

# Rozmieszczanie i eliminacja norfloksacyny z tkanek kurcząt i jaj kur

ZBIGNIEW ROLIŃSKI, CEZARY KOWALSKI, ELŻBIETA KLIMONT

Katedra Farmakologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12 20-033 Lublin

Roliński Z., Kowalski C., Klimont E.

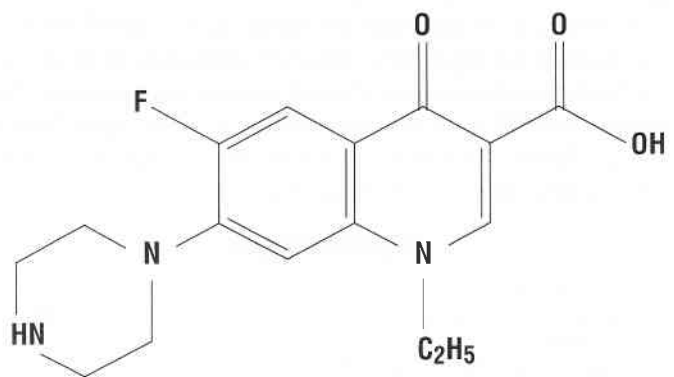
## Distribution and depletion of norfloxacin from chicken tissues and eggs

### Summary

The research was done using norfloxacin nicotinate (NNOR) in the form of 10% water soluble powder. The study was carried out on 61 broiler chickens and 120 laying hens. The birds received NNOR in drinking water at a dose of 175 mg/l (of active substance) for 5 consecutive days. Broiler chickens were killed on days 2, 3 and 5 of drug administration and days 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 after the end of the treatment. Eggs were collected on day 2, 3, 4, and 5 of drug administration and 0, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 days after the end of treatment. Tissue samples (muscles, liver and fat) and eggs after freezing were preserved at  $-18^{\circ}\text{C}$  prior to analysis. Chromatographic conditions were developed to determine the level of norfloxacin residues (NOR) in tissues of the slaughtered chickens (61 birds) and in eggs of laying hens (120): a liquid chromatograph (HPLC) with instrumentation – Varian Analytical Instruments USA, spectrofluorometric detector, column 200 mm length of internal diameter 4 mm, filled with RP-18,  $\text{dp} = 5 \mu\text{m}$  and precolumn 50 mm length containing identical filling. The mobile phase: a) water – 65% of acid reaction ( $\text{pH} = 3.0$ ), b) methanol – 35%, c) acidic tetrabutylamine sulfate – 1.4 g/L (methanol – water phase). The speed of mobile phase flow was 0.7 ml/min. Detection of NOR was 2.5 ng/g of tissue. Chromatographic analysis of NOR residues showed that

**Keywords:** norfloxacin, HPLC, residues, chickens, eggs.

Norfloksacyna (NOR) w postaci niktynianu (niktynian kwasu 1-etylo-6-fluoro-1,4-dihydro-4-okso-7-/1-piperazylo/-3-chinolinokarboksylowego) jest najczęściej stosowaną formą tego leku do stosowania *per os* u drobiu i świń. Lek ten z grupy fluorochinolonów został zsyntetyzowany w 1980 r. w Japonii, gdzie w szeregu badaniach wykazano szerokie spektrum jego działania (4). Charakterystyczną cechą NOR w budowie chemicznej jest występowanie dodatkowego atomu fluoru w pozycji 6 i grupa piperazynowa w pozycji 7 (ryc. 1). Tak zbudowana cząsteczka determinuje poszerzony zakres działania przeciwbakteryjnego NOR; obejmuje on szeroki zakres gram-dodatnich i gram-ujemnych bakterii, łącznie ze szczepami *P. aeruginosa* opornymi na gentamycynę (7). W wyniku tak szerokiego zakresu działania, NOR znajduje zastosowanie terapeutyczne w różnych rodzajach infekcji (9). W praktyce weterynaryjnej dla racjonalnego wykorzystywania NOR w infekcjach u drobiu, konieczne są bardziej szczegółowe informacje o zachowaniu się tego chemioterapeutyku w organizmie ptaków. Celem badań było stąd ustalenie tempa rozmieszczania i eliminacji NOR z tkanek kurcząt i jaj po doustnym stosowaniu tego leku.



Ryc.1. Struktura cząsteczki NOR

### Materiał i metody

**Lek.** Do badań użyto niktynian norfloksacyny (NNOR), w postaci 10% proszku, rozpuszczalnego w wodzie.

**Kurczęta rzeźne.** Badania pozostałości NOR w tkankach wykonano na 61 kurczętach rzeźnych obojga płci, w wieku 5 tygodni, o wyjściowej masie ciała 800-1400 g. Kurczęta pozyskano przez odchowianie jednodniowych piskląt w wiwarium Katedry Farmakologii AR w Lublinie. Ptaki przed doświadczeniem poddano seksowaniu, oznakowaniu numerami i ustalono wyjściową, indywidualną masę ciała. Wydzielono 12 kurcząt, trzymany w oddziel-

Tab. 1. Zużycie wody (co 12 h) w trakcie 5-dniowego podawania norfloksacyny z wodą do picia

Kurczęta	Średnie zużycie wody/szt. w ml przed podaniem leku		Średnie zużycie wody z lekiem/szt. w ml w trakcie podawania leku (w tym średnie zużycie leku/szt. w mg)									
	1.*	2.	1.*	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
Grupa doświadczalna (61 szt.)	135 (0)	(0)	122,3 (21,4)	144,4 (24,9)	144,3 (25,2)	123,9 (21,7)	146,2 (25,6)	128,8 (22,5)	154,2 (27,0)	142,3 (24,9)	120,6 (21,1)	151,7 (26,6)
Grupa** kontrolna (12 szt.)	178	165	175	160	137,5	123,7	121,3	150	125	188,8	128,5	125

Objaśnienia: \*kolejne pomiary, \*\*grupa kontrolna otrzymywała czystą wodę do picia przez cały czas trwania doświadczenia.

nej klatce, dla pozyskania tkanek kontrolnych. Wszystkie kurczęta trzymano w dużej drewnianej klatce o podłodze z siatki metalowej, podzielonej na kilka sektorów, w pomieszczeniu wiaryjnym z mechaniczną wymianą powietrza i całodobowym sztucznym oświetleniem. Ptaki były żywione standardową paszą granulowaną: DKA-Starter i DKA-Finischer.

Kurczęta doświadczalne otrzymywały NNOR z wodą do picia w dawce 175 mg/l przez 5 dni. Woda z lekiem i woda dla grupy kontrolnej była zmieniana co 12 h i określano każdorazowo poziom jej zużycia. Przed podaniem leku, w trakcie i po zakończeniu podawania wszystkie kurczęta doświadczalne i kontrolne, były co drugi dzień ważone dla określenia masy ciała i jej przyrostów. Po 5 dniach stosowania NNOR z wodą, kurczęta poddawano ubojowi w znieczuleniu (chlorok etylu), przez wykrwawienie w wyniku nacięcia tętnicy szyjnej. Ubój obejmował następujące przedziały czasowe: 2, 3, 5 dzień w trakcie podawania i po 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 i 20 dniach od zaprzestania podawania leku. Stężenia pozostałości NOR oznaczano w mięśniach, wątrobie i tłuszczu (tłuszcz badano tylko po odstawieniu leku). Próbkę tkanek (od dwóch sztuk) pulowano w jedną próbkę, zamykano w woreczkach plastikowych, niezwłocznie zamrażano i przechowywano w temp. -18°C, do dnia wykonania oznaczeń.

**Kury nioski.** Badania nad zawartością NOR w jajach wykonano na 120 kurach nioskach, odmiany Astra, trzymany w wydzielonym sektorze fermi A, produkującej jaja konsumpcyjne. NNOR stosowano z wodą do picia w ilości 175 mg/l przez 5 dni. Jaja w liczbie 10 szt. dziennie zbierano począwszy od 2 dnia rozpoczęcia podawania leku, a następnie w 3, 4 i 5 dniu w trakcie podawania NNOR oraz 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 i 10 dniach po odstawieniu leku. Jednocześnie w innym sektorze fermi A zbierano w tych samych przedziałach czasowych jaja kontrolne. Jaja po zamknięciu w plastikowych pojemnikach i oznakowaniu poddawano niezwłocznie zamrożeniu i przechowywano w temp. -18°C do dnia oznaczeń.

**Ekstrakcja NOR z tkanek i jaj.** Wszystkie próbki (mięśnie, wątroba, tłuszcz oraz żółtka i białka jaj) o masie 200 mg poddawano homogenizacji w 5 ml mieszaniny ekstrakcyjnej w homogenizatorze (DIAX 900, Niemcy) przez 2 min. Homogenat wirowano – 5500×g przez 15 min., a supernatant filtrowano przez milipory o średnicy 0,45 mikm (firma Millipore, Holandia); uzyskany przesącz poddawano procedurze chromatografowania. Skład mieszaniny ekstrakcyjnej przyjęto zgodnie z danymi w pracy (5).

**Oznaczanie NOR.** Pozostałości NOR w tkankach oznaczano metodą chromatografii cieczowej (HPLC) na chromatografii cieczowej z podzespołami firmy Varian Analytical Instruments, USA. Używano detektora spektrofluorometrycznego, kolumnę o długości 200 mm, o średnicy wewn. 4 mm z wypełnieniem RP – odp = 5 mcg/ml oraz przedkolumnę o długości 50 mm z takim samym wypełnieniem. Fazę ruchomą stanowiła woda 65% + metanol 35% + kwaśny siarczan czterobutyloamoniowy (1,4 g na 1 litr fazy metanol-woda). Objętość dozowanej próbki – 10 µg/ml; długość fali: Ex = 278, Em = 456. Czułość metody: NOR oznaczano z dokładnością do 0,1 ng/ml (1×10 g/ml). Wykrywalność NOR w badanych próbkach tkanek wynosiła 2,5 ng/g tkanki czyli 2,5 µg/kg.

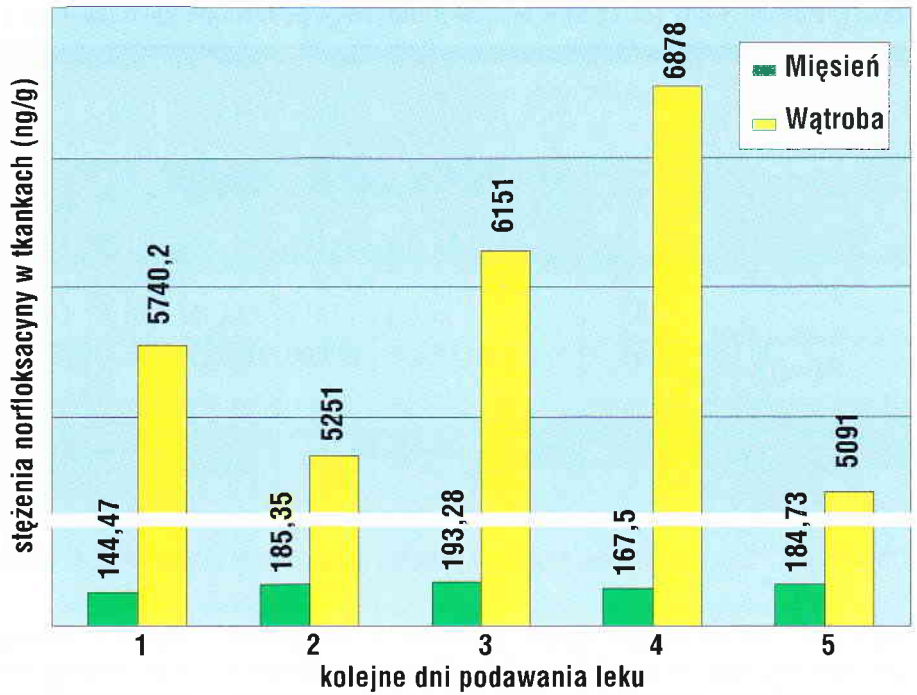
**Próby na odzysk NOR z tkanek i jaj kontrolnych.** Do próbki kontrolnej (próbki o masie 200 mg) dodawano 5 ml mieszaniny ekstrakcyjnej z dodatkiem jednego ze stężeń wzorca NOR – 0,01, 0,1 i 1 mcg/ml. Próbkę tkanek kontrolnych poddawano w całości analogicznej procedurze jak przy oznaczeniach NOR w próbkach tkanek doświadczalnych. Wiarygodność wykonywanych oznaczeń NOR w próbkach na odzysk potwierdzono przez ponawianą analizę chromatograficzną prób w ciągu 3 kolejnych dni.

## Wyniki i omówienie

**Pozostałości NOR w tkankach.** W tab.1 przedstawiono średnie spożycie wody przez jednego ptaka doświadczalnego (z grupy z lekiem) w porównaniu do kurcząt kontrolnych. Dane te stanowią informację o ilościach NNOR przyjmowanych przez jednego ptaka w kolejnych 12 godzinnych cyklach pomiaru zużycia wody. Stwierdzono, że kurczęta doświadczalne zużywały podobne ilości wody (z lekiem) co ptaki z grupy kontrolnej. Trzeba podkreślić, że przyjmowanie wody

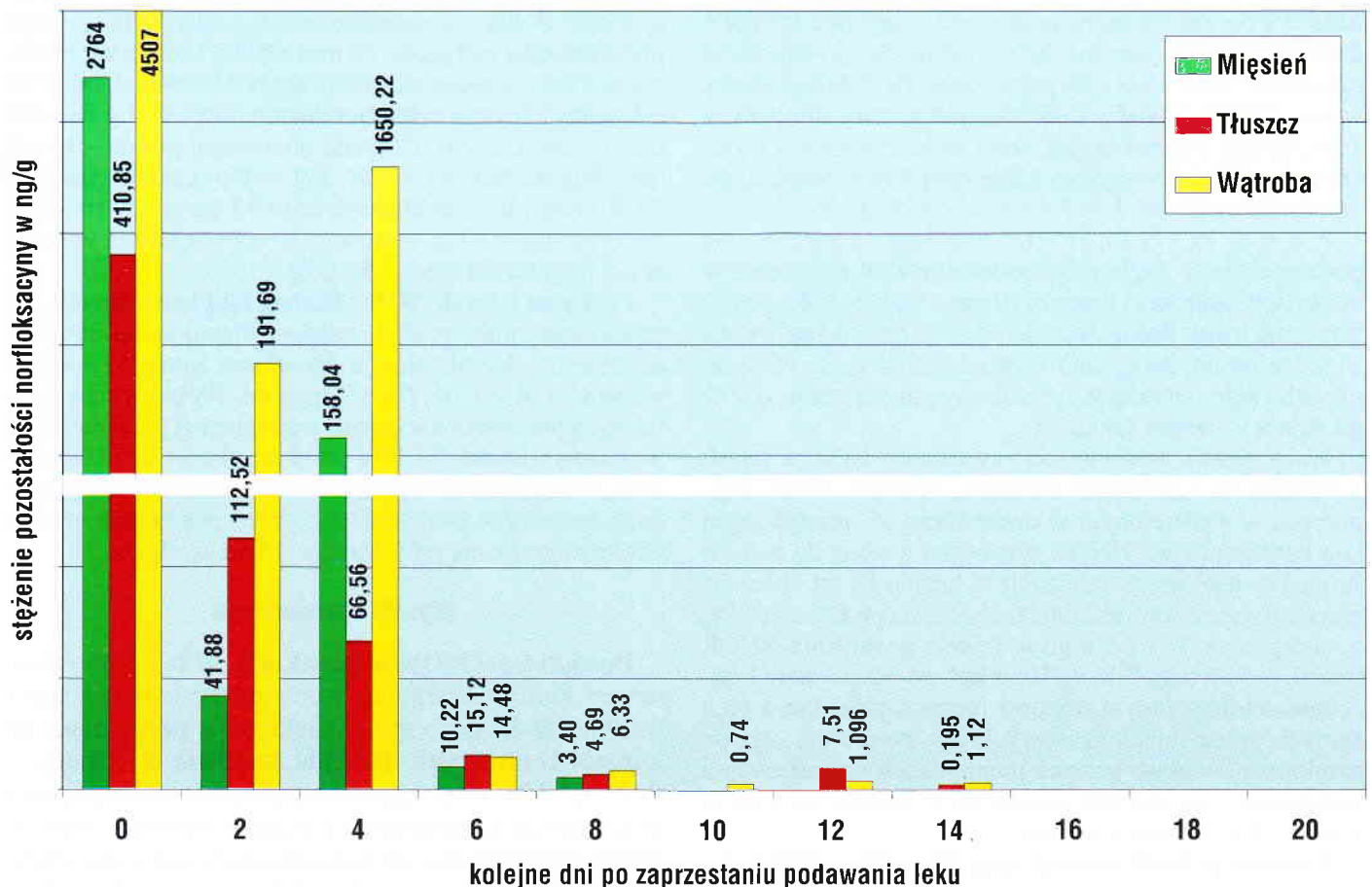
na odpowiednim poziomie w trakcie 5 dni podawania leku, zapewniało dostarczenie do organizmu kurcząt odpowiedniej ilości NOR, warunkującej dobrą dystrybucję tego leku do wszystkich tkanek.

Wyniki oznaczania pozostałości NOR w tkankach kurcząt, otrzymujących z wodą do picia badany lek w dawce 175 mg/l przez 5 dni przedstawiono na ryc. 2 i 3. Stwierdzono, występowanie znacznych różnic w poziomie pozostałości pomiędzy poszczególnymi badanymi tkankami. Najwyższe stężenia pozostałości stwierdzono w wątrobie, następnie w mięśniach, a najniższe w tłuszczu. Wyniki analiz wykazały również, że już po pierwszym dniu podawania leku, stwierdzano NOR w badanych tkankach, najwyższe stężenie w wątrobie – 5740 ng/g, a w mięśniach tylko – 144 ng/g. Na zbliżonym poziomie utrzymywały się stężenia NOR w wątrobie i mięśniach w ciągu 4 dalszych dni podawania leku: najwyższe stężenie NOR w wątrobie stwierdzono po 4 dniach podawania leku – 6878 ng/g, a w mięśniach po 3 dniach – 193,2 ng/g (ryc. 2).



Ryc. 2. Tempo rozmieszczania norfloksacyny w badanych tkankach kurcząt w trakcie podawania leku

Wyniki analizy zawartości NOR w tkankach po zaprzestaniu podawania leku wykazały, że najwyższe stężenia pozostałości we wszystkich badanych tkankach (mięśnie, wątroba, tłuszcz) występowały już po

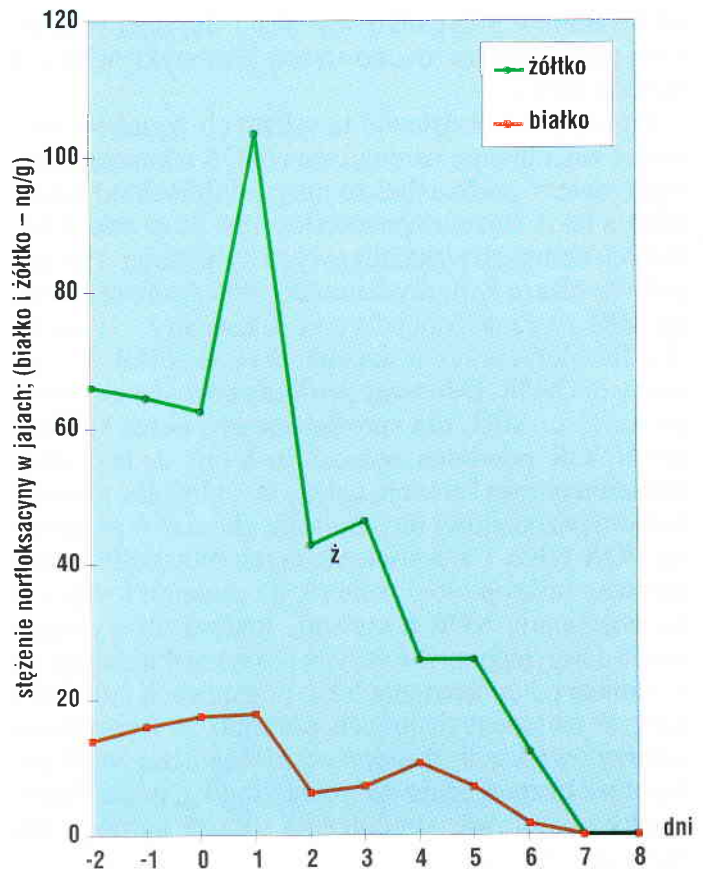


Ryc. 3. Szybkość zanikania pozostałości norfloksacyny z badanych tkanek kurcząt

12 godz. (dzień „0”) od zaprzestania podawania leku (ryc. 3). Podobnie jak w trakcie podawania NNOR, również w przedziale pierwszych 12 godz. od odstawienia leku, stwierdzono znaczne różnice w poziomach pozostałości w poszczególnych tkankach: mięśnie – 2764 ng/g, wątroba – 4507 ng/g i tłuszcz – 410,8 ng/g. Stężenia pozostałości w drugim dniu od zaprzestania podawania leku uległy znacznemu obniżeniu w porównaniu do dnia „0” i wynosiły średnio: mięśnie 41,8 ng/g, wątroba – 191,6 ng/g i tłuszcz – 112,5 ng/g. Po 4 dniach od odstawienia NNOR, zaobserwowano pewien wzrost poziomu pozostałości w tkankach dwóch kurcząt: średnie stężenie pozostałości w wątrobie wynosiło – 1650 ng/g, a w mięśniach – 158,0 ng/g. Natomiast w tkance tłuszczowej kurcząt po 4 dniach od odstawienia leku nie obserwowano wzrostu stężenia pozostałości. W 6 dniu, to jest po 144 godz. od ostatniego podania leku obserwowano kolejny spadek poziomu pozostałości, przy czym w przypadku tkanki wątrobowej był to spadek ponad 100-krotny. Jednocześnie w 6 dniu nastąpiło wyrównanie stężeń pozostałości w trzech badanych tkankach na poziomie 10,2-15,1 ng/g (ryc. 3). Po 8 dniach po odstawieniu NNOR, miał miejsce dalszy spadek pozostałości NOR, a średnie wartości stężeń kształtowały się w sposób następujący: próbki mięśni (M1 i M2) – 3,4 ng/g, próbki wątroby (W1 i W2) – 6,3 ng/g i próbki tłuszczu (T1 i T2) – 4,6 ng/g (ryc. 3). W kolejnym dniu oznaczeń NOR w tkankach, to jest w 10 dniu od odstawienia leku, nie stwierdzono pozostałości w obu pulowanych próbkach mięśni i tłuszczu, a w dwóch próbkach tkanki wątrobowej śladowe pozostałości NOR kształtowały się na granicy wykrywalności metody, to jest poniżej 1 ng/g (ryc. 3). Podobnie jak w próbkach mięśni i tłuszczu pobranych po 10 dniach w kolejnych okresach określania pozostałości NOR, to jest po 12, 14, 16, 18, 20 dniu od zaprzestania podawania leku, stwierdzano wyłącznie poziomy „zerowy”. Natomiast w przypadku tkanki wątrobowej i tłuszczu, śladowe ilości pozostałości stwierdzono jeszcze tylko w 12 i 14 dniu od zaprzestania podawania leku. Wszystkie dalsze pobrane próbki tych tkanek po 16, 18 i 20 dniach dawały wynik negatywny.

Wykonana analiza chromatograficzna pozostałości NOR w badanych tkankach kurcząt wykazała, że pozostałości leku zanikały najszybciej z mięśni. Już po 6 i 8 dniu od zaprzestania podawania leku stężenia pozostałości w tych dwóch przedziałach czasowych wynosiły w przeliczeniu odpowiednio 10,2 i 3,4 mcg/kg. Są to więc stężenia pozostałości znacznie niższe od stężeń innych fluorochinolonów, których dopuszczalne stężenia pozostałości w tkankach zwierząt rzeźnych, określono przez wartość MRL (Maximum Residue Limit) (2).

Szybkie zanikanie pozostałości NOR z mięśni kurcząt potwierdzają również wyniki prezentowane przez Anadona i wsp.(1), którzy po 12 dniach od odstawienia leku wykrywali w mięśniach jedynie śladowe ilo-



Ryc. 4. Rozmieszczenie norfloksacyny w jajach po podawaniu nikotynianu norfloksacyny (7% proszek) z wodą do picia – 2,5 g/l (175 mg substancji aktywnej) przez 5 dni

ści dwóch metabolitów NOR, to jest desetylenonorfloksacyny (0,05  $\mu\text{g/g}$ ) i oksonorfloksacyny (0,008  $\mu\text{g/g}$ ). Nasze starania o otrzymanie wzorców metabolitów NOR zakończyły się niepowodzeniem, z powodu bardzo wysokich kosztów syntezy tych związków. Jednocześnie należy podkreślić, że wymienieni autorzy (1) nie wykonywali analizy zawartości NOR i jej metabolitów w mięśniach kurcząt pomiędzy 5 a 12 dniem od odstawienia tego leku.

Maksymalne stężenia pozostałości NOR w mięśniach i wątrobie zostały wykazane przez nas w trakcie podawania NNOR i po 12 h od odstawienia leku; przy czym najwyższe stężenia NOR stwierdzono w tym okresie w wątrobie (4 dzień podawania – 6878 ng/g) i po 12 h po odstawieniu leku – 4507 ng/g. Jednak już po 2 dniach od zaprzestania podawania NNOR obserwowano znaczne obniżenie poziomu pozostałości w wątrobie – aż 23-krotnie. Stosunkowo szybkie obniżanie się pozostałości NOR w wątrobie już po upływie 24 godz. od zaprzestania podawania leku obserwowali również inni autorzy (1).

Za wyjątkiem tkanek kurcząt zabitych po 4 dniach od odstawienia NNOR, w kolejnych dniach od zaprzestania podawania leku, to jest od 6 do 10 dnia w przypadku mięśni i od 6 do 14 dnia w przypadku wątroby i tłuszczu, miał miejsce stopniowy proces obniżania się poziomu pozostałości w badanych tkankach. Należy podkreślić, że od 10 dnia w przypadku mięśni i

od 16 dnia w przypadku wątroby i tłuszczu w tkankach tych nie stwierdzono stężeń leku wykrywalnych metodą HPLC.

Próbując na podstawie uzyskanych wyników rozważać zagadnienie karencji dla NNOR u kurcząt rzeźnych, należy podkreślić, że już po 6 dniach od odstawienia leku, stężenia pozostałości NOR w trzech badanych tkankach wskaźnikowych były mniej więcej o połowę niższe w porównaniu do tymczasowej wartości MRL, wyznaczonej dla enrofloksacyny – 30 µg/kg (2). Jak dotychczas wskaźnik ten nie został wyznaczony dla NOR. Odnosząc poziomy pozostałości NOR do wartości MRL dla enrofloksacyny, okres karencji dla NNOR powinien wynosić 6-8 dni. Jednak przy ustaleniu okresu karencji, należy uwzględnić również poziom pozostałości metabolitów, chociaż w przypadku NOR tylko 1 z 5 stwierdzonych metabolitów jest aktywny mikrobiologicznie (6, 8). Anadon i wsp. (1) po stosowaniu NOR u kurcząt, stwierdzali występowanie desetylenonorfloksacyny i oksynorfloksacyny po 12 dniach od odstawienia leku, w granicach 0,008-0,1 µg/g. W świetle tych danych, pomimo, że wymienieni autorzy zwiększali dostępność biologiczną NOR podając lek bezpośrednio do wola (8 mg/kg, przez 4 dni), należy postulować wydłużenie okresu karencji dla NOR do 10-12 dni.

**Pozostałości NOR w jajach.** Proces rozmieszczenia leku w jajach po stosowaniu NNOR przez 5 dni z wodą do picia miał charakter stopniowo wzrastający. Analiza chromatograficzna stężeń NOR w trakcie podawania leku, wykazała ograniczone przenikanie tego leku do jaj. Stężenia stwierdzone w żółtku i białku jaj w trakcie podawania były wielokrotnie niższe w porównaniu do stężeń NOR, stwierdzonych w tkankach kurcząt. Obserwacje wykazały na przykład, że po trzech dniach stosowania leku stężenie NOR w żółtkach jaj wynosiło średnio 27,7 ng/g, a w białku średnio – 19,0 ng/g. Stężenie w 4 dniu stosowania NNOR zdecydowanie wzrosło w żółtku, średnio – 66,0 ng/g (ryc. 4). W dniu zaprzestania podawania NNOR (dzień 0) stężenie pozostałości w żółtku utrzymywało się na zbliżonym poziomie jak w dniu 4 średnio – 62,5 ng/g. Poziomy pozostałości NOR w białku jaj w dniach 4 i 0 nie podlegały dużym wahaniom i wynosiły odpowiednio 13,8 i 17,5 ng/g. W 1 dniu po zaprzestaniu podawania NNOR stężenie pozostałości osiągnęło w żółtku najwyższy dotychczasowy poziom – średnio 103,5 ng/g, natomiast poziom pozostałości NOR w żółtku w 2 i 3 dniu uległ obniżeniu do około 50% stężenia z dnia pierwszego i wartości średnie wynosiły 43 i 46 ng/g. W 2 i 3 dniu poziom pozostałości NOR w białku jaj również uległ obniżeniu do poziomu 6,2 i 7,2 ng/g. W ciągu kolejnych dwóch dni od zaprzestania podawania leku – dzień 4 i 5, pozostałości w żółtku jaj uległy dalszemu obniżeniu w porównaniu do dni wcześniejszych – 2 i 3 i wynosiły odpowiednio – 25,8 i 25,7 ng/g. Stopniowy wzrost stężenia leku w jajach indyczych

(enrofloksacyna) w trakcie podawania oraz szybki spadek poziomu po odstawieniu leku obserwowali również inni autorzy. (3). Poziom pozostałości w białku po nieznacznych wahaniami w 4 i 5 dniu od odstawienia leku, w 6 dniu osiągnął już wartości śladowe – 3,5 ng/g (0,003 µg/g).

W 7 dniu poziom pozostałości NOR w żółtku i białku jaj przy zastosowaniu opisanej wcześniej procedury analitycznej osiągnął poziom zerowy. Czulość użytej metody HPLC i wydajność zastosowanej procedury ekstrakcyjnej umożliwia ilościowe oznaczanie pozostałości NOR w jajach z dokładnością do 10 µg/kg (0,01 µg/g = 10 ng/g). Jest to czulość uznana aktualnie za optymalną dla oznaczania pozostałości fluorochinolonów (2). Biorąc pod uwagę nawet niepełny odzysk NOR w próbach kontrolnych, który wynosił średnio dla żółtka – 61,1% i dla białka średnio – 59,7%, to hipotetyczny poziom pozostałości w żółtku w 7 dniu od zaprzestania podawania leku byłby poniżej poziomu wykrywalności.

Stężenia pozostałości NOR w jajach (zwłaszcza w białku) nie podlegały znacznym wahaniami dobowym. Poziom pozostałości NOR w jajach począwszy od najwyższej wartości stwierdzonej w pierwszym dniu (1) od odstawienia leku, był cały czas w trakcie badań zdeteminowany wysokością stężeń leku w żółtku. Zawartość pozostałości leku w żółtku stopniowo ulegała obniżeniu, osiągając w 6 dniu stężenie dwukrotnie niższe – średnio 12,2 ng/g (0,012 µg/g) czyli 12 µg/kg w porównaniu do wartości MRL dla enrofloksacyny – 30 µg/kg (2). Wyniki te pozwalają na przyjęcie 6-dniowego okresu karencji dla NNOR u kur niosek.

## Podsumowanie

Zastosowany sposób ekstrakcji i opracowane warunki chromatograficzne oznaczania NOR umożliwiają ilościowe oznaczanie tego fluorochinolonu w tkankach i jajach z dokładnością do 10 µg/kg, to jest z czułością zalecaną przez połączone Komitety Ekspertów FAO/WHO. Analiza chromatograficzna pozostałości NOR wykazała, że stężenie tego leku w tkankach i jajach ulega szybko obniżeniu po zaprzestaniu jego podawania i w ciągu 6-12 dni w przypadku tkanek, a 6 dni w przypadku jaj osiąga poziom śladowy.

## Piśmiennictwo

1. Anadon A., Martinez-Larranga M. R., Velez C., Diaz J.: Am. J. Vet. Res. 53, 2084, 1992.
2. Anonim: 43 report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO, Geneva 1995.
3. Delaporte J., Froyman R., Ganiere J. P., Florents J. M.: Proc. EAVPT Congress, Edinburgh, UK, 7-11 August 1994, 235.
4. Goldstein E. J. G.: Am. J. Med. 82 (Suppl 6B), 3, 1987.
5. Mertes P. M., Voiriot P., Dopff C., Scholl H., Clavey M.: Antimicrob. Agents. 34, 398, 1990.
6. Ozaki T., Uchida H., Irikura T.: Chemotherapy (Tokyo) Suppl. 4, 128, 1981.
7. Salm D. F., Koburov G. T.: Antimicrob. Agents. 33, 71, 1989.
8. Wise R., Lockley R., Webberly M.: J. Antimicrob. 14, 75, 1984.
9. Ziv G.: Proc. EAVPT Congress, Edinburgh, UK, 7-11 August 1994, 194.

Adres autora: prof. zw. dr hab. Zbigniew Roliński, ul. Weteranów 10/2, 20-038 Lublin