Płyn ustny jako materiał nieinwazyjnego wykrywania antybiotyków u świń^{*) **)}

ANNA GAJDA, ANDRZEJ POSYNIAK

Zakład Farmakologii i Toksykologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 01.12.2016

Zaakceptowano 12.04.2017

Gajda A., Posyniak A.

Oral fluid as material for non-invasive antibiotics detection in pigs

Summary

Intensive and massive pig production often contributes to excessive administration of antibacterials in veterinary medicine. The misuse and failures to follow the label directions of antibiotics, as well as withdrawal inadequacy, can lead to their residue occurrence in products of animal origin. The residue of drugs may result in many biological adverse effects and allergic reactions in consumers as well as the spread of drug-resistant bacteria and bacterial resistance acquisition. Consolidation of pig production requires ensuring adequate conditions of the maintenance of animals with high health conditions, consistent with the guidelines for animal welfare. At the same time, the control of antibiotics in animals is an important element providing the high quality of pigs breeding, as well as the protection of consumers. In residue monitoring programs, the primary material for the control of antibiotics presence in pigs are tissue samples, collected from animals at the slaughterhouse. However, post-mortem analysis does not give the opportunity of monitoring the usage of antibiotics on the farm during the breeding of animals. In ante mortem drug analysis blood can be used as a diagnostic biological matrix; however, blood sampling is connected with certain disadvantages for the animals and the staff responsible for material collection. The post-mortem detection and presence of antibiotic residues in pork tissues above MRL values very often lead to the recall and destruction of significant quantities of meat, which may contribute to economic losses. Therefore, a strong need to find and implement new methods for ante-mortem detection of antibiotics in animals exists, which minimize interference in animal welfare. The results of preliminary studies demonstrate that oral fluid seems to be an effective tool for monitoring the reasonable treatment and residue avoidance. It offers a cost-effective approach for the screening of large populations of animals. The method of oral fluid collection with cotton rope usage allows for the rapid sampling of material. In case of positive oral fluid ante-mortem analysis results, the slaughtering of animals can be delayed, which can bring the avoidance of costs connected with the non-compliant pig meat destruction.

Keywords: oral fluid, non-invasive detection, antibiotics, pigs

Ze względu na zagrożenie dla konsumentów oraz zjawisko rozprzestrzeniania się lekoopornych szczepów bakteryjnych wynikające z nadużywania antybiotyków u zwierząt, kontrola stosowania leków weterynaryjnych jest ważnym elementem w hodowli świń. Jednocześnie stale postępująca konsolidacja produkcji trzody chlewnej wymaga zapewnienia zwierzętom odpowiednich warunków ich utrzymania, zgodnych z wytycznymi dobrostanu zwierząt. Dotychczas antybiotyki badane są głównie w tkankach. Przyżyciowo

natomiast można oznaczać ich poziom we krwi (w osoczu), jednak pobieranie tego rodzaju materiału wiąże się z narażeniem zwierząt na duży stres oraz pewnymi niedogodnościami dla osoby pobierającej próbki. W związku z tym poszukuje się metod, które dawałyby możliwość przyżyciowego wykrywania antybiotyków u zwierząt, przy jednoczesnej minimalizacji ingerencji w hodowlę. Najmniej inwazyjnym sposobem przyżyciowego badania stosowania antybiotyków w populacji trzody chlewnej wydaje się wykorzystanie płynu ustnego jako alternatywy dla innych matryc biologicznych.

W medycynie weterynaryjnej, zwłaszcza w przypadku świń, wykorzystanie płynu ustnego do badań diagnostycznych cieszy się coraz większym zainte-

^{*)} Sfinansowano ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015.

^{**)} Praca wyróżniona nagrodą za najlepszą prezentację przedstawioną przez młodego pracownika nauki w Sekcji Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego podczas XV Kongresu PTNW w Lublinie 22-24.09.2016 r.

resowaniem. Uważa się, że pobieranie próbek płynu ustnego w regularnych odstępach czasowych, z uwagi na łatwą ich dostępność i odzwierciedlenie statusu zdrowotnego stada, pozwoli na zminimalizowanie kosztów pobierania próbek w programach kontroli chorób zakaźnych oraz uproszczenia procesu diagnostycznego u świń (17).

Badanie płynu ustnego mogłoby umożliwić szybkie monitorowanie ekspozycji zwierząt zarówno na patogeny, jak i antybiotyki. W przypadku stwierdzenia zakażenia u świń możliwe byłoby szybsze podjęcie działań terapeutycznych. Natomiast w przypadku potwierdzenia obecności nielegalnie zastosowanych antybiotyków na fermie świń (niezgodnie z dokumentacją, niezgodnie z określonym dawkowaniem, niedotrzymanie okresu karencji lub też zastosowanie antybiotyku tuż przed ubojem zwierząt), możliwe byłoby podjęcie odpowiednich działań w celu uniknięcia pozostałości zastosowanych leków w tkankach przeznaczonych do konsumpcji, a w konsekwencji uniknięcia utylizacji tych produktów i związanych z tym strat ekonomicznych.

Zarówno w przypadku wykorzystania płynu ustnego do wykrywania zakażeń u świń, jak również stosowania jako materiału do detekcji antybiotyków, należy pamiętać, że tego typu badanie ma zasadniczo charakter testu stadnego i jego wynik powinien być zawsze powiązany z danymi uzyskanymi z wywiadu i oceną dokumentacji. O ile wykorzystanie płynu ustnego jako matrycy do rozpoznawania patogenów w populacji świń jest coraz wnikliwiej analizowane i badania w tym zakresie trwają już od dłuższego czasu, to w przypadku zastosowania tego materiału biologicznego jako matrycy do detekcji antybiotyków, dostępne badania i dane literaturowe są dość mocno ograniczone (18, 19, 24, 25, 30).

Kontrola stosowania leków weterynaryjnych w hodowli świń

W celu zapewnienia właściwej jakości produktów pochodzenia zwierzęcego, a tym samym zabezpieczenia zdrowia konsumentów w Polsce, podobnie jak w pozostałych krajach Unii Europejskiej, prowadzona jest systematyczna kontrola pozostałości leków weterynaryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego. Ochrona zdrowia konsumenta przed szkodliwym oddziaływaniem pozostałości odbywa się poprzez wyznaczanie najwyższych dopuszczalnych limitów pozostałości (maximum residue limit – MRL) dla leków weterynaryjnych, które wraz z produktami pochodzenia zwierzęcego mogą dostawać się do łańcucha pokarmowego ludzi. Wartość MRL wyznaczana jest w wyniku szacowania ryzyka (risk assessment), w oparciu o wielokierunkowe badania toksykologiczne. W konsekwencji tylko leki mające wyznaczone wartości MRL w częściach świń przeznaczonych do konsumpcji przez ludzi (mięśnie, nerki, wątroba,

tłuszcz) mogą być stosowane u tych zwierząt. Aktualny wykaz leków weterynaryjnych z podanymi wartościami MRL oraz matrycami biologicznymi i gatunkami zwierząt, dla których te wartości ustalono, został zebrany w tab. 1 rozporządzenia Komisji 37/2010 z dnia 22 grudnia 2009 r. (3).

W krajowym programie badań kontrolnych obecności substancji niedozwolonych oraz pozostałości chemicznych, biologicznych i produktów leczniczych u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego wykonuje się corocznie około 4 tysięcy próbek w kierunku pozostałości substancji przeciwbakteryjnych u świń. W badaniach pozostałości leków zebranych w grupie B1 (załącznik 2 Dyrektywy 96/23) oznaczenia u świń wykonywane są wyłącznie w materiale pobieranym pośmiertnie, w jadalnych tkankach zwierząt, takich jak: wątroba, mięśnie, nerki (4). W przypadku związków zakazanych do stosowania u zwierząt, z grupy A (tabela 2 Rozporządzenia Komisji 37/2010), ich oznaczenia wykonuje się w materiale pobieranym przyżyciowo (w gospodarstwie): woda, mocz, osocze, jak również w materiale pobieranym w rzeźni, jakim są: mięśnie, wątroba, nerki, ale również mocz i tkanka tłuszczowa (3, 4). Wykrywanie pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w żywności wykonywane jest metodami przesiewowymi (skriningowymi) oraz metodami potwierdzającymi (23). Te pierwsze charakteryzują się niskim kosztem i krótkim czasem badania, co pozwala na analizę dużej liczby próbek i wyselekcjonowanie próbek potencjalnie niezgodnych (26), jednakże zdarzają się wyniki fałszywie dodatnie i w tym przypadku czas analizy próbki ulega wydłużeniu. Dodatkowo, wynik badania metody przesiewowej (mikrobiologicznej) jest zwykle tylko jakościowy, co oznacza, że w przypadku potencjalnego stwierdzenia obecności substancji w badaniach skriningowych dla podjęcia decyzji administracyjnej konieczne jest zastosowanie instrumentalnych metod potwierdzających, pozwalających na pełną identyfikację i określenie stężenia substancji, zgodnie z wymaganiami zawartymi w Decyzji Komisji 2002/657/WE (2). Zwykle w charakterze metod potwierdzających stosuje się różne techniki chromatograficzne w połączeniu ze spektrometrią mas (23, 28).

Kontrola pozostałości leków przeciwbakteryjnych należących do grupy B1, wykonywana w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii PIWet-PIB Puławy, obejmuje analizę 59 związków należących do 11 grup antybiotyków i chemioterapeutyków. Kontrolą u świń objęte są substancje należące do: penicylin, cefalosopryn, sulfonamidów, makrolidów, fluorochinolonów, aminoglikozydów, tetracyklin, linkozamidów, pleuromutylin, diaminopirymidyn oraz polipeptydów. W obrębie grupy A u świń kontroli podlegają: hormony, beta-agoniści, metabolity nitrofuranów, nitroimidazole i ich metabolity, chloropromazyna oraz chloramfenikol.

Wady i zalety przyżyciowej i pośmiertnej kontroli antybiotyków u świń

Antybiotyki i inne leki przeciwbakteryjne należą do najczęściej stosowanych substancji chemicznych stosowanych w praktyce weterynaryjnej. Zgromadzenie dużej liczby zwierząt na względnie małej powierzchni jest jednym z czynników, które w istotnym stopniu przyczyniają się do szybkiego rozprzestrzeniania się chorób bakteryjnych w warunkach fermowych, a substancje przeciwbakteryjne (antybiotyki i chemioterapeutyki) są często jedynym, skutecznym sposobem ograniczenia strat powstałych w wyniku zachorowania zwierząt. Dość często dochodzi do popełniania wielu błędów w trakcie leczenia zwierząt, jak: przekraczanie dawek, nieprzestrzeganie czasów karencji i zamienne, niezgodne ze wskazaniem stosowanie leków. Szczególnie przy masowej produkcji antybiotyki stosowane są często bez uzasadnienia już od pierwszych dni chowu, w celu zabezpieczenia przed powstawaniem infekcji. Poprzez nieracjonalne stosowanie antybiotyków może dochodzić nie tylko do występowania tych substancji w żywności, ale również do narastania zjawiska lekooporności i rozprzestrzeniania się na szeroką skalę lekoopornych szczepów bakteryjnych (8). Jak już wcześniej wspomniano, obecnie materiałem do badań w kierunku pozostałości leków przeciwbakteryjnych są głównie próbki tkanek, pobierane od świń w rzeźni. O ile badania pośmiertne pozwalają określić pozostałości leków bezpośrednio w materiale przeznaczonym do konsumpcji przez człowieka, o tyle badania te nie dają możliwości monitorowania stosowania antybiotyków w fermie, w trakcie tuczu zwierząt. W przypadku wykrycia obecności leku w tkankach, produkty te, po odpowiednim postępowaniu administracyjnym, są wycofywane z rynku i podlegają utylizacji, co związane jest ze znacznymi startami ekonomicznymi. Badania przyżyciowe dają możliwość określania i kontroli aplikacji leków w fermie, w trakcie hodowli zwierząt lub tuż przed ich ubojem, jednak w badaniach przyżyciowych głównym problemem jest pozyskiwanie materiału do badań. Łatwość pobrania, czas, bezpieczeństwo oraz minimalizacja stresu u zwierząt podczas pobierania próbek są jednymi z głównych czynników ograniczających różne techniki pozyskiwania materiału do analiz. Przyżyciowo antybiotyki można badać we krwi (osocze), w moczu, lecz pobieranie krwi wiąże się z pewnymi niedogodnościami dla osoby pobierającej próbki oraz dla zwierząt. Osocze pobierane jest od każdego osobnika i zwierzęta narażone są na duży stres związany z tą czynnością, co znacznie może obniżać ich status zdrowotny. Pobieranie moczu również związane jest z narażeniem zwierząt na stres oraz pewnym zagrożeniem dla obsługi zwierząt. U świń, które są szczególnie wrażliwym gatunkiem zwierząt, stres oddziałuje bardzo negatywnie, co widoczne jest w znacznej redukcji przyrostów masy ciała i spadku produktywności. Ponadto obecność genu stresu RYR1

(Ryanodine receptor) powoduje przyspieszenie przemian glikolitycznych w tuszy bezpośrednio po uboju, co w konsekwencji powoduje zaburzenia procesów kruszenia i utrzymania wody przez mięso, a w związku z tym spadek jego jakości. W celu kontroli stosowania leków weterynaryjnych u zwierząt, przyżyciowo badana jest także woda przeznaczona do ich pojenia oraz pasza podawana zwierzętom w trakcie tuczu, jednakże badania wody i pasz pozwalają na określenie źródła kontaminacji ewentualnie występującymi lekami, a nie ich pozostałości w organizmie zwierząt.

Wykorzystanie płynu ustnego do nieinwazyjnej kontroli leków u świń

Płyn ustny, zwany również śliną mieszaną, jest mieszaniną śliny właściwej wydzielanej przez ślinianki oraz przesącza naczyń włosowatych błony śluzowej jamy ustnej (gębowej) i dziąseł. Płyn ustny zawiera wiele składników organicznych i nieorganicznych, wśród których znajdują się przede wszystkim białka i glikoproteiny, takie jak: interferon, laktoferyna, mucyna, antygeny grupowe krwi, albuminy, γ -globuliny, peroksydaza, lizozym, laktoperoksydaza, enzymy trawienne – amylaza, maltaza, lipaza, defensyny, czynniki wzrostu – nabłonkowy EGF (Epidermal growth factor) i wzrostu nerwów NGF (Nerve growth factor), a także substancje niebiałkowe (aminokwasy, węglowodany, lipidy, cholesterol, kortykosterydy) oraz komórki (resztki pokarmowe, złuszczone nabłonek, leukocyty), leki, hormony, substancje nieorganiczne (m.in. jony wapnia, magnezu, sodu). W płynie ustnym mogą znajdować się także patogeny i ich metabolity oraz przeciwciała, które mogą być syntetyzowane lokalnie i systemowo (7, 14, 17).

Obecność leków w płynie ustnym uzależniona jest od wielu czynników, w tym od fizykochemicznych właściwości leku, wielkości cząsteczki danego związku, rozpuszczalności w lipidach, a także interakcji z komórkami ślinianek, metabolizmu i stabilności leku w matrycy. Ponadto, istotny wpływ na przenikanie różnych substancji do płynu ustnego ma również stopień jonizacji związku, pH płynu, pKa substancji oraz wiązanie z białkami krwi i tkanek (6, 9, 27). Generalnie, dystrybucja większości leków do płynu ustnego odbywa się na zasadzie dyfuzji biernej, czyli zgodnie z gradientem stężeń (14, 21). Niektóre cząsteczki mogą przenikać na zasadzie transportu aktywnego lub ultrafiltracji (7, 10). Im mniejsza cząsteczka, tym jej dyfuzja jest łatwiejsza. Związki lipofilne oraz cząsteczki niezdysocjowane przechodzą przez błony łatwiej niż cząsteczki lipofobowe i zdysocjowane (16).

Niewątpliwą zaletą wykorzystania płynu ustnego do badania jest fakt, że pobieranie materiału jest całkowicie nieinwazyjne – w trakcie pobierania nie potrzebne są igły czy pętla ryjowe do unieruchomienia świń. Do pobierania materiału wykorzystuje się bawełnianą linę, zawieszoną w kocy na określony czas, która jest przez świnię żuta i gryziona. Stosowanie tej techniki prowa-

Ryc. 1. Schemat pobierania płynu ustnego u świń

dzi do ograniczenia stresu u zwierząt do minimum. Jest to system „przyjazny zwierzętom”, gdyż w trakcie pobierania materiału do badań wykorzystywany jest naturalny behawioryzm świń. Nie bez znaczenia jest również znacznie podwyższone bezpieczeństwo dla ludzi pobierających materiał do badań oraz łatwość pozyskania materiału. Technika wymaga właściwie minimum doświadczenia. Ponadto pobranie materiału, jakim jest płyn ustny, wymaga krótkiego czasu, tj. około 40 minut, wkład pracy jest znacznie mniejszy, a potrzebne do pobierania rzeczy są tanie i ogólnie dostępne.

Wykorzystanie płynu ustnego jako materiału do wykrywania antybiotyków umożliwia pobranie próbek od dużej liczby osobników jednocześnie oraz daje możliwość oceny występowania antybiotyków u dużej liczby zwierząt przez pobranie 1 próbki zbiorczej (jedna lina może przypadać nawet na 100 świń). Koszt analizy w przypadku jednej próbki zbiorczej płynu ustnego jest znacznie obniżony w porównaniu do badania setek indywidualnych próbek, jak to ma miejsce w przypadku badania osocza. Ponadto badanie płynu ustnego umożliwia wykrycie nielegalnego lub niezgodnego ze wskazaniami stosowania antybiotyków w trakcie chowu zwierząt, co wiąże się z ograniczeniem strat spowodowanych utylizacją mięsa w przypadku wykrycia obecności leku w tkankach.

Metoda pobierania płynu ustnego

Pobieranie płynu ustnego jest całkowicie bezinwazyjne. Bawełniana lina zawieszana jest na wysokości dostosowanej do wielkości świń, tj. koniec liny powinien znajdować się mniej więcej na wysokości mostka świń. Lina musi być łatwo dostępna, ale nie powinna dotykać podłoża. Nie powinno się umieszczać blisko źródła wody i/lub karmników, co ogranicza niepotrzebne zanieczyszczenie pobieranego materiału. Najlepsze właściwości absorpcyjne posiada lina bawełniana. Lina powinna być płątana z kilku bawełnianych linek, gdyż wówczas uzyskuje się większą ilość materiału – płynu. Ustalono, że najbardziej odpowiednia grubość liny dla warchlaków to lina o średnicy około 1,3 cm, natomiast dla starszych świń 1,6 cm. Linę mocuje się do dostępnych elementów przegrody kojca, a przy naturalnej ciekawości świń lina praktycznie natychmiast jest gryziona i żuta. Pozostawienie liny na około 30-60

minut jest wystarczające do pobrania odpowiedniej ilości płynu ustnego do dalszych badań (29).

Ilość pobranego płynu i czas pozostawienia liny w kojcu zależy od aktywności świń, na którą wpływ ma wiele czynników. Jeśli temperatura otoczenia jest zbyt niska lub zbyt wysoka, świnię wykazują zmniejszoną aktywność ruchową. Świnię przebywające na rusztach plastikowych/betonowych są bardziej chętne do żucia zawieszanej liny. Podłoże ściółkowe powoduje, że świnię mają stały dostęp do ściółki (słomy), ich naturalny instynkt rycia i żucia jest w dużej mierze zaspokojony i nie tak chętnie interesują się zawieszoną liną. Również zdrowotność świń, wiek zwierząt i pora dnia mają duże znaczenie. Wystąpienie choroby prowadzi zwykle do znacznego zmniejszenia ilości pobieranego płynu ustnego. Od starszych świń pozyskuje się więcej materiału niż od świń młodych. Należy również pamiętać, że aktywność świń do południa jest z reguły większa.

Po określonym czasie żucia liny przez zwierzęta, linę należy wycisnąć. Na nadal umocowaną w kojcu linę nakłada się plastikowy worek, którego wlot jest mocno ściskany dłońmi i ruchem w dół (od miejsca umocowania w kierunku końca) wyciskany jest płyn z liny do worka. Płyn z worka należy przelać poprzez odcięcie jednego rogu worka do probówki lub probówek. Płyn z worka można również pobrać pipetą i rozlać do probówek. W celu wstępnego oczyszczenia pobranego materiału płyn można poddać wirowaniu, ale nie jest to konieczne. Tak pobrany materiał jest schładzany i przewożony do miejsca badania lub zabezpieczany przez zamrożenie w -20°C . Schemat pobierania płynu ustnego przedstawiono na ryc. 1.

Analiza oznaczania antybiotyków w płynie ustnym – wstępne wyniki badań

W celu zbadania możliwości wykorzystania płynu ustnego do wykrywania obecności antybiotyków u świń przeprowadzono doświadczenie na zwierzętach. Zwierzętom podawano domięśniowo oksytetracyklinę w postaci jednorazowej dawki 20 mg/kg masy ciała, jako jeden z najczęściej stosowanych leków w leczeniu infekcji bakteryjnych u świń, podawanych iniekcyjnie. Po podaniu leku płyn ustny pobierany był w odpowiednich odstępach czasowych przez okres 21 dni. Do pozyskiwania próbek płynu ustnego wyko-

rzystano opisaną powyżej metodę z wykorzystaniem bawełnianej liny. Do analizy i oznaczania ilościowego oksytetracykliny zastosowano metodę chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS), którą w celu potwierdzenia wiarygodności oznaczeń poddano procesowi walidacji. Wstępne wyniki badań wskazują na możliwość wykrycia oksytetracykliny w płynie ustnym. Najwyższe stężenie obserwowano 2 godziny po aplikacji leku, które wynosiło $10653 \pm 1421 \mu\text{g/kg}$. Oksytetracyklina utrzymywała się przez okres 21 dni. W 21. dniu (okres karencji dla tkanek jadalnych dla zastosowanego preparatu leczniczego) poziom oksytetracykliny równy był $30,8 \pm 9,4 \mu\text{g/kg}$.

Przebadano także pewną liczbę próbek płynu ustnego pobranych ze świńskich ferm terenowych. W kilku próbkach potwierdzono obecność doksycykliny w zakresie stężeń $10\text{--}50 \mu\text{g/kg}$. W dalszym etapie badań planowane jest zwiększenie zakresu opracowanej metody analitycznej o inne grupy związków oraz eksperymentalne badanie możliwości przenikania różnych antybiotyków stosowanych w terapii chorób świń.

Płyn ustny jako materiał diagnostyczny w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej

Pierwsze doniesienia o wykorzystaniu płynu ustnego w medycynie ludzkiej do monitorowania stanu zdrowia pojawiły się już ponad 100 lat temu (22). Od tego czasu przeprowadzono liczne badania w zakresie możliwości diagnostycznych śliny u ludzi (12). W latach 90. Amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA) wyraziła zgodę na rozpoczęcie intensywnych badań nad opracowaniem testów diagnostycznych do wykrywania czynników zakaźnych i niezakaźnych w jamie ustnej ludzi (11). W 1994 r. FDA zatwierdziła pierwszy zestaw diagnostyczny do wykrywania przeciwciał dla HIV w ślinie i aktualnie ślina jest dość szeroko wykorzystywana w medycynie ludzkiej. Używana jest m.in. do wykrywania narkotyków, alkoholu, toksyn, hormonów, leków, nikotyny, a także do oznaczania grup krwi (5). Ślinę ludzi stosuje się także do detekcji różnych wirusów, m.in. koronawirusa, herpeswirusa typu 1 i 6, wirusa ospy wietrznej, Ebola, a także przeciwciał m.in. HIV, wirusa zapalenia wątroby typu A, B, i C, wirusa odry, różyczki, świnki, grypy, polio, rotawirusa (12, 13, 20). Przypuszcza się nawet, że w przyszłości badanie śliny zastąpi analizę krwi w diagnostyce cukrzycy, wczesnej postaci zawału serca, a nawet niektórych chorób nowotworowych (21, 22).

W medycynie weterynaryjnej najwięcej badań diagnostycznych opartych na analizie płynu ustnego dotyczy świń, jednak spektrum badań z wykorzystaniem tej matrycy w porównaniu do medycyny ludzkiej jest zdecydowanie mniejsze. Płyn ustny znalazł zastosowanie jako materiał diagnostyczny do wykrywania zespołu rozrodzo-oddechowego świń (PRRS), cirkowirusa świń typu 2 (PCV2), grypy świń oraz infekcji *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis* (1, 15, 17, 25).

Do badania płynu ustnego świń wykorzystywane są właściwe testy serologiczne oraz PCR, odpowiednio zaadaptowane i zoptymalizowane (15). Badania nad pleuropneumonią, podczas których pobierano próbki płynu ustnego od świń zakażonych *Actinobacillus pleuropneumoniae* eksperymentalnie i naturalnie, wykazały, że testem ELISA IgA wykrywano w płynie ustnym zanim przeciwciała pojawiły się w surowicy, ale rejestrowano jednocześnie szybszy spadek ich stężenia w porównaniu do krwi. Badania te potwierdzają przydatność płynu ustnego we wczesnym wykrywaniu zakażeń App. Natomiast u świń zakażonych wirusem choroby pęcherzykowej możliwe było wykrycie wirusa wyłącznie w płynie ustnym, podczas gdy badanie surowicy dało wynik ujemny. Tak więc, w odniesieniu do niektórych chorób, płyn z jamy ustnej może być nawet bardziej przydatny w diagnostyce niż surowica (17). Podobnie, w przypadku monitorowania ostrej infekcji PRRSV wykazano większą przydatność płynu ustnego niż surowicy. W innych badaniach, dotyczących możliwości wykrycia cirkowirusów i przeciwciał dla PCV2, nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych pomiędzy wynikami badania surowicy i płynu ustnego.

U bydła przedstawiano wykorzystanie płynu ustnego do izolacji pałeczek okrężnicy i salmonelli oraz przeciwciał dla wirusa pryszczycy. U zwierząt towarzyszących możliwe jest wykrywanie wirusa wścieklizny w płynie ustnym. Ponadto, udało się także wykryć DNA szczepów *Bartonella* spp. u psów. W odniesieniu do kotów badanie płynu ustnego umożliwia wykrycie antygenów wirusa białaczki kotów.

Podsumowanie

Rosnące wymagania w zakresie bezpieczeństwa żywności, a w konsekwencji kontroli racjonalnego stosowania antybiotyków sprawiają, że poszukuje się nowych, lepszych, szybszych metod weryfikacji ich racjonalnego stosowania u zwierząt, przy jednoczesnej minimalizacji ingerencji w hodowlę. Wykorzystanie płynu ustnego wydaje się alternatywą dla pośmiertnej kontroli tkanek. Badanie płynu ustnego umożliwia nieinwazyjną identyfikację nielegalnego lub niezgodnego ze wskazaniem stosowania antybiotyków u świń oraz pozyskiwanie materiału do badań w krótkim czasie.

Analiza płynu ustnego daje możliwość szybkiej oceny, czy świnię przeznaczone na ubój, a w dalszej kolejności na sprzedaż, są „wolne” od antybiotyków (tzn. czy nie zaistniało ryzyko ewentualnej ich obecności w tkankach przeznaczonych do konsumpcji, powyżej maksymalnych dopuszczalnych limitów pozostałości – MRL). Wyniki wstępnych badań eksperymentalnych potwierdzają możliwość oznaczania wybranych antybiotyków z grupy tetracyklin w omawianym materiale.

W ostatnich latach obserwowano znaczny wzrost zainteresowania i intensyfikację badań nad wykorzystaniem płynu ustnego jako matrycy diagnostycznej w wykrywaniu patogenów i monitorowaniu sytuacji zdrowotnej świń. Zastosowanie omawianej matry-

cy do detekcji antybiotyków i kontroli ich aplikacji w fermach trzody chlewnej wymaga jeszcze dalszych badań eksperymentalnych i analitycznych oraz czynności weryfikacyjnych, potwierdzających adekwatność użycia tego materiału do kontroli leków stosowanych w hodowli świń.

Piśmiennictwo

1. Alboral L. G., Gradassi M., Pavesi R., Boniotti B., Nassuato C., Giovannini S., Glacomini E., Bellini S., Pcciarini M.: Detection of PRRSV in oral fluid samples; longitudinal study under field conditions. Proc. 21 Congress IPVS, Vancouver, Canada, 2010, s. 483.
2. Commission Decision 2002/657/EC of August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off. J. Eur. Commun. L 221, 8-36.
3. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off. J. Eur. Commun. L 15:1-77.
4. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC, 86/469/EEC and Decision 89/187/EEC and 91/664/EEC. OJ L 1996, 125, 10-31.
5. Danhof M., Breimer D. D.: Therapeutic drug monitoring in saliva. Clin. Pharmacokinet. 1978, 3, 39-57.
6. Drobitch R. K., Svensson C. K.: Therapeutic drug monitoring in saliva. An update. Clin. Pharmacokinet. 1992, 23, 365-379.
7. Ghalaut P., Ghalaut V., Yadav S., Lekhvani S., Yadav A.: Diagnostic applications of saliva. J. Clin. Diagn. Res. 2010, 4, 2330-2336.
8. Girardi C., Odore R.: Pharmacological treatments and risks for food chain. Vet. Res. Commun. 2008, 32 (Suppl 1), S11-S18.
9. Haeckel R.: Factors influencing the saliva/plasma ratio of drugs. Ann. NY Acad. Sci. 1993, 694, 128-142.
10. Haeckel R., Hanecke P.: Application of saliva for drug monitoring. An in vivo model for transmembrane transport. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1996, 34, 171-191.
11. Haeckel R., Hanecke P.: The application of saliva, sweat and tear fluid for diagnostic purposes. Ann. Biol. Clin. 1993, 51, 903-910.
12. Hofman L. F.: Human saliva as a diagnostic specimen. J. Nutr. 2001, 131, 1621-1625.
13. Holmstrom P., Syrjanen S., Laine P., Valle S. L., Suni J.: HIV antibodies in whole saliva detected by ELISA and Western blot assays. J. Med. Virol. 1990, 30, 245-248.
14. Kaufman E., Lamster I. B.: The diagnostic applications of saliva – a review. Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 2002, 13, 197-212.
15. Kittawornrat A., Prickett J., Wang C., Olsen C., Irwin C., Panyasing Y., Ballagi A., Rice A., Main R., Johnson J., Rademacher C., Hoogland M., Rowland R., Zimmerman J.: Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. J. Vet. Diagn. Invest. 2012, 24, 262-269.
16. Lui P., Muller M., Derendorf H.: Rational dosing of antibiotics: the use of plasma concentrations versus tissue concentrations. Int. J. Antimicrob. Ag. 2002, 19, 285-290.
17. Markowska-Daniel I.: Nowa era w diagnostyce chorób zakaźnych zwierząt? Lecznicza Dużych Zwierząt 2010, 12, 68-72.
18. Meiszberg A., Karriker L., Zimmerman J., Irwin C. H., Coetzee J.: Detection of ceftiofur and oxytetracycline in oral fluids of swine with a pen-side competitive ELISA test after intramuscular injection. J. Vet. Pharmacol. Ther. 2011, 34, 515-517.
19. Olsen C., Karriker L., Wang C., Binjawadagi B., Renukaradhya G., Kittawornrat A., Lizano S., Coetzee J., Main R., Meiszberg A., Panyasing Y., Zimmerman J.: Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. Vet. J. 2013, 198, 159-163.
20. Parry J. V., Perry K. R., Panday S., Mortimer P. P.: Diagnosis of hepatitis A and B by testing saliva. J. Med. Virol. 1989, 28, 255-260.
21. Pfaffe T., Cooper-White J., Beyerlin P., Kostner K., Punyadeera C. H.: Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. Clin. Chem. 2011, 57, 675-687.
22. Pink R., Simek J., Vondrakova J., Faber E., Michl P., Pazdera J., Indrak K.: Saliva as a diagnostic medium. Biomed. Papers 2009, 153, 103-110.
23. Posyniak A.: Występowanie antybiotyków w żywności – aspekty prawne i analityczne kontroli pozostałości. Życie Wet. 2011, 86, 717-720.
24. Prickett J. R., Kim W., Simer R., Yoon K. J., Zimmerman J.: Oral fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. J. Swine Health Prod. 2008, 16, 86-91.
25. Prickett J. R., Zimmerman J.: The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. Anim. Health Res. Rev. 2010, 11, 207-216.
26. Rożańska H., Lewak-Pilat A.: Metody przesiewowe wykrywania pozostałości antybiotyków w żywności. Życie Wet. 2011, 86, 59-61.
27. Siegel I. A.: The role of saliva in drug monitoring. Ann. N Y Acad. Sci. 1993, 20, 86-90.
28. Stolker A. A. M., Brinkman U. A. Th.: Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. J. Chromatogr. A 2005, 1067, 15-53.
29. White D., Rotolo M., Olsen Ch., Wang Ch., Prickett J., Kittawornrat A., Panyasing Y., Main R., Rademacher Ch., Hoogland M., Zimmerman J. J.: Recommendations for pen based oral-fluid collection in growing pigs. J. Swine Health Prod. 2014, 22, 138-141.
30. Zimmerman J., Prickett J., Johnson J.: Nowe sposoby wykrywania patogenów w populacji świń – tańsze, lepsze i łatwiejsze. Mag. Wet. Monografia Choroby Świń 2010, s. 595-596.

Adres autora: dr Anna Gajda, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: anna.gajda@piwet.pulawy.pl,