

2014-03-10

Dnr:2014/240

Kloramfenikol i svensk halm – en kartläggning 2013

Erik Nordkvist, KMF/SFL

SAMMANFATTNING

Halm från de betydelsefulla jordbrukstrakterna har provtagits genom Jordbruksverkets distriktsveterinärorganisation i samarbete med Livsmedelsverket och SVA. Sammanlagt 215 prover har analyserats med ELISA med avseende på kloramfenikol, KAF. Metoden har också jämförts med vätskekromatografi-tandemmasspektrometri, LC-MS/MS. ELISA-metoden har högre detektionsgräns och sämre kvantifiering men har fungerat för screeningändamålet.

Undersökningen visar att KAF förekommer i mätbara mängder i mer än 10% av proverna. Kontaminationen med KAF är mycket ojämnt fördelad. De flesta proverna har inga detekterbara mängder. Den högst uppmätta halten 32 µg/kg är dock högre än vad man hittills observerat i övriga Europa. De flesta fynd med förhöjd halt KAF kom från östra Skåne.

BAKGRUND

Kloramfenikol, KAF, är ett bredspektrumantibiotikum som produceras av vissa actinomyceter som lever i jord, i synnerhet *Streptomyces venezuelae*. KAF är känt sedan 1947 och är effektivt mot många patogener. Det har tidigare använts i stor omfattning inom veterinärmedicinen men är numera förbjudet att använda till livsmedelsproducerande djur i stora delar av världen. Anledningen till detta är att det finns belägg för att KAF kan orsaka den allvarliga blodsjukdomen aplastisk anemi. Detta tillstånd är irreversibelt och sambandet mellan KAF och sjukdomen är inte dosberoende, vilket innebär att det i princip inte finns något tolerabelt intag av KAF. Därför har substansen förbjudits med ”nolltolerans” i lagstiftningen. Noll är dock i praktiken ingen absolut storhet utan är beroende av tekniska förutsättningar som detektionsgräns för substansen vid analys. Den enda gräns som finns är alltså ett tekniskt krav på analysmetoden för KAF i livsmedel och urin från livsmedelsproducerande djur. Kravet är specificerat till 0,3 µg/kg. Det finns ingen överenskommen tolkning av detta krav som gränsvärde, men det lär användas som *de facto* gränsvärde i flera länder.

I samband med Livsmedelsverkets rests substanskontroll under hösten 2012 upptäcktes KAF i grismuskel och -urin. Strax före julen 2012 var fynden

bekräftade och extra offentlig kontroll gjordes av länsveterinär i Skåne där fynden gjorts. Foder och foderråvaror från de aktuella gårdarna undersöktes med avseende på KAF utan att källan kunde påvisas. Efter kontakt med det laboratorium i Nederländerna, RIKILT, som utfört analyserna lyftes frågan om halm kunde vara eventuell källa till KAF. I början av januari 2013 togs halmprover på två av de aktuella gårdarna och analys kunde bekräfta låga halter (0,5 – 5 µg/kg) av KAF i halm. Dessa fynd ledde till att SVA i samarbete med Jordbruksverket och Livsmedelsverket genomförde föreliggande undersökning av halm från svenska gårdar.

UNDERSÖKNINGAR

Sammanlagt 215 prover av halm togs genom distriktsveterinärorganisationens försorg. Av dessa prover var 21 tagna på de gårdar där Livsmedelsverket utförde rests substanskontroll med avseende på KAF. Cirka 1 kg halm sändes till SVA där proven torkades vid 60°C över natt under viktskontroll för att sedan malas på hammarkvarn med 1 mm såll. Resultaten har korrigerats för vattenförluster i samband med provberedningen.

Kloramfenikol analyserades med ett ELISA-kit (Ridascreen Chloramphenicol, R Biopharm AG) designat för animaliska livsmedel. Metoden tillämpades med en enkel etylacetatextraktion, följt av upprening genom vätske-vätske-extraktion (hexan:buffert) och slutbestämning med ELISA-kitet. Ett urval (26 prover) analyserades också med vätskekromatografi-tandemmasspektrometri (LC-MS/MS) av RIKILT, Institute for food safety, Wageningen, Nederländerna.

RESULTAT OCH DISKUSSION

Metodjämförelse

Den ELISA-metod som fanns kommersiellt tillgänglig är avsedd för analys av animaliska livsmedel men verifierades för halm genom att 26 prover (alla prover med KAF över 8 µg/kg, samt ett antal med lågt innehåll). Resultaten av verifieringsanalyserna med LC-MS/MS presenteras i tabell 1. ELISA gav i genomsnitt något högre värden än LC-MS/MS, troligen beroende på en viss bakgrund eftersom extrakten var svagt färgade och detektionsmetoden är kolorimetri. Detta har dock mindre betydelse om metoden används i screeningsyfte och bekräftande analyser med LC-MS/MS kan utföras på misstänkt kontaminerade prover. Analysresultaten med LC-MS/MS var i genomsnitt 0,7 µg/kg eller 13% lägre än de från ELISA. Metodskillnaden var dock inte konstant utan var större vid de högsta uppmätta halterna.

Tabell 1. Bestämning av KAF med ELISA samt LC-MS/MS.

	ELISA (µg/kg)	LC-MS/MS (µg/kg)
Maxvärde	21,5	31,7
Medelvärde	5,3	4,6
Median	3,5	2,0
Standardavvikelse	5,3	7,5

Detta till trots är ELISA användbar för screeningändamål när det gäller att hitta de signifikant kontaminerade proven. I undersökningen användes 2 µg/kg som tröskelvärde för att klassa en analys som positiv på grund av den nämnda bakgrundssignalen. Även denna gräns medförde ett antal ”falska positiva” resultat. Det är ett hanterbart problem eftersom det betyder ökade kostnader för konfirmerande analyser men som inte medför ökad risk att ett prov med markerat förhöjd halt av KAF ska passera obemärkt.

Kloramfenikol i halmprover

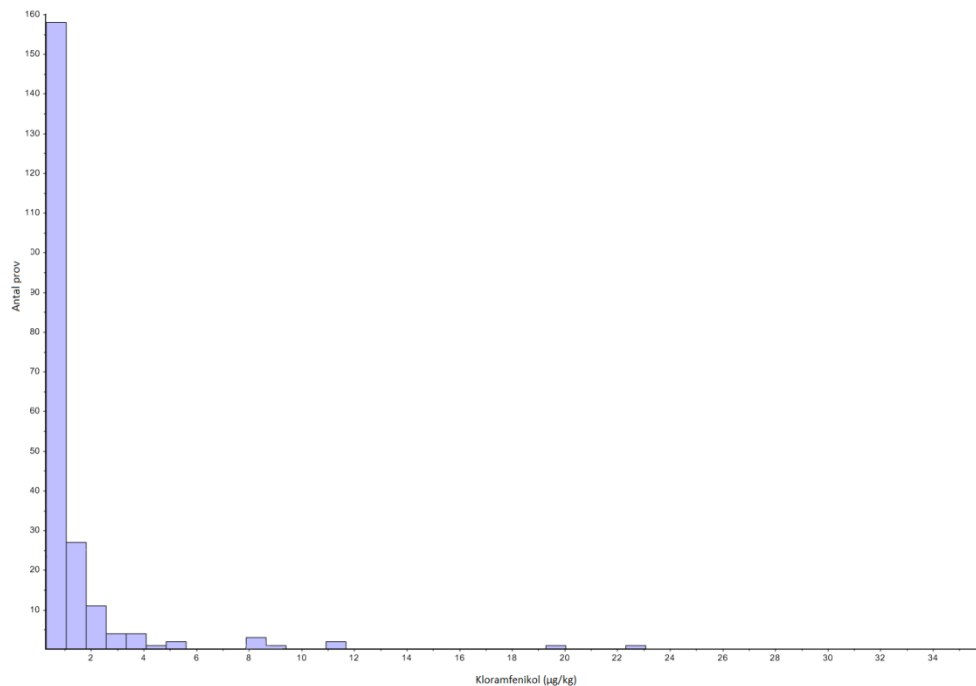
I tabell 2 sammanfattas resultaten av ELISA-analyserna. KAF-innehållet varierade starkt i materialet, den stora majoriteten av prover innehöll inga eller mycket låga halter, medan några få prover hade förhöjda halter. Det högst uppmätta värdet, 32 µg/kg är högt i internationell jämförelse. På senare år har studier gjorts framförallt i Nederländerna men i inget fall har man nått upp till denna halt. Som ses i tabell 1 och 2 är skillnaden mellan median och medelvärde mycket stor i materialet oavsett art. Detta är ett tecken på att förekomsten av KAF är ojämnt fördelad mellan proverna. Fördelningen illustreras av histogrammet i figur 1. Typvärdet, det vanligaste värdet, är mindre än 1 i samtliga fall. Eftersom det finns en viss bakgrund i ELISA-analysen kan man med denna metod inte säkerställa att halten skiljer sig från 0, det vill säga påvisa förekomst av KAF.

Tabell 2. Sammanfattning av kloramfenikolinnehåll i halm av olika spannmålsslag.

Material	Antal prover	Högsta halt KAF (ELISA, µg/kg)	Medelhalt KAF (ELISA, µg/kg)	Medianhalt KAF (µg/kg)
Korn	106	21,5 (31,7*)	1,5	< 1
Vete	46	10,7 (18,0*)	1,1	< 1
Havre	29	4,1 (0*)	< 1	< 1
Rågvete	8	1,3 (-)	< 1	< 1
Ospec halm	20	3,2 (2,4*)	1,1	< 1

*Halter inom parentes är bekräftade med LC-MS/MS

Provtagningen gjordes spritt över landet och representerar i huvudsak de områden där jordbruk bedrivs. I figur 2 visas provtagningsplatserna. De högsta halterna påvisades på Gotland och i östra Skåne. Enstaka prover med konfirmerad halt över 1 µg/kg fanns även i Öster- och Västergötland. De positiva fynden sammanfattas i tabell 3. Vid analyser av prover från Livsmedelsverkets extra kontroll i mars 2013 med provtagning på grisgårdar i Skåne där prover av halm togs samtidigt kunde inga spår av KAF påvisas i



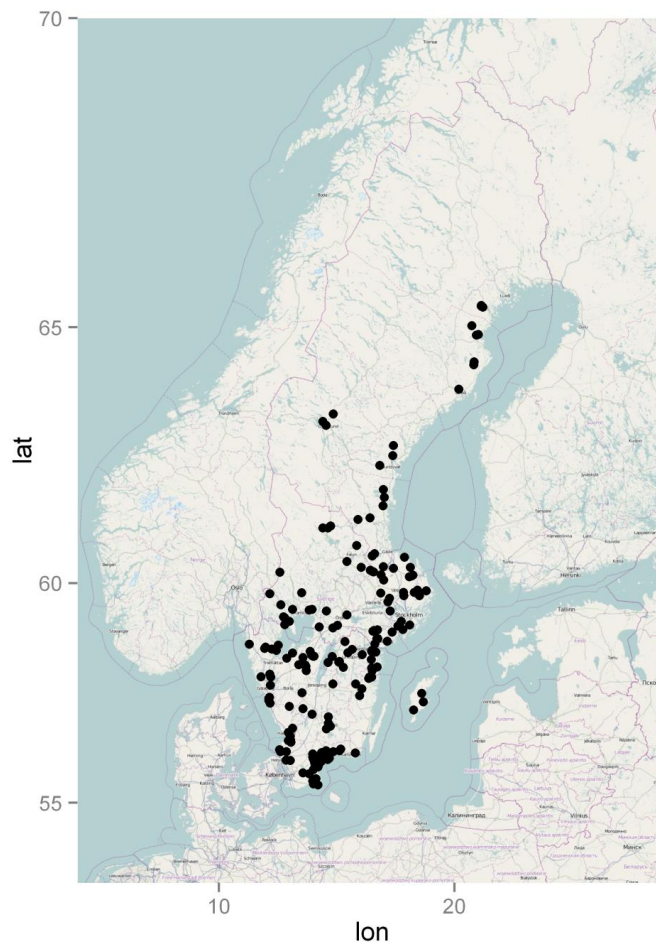
Figur 1. Histogram som visar fördelningen av kloramfenikolinnehåll i samtliga halmprover från Sverige 2013 analyserade med ELISA.

grisurin. I samma område kunde dock förhöjda halter av KAF påvisas i halm (tabell 3). Föreliggande kartläggning är för allmän och lågupplöst för att kunna dra slutsatser om kausalsamband mellan KAF i halm och i urin och/eller muskel från gris. Studien visar att KAF finns i svensk halm. Nederländsk forskning har visat att växter kan ta upp KAF ur jorden och den troligaste orsaken till de fynd som gjorts i kartläggningen är att KAF förekommer naturligt i svensk jordbruksmark.

Tabell 3. Sammanfattning av de positiva fynden av kloramfenikol

Län	Antal prover	Antal prover KAF >2 µg/kg	Högsta halt (µg/kg)
Skåne	50	18	20
Gotland	3	1	32
Västergötland	18	1	2
Östergötland	16	1	3
Uppland	16	1	4*
Hälsingland	7	1	4*
Västerbotten	7	1	2*

*Ej bekräftad med LC-MS/MS



Figur 2. Geografisk distribution av prover i undersökningen av kloramfenikol i halm 2013

De fynd som gjordes i Livsmedelsverkets restsbstanskontroll 2012 tillsammans med fynden av KAF i halm vid de uppföljande undersökningarna tyder på att kloramfenikol från naturliggande källor i marken kan kontaminera livsmedel, om än på en mycket låg nivå. Det faktum att KAF inte påträffats tidigare i den officiella restsbstanskontrollen talar för att problemet är måttligt, men tillsammans med dagens fynd ändå medför att risken måste beaktas. I kartläggningen har endast halm studerats men eftersom växter kan ta upp KAF ur marken kan problemet potentiellt också finnas för andra växter och djurslag. Enligt uppgift har man i Nederländerna påvisat KAF i vallfoder vilket ju konsumeras i mycket stora mängder av idisslare och häst. Vidare studier behövs för att utröna om dessa aspekter också behöver uppmärksammas.

Behov av ytterligare studier

Till följd av kloramfenikolhändelsen runt julen 2012 uppkom också ett behov av studier av om kloramfenikol i låga (eventuellt naturliga) halter kan resultera i mätbara resthalter i livsmedel. För att studera detta planeras ett försök där tillväxtgrisar ges låga doser, motsvarande de halter som påvisats i halm, under en period av några veckor. Efter testperioden tas prover av urin och kött för att se om KAF ansamlats i grisarna i detekterbara mängder. Försöket är nödvändigt eftersom de kinetik/metabolismstudier som finns tillgängliga är gjorda med terapeutiska doser som är flera storleksordningar större än de nu aktuella. Försöket kan ge ytterligare information och beslutsunderlag om det, som studien

indikerar, förekommer KAF naturligt i svensk jordbruksmark. Vidare kommer SVA under 2014 att börja tillämpa LC-MS/MS för att komplettera screeninganalyserna med ELISA vid analys av KAF.

Ytterligare toxikologisk överväganden och eventuellt studier behövs för att man ska kunna hantera ett problem med naturligt producerad kloramfenikol. När nolltoleransen infördes var det ju mot bakgrund av att substansen producerades och tillfördes avsiktligt. I sådana fall är en nolltolerans i alla fall teoretiskt (om än inte praktiskt) tänkbar. Om KAF däremot, som bland andra, föreliggande undersökning tyder på är en naturprodukt som kan förekomma i foder och livsmedel utan att ha blandats in, måste en gränsvärdesstrategi rimligen tillämpas. Man kan dra paralleller till mykotoxiner som aflatoxin B1.