

Stosowanie i kontrola substancji przeciwbakteryjnych w paszach – regulacje UE oraz zagrożenia związane z ich obecnością

© EWELINA PATYRA, © KRZYSZTOF KWIATEK

Zakład Higieny Pasz, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 10.11.2021

Zaakceptowano 22.11.2021

Patyra E., Kwiatek K.

Use and control of antimicrobial substances in animal feed – EU regulations and the risks related to their presence

Summary

Animal feeds are routinely subject to contamination from diverse sources, including environmental pollution, activities of microbes, and veterinary drug residues. Contamination of feed with chemical substances such as coccidiostats or antibiotics can occur at the stage of production, transport and storage, and their presence may have a negative impact on the health of animals consuming feed contaminated with certain chemicals. This study presents the legal requirements for the production of feed, the presence of antimicrobial substances in feed, and the problem of contamination of feed with antibacterial substances as well as the possible transfer of these compounds to the animal tissues and the natural environment.

Keywords: feed production, feed legislation, cross-contamination, antibacterial substances, environmental pollution

Proces produkcji, przetwórstwa i marketingu w łańcuchu żywnościowym począwszy od etapu produkcji pierwotnej, a skończywszy na gospodarstwach domowych, czyli po przejściu całej drogi „od pola do stołu” narażony jest na różnego rodzaju zagrożenia dla producentów i konsumentów żywności. Pasze dla zwierząt są rutynowo narażone na zanieczyszczenie z różnych źródeł, w tym zanieczyszczenia pochodzenia środowiskowego (np. mikotoksyny), działalności drobnoustrojów lub pozostałości leków weterynaryjnych. Skażenie pasz substancjami chemicznymi, takimi jak substancje przeciwbakteryjne (antybiotyki, sulfonamidy i chinolony), może wystąpić na etapie produkcji, transportu i przechowywania, a ich obecność może mieć negatywny wpływ na stan zdrowia zwierząt spożywających paszę zanieczyszczoną tymi substancjami.

Zakres potencjalnych zagrożeń związanych z produkcją pasz jest szeroki. Wiele z tych zagrożeń jest istotnych niezależnie od źródła paszy, ale lokalne środowisko produkcyjne i określone procesy produkcyjne mogą mieć krytyczne znaczenie z punktu widzenia ich rozpowszechnienia. W niniejszej pracy skupiono się na przedstawieniu wymogów prawa paszowego,

możliwych dróg zanieczyszczenia pasz substancjami przeciwbakteryjnymi, ich obecności w żywności i produktach pochodzenia zwierzęcego, a także potencjalnego transferu do środowiska naturalnego.

Substancje przeciwbakteryjne w paszach w świetle uregulowań prawnych

Substancje przeciwbakteryjne, w tym antybiotyki i sulfonamidy, w paszach mogą być podawane wyłącznie w postaci paszy leczniczej, co zgodnie z definicją Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/4 z dnia 11 grudnia 2018 r. oznacza paszę gotową do bezpośredniego karmienia zwierząt bez dalszego przetwarzania, składającą się z jednorodnej mieszaniny co najmniej jednego weterynaryjnego produktu leczniczego lub półproduktu i materiałów paszowych lub mieszanek paszowych (46). Paszę leczniczą można wytwarzać wyłącznie z weterynaryjnych produktów leczniczych dopuszczonych do stosowania w paszach leczniczych, a ze względu na bezpieczeństwo i skuteczność produktu należy zapewnić zgodność wszystkich użytych składników. Wśród substancji przeciwbakteryjnych dopuszczonych do stosowania w paszach leczniczych należą substancje przeciwbak-

teryjne z różnych grup chemicznych, a mianowicie: tetracykliny, sulfonamidy, pleuromutyliny, makrolidy, linkozamidy, β -laktamy, których mechanizm działania i spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej są zróżnicowane (<http://www.urpl.gov.pl> – Informacja Prezesa Urzędu z dnia 4 sierpnia 2021 r. w sprawie Urzędowego Wykazu Produktów Leczniczych; Załącznik Nr 4). Warto zwrócić uwagę, że w leczeniu zwierząt i ludzi stosuje się te same grupy chemioterapeutyków, co dodatkowo stwarza zagrożenie dla zdrowia publicznego. Z tych powodów pasza lecznicza i inne rodzaje pasz podlegają kontroli producenckiej oraz kontroli urzędowej. Zgodnie z przepisami UE, każde państwo członkowskie jest zobowiązane do corocznego opracowywania i wdrażania oficjalnego planu kontroli pasz (45). Nadrzędnym celem wdrożonego planu urzędowej kontroli pasz jest zapewnienie bezpieczeństwa i odpowiedniej jakości produkowanej, wprowadzanej do obrotu i stosowanej w żywieniu zwierząt paszy. Wdrażany urzędowy plan kontroli pasz obejmuje aspekty związane z planem pobierania próbek, zastosowanymi metodami badań, analizą ryzyka i częstotliwością kontroli urzędowych. Uwzględnia potrzebę prowadzenia badań laboratoryjnych próbek pasz w kierunkach, które są wyznacznikami bezpieczeństwa i jakości handlowej pasz. W ramach kontroli wykonywane są m.in. badania w kierunku oznaczania zawartości i homogeniczności (jednorodności zmieszania leku weterynaryjnego z materiałem paszowym) substancji czynnej w paszy leczniczej oraz na wykrywanie substancji przeciwbakteryjnych, w tym antybiotyków, chinolonów i sulfonamidów w paszach. Działania te zostały uwzględnione w planie urzędowej kontroli pasz jako uzupełnienie oficjalnego nadzoru nad produkcją żywności i związanego z nim krajowego programu kontroli substancji niedozwolonych, pozostałości chemicznych, produktów biologicznych i leczniczych u zwierząt oraz w żywności pochodzenia zwierzęcego. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/4 z dnia 11 grudnia 2018 r. w sprawie wytwarzania, wprowadzania do obrotu i stosowania paszy leczniczej, zmieniające Rozporządzenie (WE) nr 183/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady i uchylające Dyrektywę Rady 90/167/EWG, kładzie nacisk na bezpieczeństwo stosowania paszy leczniczej i paszy niedocelowej. Zgodnie z przywołanymi przepisami, pasza niedocelowa definiowana jest jako pasza lecznicza lub inna, która nie ma zawierać określonej substancji czynnej (46). Podmioty działające na rynku pasz mogą wytwarzać szeroką gamę pasz dla różnych zwierząt docelowych w jednym zakładzie, zawierającą różne rodzaje składników, takich jak dodatki paszowe lub weterynaryjne produkty lecznicze. Produkcja różnych rodzajów pasz na tej samej linii produkcyjnej może prowadzić do obecności śladowych ilości substancji czynnej na tej linii, które znajdują się w pierwszych partiach produkcyjnych następnej paszy. To przenoszenie śladów substancji czynnej z jednej partii produkcyjnej

do drugiej nazywa się „zanieczyszczeniem krzyżowym”. Zanieczyszczenie krzyżowe może wystąpić podczas produkcji, przetwarzania, przechowywania lub transportu paszy, gdy ten sam sprzęt jest używany do pasz zawierających różne składniki zarówno w zakładzie produkcyjnym, jak i na fermie (40). Obecność antybiotyków w paszach, oprócz zanieczyszczenia krzyżowego, może być wynikiem celowego, błędnego lub niewłaściwego stosowania weterynaryjnych produktów leczniczych przez hodowców. Obecnie substancje przeciwdrobnoustrojowe w paszach innych niż lecznicze nie mogą być obecne i nie ma dla nich ustalonych maksymalnych limitów (ML). Zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady 2019/4, maksymalne poziomy zanieczyszczenia krzyżowego paszy niedocelowej substancjami czynnymi o działaniu przeciwdrobnoustrojowym oraz metody ich analizy w paszy mają zostać wprowadzone do 28 stycznia 2023 r. (46).

Antybiotykowe stymulatory wzrostu jako dodatek paszowy

Antybiotyki jako dodatki do pasz zaczęto stosować na przełomie lat czterdziestych i pięćdziesiątych XX w., kiedy przypadkowo odkryto, że dodanie streptograminy do paszy dla kurcząt zwiększa przyrost masy ciała. Wkrótce potem, w 1949 r., podobny efekt zaobserwowano u kurcząt po podaniu produktu pofermentacyjnego zawierającego niewielkie ilości wytwarzanej przez *Streptomyces aureofaciens* chlortetracykliny (50). Ten stymulujący wpływ antybiotyków na przyrosty masy ciała został również potwierdzony w dalszych badaniach na świniami i bydłem (21, 50). Obserwacje te stworzyły podstawę do szerokiego wprowadzenia antybiotyków do żywienia zwierząt jako stymulatorów wzrostu (41).

Stosowanie antybiotyków w paszach było próbą ochrony zwierząt gospodarskich przed zaburzeniami równowagi mikrobiologicznej przewodu pokarmowego. Zastosowanie antybiotyków w paszach wykazujących działanie przeciwko bakteriom Gram-dodatnim pozwoliło na eliminację przewlekłych infekcji jelitowych, zwiększając efektywność produkcji zwierzęcej (13, 24, 25). Kolejne badania potwierdziły, że obecność antybiotyku w paszy poprawia przyrost masy ciała zwierząt oraz stopień wykorzystania paszy poprzez lepsze wchłanianie składników pokarmowych w kosmkach jelitowych (4). Przeprowadzone obserwacje wykazały, że podawanie antybiotyków w paszy poprawia wzrost zwierząt rzeźnych o około 4-8% oraz zwiększa wykorzystanie paszy o 2-5%, jak też wpływa na hamowanie wchłaniania toksyn w jelitach (15).

Stosowanie antybiotyków jako dodatków paszowych było cechą charakterystyczną wielkostadnych hodowli zwierząt, ale ta szeroko rozpowszechniona praktyka nie była pozbawiona krytyki. W pierwszych latach ich stosowania w hodowli zwierząt wszystkie antybiotyki były dozwolone do stosowania, chociaż

niektóre nie wykazywały wpływu na poprawę wzrostu, a inne były zbyt drogie, a więc ekonomicznie nieopłacalne do stosowania w żywieniu zwierząt rzeźnych (8).

Po pewnym okresie ich stosowania zauważono, że nadmierne, często nieuzasadnione stosowanie, a także nieodpowiednie dawkowanie i stosowanie w celach pozaterapeutycznych stało się przyczyną wielu problemów. Najważniejszym z nich okazało się zjawisko lekooporności i stale rosnąca liczba gatunków drobnoustrojów opornych na stosowane antybiotyki, co stanowiło istotne zagrożenie dla skuteczności tych leków w leczeniu chorób zakaźnych (9).

Pierwsze dyskusje na temat stosowania antybiotyków jako antybiotykowych stymulatorów wzrostu rozpoczęły się pod koniec lat 60. XX w. i zaowocowały „Raportem Swanna”, który został opublikowany w Wielkiej Brytanii (52). Raport ten zawierał propozycję ograniczenia i uporządkowania stosowania antybiotyków jako dodatków paszowych. W raporcie zalecono również ograniczenie ich stosowania w chowie zwierząt oraz zwrócono uwagę m.in. na konieczność wydzielenia tzw. antybiotyków paszowych, do wyłącznego stosowania w weterynarii i dostępnych wyłącznie na receptę lekarza weterynarii. Raport zwrócił także uwagę na możliwość rozwoju mikroorganizmów lekoopornych (51). Raport Swanna stał się ponadto podstawą prawodawstwa europejskiego w Dyrektywie 70/524, w której opublikowano listę dopuszczonych dodatków wraz z ich maksymalnymi i minimalnymi dawkami, okresem karencji oraz gatunkami zwierząt, u których może zostać zastosowana dana substancja przeciwbakteryjna. Dyrektywa została później wdrożona do ustawodawstwa krajowego poszczególnych państw członkowskich UE. Zalecenia te doprowadziły do wycofania w latach 1972-1974 antybiotyków, takich jak penicylina, streptomycyna i tetracykliny, jako stymulantów wzrostu w wielu krajach europejskich. W rezultacie w 1986 r. w Szwecji wprowadzono całkowity zakaz stosowania ASW u zwierząt hodowlanych. Od 1997 r. ten i kilka innych antybiotyków, takich jak: bamberycyna, bacytracyna, wirgniamycyna, tylozyna, spiramycyna, awoparcyna, awilamycyna, olaquindoks i karbadoks, zostały zakazane w państwach członkowskich UE jako dodatki do pasz. Podobny zakaz został wydany w Norwegii w 1995 r. ze względu na doniesienia o pojawieniu się oporności na wankomycynę wśród szczepów *Enterococcus*. Dania wkrótce poszła w ślady pozostałych krajów UE, stopniowo wycofując antybiotykowe stymulatory wzrostu (ASW) stosowane w żywieniu zwierząt od 1999 r. Przeciwnicy takiego rozwiązania argumentowali, że konsekwencją zakazu stosowania ASW będzie wzrost stosowania środków chemioterapeutycznych do celów terapeutycznych, które w przeciwieństwie do ASW łatwo penetrują ścianę jelita i wchłaniają się do organizmu zwierzęcia (10).

W 2003 r. Parlament Europejski i Rada przyjęły Rozporządzenie nr 1831/2003 w sprawie dodatków paszowych, które od dnia 1 stycznia 2006 r. całko-

wicie zabroniło ich stosowania w żywieniu zwierząt rzeźnych jako antybiotykowych stymulatorów wzrostu innych niż histomonostatyki i kokcydiostatyki. Obecnie we wszystkich państwach członkowskich UE jedyną legalną drogą podawania substancji przeciwbakteryjnych w paszach są tzw. pasze lecznicze wytwarzane w celach leczniczych na zlecenie lekarza weterynarii (48).

Pasza lecznicza jako forma podania leku

Pasza lecznicza w rozumieniu Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/4 z dnia 11 grudnia 2018 r. oznacza paszę, która jest gotowa do bezpośredniego karmienia zwierząt bez dalszego przetwarzania, składającą się z homogenicznej mieszanki przynajmniej jednego weterynaryjnego produktu leczniczego lub produktu pośredniego oraz materiałów paszowych lub mieszanek paszowych (46). Chociaż istnieje duża różnorodność przepisów dotyczących pasz i systemów produkcji zwierzęcej w poszczególnych krajach, większość leków weterynaryjnych dodawanych do pasz to antybiotyki i sulfonamidy (16).

Pasza lecznicza jest zwykle wytwarzana przez komercyjne wytwórnie pasz, które są kontrolowane przez właściwe organy, jednak niektóre kraje zezwalają na produkcję paszy leczniczej w gospodarstwach. Mali producenci pasz, na ogół w gospodarstwach, mogą produkować paszę tylko dla jednego gatunku zwierząt i używać niewielkiej liczby składników na etapie produkcji paszy leczniczej. Z kolei firmy paszowe mogą wykorzystywać różnorodne leki weterynaryjne do produkcji paszy leczniczej dla wielu gatunków i grup technologicznych zwierząt gospodarskich. Producenci pasz dysponują wieloma urządzeniami, które stosowane są zamiennie do produkcji przemysłowych mieszanek paszowych oraz pasz leczniczych. Zgodnie z dobrą praktyką produkcyjną (Good Manufacturing Practice – GMP), należy ustanowić i stosować odpowiednie procedury dla całego wyposażenia używanego do produkcji i dystrybucji paszy leczniczej, aby uniknąć zanieczyszczenia pasz leczniczych i niedocelowych innymi stosowanymi w zakładzie paszowym produktami leczniczymi weterynaryjnymi (16).

Specyfika zatwierdzania leków weterynaryjnych i ich stosowania w paszach dla zwierząt różni się znacznie w zależności od kraju i regionu świata. Na przykład we wszystkich krajach członkowskich Unii Europejskiej stosowanie leków weterynaryjnych oraz pasz leczniczych wymaga wydanego zlecenia na stosowanie i produkcję paszy leczniczej od lekarza weterynarii. Paszę leczniczą zawierającą przeciwdrobnoustrojowe weterynaryjne produkty lecznicze stosuje się zgodnie z art. 107 Rozporządzenia (UE) 2019/4, z wyjątkiem jego ust. 3 i nie stosuje się jej w profilaktyce (46). W Stanach Zjednoczonych Ameryki, pozarejestrowane stosowanie leków weterynaryjnych w paszach jest zabronione przez ustawę (11). Natomiast w Kanadzie stosowanie niezareje-

strowanych produktów leczniczych weterynaryjnych w paszach jest dozwolone, o ile jest to robione na zlecenie lekarza weterynarii (20). Niestety, w wielu krajach na świecie stosowanie leków weterynaryjnych nadal może odbywać się pod niewielkim lub bez żadnego nadzoru weterynaryjnego. Stosowanie leków weterynaryjnych powinno odbywać się zgodnie z określonymi instrukcjami. Substancje przeciwbakteryjne dopuszczone do stosowania w paszach dla zwierząt muszą być odpowiedniej jakości, o udowodnionej skuteczności i bezpieczeństwie dla zwierząt spożywających paszę z ich zawartością oraz wykazywać bezpieczeństwo dla pracowników wytwórni pasz i środowiska. Zastosowanie produktów leczniczych weterynaryjnych (PLW) w paszy leczniczej jest najbardziej skomplikowanym sposobem ich podawania. Przy stosowaniu paszy leczniczej należy wziąć pod uwagę następujące aspekty: sposób mieszania i zapewnienie jednorodności paszy, dawkę zastosowanej substancji czynnej oraz pozostałości weterynaryjnych produktów leczniczych w paszy. W przypadku wytwarzania pasz leczniczych firmy paszowe powinny regularnie pobierać próbki, aby wykazać, że leki weterynaryjne stosowane do produkcji paszy leczniczej są w niej obecne w odpowiednim stężeniu, pasza jest jednorodnie wymieszana z PLW, a także prowadzić kontrolę czystości linii technologicznej po zakończonej produkcji paszy leczniczej, aby nie dopuścić do przeniesienia substancji leczniczych do innych mieszanek paszowych (16).

Zanieczyszczenie krzyżowe pasz substancjami przeciwbakteryjnymi

Podmioty działające na rynku pasz mogą wytwarzać szeroką gamę pasz dla różnych zwierząt docelowych w jednym zakładzie, które zawierają różne rodzaje składników, takich jak weterynaryjne produkty lecznicze i dodatki paszowe. Produkcja różnych rodzajów pasz na tej samej linii technologicznej może prowadzić do obecności śladowych ilości substancji czynnej na tej linii, które znajdują się w pierwszych partiach produkcyjnych następnej paszy. To przenoszenie śladowych ilości składnika aktywnego z jednej partii produkcyjnej do drugiej nazywa się „zanieczyszczeniem krzyżowym” (46). Przemysłowe mieszanki paszowe i pasze lecznicze wytwarzane są często na tych samych liniach technologicznych, przez co pozostałości paszy leczniczej mogą pozostawać w mieszalnikach, przenośnikach, zbiornikach czy windach transportujących. Zanieczyszczenie krzyżowe może mieć miejsce podczas transportu i wyładunku paszy ze zbiornika samochodu dostawczego podczas kolejnego załadunku paszy do tego samego zbiornika transportowego (17). Istotny wpływ na poziom zanieczyszczenia krzyżowego ma konstrukcja sprzętu dozującego, rozdrabniającego i mieszającego. Zanieczyszczenie krzyżowe jest również możliwe na poziomie gospodarstwa, gdzie może nastąpić przeniesienie leków weterynaryjnych, gdy pasze nielecznicze są przechowywane

w pobliżu paszy leczniczej lub bezpośrednio po niej. Zanieczyszczenie krzyżowe może również wystąpić podczas dystrybucji paszy w gospodarstwie (17).

Na ryzyko przeniesienia środków przeciwbakteryjnych z paszy leczniczej do pasz bytowych mają wpływ właściwości fizyczne weterynaryjnych produktów leczniczych, które prowadzą do zanieczyszczenia krzyżowego paszy oraz właściwości farmakokinetyczne leku.

W kilku dostępnych badaniach naukowych autorzy wykazali, że produkcja pasz leczniczych bez zanieczyszczeń krzyżowych jest praktycznie niemożliwa (14, 28, 35). Różne parametry procesu i właściwości fizykochemiczne produktu mają wpływ na powstawanie zanieczyszczeń. Wysoki potencjał pylenia proszkowych premiksów leczniczych stosowanych do produkcji pasz leczniczych, niska wilgotność produktu, przyczepność na skutek ładunku elektrostatycznego, przyczyniają się do zanieczyszczenia krzyżowego. Nagromadzenie materiału i niepełne lub niewłaściwe czyszczenie linii produkcyjnej mogą być kolejnymi przyczynami powstawania zanieczyszczeń krzyżowych. Na przykład sulfonamidy stanowią szczególnie problematyczną klasę leków przeciwbakteryjnych pod względem efektu przenoszenia z jednej partii paszy na następną. Wynika to z ich wysokiego stężenia w paszy leczniczej, co zwiększa ryzyko zanieczyszczenia innej paszy wytworzonej na tej samej linii produkcyjnej, a ponadto sulfonamidy to związki wyjątkowo elektrostatyczne i pyliste, co praktycznie uniemożliwia ich stosowanie bez ryzyka przeniesienia (14, 28, 35). McEvoy zaobserwował również możliwość zanieczyszczenia krzyżowego pasz tetracyklinami (35). W badaniu pasz leczniczych i przemysłowych mieszanek paszowych przeprowadzonych w Irlandii Północnej Lynas i wsp. (31) poinformowali, że chlortetracyklina (CTC) była najczęściej stwierdzanym antybiotykiem, wykrywanym w 15,2% badanych rzekomo wolnych od CTC paszach. W poddanych analizie próbkach pasz stężenia CTC wynosiły do 3 mg/kg. Przeniosło-Siwczyńska i wsp. (42) również potwierdzili obecność antybiotyków tetracyklinowych w próbkach pasz „nieleczniczych”. Spośród 186 przebadanych próbek pasz w 42 autorzy potwierdzili obecność tetracyklin – doksycykliny i chlortetracykliny oraz oksytetracykliny. Stężenia antybiotyków wahały się od 0,3 do 49 mg/kg. Ponadto w dwóch próbkach paszy autorzy stwierdzili obecność dwóch różnych antybiotyków: doksycykliny oraz tylozyny w stężeniach odpowiednio 7,9 i 10,9 mg/kg oraz 3,7 i 0,4 mg/kg, co wskazuje na nielegalne stosowanie antybiotyków lub na zanieczyszczenie krzyżowe.

Podnoszenie świadomości pracowników wytwórni pasz oraz hodowców zwierząt rzeźnych w zakresie prawidłowego obchodzenia się za sprzętem oraz samą paszą jest niezbędne, aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego na poziomie wytwórni pasz oraz gospodarstwa, które może niekorzystnie wpłynąć na zdrowie

ludzi i zwierząt oraz obrót produktami pochodzenia zwierzęcego.

Pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w żywności jako efekt przeniesienia z pasz

Od pewnego czasu coraz większą uwagę zwraca się na ryzyko dla konsumentów związane z zanieczyszczeniami chemicznymi lub pozostałościami w paszach dla zwierząt (30). Jeszcze do niedawna obawy dotyczące pozostałości dotyczyły reakcji alergicznych i możliwego niekorzystnego wpływu na florę ludzkiego przewodu pokarmowego. Generalnie alergia na substancje w żywności jest rzadka, chociaż potwierdzono przypadki reakcji alergicznych u uczulonych osób wywołanych pozostałościami penicyliny w mleku (3), nadwrażliwością, przypadkami przewlekłej pokrzywki lub śmiertelną dyskrazją krwi wywołaną przez pozostałości chloramfenikolu w pożywieniu (3). Niekorzystny wpływ pozostałości antybiotyków na florę bakteryjną ludzkiego przewodu pokarmowego jest związany z selekcją pod kątem oporności bakteryjnej lub przeniesieniem genów oporności. Istnieją naukowe informacje na temat tego, że najbardziej odporne enterobakterie stwierdzone w przewodzie pokarmowym u osób, u których nie były stosowane antybiotyki najprawdopodobniej pochodzą z bakteryjnego zanieczyszczenia surowej żywności (3).

W wielu krajach ustanowiono programy monitorowania w celu określenia poziomów antybiotyków w żywności, a także wyznaczenia maksymalnych poziomów pozostałości (MRL) (47). W Unii Europejskiej pozostałości definiowane są jako „substancje farmakologicznie czynne i ich metabolity, które pozostają w środkach spożywczych uzyskanych od zwierząt, którym podawano przedmiotowe weterynaryjne produkty lecznicze”. Większość leków po podaniu do organizmu zwierzęcia jest metabolizowana i wydalana. Ogólnie większość produktu macierzystego i jego metabolitów wydalana jest z moczem, a w mniejszej ilości z kałem, jednak po wydaleniu część leków może pozostawać w mleku, jajach i mięsie przez pewien czas jako pozostałości (49).

U zwierząt antybiotyki podaje się zwykle w paszy, wodzie lub pozajelitowo. Wszystkie drogi podania mogą skutkować pojawieniem się pozostałości tych leków w tkankach i narządach zwierząt lub przedostaniem się do ich produktów, tj. mleka, jaj i miodu. Uważa się, że obecność pozostałości leków weterynaryjnych jest wynikiem nieprzestrzegania okresów karencji niezbędnych do usunięcia leku z organizmu zwierzęcia, niewłaściwego podania leku, dawkowania niezgodnego ze wskazaniami lub ich stosowania u gatunków zwierząt, dla których nie są przeznaczone. Innym powodem obecności pozostałości antybiotyków jest ich samowolne podanie przez hodowców bez nadzoru lekarza weterynarii, a także przypadkowe zanieczyszczenie paszy, np. po wyprodukowaniu paszy leczniczej. Innym powodem obecności pozo-

stałości substancji przeciwbakteryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego może być nierównomierne wymieszanie premiksu leczniczego ze składnikami paszy, co wpływa na pobieranie przez zwierzęta nadmiernych dawek leków, omyłkowe wprowadzenie innej substancji leczniczej i celowe lub przypadkowe przekroczenie dawki leku.

Jedną z najczęściej stosowanych grup substancji przeciwbakteryjnych w produkcji paszy leczniczej są tetracykliny. Ich nadużywanie w hodowli zwierząt może powodować reakcje alergiczne i toksyczne zarówno u zwierząt, jak i ludzi oraz nabycie odporności na te antybiotyki przez drobnoustroje chorobotwórcze (38). W badaniach przeprowadzonych w Niemczech (36) w latach 2000-2002 pozostałości antybiotyków tetracyklinowych stwierdzono w 58% przebadanych próbek, były to: chlortetracyklina, oksytetracyklina i tetracyklina. Piątkowska i wsp. (39) opisują przypadek nielegalnego stosowania antybiotyków, tj. lazalocydu, doksycykliny i enrofloksacyny u kur niosek. Wszystkie te substancje lecznicze zostały zakazane do stosowania u tych zwierząt. Przyczyną obecności doksycykliny i enrofloksacyny w jajach było ich zastosowanie w systemie pojenia drobiu. Doksycyklina charakteryzuje się dużą zdolnością wiązania się z białkami, w tym z białkiem jaja, co zawsze wiąże się z ogromnymi stratami ekonomicznymi. Wszystkie jaja, w których stwierdzono obecność antybiotyku, należy przekazać do utylizacji. Ponadto antybiotyki tetracyklinowe, a także inne substancje z grupami aminowymi (inne leki, naturalne składniki żywności, środki ochrony roślin) mogą potencjalnie oddziaływać z azotanami (III) i (V). To połączenie może prowadzić do powstania związków N-nitrowych, wykazujących silne działanie rakotwórcze. Liczne badania wskazują, że większość analizowanych N-nitrozoamin może powodować raka wątroby, przelyku i jamy nosowej. Działanie rakotwórcze występuje po wcześniejszej aktywacji w toku procesów metabolicznych, w wyniku której powstaje aktywny metabolit inicjujący proces nowotworowy (18). Segato i wsp. (49) przeprowadzili badania mające na celu uzyskanie informacji o przenoszeniu doksycykliny do tkanek i narządów kurcząt w przypadku podawania paszy skażonej tym antybiotykiem w ilości 4 mg kg⁻¹. W przyjętych warunkach doświadczalnych doksycyklina osiągnęła w każdej tkance (mięśniu, wątrobie, nerce) średnie stężenia niższe niż wyznaczony MRL, ale doksycyklina była obecna. Badanie to wykazało rolę, jaką odgrywa pasza, gdyż w przypadku braku okresu karencji zanieczyszczenie pasz lekami weterynaryjnymi nawet w niskich stężeniach może prowadzić do ich obecności w tkankach i narządach i stanowić zagrożenie dla konsumentów spożywających żywność zawierającą niskie stężenia leków (49).

Oprócz antybiotyków tetracyklinowych w tkankach zwierząt znaleziono inne antybiotyki, takie jak chloramfenikol i fluorochinolony. Dotyczyło to w szcze-

gólności zwierząt akwakultury, głównie krewetek i łososi hodowanych w Azji Południowej i Ameryce Południowej (36). Obecność fluorochinolonów wynika z ich stosowanie na szeroką skalę w akwakulturze, tj. w hodowlach krewetek lub łososi, ale także wzrost ich stosowania w hodowli drobiu, trzody chlewnej, bydła i zwierząt towarzyszących (psy, koty). Niewątpliwie prowadzi to do wzrostu oporności na fluorochinolony, co potwierdzają m.in. dane epidemiologiczne z USA (36). Chociaż fluorochinolony nie są dopuszczone w krajach UE do stosowania w paszach dla zwierząt gospodarskich, zdarzają się przypadki obecności niskich stężeń tych chemioterapeutyków w paszach.

W kilku publikacjach przedstawiono również wyniki badań nad zanieczyszczeniem jaj i mleka kokcydiostatykami. Na przykład van Rhijn i wsp. (44) badali wydzielanie nikarbazyny do mleka po podaniu pasz zawierających nikarbazynę w stężeniach 1, 5 i 12,5 mg kg⁻¹. Autorzy nie wykryli nikarbazyny, co wskazuje, że przechodzenie nikarbazyny z paszy do mleka nie następuje po podaniu tego związku w paszy. Podobnie Bagg i wsp. (2) nie stwierdzili obecności monenzyny u krów rasy holsztyńskiej w okresie laktacji otrzymujących do 4865 mg monenzyny dziennie. Badania nad przechodzeniem takich kokcydiostatyków, jak toltrazuril i halofuginon do jaj zostały opisane przez Muldera i wsp. (37), wykazując, że leki te są obecne w żółtku jaj. Przeprowadzone badania na kurach nioskach, którym podawano paszę zawierającą 3 mg kg⁻¹ halofuginonu, wykazywały transfer tego związku do jaj w stężeniu wynoszącym 450 µg kg⁻¹, z szybkim zanikaniem halofuginonu po zakończeniu stosowania paszy.

Nadmierne i nieuzasadnione stosowanie substancji przeciwbakteryjnych (antybiotyków, sulfonamidów i chinolonów) oraz kokcydiostatyków w leczeniu zwierząt gospodarskich może prowadzić do selekcji mikroorganizmów opornych na działanie substancji przeciwbakteryjnych oraz do stwierdzania ich pozostałości w żywności pochodzenia zwierzęcego. Obecność pozostałości antybiotyków w żywności i produktach pochodzenia zwierzęcego jest uważana za problem dla zdrowia ludzkiego, ponieważ niektóre z tych pozostałości mogą doprowadzać do wystąpienia reakcji alergicznych, zaburzeń równowagi mikroflory jelitowej i rozwoju oporności na substancje przeciwbakteryjne.

Aspekty środowiskowe stosowania substancji przeciwbakteryjnych w produkcji zwierzęcej

Substancje przeciwbakteryjne nie są w pełni metabolizowane w organizmie zwierząt. Po podaniu antybiotyków od 30% do 90% podanej dawki początkowej jest wydalanych w postaci niezmodyfikowanej lub w postaci aktywnych i/lub nieaktywnych metabolitów z moczem lub kałem (6, 19). Na przykład N4-acetylosulfonamidy, które są metabolitami sulfonamidów, są mniej aktywne w porównaniu z lekami macierzystymi. Z drugiej strony ciprofloksacyna jest

metabolitem enrofloksacyny, która wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową (7).

Odchody zwierząt w postaci nawozów naturalnych są wykorzystywane jako nawóz na pola uprawne lub użytki zielone ze względu na wysoki poziom fosforu, azotu i materii organicznej, które mogą poprawić właściwości fizyczne i chemiczne gleby oraz zapewnić roślinom niezbędne składniki odżywcze (43). Stosowanie odchodów w postaci nawozów jest powszechną praktyką w wielu krajach, w tym w krajach Unii Europejskiej, jednak należy wziąć pod uwagę zagrożenie płynące ze stosowania nawozów naturalnych, a szczególnie tych pochodzących z ferm wielkotowarowych ze względu na możliwą obecność antybiotyków, które w wyniku nawożenia pól mogą przedostawać się do głębszych warstw gleby, a także do wód powierzchniowych i podziemnych. Ich obecność może stanowić zagrożenie dla ludzi i środowiska naturalnego (54). Problem zanieczyszczenia środowiska substancjami przeciwbakteryjnymi obecnymi w nawozach naturalnych (gnojowica, gnojówka, obornik) staje się problemem coraz bardziej rozpoznawalnym na świecie. W ostatnich latach naukowcy opublikowali kilka prac wykazujących, że antybiotyki w odchodach zwierząt poddanych ubojowi są obecne w wysokich stężeniach. W Chinach analizowano nawozy naturalne pochodzące od kur. Naukowcy oznaczyli wysokie stężenia enrofloksacyny i norfloksacyny, odpowiednio, 1420 mg/kg i 225 mg/kg. W 2007 r. Martinez-Caraballo i wsp. (33) poddali analizie odchody pochodzące od trzody chlewnej w Austrii, w których stwierdzili obecność antybiotyków z grupy tetracyklin w ilości kilkudziesięciu miligramów na kilogram (tetracyklina – 23 mg/kg, oksytetracyklina – 29 mg/kg i chlorotetracyklina – 46 mg/kg). Brak informacji na temat zawartości antybiotyków, które mogą być obecne w nawozach naturalnych rozsiewanych na pola uprawne i użytki zielone, uniemożliwia przeprowadzenie odpowiedniej oceny ryzyka dla środowiska naturalnego po ich wprowadzeniu do gleb (43). Według Berendsena i wsp. (6) analiza antybiotyków w odchodach zwierząt rzeźnych może pomóc w zdobyciu wiedzy na temat rozprzestrzeniania się antybiotyków w środowisku i ich skutków ekotoksykologicznych. Badanie może dostarczyć odpowiedzi na temat pojawiania się oporności bakterii w jelitach zwierząt, a tym samym stanowić cenne źródło informacji na temat zależności między pozostałościami antybiotyków, a opornością bakterii.

Naukowcy od dawna są świadomi potencjalnych problemów związanych z obecnością antybiotyków w glebie. Najwyższe stężenia substancji przeciwbakteryjnych oznaczonych w glebach uprawnych były znajdowane głównie na terenach rolniczych w pobliżu ferm wielkotowarowych. W badaniach przeprowadzonych przez Hamschera i wsp. (22) w Niemczech w latach 2000-2001 stwierdzili obecność tetracyklin w glebie w stężeniu do 300 µg/kg gleby, wykazując, że ta klasa antybiotyków stosowana na całym świecie jest trwałą

i może się kumulować w glebie po nawożeniu nawozami naturalnymi pochodzącymi z intensywnej hodowli zwierząt. Przeprowadzone badania nie wykazały żadnych dowodów na to, że związki te przechodzą do głębszych warstw gleby lub wód gruntowych ze względu na silną sorpcję tej grupy leków w glebie (22). We Włoszech i Stanach Zjednoczonych Ameryki badania terenowe potwierdziły obecność tetracyklin w glebie po zastosowaniu gnojowicy (29). W badaniach przeprowadzonych przez badaczy z Turcji w próbkach gleby nawożonej gnojowicą z ferm trzody chlewnej stwierdzono obecność oksytetracykliny w maksymalnym stężeniu 500 µg/kg gleby (26). Z drugiej strony, w badaniach Huang i wsp. (23) na obszarach rolniczych Chin potwierdzono obecność fluorochinolonów i tetracyklin w glebach nawożonych gnojowicą pochodzącą z ferm trzody chlewnej. W badanych próbkach gleby stwierdzono obecność: tetracykliny, oksytetracykliny, chlortetracykliny, ciprofloksacyny, enrofloksacyny i ofloksacyny, natomiast najwyższe stężenia oznaczono dla enrofloksacyny – 637,3 µg/kg i chlortetracykliny – 2668,9 µg/kg.

Obecność substancji przeciwbakteryjnych w glebie jest przyczyną rozwoju antybiotykooporności u drobnoustrojów naturalnie bytujących w glebie, co może być przyczyną zmiany wrażliwości na antybiotyki całych populacji drobnoustrojów (2, 8, 22, 30). Nawet bardzo niskie stężenia substancji przeciwbakteryjnych w glebie stwarzają warunki do zmian genetycznych w genomach bakterii i przenoszenia genów oporności na antybiotyki oraz związanych z nimi ruchomych elementów genetycznych, takich jak plazmidy, transpozony i wyspy genomowe, pomiędzy populacjami drobnoustrojów (19, 27, 52). Bakterie autochtoniczne w glebie mogą również stanowić rezerwuar genów oporności w środowisku, które mogą być przenoszone na bakterie kolonizujące organizm ludzki (55). Ponadto mikroorganizmy glebowe wykonują wiele ważnych procesów i uczestniczą w utrzymaniu zdrowia i jakości gleby. Wiele mikroorganizmów działa jako czynniki kontroli biologicznej, hamując wzrost patogenów. Wysoka aktywność przeciwdrobnoustrojowa antybiotyków w glebie może wpływać na zahamowanie rozwoju mikroorganizmów glebowych, a tym samym na zmianę w populacji zbiorowisk drobnoustrojów glebowych, co finalnie może skutkować zmianą funkcji ekologicznej gleby. Obecność substancji przeciwbakteryjnych w glebie może również wpływać na stopień nityfikacji i/lub denityfikacji zachodzący w glebie dzięki odpowiednim bakteriom w niej bytującym. Na przykład sulfadimetoksyna wpływa hamująco na zachodzący proces nityfikacji gleby. Badanie przeprowadzone przez deVries i wsp. (13) wykazało, że niskie stężenie sulfametaksazolu, sulfadiazyny, narazyny lub gentamycyny z kolei wpływają na spowolnienie procesu denityfikacji. Substancje przeciwbakteryjne mogą również zmieniać tempo przemiany żelaza w glebie. Na przykład sulfadiazyna i monenzyna blo-

kują redukcję Fe (III) w glebie (53). Substancje przeciwbakteryjne mogą również wpływać na hamowanie aktywności enzymów w glebie. Może to być związane z zahamowaniem wzrostu lub śmierci wrażliwych mikroorganizmów glebowych (32).

Podsumowanie

Zanieczyszczenie środowiska substancjami przeciwbakteryjnymi pochodzącymi od zwierząt przeznaczonych do produkcji żywności jest problemem, któremu należy poświęcić więcej uwagi, ponieważ stosowanie antybiotyków u tych zwierząt jest jednym ze sposobów zanieczyszczenia środowiska, a odchody zwierząt w postaci stosowanych pod uprawy nawozów naturalnych powinny być kontrolowane pod względem stężenia substancji przeciwbakteryjnych lub gromadzone i przechowywane przez odpowiednio długi czas, aby substancje przeciwbakteryjne w nich obecne mogły ulec degradacji pod wpływem czynników i procesów zachodzących w trakcie ich przechowywania. Działania takie powinny być podejmowane ze względu na ochroną środowiska naturalnego. Istotne jest całościowe podejście do stosowania substancji przeciwbakteryjnych zarówno w terapii ludzi, jak zwierząt, ograniczenie ich stosowania i poszukiwanie alternatywnych rozwiązań mających za zadanie ich zastąpienie, ograniczenie możliwości rozwoju mikroorganizmów lekoopornych oraz ochronę wód, gleb i roślin służących do produkcji żywności.

Piśmiennictwo

1. Atashgahi S., Sánchez-Andrea I., Heipieper H. J., van der Meer J. R., Stams A. J. M., Smidt H.: Prospects for harnessing biocide resistance for bioremediation and detoxification. *Science* 2018, 360, 743-746, doi: 10.1126/science.aar3778.
2. Bagg R., Vessie G. H., Dick C. P., Duffield T., Wilson J. B., Aramini J. J.: Milk residues and performance of lactating dairy cows administered high doses of monensin. *Canadian J. Vet. Res. – Revue Canad. Rech. Vet.* 2005, 69, 180-185.
3. Barton M. D.: Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Res. Rev.* 2000, 13, 279-299.
4. Bedford M. R.: Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: Implications and strategies to minimise subsequent problems. *World's Poultry Sci. J.* 2000, 56, 347-365.
5. Berendsen B. J. A., Lahr J., Nibbeling C., Jansen L. J. M., Bongers I. E. A., Wipfler E. L., van de Schans M. G. M.: The persistence of a broad of antibiotics during calve, pig and broiler manure storage. *Chemosphere* 2018, 2014, 267-276.
6. Berendsen B. J. A., Weigh R. S., Memelink J., Zuidema T., Stolker L. A. M.: The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta* 2015, 132, 258-268.
7. Binh C. T. T., Heuer H., Gomes N. C. M., Kotzerke A., Fulle M., Wilke B. M.: Reichel et al Short-term effects of amoxicillin on bacterial communities in manured soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007, 62, 290-302, doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00393.x.
8. Butaye P., Devriese L. A., Haesebrouck F.: Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on Gram-positive bacteria. *Clinical Microbiol. Rev.* 2003, 16, 175-188.
9. Chattopadhyay M. K.: Use of antibiotics as feed additives: a burning question. *Front. Microbiol.* 2014, 5, doi: 10.3389/fmicb.2014.00334.
10. Corpet D. E.: Microbiological hazard for humans of antimicrobial growth promoter use in animal production. *Rev. Med. Vet.* 1996, 147, 851-862.
11. Davis J. L., Smith G. W., Baynes R. E., Tell L. A., Webb A. I., Riviere J. E.: Update on drugs prohibited from extralabel use in food animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2009, 235, 528-534.
12. DeVries S. L., Loving M., Li X., Zhang P.: The effect of ultra low dose antibiotics exposure on soil nitrate and N₂O flux. *Sci. Rep.* 2015, 5, 16818, doi: 10.1038/srep16818.

13. Dibner J. J., Richards J. D.: Antibiotic growth promoters in agriculture: historic and mode of action. *Poultry Science* 2005, 84, 634-643.
14. Dorne J. L., Fernandez-Cruz M. L., Bertelsen U., Renshaw D. W., Peltonen K., Anadon A., Feil A., Sanders P., Wester P., Fink-Gremmels J.: Risk assessment of coccidiostats during feed cross-contamination: animal and human health aspects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2013, 270 (3), 196-208.
15. Ewing W. N., Cole D. J. A.: The living gut: an introduction to microorganisms in nutrition. Ireland, Dungannon Context 1994.
16. FAO and IFIF. Good practices for the feed industry – Implementing the Codex Alimentarius Code of Practice on Good Animal Feeding. FAO Animal Production and Health Manual No. 9. Rome 2010.
17. Filippitzi M. E., Sarrazin S., Imberechts H., Smet A., Dewulf J.: Risk of cross-contamination due to the use of antimicrobial medicated feed throughout the trail of feed from the feed mill to the farm. *Food Addit. Contam. Part A.* 2016, 33, 644-655.
18. Gertig H.: Interakcje leków ze składnikami pożywienia, [w:] Gertig H., Przysławski J. (red.): *Bromatologia. Zarys nauki o żywności i żywieniu*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007, 271-272.
19. Grenni P., Ancona V., Barra Caracciolo A.: Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: a review. *Microchem. J.* 2018, 136, 25-39, doi: 10.1016/j.microc.2017.02.006.
20. Grignon-Boutet R., Ireland M. J., Adewoye L., Mehrotra M., Russell S., Alexander I.: Health Canada's policy on extra-label drug use in food-producing animals in Canada. *Canad. Vet. J.* 2009, 49, 689-693.
21. Gustafson R. H., Bowen R. E.: Antibiotic use in animal agriculture. *J. Appl. Microbiol.* 1997, 83, 531-541.
22. Hamscher G., Szczesny S., Hoper H., Nau H.: Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2002, 74, 1509-1518.
23. Huang X., Liu Ch., Li K., Liu F., Liao D., Liu L., Zhu G., Liao J.: Occurrence and distribution of veterinary antibiotics and tetracycline resistance genes in farmland soils around swine feedlots in Fujian Province, China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2013, 20, 9066-9074.
24. Jukes T. H., Stokstad L. R., Taylor R. R., Combs T. J., Edwards H. M., Meadows G. B.: Growth promoting effect of aureomycin on pigs. *Arch. Biochem.* 1950, 26, 324-330.
25. Jukes T. H., Williams W. L.: Nutritional effects of antibiotics. *Pharmacol. Rev.* 1953, 5, 381-420.
26. Karci A., Balcioglu A. A.: Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *Sci. Tot. Envir.* 2009, 407, 4652-4664.
27. Keen P. L., Patrick D. M.: Tracking change: a look at the ecological footprint of antibiotics and antimicrobial resistance. *Antibiotics* 2013, 21, 191-205, doi: 10.3390/antibiotics2020191.
28. Kennedy D. G., Cannavan A., McCracken R. J.: Regulatory problems caused by contamination, a frequently overlooked cause of veterinary drug residues. *J. Chromatogr. A* 2000, 882 (1-2), 37-52.
29. Kumar K., Gupta S. C., Baidoo S. K., Chander Y., Rosen C. J.: Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *J. Environ. Qual.* 2005, 34, 2082-2085.
30. Leeman W. R., Van Den Berg K. J., Houben G. F.: Transfer of chemicals from feed to animal products: The use of transfer factors in risk assessment. *Food Addit. Contam.* 2007, 24, 1-13.
31. Lynas L., Currie D., McCaughey W. J., McEvoy J. D. G., Kennedy D. G.: Contamination of animals feedingstuffs with undeclared antimicrobial additives. *Food Addit. Contam.* 1998, 15, 162-170.
32. Ma J., Lin H., Sun W., Wang Q., Yu Q., Zhao Y.: Soil microbial systems respond differentially to tetracycline, sulfamonomethoxine, and ciprofloxacin entering soil under pot experimental conditions alone and in combination. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014, 21, 7436-7448, doi: 10.1007/s11356-014-2685-2.
33. Martinez-Carballo E., Gonzalez-Barreiro C., Scharf S., Gans O.: Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environ. Pollut.* 2007, 162, 56-62.
34. Marx M.-C., Kandler E., Wood M., Wermbter N., Jarvis S. C.: Exploring the enzymatic landscape: distribution and kinetics of hydrolytic enzymes in soil particle-size fractions. *Soil Biol. Biochem.* 2005, 37, 35-48, doi: 10.1016/j.soilbio.2004.05.024.
35. McEvoy J. D. G.: Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. *Anal. Chim. Acta* 2002, 473, 3-26.
36. Mersch-Sundermann V., Stein J.: Szkodliwe działanie zanieczyszczeń żywności i pozostałości występujących w produktach spożywczych, [w:] Bronkowska M. (red.): *Wybrane zagadnienia z zakresu toksykologii żywności oraz wpływu pokarmu na farmakoterapię*. MedPharm Polska, Wrocław 2016, 121-142.
37. Mulder P. P. J., Balzer-Rutgers P. B., Brinke P. E. M., Bolck Y. J. C., Berendsen B. J. A., Gercek H., Schat B., van Rhijnmulder J. A.: Deposition and depletion of the coccidiostats toltrazuril and halofuginone in eggs. *Anal. Chim. Acta.* 2005, 529, 331-337.
38. Patyra E., Kwiatak K.: Stosowanie i kontrola laboratoryjna tetracyklin w paszach leczniczych. *Pasze przemysłowe* 2015, 3-4, 66-73.
39. Piątkowska M., Ghylik-Sikorska M., Olszewska M.: Stosowanie nielegalnych antybiotyków w wodzie na fermie niosek jaj konsumpcyjnych – opis przypadku. *Pasze przemysłowe* 2015, 2, 28-33.
40. *Przeniosło-Siwczyńska M.*: Doskonalenie metod wykrywania substancji przeciwbakteryjnych w paszach. Rozprawa doktorska, Puławy 2018.
41. *Przeniosło-Siwczyńska M., Kwiatak K.*: Dlaczego zakazano stosowania w żywieniu zwierząt antybiotykowych stymulatorów wzrostu? *Życie Wet.* 2013, 88, 104-108.
42. *Przeniosło-Siwczyńska M., Patyra E., Grelik A., Chylek-Purchala M., Kozak B., Kwiatak K.*: Contamination of animal feed with undeclared tetracyclines – confirmatory analysis by liquid chromatography–mass spectrometry after microbiological plate test. *Molecules* 2020, 25, doi: 10.3390/molecules25092162.
43. Qian M., Wu H., Wang J., Zhang H., Zhang Z., Zhang Y., Lin H., Ma J.: Occurrence of trace elements and antibiotics in manure-based fertilizers from the Zhejiang Province of China. *Sci. Total Environ.* 2016, 559, 174-181.
44. Rhijn H. J. van, Yedema E. S. E., Beek W. M. J., Kan C. A., Sebec L. B. J.: Investigation into the excretion of nicarbazin in cows milk after administration of feeds containing low-levels of nicarbazin, [w:] *Proceedings of the EuroResidue IV Conference, Veldhoven, The Netherlands 2000*, May 8-10.
45. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/625 z dnia 15 marca 2017 r. w sprawie kontroli urzędowych i innych czynności urzędowych przeprowadzanych w celu zapewnienia stosowania prawa żywnościowego i paszowego oraz zasad dotyczących zdrowia i dobrostanu zwierząt, zdrowia roślin i środków ochrony roślin, zmieniające rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001, (WE) nr 396/2005, (WE) nr 1069/2009, (WE) nr 1107/2009, (UE) nr 1151/2012, (UE) nr 652/2014, (UE) 2016/429 i (UE) 2016/2031, rozporządzenia Rady (WE) nr 1/2005 i (WE) nr 1099/2009 oraz dyrektywy Rady 98/58/WE, 1999/74/WE, 2007/43/WE, 2008/119/WE i 2008/120/WE, oraz uchylające rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 854/2004 i (WE) nr 882/2004, dyrektywy Rady 89/608/EWG, 89/662/EWG, 90/425/EWG, 91/496/EWG, 96/23/WE, 96/93/WE i 97/78/WE oraz decyzję Rady 92/438/EWG (rozporządzenie w sprawie kontroli urzędowych).
46. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/4 z dnia 11 grudnia 2018 r. w sprawie wytwarzania, wprowadzania na rynek i stosowania paszy leczniczej, zmieniające Rozporządzenie (WE) nr 183/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady oraz uchylające Dyrektywę Rady 90/167/EWG.
47. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 470/2009 z dnia 6 maja 2009 r. ustanawiającego wspólnotowe procedury określania maksymalnych limitów pozostałości substancji farmakologicznie czynnych w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego oraz uchylające Rozporządzenie Rady (EWG) nr 2377/90 oraz zmieniające Dyrektywę 2001/82/WE Parlamentu Europejskiego i Rady i Rozporządzenie (WE) nr 726/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady.
48. Rozporządzenie (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 sierpnia 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt.
49. Segato G., Benetti C., Angeletti R., Montesissa C., Biancotto G.: Doxycycline and sulfadimethoxine transfer from cross-contaminated feed to chicken tissues. *Food Addit. Contam. Part A.* 2011, 28, 860-868.
50. Stokstad E. L. R., Jukes T. H.: Further observation on the "Animal Protein Factor". *Exp. Biol. Medicine* 1950, 73, 523-528.
51. *Swann Report*. Use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. HC Deb 20 November 1969, 791, 1525-1531.
52. Tang X., Lou C., Wang S., Lu Y., Liu M., Hashmi M. Z.: Effects of long-term manure applications on the occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in paddy soils: evidence from four field experiments in south of China. *Soil Biol. Biochem.* 2015, 90, 179-187, doi: 10.1016/j.soilbio.2015.07.027.
53. Toth J. D., Feng Y., Dou Z.: Veterinary antibiotics at environmentally relevant concentrations inhibit soil iron reduction and nitrification. *Soil Biol. Biochem.* 2011, 43, 2470-2472, doi: 10.1016/j.soilbio.2011.09.004.
54. Zhao L., Dong Y. H., Wang H.: Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces in China. *Sci. Total Environ.* 2010, 408, 1069-1075.
55. Zhou Y., Niu L., Zhu S., Lu H., Liu W.: Occurrence, abundance, and distribution of sulfonamide and tetracycline resistance genes in agricultural soils across China. *Sci. Total Environ.* 2017, 599-600, 1977-1983, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.05.152.

Autor korespondencyjny: dr hab. Ewelina Patyra, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: ewelina.patyra@piwet.pulawy.pl