

ZDZISŁAW GLIŃSKI, JERZY RZEDZICKI  
Lublin

## Wpływ czasu i temperatury na stabilność Biseptolu, Trimerazinu, Tribriksenu i Trimetoprimu w miodzie i w syropie leczniczym

Skuteczność leczenia zgnilca złośliwego pszczoł przy pomocy antybiotyków i sulfonamidów zależy od czasu utrzymywania się stężenia terapeutycznego tych preparatów w organizmie czerwiu. Czas ten odgrywa szczególnie ważną rolę w przypadku leków o działaniu bakteriostatycznym, jakimi są sulfonamidy.

U pszczoł, u których leki są stosowane głównie enteralnie jako dodatek do syropu cukrowego, syty względnie cukru, istotną rolę odgrywa dobór odpowiedniego stężenia środka leczniczego i jego stabilność w materiale stosowanym do podkarmiania pszczoł. Z drugiej strony ze względów sanitarno-higienicznych środki lecznicze, które przechodzą do miodu winny względnie szybko ulegać inaktywacji w miodzie przeznaczonym do konsumpcji (2). Spełnienie tych warunków wymaga nie tylko doboru odpowiedniego stężenia preparatów leczniczych w materiale stosowanym do podkarmiania, ale również wyboru odpowiedniego okresu ich stosowania tj. przed, w czasie, względnie po okresie głównego pożytku.

Istotny limitujący wpływ na stabilność antybiotyków i sulfonamidów, oprócz rodzaju pokarmu w jakim są one stosowane, odgrywa temperatura. Katznelson i Jamieson (10, 11) wykazali, że aktywność sulfatiazolu utrzymuje się przez dłuższy okres czasu w syropie leczniczym w porównaniu do miodu. Obserwacje Landerkina i Katznelsona (4), Gilliama i Argauera (3) oraz Gochnauera i Blanda (6) nad stabilnością antybiotyków w miodzie, ze szczególnym uwzględnieniem oksytetracykliny, w różnym zakresie temperatur wskazują na ich szybką inaktywację w temperaturze 25—34°C.

W ostatnich latach bardzo zachęcające wyniki w terapii wielu schorzeń zakaźnych u ludzi i zwierząt uzyskano po stosowaniu sulfonamidów z trimetoprimem (TMP) (1, 9, 15). Dzięki nim uzyskano, oprócz spotęgowanego działania przeciwbakteryjnego, również efekt bakteriobójczy i szersze spektrum działania antibakteryjnego przy niskim stopniu narastania oporności szczepów bakteryjnych.

Stwierdzono również, że szczepy *Bac. larvae* odporne na sulfatiazol i polisulfamid — preparaty stosowane powszechnie w profilaktyce i terapii zgnilca złośliwego — są wrażliwe na połączenia sulfonamidów z TMP: Biseptol, Tribriksen, Trimerazin oraz TMP (5). Minimalne stężenie hamujące tych preparatów

dla *Bac. larvae* wynosi dla Biseptolu 0,5—12,5 µg/ml, Tribriksenu i Trimerazinu 6,25—50,0 µg/ml i dla TMP 1,61—12,5 µg/ml. W organizmie czerwiu i pszczoł stężenie terapeutyczne Biseptolu i Trimerazinu uzyskano po dwukrotnym podkarmieniu rodzin 50% syropem leczniczym zawierającym Biseptol w stężeniach 100 i 500 µg/ml i Trimerazin w stężeniu 500 µg/ml. Biseptol, Trimerazin i Tribriksen w stężeniach 100 i 500 µg/ml nie wywierały przy tym ujemnego wpływu na robotnice, czerw i czerwienie matek (4).

W przedstawionej pracy określono wpływ temperatury oraz czasu jej działania na stabilność Biseptolu, Trimerazinu, Tribriksenu i Trimetoprimu w miodzie i w 50% syropie cukrowym. Badania tego typu są konieczne przy wprowadzaniu sulfonamidów potęgowanych TMP do profilaktycznego i leczniczego ich stosowania przy zgnilcu złośliwym.

### Materiał i metody

W badaniach stosowano następujące preparaty:

1. Biseptol — 480 (Pabianickie Zakł. Farm. „Polfa”) o składzie TMP i sulfamethoxazol w stosunku 1:50.
2. Trimerazin (Grodziskie Zakł. Farm. „Polfa”) o składzie TMP i sulfamerazyna w stosunku 1:20.
3. Tribriksen (Wellcome Found. Ltd.) o składzie TMP i sulfadiazyna w stosunku 1:5.
4. Trimetoprim (2,4-dwuamino-5/3,4,5 trójmetylobenzyl/-pirymidyna) Wellcome Found. Ltd.

Stabilność badanych preparatów oznaczono w miodzie wielokwiatowym oraz w 50% syropie cukrowym zawierającym 250 µg aktywnych składników/ml po przetrzymywaniu w temperaturze 0°C, 18°C i 34°C przez okres 40 tygodni. Do rozpuszczenia stosowano mieszaninę 99% etanol — 4N kwas solny — woda (3:1:16), zaś do rozcieńczeń wodę destylowaną. Oznaczenia wykonywano w odstępach tygodniowych przez okres 2,5 miesiąca, co 2 tygodnie przez okres 4 miesięcy, a następnie po 30, 35 i 40 tygodniach.

Stabilność oznaczono metodą mikrobiologiczną wg Heifetz i wsp. (8) z użyciem podłoża Mueller-Hintona i szczepu R 260 *Sarcina lutea*. Inokulum stanowiło 10<sup>4</sup> jedn. tworzących kol. *S. lutea*/ml stałego podłoża. Minimalne stężenie hamujące (MIC) dla użytego szczepu wynosiło dla TMP 0,12 µg/ml, Tribriksenu i Trimerazinu poniżej 1,25 µg/ml i Biseptolu 0,1 µg/ml. Wielkość stref zahamowania odczytywano po 18 i 24 godz. inkubacji 37°C. Zawartość badanych preparatów w miodzie i w syropie obliczono z krzywej standardowej wg Grove i Randalla (7).

Próbki miodu po rozcieńczeniu buforem fosforanowym o pH 7,8 w stosunku 1:10 oraz próbki syropu nierozcieńczonego ogrzewano przed oznaczeniem na łaźni wodnej w temp. 75°C przez 40 min. (14).

Kontrole stanowiły miód i syrop bez dodatku leków, oraz miód i syrop do którego przed oznaczeniem dodano leki w stężeniach równych podwójnej wartości

MIC dla *S. lutea* R 260. Wszystkie oznaczenia wykonano trzykrotnie, zaś na rycinach podano średnie z trzech kolejnych oznaczeń.

Wyniki

Badania nad wpływem temperatury i czasu na aktywność Biseptolu, Trimerazinu, Tribriksenu i TMP w miodzie i w syropie cukrowym przeprowadzono na podłożu Mueller—Hintona wg metody Heifetza i wsp., która cechuje się dużą czułością i umożliwia uzyskanie powtarzalnych wyników. Ogrzewanie próbek przed oznaczeniem powodowało inaktywację substancji o działaniu antybakteryjnym zawartych w miodzie, a tym samym eliminowało ich hamujący wpływ na szczep *S. lutea* stosowany w oznaczeniach (13, 14).

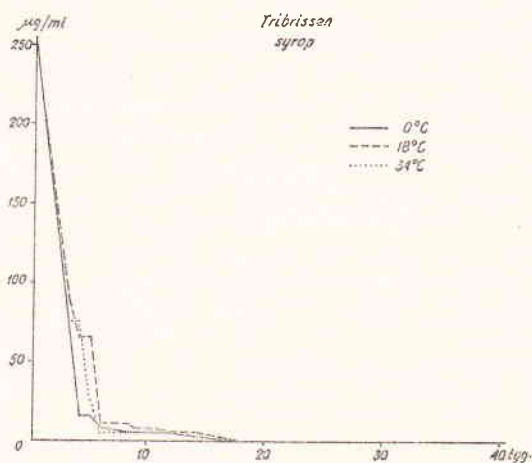
Aktywność wszystkich czterech preparatów w miodzie w badanym zakresie temperatur nie zmieniała się przez okres co najmniej 2 tygodni. Utrzymywała się ona na poziomie wyjściowym najdłużej w przypadku Trimerazinu (do 6 tyg. w 34°C, do 5 tyg. w 0 i 18°C), krócej w przypadku TMP (3 tyg. w badanym zakresie

temperatur) i Biseptolu (3 tyg. w 0°C), najkrócej w przypadku Tribriksenu.

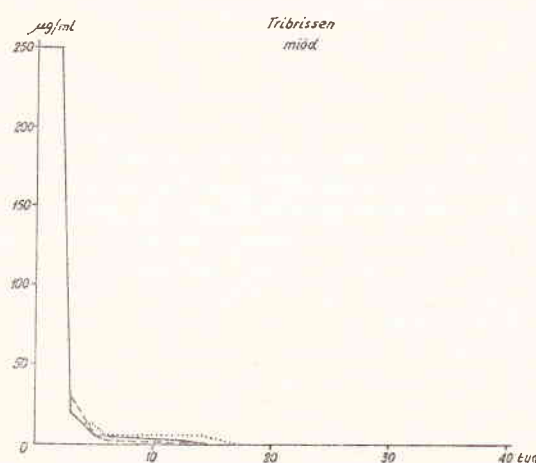
W miodzie najniższą stabilność wykazywał Tribriksen (ryc. 1), którego poziom w 0 i 34°C wynosił po 3 tyg. 20 µg/ml, zaś w 18°C 33 µg/ml. Aktywność Tribriksenu obniżyła się do 0 po 14 tyg. w 0 i 18°C i po 15 tyg. w 34°C.

Poziom Biseptolu (ryc. 2) w miodzie wykazywał nieznaczny powolny spadek między 3 i 5 tyg., a następnie obniżał się szybko osiągając w 18°C i 34°C wartość 25—31 µg/ml po 6 tygodniach. Dalszy powolny spadek stężenia tego preparatu (do 22 i 19 µg/ml) miał miejsce w 18°C i 34°C między 6 i 10 tyg. W temperaturze 0°C maksymalne obniżenie stężenia Biseptolu w miodzie wystąpiło między 6—10 tyg. (z 181 µg/ml do 20 µg/ml).

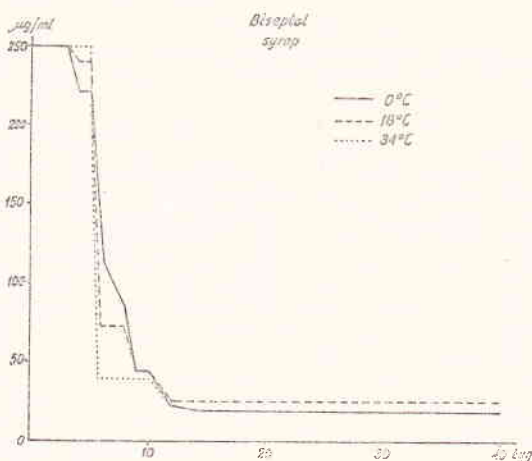
Aktywność TMP (ryc. 3) malała bardzo szybko między 5 i 6 tyg. 50-cio procentowy spadek aktywności wystąpił między 5—6 tyg. w 0°C i 18°C, zaś w 34°C między 6 i 7 tyg., natomiast 75% aktywności tego preparatu w miodzie stwierdzono w 0°C między 14—17 tyg., w 18°C między 9—10 tyg. i w 34°C między



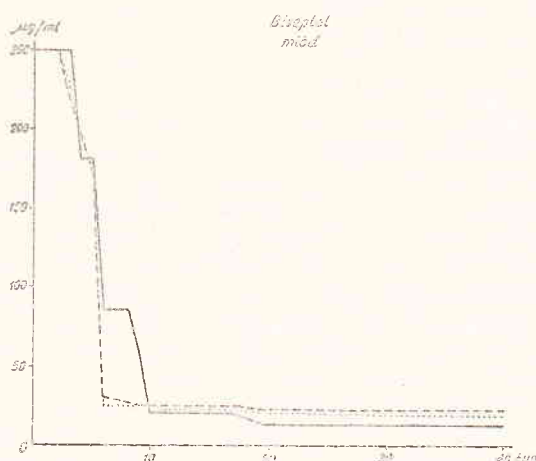
Ryc. 5. Aktywność Tribriksenu w syropie cukrowym w temperaturze 0°C, 18°C i 34°C



Ryc. 1. Aktywność Tribriksenu w miodzie w temperaturze 0°C, 18°C i 34°C



Ryc. 6. Aktywność Biseptolu w syropie cukrowym w temperaturze 0°C, 18°C i 34°C



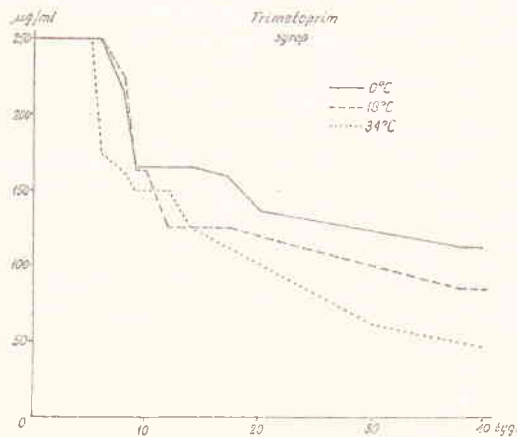
Ryc. 2. Aktywność Biseptolu w miodzie w temperaturze 0°C, 18°C i 34°C

7—8 tyg. Po 40 tyg. obserwacji aktywność TMP w miodzie w 0°C wynosiła 60 µg/ml, 18°C — 25 µg/ml i w 34°C — 30 µg/ml.

W przypadku Trimerazinu 50% obniżenie aktywności w miodzie wystąpiło między 6—7 tyg. w 34°C, między 10—12 tyg. w 18°C i między 9—10 tyg. w 0°C. Przez dalsze 28—30 tyg. jego aktywność w miodzie w 0°C i 18°C obniżała się nieznacznie (ryc. 4).

Poziom Biseptolu obniżał się do 50% wartości wyjściowej (ryc. 6) między 5 i 6 tyg., osiągając wartość 22—25 µg/ml między 10—12 tyg. Po 40 tyg. poziom Biseptolu w badanym zakresie temperatur wahał się w granicach 12—22 µg/ml.

Spadek aktywności Trimerazinu do 50% wartości wyjściowej stwierdzono w syropie w 0°C i 34°C po 40 tyg. (ryc. 7), zaś w 18°C po 10—



Ryc. 8. Aktywność Trimetoprimu w syropie cukrowym w temperaturze 0°C, 18°C i 34°C

W syropie cukrowym aktywność Trimerazinu i TMP w badanym zakresie temperatur nie ulegała zmianie przez okres 5 tyg., Biseptolu przez okres 3 i Tribriksenu przez okres 2 tygodni.

Najszybciej obniżał się poziom Tribriksenu (ryc. 5), który po 3 tyg. wynosił 1/3 aktywności wyjściowej, zaś po 6 tyg. wahał się w granicach 5—10 µg/ml. Następnie utrzymywał się on na nieznacznie obniżonym poziomie do 14 tyg. obserwacji. Po 17 tyg. nie stwierdzono jego obecności w syropie.



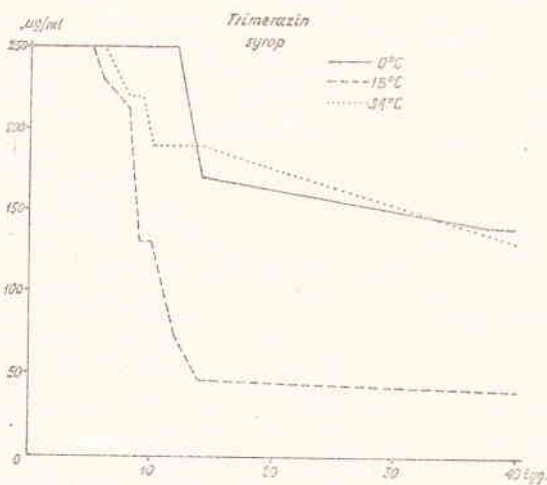
Ryc. 3. Aktywność Trimetoprimu w miodzie w temperaturze 0°C, 18°C i 34°C

12 tyg. Po 40 tyg. obserwacji w 18°C poziom Trimerazinu wynosił 40 µg/ml.

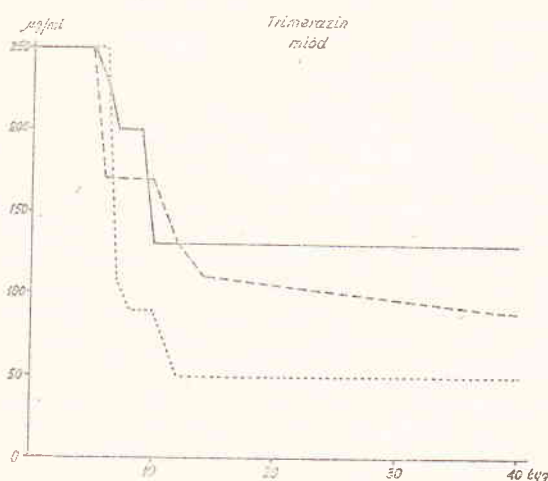
Najbardziej równomierny spadek aktywności w syropie wykazał TMP (ryc. 8). Pięćdziesiąt procent aktywności wyjściowej notowano w 0°C po 34 tyg., 18°C po 10 tyg. i 34°C po 14 tyg. Po 40 tyg. okresie badań najwyższe stężenie TMP występowało w syropie w 0°C (112 µg/ml), zaś najniższe w 34°C (48 µg/ml).

### Omówienie wyników

Badania przeprowadzono z miodem i z syropem z dodatkiem 250 µg/ml Biseptolu, Trib-



Ryc. 7. Aktywność Trimerazinu w syropie cukrowym w temperaturze 0°C, 18°C i 34°C



Ryc. 4. Aktywność Trimerazinu w miodzie w temperaturze 0°C, 18°C i 34°C

rissenu, Trimerazinu lub TMP. Zastosowana dawka w przypadku Biseptolu była o 150% wyższa, zaś w przypadku Trimerazinu zbliżona do dawki, po której uzyskiwano stężenie terapeutyczne tych preparatów równocześnie w organizmie czerwiu i pszczoł robotnic (4). Poziom TMP w miodzie i syropie przewyższał 5-krotnie jego zawartość w Tribriessenie, 20-krotnie w Trimerazynie i 50-krotnie w Biseptolu.

Stabilność oznaczono w 0°C — temperatura przechowywania miodu w chłodni, 18°C — temperatura miodu w plastrach oraz temperatura przechowywania miodu w handlu i w warunkach domowych i 34°C — temperatura gniazda i syropu stosowanego do podkarmiania rodzin.

Badania wykazały, że zarówno w miodzie jak i w syropie leczniczym w badanym zakresie temperatur wszystkie badane preparaty cechują się dużą stabilnością. Ich aktywność w miodzie w 18°C i 34°C utrzymywała się przy tym krócej aniżeli w syropie. Wydaje się, że obserwowany spadek ich aktywności w miodzie może wiązać się z jednej strony z inaktywacją sulfonamidów pod wpływem enzymów zawartych w miodzie, z drugiej strony z występowaniem w miodzie inhibitorów sulfonamidów.

Ze względów praktycznych najbardziej korzystne jest uzyskanie i utrzymanie wysokiego stężenia leków w materiale stosowanym do podkarmiania, natomiast ze względów sanitarnych szybka ich inaktywacja w miodzie, szczególnie w 18°C i 34°C. Pierwszy postulat spełniają wszystkie badane preparaty, zaś drugi Tribriessen, a w nieco mniejszym stopniu Biseptol oraz TMP i Trimerazyn. W związku z faktem, że stężenie terapeutyczne w organizmie czerwiu i pszczoł uzyskano po stosowaniu syropu leczniczego z dodatkiem Biseptolu w dawkach niższych niż 250 µg/ml, Trimerazynu w zbliżonej dawce, zaś w przypadku Tribriessenu nawet po dawce 500 µg/ml stężenia tego nie uzyskiwano (4), wydaje się, że Biseptol i Trimerazyn mogą zostać wykorzystane w terapii zgnilca złośliwego.

Uwzględniając stabilność Biseptolu i Trimerazynu w syropie leczniczym i względnie szybkość ich inaktywację w miodzie w 18°C i 34°C przy jednoczesnym utrzymywaniu się ich aktywności przez cały okres badania, wydaje się celowe postulowanie stosowania tych leków przed okresem oraz po okresie głównego pożytku. Stosowanie Biseptolu i Trimerazynu w okresie głównego pożytku, może spowodować przedostanie się pewnych ich ilości do miodu przeznaczonego do konsumpcji.

Godnym uwagi jest fakt, że po 14—17 tyg. działania temp. 18°C i 34°C nie stwierdza się zupełnie w miodzie Tribriessenu, zaś po 40 tyg., aktywność Biseptolu w miodzie jest niewielka. Uzyskane wyniki nie pokrywają się z obserwacjami Katznelsona i Jamiesona (10, 11)

nad stabilnością sulfonamidów, a szczególnie sulfatiazolu, w miodzie. Wg tych autorów sulfonamidy nie tracą aktywności w miodzie przez okres co najmniej 3 lat. Autorzy ci oznaczali jednakże całkowitą pozostałość sulfatiazolu w miodzie, a nie jego aktywność antybakteryjną.

### Wnioski

1. Biseptol, Trimerazyn, Tribriessen i Trime-toprim nie zmieniały aktywności w miodzie i w 50% syropie cukrowym przez okres co najmniej 2 tyg. w 0, 18 i 34°C.

2. W badanym zakresie temperatur Biseptol, Trimerazyn i TMP wykazywały większą stabilność w syropie cukrowym w porównaniu do miodu.

3. Biseptol i Trimerazyn mogą być stosowane profilaktycznie i leczniczo w przypadkach zgnilca złośliwego przed oraz po okresie głównego pożytku.

### Piśmiennictwo

1. Burnett M., Bushby S. R. M.: Vet. Rec. 87, 43, 1970.
2. Dotynowa C. A., Butko M. P., Smirnow A. M.: Veterinaria 4, 113, 1970.
3. Gilliam M., Arguer R. J.: J. Invertebr. Pathol. 26, 383, 1975.
4. Gliński Z., Rzedzicki J., Woźnica J.: Pol. Arch. vet. w druku.
5. Gliński Z., Rzedzicki J.: Pol. Arch. vet. w druku.
6. Gochmauer T. A., Blaund S. E.: J. Apicult. Res. 13, 153, 1976.
7. Grove D. C., Randall A.: Medical Encyclopedia INC, NY, 1955.
8. Heifetz C. L., Chudobski A., de Carlo M. O., Fisher M. W.: Appl. Microbiol. 21, 893, 1971.
9. Jurgiel K., Sobczyk J.: Nowości Wet. 5, 29, 1975.
10. Katznelson H., Jamieson C. A.: J. Agric. Sci. 34, 120, 1954.
11. Katznelson H., Jamieson C. A.: Gleaning Bee Cult. 83, 272, 1955.
12. Landerkin G. B., Katznelson H.: Appl. Microbiol. 5, 152, 1957.
13. Labie P.: CR. Acad. Sci. Paris 248, 455, 1959.
14. Precausta J. Thèse Med. Vét. Toulouse 1960.
15. Rehm W. F., White G.: Vet. Rec. 87, 38, 1970.

Adres autora: doc. dr habil. Dżyzław Gliński, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin.

Глиньски З., Жедзицки Е. — Исследования влияния времени и температуры на стабильность бисептола, тримеразина, трибриссена и триметоприма в меде и в лечебном сиропе.

Исследовали влияние времени и температуры на стабильность бисептола, тримеразина, трибриссена и триметоприма в меде и сахарном сиропе, удерживаемом 40 недель в темп. 0°C, 18°C и 34°C. Исследования показали, что в меде в исследуемом диапазоне температур активность бисептола и трибриссена не изменяется в течение 2 недель, триметоприма — в течение 3 недель и тримеразина — в течение 5 недель. В лечебном сиропе активность тримеразина и триметоприма уменьшается по истечении 5 недель, бисептола — по истечении 3 недель и трибриссена — по истечении 2 недель. Как в меде, так и в лечебном сиропе не была обнаружена активность трибриссена. Активность бисептола в меде по истечении 40 недель составляла 12—19 µg/ml, в сиропе — 20 µg/ml, тримеразина в меде — 50—130 µg/ml, в сиропе — 40—140 µg/ml, триметоприма в меде — 25—60 µg/ml, в сиропе — 43—112 µg/ml. Бисептол и тримеразин могут применяться в профилактике и лечении злокачественного гнильца пчел вне периода главного взятка.

Gliński Z., Rzedzicki J. — **Studies on the influence of time and storage temperature on the stability of Biseptol, Trimerazin, Tribriksen and Trimethoprim in honey and medicated sugar syrup.**

There was determined the influence of time and temperature on the stability of Biseptol, Trimerazin, Tribriksen and Trimethoprim in honey and medicated sugar syrup stored for 40 weeks at 0, 18 and 34°C. It was found that in honey at the above ranges of temperatures the activity of Biseptol and Tribriksen was stable for 2 weeks, Trimethoprim for 3 weeks and

Trimerazin for 5 weeks. In medicated syrup the activity of Trimerazin and Trimethoprim decreased after 5 weeks, Biseptol after 3 weeks and Tribriksen after 2 weeks. The activity of Tribriksen in honey and sugar syrup disappeared completely after 17 weeks. The activity of Biseptol in honey after 40 weeks of storage was 12—19 µg/ml, in syrup 20 µg/ml; Trimerazin in honey 50—130 µg/ml, in syrup 40—140 µg/ml; Trimethoprim in honey 25—60 µg/ml, in syrup 43—112 µg/ml. Both Biseptol and Trimerazin could be applied in prevention and therapy of AFB after a main nectar flow.

## PROFILAKTYKA I HIGIENA PRODUKCJI ZWIERZĘCEJ

MICHAŁ MAZURKIEWICZ

### Najczęstsze niedobory witamin w hodowli wielkostadnej drobiu\*)

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR we Wrocławiu

Stały postęp w zakresie technologii chowu drobiu oraz profilaktyki swoistej sprawił, że zasadnicze straty w produkcji drobiarskiej są obecnie następstwem czynników niezakaźnych (8, 55, 57). Spośród nich bardzo istotną rolę odgrywają choroby z niedoboru witamin, składników mineralnych oraz złej jakości skarmianych pasz.

Według Edwardsa (14) wzrostu częstotliwości występowania niedoborów witaminowych w przemysłowej hodowli drobiu należy upatrywać w następujących czynnikach:

- zwiększeniu tempa wzrostu ptaków oraz współczynnika wykorzystania przez nie paszy,
- opracowaniu i wprowadzeniu „mniej kosztownych” receptur pasz, polegających na wykluczeniu z nich składu surowców o dużej zawartości witamin (drożdże, produkty chodzenia zwierzęcego i rybne),
- długim okresie składowania i magazynowania surowców, jak też i gotowych mieszanek paszowych,
- zakażeniu bakteryjnym i grzybiczym mieszanek paszowych, w konsekwencji czego dochodzi do wytwarzania antymetabolitów lub enzymów, które są zdolne rozkładać niektóre witaminy z grupy B oraz przyspieszają proces jęczenia tłuszczów,
- wprowadzeniu do paszy dla drobiu znacznego odsetka tłuszczów, co przy braku odpowiednich antyoksydantów i witaminy E prowadzi do ich jęczenia i tym samym rozkładu zawartych w paszy witamin,
- zmianach technologii, stosowanych przy wytwarzaniu niektórych surowców paszo-

wych (np. przy ekstrakcji mechanicznej soji poziom kwasu foliowego w mączce sojowej wynosi — 6,6 mg/kg, a po zastosowaniu do ekstrakcji rozpuszczalników organicznych wartość ta zostaje obniżona do 0,7 mg/kg).

W świetle natomiast obserwacji krajowych (6, 22, 32, 73) na niedobory witaminowe w hodowli wielkotowarowej drobiu rzutuują: zbyt długi okres przechowywania paszy, obecność w paszy zjełczałych tłuszczów, zbyt niski poziom witamin w skarmianej paszy, jak również niedokładne wymieszanie ze sobą jej komponentów.

Grabowski i wsp. (22) wykazali, że w mieszance DK Starter już po 3-4 miesięcznym okresie przechowywania poziom witaminy A spadł do 0, beta karotenu — 30%, a witaminy E — obniżył się około 65%. Z okresem przechowywania paszy wiąże się również bardzo ściśle stopień świeżości zawartego w niej tłuszczu. Jak wynika z badań Bohosiewicza i wsp. (6), wykonanych w latach 1967-1974 aż 52,5 do 74,1% badanych mieszanek dla drobiu cechowała obecność zjełczałego tłuszczu.

Niedobór witamin może zaistnieć przy skarmianiu pasz wysokoenergetycznych (zapotrzebowanie na witaminy wzrasta wówczas średnio około 10—20%, w tym na witaminy A, D<sub>3</sub>, E i H nawet do 100%); pasz o podwyższonej w nich zawartości białka (występuje zwiększone zapotrzebowanie na witaminy A, B<sub>6</sub>, H) oraz w warunkach oddziaływania na drób czynników stresowych (57). Według Mazurczaka (41), w warunkach niekorzystnych (wysoka lub niska temperatura, stany chorobowe, szczepienia ochronne itp.) należy zwiększyć w paszy dla dro-

\*) Referat wygłoszony na Sesji Naukowej PTNW, Sekcja Kliniczna, Wrocław, 27.XI.1976 r.