Występowanie tetracyklin w paszach – przyczyny i skutki

EWELINA PATYRA, MONIKA PRZENIOSŁO-SIWCZYŃSKA,
ALEKSANDRA GRELIK, KRZYSZTOF KWIATEK

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

Otrzymano 23.03.2018

Zaakceptowano 09.07.2018

Patyra E., Przeniosło-Siwczyńska M., Grelik A., Kwiatek K.
Use of tetracyclines in feeds: Causes and consequences

Summary

Tetracycline antibiotics, including tetracycline (TC), chlortetracycline (CTC), oxytetracycline (OTC) and doxycycline (DOX), are commonly used in veterinary medicine because of their broad-spectrum activity, cost effectiveness and certain favourable pharmacokinetic properties. The use of antibiotics in feed for non-medicinal purposes has been prohibited in the European Union. In Poland and other countries of the European Union, there are official national programmes for controlling the use of TCs and all other antibacterials in feed. This paper presents the pharmacological properties of TCs as well as the main reasons for and consequences of their use in feed. It also presents a chromatographic method for detection of TCs in animal feeds. The method is used in routine testing of food for the presence of tetracycline antibiotics. In the years 2015-2017, tetracycline antibiotics were detected in 31 out of 126 feed samples analysed by this method.

Keywords: tetracyclines, feed, pharmacokinetics, methods, residues, results

Intensywna produkcja zwierzęca oraz ciągły wzrost zapotrzebowania na białko pochodzenia zwierzęcego od lat zmuszają do poszukiwania rozwiązań, które przyczynią się do intensyfikacji produkcji zwierzęcej, ograniczenia występowania chorób bakteryjnych oraz obniżenia kosztów produkcji w fermach wielkotowarowych. Przez szereg lat stosowane były antybiotykowe stymulatory wzrostu (ASW) dodawane do pasz w celu poprawy przyrostów masy ciała zwierząt rzeźnych oraz zapobiegania występowaniu chorób bakteryjnych. Od 2006 r. wprowadzono zakaz stosowania ASW w krajach Unii Europejskiej (UE), a antybiotyki w paszach mogą być podawane wyłącznie w postaci pasz leczniczych, które zgodnie z obowiązującym prawem wytwarzane są na zlecenie lekarza weterynarii, w zakładach zatwierdzonych przez właściwego Wojewódzkiego Lekarza Weterynarii (WLW) oraz stosowane pod nadzorem lekarza opiekującego się stadem. Od kilku lat obserwuje się wzrost produkcji przemysłowych mieszanek paszowych. Światowa produkcja pasz przemysłowych w 2016 r. wyniosła 1032 miliony ton, z czego około 3-7% produkcji przypada w udziale paszom leczniczym (www.alltech.com). W krajach należących do UE pasze lecznicze to obecnie jedyna legalna droga podawania leków weterynaryjnych w paszach.

Substancje przeciwbakteryjne to największa grupa autoryzowanych substancji, które są stosowane w formie premiksów leczniczych do produkcji pasz leczniczych. Wytwarzanie pasz leczniczych może odbywać się w tych samych zakładach i na tych samych liniach technologicznych, co produkcja przemysłowych mieszanek paszowych. Może to skutkować obecnością substancji przeciwbakteryjnych w paszach innych niż lecznicze. Obecność substancji przeciwbakteryjnych w paszach może być również wynikiem ich zanieczyszczenia w trakcie transportu czy przechowywania, a także celowego lub nielegalnego zastosowania leków przez hodowców.

Spośród wielu dopuszczonych do stosowania w lecznictwie weterynaryjnym substancji przeciwbakteryjnych jedną z najczęściej stosowanych grup leków są antybiotyki tetracyklinowe. W Polsce stanowią one około 40% całkowitej sprzedaży weterynaryjnych produktów leczniczych, są również jedną z najczęściej stosowanych grup antybiotyków do produkcji pasz leczniczych (17).

Tetracykliny – charakterystyka

Pierwszym odkrytym przez Benjaminą Duggara przed ponad sześćdziesięciu laty antybiotykiem z grupy tetracyklin była chlorotetracyklina, która

nadała nazwę całej grupie tych związków. Antybiotyki tetracyklinowe dzieli się na związki pochodzenia naturalnego, wytwarzane przez drobnoustroje z rodzaju *Streptomyces*, do których należą tetracyklina, chlorotetracyklina i oksytetracyklina oraz związki półsyntetyczne, takie jak: doksycyklina, rolitetracyklina, metacyklina, minocyklina i limecyklina. W latach 90. XX w. na drodze syntezy chemicznej otrzymano nową grupę antybiotyków tetracyklinowych – glikocykliny, których przedstawicielem jest tigeceyklina (15, 26).

Tetracykliny stanowią grupę antybiotyków o szerokim spektrum aktywności przeciwbakteryjnej. Mechanizm ich działania polega na hamowaniu syntezy białek poprzez wiązanie się z podjednostką 30S bakteryjnego rybosomu, w wyniku czego nie dochodzi do połączenia tRNA z miejscem wiązania na kompleksie rybosom-mRNA (5, 12, 26, 27, 32). Z uwagi na okres aktywności, tetracykliny możemy podzielić na krótko działające (tetracyklina, oksytetracyklina i chlorotetracyklina) oraz długo działające (doksycyklina i minocyklina). Zakres aktywności przeciwbakteryjnej tetracyklin obejmuje tlenowe i beztlenowe bakterie Gram-dodatnie (*Staphylococcus*, *Pneumococcus*, *Enterococcus*) i Gram-ujemne (*Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Brucella*). Ponadto wykazują działanie bakteriostatyczne w odniesieniu do drobnoustrojów z rodzaju *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, niektórych krętków, a nawet pierwotniaków i prątków oraz wirusów (3, 4, 18, 19, 26, 28, 32, 33). W odróżnieniu od innych antybiotyków z grupy tetracyklin, doksycyklina i minocyklina wykazują aktywność skierowaną przeciwko *Staphylococcus aureus* i niektórym gatunkom z rodzaju *Streptococcus*. Bakterie Gram-ujemne, wrażliwe na działanie tetracyklin to: *Pseudomonas multocida*, *Klebsiella* sp., *Brucella* sp., natomiast większość *Pseudomonas aeruginosa* jest opornych na działanie tetracyklin (10).

Tetracykliny uznaje się zarówno za leki z wyboru, jak również za leki alternatywne w terapii wielu zakażeń. Do najważniejszych wskazań do stosowania tej grupy leków u zwierząt gospodarskich, zalicza się schorzenia bakteryjne przewodu pokarmowego (zapalenie błony śluzowej żołądka, zapalenie wątroby), układu oddechowego (zapalenie płuc), układu moczowo-płciowego (zapalenie wymion, macicy), a także stosowane są w leczeniu zakażeń bakteryjnych skóry i zakażeniach układowych (21, 22, 26).

Tetracykliny podawane są głównie drogą *per os*, z wyjątkiem przeżuwaczy, u których ta droga podania powoduje zaburzenia procesów fermentacji w żwaczu oraz może doprowadzać do niszczenia mikroflory żwacza, dlatego też u tej grupy zwierząt zalecane jest podawanie domięśniowe lub dożylnie (24). U koni również nie należy podawać tetracyklin doustnie, gdyż mogą one zaburzać rozwój saprofitycznej mikroflory jelita ślepego.

Do nowych tetracyklin, jak dotąd sporadycznie stosowanych w weterynarii zalicza się rolitetracyklinę,

minocyklinę oraz metacyklinę. Stosowanie minocykliny i metacykliny opisano głównie u psów i kotów (24). Oprócz wymienionych związków, do grupy tetracyklin należą także klomocyklina, limecyklina, mekloocyklina i penimepicyklina stosowane w medycynie ludzkiej. Glikocykliny, których przedstawicielem jest tigeceyklina, stosowane są w leczeniu ciężkich zakażeń bakteryjnych u ludzi. Mechanizm działania glikocyklin polega na zakłóceniu syntezy białka bakteryjnego. Antybiotyk charakteryzuje się bardzo dobrą dystrybucją w tkankach i długim czasem półtrwania (15, 24).

Właściwości farmakokinetyczne

Właściwości przeciwbakteryjne i farmakokinetyczne antybiotyków tetracyklinowych predysponują je do stosowania w infekcjach występujących u różnych gatunków zwierząt. Zwykle podaje się je doustnie lub pozajelitowo, w dawkach od 10 do 50 mg/kg masy ciała, w zależności od formy przygotowania leku i gatunku zwierząt (24). Tetracykliny odznaczają się dużą objętością dystrybucji ($V_d > 1$ l/kg), co oznacza, że łatwo przenikają do większości tkanek i płynów ustrojowych. Po podaniu doustnym wysokie stężenie tetracyklin pojawia się po upływie 3-4 godzin, a po domięśniowym już po 1 godzinie. Antybiotyki tetracyklinowe szybko wchłaniają się z miejsca iniekcji, osiągając wysokie stężenie we krwi, większości płynów ustrojowych i tkankach. W najwyższych stężeniach występują w nerkach, wątrobie, śledzionie, żółci, płucach oraz w centrach kostnienia. Mogą również w niewielkim stopniu przenikać do płynu mózgowo-rdzeniowego. U drobiu nieśnego antybiotyki tej grupy przenikają do jaj bez względu na drogę podania (9, 32).

Okres biologicznego półtrwania ($t_{1/2}$) antybiotyków tetracyklinowych jest zróżnicowany i zależy od wieku zwierzęcia, postaci oraz drogi podania leku (24). W przypadku chlorotetracykliny i tetracykliny okres półtrwania antybiotyku we krwi wynosi od 1 do 9 godzin, w zależności od gatunku zwierzęcia. Oksytetracyklina szybko wchłania się z przewodu pokarmowego, osiągając wszystkie tkanki i płyny ustrojowe z wyjątkiem płynu mózgowo-rdzeniowego. Długość okresu półtrwania dla tego antybiotyku wynosi od 4 do 10 godzin w zależności od gatunku zwierząt. Półsyntetyczna doksycyklina odznacza się znacznie dłuższym okresem półtrwania w osoczu (19-20 godzin), co pozwala na stosowanie tego leku z mniejszą częstotliwością podawania w ciągu doby. Doksycyklina wydalana jest z kałem w postaci nieaktywnych metabolitów lub chelatów, nie powodując niszczenia saprofitycznej flory jelitowej (7, 14, 29). Długi okres półtrwania, większe stężenie w tkankach, zmniejszone wydalanie nerkowe dla doksycykliny zapewniają uzyskiwanie dobrych wyników leczenia zakażeń bakteryjnych (9).

Proces wchłaniania tetracyklin może być zaburzony przez mleko, leki zmniejszające kwasowość soku żołądkowego, preparaty żelaza oraz związki zawierające

wapń, magnez, glin, żelazo, które upośledzają wchłanianie tetracyklin z przewodu pokarmowego. W porównaniu do pozostałych antybiotyków tetracyklinowych wchłanianie doksycykliny jest w mniejszym stopniu zaburzone przez te dwu- i trójwartościowe kationy, jednak należy unikać ich przyjmowania w ciągu 1-2 godzin od zażycia któregoś z tych antybiotyków. Antybiotyki tej grupy ulegają w ograniczonym stopniu przemianom metabolicznym, gdyż około 1/3 podawanej dawki ulega wydaleniu w stanie niezmienionym głównie przez nerki i układ pokarmowy, a także z mlekiem (4, 22, 24, 28, 31, 32).

Działanie toksyczne i inne niepożądane

Tetracykliny są na ogół dobrze tolerowane, ale nie można wykluczyć występowania poważnych działań niepożądanych, wyrażających się fototoksycznością oraz przebarwieniem zębów. Reakcje fototoksyczne są wywoływane przez wszystkie tetracykliny, wydaje się jednak, że występują one rzadziej w przypadku stosowania doksycykliny lub minocykliny. Odkładanie się tetracyklin w tkance kostnej może prowadzić do zahamowania wzrostu kośćca, a także przebarwienia zębów, ze względu na tworzenie chelatów z jonami metali, które wbudowują się w tkankę kostną, hamując jej wapnienie, powodując łamliwość kości oraz hipoplastyczne szkliwo zębów (18). Z tego powodu antybiotyki te są zwykle przeciwwskazane do stosowania u samic ciężarnych oraz u zwierząt poniżej pierwszego miesiąca życia. Przy stosowaniu najniższych dawek tetracyklin obserwuje się opóźnienie wzrostu złamanych kości. Szybkie podanie tych leków może być przyczyną wstrząsu anafilaktycznego, hipotensji i zapaści, szczególnie w przypadku koni. Podanie terapeutyczne dużych dawek tetracykliny może doprowadzić do wystąpienia efektów hepatotoksycznych, wśród których najpoważniejsze jest ostre stłuszczenie z martwicą wątroby. Śmiertelne zaburzenia w czynności nerek stwierdzono po zastosowaniu dużych dawek oksytetracykliny u bydła z septicemią i endotoksemią. Stosowanie wysokich dawek tetracyklin może zmniejszać tempo syntezy białek zwierzęcych (działanie przeciwanaboliczne), które przejawia się niewydolnością nerek oraz zwiększeniem stężenia mocznika we krwi (22). Zaznacza się to szczególnie w biosyntezie enzymów, zwłaszcza tych biorących udział w procesach trawienia i wchłaniania. Tetracykliny zmniejszają aktywność enterokinazy prawie o 100%. Długotrwała terapia może być przyczyną zaburzenia czynności szpiku kostnego. Oksytetracyklina podana dożylnie może być przyczyną zwyrodnienia tłuszczowego wątroby oraz ciężkiej martwicy proksymalnych kanalików nerkowych (22). Ponadto tetracykliny mogą zakłócać rozwój prawidłowej flory jelitowej oraz wywoływać zaburzenia przewodu pokarmowego w postaci wymiotów, wzdęć i biegunk. Przy wysokich stężeniach tetracyklin dochodzi do niszczenia flory jelitowej, także u zwierząt monogastrycznych, powodując ogra-

niczenie syntezy i dostępności witamin z grupy B i K w jelicie grubym. Jak stwierdzono, leki te mogą być ponadto przyczyną kwasicy metabolicznej i zaburzeń równowagi elektrolitowej. Niektórzy autorzy wskazują również na działania mutagenne i teratogenne tetracyklin, przez co antybiotyki te powinny być stosowane racjonalnie i ostrożnie, szczególnie przy podawaniu doukładowym (13).

Przyczyny występowania tetracyklin w paszach

Tetracykliny są jedną z grup autoryzowanych leków przeciwbakteryjnych dopuszczonych do stosowania w terapii zwierząt rzeźnych. W przypadku obecnej intensywnej hodowli dużych stad zwierząt gospodarskich nastawionej na szybkie zyski, nie ma możliwości wyeliminowania pojawiających się infekcji bakteryjnych, z tego względu w hodowlach przemysłowych antybiotyki często podawane są całej grupie zwierząt w wodzie lub w postaci paszy leczniczej. Pasze lecznicze jak już wspomniano wytwarzane są w wytwórniach pasz posiadających zezwolenie WLW. Zdarza się, że w tej samej wytwórni i na tej samej linii technologicznej produkowana jest pasza lecznicza i pasza bytowa. Wykorzystywanie tych samych linii technologicznych do produkcji obu rodzaju pasz może skutkować przeniesieniem pewnych ilości, niebędących dawkami leczniczymi substancji przeciwbakteryjnych do pasz bytowych. Pojawiające się zanieczyszczenie poprodukcyjne pasz nazywane jest zanieczyszczeniem krzyżowym (cross-contamination). Takie pasze mogą zostać wprowadzone do żywienia całych grup zwierząt bez świadomości realnego zagrożenia dla zwierząt oraz produktów pochodzenia zwierzęcego. Kolejną przyczyną występowania zanieczyszczeń pasz bytowych substancjami przeciwbakteryjnymi, w tym antybiotykami z grupy tetracyklin można uznać transport i/lub przechowywanie. Niewłaściwy proces czyszczenia lub jego brak w przypadku transportu, przechowywania i dozowania do karmników dla zwierząt po wcześniejszym stosowaniu paszy leczniczej może być kolejną z przyczyn nieświadomego wprowadzania niskich stężeń tetracyklin do żywienia zwierząt rzeźnych. Opisane powyżej drogi wprowadzania leków weterynaryjnych do pasz bytowych są łatwe do wyeliminowania, ponieważ podstawowym wymogiem w celu zapobiegania temu zjawisku jest odpowiednie czyszczenie miejsc i urządzeń, które miały kontakt z paszami leczniczymi.

Pomimo kontroli gospodarstw i wytwórni pasz przez pracowników Inspekcji Weterynaryjnej w Polsce stwierdzane są przypadki celowego wprowadzenia lub niewłaściwego zastosowania substancji przeciwbakteryjnych do pasz bytowych. Przykładem może być użycie produktu leczniczego niezgodnie z jego przeznaczeniem, np. podanie do paszy substancji przeciwbakteryjnej przeznaczonej do rozpuszczenia w wodzie poprzez jej wymieszanie z tą paszą lub po-

sypanie paszy lekiem. Zdarzają się przypadki użycia preparatów przeznaczonych do podania iniekcyjnego z paszą. Należy wziąć pod uwagę nieuczciwą praktykę hodowców związaną ze stosowaniem zakazanych w krajach UE antybiotykowych stymulatorów wzrostu, które mogą być stosowane w celu poprawy konwersji paszy oraz zwiększenia dziennych przyrostów masy ciała zwierząt rzeźnych. Wymienione przyczyny obecności substancji przeciwbakteryjnych w paszach bytowych nie są obojętne dla organizmu zwierząt oraz niosą ryzyko dla zdrowia konsumenta spożywającego żywność pochodzenia zwierzęcego.

Konsekwencje stosowania tetracyklin u zwierząt gospodarskich

Stosowanie leków przeciwbakteryjnych, w tym antybiotyków z grupy tetracyklin w chowie zwierząt gospodarskich poza ewidentnymi korzyściami niesie ze sobą szereg niebezpieczeństw. Jednym z nich jest możliwość występowania reakcji alergicznych u konsumentów. Reakcje alergiczne (bezpośrednie lub odległe w czasie, ujawniające się przy okazji ponownego zetknięcia z lekiem) występują w ostatnich latach coraz częściej i stają się coraz większym problemem. Mogą objawiać się wysypkami skórnymi, stanami astmatycznymi, a u osób wrażliwych doprowadzać do wystąpienia wstrząsu anafilaktycznego. Ponadto tetracykliny mogą prowadzić do uszkodzenia wątroby, zaburzeń żołądkowo-jelitowych, a nawet wykazywać działanie kancerogenne (9, 18, 26).

Nadmierne i nieracjonalne stosowanie tetracyklin, jak również innych substancji przeciwbakteryjnych w terapii chorób zwierząt gospodarskich może prowadzić do powstawania drobnoustrojów opornych na działanie tej grupy związków oraz do występowania ich pozostałości w żywności pochodzenia zwierzęcego, przez co mogą negatywnie oddziaływać na zdrowie konsumenta.

Konsekwencją nadmiernego i niewłaściwego stosowania antybiotyków z grupy tetracyklin mogą być także straty ekonomiczne. Produkty spożywcze pochodzenia zwierzęcego, w których stwierdzono obecność antybiotyku w niedozwolonych stężeniach (powyżej maksymalnego limitu pozostałości), podlegają wycofaniu z rynku i nie mogą być dalej wykorzystywane do spożycia przez ludzi (8).

Innym istotnym problemem, wynikającym z dość dużej stabilności antybiotyków tetracyklinowych, jest zdolność ich kumulacji w środowisku zewnętrznym, tj. wodzie, glebie, ściekach, nawozach naturalnych (1, 2, 11, 23, 30). Odchody zwierzęce pochodzące z wielkostadnych hodowli stosowane są jako nawozy organiczne i właśnie tą drogą substancje lecznicze najczęściej dostają się do środowiska naturalnego, zaburzając równowagę flory i fauny glebowej (16). Ponadto poprzez częściowe hamowanie procesu rozkładu materii organicznej mogą stanowić jedną z przyczyn eutrofizacji wód (20).

Obecność pozostałości tetracyklin może również utrudniać prawidłową ocenę sanitarno-weterynaryjną surowców żywnościowych, ponieważ poprzez hamowanie wzrostu drobnoustrojów mogą prowadzić do uzyskania fałszywych wyników badań oceniających mikrobiologiczną jakość żywności (25).

Przyczyny występowania pozostałości tetracyklin w żywności

Dominujący udział antybiotyków tetracyklinowych w lecnictwie wynika z ich korzystnych właściwości terapeutycznych związanych z szerokim spektrum działania przeciwbakteryjnego, właściwościami farmakokinetycznymi i farmakodynamicznymi oraz łatwością aplikacji (8). U zwierząt gospodarskich antybiotyki tetracyklinowe mogą być podawane z paszą, wodą lub parenteralnie. Wszystkie drogi aplikacji leku mogą skutkować pojawieniem się pozostałości tych związków w tkankach i narządach zwierząt lub produktach pochodzenia zwierzęcego. Uważa się, że występowanie tego rodzaju pozostałości jest wynikiem nieprzestrzegania okresów karencji niezbędnych do eliminacji leku z organizmu zwierzęcia, niewłaściwego podawania leku, niezgodnego ze wskazaniami dawkowania lub ich stosowania u gatunków zwierząt, dla których nie są przeznaczone. Kolejną przyczyną występowania pozostałości antybiotyków w tkankach jest ich podawanie przez hodowców, bez nadzoru lekarza weterynarii, a także przypadkowe zanieczyszczenie paszy, np. po procesie produkcji pasz leczniczych. Ponadto na pojawienie się pozostałości leków weterynaryjnych w zwierzęcych tkankach jadalnych mają wpływ uwarunkowania biologiczne, które dotyczą głównie indywidualnych różnic w biodostępności lub eliminacji substancji, zależnych od wieku, płci i gatunku zwierzęcia. Interakcje z innymi, równolegle podawanymi lekami występują rzadko, lecz ich efektem może być spowolnienie metabolizmu i gromadzenie się w tkankach pozostałości, które nie uległy procesom przemiany. Inną przyczyną występowania pozostałości antybiotyków w produktach pochodzenia zwierzęcego może być stosowanie substancji przeciwbakteryjnych w niskich dawkach w paszy lub wodzie, co może prowadzić do ich obecności w jadalnych tkankach zwierząt rzeźnych, narządach oraz mleku i jajach.

Kontrola laboratoryjna pasz w kierunku wykrywania tetracyklin

W celu zapewnienia właściwej jakości produkowanych przemysłowych mieszanek paszowych oraz pasz leczniczych, w Polsce i UE prowadzona jest kontrola pasz w kierunku wykrywania substancji przeciwbakteryjnych. Krajowy Plan Urzędowej Kontroli Pasz, aktualizowany każdego roku, przewiduje badania tzw. czynników zagrożeń typu chemicznego, do których zaliczane są między innymi substancje przeciwbakteryjne (antybiotyki, sulfonamidy, chinolony) oraz niedozwolone antybiotykowe stymulatory wzrostu.

Działania te realizowane są w ramach zadań Inspekcji Weterynaryjnej. Dodatkowo, do badań przesyłane są próbki pasz z indywidualnych gospodarstw oraz próbki pasz niedocelowych z wytwórni pasz produkujących pasze lecznicze w ramach kontroli produkcyjnej.

Wszystkie próbki w pierwszym etapie badań kierowane są do przesiewowego badania metodą mikrobiologiczną. Badanie wykonane tą metodą może wskazać obecność substancji przeciwbakteryjnych, bez możliwości identyfikacji substancji. Uzyskany w badaniu przesiewowym wynik dodatni lub wątpliwy wymaga zastosowania metod potwierdzających wykonywanych z zastosowaniem technik chromatograficznych. Zarówno badania przesiewowe, jak i potwierdzające koordynowane są przez Zakład Higieny Pasz (ZHS) – Krajowe Laboratorium Referencyjne Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Do badań pobierane są wszystkie rodzaje pasz ze szczególnym uwzględnieniem mieszanek paszowych stosowanych w żywieniu kur niosek, trzody chlewnej oraz mieszanek dla brojlerów typu Finisz z całego kraju, zarówno z wytwórni pasz, jak również bezpośrednio z gospodarstw zajmujących się chowem zwierząt gospodarskich.

W prowadzonych badaniach należy wziąć pod uwagę fakt, że mieszanka paszowa jest niezwykle złożoną matrycą badawczą. W paszy oprócz nasion zbóż, soi, śrut/makuchu rzepakowego czy słonecznikowego, dodatków pochodzących z krwi lub mleka, tłuszczów zwierzęcych i/lub roślinnych dodawanych jest szereg innych substancji pochodzenia naturalnego, jak i syntetycznego, tj.: aminokwasy, zakwaszacze, zioła i/lub ekstrakty ziołowe, enzymy, a także dodatki witaminowe, mineralne lub mineralno-witaminowe. Ze względu na skład paszy w niektórych przypadkach badanie mikrobiologiczne może skutkować otrzymaniem wyniku fałszywie dodatniego ze względu na obecność składników, które mogą wpływać na zahamowanie wzrostu drobnoustrojów testowych (np.: zakwaszacze, kokcydiostatyki dodane do mieszanki paszowej), dlatego też ważne jest stosowanie w praktyce laboratoryjnej metod pozwalających na jednoznaczne potwierdzenie obecności substancji przeciwbakteryjnej w paszach. W tym celu opracowywane i wdrażane są do praktyki laboratoryjnej metody chromatograficzne z różnymi typami detekcji. W analizie niskich stężeń antybiotyków tetracyklinowych w paszach ze względu na złożony charakter matrycy i znaczną ilość substancji mogących potencjalnie interferować z analizowaną substancją, najkorzystniejszym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas, która umożliwia jakościowe i ilościowe oznaczenie badanych antybiotyków. W ZHS PIWet-PIB opracowano i wdrożono do rutynowych badań kontrolnych antybiotyków tetracyklinowych w paszach procedurę umożliwiającą w jednym toku postępowania analitycznego określenie obecności i ilości tych związków. W przypadku metod analitycznych stosowanych w kontroli

Ryc. 1. Schemat analizy próbki paszy

substancji przeciwbakteryjnych (antybiotyków, chinolonów i sulfonamidów) obecnie nie są dostępne żadne regulacje unijne dotyczące zastosowanej aparatury pomiarowej oraz sposobu walidacji opracowanych metod. Z tego względu opracowaną w ZHS metodę poddano walidacji zgodnie z zaleceniami Decyzji Komisji Europejskiej 2002/657/WE odnoszącą się do wyników metod analitycznych i ich interpretacji dla żywności pochodzenia zwierzęcego (6).

W latach 2015-2017 w ZHS przeprowadzono badania pasz w kierunku wykrywania substancji przeciwbakteryjnych, w tym ASW w ramach kontroli urzędowej oraz w ramach badań usługowych. Badaniom przesiewową metodą mikrobiologiczną poddano łącznie 286 próbek pasz. W wyniku badania przesiewowego 126 próbek pasz skierowano do badania potwierdzającego metodą instrumentalną w kierunku obecności antybiotyków z grupy tetracyklin. Potwierdzające badanie chromatograficzne wskazało na obecność antybiotyków tetracyklinowych w 31 próbkach (24,6%) skierowanych do analizy potwierdzającej. Najczęściej stwierdzanymi antybiotykami w paszach były chlo-

rotetracyklina i doksycyklina. Pomimo iż w chwili obecnej w Polsce nie ma zarejestrowanych premiksów leczniczych z oksytetracykliną, w trzech poddanych badaniu potwierdzającym próbkach mieszanek paszowych potwierdzono jej obecność. Na rycinie 1 przedstawiono schemat opracowanej metody, z kolei na rycinach 2, 3 i 4 chromatogramy, odpowiednio: próbki ślepej paszy, próbki fortyfikowanej badanymi antybiotykami na poziomie 300 µg/kg oraz próbki niezgodnej, w której stwierdzono obecność doksycykliny. Na rycinie 5 zaprezentowano liczbę wyników niezgodnych dla badanych próbek mieszanek paszowych. Natomiast w tabeli 1 przedstawiono wartości stężeń, w jakich stwierdzono antybiotyki tetracyklinowe w próbkach badanych pasz w latach 2015-2017.

Badania pozostałości antybiotyków, zwłaszcza tych powszechnie stosowanych, takich jak antybiotyki tetracyklinowe, jest niezwykle ważne dla zapewnienia odpowiedniej jakości produkowanych pasz, żywności i produktów pochodzenia zwierzęcego. Dane dotyczące sprzedaży leków oraz liczba uzyskanych wyników niezgodnych potwierdzają, że tetracykliny są jedną z najczęściej stosowanych grup leków weterynaryjnych w leczeniu zwierząt. Badania wykonane w latach 2015-2017 potwierdzają przydatność opracowanej metody chromatograficznej do analizy pasz w kierunku wykrywania tetracyklin. Prowadzone badania wykazały, że w blisko 25% skierowanych do

Ryc. 2. SIM chromatogram ślepej próbki paszy

Ryc. 3. SIM chromatogram próbki paszy fortyfikowanej oksytetracykliną, tetracykliną, chlorotetracykliną i doksycykliną na poziomie 300 µg/kg

Ryc. 4. SIM chromatogram niezgodnej próbki paszy, w której stwierdzono doksycyklinę

Ryc. 5. Liczba uzyskanych wyników niezgodnych w latach 2015-2017

Tab. 1. Liczba próbek zbadanych, wyników dodatnich oraz zakresy stężeń dla oznaczonych tetracyklin w próbkach pasz

Rok	Liczba próbek skierowanych do badań potwierdzających	Liczba wyników dodatnich	Antybiotyk	Zakres stężeń [µg/kg]
2015	25	4	OTC	–
			TC	–
			CTC	–
			DC	< 300* - 4190,0
2016	40	4	OTC	2340,3
			TC	–
			CTC	< 300*
			DC	927,9-3955,0
2017	61	23	OTC	2761,7 - > 5000**
			TC	–
			CTC	< 300* - > 5000**
			DC	< 300* - > 5000**

Objaśnienia: *oznaczona ilość znajduje się poniżej zakresu roboczego metody; **oznaczona ilość znajduje się powyżej zakresu roboczego metody

badan potwierdzających próbkach pasz znajdowały się antybiotyki z grupy tetracyklin, głównie chloroteracyklina i doksycyklina.

Rosnące wymagania w zakresie bezpieczeństwa żywności i pasz sprawiają, że przed laboratoriami zajmującymi się kontrolą zawartości, jak i pozostałości leków weterynaryjnych stawiane są coraz większe wymagania analityczne. W związku z tym dąży się do wprowadzania metod chromatograficznych pozwalających na jednoznaczne potwierdzanie uzyskiwanych wyników metodami przesiewowymi (mikrobiologicznymi).

Piśmiennictwo

1. Babić S., Asperger D., Mutavdžić D., Horvat A. J. M., Kastelan-Macan M.: Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. *Talanta* 2006, 70, 732-738.
2. Ben W., Qiang Z., Adams C., Zhang H., Chen L.: Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2008, 1202, 173-180.
3. Blasco C., Di Corcia A., Picó Y.: Determination of tetracyclines in multi-specie animal tissues by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 2009, 116, 1005-1012.
4. Chopra J., Roberts M.: Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001, 65, 232-260.
5. Chung W. O., Young K., Leng Z., Roberts M. C.: Mobile elements carrying ermF and tetQ genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999, 44, 329-335.
6. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *O.J.* 2002, L 221, 8-36.
7. Friendship R.: Antimicrobial drug use in swine, [w:] Prescott J. F., Baggot J. D., Walker R. D., eds. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 3rd ed. Ames: Iowa State University Press 2000, s. 602-616.
8. Gajda A.: Pozostałości tetracyklin w produktach zwierzęcego pochodzenia – aspekty analityczne i występowanie zagrożeń. *Rozprawa doktorska*, Puławy 2014.
9. Gajda A., Posyniak A., Żmudzki J., Różańska H.: Występowanie tetracyklin w tkankach i produktach pochodzenia zwierzęcego – przyczyny i skutki. *Med. Weter.* 2012, 68, 650-655.
10. Giguere S., Prescott J. F., Baggot J. D., Walter R. D., Dolin P. M.: *Antimicrob.* 4th ed. Ther. Vet. Med. 2006, 231-239.
11. Grandos M., Encabo M., Compano R., Prat M. D.: Determination of tetracyclines in water samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *Chromatographia* 2005, 61, 471-477.
12. Guo L., Chen Y., Zhang L., Yang W., He P.: Development and validation of a liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for determination of chlortetracyclines, oxytetracyclines, tetracyclines, and doxycyclines in animal feeds. *J. AOAC Inter.* 2012, 95, 1010-1015.
13. Kania B. F.: *Praktyczna chemioterapia weterynaryjna*. Medyk, Warszawa 2005.
14. Kelch W. J., New J. C.: The reported use of drugs to prevent diseases in beef cattle in Tennessee. *Prev. Vet. Med.* 1993, 15, 291-302.
15. Kenneth A., McGowan A.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracycline liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19, 493-502.
16. Kowalski P.: Ilościowe oznaczanie chemioterapeutyków w materiale biologicznym pochodzenia zwierzęcego za pomocą elektroforezy kapilarnej z uwzględnieniem najwyższej dopuszczalnej pozostałości. *Rozprawa habilitacyjna*, Gdańsk 2008, PL ISSN 0303-4135.
17. Krasucka D., Cybulski W., Klimowicz A.: Ocena stosowania substancji przeciwdrobnoustrojowych u świń i bydła w Polsce na podstawie badań sondażowych w 2010 roku. *Med. Weter.* 2012, 68, 106-109.
18. Kucers A., Crowe S. M., Grayson M. L., Hay J. F.: *The Use of Antibiotics. A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, and Antiviral Drugs*. Butterworth and Heinemann, Oxford 1997.
19. Oka H., Ikai Y., Ito Y., Hayakawa J., Harada K., Suzuki M., Odani H., Maeda K.: Improvement of chemical analysis of antibiotics XXIII: identification of residual TCs in bovine tissues by electrospray HPLC-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1997, 693, 337-344.
20. Opaliński K. W.: Potencjalne zagrożenia dla środowiska związane z wykorzystaniem w hodowli (chowie) zwierząt produktów paszowych oraz niezbędne minimum badań pozwalające na stwierdzenie, czy ich stosowanie będzie wywierało na środowisko niekorzystny wpływ. *Centrum Badań Ekologicznych PAN*, Warszawa 2003.
21. Pijpers A., Schoevers E. J., Haagsma N., Verheijden J. H.: Plasma levels of oxytetracycline, doxycycline, and minocycline in pigs after oral administration in feed. *J. Anim. Sci.* 1991, 69, 4512-4522.
22. Prescott J. F., Baggot J. D., Walker R. D.: *Antimicrobial therapy in Veterinary Medicine*. Iowa State University Press, Ames 2000, 277.
23. Reverte S., Borrull F., Pocurull E., Marce R. M.: Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2003, 1010, 225-232.
24. Roliński Z.: *Farmakologia i farmakoterapia weterynaryjna*. PWRiL, Warszawa 2008.
25. Różańska H., Lewtak-Pilat A.: Metody przesiewowe wykrywania pozostałości antybiotyków w żywności. *Życie Wet.* 2011, 86, 59-61.
26. Samanidou V. F., Nikolaidou K. I., Papadoyannis I. N.: Advances in Chromatographic Analysis of Tetracyclines in Foodstuffs of Animal Origin – A Review. *Sep. Purif. Rev.* 2007, 36, 1-69.
27. Schnappinger D., Hillen W.: Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch. Microbiol.* 1996, 165, 359-369.
28. Similack J. D., Wilson W. R., Cockerill F. R.: Tetracyclines, chloramphenicol, erythromycin, clindamycin, and metronidazole. *Mayo Clin. Proc.* 1991, 66, 1270-1280.
29. Tanner A. C.: Antimicrobial drug use in poultry, [w:] Prescott J. F., Baggot J. D., Walker R. D. (red.): *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 3rd ed. Ames, IA: Iowa State University Press 2000, s. 637-655.
30. Tsai W.-H., Huang T.-C., Huang J.-J., Hsue Y.-H., Chuang H.-Y.: Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 2263-2269.
31. USP DI: Drug information for the health care professional. Vol. I. 13th ed. Rockville, MD, US Pharmacopeial Convention 1993, 2610-2620.
32. Williams D. N.: Tetracyclines, [w:] Gorbach S. L., Bartlett J. G., Blacklow N. R. (red.): *Infectious Diseases*. 2nd ed. Saunders, Philadelphia 1998, s. 227-231.
33. Xia W., Nielsen P., Gyrol-Hansen N.: Oxytetracycline in cattle: a comparison between a conventional and a long-action preparation. *Acta Vet. Scand.* 1983, 24, 120-128.

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