, 88, 359-361.

Dr Hanna Różańska, Państwowy Instytut Weterynaryjny, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: bruna@piwet.pulawy.pl