

Metody przesiewowe wykrywania pozostałości antybiotyków w żywności

Hanna Różańska, Aleksandra Lewtak-Piłat

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

Pojęcie bezpieczna żywność oznacza, że jest ona wolna od zagrożeń biologicznych, chemicznych i fizycznych lub ich poziom jest ograniczony do zgodnego z przepisami międzynarodowymi, nie-stwarzającego niebezpieczeństwa dla konsumenta. Zgodnie z definicją Codex Alimentarius zagrożeniem jest każdy czynnik biologiczny, chemiczny lub fizyczny w samej żywności lub w paszy, który potencjalnie może mieć negatywny wpływ na zdrowie człowieka. Wśród tych czynników należy wymienić między innymi pozostałości leków weterynaryjnych (w tym antybiotyków) oraz zanieczyszczenia chemiczne.

Różnego rodzaju zagrożenia mogą znaleźć się w żywności na każdym etapie jej produkcji i przetwarzania (1, 2, 3). Znaczenie czynników chemicznych w żywności nie jest tak spektakularne, jak czynników mikrobiologicznych. Ich obecność w żywności nie daje z reguły natychmiastowych objawów chorobowych, z pewnością jednak nie pozostają obojętne dla zdrowia konsumenta. Z tego względu kontrola obecności substancji chemicznych w żywności pozostaje jednym z głównych zadań zarówno służb inspekcyjnych, jak i samych producentów żywności, którzy zgodnie z literą i duchem prawa ponoszą bezpośrednią odpowiedzialność za jej jakość zdrowotną (4). Ustawa z 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia (5) za środek spożywczy szkodliwy lub groźny dla zdrowia lub życia człowieka uznaje środek spożywczy, którego spożycie w warunkach normalnych i zgodnie z przeznaczeniem może spowodować negatywne skutki dla zdrowia lub życia człowieka, a w szczególności (pkt 44b), jeśli zawiera m.in. weterynaryjne produkty lecznicze w ilościach przekraczających dopuszczalne poziomy lub zabronione, określone w rozporządzeniach Unii Europejskiej. Zasady ustalania najwyższych dopuszczalnych limitów pozostałości określa rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 470/2009 z 6 maja 2009 r. (6). Przyjęte wartości MRL, tj. najwyższych dopuszczalnych stężeń pozostałości, wyrażonych w $\mu\text{g}/\text{kg}$, ustalonych w oparciu o ocenę ryzyka dla konsumentów, są określone w rozporządzeniu Komisji (UE) nr 37/2010 z 22 grudnia 2009 r. (7). Postęp wiedzy, rozwój możliwości analitycznych, a także trudności

w interpretacji wyników badań, a często wątpliwości co do zasadności podejmowanych decyzji administracyjnych wymusiły konieczność zmiany podejścia do pojęcia MRL i sposobów jego ustalania. Regulacja Parlamentu Europejskiego nr 470/2009 zakłada po pierwsze, że u zwierząt mogą być stosowane wyłącznie substancje i preparaty posiadające stosowną autoryzację (zatwierdzenie), po drugie obok definicji MRL wprowadza też pojęcie tzw. poziomu działania, tj. poziom wymagający podjęcia decyzji administracyjnej, za którego ustalenie byłoby odpowiedzialne wspólnotowe laboratorium referencyjne (CRL).

Pozostałości antybiotyków lub innych substancji o działaniu przeciwbakteryjnym mogą znaleźć się w żywności z wielu powodów (3, 8, 9). Wśród nich należy wymienić:

- nieprzestrzeganie okresów karencji;
- niewłaściwe dawkowanie;
- samowolne stosowanie antybiotyków przez właścicieli zwierząt;
- celowe dodawanie antybiotyków lub innych środków o działaniu przeciwbakteryjnym do mleka;
- niewłaściwe stosowanie środków myjąco-dezynfekujących w procesie doju.

Za najważniejsze skutki zdrowotne związane z występowaniem pozostałości substancji przeciwbakteryjnych uważa się możliwości wystąpienia reakcji alergicznych, generowanie oporności drobnoustrojów, zaburzenia ilościowego i jakościowego składu naturalnej mikroflory jelitowej oraz niebezpieczeństwa związane z niewłaściwą oceną sanitarno-weterynaryjną.

Wielu autorów donosiło o wystąpieniu reakcji alergicznych po spożyciu żywności zawierającej pozostałości antybiotyków, głównie β -laktamowych, rzadziej innych, jak makrolidy czy sulfonamidy. Jest to zjawisko tym groźniejsze, że niezależne od koncentracji alergenu. Notowano dla przykładu przypadek wystąpienia wstrząsu anafilaktycznego u dziecka po spożyciu mleka zawierającego 0,00001 j.m. penicyliny w ml, a więc w koncentracji znacznie poniżej przyjętej wartości MRL, ustalonej na 4 ppb (0,004 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Należy przy tym zaznaczyć, że jakiegokolwiek procesy technologiczne, w tym pasteryzacja lub sterylizacja, tylko w nieznacznym stopniu wpływają na poziom pozostałości, przy czym nie wpływają na ich zdolności alergenne.

Screening methods for the determination of antibiotic residues in food

Różańska H., Lewtak-Piłat A., Department of Hygiene of Food of Animal Origin, National Veterinary Research Institute, Pulawy

Antimicrobial residues in food of animal origin are very important risk factors for the public health. According to the requirements of the Council Directive 96/23, antibacterial agents are included into national program of the control of residues in veterinary medical products, in live animals and in products of animal origin. The aim of this paper was to present current regulations concerning the antibiotic residues survey and control and the most useful screening methods for their detection in food.

Keywords: food, antibiotic residues, detection.

Co więcej, pozostają one aktywne pod tym względem nawet wtedy, kiedy nie wykazują już aktywności przeciwbakteryjnej, a zatem nie mogą być wykrywane powszechnie stosowanymi metodami mikrobiologicznymi. Inny rodzaj zagrożenia dla konsumenta wiąże się z możliwym wpływem pozostałości antybiotyków na delikatną równowagę naturalnej mikroflory jelitowej. Wiele uwagi poświęca się od lat problemowi narastającej oporności drobnoustrojów na antybiotyki. Nie można wykluczyć pewnego działania pozostałości antybiotyków w przewodzie pokarmowym. Dowiedziano również, że pozostałości antybiotyków lub innych substancji o podobnym działaniu mogą, przez hamowanie wzrostu drobnoustrojów, prowadzić do uzyskania fałszywych wyników badań mikrobiologicznych surowców i produktów pochodzenia zwierzęcego, co może prowadzić do ważnych z epidemiologicznego punktu widzenia przeoczeń i niewłaściwej oceny sanitarno-weterynaryjnej.

Pozostałości substancji o działaniu przeciwbakteryjnym mogą w bardzo znaczący sposób wpływać na przydatność technologiczną surowca mlecznego, a zatem stać się przyczyną wymiernych strat ekonomicznych. Dowiedziono m.in., że już w stężeniach odpowiadających wartościom MRL lub niższych, przez hamowanie wzrostu mikroorganizmów wchodzących w skład kultur starterowych, pozostałości takie mogą utrudniać lub wręcz uniemożliwiać produkcję napojów mlecznych fermentowanych, twarogów i serów dojrzewających (1, 8).

Opisane wyżej potencjalne zagrożenia wynikające z obecności pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w żywności powodują konieczność systematycznej kontroli surowców i produktów pochodzenia zwierzęcego w tym zakresie,

sprawowanej przez Inspekcję Weterynaryjną w ramach urzędowego nadzoru nad produkcją żywności, a także przez same zakłady sektora spożywczego. Badania takie są też elementem składowym krajowego programu badań kontrolnych substancji niedozwolonych, pozostałości chemicznych, biologicznych, produktów leczniczych i skażeń promieniotwórczych u zwierząt, w ich wydzielinach i wydalinach, w tkankach i narządach zwierząt, w produktach pochodzenia zwierzęcego, w wodzie przeznaczonej do pojenia zwierząt i w środkach żywienia zwierząt. Program ten jest konstruowany i realizowany zgodnie z wytycznymi dyrektywy Rady 96/23/EC z 29 kwietnia 1996 r. o środkach przyjętych do monitorowania pewnych substancji i ich pozostałości u zwierząt żywych i w produktach pochodzenia zwierzęcego (10). Najogólniej ujmując dyrektywa wyróżnia dwie grupy substancji. W grupie I znajdują się związki o działaniu anabolicznym oraz substancje, na stosowanie których nie ma urzędowego zezwolenia. W grupie II znajdują się z kolei substancje przeciwbakteryjne, w tym sulfonamidy i fluorochinolony (grupa B1), inne leki weterynaryjne (grupa B2) oraz inne substancje i czynniki skażające środowisko (B3). Prowadzenie monitorowania substancji niedozwolonych, pozostałości chemicznych, biologicznych, produktów leczniczych i skażeń promieniotwórczych u zwierząt, w ich wydzielinach i wydalinach, w tkankach lub narządach zwierząt, w produktach pochodzenia zwierzęcego, w wodzie przeznaczonej do pojenia oraz w środkach żywienia zwierząt jest zadaniem Inspekcji Weterynaryjnej (ustawa z 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej, art. 3 pkt 2.6; 11). Szczegółowe zasady prowadzenie badań monitoringowych regulują instrukcje głównego lekarza weterynarii (aktualna: nr GIWhig-520-10/09 z 10 marca 2009 r.) w sprawie zakresu i sposobu realizacji krajowego programu badań kontrolnych substancji niedozwolonych, pozostałości chemicznych, biologicznych, produktów leczniczych i skażeń promieniotwórczych u zwierząt, w produktach pochodzenia zwierzęcego oraz w wodzie do pojenia zwierząt. 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. w sprawie sposobu postępowania z substancjami niedozwolonymi, pozostałościami chemicznymi, produktami leczniczymi i skażeniami promieniotwórczymi u zwierząt w produktach pochodzenia zwierzęcego.

Istnieje wiele metod wykrywania i oznaczania pozostałości substancji

przeciwbakteryjnych w surowcach i produktach pochodzenia zwierzęcego, wodzie czy środkach żywienia zwierząt. Najogólniej można je podzielić na:

- metody przesiewowe, inaczej skринingowe, pozwalające wykrywać lub niekiedy i oznaczać jedną lub więcej grup substancji;
- metody postskринingowe, ilościowe lub półilościowe;
- metody potwierdzające, oparte z reguły na chromatografii gazowej lub cieczowej ze spektrometrią mas.

Wybór metody analitycznej zależy przede wszystkim od kierunku badania, ale także od zamierzonego celu. Należy jednak pamiętać, że nie ma metod uniwersalnych, pozwalających w jednej analizie wykrywać wszystkie możliwe rodzaje substancji przeciwbakteryjnych, w tym antybiotyków, na satysfakcjonujących poziomach. Różnorodność tych substancji, ich cech fizykochemicznych i biologicznych jest bowiem ogromna. Wszystkie stosowane metody analityczne muszą jednak spełniać określone wymagania, zgodnie z decyzją Komisji 2002/657/WE z 14 sierpnia 2002 r. wykonującą dyrektywę Rady 96/23/WE dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji (notyfikowana jako dokument nr C(2002)3044 (12).

Dokument ten wskazuje, że metody odnośnie do substancji zakazanych do stosowania u zwierząt, takich jak chloramfenikol czy nitrofurany, muszą charakteryzować się odpowiednią czułością, tzw. wymaganym minimalnym limitem oznaczalności (MRPL). Dla chloramfenikolu wynosi on 0,3 µg/kg, natomiast dla nitrofuranów – 1,0 µg/kg. W przypadku innych substancji decydujące znaczenie ma wykrywalność co najmniej na poziomie MRL. Nie zawsze może to być osiągnięte. Zasady walidacji metod skринingowych opisano w dokumencie Wspólnotowych Laboratoriów Referencyjnych ds. Pozostałości (13).

Jak wspomniano powyżej, o wyborze metody, oprócz kierunku badania decyduje także jego cel. W przypadku regularnych badań kontrolnych (np. wyżej opisany program kontroli pozostałości) możliwe jest zastosowanie od razu metody specyficznej dla poszukiwanego związku lub grupy związków, a czas badania nie odgrywa zasadniczej roli. Inaczej jest w przypadku konieczności szybkiej oceny partii surowca lub produktu. W takim wypadku z reguły używa się skринingowych metod jakościowych, dających odpowiedź na pytanie, czy badana próbka zawiera „jakiś” substancje przeciwbakteryjne, bez precyzyjnego ustalenia ich rodzaju i koncentracji. Ponieważ metody skринingowe pozwalają wykrywać poszczególne substancje przeciwbakteryjne na poziomach MRL lub wyższych, w każdym przypadku

wynik dodatni oznacza przekroczenie dopuszczalnej wartości. W przypadkach wątpliwych lub spornych należałoby zastosować potwierdzającą metodę specyficzną. Poza czasem badania istotne znaczenie ma jego koszt, w przypadku metod skринingowych relatywnie niski, co nie jest bez znaczenia przy dużej liczbie wykonywanych analiz.

Spośród metod przesiewowych istotną rolę odgrywają metody mikrobiologiczne, które wykorzystują zasadę hamowania wzrostu wyselekcjonowanych drobnoustrojów (tzw. szczepy testowe) w określonym podłożu agarowym przez substancje przeciwbakteryjne zawarte w badanym materiale. Wynik pozytywny manifestuje się powstaniem po inkubacji stref zahamowania wzrostu szczepów testowych wokół próbki badanego materiału (metody płytkowe) lub brakiem zmiany barwy pożywki testowej (metody próbkowe) (2, 3, 9, 14). Drobnoustrojami testowymi są wyselekcjonowane szczepy bakteryjne, cechujące się wysoką, stabilną wrażliwością na określone substancje. Szczepy te pochodzą z reguły z renomowanych kolekcji drobnoustrojów, takich jak ATCC (American Type Culture Collection), czy BGA (Bundesgesundheitsamt). W różnych metodach stosuje się rozmaite kombinacje: pożywka – szczep testowy. Przykładem stosowanej w Polsce mikrobiologicznej metody skринingowej jest tzw. europejska metoda 4-płytkowa. W tej metodzie wykorzystuje się pożywki o pH 6,0; 7,2 + trimetoprim i 8,0 z *Bacillus subtilis* BGA oraz 8,0 z *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Ze względu na swoją zróżnicowaną budowę chemiczną oraz właściwości fizykochemiczne poszczególne związki różnie dyfundują, w zależności od składu pożywki i jej pH, co pozwala na wstępne rozróżnienie, z czym możemy mieć do czynienia. I tak β-laktamy i tetracykliny dyfundują najlepiej przy pH 6,0, dając w tych warunkach największe strefy hamowania wzrostu. Z kolei aminoglikozydy i makrolidy dają największe strefy hamowania na płytkach z pożywką o pH 8,0. W rzeczywistości zależność ta jest orientacyjna, ponieważ rzadko są obecnie stosowane jednoskładnikowe preparaty antybiotykowe, zatem najczęściej strefy pojawiają się na kilku lub nawet wszystkich płytkach. Tak więc przy zastosowaniu tego rodzaju metod otrzymujemy najczęściej wynik: „tak” – coś jest, lub „nie” – nic nie ma.

Podejmowano wiele prób identyfikacji i oznaczania ilościowego pozostałości substancji przeciwbakteryjnych przy użyciu metod mikrobiologicznych, wykorzystując specyficzną wrażliwość pewnych szczepów testowych na określone substancje lub ich oporność na nie lub podejmując próby „wyłączenia” aktywności

pewnych substancji przez związki je rozkładające (β -laktamy – penicylina, sulfonamidy – PABA; 2, 9).

W sytuacji, kiedy znana jest tożsamość analizowanej substancji, metody mikrobiologiczne mogą niekiedy pozwolić na jej oznaczenie ilościowe w badanym materiale biologicznym. W tym celu, z użyciem odpowiedniego wzorca, sporządza się krzywą standardową i z niej, na podstawie wielkości stref hamowania wzrostu odczytuje koncentrację związku w próbce.

Istotne znaczenie mają metody mikrobiologiczne przeznaczone do badania mleka, wykorzystujące najczęściej *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C.953 jako szczep testowy. Drobnoustrój ten szybko rośnie w temperaturze 63–65°C, zatem, w przeciwieństwie do wyżej opisanych metod płytkowych (inkubacja 18–24 godziny), wynik otrzymuje się już po 2,5–3 godzinach. W przypadku mleka, które musi być szybko zakwalifikowane do przetwórstwa, jest to szczególnie istotne. Mikrobiologiczne testy do mleka oferowane są najczęściej w postaci komercyjnie dostępnych zestawów, w formie probówkowej lub w formie mikropłytek. Pożywka agarowa zawiera wskaźnik barwny. Wynik ujemny świadczy o braku hamowania wzrostu szczepu testowego i przejawia się zakwaszeniem pożywki i zmianą jej barwy z fioletowoniebieskiej na żółtą. W przypadku wyniku dodatniego barwa pożywki pozostaje niezmienną. Przykładami takich testów są Deltotest, BR-Test, Polutest, Premi-Test (można nim badać także inny materiał biologiczny) czy Eclipse (3, 15).

Mikrobiologiczne metody stosowane do wykrywania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych obarczone są pewnym ryzykiem wystąpienia wyników fałszywie dodatnich, spowodowanych obecnością substancji o naturalnym działaniu hamującym, takich jak lizozym (nerki), laktoperoksydazy mleka, owoalbuminy jaja i inne. Dla uniknięcia takich niepożądanych reakcji nerek nie powinno się mrozić, ponadto należy badać ich warstwę korową. Nie powinno się również badać mleka od pojedynczych krów, a mleko zbiorcze z gospodarstwa (1). W przypadku jaj należy badać żółtko, dokładnie oddzielając je od białek. Niekiedy te nieswoiste reakcje można wyeliminować stosując ogrzewanie próbki. Naturalne inhibitory, w przeciwieństwie do antybiotyków, rozkładają się pod wpływem wysokiej temperatury.

Inną grupę testów przeznaczonych do badania mleka stanowią testy receptorowe, oparte na wiązaniu antybiotyków ze specyficznymi receptorami znajdującymi się na pasku bibulowym, wzdłuż którego dyfunduje mleko. Na rynku polskim występują między innymi Twinsensor BT, Beta-Star,

CHARM ROSA MRL BL/TET, pozwalające wykrywać równocześnie β -laktamy i tetracykliny. Prowadzone są prace nad poszerzeniem spektrum substancji, które mogłyby być wykrywane przy użyciu tego rodzaju testów. Ich największą zaletą z punktu widzenia zakładu mleczarskiego jest krótki, kilkuminutowy czas oczekiwania na wynik, wadą zaś – zbyt mała gama wykrywanych substancji (3, 15).

Większość testów przesiewowych przeznaczonych do badania mleka jest, jak wyżej wspomniano, oferowana komercyjnie. Mimo podobieństw, różnią się one, niekiedy istotnie, pod względem czułości w odniesieniu do poszczególnych substancji. W związku z tym, że niezależnie od oceny technologicznej przydatności surowca mlecznego, celem nadrzędnym jest ochrona zdrowia konsumenta, słuszne wydaje się, aby testy te podlegały jakiejś formie kontroli i rejestracji, opartej o opinię krajowego laboratorium referencyjnego (1, 3, 8, 13, 16). Zasady wprowadzania do obrotu i używania wyrobów do diagnostyki *in vitro* stosowanych w medycynie weterynaryjnej określa ustawa 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt (17).

Piśmiennictwo

- Mullan W.M.A.: Inhibitors in milk. www.dairyscience.info/inhibitors.htm 2004.
- Myllyniemi A.-L.: *Development of microbiological methods for the detection and identification of antimicrobial residues in milk*. Academic Dissertation. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, 2004.
- Różańska H.: Szybkie metody wykrywania substancji przeciwbakteryjnych w mleku. *Przegląd Mleczarski*, 2010, 10, 10, 18-21.
- Rozporządzenie (WE) Nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności. *Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich* L31/1 1.2.2002.
- Ustawa z 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia. Tekst jednolity. *Dz.U.* 2009.98.817.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 470/2009 z dnia 6 maja 2009 r. ustanawiające wspólnotowe procedury określania maksymalnych limitów pozostałości w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej* L152/11, 16.6.2009.
- Rozporządzenie Komisji (WE) 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.
- Scippo M.-L.: European legislation on methods for antibiotics detection in milk. *Workshop on European legislation and methods for antibiotics detection in milk*. Beograd, 22-Sep-2008.
- USDA Microbiology Laboratory Guidebook. *Bioassay for the Detection, Identification and Quantitation of Antimicrobial Residues in Meat and Poultry Tissue*. Revision 02, 5/2/07.
- Dyrektywa Rady 96/23 z dnia 29 kwietnia 1996 r. w sprawie środków monitorowania niektórych substancji i ich pozostałości u żywych zwierząt i w produktach pochodzenia zwierzęcego. *Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich* L125, 23.5.1996.
- Ustawa z 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej. Tekst jednolity. *Dz.U.* 2010.112.744.

- Decyzja Komisji z dnia 14 sierpnia 2002 r. (2002/657/WE) wykonująca Dyrektywę Rady 96/23/WE dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji. *Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich* L.221 17.8.2002.
- Community Reference Laboratories (CRLs) 20/1/2010. *Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (Initial validation and transfer)*.
- Pikkemaat M.G.: Microbial screening methods for the detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 395, 893-905.
- Zvirauskiene R., Šalomskiene J.: An evaluation of different microbial and rapid tests for determining inhibitors in milk. *Food Control* 2007, 18, 541-547.
- Kijak P.J.: FDA validates rapid screening tests for antibiotics in milk. *FDA Veterinarian Newsletter* 2004, 19, no 4.
- Ustawa z 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt. Tekst jednolity. *Dz.U.* 2010.78.513.

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