

**REZIDUE NITROFURANA U NAMIRNICAMA ANIMALNOG
POREKLA ******NITROFURANS' RESIDUES IN FOOD OF ANIMAL ORIGIN*****A. Smajlović, Indira Mujezinović, V. Čupić, M. Muminović****

Nitrofurani su sintetski antimikrobici širokog spektra koji se često koriste u masovnoj animalnoj proizvodnji zbog svojih odličnih antibakterijskih i farmakokinetičkih svojstava. Međutim, nitrofurani i njihovi metaboliti su pokazali da imaju potencijalne kancerogene i mutagene karakteristike, zbog čega je zabranjena njihova upotreba u profilaksi i terapiji životinja koje se koriste za proizvodnju hrane. Metaboliti nitrofurana koji se mogu utvrditi nakon njihove aplikacije su: metabolit furazolidona, metabolit furaltadona, metabolit nitrofurantoina i metabolit nitrofurazona. Prisustvo rezidua nitrofurana u mesu, ribi i škampima, te mleku i jajima poreklom iz zemalja van Evropske unije se prati i beleži putem RASFF sistema Evropske unije. Pošto se nitrofurani još uvek koriste u nekim zemljama kao profilaktička sredstva i promotori rasta, potrebno je sprovesti stalnu kontrolu različitih vrsta namirnica animalnog porekla. U Bosni i Hercegovini ne postoji stalna kontrola nitrofurana u namirnicama animalnog porekla. U odredbama „Pravilnika o maksimalno dozvoljenim količinama veterinarskih lekova i pesticida u proizvodima životinjskog porekla” objavljenog u Službenom glasniku Bosne i Hercegovine se navodi zabrana primene određenih veterinarskih lekova kod životinja koje se koriste za proizvodnju hrane namenjene ishrani ljudi, među kojima se nalaze i nitrofurani. Evropska Unija je ustanovila i minimalnu potrebnu granicu performanse (MRPL) metoda koja iznosi 1 µg/kg nitrofurana za jestiva tkiva životinjskog porekla. Uzevši sve ovo u obzir, trebalo bi izvršiti akreditaciju i validaciju metoda, kako „screening“ tako i konfirmativnih, te nakon toga ponovo

* Rad primljen za štampu 03. 03. 2011. godine

** Ahmed Smajlović, viši asistent, dr sci. med. vet. Indira Mujezinović, docent, Katedra za farmakologiju i toksikologiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Sarajevu, Bosna i Hercegovina; dr sci. med. vet. Vitomir Čupić, redovni profesor, Katedra za farmakologiju i toksikologiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija; dr sci. med. vet. Mehmed Muminović, redovni profesor, Katedra za farmakologiju i toksikologiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Sarajevu, Bosna i Hercegovina

sprovesti daljnja istraživanja prisustva nitrofurana u namirnicama animalnog porekla u Bosni i Hercegovini.

Ključne reči: MRPL, nitrofurani, RASFF sistem, screening i konfirmativne metode

Uvod / Introduction

Nitrofurani su sintetski antimikrobnici širokog spektra koji se često koriste u masovnoj animalnoj proizvodnji zbog svojih odličnih antibakterijskih i farmakokinetičkih svojstava. U prošlosti su također korišteni kao promotori rasta i profilaktička sredstva u uzgoju svinja, peradi i ribe. Glavni razlozi za njihovo korištenje su bili njihova efikasnost i pristupačna cena. Tokom dugogodišnjih istraživanja koja su sprovedena na laboratorijskim životinjama, nitrofurani i njihovi metaboliti su ispoljili kancerogene i mutagene karakteristike, što je dovelo do zabrane njihove upotrebe u profilaksi i u terapijskom tretmanu životinja koje se koriste za proizvodnju hrane. Tako je upotreba furaltadona, nitrofurantoina i nitrofurazona zabranjena kod životinja za proizvodnju hrane u zemljama Evropske unije još od 1993. godine, a od 1995. godine i furazolidona.

Kako kontrola rezidua nitrofurana koja je u prošlosti zasnivana na utvrđivanju koncentracije furazolidona u krvi i tkivima nije dovoljno validna, zaključeno je da se vrši praćenje rezidua na osnovu utvrđivanja „roditeljskih“ nitrofurana, što daje odgovarajuće nalaze stvarnog prisustva nitrofurana odnosno njihovih metabolita u tkivima i organima (Vass i sar., 2008).

Nitrofurani, naročito furazolidon (FZD), furaltadon (FTD), nitrofurantion (NFT) i nitrofurazon (NFZ) spadaju u klasu sintetskih antimikrobnih sredstava širokog spektra, od kojih svi sadrže karakterističan 5-nitrofuranski prsten, a s uspehom se koriste protiv salmonela, koliforma, mikoplazmi, kokcidijskih i nekih drugih protozoa (Ćupić i sar., 2007; Bishop, 2005). Prije su korišteni kao dodaci hrani za promociju rasta naročito kod svinja, goveda i peradi, u akvakulturi (za ribe i škampe), te u profilaktičke i terapijske svrhe kod pčela. Danas im je upotreba ograničena na male životinje (pse i mačke) i konje i to za lečenje urinarnih infekcija uzrokovanih nekim od pomenutih uzročnika (Plumb, 2008; Osweiler, 1996). Evropska komisija 1995. godine potpuno zabranjuje upotrebu nitrofurana u Evropskoj uniji, kod životinja namenjenih za ishranu ljudi. Zabrana je usledila zbog rastuće zabrinutosti u vezi sa potencijalnom kancerogenošću rezidua nitrofurana i mogućim štetnim posledicama po zdravlje ljudi (1442/95/EC).

Mehanizam delovanja nitrofurana se zasniva na inhibiciji enzima uključених u ciklus trikarboksilne kiseline, gde ometaju aerobnu oksidaciju glukoze. Metabolički aktivna tkiva, kao što su mozak, bubrezi i jetra, veoma su ovisna o aerobnom metabolizmu i zbog toga najpodložnija toksičnosti nitrofurana. To je razlog što se i većina kliničkih znakova toksikoze odnosi na pomenute organe (Osweiler, 1996).

U svrhu kontrole nedopuštene upotrebe nitrofurana merenjem nivoa rezidua u tkivima, potrebno je kontrolisati marker rezidue, odnosno metabolite „roditeljskog” leka. Stoga su razvijene nove metode, a sve u cilju razvoja visokosenzitivnih i specifičnih metoda za utvrđivanje nitrofurana. Danas se u ovu svrhu koristi ELISA kao „screening“ metod, te LC/MS/MS kao konfirmativni metod (2002/657/EC).

Analiza rezidua nitrofurana / *Analysis of nitrofuran residue*

S obzirom na to da je u veterinarskoj praksi prisutna zloupotreba nitrofurana i kod životinja koje se koriste za ljudsku ishranu, to je neophodna stalna kontrola njihovih rezidua. Savremena analiza rezidua nitrofurana se zasniva na detekciji samo njihovih metabolita koji su vezani za tkivo. Razlog je to što se nitrofurani veoma brzo metaboliziraju, te se ubrzo nakon tretmana ne mogu utvrditi u tkivima. Ipak, srećna okolnost je da se njihovi metaboliti vezani za tkivo mogu utvrditi dugo nakon aplikacije i zbog toga se koriste u detekciji zloupotrebe nitrofurana. Metaboliti nitrofurana koji se mogu utvrditi nakon njihove aplikacije su:

1. metabolit furazolidona (3-amino-2-oksazolidinon = AOZ),
2. metabolit furaltadona (3-amino- 5-morfolinometil-2-oksazolidinon = AMOZ),
3. metabolit nitrofurantoina (1-amino- hidantoin = AHD) i
4. metabolit nitrofurazona (semikarbazid = SEM).

Prisustvo rezidua nitrofurana u mesu, ribi i škampima, te mleku i jajima poreklom iz zemalja van Evropske unije prati se i beleži putem RASFF sistema Evropske unije. Obaveštavanje o zdravstveno neispravnoj hrani i hrani za životinje kroz evropski RASFF sistem brzog uzbunjivanja (Rapid Alert System for Food and Feed) koristi se u slučajevima direktnog i indirektnog rizika za ljudsko zdravlje koji potiče iz hrane i hrane za životinje. RASFF sistem je osnovni alat za razmenu informacija između kompetentnih institucija u zemljama članicama. U slučajevima kada postoji rizik za ljudsko zdravlje, a zbog kojega su pokrenute određene mere poput povlačenja, zaplene ili zabrane prodaje određenih proizvoda. Od maja 2003. godine Evropska komisija izdaje sedmične izveštaje koji sadrže informacije o zdravstveno neispravnoj hrani i hrani za životinje nađenju na tržištu EU, te o onoj hrani koja je odbijena sa vanjskih granica EU. Tako je u godišnjem izveštaju za 2009. utvrđen značajan rast zastupljenosti rezidua nitrofurana u škampima namenjenim za uvoz u EU, a poreklom iz Bangladeša, Indije i Šri Lanke (RASFF Annual Report 2009). Ovo je dokaz da se nitrofurani još uvijek koriste u nekim zemljama kao profilaktička sredstva i promotori rasta.

Kontrola rezidua / *Residue control*

Zbog svega navedenog, jasno je da je neophodno sprovoditi stalnu kontrolu različitih vrsta namirnica animalnog porekla, gde spadaju: meso (goveda, svinjsko i pileće), njihove iznutrice (jetra), jaja, mleko, te riba i škampi, kako bi se sveli na minimum potencijalni kancerogeni i mutageni efekti ovih susptancija

po zdravlje potrošača. U Bosni i Hercegovini ne postoji stalna kontrola nitrofurana u namirnicama animalnog porijekla. Iako postoji Plan kontrole rezidua nitrofurana Ureda za veterinarstvo Bosne i Hercegovine, koji predviđa kontrolu samo manjeg broja uzoraka animalnog porekla proizvedenih na teritoriji cele države na godišnjem nivou, ipak ne postoji plan kontrole uzoraka iz uvoza.

Kako je već spomenuto da nitrofurani imaju jako kancerogeno i mutageno delovanje, to je neophodno vršiti stalnu kontrolu njihove zastupljenosti i količina u namirnicama animalnog porekla, što treba regulisati odgovarajućom legislativom.

Legislativa / *Legislature*

Nitrofuranski antibiotici su uključeni u Aneks IV Pravilnika Evropske komisije 1442/95 kao jedinjenja koja nisu dozvoljena za upotrebu kod životinja namenjenih za ishranu ljudi. Odredbe ovoga pravilnika su preuzete i uvrštene u „Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama veterinarskih lijekova i pesticida u proizvodima životinjskog porijekla” objavljenog u Službenom glasniku Bosne i Hercegovine broj 6 od 27.01.2009. godine. U Aneksu IV ovog Pravilnika se navodi zabrana primene određenih veterinarskih lekova kod životinja koje se koriste za proizvodnju hrane namenjene ishrani ljudi, među kojima se nalaze i nitrofurani. Evropska Unija je također ustanovila minimalnu potrebnu granicu performance (MRPL) metoda koja iznosi 1 µg/kg za jestiva tkiva životinjskog porekla (Commission Decision, 2003). Kako u Evropskoj uniji tako i u BiH, nedozvoljena upotreba nitrofurana se kontroliše službenim inspekcijским i analitičkim kontrolama, gde se laboratorije zadužene za ispitivanje prisustva rezidua obično susreću sa velikim brojem uzoraka koje treba ispitati na prisustvo velikog broja različitih jedinjenja u kratkom vremenu. Iz ovog razloga, korištenje brzih „screening“ metoda kao što je ELISA može poboljšati efikasnost kontrole. Sve sumnjive uzorke bi trebalo i proveriti nekom od konfirmativnih metoda, što nažalost, kod nas nije moguće uraditi.

Iako je utvrđen MRLP od 1 µg/kg, primena i interpretacija ove legislative pri izvozu u Evropsku uniju je veoma komplikovana, gde prema nekim odlukama Evropske komisije analitička metoda nije zadovoljavajuća ako ne može utvrditi prisustvo vrlo niskih koncentracija metabolita nitrofurana. Prema ovome, potrebno je da metoda može kvantificirati vrijednosti do 1 µg/kg, ali nije specificirana najniža vrednost analita koju treba utvrditi. Ova je vrednost poznata pod nazivom granica ili limit odluke (CC_{α}) i utvrđena je u različitim laboratorijama Evropske unije upotrebom validacijskih procedura. CC_{α} se definiše kao granica gde se za neku supstancu može zaključiti da je pozitivna sa mogućnošću greške od $\alpha = 1\%$. Pored toga, fluktuacija CC_{α} među različitim instrumentalnim metodama i laboratorijama dalje komplikuje upotrebu ovog parametra za potrebe zahteva nulte tolerancije rezidua nitrofurana u hrani animalnog porekla.

Da bi osigurali kvalitet i uporedivost analitičkih rezultata dobivenih u laboratorijama, Evropska komisija je donela niz pravilnika koji se tiču uobičajenih

kriterija delovanja (performansi) za analizu rezidua te utvrdila uputstva za validaciju i „screening“ i konfirmatornih analitičkih metoda (EC 657/2002). Ovakvi pravilnici još uvek nisu usvojeni u Bosni i Hercegovini. Prema ovoj odluci Evropske komisije, karakteristike metode kao što su sposobnost detekcije (CC_{β}), preciznost, selektivnost i upotrebljivost/stabilnost trebaju biti procenjene da bi „screening“ metoda bila klasificirana kao kvantitativna. Za nitrofurane, koji nemaju utvrđenu maksimalnu granicu rezidua (eng. MRL – maximum residue limit) u životinjskim tkivima namenjenim za ishranu ljudi, CC_{β} se definiše kao najniža koncentracija određene supstance koja se može izmeriti određenom metodom za mogućnošću greške od $\beta = 5\%$.

Uzevši sve ovo u obzir, trebalo bi izvršiti akreditaciju i validaciju metoda, kako „screening“ tako i konfirmativnih, te nakon toga ponovo sprovesti daljnja istraživanja prisustva nitrofurana u namirnicama animalnog porekla u Bosni i Hercegovini.

Zaključak / Conclusion

1. Zbog dokazanog potencijalnog kancerogenog i mutagenog delovanja upotreba nitrofurana danas je ograničena na male životinje (pse i mačke) i konje za lečenje urinarnih infekcija uzrokovanih osetljivim uzročnicima.

2. U svrhu kontrole nedopuštene upotrebe nitrofurana merenjem nivoa rezidua u tkivima, potrebno je kontrolisati marker rezidue odnosno metabolite „roditeljskog“ leka. Danas se u ovu svrhu koristi ELISA kao „screening“ metod, te LC/MS/MS kao konfirmativni metod (2002/657/EC).

3. Metaboliti nitrofurana koji se mogu utvrditi nakon njihove aplikacije su: metabolit furazolidona, metabolit furaltadona, metabolit nitrofurantoina, te metabolit nitrofurazona.

4. Pošto je u godišnjem izveštaju Evropske unije za 2009. utvrđen značajan rast količine rezidua nitrofurana u škampima namenjenim za uvoz u EU, a poreklom iz Bangladeša, Indije i Šri Lanke (RASFF Annual Report 2009), potrebno je sprovoditi stalnu kontrolu različitih vrsta namirnica animalnog porekla, gde spadaju: meso (goveđe, svinjsko i pileće), njihove iznutrice (jetra), jaja, mleko, te riba i škampi, kako bi se na minimum sveli potencijalni kancerogeni i mutageni efekti ovih susptancija po zdravlje potrošača.

5. Nitrofuranski antibiotici su uključeni u Aneks IV Pravilnika Evropske komisije 1442/95 kao jedinjenja koja nisu dozvoljena za upotrebu kod životinja namenjenih za ishranu ljudi.

6. Evropska unija je ustanovila i minimalnu potrebnu granicu performance (MRPL) metoda koja iznosi $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ za jestiva tkiva životinjskog porekla.

7. Prema odlukama Evropske komisije niti jedna analitička metoda nije zadovoljavajuća ako ne može utvrditi prisustvo vrlo niskih koncentracija metabolita nitrofurana.

8. Prema odluci Evropske komisije, karakteristike performanci kao što su sposobnost detekcije (CC_{α}), preciznost, selektivnost i upotrebljivost/stabilnot trebaju biti procenjene da bi „screening“ metoda bila klasificirana kao kvantitativna. Za nitrofurane, koji nemaju utvrđenu maksimalnu granicu rezidua (eng. MRL – maximum residue limit) u životinjskim tkivima namenjenim za ishranu ljudi, CC_{β} se definiše kao najniža koncentracija određene supstance koja se može izmeriti određenom metodom za mogućnošću greške od $\beta = 5\%$.

9. Na osnovu svega navedenog, trebalo bi izvršiti akreditaciju i validaciju metoda, kako „screening“ tako i konfirmativnih, te nakon toga ponovo sprovesti daljnja istraživanja prisustva nitrofurana u namirnicama animalnog porekla u Bosni i Hercegovini.

Literatura / References

1. Bishop Y. The Veterinary formulary. 6th edition, Pharmaceutical Press, 2005.
2. Ćupić V, Muminović M, Kobal S, Velev R. Farmakologija za studente veterinarske medicine. Heleta. Beograd, Sarajevo, Ljubljana, Skoplje, 2007.
3. Vass M, Hruska K, Franek M. Nitrofuran antibiotics: A review of the application, prohibition and residual analysis. Veterinarni Medicina 2008; 53(9): 469-500.
4. Osweiler GD. Toxicology. Williams and Wilkins, 1996.
5. Plumb DC. Veterinary Drug Handbook. 6th editio, Blackwell Publishing, 2008.
6. Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama veterinarskih lijekova i pesticida u proizvodima životinjskog porijekla. Službeni glasnik Bosne i Hercegovine, 06/2009.
7. Commission Decision of implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the implementation of the results. 2002/657/EC.
8. Commission Regulation Commission amending Annexes I, II, III and IV of Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in food-stuffs of animal origin. 1442/95/EC.
9. RASFF Annual Report 2009. European Commission Directotote-General for Health and Consumers, Europena Union, 2010.

ENGLISH

NITROFURAN RESIDUE IN FOOD OF ANIMAL ORIGIN

A. Smajlović, Indira Mujezinović, V. Ćupić, M. Muminović

Nitrofurans are synthetic broad-spectrum antimicrobial agents that are often used in commercial animal production because of their excellent antibacterial and pharmacokinetic properties. However, nitrofurans and their metabolites have been shown to have potentially carcinogenic and mutagenic characteristics which has led to a ban on the use of nitrofurans in preventive and therapeutic treatment of animals used for food production.

Metabolites of nitrofurans that can be determined after their application are: a metabolite of furazolidone, furaltadone metabolite, a metabolite of nitrofurantoin and nitrofurazone metabolite. The presence of residues of nitrofurans in meat, fish and shrimps, and milk and eggs originating from countries outside the European Union is monitored and recorded by the RASFF system of the European Union. Furthermore, since nitrofurans are used in some countries as prophylactic agents and growth promoters, it is necessary to carry out constant control of various types of food of animal origin, in order to reduce to the minimum potential carcinogenic and mutagenic effects of these substances for the health of consumers. In Bosnia and Herzegovina, there is no permanent control of nitrofurans in food of animal origin. The provisions of the „Regulation on the maximum allowable amounts of veterinary drugs and pesticides in products of animal origin“, published in the Official Gazette of Bosnia and Herzegovina state the prohibiting of the use of certain veterinary drugs in animals intended for human consumption, including nitrofurans. The European Union has established the minimum required limit (MRLP) for performance which is 1 µg/kg of nitrofurans for edible tissues of animal origin. Taking all this into account, methods for nitrofurans detection should be accredited and validated, both for screening and confirmatory methods, and further research into the presence of nitrofurans in food of animal origin in Bosnia and Herzegovina should be performed.

Key words: nitrofurans, RASFF system, MRLP, screening and confirmative methods

РУССКИЙ

ОСТАТКИ НИТРОФУРАНОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ АНИМАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

А. Смайлович, Индира Муезинович, В. Чупич, М. Муминович

Нитрофураны - синтетические антимикробики широкого спектра, которые часто используются в массовом животноводстве из-за своих отличных антибактериальных и фармакокинетических свойств. Между тем, нитрофураны и их метаболиты показали, что имеют потенциальные канцерогенные и мутагенные характеристики, что привело к запрещению их употребления в профилактике и терапии животных, используемых для производства пищи. Метаболиты нитрофуранов, которые могут образоваться после их аппликации суть: метаболит фуразолидона, метаболит фуралидадона, метаболит нитрофурантоина и метаболит нитрофуразона. Присутствие остатков нитрофуранов в мясе, рыбе и раках, и молоке и яйцах происхождения из стран вне Европейской Унии следится и записывается путём РАСФФ системы Европейской Унии. Так как нитрофураны всё ещё используются в некоторых странах как профилактические средства и промоторы роста, нужно проводить постоянный контроль различных видов пищевых продуктов животного происхождения. В Боснии и Герцеговине не существует постоянный контроль нитрофуранов в пищевых продуктах животного происхождения. В определениях "Инструкции о максимально разрешенных количествах ветеринарных лекарств и пестицидов в продуктах животного происхождения" объявленной в Службеном вестнике Боснии и Герцеговины приводится запрещение применения определенных ветеринарных лекарств у животных, используемых для производства пищи, предназначенной для питания людей, между которыми находятся и нитрофураны. Европейская Уния установила и минимальную необходимую границу перформансы

(МНГП) метода која саставља (у сумми) 1 мг/кг нитрофуранова за једобних ткива животног поришодениа. Прињава во внимаиие, нужно было совершити аккредитацију и потврдиение методов, как "*screening*" так и конфирмационных, и после этого снова провести дальние исследовния присутствия нитрофуранова в пищевых продуктах анимального поришодениа в Боснии и Герцеговини.

Ключевые слова: нитрофураны, РАСФФ система, МНГП, *screening* и конфирмативные методы