

# Koncentracije tetraciklinskih antibiotika u mesu i mesnim proizvodima

Bilandžić, Nina<sup>1\*</sup>, Božica Solomun Kolanović<sup>1</sup>, Ivana Varenina<sup>1</sup>, Ines Varga<sup>1</sup>, Marina Krpan<sup>2</sup>, Mirjana Hruškar<sup>2</sup>

Stručni rad

## SAŽETAK

Tetraciklinski antibiotici su najviše korišteni veterinarski lijekovi u životinja koje se koriste za proizvodnju hrane u Hrvatskoj. Cilj ovog rada bio je odrediti koncentracije tetraciklina, klortetraciklina, oksitetraciklina i doksiciklina u svinjskom mesu (n=101), jetri (n=31) i masnom tkivu (n=30), goveđem mesu (n=89) i jetri (n=20), te mesnim proizvodima (kobasice i šunke, n=24). Za određivanje tetraciklina korištena je imunoenzimska ELISA metoda koja je validirana prema kriterijima Odluke Komisije 2002/657/EZ. Određeni su validacijski parametri za četiri analizirana tetraciklina u rasponu: sposobnost detekcije  $CC\beta$  19,3 - 66,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , iskorištenje 64,5 - 102 %, koeficijent varijacije 14,1-28,9 %, granica detekcije LOD 3,62 - 21,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . U ukupno 295 analiziranih uzoraka tetraciklini su izmjereni u rasponima ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ): tetraciklin 10,5 - 92,1, klortetraciklin 2,63 - 28,0, oksitetraciklin 17,5 - 91,3, doksiciklin 1,81 - 14,0. Najviša koncentracija od 92,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  određena je za tetraciklin u svinjskom mesu. Najviše srednje vrijednosti određene su za ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ): tetraciklin 23,6 u svinjskom mesu, oksitetraciklin i klortetraciklina 41,7 i 6,41 u goveđem mesu. Srednje vrijednosti doksiciklina za sve vrste analiziranih uzoraka su ispod LOD vrijednosti (3,62  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Niti u jednoj vrsti uzoraka nisu utvrđene koncentracije iznad najviših dopuštenih koncentracija za četiri tetraciklina određenih Uredbom Komisije 37/2010/EZ. Utvrđeni rezultati ukazuju da se liječenje primjenom tetraciklina u životinja namijenjenih ishrani propisno proizvodilo pazeći na propisano vrijeme zadržavanja tetraciklinskih antibiotika te time osigurala zdravstvena sigurnost potrošača.

**Ključne riječi:** tetraciklini, meso, jetra, masno tkivo, mesni proizvodi, sigurnost hrane

## UVOD

Tetraciklinski antibiotici danas se uvelike primjenjuju u veterinarskoj medicini za prevenciju i liječenje životinja na farmama zbog njihova širokog spektra antimikrobne aktivnosti te pristupačnosti usljed niskih cijena koštanja (Őnal, 2011). Tetraciklini nastaju kao proizvodi sekundarnog metabolizma bakterija iz roda *Streptomyces* te se danas koristi šesnaest različitih bakterijskih *Streptomyces* vrsta u industrijskoj proizvodnji tetraciklinskih antibiotika. Karakterizira ih široki spektar djelovanja prema mnogim Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama kao i rikcijama i virusima. Kemijske strukture ove skupine antibiotika su slične te

su aromatski poliketidi koji sadrži četiri spojena prstena. Istraživanja su pokazala da je antimikrobna aktivnost tetraciklina, klortetraciklina i oksitetraciklina vrlo slična (EMEA, 1995). Mehanizam njihova djelovanja nakon transporta u bakterijsku stanicu sastoji se u inhibiciji biosinteze proteina odnosno onemogućuju proces očitavanja aminokiselina i sintezu peptida s mRNA u ribosomima i time reprimiraju produljivanje polipeptidnog lanca (Makovec i sur., 2014).

Osim u terapijske svrhe tetraciklini su također korišteni i kao aditivi u hrani za životinje kao promotori rasta životinja (Sczesny i sur., 2003; Grana-dos-Chinchilla i Rodríguez, 2017). Ostaci tetracikli-

1 Dr. sc. Nina Bilandžić, znanstvena savjetnica; Božica Solomun Kolanović, dipl. ing. preh. tehnol., znanstveni novak; dr. sc. Ivana Varenina, poslijedoktorand; Ines Varga, mag. primj. kem., stručna suradnica, Laboratorij za određivanje rezidua, Odjel za veterinarsko javno zdravstvo, Hrvatski veterinarski institut, Savska 143, Zagreb;

1 Doc. dr. sc. Marina Krpan, docent; prof. dr. sc. Mirjana Hruškar, redoviti profesor, Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb

Autor za korespondenciju: bilandzic@veinst.hr

na mogu zaostati u hrani životinjskog podrijetla te hranidbenim lancem dospjeti do čovjeka čime mogu predstavljati zdravstveni rizik ne samo zbog toksikoloških utjecaja nego i zbog rizika od stvaranja rezistencija na tetraciklinske antibiotike (Önal, 2011). Utvrđeno je na primjer da oksitetraciklin u povišenim koncentracijama izaziva ozbiljne zdravstvene učinke kao što su alergijska reakcija, teratogenost u prvom tromjesečju trudnoće, obojenost primarnih i trajnih zuba (Kaale i sur., 2008), mogućnost hipoplazije u razvoju zuba kada se primjenjuje u dojenčadi, djeci mlađoj od 12 godina ili majkama tijekom posljednja dva trudnoća trudnoće (Senyuva i sur., 2000).

Naime, općenito gledajući konstanta uporaba antibiotika u farmakološkom uzgoju životinja uzrokovala je stvaranje rezistentih gena u bakterija koje čine prirodnu mikrobnu populaciju u životinja (Cabello, 2006). Stoga se smatra da se uporaba veterinarskih lijekova treba kontrolirati kako bi se smanjio rizik razvoja pojava rezistentnih vrsta bakterija. Europska agencije za sigurnost hrane i Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti su na temelju podataka 28 zemalja članica Europske unije (EU) za 2016. godinu izradili izvještaj o antimikrobnoj rezistenciji indikatorskih bakterija u izolatima ljudi i peradi (EFSA, 2018). U izolatima bakterija roda *Salmonella* i *E. coli* iz brojlera, tovnih purana i njihovog mesa rezistencija na tetracikline je visoka. U dodatnim uzorcima utvrđena je otpornosti bakterije *E. coli* iz brojlara pri čemu je razina otpornosti na tetracikline bila vrlo visoka odnosno 61,7%. Utvrđeni su visoki udjeli izolata salmonela ljudi koji su otporni na tetracikline (29,2%). Utvrđene su i kombinirane kliničke otpornosti izolata *E. coli* iz ljudi pri čemu su gotovo svi izolati koji su kombinirali otpornost na ciprofloksacin i eritromicin bili osim toga otporni na tetracikline koji se koristi u liječenju infekcija bakterijom roda *Campylobacter* u ljudi. U izolatima *Campylobacter* spp. iz ljudi, brojlera i njihova mesa, otpornost na tetracikline bila je visoka do izuzetno visoka. U svrhu smanjenja svih negativnih utjecaja uslijed prevelike uporabe antibiotika u životinja koje se koriste za ishranu te posebice u svrhu prevencije stvaranja rezistencija na antibiotike Europska unija (EU) je donijela akcijski plan za smanjenje uporabe antibiotika (EC, 2011; 2017).

Europska agencija za lijekove izradila je izvještaj o prodaji antimikrobnih veterinarskih lijekova u 30 zemalja EU u 2015. godini te prikazala trendove povećanja ili smanjenja prodaje lijekova u razdoblju od 2010. do 2015. (EMA, 2017). U Hrvatskoj se u 2015. godini prodalo ukupno 27,9 tone aktivnih

farmakoloških tvari za primjenu u životinja namijenjenih ishrani, dok je ta prodaja puno veća u zemljama s velikom proizvodnjom kao što su Francuska s 501,5 t, Njemačka s 851,1 t, Italija s 1300,0 t odnosno Španjolska s 3027,8 t. Uzevši u obzir sve porodice antimikrobnih lijekova u 30 zemalja članica EU prodaja tetraciklina, penicilina i sulfonamida izražena u mg prodanih po jedinici korekcije populacije (eng. population correction unit, PCU) činila je 69,6% ukupne prodaje u 2015. Najviše se prodalo tetraciklinskih antibiotika, odnosno 32,8 % mg/PCU. U Hrvatskoj su se u 2015. godini u najvećem postotku prodavali tetraciklini sa 41,4 % ukupne prodaje antimikrobnih lijekova (mg/PCU) za vrste koje proizvode hranu, uključujući konje. U razdoblju od 2011. do 2015. godine za 15 zemalja zabilježen je pad prodaje viši od 5% (raspon od 6,9% do 53,7% mg/PCU). Povećanje prodaje za više od 5% utvrđeno je za Bugarsku, Cipar, Mađarsku, Irsku, Latviju i Švedsku. Za Hrvatsku su prikazane prodaje za 2014. i 2015. godinu te je u 2015. godini vidljiv trend pada prodaje sa 114,8 na 101,6 mg/PCU (EMA, 2017).

Tetraciklinski antibiotici danas se određuju primjenom jednostavnih i brzih orijentacijskih metoda kao što su mikrobiološki testovi (Pikkemaat i sur., 2009.) i imunoenzimski testovi (Perme i sur., 2010; Gaudin i sur., 2017). Kvantifikacija i potvrda povišenih koncentracija tetraciklina najčešće se provodi tekućinskom kromatografijom kombiniranom s tandemskom spektrometrijom masa LC-MS/MS (Önal, 2011, Desmarchelier i sur., 2018). Danas se sve više koriste multirezidualne metode koje omogućuju analizu različitih skupina antibiotika uključujući i tetracikline (Bittencourt i sur., 2012; Bisselli i sur., 2013; Martins i sur., 2015).

Obzirom da su tetraciklinski antibiotici najviše korišteni u proizvodnji životinja za ishranu u Hrvatskoj, cilj ovog rada je provesti istraživanje njihovih koncentracija u mesu i iznutricama svinja i goveda, masnom tkivu te mesnim proizvodima.

## MATERIJALI I METODE

### Uzorkovanje mesa i mesnih proizvoda

U trgovačkim lancima s područja grada Zagreba sakupljeno je ukupno 295 uzoraka mesa, iznutrica i proizvoda: 101 uzorak svinjskog mesa, 31 svinjske jetre, 30 svinjske masti, 89 uzoraka goveđeg mesa, 20 goveđe jetre i 24 uzoraka mesnih proizvoda (šunka i kobasice). Uzorci su do laboratorija transportirani na hladnom. U laboratoriju su uzorci homogenizirani, razdijeljeni na manje količine te propisno označeni i pohranjeni na -18 °C do početka analize.

## Reagensi i standardi

Za određivanje teraciklinskih antibiotika tetraciklina, klortetraciklina, oksiteraciklina i doksiciklina korišten je enzimsko-receptorski test br. AB701 proizvođača Tecna R&D Diagnostics-Biotechnology (Trst, Italija). Kit sadrži mikrotitarsku pločicu (48 jažica), standard tetraciklina (3 x 100 ng), otapalo standard (25 mL), receptor (3x liofilizirana pakiranja), otapalo receptora (10 mL), enzimski konjugat (100 µL koncentrata), otapalo enzimskog konjugata (10 mL), pufer za razrijeđivanje (10 x 50 mL), pufer za ispiranje (20 x 50 mL), otopina za razvijanje (15 mL), stop otopina (9 mL).

U pripremi standarada tetraciklina korištene su sljedeće kemikalije: natrij klorid, kalij klorid, natrij hidrogenfosfat, kalij dihidrogenfosfat proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD); etanol proizvođača Honeywell (Morris Plains, New Jersey, United States); metanol proizvođača Biosolve Chimie (Dieuze, Francuska).

Korišteni su standardi tetraciklina, klortetraciklina, oksiteraciklina i doksiciklina proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD). Bazna otopina klortetraciklina, oksiteraciklina i doksiciklina koncentracija 1000 µg/mL pripremljene su otapanjem u mješavini metanol-PBS pufer (70:30 v/v) odnosno bazna otopina tetraciklina otapanjem u mješavini etanol-PBS pufer (70:30 v/v). Otopine radnih standarda pripremljene su razrijeđivanjem baznih otopina u PBS puferu pH 7,4. Bazne otopine pohranjuju se na temperaturi od na +2 do +8 °C jedan mjesec, a radne otopine na +2 do +8 °C najdulje 3 tjedna.

U postupku pripreme uzoraka korišten je natrijev hidroksid proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD). Ultra čista voda je pripremana koristeći sustav Direct Q 5UV (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka).

## Instrumenti

Za pripremu standarda odnosno uzoraka za analizu korišteni su sljedeći instrumenti: tehnička vaga ( $\pm 0,001$  g) model EW 220-3NM, Kern (Balingen, Njemačka), aparat za usitnjavanje uzoraka Waring Commercial Blender 7011HS (Hartford, SAD), vorteks miješalica IKA ultra turrax model T 18 digital i vorteks model MS2 Minishaker IKA®-WERKE (GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka), centrifuga model Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Njemačka). Optička gustoća mjerena je primjenom spektrofotometra, mikročitača Tecan model Sunrise Absorbance Reader Tecan (Austria GmbH, Salzburg, Austrija).

## Priprema uzoraka

Odvaže se 1 g homogeniziranog uzorka (meso, jetra,

masno tkivo i mesni proizvodi) u plastičnu epruvetu te doda 9 mL pufera za razrijeđivanje. Uzorak se homogenizira 30 sekundi te inkubira u ledenici 15 minuta. Zatim se provodi centrifugiranje na 2000xg 5 minuta i filtrira nadtalog. Podesi se pH na 7,4 dodatkom 0,5 N NaOH. U slučaju da se pojavio talog ponovno se centrifugira na 2000xg 5 minuta. Nakon što se uzorak temperira na sobnu temperaturu pipetira se 50 µL otopine u jažice.

## Postupak ELISA testa

Test je proveden prema uputama proizvođača. U jažice se doda 50 µL pripremljenih otopina standarda (u dvije paralele) odnosno nultog standarda i ostalih standarda za kalibraciju (5, 10, 20, 40, 100 ng/mL) te po 50 µL otopine uzoraka, svakog u dvije paralele. Zatim se u svaku jažicu doda 50 µL otopine receptora i pločica lagano protrese kružnim pokretima nekoliko sekundi. Inkubira se 30 minuta na sobnoj temperaturi (20-25 °C). Nakon inkubacije ukloni se tekućina iz jažica te ispere s otopinom za ispiranje koristeći bocu za potiskivanje tekućine. Istrese se tekućina iz jažica i preostale kapljice uklone tapkanjem o upijajući papir. Postupak se ponavlja 3 puta. Zatim se doda 100 µL enzimskog konjugata u svaku jažicu i pločica protrese kružnim pokretima nekoliko sekundi. Inkubira se 30 minuta na sobnoj temperaturi (20-25 °C). Ponovi se postupak ispiranja. U svaku jažicu doda se 100 µL otopine za razvijanje i inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi (20-25 °C). Zatim se doda 50 µL stop otopine u svaku jažicu i pločica lagano protrese kružnim pokretima nekoliko sekundi. Apsoorbancija standarda i uzoraka se mjeri pri valnoj duljini od 450 nm pomoću spektrofotometra.

## Validacija metode

Postupak validacije metode za određivanje tetraciklina proveden je prema kriterijima Odluke Komisije 2002/657/EC za orijentacijske metode (EC, 2002.a). Validacijom su određeni sljedeći parametri: selektivnost (specifičnost), sposobnost detekcije (CC $\beta$ ), iskorištenje, ponovljivost i preciznost, granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ). Validacija metode provedena je u rasponu koncentracija od 5 do 100 µg/kg.

Selektivnost (specifičnost) je određena analiziranjem 20 uzoraka mesa bez obogaćenja i 20 uzoraka s obogaćenjem na koncentraciji od 50 µg/kg. Granica odlučivanja (CC $\alpha$ ) dobivena je zbrajanjem srednje vrijednosti koncentracija slijepe probe i konstante k koja je jednaka 3. Sposobnost detekcije (CC $\beta$ ) dobivena je množenjem vrijednosti 1,64 sa standardnom devijacijom obogaćenih uzoraka

te se dobivena vrijednost pribroji prethodno izračunatoj vrijednosti CC<sub>α</sub>.

Ukupno iskorištenje i ponovljivost rezultata izražena kao koeficijent varijacije rezultata CV % izračunati su iz dobivenih vrijednosti obogaćenih uzoraka mesa na 3 koncentracijske razine 50, 100 i 200 µg/kg. Granica detekcije (LOD) računata je zbrajanjem srednje vrijednosti koncentracija slijepih uzoraka i 3 standardne devijacije uzorka, odnosno za granicu kvantifikacije (LOQ) 10 standardnih devijacija uzoraka.

### Statistička analiza

U statističkoj analizi primijenjen je računalni program Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD). Utvrđene koncentracije tetraciklina izražene su kao srednja vrijednost (SV) ± standardna devijacija (SD), minimalna i maksimalna koncentracija. Za koncentracije tetraciklina izmjerene ispod LOD vrijednosti dodijeljene su vrijednosti od 50 % LOD te kao takve korištene za statistički izračun srednjih vrijednosti koncentracija (Clarke, 1998).

### REZULTATI I RASPRAVA

U ovome istraživanju koncentracije tetraciklina određivane su ELISA metodom koja je validirana prema kriterijima Odluke Komisije 2002/657/EZ za orijentacijske metode (EC, 2002.a). Tablica 1 prikazuje određene validacijske parametre za sposobnost dokazivanja CC<sub>β</sub>, selektivnost/specifičnost, preciznost i ponovljivost, iskorištenje, granicu detekcije LOD i granicu kvantifikacije LOQ. Vrijednosti CC<sub>β</sub> su određene u rasponu od 19,3 µg/kg za klortetraciklin do 66,7 µg/kg za tetraciklin. Niže su od NDK vrijednosti od 100 µg/kg čime je potvrđena selektivnost odnosno specifičnost korištene metode. Ukupna izračunata iskorištenja kretala su se u rasponu od 64,5 % za klortetraciklin do 102 % za oksitetraciklin te su unutar preporučenog raspona (50 - 120 %). Koeficijenti varijacije određeni su u rasponu od 14,1 % za doksiciklin do 28,9 % za tetraciklin. Granice detekcije LOD izračunate su za četiri tetraciklina u rasponu od najviše 21,0 µg/kg za tetraciklin do najniže 3,62 µg/kg za doksiciklin. Validacijski parametri omogućuju kvantifikaciju tetraciklina prema kriterijima Odluke Komisije 2002/657/EZ za orijentacijske metode (EC, 2002.a).

Koncentracije tetraciklina, klortetraciklina, oksitetraciklina i doksiciklina u uzorcima svinjskog i goveđeg mesa, svinjske i goveđe jetre, svinjskom masnom tkivu i mesnim proizvodima (kobasice i šunke) prikazane su u Tablici 2. U ukupno 295 analiziranih uzoraka tetraciklini su izmjereni u rasponima (µg/kg): tetraciklin 10,5 - 92,1, klortetraciklin 2,63 - 28,0, oksitetraciklin 17,5 - 91,3, doksiciklin 1,81

**Tablica 1.** Validacijski parametri ELISA metode za određivanje tetraciklina u mesu.

Vrsta uzoraka	CC <sub>β</sub> (µg/kg)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Iskorištenje (%)	CV (%)
Tetraciklin	66,7	21,0	42,7	101,6	28,9
Oksitetraciklin	71,2	35,0	71,2	102,0	14,9
Klortetraciklin	19,3	5,25	10,7	64,5	15,0
Doksiciklin	27,1	3,62	6,92	80,0	14,1

- 14,0. Najviša koncentracija od 92,1 µg/kg određena je za tetraciklin u svinjskom mesu. Najviše srednje vrijednosti određene su za (µg/kg): tetraciklin od 23,6 u svinjskom mesu, oksitetraciklin i klortetraciklin od 41,7 i 6,41 u goveđem mesu. Srednje vrijednosti doksiciklina za sve vrste analiziranih uzoraka su ispod LOD vrijednosti.

Europska komisija je definirala najviše dopuštene količine (NDK) tetraciklinskih antibiotika odnosno tetraciklina, klortetraciklina, oksitetraciklina i doksiciklina za sve vrste životinja koje se koriste za proizvodnju hrane za pojedine vrste hrane: 100 µg/kg za mišić, 300 µg/kg za jetru, 300 µg/kg za bubreg (EC, 2010.). NDK vrijednost za masno tkivo određena je samo za doksiciklin i iznosi 300 µg/kg. Za mesne proizvode nisu određene NDK vrijednosti za tetracikline. U ovome istraživanju u mesu, jetri i masnom tkivu nisu utvrđene koncentracije iznad NDK vrijednosti za četiri određivana tetraciklina.

Na razini EU koncentracije tetraciklinskih antibiotika u hrani životinjskog podrijetla članice EU kontroliraju u okviru nacionalnih planova praćenja ostataka veterinarskih lijekova propisanih Direktivom Vijeća 96/23/EZ (EC, 1996.). Svake godine Europska agencija za sigurnost hrane izrađuje izvještaje u kojima objedinjuje rezultate tih planova kao i ostalih uzorkovanja. Ukupno je u razdoblju tri godine odnosno 2013., 2014. i 2015. prijavljeno ukupno 606 rezultata sa povišenim koncentracijama tetraciklinskih antibiotika (EFSA, 2015., 2016., 2017.). U Tablici 3 prikazani su nesukladni rezultati tetraciklina, oksitetraciklina, klortetraciklina i doksiciklina po vrstama životinja, uključujući i prikaz za mlijeko i jaja za razdoblje 2013.-2015. Ukupno gledajući najmanji broj nesukladnih rezultata na tetracikline je utvrđen u 2015. godini, a najveći od 234 u 2014. godini. Među nesukladnim rezultatima najveći broj od 281 (46,4 %) odnosio se na oksitetraciklin, te nadalje 225 (37,1 %) na doksiciklin dok je za tetraciklin i klortetraciklin određeno ukupno 100 nesukladnih rezultata (16,5 %). Obzirom na vrstu životinjskog mesa najveći broj nesukladnih rezultata od 43,4 % je utvrđeno za svinjsko meso, odnosno za goveđe meso ukupno 34,1 %.

**Tablica 2.** Koncentracije tetraciklina u mesu i mesnim proizvodima

Vrsta uzorka	N	Koncentracije SV $\pm$ SD - Minimum - maksimum ( $\mu\text{g/kg}$ ) Kolagen (%)			
		Tetraciklin	Oksitetraciklin	Klortetraciklin	Doksiciklin
Svinjsko meso	101	23,6 $\pm$ 13,2 10,5 - 92,1	38,1 $\pm$ 15,5 17,5 - 81,9	6,01 $\pm$ 3,84 2,63 - 28,0	2,74 $\pm$ 1,90 <sup>d</sup> 1,81 - 14,0
Svinjska jetra	31	15,2 $\pm$ 7,59 <sup>a</sup> 10,5 - 32,5	25,3 $\pm$ 12,6 <sup>b</sup> 10,5 - 32,5	3,79 $\pm$ 1,89 <sup>c</sup> 2,63 - 8,12	1,95 $\pm$ 0,52 <sup>d</sup> 1,81 - 4,06
Svinjsko masno tkivo	30	20,1 $\pm$ 9,63 <sup>a</sup> 10,5 - 35,9	34,4 $\pm$ 15,9 <sup>b</sup> 17,5 - 59,9	5,25 $\pm$ 2,37 2,63 - 8,98	2,39 $\pm$ 0,98 <sup>d</sup> 1,81 - 4,49
Goveđe meso	89	25,5 $\pm$ 13,4 10,5 - 90,7	41,7 $\pm$ 21,3 17,5 - 91,3	6,41 $\pm$ 3,34 2,63 - 22,7	2,79 $\pm$ 1,73 <sup>d</sup> 1,81 - 11,3
Goveđa jetra	20	16,2 $\pm$ 9,08 <sup>a</sup> 10,5 - 33,1	26,0 $\pm$ 14,0 <sup>b</sup> 17,5 - 55,2	4,05 $\pm$ 2,27 <sup>c</sup> 2,63 - 8,28	2,23 $\pm$ 0,87 <sup>d</sup> 1,81 - 4,14
Mesni proizvodi	24	24,7 $\pm$ 11,3 10,5 - 45,2	36,5 $\pm$ 17,1 17,5 - 63,4	6,29 $\pm$ 3,02 2,63 - 12,8	3,01 $\pm$ 1,44 <sup>d</sup> 1,81 - 6,38

<sup>a</sup> srednje vrijednosti tetraciklina manje od LOD 21,0  $\mu\text{g/kg}$  / mean value of Tetracycline < LOD 21,0  $\mu\text{g/kg}$

<sup>b</sup> srednje vrijednosti oksitetraciklina manje od LOD 35,0  $\mu\text{g/kg}$  / mean value of Oxytetracycline < LOD 35,0  $\mu\text{g/kg}$

<sup>c</sup> srednje vrijednosti klortetraciklina manje od LOD 5,25  $\mu\text{g/kg}$  / mean value of Chlortetracycline < LOD 5,25  $\mu\text{g/kg}$

<sup>d</sup> srednje vrijednosti doksiciklina manje od LOD 3,62  $\mu\text{g/kg}$  / mean value of Doxycycline < LOD 3,62  $\mu\text{g/kg}$

Kroz tri godine najveći broj nesukladnih rezultata na tetraciklinske antibiotike se odnosio na oksitetraciklin (42,3 – 49,4 %). Ističe se značajan broj nesukladnih rezultata na tetracikline u svinja podrijetlom iz Njemačke. Ovaj trend nije neobičan obzirom da je ta država najveći proizvođač svinja u EU sa godišnjom proizvodnjom većom od 58 miliona životinja (EFSA, 2015., 2016., 2017.). U 2014. godini je prijavljen nesukladni rezultat oksitetraciklina u

mesu goveda iz Hrvatske (EFSA, 2016.).

Nesukladni rezultati tetraciklinskih antibiotika u mesu i proizvodima koji su određeni u kontroli proizvoda sa tržišta članice EU prijavljuju kroz 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 2018. godine (zaključno sa 29.03.2018.) prijavljeno je ukupno 34 uzoraka mesa (Tablica 4) sa nesukladnim

**Tablica 3.** Broj nesukladnih rezultata za tetraciklinske antibiotike u okviru nacionalnih programa praćenja ostataka veterinarskih lijekova i dodatnih uzorkovanja članica EU u razdoblju 2013.-2015.

Godina	Vrsta životinje	Broj nesukladnih rezultata				Ukupno
		Tetraciklin	Oksitetraciklin	Klortetraciklin	Doksiciklin	
2013.	govedo	8	46	3	7	64
	svinja	6	23	14	55	98
	ovce/koze	-	5	5	1	11
	perad	-	5	5	2	12
	zečevi	-	-	-	1	1
	akvakultura	-	1	2	-	3
	mlijeko	-	1	-	3	4
	jaja	-	1	-	-	1
	<b>Ukupno</b>	<b>14</b>	<b>82</b>	<b>29</b>	<b>69</b>	<b>194</b>
2014.	govedo	11	63	-	3	77
	svinja	4	19	10	55	88
	ovce/koze	-	12	3	1	16
	perad	-	2	2	21	25
	zečevi	-	-	-	1	1
	akvakultura	-	15	-	3	18
	mlijeko	-	-	-	2	2
	jaja	-	-	-	7	7
	<b>Ukupno</b>	<b>15</b>	<b>111</b>	<b>15</b>	<b>93</b>	<b>234</b>
2015.	govedo	7	55	1	3	66
	svinja	10	19	4	44	77
	ovce/koze	-	11	3	1	15
	perad	-	1	1	14	16
	zečevi	-	1	-	-	1
	akvakultura	-	1	-	-	1
	mlijeko	1	-	-	-	1
	jaja	-	-	-	1	1
	<b>Ukupno</b>	<b>18</b>	<b>88</b>	<b>9</b>	<b>63</b>	<b>178</b>
	<b>Ukupno svi</b>	<b>47</b>	<b>281</b>	<b>53</b>	<b>225</b>	<b>606</b>

**Tablica 1.** Uzorci mesa i mesnih proizvoda sa nesukladnim koncentracijama tetraciklina prijavljeni u RASAFF sustav u razdoblju 2008.-2018. (29.03.2018.).

Datum prijave	Članica prijave	Vrsta proizvoda	Tetraciklini	Koncentracija (µg/kg; mg/kg)	Zemlja podrijetla
19/01/2018	Mađarska	piletina	doksiciklin	254 µg/kg	Rumunjska
17/11/2017	Belgija	meso patke	klortetraciklin	372, 2774 µg/kg	Bugarska
12/10/2017	Belgija	govedina	doksiciklin	270 µg/kg	Belgija
11/08/2017	Belgija	teletina	doksiciklin	120 µg/kg	Belgija
28/04/2017	Belgija	piletina	doksiciklin	210,5 µg/kg	Belgija
08/11/2016	Poljska	piletina	doksiciklin	246 µg/kg	Poljska
26/08/2016	Nizozemska	govedina	oksitetraciklin	nn	Nizozemska
03/08/2016	Poljska	svinjatina	doksiciklin	360, 1500 µg/kg	Poljska
20/06/2016	Litva	govedina	oksitetraciklin	1000 µg/kg	Litva
24/12/2015	Belgija	piletina	doksiciklin	218 µg/kg	Belgija
26/12/2014	Rumunjska	piletina	oksitetraciklin	109 µg/kg	Rumunjska
08/12/2014	Slovačka	piletina	oksitetraciklin	139 µg/kg	Mađarska
09/10/2014	Poljska	govedina	oksitetraciklin	334, 1970, 296 µg/kg	Poljska
08/08/2014	Poljska	govedina	oksitetraciklin	1450, 968 mg/kg	Poljska
20/06/2014	Belgija	piletina	oksitetraciklin	300 µg/kg	Belgija
05/05/2014	Belgija	pileća prsa	doksiciklin	146 µg/kg	Belgija
17/12/2013	Belgija	piletina	tetraciklin	> 100 µg/kg	Brazil
11/12/2013	Belgija	govedina	doksiciklin	> 200 µg/kg	Nizozemska
19/11/2013	Nizozemska	piletina	doksiciklin	246 µg/kg	Brazil
07/11/2013	Češka Republika	pileća prsa	doksiciklin	172 µg/kg	Brazil
09/09/2013	Poljska	svinjatina	doksiciklin	127 µg/kg	Poljska
29/08/2013	Poljska	piletina	doksiciklin	nn	Poljska
12/07/2013	Češka Republika	piletina	doksiciklin	> 300 µg/kg	Poljska
12/07/2013	Češka Republika	piletina	doksiciklin	243, 315 µg/kg	Poljska
04/07/2013	Belgija	svinjatina	doksiciklin	230 µg/kg	Belgija
14/03/2013	Nizozemska	govedina	oksitetraciklin	715 mg/kg	Poljska
08/11/2012	Belgija	piletina	doksiciklin	nn	Brazil
23/10/2012	Italija	govedina	klortetraciklin	358 µg/kg	Italija
20/08/2012	Slovačka	pileća prsa	doksiciklin	230 µg/kg	Poljska
21/09/2011	Italija	govedina	klortetraciklin	123 µg/kg	Italija
27/07/2010	Italija	kozje meso	oksitetraciklin	172,3 µg/kg	Francuska
08/07/2010	Njemačka	konjsko meso	oksitetraciklin	152 µg/kg	Argentina
22/06/2006	Italija	svinjatina	tetraciklin	160 mg/kg	Austrija
17/06/2005	Slovačka	piletina	doksiciklin	0,3 mg/kg	Češka Republika

nn – nije navedene koncentracija /nn – no data

koncentracijama višim od NDK odnosno 100 µg/kg (RASFF, 2010.-2018.). U ukupnom broju nesukladnih uzoraka na pojedine vrste se odnosilo: 16 piletna, 8 govedina, 5 svinjatina, 2 mesa pataka, jedno konjsko i jedno kozje meso.

Nesukladni rezultati su se odnosili na povećane koncentracije: 19 doksiciklin, 9 oksitetraciklin, 3 klortetraciklin, 3 tetraciklin. Među 16 nesukladnih uzoraka piletna 14 se odnosilo na doksiciklin u koncentracijama 146 do > 300 µg/kg, jedan na oksitetraciklin od 109 µg/kg, te jedan na tetraciklin > 100 µg/kg. U 8 uzoraka govedeg mesa utvrđene su koncentracije oksitetraciklina (5 uzoraka) u rasponu od 296 µg/kg do čak 1450 mg/kg (podrijetlo iz Poljske), odnosno klortetraciklina (2 uzorka) od 123 i 358 µg/kg, te doksiciklina od 275 µg/kg. U mesu patke podrijetlom iz Bugarske utvrđena je koncentracija klortetraciklina od čak 2774 µg/kg. U mesu kože i konja podrijetlom iz Francuske i Argentine određen je oksitetraciklin. U siječnju 2018. godine u Mađarskoj je prijavljen uzorak piletna podrijetlom iz Rumunjske sa koncentracijom doksiciklina od 254 µg/kg.

U istraživanju tetraciklina u mesu goveda sa pet različitih klaonica u Keniji određene su srednje vrijednosti ukupnih tetraciklina u rasponu od 110 do 280 µg/kg odnosno u jetri od 150 do 270 µg/kg (Muriuki i sur., 2001). U Iranu su u mesu goveda sa klaonica određene koncentracije tetraciklina od 18,7 µg/kg u mesu do najviše 112,9 µg/kg u jetri (Abasi i sur., 2009). Koncentracije oksitetraciklina u mesu iznosile su 62,0 µg/kg, odnosno u jetri 43,0 µg/kg, dok su koncentracije klortetraciklina u mesu i jetri iznosile 50,5 i 98,9 µg/kg. Istraživanje uzoraka mesa

i jetre kokoši s različitih lokacija u Egiptu pokazalo je da su u svim analiziranim uzorcima koncentracije tetraciklina, oksitetraciklina i klortetraciklina bile iznad 100 µg/kg (Salama i sur., 2011). U 26 uzoraka koncentracije tri tetraciklina su određene između 1000 i 3000 µg/kg.

## ZAKLJUČAK

U ovome istraživanju nisu utvrđene koncentracije četiri analizirana tetraciklina iznad propisanih NDK vrijednosti. Obzirom na dobivene sukladne rezultate koncentracija tetraciklina može se zaključiti da se liječenje životinja namijenjenih ishrani primjenom tetraciklina propisno provodilo te dobro pazilo na dopuštena propisana vremena zadržavanja tetraciklinskih antibiotika. Na ovaj način dolazi do izlučivanja tetraciklina iz životinjskih tkiva te time nema njihovih ostataka i postiže se zdravstvena sigurnost mesa, jetre, masnog tkiva te u konačnici i mesnih proizvoda za prehranu ljudi. Međutim, rezultati praćenja ostataka tetraciklina na razini nacionalnih planova praćenja ostataka veterinarskih lijekova u hrani životinjskog podrijetla u drugim zemljama EU ukazuju na nesukladne rezultate četiri tetraciklinska antibiotika. Time se zasigurno potvrđuje stalna potreba kontrole ostataka ovih antibiotika u svim fazama proizvodnje hrane životinjskog podrijetla posebice uzimajući u obzir da se u Hrvatskoj ova porodica antibiotika najviše koristi u liječenju životinja.

## LITERATURA

- Abasi, M. M., M. R. Rashidi, A. Javadi, M. B. Amirkhiz, S. Mirmahdavi, M. Zabihi (2009): Levels of tetracycline residues in cattle meat, liver, and kidney from a slaughterhouse in Tabriz, Iran. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 33(4), 345-349.
- Biselli, S., U. Schwalb, A. Meyer, L. Hartig (2013): A multi-class, multi-analyte method for routine analysis of 84 veterinary drugs in chicken muscle using simple extraction and LC-MS/MS. *Food Addit. Contam. A* 30, 921-939.
- Bittencourt, M.S., M.T. Martins, F.G.S. de Albuquerque, F. Barreto, R. Hoff (2012): High-throughput multiclass screening method for antibiotic residue analysis in meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a novel minimum sample preparation procedure. *Food Addit. Contam. A* 29, 508-516.
- Cabello, F.C. (2006): Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8, 1137-1144.
- Clarke, J.U. (1998): Evaluation of censored data methods to allow statistical comparisons among very small samples with below detection limit observations. *Environ. Sci. Technol.* 32, 177-183.
- Desmarchelier, A., S. Anizan, M.M. Tien, M.-C. Savoy, C. Bion (2018): Determination of five tetracyclines and their epimers by LC-MS/MS based on a liquid-liquid extraction with low temperature partitioning. *Food Addit. Contam. A* 35, 686-694.
- 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.
- 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. L* 221, 8-28.
- 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. L* 31, 1-24.
- 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. L* 15, 1-72.
- EC (2011): Communication from the Commission to the European Parliament and the Council. Action Plan against the Rising Threats from Antimicrobial Resistance. European Commission, Brussels, Belgium. COM (2011) 748.
- EC (2016): Evaluation of the EC Action Plan against the rising threats from antimicrobial resistance. Final Report. European Commission, Brussels, Belgium. B-1049 Brussels.
- 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.
- 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.
- 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.
- EFSA (2018): The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. EFSA J. February 2018.
- EMA (2017): Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015. Trends from 2010 to 2015. Seventh ESVAC report. European Medicines Agency, EMA/184855/2017.
- EMEA (1995): Sulfonamides, summary report (2) committee for veterinary medicinal products, EMEA. EMEA/MRL/026/95, 1995.
- Gaudin, V., A. Rault, C. Hedou, C. Soumet, E. Verdon (2017): Strategies for the screening of antibiotic residues in eggs: comparison of the validation of the classical microbiological met-

hod with and immunobiosensor method. *Food Addit. Contam. A*, 34, 1510-1527.

**Granados-Chinchilla, F., C. Rodríguez (2017):** Tetracyclines in Food and Feedingstuffs: From Regulation to Analytical Methods, Bacterial Resistance, and Environmental and Health Implications. *J. Anal. Methods Chem.* 2017, 24 pages.

**Kaale, E. M., Chambuso, J. Kitwala (2008):** Analysis of residual oxytetracycline in fresh milk using polymer reversed-phase column. *Food Chem.* 107, 1289-1293.

**Martins, M.T., F. Barreto, R.B. Hoff, L. Jank, J.B. Arsand, T.C. Feijó, E.E.S. Schapoval (2015):** Determination of quinolones and fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in bovine, swine and poultry liver using LC-MS/MS. *Food Addit. Contam. A* 32, 333-341.

**Makovec, S., B. Kos, J. Šušković, N. Bilandžić (2014):** Tetraciklinski antibiotici i određivanje njihovih rezidua u hrani. *Hrvat. čas. prehrambenu tehnol. biotehnol. nutr.* 9 (1-2), 7-16.

**Muriuki, F.K., W.O. Ogara, F.M. Njeruh, E.S. Mitema (2001):** Tetracycline residue levels in cattle meat from Nairobi slaughter house in Kenya. *J. Vet. Sci.* 2 (2), 97-101.

**Salama, N.A., S.H. Abou-Raya, A.R. Shalaby, W.H. Emam, F.M. Mehaya (2011):** Incidence of tetracycline residues in chicken meat and liver retailed to consumers. *Food Addit. Contam. B* 35, 686-694.

**Szczesny, S., H. Nau, G. Hamscher (2003):** Residue analysis of tetracyclines and their metabolites in eggs and in the environment by HPLC coupled with a microbiological assay and tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* 51, 697-703.

**Senyuva, H., T. Ozden, D.Y. Sarica (2000):** High-performance liquid chromatographic determination of oxytetracycline residue in cured meat products. *Turkish J. Chem.* 24, 395-400.

**Önal, A. (2011):** Overview on liquid chromatographic analysis of tetracycline residues in food matrices. *Food Chem.* 127, 197-203.

**Pikkemaat, M-G., M.L.B.A. Rapallini, S. Oostra-van Dijk, J.W.A. Elferink (2009):** Comparison of three microbial screening methods for antibiotics using routine monitoring samples. *Anal. Chim. Acta* 637, 298-304.

**Perme, T., M. Bizjak, K. Šinigoj Gačnik, A. Kirbiš (2010):** Validation of TwinsensorBT, screening test for the detection of  $\beta$ -lactams and tetracyclines in milk, and comparison to Delvotest@SP-NT. *Slov. Vet. Res.* 47 (3), 97-106.

**RASFF (2008-2018):** 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 29.03.2018.

Dostavljeno: 11.4.2018.

Prihvaćeno: 10.5.2018.

## Concentration of tetracycline antibiotics in meat and meat products

### SUMMARY

*Tetracycline antibiotics are the most used veterinary medicines in animals used for food production in Croatia. The aim of this study was to determine the concentrations of tetracycline, chlorothalacycline, oxiteracycline and doxycycline in pork meat (n = 101), liver (n = 31) and fatty tissue (n = 30), beef meat (n = 89) and liver (n = 20), and meat products (sausages and ham, n = 24). For the determination of tetracycline an immunoenzyme ELISA method was used which was validated according to the criteria of Commission Decision 2002/657/EC. Validation parameters for four analyzed tetracyclines ranged from: detection capabilities CC $\beta$  19.3 - 66.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , recoveries 64.5-102%, variation coefficients 14.1-28.9%, detection limits LOD 3.62-21.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . In a total of 295 analyzed samples tetracyclines were measured in the ranges ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ): tetracycline 10.5-92.1, chlortetracycline 2.63-28.0, oxiteracycline 17.5-91.3, doxycycline 1.81-14.0. The highest concentration 92.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  was determined for tetracycline in pork meat. The highest mean values were determined for ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ): tetracycline 23.6 in pork meat; oxiteracycline and chlortetracycline, 41.7 and 6.41 in beef meat. The mean values of doxycycline for all types of analyzed samples are below the LOD value (3.62  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Concentrations above maximum permissible concentrations for the four tetracyclines established by Commission Regulation 37/2010/EC have not been measured in all analyzed types of samples. Results confirmed that treatment with tetracycline antibiotic in animals used for food production was properly carried out, taking into account the prescribed withdrawal periods, thereby ensuring consumer health safety.*

**Key words:** tetracyclines, meat, liver, fatty tissue, meat products, food safety

## Konzentrationen von Tetrazyklinen im Fleisch und in Fleischerzeugnissen

### ZUSAMMENFASSUNG

*Tetrazykline sind die am häufigsten verwendeten Arzneimittel für Tiere, die für die Herstellung von Lebensmitteln in Kroatien verwendet werden. Ziel dieser Arbeit war es, die Konzentrationen von Tetrazyklinen, Chlortetrazyklinen, Oxytetrazyklinen und Doxazyklinen im Schweinefleisch (n=101), in der Leber (n=31), im Fettgewebe (n=30), im Rindfleisch (n=89) und in der Leber (n=20) sowie in*



Fleischerzeugnissen festzulegen (Würste und Schinken, n=24). Für die Festlegung der Tetracycline wurde die immunoenzymatische ELISA Methode eingesetzt, die nach den Kriterien der Entscheidung der Kommission 2002/657/EG validiert wurde. Für die vier analysierten Tetracycline wurden folgende Validierungsparameter festgelegt: Nachweisvermögen CC $\beta$  19,3 - 66,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Wiederfindung 64,5 - 102 %, Variationskoeffizient 14,1-28,9 %, Nachweisgrenze LOD 3,62 - 21,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . In den insgesamt 295 analysierten Tetracyclinproben wurden Tetracycline in folgender Spannweite ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) festgelegt: Tetracyclin 10,5 - 92,1, Clortetracyclin 2,63 - 28,0, Oxytetracyclin 17,5 - 91,3, Doxizylin 1,81 - 14,0. Die höchste Konzentration von 92,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  wurde beim Tetracyclin im Schweinefleisch ermittelt. Bei der Auswertung wurden die höchsten Mittelwerte wie folgt ermittelt ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ): Tetracyclin 23,6 im Schweinefleisch, Oxytetracyclin und Clortetracyclin 41,7 und 6,41 im Rindfleisch. Die mittleren Werte von Doxizylin bewegen sich bei allen analysierten Probetypen unterhalb der LOD Werte (3,62  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). In keiner Probe wurden Konzentrationen über den erlaubten Konzentrationen für die vier Tetracycline festgelegt, die durch die Verordnung 37/2010/EZ vorgeschrieben sind. Die ermittelten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Behandlung mit Tetracyclinen von Tieren, die für die Herstellung von Nahrungsmitteln bestimmt sind, vorschriftsmäßig durchgeführt wurde, wobei die vorgeschriebene Retentionszeit berücksichtigt wurde, wodurch die gesundheitliche Sicherheit der Verbraucher sichergestellt ist.

**Schlüsselwörter:** Tetracycline, Fleisch, Leber, Fettgewebe, Fleischerzeugnisse, Nahrungssicherheit

## Las concentraciones de antibióticos en carne y productos cárnicos

### RESUMEN

Los antibióticos de tetraciclina son los medicamentos veterinarios más usados en los animales destinados a la producción de carne en Croacia. El fin de este trabajo fue determinar las concentraciones de las tetraciclinas, clortetraciclinas, oxitetraciclinas y doxiciclinas en la carne de cerdo (n=101), hígado (n=31) y en el tejido adiposo (n=30), en la carne bovina (n=89) y en hígado (n=20) y en los productos cárnicos (embutidos y jamones, n=24). Para determinar las tetraciclinas fue usado el método inmunoenzimático ELISA, validado según los criterios de la Decisión de la Comisión 2002/657/CE. Fueron determinados los parámetros de validación para cuatro tetraciclinas analizadas: la capacidad de detección CC $\beta$  19,3 - 66,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , la recuperación 64,5 - 102 %, el coeficiente de variación 14,1-28,9 %, el límite de detección LOD 3,62 - 21,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En 295 muestras en total las tetraciclinas fueron medidas en siguientes concentraciones ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ): la tetraciclina 10,5 - 92,1, la clortetraciclina 2,63 - 28,0, la oxitetraciclina 17,5 - 91,3, la doxiciclina 1,81 - 14,0. La concentración más alta de 92,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  fue determinada para la tetraciclina en la carne de cerdo y para las oxitetraciclina (41,7) y clortetraciclina (6,41) en la carne bovina. Los valores medios de la doxiciclina para todas las muestras analizadas fueron bajo los valores LOD (3,62  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). En ningún tipo de muestras fueron determinadas las concentraciones superiores a las concentraciones máximas permisibles para todos los cuatro tipos de las tetraciclinas determinadas por el Reglamento (UE) 37/2010 de la Comisión. Los resultados determinados muestran que el tratamiento por las tetraciclinas de los animales destinados a la nutrición fue hecho según las regulaciones, teniendo en cuenta el tiempo de retención de antibióticos de tetraciclina y de esta manera fue asegurada la seguridad alimentaria de los consumidores.

**Palabras claves:** tetraciclinas, carne, hígado, tejido adiposo, productos cárnicos, seguridad alimentaria

## Concentrazione degli antibiotici tetracicline nella carne e nei prodotti a base di carne

### RIASSUNTO

Gli antibiotici tetracicline sono i farmaci veterinari più usati nell'industria della carne in Croazia. Questo studio aveva l'obiettivo di accertare la concentrazione di tetraciclina, clorotetraciclina, ossitetraciclina e doxiciclina nella carne (n=101), nel fegato (n=31) e nel tessuto adiposo (n=30) dei suini, oltre che nella carne (n=89) e nel fegato (n=20) dei bovini e nei prodotti a base di carne (salsicce e prosciutti, n=24). Per stabilire la concentrazione di tetracicline impiegate, è stato adoperato il test immunoenzimatico ELISA convalidato secondo i criteri della Decisione della Commissione 2002/657/CE. Sono stati accertati i parametri di convalida per quattro tetracicline analizzate nell'intervallo di concentrazione: capacità di rilevazione CC $\beta$  19,3 - 66,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , recupero 64,5 - 102%, coefficiente di variazione 14,1-28,9%, limite di rilevazione LOD 3,62 - 21,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . In 295 campioni analizzati complessivamente, sono state rilevate tetracicline nei seguenti intervalli di concentrazione: ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ): tetracicline 10,5 - 92,1, clorotetraciclina 2,63 - 28,0, ossitetraciclina 17,5 - 91,3 e doxiciclina 1,81 - 14,0. La maggior concentrazione di 92,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ha riguardato la tetraciclina ed è stata rilevata nella carne suina. I maggiori valori medi hanno riguardato ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ): la tetraciclina 23,6 nella carne suina, l'ossitetraciclina e la clorotetraciclina (rispettivamente 41,7 e 6,41) nella carne bovina. I valori medi della doxiciclina per ogni genere di campione analizzato sono risultati sotto i valori LOD (3,62  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). In nessun campione analizzato non è stata rilevata una concentrazione superiore alle concentrazioni massime consentite per le quattro tetracicline indicate dalla Decisione della Commissione 2002/657/CE. I risultati ottenuti dimostrano che l'approccio terapeutico mediante l'uso di tetracicline negli animali destinati al macello e all'alimentazione umana s'è svolto in maniera corretta, tenendo conto del tempo di assorbimento delle tetracicline nell'organismo animale e garantendo, così, la sicurezza alimentare dei consumatori.

**Parole chiave:** tetracicline, carne, fegato, tessuto adiposo, prodotti a base di carne, sicurezza alimentare