

WANDA BORZEMSKA, EWA KARPIŃSKA, PIOTR SZELESZCZUK, MARIAN BINEK*,
ELŻBIETA MALICKA**, GRAŻYNA KOSOWSKA, HENRYK MALEC***

Ocena toksyczności stymulatorów wzrostu w teście biologicznym na zarodkach kurzych*)

Zakład Chorób Drobiu Katedry Epizootiologii,

*Katedra Mikrobiologii i **Katedra Patologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

***Zakład Konsultingu i Usług Drobiarskich, ul. Cyklamienów 14, 04-798 Warszawa

Summary

Evaluation of toxicity of stimulators in a biological test on chick embryos

Three antibiotics (avoparcin, flavomycin and virginiamycin) used as fodder additives for poultry were compared. The antibiotics were injected into the yolk sac of six-day-old chick embryos. Gross lesions in dead embryos, hatching, total protein content, activity of A1AT, AspAT, AP, BUN and uric acid were examined in chickens. Virginiamycin appeared to be the most toxic for chick embryos. Avoparcin and flavomycin damaged liver and kidneys in dead embryos and affected down in hatched chickens. Avoparcin decreased hatching by 16.7%. A decreased serum activity of AspAT, BUN ($p < 0.05$) and uric acid ($p < 0.01$) may reflect strong disturbances of cell metabolism. Flavomycin disturbed the hatching schedule and lowered hatching by 24.71%. The increased A1AT ($p < 0.05$) in chicken sera reflects liver damage.

Próby biologiczne przeprowadzane na zarodkach ptaków należą do czułych dzięki braku możliwości wydalania toksyn na zewnątrz jaja. Metody te używano między innymi do testowania kokcydiostatyków (2), wykrywania toksyn pasożytów (7), oceny teratogennego wpływu toksyn grzybiczych (5, 19), zanieczyszczeń paszowych (3), a także chemicznych dodatków do pasz (18).

W obszernej pracy Verretta i wsp. (18) nie uwzględniono antybiotyków stymulujących wzrost, które są istotnym składnikiem paszy. Z wielu powodów preparaty te powinny być wymieniane przynajmniej co 20 lat (4). Z 5 dopuszczonych i zarejestrowanych w kraju stymulatorów Zn-Bacytacyna już ulega przedawnieniu, natomiast avilamycyna produkt fermentacji *Streptomyces viridochromogenes* jest preparatem najnowszej generacji. Z pozostałych używane są awoparcina, antybiotyk glikopeptydowy otrzymany w procesie fermentacji szczepu *Streptomyces candidus* (8, 9), flavomycyna antybiotyk glikolipidowy wytwarzany przez szczep *Streptomyces bambergenensis* i *Streptomyces ghanaensis* (4, 16, 17) oraz wirginiamycyna – peptolipidowy antybiotyk syntetyzowany przez *Streptomyces virginiae* (1, 13, 14, 15). Wszystkie wymienione związki spełniają wymagania stawiane antybiotekom paszowym (4, 12). Stosowane zgodnie z przeznaczeniem uznane są za bezpieczne dla ptaków, środowiska i produktu spożywczego. Badania na płodach ssaków nie wykazały działania teratogennego (1, 8, 9).

Celem badań była porównawcza ocena trzech stymulatorów wzrostu w zaproponowanym teście biologicznym na zarodkach kurzych dla wskazania antybiotyku do wymiany w pierwszej kolejności.

Materiał i metody

Do testów porównawczych użyto 3761 6-dniowych zarodków kurzych. Jaja pochodziły od kur Starbro w 24 tyg. nieśności i leżone były w aparacie Reform Poldrob D-108 i Atlas 180.

Grupę I stanowiło 720 zarodków, którym w ostrym końcu jaja wstrzyknięto awoparcinę do białka gęstego wg metody podanej wcześniej (3). Do każdego jaja podano 10-krotną dawkę maksymalną wg przyjętych ustaleń (4) przeznaczoną dla piskląt. Antybiotyk zawieszono w 0,1 ml PBS z przeznaczeniem do spożycia przez zarodki *per os* między 12-14 dniem embriogenezy.

Grupę II stanowiły 723 zarodki, które w analogiczny sposób otrzymały flavomycynę. Do grupy III zaliczono 722 zarodki, którym analogicznie podano wirginiamycynę. Grupa IV obejmowała 718 zarodków, którym wstrzyknięto 0,1 ml PBS dla kontroli strat spowodowanych zabiegiem. Grupa V (kontrola) objęła 878 zarodków i była przeznaczona do oceny zdolności wylęgowej jaj. Na czas zabiegu została schłodzona do temperatury pokojowej.

Przekładu do komory klujnikowej dokonano w 456 godzinie inkubacji po nakłuciu pierwszych jaj. Diagram legu i klucia (liczbę wylęglých piskląt lub naklutyh skorup w danym przedziale czasu) przeprowadzono co 6 godz. wg metod podanych wcześniej (10, 11). Wylęg uznano za zakończony w 504 godz. inkubacji. W obu diagramach proces wylęgania i nakluwania skorup rozpatrywano w 3 etapach: 1. do wylęgu lub naklucia pierwszych 10% jaj; 2. etap główny najlepiej synchronizowany, w którym nakluwa się lub wylęga nie mniej niż 50% piskląt; 3. w którym nakluwają się i wylęgają ostatnie pisklęta. Wyniki wylęgu, brakowanie piskląt oraz zamieranie zarodków w komorach legowej i klujnikowej podano w procentach w stosunku do nakładu 6-dniowych zarodków. Zarodki zmarłe podano rutynowej analizie embriopatologicznej metodą stosowaną poprzednio (3). Opis najbardziej charakterystycznych zmian anatomopatologicznych uzupełniono liczbową dokumentacją powtarzających się zmian w poszczególnych zarodkach, którą opracowano statystycznie metodą χ^2 . Dane liczbowe przedstawiono w procentach w stosunku do nakładu zarodków.

Masę ciała wylęglých piskląt określono w chwili wylęgu. Równocześnie od 10 piskląt z grup I, II, III i IV pobrano surowicę i oznaczono standardowymi metodami (6) poziom białka całkowitego (g/dl), aminotransferazę alaninową – A1AT (IU/L), aminotransferazę asparaginową – AspAT (IU/L), fosfatazę alkaliczną (IU/dl), mocznik – BUN (mg/dl) i kwas moczowy (mg/L). Wyniki badań biochemicznych oceniono statystycznie testem t-Studenta.

Wycinki wątroby i nerki wylęglých piskląt poddano kontroli histopatologicznej. Skrawki utrwalono w 5% formalinie i barwiono metodą H-E.

Wyniki i omówienie

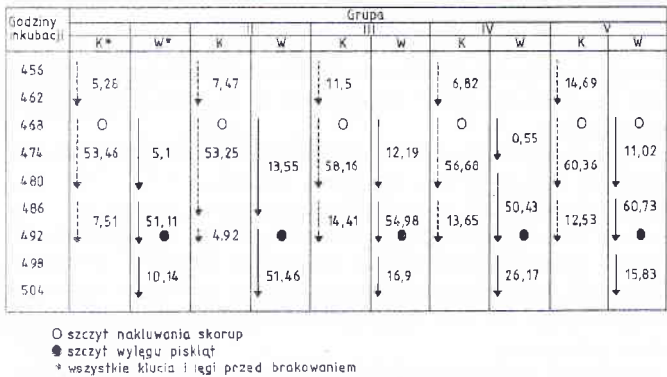
Podanie antybiotyków do białka w celu spożycia ich przez zarodki drogą *per os* miało stanowić najbezpieczniejszą drogę podania w porównaniu do dożótkkowej stosowanej przez Verrett i wsp. (18) dla dodatków paszowych.

*) Praca finansowana przez KBN (proj. bad. nr 50102110023).

Tab. 1. Zamieranie zarodków, brakowanie, wylęg (%) i masa ciała piskląt (g)

Grupa	Zamieranie zarodków			Pisklęta			
	po zabiegu	w komorze		brakowanie	wylęg	masa ciała	
		lęgowej	klujnikowej			$\bar{x}$	SD
I	6,53	2,50	24,72**	9,72**	56,53**	41,80	3,26
II	7,19	5,39**	22,41**	17,02**	47,99**	46,50	3,71
III	2,22	4,57**	9,14	3,60	80,47	46,47	4,49
IV	6,27	2,37	14,21*	4,45	72,70**	44,20	3,41
V	0,23 ^x	2,05	10,14	5,35	82,23	45,93	3,63

Objaśnienia: * – różnica istotna w porównaniu do kontroli przy $p \leq 0,05$, ** – przy $p \leq 0,01$, ^x – zarodki zmarłe 6–7 dnia inkubacji.



Ryc. 1. Diagram klucia i wylęgu (%)

Z badań wynika, że śmiertelność zarodków może być równie wysoka (tab. 1), a sam zabieg obciąża mniej próbę biologiczną niż iniekcja dożyłkowa (2, 5).

W ocenie porównawczej badanych preparatów tylko wirginiamycyna (grupa III) nie obniżyła wskaźników wylęgu (tab. 1), które wynosiły 80,47% (w grupie kontrolnej nie traktowanej 82,23%), równocześnie chroniąc straty na skutek zabiegu (kontrola zabiegu z PBS 72,7%). Nie zakłóciła diagramu lęgu (ryc. 1) i spowodowała niewielkie uszkodzenie odpadu powylęgowego (tab. 2) ograniczone do niższej masy ciała u 2,49% embrionów ($p < 0,01$). Znamienne jest, że zarodki

tej grupy spożyły białko w prawidłowym czasie. W niewielkiej liczbie skorup (3,32%) znaleziono zaledwie jego ślad. Natomiast w grupie I (awoparcina) i grupie II (flawomycyna) odnotowano podobne straty w lęgach (tab. 1). Wylęg w grupie I wynosił 56,53% ($p < 0,01$), przy 9,72% brakowaniu piskląt, w grupie II był jeszcze niższy kształtując się na poziomie 47,99% ($p < 0,01$) na skutek wynoszącego 17,02% brakowania. W grupie I śmiertelność zarodków przesuwiała się głównie na końcowy etap inkubacji. Natomiast zarodki grupy II ginęły we wszystkich etapach lęgu. Zarodki obu tych grup nie spożywały białka w całości, bowiem w skorupach powylęgowych pozostawały znaczne jego ilości, w ponad 17% jaj (tab. 2). Obraz anatomopatologiczny obu grup był zróżnicowany. W grupie I obserwowano znaczny obrzęk nerek z wyraźną tendencją do skazy moczowej. Odnotowano także atrofię wątroby. Tylko 27,39% zarodków uznano za prawidłowe. W grupie tej stwierdzono także statystycznie istotne obniżenie aktywności AspAT, której towarzyszył równoczesny spadek koncentracji kwasu moczowego i mocznika (tab. 3). Precyzyjna interpretacja uzyskanych wyników biochemicznych jest trudna, niemniej mogą one wskazywać na daleko idące uszkodzenie metabolizmu wątroby i nerek, a szczególnie o zahamowaniu przemian metabolicznych puryn. W dostępnej literaturze brak jest potwierdzenia tego zjawiska u ptaków. Uzyskane wyniki pozwalają sądzić, że awoparcina może być najbardziej kontrowersyjnym stymulatorem wzrostu dla ptaków. Mimo tych wyników diagramy lęgu nie zostały zakłócone (ryc. 1). Masa wylęzonych piskląt była natomiast najniższa (41,8 g $\pm$ 3,26) ze wszystkich badanych grup (tab. 1). Pisklęta były drobne o krótkim, źle wykształconym puchu.

Flawomycyna (grupa II), która doprowadziła do równie wysokich strat w lęgach (tab. 1) jako jedyna odkształciła oba diagramy, przedłużając 2 etap klucia o 6 godz., a synchronizację wylęgu (51,16%) uzyskano dopiero w ostatnim etapie (ryc. 1). W grupie tej tylko 9,79% zarodków można było uznać za prawidłowe (tab. 2). Obserwowano obrzęki wątroby, wybroczyny w nerkach oraz pęknięcie naczyń wieńcowych serca. W surowicy wylęzonych piskląt zanotowano wzrost A1AT – aminotransferazy alaninowej (tab. 3), co jest powszechnie uznanym wskaźnikiem uszkodzenia wątroby. Pisklęta te wykazywały podobnie jak w grupie I niedorozwój puchu. Natomiast masa ciała piskląt grupy II i III była wyższa niż w grupie I (tab. 1).

Tab. 2. Zmiany anatomopatologiczne zarodków zmarłych (%)

Rodzaj zmian		I Awoparcin	II Flawomycin	III Wirginiamycin	IV PBS	V Kontrola
Wady ułożenia		9,86	8,44**	5,40	5,43	3,8**
Zahamowanie w rozwoju		6,53**	9,4**	2,49**	1,89**	0,45**
Retencja	woreczka żółciowego	9,86**	9,26**	4,99**	7,94	6,15**
	białka	17,78**	17,01**	3,32	2,23	2,16**
Oddychanie płodowe		4,4**	4,43**	2,91	3,76	2,28**
Uszkodzenie	naczyń krwionośnych	7,08	10,10**	1,52	1,81	1,02**
	nerek	8,47**	4,43**	1,25**	0,14	0,11**
	wątroby	3,47**	2,77	0	0,14	0,22**
Zarodki zmarłe prawidłowe		27,39	9,79	35,00	60,81	62,85

Objaśnienia: jak w tab. 1.

Tab. 3. Kształtowanie się parametrów biochemicznych u piskląt ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$)

Grupa	Białko całkowite (g/dl)	AIAT (IU/l)	AspAT (IU/l)	BUN (mg/dl)	Kwas moczowy (mg/dl)	Fosfataza alkaliczna (IU/l)
I	1.42 $\pm$ 0.40	13,4 $\pm$ 2,5	154,2 $\pm$ 16,8*	8,11 $\pm$ 1,61*	4,04 $\pm$ 1,86**	1188 $\pm$ 378,2
II	1.78 $\pm$ 0,41	21,4 $\pm$ 5,1*	195,4 $\pm$ 42,9	10,55 $\pm$ 3,81	7,66 $\pm$ 4,87	1561 $\pm$ 735,9
III	1.61 $\pm$ 0,46	15,3 $\pm$ 4,8	176,4 $\pm$ 28,9	10,22 $\pm$ 2,43	7,72 $\pm$ 4,79	1358 $\pm$ 462,5
V Kontrola	1,53 $\pm$ 0,38	14,9 $\pm$ 5,2	182,7 $\pm$ 31,8	12,0 $\pm$ 3,26	7,88 $\pm$ 1,93	1338 $\pm$ 529,2

Objaśnienia: jak w tab. 1.

W żadnej grupie nie obserwowano działania teratogenne. Verrett i wsp. (18) oraz Vesely i wsp. (19) uważają odkształcenia morfologiczne za ważny element próby biologicznej na zarodkach. Nie ma możliwości sprawdzenia powyższą metodą działania onkogenne. Tokosova (15) obserwowała po wirginiamycynie wzrost zachorowań na chorobę Mareka u kurcząt co wymaga osobnych badań.

Badanie histopatologiczne wątroby i nerek wylężonych piskląt nie ujawniło uszkodzeń patomorfologicznych.

Na podstawie przeprowadzonej próby biologicznej na zarodkach toksyczność badanych stymulatorów wzrostu można przedstawić w następującej kolejności: awoparcina, flawomycyna i wirginiamycyna.

Piśmiennictwo

- Allen P. C.: Avian Dis. 36, 852, 1992.
- Atef H., Shalaby A. A., Khafagy A., Abo-Noraga A.: Dt. tierärztl. Wschr. 96, 285, 1989.
- Borzemska W., Kosowska G., Malec H., Piusiński W., Niezgoda J., Malec L.: Medycyna Wet. 47, 366, 1991.
- Dodatki paszowe w żywieniu drobiu. Praca zbiorowa, PAN Jabłonna, 20, 1994.
- Harvey R. B., Kubena L. F., Nagi S. A., Gyimah J., Corrier D. E., Panigrahy B., Philips T. D.: Avian Dis. 31, 787, 1987.
- ISCC Expert Panel of Enzymes – Part 3: J. clinical chemistry Clin. Biochem. 24, 481, 1986.
- Kadłubowski R., Błaszowska J.: Wiad. parazyt. 38, 31, 1992.
- Kirchgessner M., Roth F. X.: Arch. Geflügelk. 46, 36, 1982.
- Lesson S., Summers J. D., Ferguson A. E.: Can. J. Anim. Sci. 60, 275, 1980.
- Malec H.: Diagram czasu wylęgu piskląt kurzych przy zakłóceniu naturalnej synchronizacji klucia. Etologia Drobiu wyd. IZ Kraków, 1988.
- Malec H., Borzemska W., Malec L.: Roczn. Nauk roln. B, 106, 93, 1990.
- Mazurczak J., Harenza T.: Medycyna Wet. 32, 577, 1977.
- Tokosova M.: Vet. Med. Praga 34, 51, 1989.
- Tokosova M.: Vet. Med. Praga 34, 107, 1989.
- Tokosova M.: Vet. Med. Praga 35, 105, 1990.
- Tuller R.: Arch. Geflügelk. 33, 351, 1969.
- Turek F.: Wien. tierärztl. Machr. 60, 95, 1973.
- Verrett M. J., Scott W. F., Reynaldo E. F., Alterman E. K., Thomas C. A.: Toxic. appl. Pharmac. 56, 265, 1980.
- Vesely D., Vesela D.: Vet. Med. Praga 36, 175, 1991.

Adres autora: prof. dr hab. Wanda Borzemska, ul. Perzyńskiego 8 m. 18, 01-872 Warszawa

ANTONINA Sopińska, HANNA Lutnicka, LESZEK Guz

Wpływ permetryny na układ odpornościowy karpi

Katedra Chorób Ryb i Biologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

S u m m a r y

The influence of permethrin on the immune system of the carp

The studies were done on 90 carps K₁ of a 60-80 g weight exposed to permethrin at a concentration of 0.3 µg/L of water for 28 days (group 1) or 11 µg/L for 14 days (group 2). Immunological examinations were done with the blood of fish in group 1 after 4, 7, 14, 21, and 28 days, and in group 2 after 4, 7 and 14 days after the use of permethrin. Immunological examinations were performed after 7 and 14 days from the end of permethrin action. Group 3, untreated, served as a control.

It was found that permethrin at a concentration of 0.3 µg/L significantly decreased metabolic activity of neutrocytes and the level of blood lysozyme after 28 days of exposure. Permethrin at a concentration of 11 µg/L caused death of about 50% of the examined individuals after 14 days exposure. Granulocytosis, monocytosis and unphysiological nuclear division in neutrocytes and lymphocytes were noted. During the whole period a significantly de-

creased metabolic activity of neutrocytes and blood plasma lysozyme level were observed. After transport of the fish into clean water, the examined parameters returned to physiological value in group 1 after 14 days, while in group 2 all the parameters had lower values than those in the control group.

Syntetyczne pyretroidy odznaczają się dużą siłą toksycznego oddziaływania na większość organizmów żywych. Spośród wielu należących do tej grup pestycydów na szczególną uwagę zasługuje permetryna, szeroko stosowana jako środek owadobójczy, która podczas opryskiwania pól dostaje się do wód powierzchniowych. Jej toksyczne działanie na ryby, a także inne organizmy zamieszkujące środowisko wodne wynika zarówno z bezpośredniego oddziaływania substancji macierzystej, jak również produktów jej degradacji, które okazały się bardziej toksyczne dla ryb niż sama permetryna (6, 16). Dlatego też, pomimo prac wskazujących na niewielką trwałość permetryny jako insektycydu (16) należy się spodziewać, że w środowisku wodnym wystąpi jej przedłużone działanie poprzez