



Ostanki protimikrobnih snovi v medu slovenskih čebelarjev

Jožica Dolenc (jozica.dolenc@vf.uni-lj.si), Stanka Vadnjal, Majda Biasizzo
in Zlatka Bajc, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani



Slika 1: Tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektrometrijo med meritvijo



Slika 2: Sistem HPLC-FLD med analizo vzorcev medu na sulfonamide

Enota za varno hrano Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani se med drugim ukvarja tudi z ugotavljanjem ostankov zdravil v živilih živalskega izvora, vključno z medom. Nobena protimikrobna snov v Evropski skupnosti ni registrirana za zdravljenje čebel. V primeru njihove uporabe so koncentracije v medu visoke in se le počasi znižujejo. Evropska agencija za varnost hrane ugotavlja, da je frekvenca neskladnih vzorcev zaradi vsebnosti ostankov protimikrobnih snovi največja ravno pri medu. Rezultati so nastali v okviru Uredbe o izvajanju intervencij v sektorju čebelarstva iz strateškega načrta skupne kmetijske politike in programa »Analize čebeljih pridelkov v letih od 2019 do 2025«, ki je bil financiran iz sredstev državnega proračuna in proračuna Evropske unije. Že tisočletja ljudje po svetu uporabljajo čebelarstvo. Razvoj čebelarstva je človeku omogočil lažji dostop do čebeljih proizvodov. Z naraščajočimi potrebami po tovrstnih izdelkih so čebelarji povečevali število panjev in čebeljih družin. S tem so se ustvarili pogoji za hitrejšo širjenje in razvoj novih čebeljih bolezni. Posebno v zadnjem stoletju smo z intenzivno in hitro izmenjavo dobrin procese pospešili. Čebele danes tako ogroža vrsta bolezni. Hudo gnilobo in pohlevno gnilobo čebele zalege povzročata bakteriji *Paenibacillus larvae* in *Melissococcus pluton*. Bakterijske okužbe je sicer mogoče zdraviti z uporabo protimikrobnih zdravil

oziroma antibiotikov, vendar v Evropski skupnosti za zdravljenje čebel ni odobrena nobena protimikrobna snov. V ZDA so za zdravljenje čebel odobrene tri farmakološko aktivne snovi, ki sodijo med antibiotike, oksitettraciklin, tilozin in linkomicin. Kljub nedovoljeni uporabi v čebelarstvu v Evropi vsako leto odkrijejo vzorce, ki vsebujejo ostanki protimikrobnih snovi. V poročilih o nadzoru ostankov veterinarskih zdravil v živalih in njihovih proizvodih Evropska agencija za varnost hrane (EFSA) [1–7] ugotavlja, da je frekvenca neskladnih vzorcev zaradi vsebnosti ostankov protimikrobnih snovi največja ravno pri medu (Preglednica 1). Pri nobenem drugem živilu delež neskladnih vzorcev zaradi vsebnosti protimikrobnih snovi ni tako visok. Pri zdravljenju čebel se v Evropi daleč najpogostejše nedovoljeno uporabljajo sulfonamidi, sledijo tetraciklini in aminoglikozidi, kar poleg podatkov EFSE potrjuje tudi raziskava, ki so jo opravili v Belgiji na zelo velikem številu vzorcev medu [8]. V domačem medu so največkrat ugotovili prisotnost sulfonamidov (v 4,2 %), 2,8 % vzorcev je vsebovalo tetracikline in 1,6 % aminoglikozide. Ne glede na način zdravljenja čebel s protimikrobnimi snovmi te onesnažijo čebelnjak, pa tudi okoliške panje v oddaljenosti nekaj deset metrov. Ostanke protimikrobnih snovi vedno zaznamo v medu iz panja zdravljenih čebel, ravno tako pa tudi v medu okoliških panjev [9]. Zaradi stabilnosti so ostanki zdravil v

Preglednica 1: Delež neskladnih vzorcev medu v EU od leta 2017 do 2023 (novejših podatkov EFSA še ni objavila)

Leto	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
Delež neskladnih vzorcev v odstotkih	0,83	0,82	0,98	0,56	0,96	1,44	0,41

Preglednica 2: Zakonodajne vrednosti (MRL) in ciljne koncentracije, ki jih želimo določiti

Parameter	MRL [µg/kg]	Preizkušanec	Živalska vrsta	Ciljna koncentracija [µg/kg]
Streptomycin	200	Mleko	Prežvekovalci	20
Tetraciklin	100	Mleko, meso	Vse proizvodne živali	10
Klortetraciklin	100	Mleko, meso	Vse proizvodne živali	10
Oksitetraciklin	100	Meso, mleko	Vse proizvodne živali	10
Sulfonamidi	100	Mleko, meso ...	Vse proizvodne živali	10

medu lahko prisotni še leta. Z uvoženim medom se na trgih EU pojavijo tudi taki, ki vsebujejo v Evropski skupnosti že leta prepovedane protimikrobne snovi, največkrat nitrofurane. Belgijska študija [8] v uvoženih medovih ugotavlja pogosto prisotnost kloramfenikola, sulfonamidov, tetraciklinov in aminoglikozidov. Kitajska je velika izvoznica in porabnica medu, zato so kitajski strokovnjaki pripravili oceno tveganja za zdravje ljudi v povezavi s protimikrobnimi zdravili v medu [10]. V študiji so analizirali 94 vzorcev medu, od katerih jih je kar 84 % vsebovalo ostanke ene ali več protimikrobnih snovi. Kinolone so našli v 69,1 %, sulfonamide v 44,7 %, tetracikline v 26,6 % in fenikole (mednje sodi kloramfenikol) v 1,1 % vzorcev. Za živila živalskega izvora so določene maksimalne dovoljene vrednosti ostankov (MRL) posameznih protimikrobnih snovi. Določene so za živila tistih živalskih vrst, pri katerih so za zdravljenje določene učinkovine tudi registrirane. Za zdravljenje čebel ni registrirano nobeno protimikrobno zdravilo, zato vrednosti MRL za ostanke protimikrobnih zdravil v medu ne obstajajo. Kljub temu nam Uredba Komisije (EU) št. 37/2010 o farmakološko aktivnih snoveh in njihovi razvrstitvi glede mejnih vrednosti ostankov v živilih živalskega izvora [11] služi za orientacijo, katere koncentracije so tiste, ki jih moramo z analitskimi metodami biti sposobni določiti. Izberemo najnižjo vrednost MRL farmakološko aktivne snovi, ki je določena za kateri koli preizkušanec ne glede na živalsko vrsto (Preglednica 2). Izvedbena uredba Komisije (EU) št. 2021/808 o izvajanju analiznih metod za ostanke farmakološko aktivnih snovi, ki se uporabljajo pri živalih za proizvodnjo živil, o razlagi rezultatov in metodah, ki jih je treba uporabljati za vzorčenje [12], predvideva validacijo na desetini vrednosti MRL, kjer je to mogoče. Glede na to izberemo metode, ki so sposobne določitve v ustreznem koncentracijskem območju. Zaradi omejitvev metod, ki so na voljo, to ni vedno mogoče, zato se moramo pri nekaterih farmakološko aktivnih snoveh zadovoljiti z višjimi koncentracijami. Nadzor poteka v dveh korakih. Najprej s hitro in cenejšo presejalno metodo izločimo sumljive vzorce. Skladno z Izvedbeno uredbo Komisije (EU) št. 2021/808 [12] je sposobnost določitve (CC β) presejalne metode najnižja koncentracija, pri kateri snov oziroma skupino snovi zaznamo s 95-odstotno verjetnostjo. Sumljive vzorce ponovno analiziramo

s potrditveno metodo. Z njo določimo koncentracijo prisotnih farmakološko aktivnih snovi. Meja odločitve (CC α) potrditvene metode je koncentracija, ki smo jo sposobni zanesljivo določiti, torej meja kvantitativne določitve (LOQ), povečana za merilno negotovost, skladno z Izvedbeno uredbo Komisije (EU) št. 2021/808.

Vzorčenje

Čebelarji so se prostovoljno odločili za sodelovanje v raziskavi. Vzorce medu iz vseh statističnih regij Slovenije (goriške, zasavske, obalno-kraške, primorsko-notranske, gorenjske, koroške, jugovzhodne Slovenije, podravske, posavske, pomurske, savinjske in osrednjeslovenske) so zbirali na Kmetijskem inštitutu Slovenije (KIS).

Analizne metode

Tetraciklini

Kot presejalno metodo določanja tetraciklinov v medu smo uporabili hitri test TetraSensor Honey (proizvajalca Unisensor), ki vsebuje receptorje za prepoznavanje molekul tetraciklinov. Med smo raztopili v pufru, dodali receptorska telesa in inkubirali. Intenziteto nastale barve smo izmerili spektrofotometrično.

Aminoglikozidi

Streptomycin in dihidrostreptomycin smo do vključno 2023 določali z receptorskim testom ELISA (proizvajalec EuroProxima). V pufru raztopljen vzorec smo prefiltrirali. Dodali smo konjugat in po inkubaciji še substrat. Po natančno določenem času smo prekinili reakcijo, pri kateri nastajajo obarvani produkti. Spektrofotometrično smo merili absorbanco raztopine pri 450 nm. V letu 2024 smo uporabili metodo, ki ni samo presejalni test, ampak jo lahko uporabimo tudi za potrjevanje aminoglikozidov. Med smo raztopili v 2-odstotni očetni kislini, dodali acetonitril in trdno fazo C18. Po centrifugiranju in filtraciji smo vzorce injicirali v HPLC, povezan s tandemskim masnim detektorjem (Slika 1). Aminoglikozida, prisotna v vzorcu, bi prepoznali po značilnih ionskih prehodih. Ker metoda omogoča določanje tudi drugih skupin protimikrobnih snovi, smo v letu 2025 nadzor razširili še na skupino kinolonov, makrolidov, linkomicina in trimetoprima.

Sulfonamidi

Vzorcem medov smo dodali interni standard in kislino ter jih pri ustreznih pogojih hidrolizirali. Po ekstrakciji tekoče-tekoče (LLE) sulfonamidov iz vodne raztopine v mešanico acetonitrila in diklorometana smo vzorce posušili do suhega. Pred določitvijo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti s fluorescenčnim detektorjem (HPLC-FLD, Slika 2) je potrebna derivatizacija, ker sulfonamidov neposredno ne zaznamo.



Preglednica 3: Testirane protimikrobne snovi in koncentracije, ki jih v medu lahko zaznamo z izbranimi metodami

Skupina	Učinkovina	CCβ [μg/kg]	CCα [μg/kg]
Sulfonamidi	Sulfisoksazol	5	6
	Sulfatiazol	5	8
	Sulfamerazin	5	9
	Sulfamonometoksin	5	8
	Sulfadimetoksin	5	6
	Sulfametazin	5	8
	Sulfapiridin	5	9
	Sulfametoksazol	5	6
	Sulfadiazin	5	6
	Sulfanilamid	5	8
Aminoglikozidi	Sulfametizol	5	7
	Streptomycin	10	
Tetraciklini	Dihidrostreptomycin	10	
	Doksiciklin	15	
	Klortetraciklin	15	
	Oksitetraciklin	10	
Tetraciklin	Tetraciklin	10	
Dodatno v letu 2025			
Kinoloni	Danofloksacin	10	
	Difloksacin	10	
	Enrofloksacin	10	
	Flumekvin	10	
	Marbofloksacin	10	
	Nalidiksična kislina	10	
	Norfloksacin	10	
	Sarafloksacin	10	
Skupina	Učinkovina	CCβ [μg/kg]	CCα [μg/kg]
Makrolidi	Eritromicin	10	
	Gamitromicin	10	
	Pirlimicin	20	
	Spiramicin	10	
	Tildipirozin	10	
	Tilmikozin	5	
	Tilozin	10	
	Linkomicin	20	
	Trimetoprim	10	

Rezultati

Vsak vzorec medu je bil do leta 2024 testiran na tri skupine veterinarskih zdravil. Posamezne učinkovine, ki jih metode zaznajo, ter njihova sposobnost določitve oziroma meje odločitve so zbrane v Preglednici 3. V šestih letih je bilo na tri skupine antibiotikov testiranih 369 vzorcev medu. Leta 2019 je bilo pregledanih 58 vzorcev, največ, 100 vzorcev, je bilo analiziranih leta 2020, 45 jih je bilo pregledanih leta 2021, samo 22 v letu 2022, nekoliko več, 31, leta 2023, 66 vzorcev v letu 2024 in 47 vzorcev v letu 2025. Nadzor v letu 2025 je bil razširjen, saj je bila nadgrajena metoda določanja aminoglikozidov in so bili dodani tudi kinoloni in makrolidni antibiotiki. Manjše število vzorcev v letih 2022 in 2023 je posledica neugodnih okoljskih razmer. Marsikje v Sloveniji so čebelarji svoje čebele hranili še dolgo v pomlad. Zaradi slabe paše je bila količina medu in drugih

čebeljih pridelkov majhna. Pomanjkanje hrane oslabi čebelje družine, ki postanejo dovzetnejše za okužbe. Kljub temu v nobenem medu nismo odkrili ostankov antibiotikov. ■

Viri

- 1 EFSA (European Food Safety Authority), 2019. Report for 2017 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publication 2019:EN-1578. 88 str. doi:10.2903/sp.efsa.2019.EN-1741
- 2 EFSA (European Food Safety Authority), 2020. Report for 2018 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publication 2020:EN-1775. 74 str. doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1775
- 3 EFSA (European Food Safety Authority), 2021. Report for 2019 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publication 2021:EN-1997. 82 str. doi:10.2903/sp.efsa.2021.EN-1997
- 4 EFSA (European Food Safety Authority), Brocca, D., Salvatore, S., 2022. Report for 2020 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publication 2022:EN-7143. 91 str. doi:10.2903/sp.efsa.2022.EN-7143
- 5 EFSA (European Food Safety Authority), Brocca, D. in Salvatore, S., 2023. Report for 2021 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publication 2023:EN-7886. 111 str. doi:10.2903/sp.efsa.2023.EN-7886
- 6 EFSA (European Food Safety Authority), 2024. Report for 2022 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publication 2024:EN-8669. 101 str. doi: 10.2903/sp.efsa.2024.EN-8669
- 7 EFSA (European Food Safety Authority), Salvatore, S., Vericat Ferrer, M., 2025. Report for 2023 on the results from the monitoring of residues of veterinary medicinal products in live animals and animal products. EFSA supporting publication 2025: EN-9297. 87 str. doi:10.2903/sp.efsa.2025.EN-9297
- 8 W. Reybroeck, »Residues of antibiotics and sulfonamides in honey on the Belgian market«, *Apiacta*, vol. 38, str. 23–30, 2003.
- 9 Anne-Claire Martel, Sarah Zeggane, Patrick Drajnudel, Jean-Paul Faucon, Michel Aubert. Tetracycline residues in honey after hive treatment. *Food Additives and Contaminants*, 2006, 23 (03), str. 265. 10.1080/02652030500469048. hal-00577570
- 10 Yuanping Wang, Xiaolian Dong, Minghui Han, Zichen Yang, Yi Wang, Lu Qian, Min Huang, Baozhang Luo, Hexing Wang, Yue Chen, Qingwu Jiang, »Antibiotic residues in honey in the Chinese market and human health risk assessment«, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 440, 15. 10. 2022, 129815.
- 11 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, *Uradni list EU*, L 15, 20. 1. 2010, str. 1–72.
- 12 Izvedbena uredba Komisije (EU) 2021/808 o izvajanju analiznih metod za ostanke farmakološko aktivnih snovi, ki se uporabljajo pri živalih za proizvodnjo živil, o razlagi rezultatov in metodah, ki jih je treba uporabljati za vzorčenje, ter o razveljavitvi odločb 2002/657/ES in 98/179/ES, *Uradni list EU*, L 180, 21. 5. 2021, str. 84–109.
- V programu »Analize čebeljih pridelkov« so sodelovale tri institucije, poleg Veterinarske fakultete še Čebelarstva zveza Slovenije (ČZS) in Kmetijski inštitut Slovenije (KIS), vsak od deležnikov s svojimi nalogami. Rezultati ČZS in KIS-a so objavljeni na spletnih straneh omenjenih institucij.