

Praćenje ostataka kloramfenikola u mesu i mesnim proizvodima tijekom razdoblja 2015.-2017.

Nina Bilandžić*, Petra Vrkljan, Božica Solomun Kolanović, Ivana Varenina, Marina Krpan i Mirjana Hruškar



Uvod

Kloramfenikol je antibiotik širokog spektra djelovanja, bakteriostatik primarno dobiven od bakterija iz roda streptomiceta, a kasnije se počeo proizvoditi sintetički. Primjenjuje se za liječenje različitih infekcija prouzročenih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. U veterinarskoj medicini primjenjuje se oralno ili parenteralno u liječenju infekcija oka i vanjskog uha, sistemske salmoneloze, mastitisa, prostatitisa, pijelonefritisa, meningitisa i drugih infekcija prouzročenih anaerobnim bakterijama te bakterijskih bolesti u riba, vibrioze i eritrodermatitisa (Dowling, 2006.). Mehanizam njegova djelovanja kao antimikrobnog lijeka zasniva se na inhibiciji sinteze proteina u bakterijskim stanicama, odnosno sprječava rast i razvoj rikicija, mikoplazmi i klamidije (Šeol i sur., 2010.). Nakon peroralne pri-

mjene, kloramfenikol se biotrasformira glukuridacijom u različitim organima, jetri i bubrezima, u metabolite koji se transportiraju u cijeli organizam (Anadon i sur., 1994., Akhtar i sur., 1996.).

U humanoj i veterinarskoj medicini primjena kloramfenikola je ograničena zbog mogućeg toksičnog djelovanja (Scortichini i sur., 2005.). Utvrđeno je da prouzroči razne bolesti kao što je depresija koštane srži, odnosno ireverzibilna aplastična anemija koja može dovesti do leukemije (Dowling, 2006.). U mnogim zemljama širom svijeta, uporaba kloramfenikola je smanjena ili potpuno zabranjena u životinja koje se koriste za prehranu, upravo zbog izazivanja nepovratne depresije koštane srži pa čak i aplastične anemije (EFSA, 2014.). Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) je prema rezultatima

Dr. sc. Nina BILANDŽIĆ*, (dopisni autor, e-mail: bilandzic@veinst.hr), dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; Petra VRKLJAN, mag. ing. techn. aliment., Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, dipl. ing. preh. tehnol., dr. sc. Ivana VARENINA, dipl. ing. biotehnol., Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Marina KRPAN, dipl. ing. preh. tehnol., docentica, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; dr. sc. Mirjana HRUŠKAR, dipl. ing. biotehnol., redovita profesorica, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

istraživanja zaključila da je kloramfenikol u *in vitro* uvjetima citotoksičan, odnosno genotoksičan u koštanoj srži te ga klasificirala u grupu 2A kao mogući karcinogen za ljude (IARC, 1990., WHO, 2004.).

Od 1994. godine Europska je unija (EU) zabranila njegovo korištenje u veterinarskoj medicini u životinja namijenjenih ljudskoj potrošnji (EC, 1990., 1994.). Kloramfenikol pripada skupini lijekova za koje se najviša dopuštena količina (NDK) u hrani životinjskog podrijetla ne može ustvrditi iz toksikoloških razloga (EFSA, 2014.). Također je uspostavila razinu nulte tolerancije za kloramfenikol u hrani životinjskog podrijetla, odnosno kao tvari za koje nema dopuštenih razina u proizvodima životinjskog podrijetla. Propisana je jedino najmanja granica zahtjevane učinkovitosti izvedbe metode (engl. *Minimum required performance limit*, MRPL) za određivanje kloramfenikola od 0,3 µg/kg (EC, 2003.).

U kontroli kloramfenikola u hrani životinjskog podrijetla danas se primjenjuju različite orijentacijske i potvrđne metode. Orijetacijske metode omogućuju analizu velikog broja uzoraka i otkrivaju prisutnosti neke tvari, dok potvrđne metode karakterizira visoka osjetljivost, niska granica određivanja, što omogućuje identifikaciju i kvantifikaciju određene supstance. Danas se kao orijentacijske metode za određivanje kloramfenikola najčešće koriste imunoenzimski testovi (ELISA) i plinska kromatografija (Scortichini i sur., 2005., Cerkvenik-Flajs, 2006.). Kao potvrđne metode za određivanje i kvantifikaciju kloramfenikola u hrani primjenjuju se metode plinske i tekućinske kromatografije-tandemske spektrometrija masa, GC-MS/MS odnosno LC-MS/MS (Impens i sur., 2003., Peng i sur., 2006., Zhang i sur., 2008., Bilandžić i sur., 2012., Douny i sur., 2013., Wang i sur., 2014., Barreto i

sur., 2016.). Češća je primjena LC-MS/MS tehnike zbog kraćeg postupka pripreme i postizanja veće osjetljivosti metode i do 0,003 µg/kg (Rønning i sur., 2006.).

Kriteriji izvedbe za metode koje se koriste za određivanje kloramfenikola su navedeni u Odluci Komisije 2002/657/EZ za orijentacijske i potvrđne metode (EC, 2002.a). Metode moraju imati zadovoljavajuće rezultate za parametre: specifičnost/selektivnost, linearnost, točnost, preciznost i ponovljivost, sposobnost dokazivanja CC β za orijentacijske metode (engl. *detection of capability*) te granična koncentracija (količina) analita CC α (engl. *limit of decision*) u skladu s postupcima navedenim u Odluci (EC, 2002.a). Granice određivanja metode LOD (engl. *limit of detection*) također se izračunavaju u okviru vrednovanja metode.

Većina uzorkovanja hrane životinjskog podrijetla i srodnih proizvoda za ispitivanje kloramfenikola u hrani životinjskog podrijetla provodi se u okviru nacionalnih planova praćenja ostataka zabranjenih tvari, odnosno veterinarskih lijekova u državama članicama prema Direktivi Vijeća 96/23/EZ (EC, 1996.). Kloramfenikol spada u skupinu A6 zabranjenih tvari, odnosno tvari koje se ne smiju davati životinjama koje proizvode hranu i svrstan je u tablici 2. Uredbe Komisije 37/2010 pod tvari za koje NDK nije moguće ustvrditi (EC, 2010.). Iako je njegova primjena zabranjena u EU, kloramfenikol je određen u hrani životinjskog podrijetla gotovo svake godine praćenja te je njegova kontrola sustavno potrebna (EFSA, 2016.).

Cilj ovog rada je određivanje koncentracija kloramfenikola u mesu svinja i goveda te različitim mesnim proizvodima na razini EU tijekom zadnjeg desetljeća. U tu svrhu je provedena validacija postupka određivanja kloramfenikola primjenom orijentacijske ELISA metode u mesu i mesnim proizvodima.

Materijali i metode

Uzorkovanje mesa i mesnih proizvoda

Tijekom 2015., 2016. i 2017. godine sakupljeno je ukupno 392 uzoraka mesa i iznutrica svinja i goveda te mesnih proizvoda odnosno mesnih narezaka, pašeta, šunki i kobasica. Uzorci su sakupljeni u velikim trgovačkim lancima na području grada Zagreba. Broj uzoraka po godini uzorkovanja je iznosio (meso i mesni proizvodi): 2015. ukupno 96 i 39; 2016. ukupno 75 i 42; 2017. ukupno 102 i 38. Uzorci su držani na hladnom do dolaska u laboratorij. U laboratoriju su podijeljeni u manje komade te zamrznuti na -18 °C do analize.

Reagensi i standardi

Kloramfenikol je određivan ELISA metodom primjenom testa proizvođača EuroProxima B.V. (Arnhem, Nizozemska) opremljenog s: mikrotitarska ploča (96 jažica), standardna otopina kloramfenikola 100 ng/mL (spremno za uporabu), otopine standarda kloramfenikola (2; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 i 0 ng/mL), pufer za razrjeđivanje (4x koncentriran), pufer za ispiranje (20x koncentriran), pufer za rekonstituciju konjugata i antitijela/zero standard (spremno za uporabu), otopin supstrat/kromogen (spremno za uporabu), stop otopine (spremno za uporabu), konjugat (liofilizirani), antitijela (liofilizirano).

Standard kloramfenikola nabavljen je od proizvođača Sigma (St. Louis, SAD). Ostale kemikalije su nabavljene od: metanol, kloroform i amonij acetat od J. T. Baker (Deventer, Nizozemska); etil acetat od Carlo Erba (Milano, Italija); izooktan od Kemike (Zagreb, Hrvatska); dušik 5,0 i 5,5 za uparavanje uzoraka nabavljen je od SOL spa (Monza, Italija). Ultra čista voda je pripremljena koristeći sustav Direct Q 5UV (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka). Bazne otopine standarda pripremljene su otapanjem analita u metanolu. Radne

otopine upotrebljavane za obogaćivanje slijepih uzoraka dobivene su daljnjim razrjeđivanjem, koristeći isto otapalo do koncentracije od 1 µg/mL. Bazne i radne otopine standarda su pohranjene na +2 to +8 °C.

Instrumenti

U postupku pripreme uzoraka mesa i mesnih proizvoda primijenjivani su instrumenti: Vortex model VWR, VX-2500 (IKA®-WERKE GMBH & CO.KG, Njemačka), homogenizator Ultra-Turrax® model T25IKA®, centrifuga ROTANTA 460 R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka), uparivač dušikom N-EVAP model 111 (Orgamotion Associates Inc., Berlin, SAD). Mikročitač Tecan model Sunrise (Tecan Austria GmbH, Austria) korišten je za očitavanje vrijednosti apsorbanci za ELISA metodu.

Priprema uzoraka

Odvaže se 3 g homogeniziranog uzorka mesa, odnosno mesnih proizvoda u plastičnu epruvetu. Uzorku se doda 6 mL etil acetata nakon čega se 10 minuta vorteksira, a zatim centrifugira 10 minuta na 2000 x g pri 21 °C. Nakon centrifugiranja pipetira se 4 mL nadtaloga u čistu epruvetu i stavlja na uparavanje do suhog u blagoj struji dušika pri 50 °C. Masni se ostatci nakon uparavanja otapaju u 1 mL mješavine izooktan/kloroforma (2:3; v:v) te se doda 1 mL pufera za razrjeđivanje nakon čega se vorteksira 1 minutu. Takvi se uzorci stave u vodenu kupelj 5 minuta pri 80 °C i potom centrifugiraju 10 minuta na 2000 x g pri 21 °C. Nakon centrifugiranja se 50 µL nadtaloga pipetira u jažice.

Postupak određivanja kloramfenikola ELISA metodom

U pojedinačne jažice se doda 100 µL nultog standarda, 50 µL nultog standarda, 50 µL pripremljenih standarda za kalibraciju (0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 2 ng/mL) te 50 µL otopine uzoraka, svakog

u dvije paralele. Zatim se u svaku jažicu (osim jažica sa 100 μL zero standarda) doda 25 μL razrijeđenog enzim-konjugata i razrijeđene otopine protutijela. Jažice se prekriju, ploča nekoliko sekundi protrese i zatim inkubira u tami pri 4 °C tijekom 1 sata. Nakon inkubacije tekućina se iz jažica ukloni te ispere 3 puta s pferom za ispiranje. U svaku jažicu pipetira se 100 μL supstrata/kromogena te inkubira 30 minuta u tami na sobnoj temperaturi (20 do 25 °C). Nakon inkubacije doda se 100 μL stop otopine i zatim se očitava apsorbancija pri 450 nm na mikročitaču Tecan.

Validacija ELISA metode

Postupak validacije metode za određivanje kloramfenikola u uzorcima mesa i mesnih proizvoda proveden je sukladno zahtjevima Odluke Komisije 2002/657/EC (EC, 2002.a). Određeni su validacijski parametri: selektivnost/specifičnost, sposobnost dokazivanja $\text{CC}\beta$, iskorištenje, ponovljivost i preciznost, granica detekcije LOD, granica kvantifikacije LOQ.

U svrhu utvrđivanja selektivnosti/specifičnosti analizirano je 20 uzoraka mesa, odnosno proizvoda bez obogaćenja i 20 uzoraka s obogaćenjem na razini 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U metodama se određivalo iskorištenje, $\text{CC}\alpha$ i $\text{CC}\beta$ pomoću kojih je dokazana selektivnost/specifičnost.

Granična koncentracija $\text{CC}\alpha$ određena je kao zbroj srednje vrijednosti koncentracije slijepih uzoraka i standardne devijacije odgovora slijepih uzoraka pomnožene s 2. Sposobnost dokazivanja $\text{CC}\beta$ ($\beta=5\%$) je dobivena kao zbroj granične koncentracije i odgovarajuće standardne devijacije pomnožene s 1,64. Granica detekcije LOD i granica kvantifikacije LOQ izračunati su analizom 20 negativnih uzoraka, odnosno tako da se srednjoj vrijednosti ponavljanih uzoraka pribroji 3 (LOD), odnosno 10 (LOQ) standardnih devijacija utvrđenih za uzorke.

Iskorištenje metode je ispitano obogaćivanjem slijepih uzoraka na tri koncentracijske razine za meso na 0,15; 0,30 i 0,45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ odnosno za mesne proizvode na 0,3; 0,45 i 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, u četiri ponavljanja serija po minimalno 8 mjerenja. Na temelju dobivenih rezultata izračunata je ponovljivost rezultata izračunom koeficijenta varijacije rezultata CV%.

Statistička analiza

Statistička analiza dobivenih koncentracija kloramfenikola provedena je računalnim programom Statistica 10 (StatSoft® Inc., Tulsa, SAD). Koncentracije su izražene kao minimalna i maksimalna koncentracija, srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD).

Tabela 1. Validacijski parametri ELISA metode za određivanje kloramfenikola u mesu i mesnim proizvodima.

Vrsta uzoraka	Obogaćenje ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Iskorištenje (%)	CV (%)	$\text{CC}\alpha$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$\text{CC}\beta$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Meso	0,15	60,3	17,7	0,005	0,05	0,005	0,010
	0,30	77,3	11,2				
	0,45	101,9	10,1				
	Ukupno	80,8	13,0				
Mesni proizvodi	0,30	89,1	21,6	0,02	0,13	0,019	0,068
	0,45	108,4	10,4				
	0,60	102,6	10,7				
	Ukupno	100,0	14,2				

Rezultati i rasprava

U ovome radu koncentracije kloramfenikola u mesnim proizvodima određivane su ELISA metodom. Metoda je validirana sukladno postupcima Odluke Komisije 2002/657/EZ za orijentacijske (EC, 2002.a). U Tabeli 1 prikazani su izračuni validacijskih parametara selektivnost/specifičnost, preciznost i ponovljivost, iskorištenje, granična koncentracija CC α sposobnost dokazivanja CC β , granica detekcije LOD, granica kvantifikacije LOQ za primjenjivanu ELISA metodu za određivanje kloramfenikola u mesu i mesnim proizvodima.

Selektivnost/specifičnost metode prikazana je pomoću sposobnosti dokazivanja CC β . Određene su CC β vrijednosti za meso i mesne proizvode od 0,05, odnosno 0,13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ te su niže od MRPL vrijednosti (0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) čime se potvrđuje selektivnost/specifičnost

metode. Određena su ukupna iskorištenja od 80,8% odnosno 100,0% i unutar su preporučenog raspona 50-120%. Rezultati određivanja ponovljivosti i preciznosti prikazani su kao koeficijent varijacije u unutar-laboratorijskim uvjetima ponovljivosti te su unutar dopuštene granice odstupanja (- 50% do + 20%). Određene granice detekcije LOD u mesu i mesnim proizvodima su 0,005, odnosno 0,019 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a granice kvantifikacije LOQ 0,010 i 0,068 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Zaključno se može reći da su ključni validacijski parametri u skladu s kriterijima te se ispitivana ELISA metode za određivanje kloramfenikola u mesu i mesnim proizvodima može smatrati prikladnom za svoju namjenu.

U Tabeli 2 su prikazani rezultati određivanja koncentracija kloramfenikola u mesu goveda i svinja te različitim mesnim proizvodima sakupljenih tijekom 2015., 2016. i 2017. godine. U ukupno 392 uzorka koncentracije kloramfenikola su

Tabela 2. Koncentracije kloramfenikola u mesu i mesnim proizvodima sakupljenim u periodu 2015.-2017.

Vrsta uzoraka	2015.			2016.			2017.		
	N	Sred.vrij. \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Min - Maks ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	N	Sred.vrij. \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Min - Maks ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	N	Sred.vrij. \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Min-Maks ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Svinjsko meso	40	0,0069 \pm 0,007	0,0003-0,029	42	0,018 \pm 0,041	0,001-0,20	48	0,0098 \pm 0,014 ^a	0,0003-0,062
Svinjske iznutrice	10	0,0059 \pm 0,005	0,0009-0,016	6	0,0028 \pm 0,002 ^a	0,001-0,006	10	0,0046 \pm 0,003 ^a	0,0011-0,009
Goveđe meso	38	0,017 \pm 0,029	0,0006-0,14	21	0,022 \pm 0,041	0,001-0,13	34	0,0058 \pm 0,004	0,0005-0,014
Goveđe iznutrice	8	0,0029 \pm 0,002 ^a	0,0003-0,007	6	0,0026 \pm 0,001	0,001-0,005	10	0,0056 \pm 0,002	0,0024-0,009
Ukupno meso	96	0,011 \pm 0,019	0,0003-0,14	75	0,016 \pm 0,037	0,001-0,20	102	0,0076 \pm 0,009	0,0003-0,063
Naresci	7	0,076 \pm 0,065	0,0051-0,18	10	0,052 \pm 0,030	0,019-0,11	12	0,069 \pm 0,072	0,0069-0,22
Paštete	18	0,021 \pm 0,031	0,0015-0,11	12	0,012 \pm 0,016 ^b	0,0004-0,048	12	0,026 \pm 0,027	0,0021-0,085
Šunke	8	0,021 \pm 0,039	0,0016-0,12	8	0,0034 \pm 0,003 ^b	0,0012-0,009	8	0,012 \pm 0,016 ^b	0,0014-0,039
Kobasice	6	0,0089 \pm 0,011 ^b	0,0016-0,030	12	0,0088 \pm 0,011 ^b	0,0006-0,037	6	0,008 \pm 0,005 ^b	0,0003-0,016
Ukupno proizvodi	39	0,029 \pm 0,044	0,0015-0,18	42	0,019 \pm 0,026	0,0004-0,11	38	0,034 \pm 0,049	0,0015-0,22

^a srednje vrijednosti manje od LOD = 0,005 $\mu\text{g}/\text{kg}$

^b srednje vrijednosti manje od LOD = 0,019 $\mu\text{g}/\text{kg}$

se kretale u rasponu 0,0003-0,22 µg/kg. Najveća vrijednost od 0,22 µg/kg izmjerena je u mesnom naresku. Ukupne srednje vrijednosti kloramfenikola za sve vrste mesa i iznutrica su određene u rasponu od 0,0076 do 0,016 µg/kg, odnosno iznad LOD vrijednosti od 0,005 µg/kg. Ukupne srednje vrijednosti za mesne proizvode su izmjerene u većem rasponu 0,019-0,034 µg/kg, odnosno na i iznad LOD vrijednosti od 0,019 µg/kg. Nisu utvrđene vrijednosti iznad MRPL vrijednosti.

U prijašnjim istraživanjima ostatci kloramfenikola određeni su u tkivima pilića podrijetlom iz tri pokrajine Irana. Utvrđena su 28 pozitivna uzorka te određene maksimalne koncentracije

od 0,54 µg/kg u bubrezima i 155,2 µg/kg u jetri pilića (Tajik i sur., 2010.). U razdoblju od 2002. do 2012. godine u okviru nacionalnih planova praćenja ostataka veterinarskih lijekova i drugih tvari u živim životinjama i životinjskim proizvodima u okviru nacionalnih planova prema Direktivi Vijeća 96/23/EZ (EC, 1996.) članice EU su analizirale ukupno 768 734 ciljanih uzoraka na tvari grupe A6, odnosno zabranjenih tvari, a koja uključuje kontrolu kloramfenikola (EFSA, 2014.). Ustvrdeno je ukupno 306 nesukladnih uzoraka obzirom na povišene koncentracije kloramfenikola, a najveći broj se odnosi na životinjske vrste svinje, perad i goveda s 91, 74 i 68

Tabela 3. Broj utvrđenih nesukladnih rezultata kloramfenikola na razini EU u okviru nacionalnih programa praćenja ostataka kloramfenikola u razdoblju 2013.-2015.

Godina	Vrsta životinje	Broj nesukladnih rezultata	Članica EU koja je prijavila nesukladan rezultat
2013.	Govedo	7	Češka, Njemačka, Nizozemska, Poljska, Ujedinjeno Kraljevstvo
	Svinja	5	Austrija, Italija, Njemačka, Poljska
	ovce/koze	1	Austrija
	perad	6	Češka, Njemačka, Poljska
	uzgojena divljač	1	Češka
	mlijeko	3	Letonija, Slovenija, Slovačka
	Ukupno	23	
2014.	govedo	4	Austrija, Njemačka, Poljska, Slovačka
	svinja	1	Češka
	ovce/koze	1	Austrija
	perad	1	Cipar
	akvakultura	1	Njemačka
	mlijeko	1	Letonija, Poljska
	jaja	1	Letonija
Ukupno	15		
2015.	govedo	2	Hrvatska, Letonija
	svinja	5	Bugarska, Finska, Poljska
	perad	3	Hrvatska, Poljska
	mlijeko	2	Letonija, Poljska
	Jaja	2	Letonija
	Med	1	Njemačka
	Ukupno	12	

nesukladnih uzoraka. Ostale kategorije za koje su prijavljeni uzorci koji nisu sukladni uključuju ribe, ovce/koze, kuniće, uzgojenu divljač, med i mlijeko (EFSA, 2014.).

U okviru praćenja ostataka kloramfenikola u nacionalnim planovima članica Europske unije u razdoblju od 2013. do 2015. također su ustvrđene povišene koncentracije kloramfenikola (Tabela 3). U tome razdoblju ustvrđeno je ukupno 50 nesukladnih rezultata kloramfenikola u različitim vrstama životinja i njihovih proizvoda (EFSA, 2015., 2016., 2017.). Najveći broj nesukladnih rezultata odnosio se na uzorke goveda, svinja i peradi s po 13, 11 i 9 nesukladnih uzoraka. Uspoređujući tri navedene godine provođenja nacionalnih planova vidi se tendencija smanjenja nesukladnih uzoraka s ukupno 23 u

2013. na 12 nesukladnih u 2015. godini. U 2015. godini u Hrvatskoj su isto tako u okviru nacionalnog plana praćenja ostataka zabranjenih tvari ustvrđena 2 nesukladna rezultata kloramfenikola, jedan u mesu goveda i jedan u mesu peradi (EFSA, 2017.). Države članice, nakon ustvrđivanja povišenih koncentracija, provode naknadne istrage za ustvrđivanje uzroka pojave ostataka kloramfenikola u hrani životinjskog podrijetla i sprečavanje ponavljanja te provode određene mjere prema Direktivi 96/23/EZ (EC, 1996.). Budući da je kloramfenikol zabranjena tvar očekivani ishod nalaza kloramfenikola je njegova nezakonita uporaba, odnosno zlouporaba kao veterinarskog lijeka u životinja namijenjenih za prehranu (EFSA, 2014.).

Zemlje članice EU ostale nesukladne rezultate kloramfenikola u kontroli

Tabela 4. Uzorci mesa i mesnih proizvoda s nesukladnim koncentracijama kloramfenikola prijavljeni u RASFF sustav u razdoblju 2008.-2017.

Datum prijave	Članica prijave	Vrsta proizvoda	Koncentracija kloramfenikola (µg/kg)	Zemlja podrijetla proizvoda
14/12/2016.	Ujedinjeno Kraljevstvo	svinjska crijeva	4,6	Kina
21/12/2012.	Portugal	ovčja crijeva	0,5	Pakistan
26/11/2012.	Danska	crijeva	Nije navedena	Australija, procesuirano u Kini
16/10/2012.	Danska	crijeva	0,35	Danska, procesuirano u Kini
16/10/2012.	Danska	crijeva	0,35	Danska, procesuirano u Kini
21/09/2012.	Danska	svinjska crijeva	1,6; 0,47	Danska, procesuirano u Kini
06/09/2012.	Danska	svinjska crijeva	3,5	Danska, procesuirano u Kini
22/08/2012.	Danska	svinjska crijeva	1,91	Poljska, procesuirano u Kini
21/08/2012.	Italija	meso peradi	0,88	Italija
23/03/2012.	Belgija	zečije meso	Nije navedena	Kina
29/03/2011.	Danska	crijeva	0,48	Kina
23/03/2011.	Danska	crijeva	0,87	Kina
08/03/2011.	Danska	svinjska crijeva	0,45; 0,31	Danska, procesuirano u Kini
13/05/2010.	Luksenburg	svinjska crijeva	Nije navedena	Pakistan
20/11/2009.	Francuska	ovčja crijeva	0,56	Indonezija
15/10/2009.	Francuska	zečije meso	0,3	Kina
16/01/2009.	Belgija	zečije meso	4	Kina
09/06/2008.	Italija	ovčja crijeva	0,43	Novi Zeland, procesuirano u Kini

proizvoda koji se upućuju na tržište EU prijavljuju u centralni sustav brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje - RASFF (engl. *Rapid Alert System for Food and Feed*) (EC, 2002.b). U razdoblju od 2008. do 2017. godine prijavljeno je ukupno 108 različitih proizvoda s nesukladnim koncentracijama kloramfenikola (RASFF, 2008.-2017.). U Tabeli 4 su prikazane vrste mesa i mesnih proizvoda s nesukladnim koncentracijama kloramfenikola koji su prijavljeni u RASFF sustav u razdoblju 2008.-2017. Ukupno je prijavljeno 18 proizvoda od koji su 14 crijeva životinja, 3 meso žičeva i jedno meso peradi. Koncentracije su se kretale od 0,3 do 4,6 µg/kg, a najviša koncentracija od 4,6 µg/kg kloramfenikola određena je u uzorcima svinjskih crijeva podrijetlom iz Kine u 2016. godini u Ujedinjenom Kraljevstvu.

U vremenu od 2013. do 2017. prijavljeno je 20 enzimskih preparata s povišenim koncentracijama kloramfenikola. Najviše vrijednosti od 2100 do 31400 µg/kg određene su u 2013. u enzimima koji sadrže pektinazu iz Njemačke, sa sirovinom iz Indije. Postotci ostalih vrsta proizvoda s povišenim koncentracijama kloramfenikola prijavljenih u RASFF sustav u vremenu od 2008. do 2017. godine bili su: rakovi 25,9%, med i matična mliječ 7,4%, mlijeko i mliječni proizvodi 9%, hrana za životinje 13,9%, riba i proizvodi 5,6%, dodatci hrani 5,6% i drugi. Najviša koncentracija od 125 µg/kg u kategoriji vrsta hrane rakovi utvrđena je u ohlađenim jastozima podrijetlom iz Sjedinjenih Država u 2011. godini.

U 2017. godini u RASFF sustav su prijavljeni nesukladni uzorci s povišenim vrijednostima kloramfenikola u sljedećim državama: Njemačka - smrznuti bijeli škampi (*Penaeus vannamei*) podrijetlom iz Vijetnama (0,46 µg/kg), Norveška - smrznuti riblji štapići iz Vijetnama (<0,1 µg/kg), Belgija - sirove kozice (*Litopenaeus vannamei*) iz Indije (0,52 µg/kg), Poljska - med iz Rusije (1,34 µg/kg) (RASFF, 2008.-2017.).

U analizama rizika izloženosti korištenjem prehranbenih namirnica koje bi mogle sadržavati kloramfenikol Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority, EFSA*) ustvrdila je da kontrola kloramfenikola na zadanoj koncentracijskoj razini od 0,3 µg/kg pokriva sve potencijalne izloženosti prehrani. U izračun izloženosti uzete su količine u prehranbenim proizvodima životinjskog podrijetla, hrani u kojima su prisutni enzimski pripravci koji mogu kontaminirati hranu kloramfenikolom te žitarice i proizvodi na bazi žitarica u kojima bi se kloramfenikol mogao prirodno pojaviti. Uzevši u obzir prehranbene navike u različitim zemljama EU izračunata je srednja kronična izloženost prehranom od 11 do 17 ng/kg tjelesne mase na dan za malu djecu i od 2,2 do 4,0 ng/kg tjelesne mase na dan za odrasle (EFSA, 2014.).

Rezultati u ovome istraživanju pokazuju da su meso i mesni proizvodi zdravstveno ispravni s obzirom na ostatke kloramfenikola. Usprkos zabrani primjene, ostaci kloramfenikola sustavno se pronalaze u EU u svim vrstama proizvoda životinjskog podrijetla što je zabrinjavajuće za potrošače. Stoga je njegova kontrola imperativna na svim razinama proizvodnje hrane životinjskog podrijetla te posebice kontrole uvoznih pošiljaka različitih proizvoda.

Sažetak

Usprkos zabrani primjene kloramfenikola u veterinarskoj medicini za životinje namijenjene za prehranu u Europskoj uniji (EU) više od dva desetljeća, njegovi ostaci se sustavno određuju u svim vrstama proizvoda životinjskog podrijetla. Svrha ovog istraživanja je određivanje koncentracija kloramfenikola u uzorcima mesa i mesnih proizvoda primjenom ELISA metode. Validacija metode je provedena prema kriterijima Odluke Komisije 2002/657/EC. Određeni su sljedeći parametri za meso i mesne proizvode: sposobnosti dokazivanja CCβ 0,05 i 0,13

µg/kg; iskorištenje 80,8 i 100%; koeficijent varijacije 13 i 14,2%; granice detekcije LOD 0,005 i 0,019 µg/kg; granice kvantifikacije LOQ 0,010 i 0,068 µg/kg. Dobiveni validacijski parametri su u skladu s kriterijima Odluke Komisije te se metoda može smatrati prikladnom za kvantifikaciju kloramfenikola u mesu i mesnim proizvodima. U ovome istraživanju koncentracije kloramfenikola određivane su u mesu goveda i svinja te različitim mesnim proizvodima sakupljenim tijekom 2015., 2016. i 2017. godine. U ukupno 392 uzorka koncentracije kloramfenikola su se kretale u rasponu od 0,0003 do 0,22 µg/kg. Najveća vrijednost od 0,22 µg/kg izmjerena je u mesnom naresku. Srednje vrijednosti kloramfenikola za meso i mesne proizvode određene su u rasponu od 0,0076 do 0,034 µg/kg. Nisu ustvrđene vrijednosti iznad propisane granice najmanje zahtjevane učinkovitosti izvedbe metode (MRPL) od 0,3 µg/kg. Prema podatcima Europske agencije za sigurnost hrane u okviru praćenja ostataka kloramfenikola u nacionalnim planovima članica EU u razdoblju od 2013. do 2015. određeno je ukupno 50 uzoraka različitih životinjskih vrsta te proizvoda s povišenim koncentracijama kloramfenikola. Najveći broj nesukladnih rezultata je zabilježen u goveda i svinja. U 2015. godini su u Hrvatskoj utvrđena 2 nesukladna rezultata kloramfenikola, jedan u mesu goveda te drugi u mesu peradi. U razdoblju od 2008. do 2017. godine u centralni sustav brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje (RASFF) u koji se evidentiraju nesukladni proizvodi koji se upućuju na tržište EU, prijavljeno je ukupno 108 različitih proizvoda s nesukladnim koncentracijama kloramfenikola. Među nesukladnima je prijavljeno 18 mesnih proizvoda od koji su 14 bila crijeva životinja, 3 meso zečeva i jedno meso peradi. Rezultati u ovome istraživanju pokazuju da su analizirani mesni proizvodi zdravstveno ispravni s obzirom na ostatke kloramfenikola. Međutim, s obzirom na navedene nesukladne rezultate na razini EU imperativna je njegova kontrola na svim razinama proizvodnje hrane životinjskog podrijetla, posebice kontrole uvoznih pošiljaka različitih proizvoda.

Ključne riječi: kloramfenikol, meso, mesne proizvodi, sigurnost hrane, ELISA, validacija

Literatura

1. AKHTAR, M. H., K. ABO EL SOOUD, A. M. SHEHATA and H. ANWAR (1996): Fate and residues of 14C-chloramphenicol in laying chickens. *J. Environ. Sci. Health B* 31, 1061-1084.
2. ANADON, A., P. BRINGAS, M. R., MARTINEZ-LARANAGA and M. J. DIAZ (1994): Bioavailability, pharmacokinetics and residues of chloramphenicol in the chicken. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 17, 52-58.
3. BARRETO, F., C. RIBEIRO, R. BARCELLOS HOFF and T. DALLA COSTA (2016): Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1449, 48-53.
4. BILANDŽIĆ, N., S. TANKOVIĆ, I. VARENINA, B. SOLOMUN KOLANOVIĆ and M. SMAJLOVIĆ (2012): Chloramphenicol residues in muscle of rainbow trout following two different dose treatments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89, 461-466.
5. CERKVENIK-FLAJS, V. (2006): Performance characteristics of an analytical procedure for determining chloramphenicol residues in muscle tissue by gas chromatography-electron capture detection. *Biomed. Chromatogr.* 20, 985-992.
6. DOUNY, C., J. WIDART, E. DE PAUW, G. MAGHUIN-ROGISTER and M.-L. SCIPPO (2013): Determination of chloramphenicol in honey, shrimp and poultry meat with liquid chromatography-mass spectrometry: validation of the method according to Commission Decision 2002/657/EC. *Food Anal. Meth.* 6, 1458-1465.
7. DOWLING, P. M. (2006): Chloramphenicol, Thiamphenicol, and Florfenicol. In: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 4th Edition, Blackwell Publishing, pp. 241-247.
8. EC (1990): Council Regulation 2377/90/EEC of 26 June 1990 on laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Commun.* L224, 1-8.
9. EC (1994): Commission Regulation (EC) No 2701/94 amending Annexes I, II, III and IV to Council Regulation (EEC) no. 2377/90. *Off. J. Eur. Commun.* L287, 7.
10. EC (1996): Council Directive 96/23/EC of 29 of April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Off. J. Eur. Commun.* L 125, 10-32.
11. EC (2002a): Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Commun.* L221, 8-28.
12. EC (2002b): Regulation (EC) No 178/2002 of the European parliament and of the council of 28 January 2002 laying down the general principles

- and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Off. J. Eur. Commun.* L31, 1-24.
13. EC (2003): Commission Decision 2003/181/EC of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin. *Off. J. Eur. Commun.* L71, 17-18.
 14. EC (2010): Council Regulation 37/2010/EU of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Commun.* L15, 1-72.
 15. EFSA (2014): Scientific Opinion on Chloramphenicol in food and feed. European Food Safety Authority. *EFSA Journal* 12, 3907.
 16. EFSA (2015): Report for 2013 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal product. EFSA Supporting publication 2015:EN-723.
 17. EFSA (2016): Report for 2014 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal product. EFSA Supporting publication 2016:EN-923.
 18. EFSA (2017): Report for 2015 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal product. EFSA Supporting publication 2017:EN-1150.
 19. IARC (1990): IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans, 50, Chloramphenicol. Lyon: IARC Press, pp. 169-193.
 20. IMPENS, S., W. REYBROECK, J. VERCAMMEN, D. COURTHEYN, S. OOGHE, K. DE WASCH, W. SMEDTS and H. DE BRABANDER (2003): Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC-MS2 and LC-MS2. *Anal. Chim. Acta.* 483, 153-163.
 21. PENG, L., Q. YUEMING, C. HUIXIA, K. YING, T. YINGZHANG, W. DANING and X. MENGXIA (2006): Simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol residues in animal tissues by gas chromatography/mass spectrometry. *Chin. J. Chromatogr.* 24, 14-18.
 22. RASFF (2008-2017): Rapid alert system for food and feed (RASFF). Dostupno na: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchByKeyword&NewSearch=1&Keywords=chloramphenicol>. Pristupljeno 23.02.2018.
 23. RØNNING, H., T. K. EINARSEN and T. N. ASP (2006): Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC. *J. Chromatogr. A* 1118, 226-233.
 24. SCORTICHINI, G., L. ANNUNZIATA, M. N. HAOUET, F. BENEDETTI, I. KRUSTEVA and R. GALARINI (2005): ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria. *Anal. Chim. Acta* 535, 43-48.
 25. ŠEOL, B., K. MATANOVIĆ i S. TERZIĆ (2010): Antimikrobna terapija u veterinarskoj medicini. Herak-Perković, V. (ured.), Zagreb, HR, Medicinska naklada, str. 45-49.
 26. TAJIK, H., H. MALEKINEJAD, S. M. RAZAVIROUHANI, M. R. PAJOUHI, R. MAHMOUDI and A. HAGHNAZARI (2010): Chloramphenicol residues in chicken liver, kidney and muscle: A comparison among the antibacterial residues monitoring methods of Four Plate Test, ELISA and HPLC. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2464-2468.
 27. WANG, Q., H. ZHAO, C. XI, G. WANG, D. CHEN and S. DING (2014): Determination of chloramphenicol and zeranols in pig muscle by immunoaffinity column clean-up and LC-MS/MS analysis. *Food Addit. Contam. A* 31, 1177-1186.
 28. WHO (2004): Food Additives series: 53, Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food, World Health Organization, Geneva, pp. 7-84.
 29. ZHANG, S., Z. LIU, X. GUO, L. CHENG, Z. WANG and J. SHEN (2008): Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 875, 399-404.

Survey of chloramphenicol residues in meat and meat products during the period 2015 - 2017

Nina BILANDŽIĆ, PhD, Grad. Biotechnology Eng., Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Petra VRKLJAN, Mag. Eng. Techn. Aliment., Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Croatia; Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, Grad. Food Technology Eng., Ivana VARENINA, PhD, Grad. Biotechnology Eng., Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Marina KR PAN, PhD, Assistant Professor, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Croatia; Mirjana HRUŠKAR, PhD, Grad. Biotechnology Eng., Full Professor, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Croatia

Despite the ban on the use of chloramphenicol in veterinary medicine in animals intended for nutrition within the European Union (EU) for more than two decades, its residues are systematically determined in all types of animal products. The purpose of this study was to determine chloramphenicol concentrations in meat and meat products using the ELISA method. Method validation was performed according to Commission Decision 2002/657/EC. The following parameters for meat and products were determined: detection capability ($CC\beta$) 0.05 and 0.13 $\mu\text{g}/\text{kg}$; recovery 80.8 and 100%; coefficient of variation 13 and 14.2%; detection limit (LOD) 0.005 and 0.019 $\mu\text{g}/\text{kg}$; quantification limit (LOQ) 0.010 and 0.068 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The obtained validation parameters were in accordance with the criteria of the Commission Decision, and the method is suitable for the quantification of chloramphenicol in meat and meat products. In this study, chloramphenicol concentrations were determined in beef and pork meat and various meat products collected during 2015, 2016 and 2017. In a total of 392 samples, chloramphenicol concentrations ranged from 0.0003 to 0.22 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The highest value of 0.22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was measured in luncheon meat. Mean chloramphenicol values for all tested meat and meat products ranged from 0.0076 to 0.034 $\mu\text{g}/\text{kg}$. No values were found to exceed the prescribed minimum required performance

limit (MRPL; 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) for the method used for chloramphenicol quantification. According to the data of the European Food Safety Agency, based on national monitoring plans of chloramphenicol residues in EU Member States for the period 2013–2015, a total of 50 samples of different animal species and products were determined to have elevated chloramphenicol concentrations. The highest number of non-compliant results was recorded in beef and pork meat. In 2015, two non-compliant results of chloramphenicol were found in Croatia, one in beef and the other in poultry meat. In the period from 2008 to 2017, a total of 108 different products with non-compliant chloramphenicol concentrations were reported in the Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) for non-compliant products intended for the EU market. Among those non-compliant samples were 18 meat products, of which 14 were offal of different animal species, three were rabbit meat and one poultry meat. The results of this study showed that the analysed meat products are suitable for human consumption with regard to the measured chloramphenicol residues. However, given the non-compliant results at the EU level, control of these residues is essential at all levels of animal food production and, in particular, control of import consignments of different products.

Key words: *chloramphenicol, meat, meat products, food safety, ELISA, validation*