

Substancje przeciwbakteryjne w paszach – organizacja urzędowej kontroli i metody badań

Monika Przeniosło-Siwczyńska, Krzysztof Kwiatek

z Zakładu Higieny Pasz Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Pojęcie „substancje przeciwbakteryjne” obejmuje antybiotyki, sulfonamidy i chinolony zgodnie z dyrektywą Rady 96/23/EC z dnia 29 kwietnia 1996 r. (1). Dyrektywa ta wyodrębnia dwie grupy substancji: grupę A, w której znajdują się związki o działaniu anabolicznym oraz substancje, na stosowanie których nie ma urzędowego zezwolenia, w tym nitrofurany i chloramfenikol oraz grupę B, w której jedną z podgrup (B1) stanowią właśnie substancje przeciwbakteryjne (antybiotyki, sulfonamidy i chinolony obok innych leków weterynaryjnych (B2) i substancji skażających środowisko (B3). Substancje przeciwbakteryjne są zaliczane do zagrożeń chemicznych, które mogą występować w paszy lub żywności i mieć negatywny wpływ na zdrowie człowieka. Występowanie leków weterynaryjnych, w tym antybiotyków lub ich pozostałości, w paszach lub żywności nie pozostaje obojętne dla zdrowia zwierząt oraz konsumentów. Z tego względu kontrola występowania substancji przeciwbakteryjnych w paszach jest jednym z głównych zadań służb inspekcyjnych, jak i samych producentów.

W przeszłości antybiotyki, jako tzw. antybiotykowe stymulatory wzrostu (ASW), mogły być stosowane w żywieniu zwierząt jako dodatki paszowe. Zyskały one dużą popularność w produkcji zwierzęcej, ponieważ ich dodatek do paszy powodował wzrost przyrostów masy ciała przy zmniejszeniu dawek pokarmowych, polepszał stopień wykorzystania paszy poprzez polepszenie wchłaniania składników pokarmowych, a jednocześnie stanowił profilaktykę chorób powodujących największe straty w hodowli. Jednakże powszechne i nadmierne stosowanie antybiotyków w wielu obszarach, nie tylko w hodowli zwierząt, często nieuzasadnione, a także nieodpowiednie dawkowanie oraz stosowanie w celach pozaterapeutycznych stało się przyczyną wielu problemów. Najpoważniejszym z nich okazało się zjawisko lekooporności i stale rosnąca liczba drobnoustrojów opornych na wiele antybiotyków (2). Należy mieć na uwadze, że stosowanie przez kilkadziesiąt lat antybiotyków u zwierząt mogło mieć związek z antybiotykoopornością bakterii występujących u ludzi. Jako przyczynę tego należy wskazać globalny obrót zwierzętami,

wydalany przez nie kał i stosowany w produkcji roślinnej nawóz oraz surowce i żywność pochodzenia zwierzęcego zanieczyszczona antybiotykoopornymi bakteriami oraz uwalnianymi z bakterii genami determinującymi antybiotykooporność. Oporne na antybiotyki bakterie mogą być przekazane przez zwierzęta ludziom poprzez łańcuch pokarmowy albo podczas kontaktów bezpośrednich, co może być przyczyną rozwoju zakażeń opornych na leczenie antybiotykami (3, 4). W związku z tymi problemami poszczególne kraje Unii Europejskiej stopniowo zaczęły odstępować od stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu w celu ochrony zdrowia konsumentów, w wyniku czego od 1 stycznia 2006 r. obowiązuje całkowity zakaz stosowania antybiotyków jako dodatków paszowych (5).

Wspomniana dyrektywa 96/23 nakłada obowiązek prowadzenia skutecznego i jednolitego systemu monitorowania oraz nadzoru w odniesieniu do stosowania nielegalnych substancji w produkcji zwierzęcej. System ten musi obejmować wykrywanie i monitorowanie substancji mających działanie hormonalne i tyreostatyczne, ale również innych substancji używanych w hodowli zwierząt w celach zootechnicznych lub leczniczych, a które mogą okazać się niebezpieczne dla konsumentów ze względu na ich pozostałości. Zatem ustalono, że proces produkcyjny zwierząt i podstawowe produkty pochodzenia zwierzęcego muszą być monitorowane w celu wykrywania obecności pozostałości i substancji wymienionych w załączniku I dyrektywy 96/23 u zwierząt żywych, ich wydalinach, płynach ustrojowych i tkankach, w produktach pochodzenia zwierzęcego, paszach oraz w wodzie przeznaczonej do pojenia zwierząt (6).

Prowadzenie skutecznej i sprawnej kontroli nielegalnego stosowania substancji niedozwolonych wymaga dysponowania metodami przesiewowymi i potwierdzającymi, które są czułe, specyficzne, wiarygodne i odporne. Prowadzenie urzędowej kontroli pasz wymaga opracowania i zwalidowania właściwych metod, które wdrożone do praktyki laboratoryjnej zapewnią realizację przyjętej strategii kontroli niedozwolonych substancji stosowanych

Antibacterial substances in feed – organization of the official control and methods for their determination

Przeniosło-Siwczyńska M., Kwiatek K.,
Department of Hygiene of Animal Feedingstuffs,
National Veterinary Research Institute, Puławy

The aim of this article was to present important aspects connected with the prevalence of antibacterial substances in feed, the organization of the official control and methods for their detection in feed. Antibacterial substances, mainly antibiotics are used on a large scale and administered for treating and preventing bacterial diseases in animals. Furthermore, the antibacterial agents were used as feed additives to improve growth since the early 1950s as antibiotic growth promoters (AGPs). Due to the increasing risk of rapidly developing bacterial antibiotic resistance, EU imposed for precautionary reasons a ban on use of AGPs in feeds. Antibacterial substances may pose health hazard to consumers via food chain so their presence and levels in feed have to be systematically controlled. EU enforced suitable regulations for monitoring and conducting control programmes of detection residues of antibiotics in food and detection of antibacterial substances, including AGPs in feed and water. This paper describes current regulations concerning the antibiotics control, national programme for the control of antibacterial agents and the most useful screening and confirmatory methods for their detection and determination in feed.

Keywords: feed, antibiotics, feed analysis, official control.

w hodowli zwierząt. Najogólniej metody można podzielić na:

- metody przesiewowe, inaczej skrinigowe, pozwalające wykryć jedną lub więcej grup substancji – np. metody mikrobiologiczne, HPLC-UV;
- metody postskrinigowe, ilościowe lub półilościowe – np. elektroforeza wysokonapięciowa (HVE), chromatografia cienkowarstwowa (TLC);
- metody potwierdzające, oparte z reguły na chromatografii cieczowej (HPLC-DAD, LC-MS, LC-MS/MS).

Zastosowane metody muszą spełniać określone warunki:

- 1) charakteryzować się odpowiednią czułością (dla antybiotyków 1 mg/kg);
- 2) dawać możliwość analizowania wielu substancji (metody wieloskładnikowe);
- 3) różnicować substancje zakazane, dopuszczone dodatki paszowe i antybiotyki stosowane jako substancje czynne w paszach leczniczych;
- 4) powinny być oparte na technice dostępnej dla laboratoriów urzędowych;
- 5) być wiarygodne, czyli dawać jednoznaczny odpowiedź co do tożsamości związku. Wszystkie stosowane metody analityczne muszą spełniać określone wymagania

zgodnie z decyzją Komisji 2002/657/WE z 14 sierpnia 2002 r., która określa wymagania w zakresie sprawności metod stosowanych w kontroli pozostałości w żywności zwierzęcego pochodzenia. Z powodu braku odpowiednich wytycznych do walidacji metod analitycznych dla pasz, przyjmuje się przeprowadzenie walidacji tych metod według wymagań wspomnianej decyzji (7).

Organizacja urzędowej kontroli pasz

Z uwagi na potencjalne zagrożenie dla konsumentów, jakie może wynikać z obecności antybiotyków w żywności lub w paszach, niezbędna jest systematyczna kontrola ich występowania. Kontrola stosowania substancji przeciwbakteryjnych w paszach jest prowadzona w ramach Planu Urzędowej Kontroli Pasz (PUKP), który jest opracowywany corocznie. Programy urzędowych badań kontrolnych pasz są opracowywane, zatwierdzane, a następnie przekazywane do wdrożenia we wszystkich państwach członkowskich Unii Europejskiej. Początkowo ich opracowanie i wdrażanie wynikało z postanowień zawartych w dyrektywie Rady 95/53/WE z 25 października 1995 r. ustalającej zasady dotyczące organizacji urzędowych inspekcji w zakresie żywienia zwierząt, której art. 22 nakładał obowiązek opracowania przez każde państwo członkowskie programu ukierunkowanego na weryfikację zgodności z przepisami prawa paszowego i zidentyfikowanie potencjalnych źródeł ryzyka. Od 2006 r. podstawą do realizacji tego zadania stało się rozporządzenie 882/2004/WE z 29 kwietnia 2004 r. W świetle obowiązujących przepisów każde państwo członkowskie UE zobowiązane jest do opracowania jednego, spójnego programu kontrolnego, niezależnie od struktury organizacyjnej i ilości służb nadzoru funkcjonujących w danym kraju. Przygotowany przez Polskę krajowy plan kontroli urzędowej pasz obejmuje zakres nadzoru sprawowanego przez Inspekcję Weterynaryjną zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa. Program jest skoordynowany w obrębie kraju, tworząc jednolity i spójny roczny plan urzędowej kontroli (8).

Monitorowanie występowania substancji niedozwolonych, pozostałości produktów leczniczych w tkankach i narządach zwierząt, w produktach pochodzenia zwierzęcego, wodzie przeznaczonej do pojenia oraz w paszach jest zadaniem Inspekcji Weterynaryjnej zgodnie z ustawą o Inspekcji Weterynaryjnej z 29 stycznia 2004 r. (9). W ramach urzędowej kontroli pasz prowadzone są badania w zakresie wykrywania substancji przeciwbakteryjnych w paszach i w wodzie przeznaczonej do pojenia zwierząt oraz wykrywania niedozwolonych antybiotykowych stymulatorów wzrostu w paszach. Działania te są prowadzone od 2006 r. i są

uzupełnieniem urzędowego nadzoru nad produkcją żywności i związanym z nim krajowym programem badań kontrolnych substancji niedozwolonych, pozostałości chemicznych, biologicznych i produktów leczniczych u zwierząt oraz w żywności pochodzenia zwierzęcego. Próbkę do badań w kierunku wykrywania substancji przeciwbakteryjnych obejmujących antybiotyki, sulfonamidy i chinolony są pobierane urzędowo przez inspektorów weterynaryjnych i dostarczane do wyznaczonych Zakładów Higieny Weterynaryjnej (w Białymstoku, Bydgoszczy, Gdańsku, Krośnie, Łodzi, Olsztynie, Poznaniu, Warszawie i Wrocławiu) zgodnie z rejonizacją wskazaną w PUKP. Próbkę do badań w kierunku wykrywania niedozwolonych antybiotykowych stymulatorów wzrostu przesyłane są do ZHW w Białymstoku, Bydgoszczy, Krośnie, Olsztynie i Szczecinie. Liczba próbek przeznaczonych do badań wynosi 160 dla każdego kierunku (na 2013 r.). Materiałem do badań są głównie mieszanki paszowe pełnoporcjowe dla świń, drobiu i bydła, woda przeznaczona do pojenia oraz w mniejszej liczbie materiały paszowe, premiksy i mieszanki paszowe uzupełniające. W przypadku otrzymania z Zakładu Higieny Weterynaryjnej wyniku dodatniego właściwy powiatowy lekarz weterynarii powinien przesłać próbkę będącą w posiadaniu powiatowego inspektoratu weterynarii do badań potwierdzających do Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – PIB w Puławach.

Metody wykrywania substancji przeciwbakteryjnych w paszach

Istnieje wiele metod wykrywania i oznaczania pozostałości leków przeciwbakteryjnych w surowcach i produktach pochodzenia zwierzęcego. Natomiast w przypadku pasz liczba metod jest znacznie ograniczona. Należy zauważyć, że chociaż istnieje ogromna potrzeba dysponowania czułymi, dokładnymi i szybkimi metodami, aby monitorować stosowanie substancji przeciwbakteryjnych, tylko ograniczona ich liczba znajduje zastosowanie w badaniach pasz w porównaniu do liczby metod opisanych i używanych do badania pozostałości antybiotyków w żywności. Powodem jest niewątpliwie to, że pasza jest bardzo złożoną matrycą, z różnym składem w zależności od gatunku zwierząt, dla których jest przeznaczona oraz zastosowaniem do jej wytworzenia najróżniejszych materiałów paszowych i dodatków paszowych. Kolejnym istotnym czynnikiem jest jednorodność składu mieszanki w całej jej objętości, co ma kluczowe znaczenie w analizie ilościowej, jak i jakościowej. Jednym z podstawowych elementów jest zapewnienie odpowiedniej homogeniczności i reprezentatywności próbki laboratoryjnej (analitycznej). Specyfika matrycy

paszowej wynika z faktu, że jest to niejednorodna mieszanina złożona z wielu składników, wśród których liczne mogą występować w małych ilościach w stosunku do podstawowych komponentów paszowych. Na przykład śrutę zbożowe i białkowe obecne są w mieszankach paszowych w ilości nawet kilkudziesięciu procent, przy wystąpieniu np. antybiotyku w ilości zaledwie kilku ppm (mg/kg). Tak więc mieszanka paszowa jest często heterogenną mieszaniną kilkudziesięciu składników, z których wiele występuje w ilościach niewielkich w porównaniu do różnego rodzaju substancji bazowych. Składniki te powinny być homogenicznie rozprowadzone w całej masie mieszanki paszowej, a następnie odnalezione w toku analizy chemicznej. Ponadto pasza to bardzo skomplikowana matryca z jeszcze jednego powodu, a mianowicie mieszanki paszowe różnią się składem w zależności od gatunku zwierząt, dla których są przeznaczone, a nawet materiałami wyjściowymi dla poszczególnych partii, co prowadzi do uzyskania próbek pasz o różnych właściwościach (10, 11).

Spośród metod przesiewowych stosowanych do wykrywania substancji przeciwbakteryjnych w paszach istotną rolę odgrywają metody mikrobiologiczne, które wykorzystują zasadę hamowania wzrostu wyselekcjonowanych drobnoustrojów, tzw. szczepów testowych w określonym podłożu agarowym przez substancje przeciwbakteryjne zawarte w badanej próbce. Metody te oparte są na zjawisku dyfuzji antybiotyku w agarze, przez co określa się je jako dyfuzyjne, w których stosuje się płytki z pożywką agarową, do której wprowadza się zawieszinę szczepu testowego w odpowiedniej ilości (inokulum). Na powierzchni podłoża stosuje się metalowe cylinderki, krążki bibułowe lub wycina się w agarze studzienki. Biorąc pod uwagę sposób postępowania można zatem wyróżnić techniki: cylinderkowo-płytkową, krążkowo-płytkową lub studzienkowo-płytkową. W zależności od zastosowanej techniki ekstrakt z badanej próbki wprowadza się do cylinderka, na krążek lub do studzienki. W przypadku obecności w próbce substancji przeciwbakteryjnych po okresie inkubacji pojawia się strefa zahamowania wzrostu, której średnica jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia badanej substancji. Ogólnie rzecz ujmując, metoda polega na wprowadzeniu ekstraktu z próbki do podłoża agarowego z odpowiednim szczepem testowym. Jeżeli próbka zawiera antybiotyk, dyfunduje on w agarze powodując hamowanie wzrostu drobnoustroju testowego wrażliwego na dany antybiotyk, co widoczne jest w postaci strefy zahamowania wzrostu.

Jako metoda przesiewowa w badaniach urzędowych prowadzonych w Polsce stosowana jest metoda mikrobiologiczna,

Wesołych Świąt
życzy venanet.pl

NOWOCZESNE ROZWIĄZANIE
**DLA LEKARZY
WETERYNARII**

- vademecum
- forum lekarzy weterynarii
- kursy on line
- e-booki
- informacje dla lekarzy praktyków



www.venanet.pl



WETERYNARIA W SIECI

studzienkowo-płytkowa, w której zastosowano różne kombinacje pożywek oraz szczepów testowych, w wyniku czego uzyskano 8 płytek przeznaczonych do wykrywania różnych grup substancji przeciwbakteryjnych (metoda 8-płytkowa). Wykorzystuje się w niej pożywki o pH 6,0, 7,2 i 8,0 w kombinacji ze szczepami testowymi *Bacillus subtilis* BGA, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Kocuria rhizophila* ex. *Micrococcus luteus* ATCC 9341 oraz *Escherichia coli* ATCC 11303. Taki układ płytek pozwala na wykrycie antybiotyków należących do różnych grup chemicznych, mianowicie antybiotyków β -laktamowych, tetracyklin, antybiotyków aminoglikozydowych, makrolidowych, a także sulfonamidów i chinolonów. Ze względu na właściwości i budowę chemiczną poszczególne związki różnie dyfundują, w zależności od składu pożywki i jej pH, co pozwala na wstępną identyfikację z jakim antybiotykiem możemy mieć do czynienia. W rzeczywistości działanie hamujące wzrost bakterii mogą powodować również substancje o działaniu przeciwbakteryjnym inne niż antybiotyki, więc wynik dodatni daje informację typu: „tak, coś jest”, natomiast wynik ujemny: „nie, nic nie ma”. Wynik dodatni wskazuje na obecność substancji o działaniu przeciwbakteryjnym, ale bez możliwości identyfikacji i ilościowego oznaczenia konkretnej substancji. Wszystkie wyniki dodatnie muszą być zatem potwierdzone metodami instrumentalnymi (12).

Stosowanie metod mikrobiologicznych musi uwzględniać kilka czynników, które mogą wpływać na uzyskiwane wyniki, a mianowicie (13):

Rodzaj i właściwości badanego materiału

Przy badaniu różnych rodzajów próbek należy liczyć się z możliwością uzyskania wyników fałszywie dodatnich. Jest to istotne w przypadku badania tkanek zwierzęcych lub produktów pochodzenia zwierzęcego, ponieważ np. obecność lizozymu w nerkach może dawać wynik fałszywie dodatni lub w przypadku badania jaj, ze względu na silne właściwości bakteriostatyczne białka. W przypadku pasz problem jest bardziej złożony. Pasma, jak wcześniej wspomniano, jest niezwykle trudną matrycą ze względu na swoją różnorodność i obecność wielu różnych komponentów. Specyfika pasz przemysłowych, tj. premiksów, pasz uzupełniających i pełnoporcjowych, wynika z faktu, że są one mieszaninami nawet kilkudziesięciu składników, mamy więc do czynienia ze składnikami mineralnymi, witaminami, kwasami organicznymi i innymi dodatkami paszowymi (np. kokcydiostatykami). W związku z tym mogą występować różne problemy analityczne, zwłaszcza w analizie antybiotyków.

W przypadku braku antybiotyku możemy uzyskać wynik (fałszywie) dodatni z powodu właściwości bakteriobójczych lub bakteriostatycznych niektórych wymienionych dodatków paszowych.

Dobór drobnoustroju testowego i wielkość inokulum

Użyty szczep testowy decyduje o czułości metody. W zależności od szczepu testowego czułość metod jest różna w odniesieniu do poszczególnych substancji. *Bacillus subtilis* jest np. bardzo wrażliwy na obecność antybiotyków aminoglikozydowych, natomiast stosunkowo mało wrażliwy na penicyliny. W przypadku niskich stężeń penicyliny wynik badania może być ujemny. Przy oznaczaniu penicylin optymalnym drobnoustrojem jest *Kocuria rhizophila* ex. *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Nie mniej istotna jest również ilość szczepu testowego w pożywce. Przyjmuje się, że im mniejsze inokulum, tym większe strefy zahamowania wzrostu, a więc tym większa czułość.

Skład i odczyn pH pożywki

Ze względu na swoją zróżnicowaną budowę chemiczną oraz właściwości fizykochemiczne poszczególne związki różnie dyfundują. Właściwy dobór pH daje możliwość uzyskania możliwie jak najlepszej dyfuzji antybiotyku z badanej próbki. Antybiotyki β -laktamowe i tetracykliny dyfundują najlepiej przy pH 6,0, dając w tych warunkach największe strefy zahamowania wzrostu. Z kolei aminoglikozydy i makrolidy dają największe strefy hamowania na płytkach z pożywką o pH 8,0.

Rodzaj i pH rozpuszczalnika do ekstrakcji

Niezwykle istotny jest etap przygotowania próbki do badania i ekstrakcja, do której należy odpowiednio dobrać rozpuszczalnik, aby zapewnić jak najlepsze oddzielenie danego antybiotyku od składników matrycy.

W przypadku otrzymania wyniku dodatniego w badaniu przesiewowym niezbędne jest zastosowanie bardziej czułych i specyficznych metod potwierdzających w celu ustalenia tożsamości wykrytej w badaniu substancji przeciwbakteryjnej. Efektywność kontroli nielegalnego stosowania substancji przeciwbakteryjnych, w tym antybiotyków, wymaga zastosowania metod czułych, specyficznych, wiarygodnych i dających jednoznaczną odpowiedź, co do tożsamości wykrytych w badaniu przesiewowym substancji. Do badań tego rodzaju stosowane są metody służące do identyfikacji i ilościowego oznaczenia konkretnej substancji, oparte głównie na chromatografii cieczowej z różnymi rodzajami detektorów, w tym chromatografii cieczowej

sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS). W klasycznej analizie antybiotyków i ich pozostałości chromatografię cieczową najczęściej łączy się z detektorami UV lub detektorami fluorescencyjnymi. Jednak coraz częściej do potwierdzania obecności antybiotyków w żywności oraz w paszach stosowana jest spektrometria mas, która umożliwia nie tylko wykrycie obecności analizowanego związku chemicznego, ale również jego struktury. Rozwój spektrometrii mas oraz wykazanie jej przydatności w analizie leków weterynaryjnych sprawiło, że jest ona coraz częściej wykorzystywana w analizie substancji przeciwbakteryjnych zaliczanych do grupy B1 (14, 15). Należy pamiętać jednak, że przy zastosowaniu technik chromatograficznych niezwykle istotne jest odpowiednio przygotowanie próbek, co jest dużym ograniczeniem w wykonaniu analiz i sporym wyzwaniem dla analityków. Odpowiednie przygotowanie próbek do badań jest ważnym elementem postępowania analitycznego, ponieważ może mieć wpływ na wiarygodność wyników. W przypadku analizy antybiotyków w paszach etap przygotowania próbki jest niezwykle trudny, ponieważ mamy do czynienia ze zróżnicowaną budową chemiczną tych związków, co utrudnia lub niekiedy uniemożliwia uzyskanie zadowalającego rozdziału na kolumnie chromatograficznej, a jeszcze wcześniej trudności sprawia efektywne oczyszczenie ekstraktu od interferujących składników matrycy. Pasma jest matrycą złożoną, dlatego tak istotne i konieczne jest jak najlepsze wyodrębnienie substancji badanych od interferujących związków. Przeprowadzenie analizy za pomocą spektrometru masowego wymaga zazwyczaj wstępnego oczyszczenia próbki, np. za pomocą odbiałczania, ekstrakcji ciecz-ciecz lub ekstrakcji do fazy stałej SPE.

Jak wcześniej wspomniano, prowadzenie badań przesiewowych musi być połączone z możliwością zastosowania metod potwierdzających. W przypadku badań pasz w analizie potwierdzającej obecność antybiotyków z grupy tetracyklin, które są antybiotykami najczęściej stosowanymi u zwierząt, wykorzystuje się chromatografię cieczową połączoną z detektorem DAD oraz chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrem mas. Ponadto spektrometria mas stosowana jest także do potwierdzania obecności makrolidów (tylozyna, spiramycyna) i penicylin oraz linkomycyny i tiamuliny. Chinolony są grupą chemioterapeutyków, która również znalazła szerokie zastosowanie w praktyce weterynaryjnej, zwłaszcza u drobiu. Obecność tych substancji potwierdzana jest przy zastosowaniu techniki chromatografii cieczowej z detektorem fluorescencyjnym (HPLC-FLD) oraz z wykorzystaniem bardziej czułej techniki LC-MS.

Technologia

Jakość

Cena

...

USG
tylko
25 tys. zł!

Super Oferta.
USG SonoScape S2
już za 25 tys. zł!

Z dowolną głowicą do wyboru
w promocyjnej cenie 10 tys. zł.
Oferta nie dotyczy głowic kardiologicznych, 4D.



SonoScape

Partner **4**
MEDICINE

Oferta na miarę Twoich potrzeb:
info@p4m.pl • infolinia: 22 540 18 99 • www.p4m.pl

Wymagania stawiane przed metodami analitycznymi

Aby egzekwować obowiązujący zakaz stosowania antybiotyków w charakterze dodatków paszowych oraz kontrolować ich ewentualne nielegalne użycie, potrzebne są odpowiednie metody analityczne. Skuteczna i sprawna kontrola nielegalnego i nieprawidłowego stosowania antybiotyków wymaga metod, które charakteryzują się odpowiednią czułością, specyficznością, wiarygodnością i odpornością. Wymagane jest, aby stosowane metody posiadały sprawność analityczną dającą gwarancję uzyskania wiarygodnych wyników. Obecnie kontrola oparta jest w dużym stopniu na metodach mikrobiologicznych, które są stosunkowo proste i nie wymagają kosztownego sprzętu, są jednak mało specyficzne i mogą dawać wyniki fałszywie dodatnie. Jednakże są one stosowane ze względu na to, że są czułe, szybkie, proste i tanie. Ich zastosowanie pozwala w krótkim czasie dokonać oceny, czy w badanych próbkach znajdują się substancje przeciwbakteryjne (hamujące wzrost szczepów testowych), czy jest to materiał wolny od tych substancji. Tak więc spełniają wymagania stawiane metodom przesiewowym. Jednakże dla ostatecznego potwierdzenia wyników dodatnich muszą być zastosowane metody instrumentalne. Techniki chromatograficzne pozwalają na identyfikację i oznaczenie ilościowe substancji przeciwbakteryjnej wykrytej w badaniu przesiewowym. Obecnie chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas jest jedną z częściej stosowanych technik do oznaczania substancji leczniczych w materiale biologicznym i innych matrycach, takich jak żywność i pasze. Technika ta znalazła tak duże zastosowanie dzięki wysokiej selektywności i dużej czułości. Klasyczne techniki chromatograficzne nie mają możliwości pełnej identyfikacji związków, jak w przypadku spektrometrii mas. Jej zastosowanie daje możliwość jednoczesnego analizowania wielu różnych grup leków przeciwbakteryjnych. Zaletą spektrometru masowego jako detektora chromatograficznego jest zdolność do określenia jonu macierzystego (na podstawie masy cząsteczkowej) i jonów potomnych powstałych z fragmentacji, dostarczając w ten sposób informacji o strukturze cząsteczki. Głównymi zaletami wynikającymi z połączenia LC i MS jest zwiększenie specyficzności oraz umożliwienie analizy ilościowej złożonych mieszanin. Połączenie to pozwala na identyfikację badanego związku na podstawie widma masowego, co zapewnia wysoką specyficzność i umożliwia ilościowe oznaczenie substancji nawet nie w pełni rozdzielonych chromatograficznie. Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas umożliwia przeprowadzenie oznaczeń ilościowych często

niemożliwych do wykonania za pomocą innych technik. Do najważniejszych zalet metod LC-MS należą: bardzo duża selektywność, czułość, krótszy czas analizy i uproszczenie procesu przygotowania próbki (16).

Należy dodać, że wynik dodatni uzyskany metodą przesiewową daje informację, że próbka może zawierać antybiotyk (antybiotyki) lub inne substancje o działaniu przeciwbakteryjnym. W takiej sytuacji konieczne jest wykonanie analizy potwierdzającej dającej jednoznaczną odpowiedź, czy substancja powodująca zahamowanie wzrostu szczepu testowego jest antybiotykiem. Tylko pełna wiedza w tym zakresie pozwala podjąć ostateczną decyzję administracyjną w stosunku do badanej paszy.

Laboratoria prowadzące badania urzędowe muszą stawić czoła rosnącemu wymaganiom analitycznym w odniesieniu do zwiększającej się liczby substancji analizowanych w różnych rodzajach próbek, wysokich wymagań dla stosowanych metod zawartych w odpowiednich dokumentach, wzrastających kosztów analiz, rosnącego zapotrzebowania na analizy wieloskładnikowe i dysponowania odpowiednimi metodami potwierdzającymi. Należy zauważyć, że dopiero od niedawna istnieją wieloskładnikowe metody pozwalające na jednoczesne analizowanie antybiotyków należących do wszystkich grup leków przeciwbakteryjnych w tkankach i produktach pochodzenia zwierzęcego. Należy również przypuszczać, że zostaną opracowane i wdrożone tego typu metody do badania pasz. Jednakże problemy analityczne związane z matrycą paszową opisane powyżej, jak również różnice w budowie chemicznej oraz właściwościach fizykochemicznych składników pasz i analizowanych substancji stanowią znaczącą przeszkodę w ich szybkim rozwoju.

Podsumowanie

Substancje przeciwbakteryjne, w tym głównie antybiotyki, są nieodzownym elementem terapii chorób zakaźnych zwierząt hodowlanych. Są stosowane powszechnie w leczeniu i profilaktyce chorób bakteryjnych występujących u zwierząt gospodarskich i powodujących największe straty ekonomiczne. Antybiotyki stanowią liczną grupę leków weterynaryjnych podawanych zwierzętom różnymi drogami, w tym w postaci pasz leczniczych i w wodzie. Obecnie obowiązuje zakaz stosowania antybiotyków jako dodatków paszowych, jednak są one powszechnie stosowane w zapobieganiu różnym chorobom. Stąd często mówi się o odpowiedzialnym i właściwym stosowaniu antybiotyków w medycynie weterynaryjnej. Warunkiem rozważnego stosowania antybiotyków w weterynarii jest stosowanie antybiotyków tylko w ściśle określonych wskazaniach. Wynika to z obaw związanych ze zjawiskiem antybiotykooporności

i z możliwością transferu genów oporności ze zwierząt na ludzi, co stanowiło podstawę do wprowadzania restrykcji związanych ze stosowaniem antybiotyków u zwierząt. W celu ochrony zdrowia konsumentów Unia Europejska wprowadziła zakaz stosowania antybiotyków jako dodatków paszowych, co przyczyniło się do ograniczenia używania antybiotyków u zwierząt, a ponadto wprowadzono odpowiednie regulacje związane z obowiązkiem prowadzenia programów kontrolnych dotyczących monitorowania występowania pozostałości antybiotyków w żywności pochodzenia zwierzęcego, a także antybiotyków, w tym niedozwolonych antybiotykowych stymulatorów wzrostu w paszach i wodzie przeznaczonych do pojenia zwierząt. Działania te są wynikiem rosnących wymagań w zakresie bezpieczeństwa żywności obejmującego cały łańcuch żywnościowy, co powoduje, że organom urzędowym zajmującym się kontrolą i sprawującym nadzór nad bezpieczeństwem żywności i pasz stawiane są coraz większe wymagania.

Piśmiennictwo

1. 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.
2. Przeniosło-Siwczyńska M., Kwiatek K.: Dlaczego zakazano stosowania w żywieniu zwierząt antybiotykowych stymulatorów wzrostu? *Życie Wet.* 2013, **88**, 104-108.
3. Buczek K., Marć M.: Antybiotykooporność bakterii – przyczyny i skutki. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin – Polonia* 2009, **64**, 1-8.
4. Pejsak Z.: Racjonalne stosowanie antybiotyków. *Lecznica Dużych Zwierząt* 2013, **1**, 6-11.
5. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) 1831/2003 z dnia 22 września 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt.
6. Różańska H.: Pozostałości antybiotyków w żywności w aspekcie ich niewłaściwego stosowania u zwierząt. Monografia pt.: *Farmacja weterynaryjna w Polsce – racjonalne stosowanie antybiotyków – nauka i praktyka*. Puławy 2012 r.
7. De Jong J. et al.: Towards a control strategy for banned antibiotics and growth promoters in feed: the SIMBAG-FEED project. *Antimicrobial growth promoters. Where do we go from here?* Wageningen Academic Publishers 2006.
8. Plan Urzędowej Kontroli Pasz na rok 2013. Główny Inspektorat Weterynarii, Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Warszawa 30 stycznia 2013 r.
9. Ustawa z 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej.
10. Matyka S.: Czynniki wpływające na wyniki analiz przemysłowych mieszanek paszowych – wielkość i liczba cząstek dodatków paszowych. *Pasze Przemysłowe* 2005, **14** (1), 17-18.
11. Matyka S.: Wybrane uwarunkowania analizy pasz przemysłowych. *Pasze przemysłowe. Materiały konferencyjne z XXI Konferencji Naukowo-Technicznej „Kontrola jakości środków żywienia zwierząt”*, Puławy 1-2.12.2005 r.
12. Różańska H.: Metody przesiewowe wykrywania pozostałości antybiotyków w żywności. *Życie Wet.* 2011, **86**, 59-61.
13. Różańska H.: Fałszywie dodatnie lub ujemne wyniki w wykrywaniu pozostałości antybiotyków. *Med. Weter.* 1996, **52**, 167-169.
14. Posytniak A.: Antybiotyki w żywności – występowanie i kontrola pozostałości. *Monografia pt.: „Farmacja weterynaryjna w Polsce – racjonalne stosowanie antybiotyków – nauka i praktyka”*. Puławy 2012 r.
15. Posytniak A.: Występowanie antybiotyków w żywności – aspekty prawne i analityczne kontroli pozostałości. *Życie Wet.* 2011, **86**, 717-721.
16. Rudzki P.J., Kobylńska K.: Zastosowanie techniki LC-MS-MS do oznaczania stężeń substancji leczniczych w materiale biologicznym. *Przemysł Chemiczny* 2006, **85/5**, 360-362.

Dr Monika Przeniosło-Siwczyńska, Państwowy Instytut Weterynaryjny, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy