

OSTANKI ANTIBIOTIKOV IN DRUGIH ZDRAVIL V ŽIVILIH ŽIVALSKEGA IZVORA

RESIDUES OF ANTIMICROBIALS AND OTHER DRUGS IN FOOD OF ANIMAL ORIGIN

AVTOR / AUTHOR:

Izr. prof. dr. Ksenija Šinigoj Gačnik, univ. dipl. kem.

*Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta,
Inštitut za varno hrano krmu in okolje,
Gerbičeva 60, Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: ksenija.gacnik@vf.uni-lj.si

1 UVOD

V primeru bolezni je potrebno zdraviti rejne in proizvodne živali (govedo, konje, ovce, koze, prašiče, kunce, perutnino, gojene ribe in drugo akvakulturo, čebele, gojeno divjad) ter ljubiteljske živali (pse, mačke, ptice, razne plazilce itd.). V veterinarski medicini poznamo poleg samega zdravljenja

POVZETEK

Uporabi zdravil se v veterinarski medicini ne moremo izogniti. Kadar zbolijo, je potrebno zdraviti tako rejne in proizvodne živali (govedo, konje, ovce, koze, prašiče, kunce, perutnino, gojene ribe in drugo akvakulturo, čebele, gojeno divjad) ter ljubiteljske živali (pse, mačke, ptice, razne plazilce itd.). Pogosto uporabljamo veterinarska zdravila tudi v preventivne namene, npr. antihelmintike. Posledica vsake uporabe zdravil v veterinarski medicini so rezidua, t.j. njihovi ostanki v živilih živalskega izvora, ki se vključujejo v prehransko verigo ljudi. Najdemo jih v užitnih tkivih živali, na primer v mišičnem tkivu, v jetrih, v ledvicah, v maščobnem tkivu, v maščobi s kožo pri prašičih ali perutnini in v mišičnini s kožo pri ribah, pa tudi v mleku, v jajcih in v medu.

Pri zdravilih za uporabo v veterinarski medicini moramo vedeti, kako se farmakološko aktivne učinkovine kopičijo in zadržujejo v različnih tkivih in kako se iz njih izločajo. Pomembno pa je tudi njihovo zaostajanje v mleku, v jajcih ali v medu. Zato mora proizvajalec pri registraciji veterinarskega zdravila, za razliko od humanega zdravila, poleg druge dokumentacije predložiti še rezultate tako imenovane rezidualne študije, s katero je mogoče določiti pravila uporabe pripravkov brez tveganja za zdravje ljudi. Kadar uporabljamo zdravila pri rejnih in proizvodnih živalih, je treba upoštevati karencu, to je čas, ki mora preteči od zadnjega dajanja zdravila do uporabnosti živila. Ta nam namreč zagotavlja, da je ostankov zdravil in njihovih presnovkov v živilih živalskega izvora manj od največje dovoljene količine.

KLJUČNE BESEDE:

veterinarska zdravila, ostanki v živilih, karencu

ABSTRACT

The use of drugs cannot be avoided in veterinary medicine. If they fall ill, food producing animals (cattle, horses, sheep, goats, pigs, rabbits, poultry, farmed fish and other aquaculture, bees, farmed game) as well as pets (dogs, cats, birds, various reptiles, etc.) must be treated. Veterinary medicines are often used also for preventative purposes, for example antihelmintics. Each use of drugs in veterinary medicine results in residues - the residues of drugs in food of animal origin, which are intro-

duced in the human food chain. They are found in edible animal tissue, such as in muscle tissue, in liver, in kidneys, in fat tissue, in fat with skin from pigs or poultry, and in muscle tissue with skin from fish, as well as in milk, eggs, and honey.

For veterinary drugs, we must know how the residues of pharmacologically active ingredients accumulate and stay in various tissues, and how they are removed from them. But also important is their accumulation in milk, eggs, or honey. That is why when registering a veterinary medicinal product, unlike a human drug, the manufacturer must, along with other documentation, also compile a so-called residual study, with which the manner of use of the drug without risk to human health may be determined. When drugs are used in food producing animals, the withdrawal period must be taken into account - the time that must elapse from the last drug administration before the food may be consumed. That is what guarantees that the drug residues and their metabolites in food of animal origin are at levels below the maximum permitted limits.

KEY WORDS:

veterinary drugs, residues in food, withdrawal period

še preventivno obravnavo živali z namenom preprečevanja izbruhov bolezni. Poudariti moramo, da je v Evropski uniji prepovedana uporaba pripravkov za izboljšanje izrabe krme, in s tem pospeševanje rasti. Pri zdravljenju rejnih in proizvodnih živali se postavlja vprašanje zdravstvene neoporečnosti tako proizvedenih živil živalskega izvora. Posledica vsake uporabe zdravil v veterinarski medicini so namreč rezidua, t.j. njihovi ostanki v živilih živalskega izvora, ki se vključujejo v prehransko verigo ljudi. Najdemo jih v užitnih tkivih živali, to so mišično tkivo, jetra, ledvice, maščobno tkivo, maščoba s kožo pri prašičih in perutnini ter mišičnina s kožo pri ribah. Iščemo pa jih tudi v živalskih proizvodih na primer v mleku, v jajcih in v medu. Z uporabo zdravil za zdravljenje rejnih in proizvodnih živali torej lahko vnesemo zdravila ali njihove metabolite v hrano za ljudi, zato je potrebno ukrepati tako, da ti ostanki ne bodo vplivali na zdravje potrošnikov.

Po definiciji, ki so jo postavili v Evropski uniji najprej z Uredbo Sveta (EGS) št. 2377/90 (1) in ponovno z Uredbo (ES) št. 470/2009 (2), so »rezidua veterinarskih zdravil vse farmakološko aktivne substance, ki izhajajo iz izhodnega pripravka

ali njegovih razpadnih produktov in njihovih metabolitov, ter ostanejo v živilih, ki jih dobimo od živali, tretiranih z veterinarskim pripravkom«. V večini primerov metaboliti teh pripravkov niso tako toksični kot izhodna substanca, so pa tudi primeri, ko so njihovi metaboliti bolj toksični.

Problematika reziduuov veterinarskih zdravil je področje, ki spada v sklop veterinarsko-sanitarnega nadzora nad živilih živalskega izvora. S tem naj bi za varovanje zdravja potrošnikov zagotavljali zdravstveno neoporečno hrano. Nadzor pa lahko opravljamo zgolj z objektivnimi in nepristranskimi raziskavami in s ti. dobro veterinarsko prakso.

Zavedati se moramo, da ima pri reji živali uporaba veterinarsko-medicinskih pripravkov za posledico njihove ostanke v živalskih tkivih (v mišičnem tkivu, v maščobnem tkivu in v organih), v mleku, v jajcih, pa tudi v sladkovodnih ali morskih ribah in v medu.

Za preprečevanje pojavljanja reziduuov veterinarskih zdravil v živilih živalskega izvora je nujno potrebno dobro poznavanje »obnašanja« farmakološko aktivne učinkovine v živalskem organizmu, se pravi farmakokinetiko in farmakodinamiko; za vsako učinkovino je potrebno vedeti, v katerih organih se zadržuje najdlje, nujno pa je tudi poznavanje časa izločanja preparata iz organizma glede na različne možne poti vnosa.

Da bi zaščitili potrošnike, so določene mejne vrednosti ostankov učinkovin (angl. *maximum residue limit*, MRL) za mleko, jajca in različna tkiva klavnih živali, perutnine in rib (3). Primarno so določene vrednosti MRL na osnovi toksikoloških meril, pri tem se uporablja načelo sprejemljivega dnevnega vnosa (angl. *acceptable daily intake*, ADI). Poleg toksikoloških podatkov je potrebno upoštevati tudi mikrobiološke in farmakološke lastnosti učinkovin. Končno določanje največje še dovoljene količine reziduuov pa je še nekoliko zahtevnejše, kar je razvidno iz omenjenih parametrov oziroma izvedene toksikološke študije. Nekatere učinkovine, pri katerih ni mogoče določiti za človeka še varne količine reziduuov v živilih, so prepovedane za uporabo pri rejnih in proizvodnih živalih, torej pri živalih, namenjenih za prehrano ljudi (kloramfenikol, dietilstilbestrol, nitrofurani, beta-agonisti in drugi).

2 UPORABA PROTIMIKROBNIH IN DRUGIH ZDRAVIL ZA REJNE IN PROIZVODNE ŽIVALI

Danes pridobivamo največ živil živalskega izvora z intenzivno farmsko rejo. Vsak izbruh bolezni pri taki proizvodnji



pomeni veliko ekonomsko škodo. Da bi to preprečili, je potrebno zagotoviti dobro upravljanje kmetij, predvsem glede zootehnike in higiene. Velikokrat je potrebno tudi preventivno tretirati oz. cepiti živali. Tudi izbira primernih pasem živali za rejo in skrb za kakovostno in neoporečno krmo vplivata na zdravje živali.

Ne glede na vse povedano pa je uporaba veterinarskih zdravil nujna. Lahko jih dajemo posameznim živalim, ali pa kar vsem živalim v čredi. V tem primeru govorimo o masovnem zdravljenju.

Ko gre za velike živali, dajemo zdravila najpogosteje posamezni živali, na primer pri zdravljenju mastitisov pri kravah. Zdravila dajemo parenteralno ali peroralno. Posamezno najpogosteje zdravimo tudi prašiče ali teleta zaradi respiratornih težav ali zaradi prizadetih prebavil. Omeniti je potrebno tudi dajanje pomirjeval prašičem in govedu pred prevozom v klavnico. S tem preprečimo izgube zaradi stresa, ki ga doživljajo živali, kar se kaže v slabi kakovosti mesa.

Pri tako imenovanem masovnem zdravljenju pa naenkrat zdravijo vse živali v čredi, ali v hlevu. Tokrat je pot vnosa zdravila peroralna; zdravilo je lahko raztopljeno v vodi ali v mleku, ali pa je primešano krmi. Med podobne postopke prištevamo tudi dajanje sredstev proti zajedavcem v čredah govedi, ovc ali koz. Razlikovati moramo med dajanjem manjših količin zdravil zdravim živalim in dajanjem večjih količin zdravil bolnim živalim. Pri zdravih živalih naj omenimo dajanje kokcidiostatikov piščancem brojlerjem, za kar ne potrebujemo veterinarskega recepta. Pri zdravljenju bolnih živali pa mora biti vedno vključen lečeči veterinar. Poudariti moramo, da je v Evropski uniji prepovedano dajanje pripravkov za povečanje izrabe krme in za pospeševanje prirasta živali.

3 VARNOST OSTANKOV

3.1 SPREJEMLJIV DNEVNI VNOS

Enako kot v humani medicini, je potrebno registrirati tudi pripravke za uporabo v veterinarski medicini. V ta namen moramo temeljito poznati lastnosti učinkovin v pripravkih, torej njihovo farmakokinetiko in farmakodinamiko ter njihovo toksičnost, poznati moramo njihovo učinkovitost in to za tisto živalsko vrsto, za katero so namenjeni. Pri zdravljenju za uporabo v veterinarski medicini pa moramo dobro poznati tudi kopičenje in zadrževanje učinkovin v različnih živalskih

tkivih ter tudi njihovo izločanje iz tkiv, pa tudi njihov pojav v mleku, v jajcih ali v medu. Proizvajalec mora, poleg vse druge dokumentacije, izdelati še tako imenovano rezidualno študijo, s katero je možno določiti pravila uporabe pripravkov brez tveganja za zdravje ljudi, kar smo že zapisali.

Z izjemo nekaterih substanc, katerim ni potrebno določiti mejne vrednosti ostankov, moramo za vse učinkovine poznati največji sprejemljiv dnevni vnos, se pravi vrednost ADI (angl. *acceptable daily intake*, ADI), ki ga ne smemo preseči. Torej, ostanki veterinarskih zdravil v živilih pomenijo potencialno tveganje za ljudi. Velikost tveganja je odvisna od nevarnosti zaradi ostankov učinkovin skupaj z njihovimi metaboliti in razkrojnimi produkti, zaužitimi s hrano, v našem primeru z živilih živalskega izvora.

Vrednost ADI določimo preko poznavanja količine, ki ne povzroča opaznih učinkov, (angl. *no-observed effect level*, NOEL). Pri izračunu upoštevamo povprečno telesno maso odrasle osebe, za potrebe veterinarskih zdravil vzamemo maso 60 kg. ADI torej izračunamo po enačbi:

$$ADI = NOEL * 60 / SF \text{ mg/osebo/dan}$$

Vrednost varnostnega faktorja (angl. *safety factor*, SF) je običajno 100. Dobimo ga zaradi upoštevanja variabilnosti med posameznimi osebkami in zaradi prenosa podatkov od živali na ljudi. Varnostni faktor je lahko tudi večji, na primer če so podatki pomanjkljivi. Pri substancah, ki imajo pomembne farmakološke učinke (pomirjevala, anestetiki, beta-agonisti), je potrebno poznati količino, ki nima farmakoloških vplivov. Za protimikrobne učinkovine pa moramo poznati še najmanjšo zaviralno koncentracijo (angl. *minimal inhibitory concentration*, MIC₅₀). Ostanki protimikrobnih snovi v živilih so nezaželeni, saj lahko vplivajo na bakterije v debelem črevesu. Oslabijo namreč obrambni učinek gastrointestinalne mikroflore, kar ima za posledico vstop in rast potencialnih patogenih mikrobov. Nastanejo tudi razmere, ki omogočajo pojav odpornosti bakterij proti antibiotikom.

Vsekakor pri določanju vrednosti ADI izberemo tisto, ki je najmanjša od treh možnih: toksikološke, farmakološke ali mikrobiološke. Kadar ne moremo določiti NOEL, to je predvsem v primerih rakotvornih in teratogenih substanc, takih učinkovin ne smemo uporabljati pri rejnih in proizvodnih živalih.

3.2 MEJNE VREDNOSTI OSTANKOV V ŽIVILIH ŽIVALSKEGA IZVORA

Podrobnosti določanja mejnih vrednosti ostankov, ali na kratko vrednosti MRL, so natančno opisane v Volumnu 8

Preglednica 1: Dnevna prehrabena košarica živil živalskega izvora (4)

Table 1: Daily food basket of food of animal origin (4)

Sesalci		Perutnina		Ribe		Čebele	
mišičnina	0,3 kg	mišičnina	0,3 kg	mišičnina/ koža ²	0,3 kg	med	0,02 kg
maščoba ¹	0,05 kg	maščoba/ koža ²	0,09 kg				
jetra	0,1 kg	jetra	0,1 kg				
ledvice	0,05 kg	ledvice	0,01 kg				
mleko	1,5 kg	jajca	0,1 kg				

¹ pri prašičih koža z maščobo

² v naravnem razmerju

(4). Določene so tako, da smemo vsak dan s hrano, ki vsebuje ostanke zdravil na ravni MRL, zaužiti neko učinkovino največ na vrednosti ADI ali pa manj. Dnevna količina zaužitih živil živalskega izvora pa je tudi predpisana in je prikazana v Preglednici 1 (4). Za tako imenovano košarico dnevnega vnosa se upošteva 0,5 kg mesa, ki je sestavljeno iz 0,3 kg mišičnine, 0,1 kg jeter, 0,05 kg ledvic in 0,05 kg maščobe. Dodamo pa ji lahko še 1,5 litra mleka, če gre za sesalce. Če jemo perutnino, je razmerje nekoliko drugačno, še vedno pa je osnova 0,5 kg mesa (0,3 kg mišičnine, 0,1 kg jeter, 0,01 kg ledvic in 0,09 kg kože z maščobo) ter 0,1 kg jajc. Pri uživanju rib se upošteva 0,3 kg mišičnine s kožo v naravnem razmerju. K dnevni količini zaužite hrane lahko prištejemo še 0,02 kg medu čebel, ki so jih zdravili z dovoljenimi pripravki.

Poleg vrednosti MRL je potrebno določiti tudi obliko učinkovine, na katero se vrednost MRL nanaša. V večini primerov je to kar osnovna oblika učinkovine, včasih pa se MRL nanaša na vsoto matične oblike in njenega najpomembnejšega metabolita. Tak primer je enrofloksacin, kinolon ki se uporablja zgolj za zdravljenje živali, in se v veliki meri presnovi v ciprofloksacin. Pri določanju vrednosti MRL je potrebno poznati tudi delež tiste oblike učinkovine, na katero se MRL nanaša glede na skupno količino vseh možnih oblik te učinkovine v tkivih. Omenjene oblike so vsi metaboliti, vezani ostanki in razpadni produkti. Tovrstne preiskave opravimo z radioaktivno označenimi spojinami. V preglednici, ki sledi, so prikazani primeri vrednosti MRL (Preglednica 2) (3).

Preglednica 2: Nekaj primerov predpisanih vrednosti MRL (3).

Table 2: Some examples of MRLs prescribed (3).

Učinkovina	Vrsta živali	MRL	Tkiva/živila
Amoksicilin Ampicilin Benzilpenicilin	vse rejne živali	50 µg/kg 4 µg/kg	meso, maščoba, jetra, ledvice mleko
Cefacetril	govedo (samo za intramamarno dajanje)	125 µg/kg	mleko
Amitraz	govedo	200 µg/kg 10 µg/kg	maščoba, jetra, ledvice mleko
	ovce	400 µg/kg 100 µg/kg 200 µg/kg 10 µg/kg	maščoba jetra ledvice mleko
	koze	200 µg/kg 100 µg/kg 10 µg/kg	maščoba, ledvice jetra mleko
	prašiči	400 µg/kg 200 µg/kg	maščoba s kožo jetra, ledvice
	čebele	200 µg/kg	med

4 DOLOČANJE KARENČNEGA OBDOBJA

Karenca je čas, ki mora preteči od zadnjega dajanja zdravila do zakola živali, ali ponovne uporabe jajc, mleka in medu. Karenco predlagajo proizvajalci zdravil za uporabo v veterinarski medicini in s tem zagotovijo, da po preteku določenega obdobja ostanki v tkivih ne bodo presejali vrednosti MRL. Proizvajalci pripravka morajo dokazati primernost predlagane karence s kliničnim poskusom na živalih, ki jim je pripravek namenjen.

Poskuse opravijo praviloma na zdravih živalih. Le izjemoma lahko poskus izvedejo tudi na bolnih živalih, vendar je v tem primeru potrebno točno navesti vrsto bolezni z vsemi podrobnostmi. Pripravek aplicirajo živalim v skladu z navodili, npr. peroralno ali parenteralno. Pomembno je, da se časi izločanja pri različnih načinih dajanja zdravila razlikujejo. Pri samem poskusu mora proizvajalec vedno izbrati največje predvidene odmerke in najdaljši predviden čas dajanja zdravila. Po končanem dajanju je potrebno ugotoviti vsebnost ostankov v tkivih živali ali njihovih produktih v izbranih časovnih intervalih. Ugotavljanje vsebnosti morajo opraviti najmanj v treh časovnih intervalih, ki naj bi bili ena-

komerno razporejeni. Število živali v časovnem intervalu mora biti dovolj veliko, da lahko pravilno ocenimo rezultate. V Preglednici 3 prikazujemo predpisano število živali za posamezno vzorčenje in tkiva, v katerih je potrebno določiti ostanke proučevane učinkovine (4).

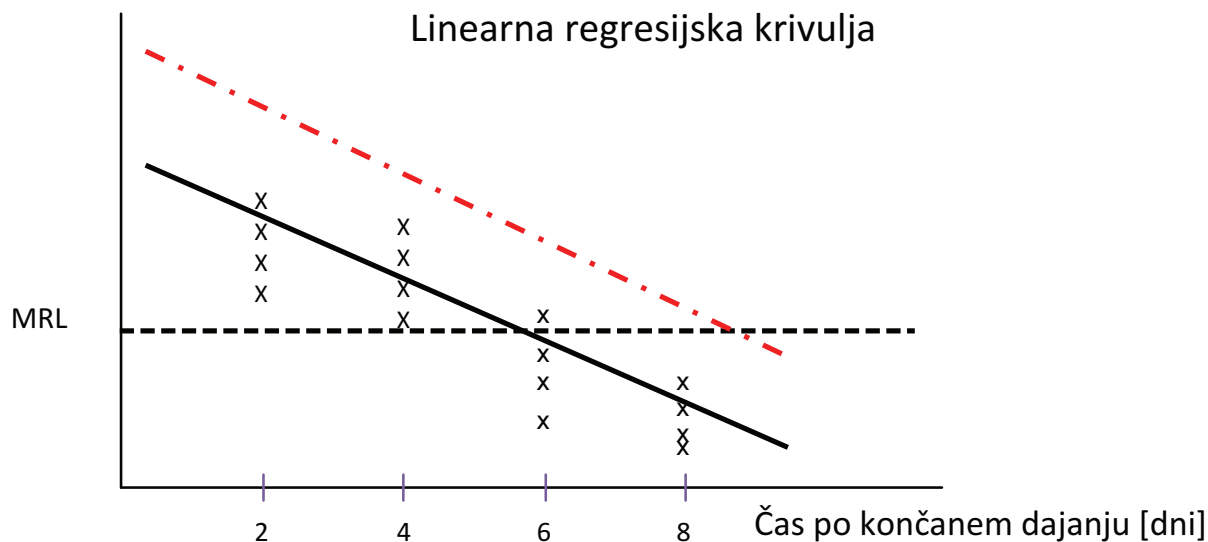
Na sliki 1 je prikazan primer dinamike izločanja zdravila in določitev karence (5). Kot je razvidno iz slike, se pri končni določitvi karence upošteva tudi tako imenovano sipanje, do katerega pride zaradi individualnih razlik med posameznimi živalmi, kar ima za posledico daljšo karenco. Na Evropski agenciji za zdravila (EMA) oziroma njenem Komiteju za zdravila za uporabo v veterinarski medicini (*Committee for medicinal products for veterinary use, CVMP*) so izdali navodila za izpeljavo in obdelavo podatkov, ki jih dobimo pri omenjenih kliničnih poskusih. Namenjena so objektivnemu določanju karence in enotnemu načinu dela. Navodila so pripravljena posebej za tkiva (5) in posebej za mleko (6). Karenco določimo s statističnim modelom, zato pa moramo zagotoviti med seboj neodvisne podatke in sicer tako, da analiziramo tkiva vsake živali posebej in rezultate korigiramo z izkoristkom analitske metode. Dobljena krivulja, ki nam prikazuje $\log_e C = f(t)$, mora biti linearna. Sledi konstruiranje gornje, 95 % tolerančne meje s 95 % zaupanjem. Karenca je obdobje, po katerem bodo koncentracije na gornji tolerančni meji manjše od vrednosti MRL.

Preglednica 3: Število živali potrebnih za vzorčenje in tkiva za določitev karence (4)

Table 3: Number of animals required for sampling and tissues to determine the withdrawal period (4)

Vrsta živali	Število živali v časovnem intervalu	Vrsta vzorca
Krave v laktaciji	8 (19) živali, vključno z živalmi v drugem obdobju laktacije; polovica živali v zgodnjem in polovica v poznem laktacijskem obdobju ¹	mleko
Velike živali	4 živali / čas vzorčenja	mišično tkivo, jetra, ledvice, maščoba, koža (pri prašičih), injekcijsko mesto
Perutnina	6 živali / čas vzorčenja	mišično tkivo, jetra, ledvice, koža z maščobo, injekcijsko mesto
Ribe	10 živali / čas vzorčenja	meso s kožo
Nesnice	10 jajc / čas vzorčenja	cela jajca

¹ Količina mleka se pri kravah v laktaciji spreminja. Po telitvi približno dva meseca strmo narašča, nato pa začne upadati do približno 305 dneva po telitvi. Sledi obdobje presušitve ko so krave ponovno breje.



Slika 1: Prikaz določitve karenčnega časa z uporabo statističnega modela (5).
Figure 1: Determination of the withdrawal period using the statistical model (5).

5 URADNI NADZOR NAD OSTANKI

V vseh državah članicah Evropske unije je potrebno izvajati nadzor nad ostanki nevarnih snovi v živalih in živilih živalskega izvora. Obseg nadzora je določen z Direktivo Sveta 96/23/ES (7) pa tudi z novo Uredbo o uradnem nadzoru, Uredbo (EU) 2017/625 Evropskega parlamenta in Sveta (8). S tem imamo predpisan obseg tako imenovanega monitoringa za živila živalskega izvora.

V tej direktivi so kontrolirane substance razdeljene v skupino A in skupino B. V skupino A so uvrščene vse prepovedane učinkovine, torej substance določene z Direktivo Sveta 96/22/ES (9) in nedovoljene učinkovine iz Uredbe Komisije (EU) št. 37/2010 (3). Prepovedane snovi so stilbeni, antitiroidna sredstva, steroidi, laktone rezorcilne kisline, beta-agonisti in aristolohična kislina, kloramfenikol, kloroform, kolhicin, dapson, klorpromazin, dimetridazol, metronidazol, ronidazol in nitrofurani. Substanc iz skupine A ne smemo dajati živalim, namenjenim za proizvodnjo živil. V skupini B so dovoljene učinkovine za uporabo v veterinarski medicini in onesnaževala iz okolja kot so pesticidi, poliklorirani bifenili, dioksini, toksične kovine, mikotoksini, razna barvila in drugo.

Monitoring ostankov pri živalih za proizvodnjo živil izvaja Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo

in varstvo rastlin. Vzorčijo se tista tkiva, v katerih pričakujemo največjo koncentracijo iskane učinkovine, posebej pa mleko, jajca in med. Prepovedane substance, stilbene, antitiroidna sredstva, steroide, laktone rezorcilne kisline in beta-agoniste pa določamo tudi pri živih živalih; v ta namen se vzorčita urin in/ali krvna plazma, na kmetijah pa tudi voda za pitje in krma.

6 ANALITSKE METODE

Tudi glede izbire analitskih metod, ki se uporabljajo pri določanju ostankov veterinarskih zdravil v živilih, imamo kar nekaj posebnosti. Zaradi hitrega razvoja analitskih tehnik, povezanih z novimi in občutljivejšimi aparati, nimamo predpisanih uradnih metod. Zavedati se moramo tudi, da vsi laboratoriji ne razpolagajo z enako analitsko opremo. Zaradi vsega navedenega lahko laboratoriji izberejo ali razvijejo svoje postopke, ki pa morajo slediti zahtevam opredeljenim v Odločbi Komisije 2002/657/ES (10), ki se nanašajo na validacijo izbrane metode. Pod pojmom validacija razumemo sistematično preverjanje karakteristik analitske metode glede na zahteve analiznega problema. Parametri, ki so pomembni pri vrednotenju tovrstnih metod so: selektivnost/specifičnost, meja zaznave, meja določanja, de-

lovno in linearno območje, pravilnost, natančnost, točnost, ponovljivost, obnovljivost, merska negotovost, občutljivost, robustnost in izkoristek.

Pri izbiri metod za določanje ostankov veterinarskih zdravil stremimo k izbiri metod za sočasno analizo več analitov, to je postopkov, s katerimi lahko določamo več različnih učinkovin hkrati. Vzorce najprej analiziramo s tako imenovanimi presejalnimi metodami, tem pa sledi ponovna analiza pozitivnih vzorcev s potrditvenimi metodami. Uporabljene metode morajo določiti vsebnosti učinkovin na najmanj polovici vrednosti MRL.

Kako pa je s prepovedanimi substancami? V tem primeru nimamo vrednosti MRL, ampak imamo za nekatere učinkovine predpisane vrednosti MRPL, to so meje najmanjše zahtevane učinkovitosti postopka (angl. *minimum required performance limit*). To pomeni, da morajo laboratoriji uporabljati tak postopek, s katerim lahko določijo vsaj vsebnost na MRPL nivoju z dovolj veliko gotovostjo. V Odločbah Komisije 2003/181/ES (11) in 2004/25/ES (12) imamo predpisane vrednosti MRPL za kloramfenikol, medroksiprogesteron acetat, metabolite nitrofurantoinov in malahit zeleno (Preglednica 4). Pri določanju prepovedanih substanc navedenih v Direktivi Sveta 96/22/ES (9) (stilbeni, derivati stilbenov, njihove soli in estri, antitiroidna sredstva, steroidi, laktoni rezorcilne kisline vključno z zeranoli, beta-agonisti) in prepovedanih substanc brez določene vrednosti MRPL iz Uredbe Komisije (EU) št. 37/2010 (3) (aristolohična kislina, kloroform, kolhicin, dapson, klorpromazin, dimetridazol,

metronidazol, ronidazol), pa tudi nekaterih pomirjeval, nesteroidnih protivnetnih zdravil, in še karbadoksa in olakvindoksa, si pomagamo z navodilom, ki so ga izdali Evropski referenčni laboratoriji za rezidua (13).

V Odločbi Komisije 2002/657/EC (10) najdemo podrobna navodila, kako izvajati in validirati kvantitativne metode, predpisani pa so tudi kriteriji, ki jih moramo dosegati. Za validacijo analiznih postopkov sta dopuščena dva pristopa. Pri prvem klasičnem pristopu je potrebno trikrat neodvisno analizirati po šest paralelnih vzorcev na treh koncentracijskih nivojih. Dobljeni validacijski parametri veljajo za testirane učinkovine v izbrani matrici. Potreben je dodaten eksperiment, s katerim potrdimo ali ovržemo veljavnost istih parametrov v drugi matrici, pri čemer se kot druga matrica obravnava tudi samo sprememba živalske vrste (npr. meso goveda ali meso perutnine). Drugi alternativni pristop s statističnim načrtovanjem eksperimentov omogoča hkratno validacijo teh spremenljivk. V Odločbi Komisije 2002/657/EC (10) je podana tudi zahteva, da mora laboratorij, ki uporablja v kakem drugem laboratoriju razvito in validirano metodo dokazati, da izpolnjuje zahteve, v skladu z zahtevanimi parametri analiznega določanja. Ne glede na način validacije se zmeraj omejimo na tri koncentracijske nivoje. Izbira le-teh pa je odvisna od učinkovine, njene vrednosti MRL oz. MRPL oz. priporočenih koncentracij.

Poleg glavnih parametrov pri validaciji metod sta za določanje ostankov veterinarskih zdravil pomembna še dva

Preglednica 4: Zahtevane MRPL-vrednosti za prepovedane učinkovine (11, 12).

Table 4: Required MRPL values for banned active ingredients (11, 12).

Učinkovina ali metabolit	Vrsta vzorca	MRPL
Kloramfenikol (11)	meso jajca mleko urin proizvodi iz ribogojstva med	0,3 µg/kg
Medroksiprogesteron acetat (11)	ledvična maščoba prašičev	1 µg/kg
Metaboliti nitrofurantoinov furazolidon furaltadon nitrofurantoin nitrofurazon	perutninsko meso proizvodi iz ribogojstva	1 µg/kg
Vsota malahitzelene in levko-malahit zelene (12)	meso proizvodov iz ribogojstva	2 µg/kg

parametra. Vsaki učinkovini moramo določiti mejo odločitve CC α (angl. *Decision Limit*, CC α) in sposobnost določitve CC β (angl. *Detection Capability*, CC β). Prva je definirana kot vrednost, pri kateri in nad katero se lahko sklepa z verjetnostjo α -napake, da je vzorec neskladen. V primeru prepovedanih učinkovin je vrednost α 1 %, v primeru učinkovin z določeno vrednostjo MRL pa 5 %. Sposobnost določitve pa je tista koncentracija, nad katero lahko s 95 % verjetnostjo trdimo, da je učinkovina prisotna v vzorcu v izmerjeni koncentraciji oziroma, da presega vrednost MRL. Za učinkovine, ki imajo predpisano vrednost MRL, določimo CC α tako, da vrednosti MRL prištejemo 1,64-kratnik standardne deviacije obnovljivosti, ki smo jo dobili z analizo osemnajstih vzorcev obogatenih na nivoju vrednosti MRL. Sposobnost določitve CC β pa tako, da k CC α prištejemo 1,64-kratnik standardne deviacije obnovljivosti, ki smo jo dobili z analizo vzorcev obogatenih na nivoju CC α (10, 14).

Večina dovoljenih učinkovin ima določene vrednosti MRL. V tem primeru metodo validiramo na nivoju 0,5, 1 in 1,5 MRL-vrednosti. V primeru prepovedanih učinkovin moramo torej metodo validirati na meji zaznave, ki mora biti vsaj enaka vrednosti MRPL ali pa nižja in meji določitve, ter 2- in 3-kratniku slednje vrednosti. To pomeni, da morata biti dobljena CC α in CC β manjša od zahtevanih minimalnih mej učinkovitosti postopka.

7 SKLEP

Z upoštevanjem navodil proizvajalcev in veterinarske doktrine o uporabi zdravil pri rejnih in proizvodnih živalih zagotavljamo varnost in neoporečnost živil živalskega izvora. V državah Evropske unije imamo zelo natančen načrt veterinarsko-sanitarnega nadzora nad ostanki zdravil za uporabo v veterinarski medicini v živilih živalskega izvora, tako imenovani državni monitoring. Omenjena živila redno preiskujemo glede na prepovedane substance (stilbene, steroide, tireostatike, laktone rezorcilne kisline, beta-agoniste, kloramfenikol, kloroform, klorpromazin, dapson, nitroimidazole, nitrofurane, kolhicin in aristolohijsko kislino) in ugotavljamo dovoljena zdravila (antibiotike, antihelmintike, kokcidostatike, pomirjevala, nesteroidna protivnetna zdravila, barvila in drugo). Monitoring z vsakoletnim programom omogoča pregled statistično dovolj velikega števila vzorcev za pridobitev potrebnih podatkov.

8 LITERATURA

1. Uredba Sveta (EGS) št. 2377/90 z dne 26. junija 1990 o določitvi postopka Skupnosti za določanje najvišjih mejnih vrednosti ostankov zdravil za uporabo v veterinarski medicini v živilih živalskega izvora. UL L 224, 18.8.1990, str. 1-11.
2. Uredba (ES) št. 470/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 6. maja 2009 o določitvi postopkov Skupnosti za določitev mejnih vrednosti ostankov farmakološko aktivnih snovi v živilih živalskega izvora in razveljavitvi Uredbe Sveta (EGS) št. 2377/90 in spremembi Direktive 2001/82/ES Evropskega parlamenta in Sveta ter Uredbe (ES) št. 726/2004 Evropskega parlamenta in Sveta. UL L 152, 16.6.2009, str. 11-22.
3. Uredba Komisije (EU) št. 37/2010 z dne 22. decembra 2009 o farmakološko aktivnih snoveh in njihovi razvrstitvi glede mejnih vrednosti ostankov v živilih živalskega izvora. UL L 15, 20.1.2010, str. 1-72.
4. Volume 8, Notice to applicants and Guideline, Veterinary medicinal products, Establishment of maximum residue limits (MRLs) for residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. The rules governing medicinal products in the European Union, October 2005. [internet] [cited 2018 May 8]. 78 p. Available from: https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-8_en
5. EMEA/CVMP/036/95 »Approach towards harmonization of withdrawal periods«. [internet] [cited 2018 May 8]. 37 p. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004428.pdf
6. EMEA/CVMP/473/98. »Notes for guidance for the determination of withdrawal periods for milk«. [internet] [cited 2018 May 8]. 26 p. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004496.pdf
7. Direktiva Sveta 96/23/ES z dne 29. aprila 1996, o ukrepih za spremljanje nekaterih snovi in njihovih ostankov v živih živalih in v živalskih proizvodih. UL L 125, 23.5.1996, str. 10-32.
8. Uredba (EU) 2017/625 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 15. marca 2017 o izvajanju uradnega nadzora in drugih uradnih dejavnosti, da se zagotovi uporaba zakonodaje o živilih in krmi, pravil o zdravju in dobrobiti živali ter zdravju rastlin in fitofarmaceutskih sredstvih, ter o spremembi uredb (ES) št. 999/2001, (ES) št. 396/2005, (ES) št. 1069/2009, (ES) št. 1107/2009, (EU) št. 1151/2012, (EU) št. 652/2014, (EU) 2016/429 in (EU) 2016/2031 Evropskega parlamenta in Sveta, uredb Sveta (ES) št. 1/2005 in (ES) št. 1099/2009 ter direktiv Sveta 98/58/ES, 1999/74/ES, 2007/43/ES, 2008/119/ES in 2008/120/ES ter razveljavitvi uredb (ES) št. 854/2004 in (ES) št. 882/2004 Evropskega parlamenta in Sveta, direktiv Sveta 89/608/EGS, 89/662/EGS, 90/425/EGS, 91/496/EGS, 96/23/ES, 96/93/ES in 97/78/ES ter sklepa Sveta 92/438/EGS (Uredba o uradnem nadzoru). UL L 95, 7.4.2017, str. 1-142.
9. Direktiva Sveta 96/22/ES z dne 29. aprila 1996 o prepovedi uporabe v živinoreji določenih snovi, ki imajo hormonalno ali tirostatično delovanje, in beta-agonistov ter o razveljavitvi direktiv 81/602/EGS, 88/146/EGS in 88/299/EGS. UL L 125, 23.5.1996, str. 3-9.
10. Odločba Komisije 2002/657/ES z dne 14. avgusta 2002 o izvajanju Direktive Sveta 96/23/ES glede opravljanja analitskih metod in razlage rezultatov. UL L 221, 17.8.2002, str. 8-36.



11. Odločba Komisije 2003/181/ES z dne 13. marca 2003 o spremembi Odločbe 2002/657/ES glede določitve zahtevane spodnje meje zaznavanja (MRPL) za nekatere ostanke škodljivih snovi v hrani živalskega izvora. UL L 71, 15.3.2003, str. 17-18.
12. Odločba Komisije 2004/25/ES z dne 22. decembra 2003 o spremembi Odločbe 2002/657/ES glede določitve meje najmanjše zahtevane učinkovitosti (MRPL) za nekatere ostanke v hrani živalskega izvora. UL L 6, 10.1.2004, str 38-39.
13. CRL guidance paper (7 december 2007) CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans. [internet] [cited 2018 May 8]. 8 p. Available from: https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/09_Untersuchungen/EURL_Empfehlungen_Konzentrationsauswahl_Methodenvalidierungen_EN.pdf?__blob=publicationFile&v=2
14. Van Loco J, Jànosi A, Impens S, Fraselle S, Cornet V, Degroodt JM: Calculation of the decision limit (CC α) and the detection capability (CC β) for banned substances: The imperfect marriage between the quantitative and the qualitative criteria. *Analytica Chimica Acta*. 2007;586:8-12.