

Przyczyny i skutki zakazu stosowania 5-nitroimidazoli u zwierząt, których tkanki lub produkty przeznaczone są do spożycia przez ludzi¹⁾

KAMILA MITROWSKA

Zakład Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 09.06.2014

Zaakceptowano 29.07.2014

Mitrowska K.

Reasons and consequences of the ban on the use of 5-nitroimidazoles in food producing animals

Summary

Nitroimidazoles have been used for the treatment of anaerobic bacterial and parasitic infections in animals. However, they are believed to possess genotoxic and carcinogenic properties, which is why their use in food producing animals has been banned in many countries. At present, nitroimidazoles are approved in the European Union only for use in companion animals and human medicine, although the reason for the ban of their use in food producing animals was just care about the health of people. As a consequence of this ban each European Union country and countries wishing to export animal products to the European Union are required to implement a residue monitoring plan for nitroimidazole residues in food of animal origin which helps to ensure the safety and reduce the possible health risks to consumers.

In this article the pharmacological and toxicological aspects of the most commonly used 5-nitroimidazoles in veterinary medicine are summarized.

Keywords: 5-nitroimidazoles, pharmacokinetics, toxicology, residues

Pochodne 5-nitroimidazolu są skutecznymi środkami stosowanymi w leczeniu inwazji pierwotniaków oraz infekcji spowodowanych przez bakterie beztlenowe i w związku z tym były szeroko stosowane w medycynie weterynaryjnej, jednakże ze względu na potencjalne działanie genotoksyczne i kancerogenne ich użycie u zwierząt, których tkanki lub produkty przeznaczone są do spożycia przez ludzi zostało zabronione w wielu krajach. Obecnie substancje z grupy nitroimidazoli są dopuszczone do stosowania wyłącznie w leczeniu zwierząt towarzyszących oraz w medycynie człowieka, mimo iż przyczyną wycofania ich użycia w hodowli zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność była troska właśnie o zdrowie ludzi.

Do nitroimidazoli, które w przeszłości były zarejestrowane w Unii Europejskiej (UE) jako leki weterynaryjne lub dodatki paszowe stosowane u zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność, należą metronidazol, dimetridazol, ronidazol i ipronidazol (ryc. 1). Leki z tej grupy dzięki niewątpliwym zaletom terapeutycznym miały zastosowanie w zwalczaniu dyzenterii u świń oraz w połączeniu z neomycyną

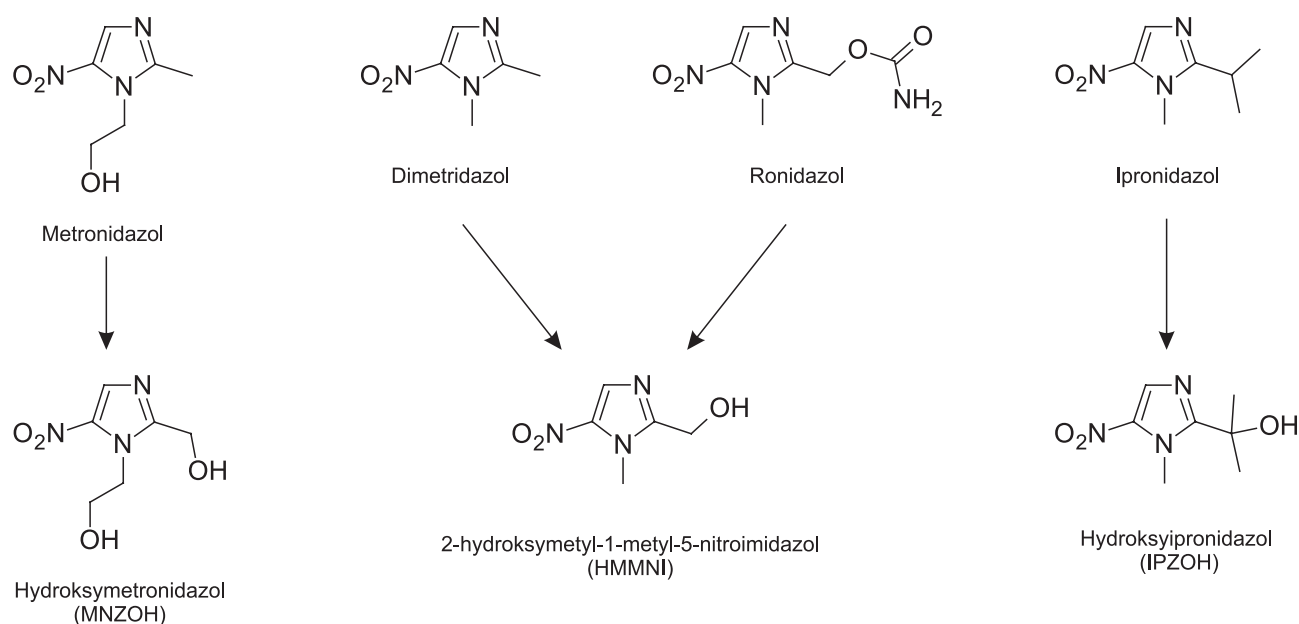
w zatrzymaniu błon płodowych u krów i w zakażeniach powstałych w wyniku interwencji chirurgicznych. Ponadto były używane również w leczeniu histomonadozy, trychomonadozy i giardiozy u drobiu, trychomonadozy u bydła (19, 35) oraz heksamitozy u ryb (46). Natomiast zarejestrowany na terenie Rosji i Armenii preparat Nosemat, zawierający w swoim składzie metronidazol i oksytetracyklinę, zalecany jest w zwalczaniu nosemozy u pszczoły miodnej (23).

Nitroimidazole były także stosowane jako antybiotyczne stymulatory wzrostu; ich dodatek do paszy powodował wzrost przyrostu masy ciała zwierząt przy jednoczesnym zwiększeniu stopnia wykorzystania paszy, jednakże ich użycie w tym charakterze również zostało zabronione w UE (5-7, 21).

Farmakokinetyka u zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność

Jak każda substancja obca, leki z grupy nitroimidazoli po podaniu zwierzętom ulegają wchłonięciu, dystrybucji do tkanek i narządów, a następnie eliminacji na drodze metabolizmu i wydalania. Niewiele jest informacji dotyczących farmakokinetyki nitroimidazoli u zwierząt, których tkanki lub produkty przeznaczone

¹⁾ Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2011/03/D/NZ7/03767.



Ryc. 1. Wzory strukturalne 5-nitroimidazoli i ich metabolitów

są do spożycia przez ludzi, a te, które są dostępne są mało aktualne i odnoszą się tylko do kur niosek, krów i owiec (tab. 1).

Nitroimidazole są związkami chemicznymi słabo zasadowymi, umiarkowanie lipofilnymi, o małej masie cząsteczkowej, dzięki czemu łatwo penetrują błony komórkowe i umożliwiają prawie całkowite wchłanianie do krążenia ogólnoustrojowego. Z przewodu pokarmowego są wchłaniane szybko, ale w różnym stopniu. Biodostępność (F) nitroimidazoli u zwierząt monogastrycznych jest wysoka, u kur niosek F metronidazolu po podaniu *p.o.* wynosi 78% (10), a dime-tridazolu powyżej 80% (30). Ze względu na rozkład nitroimidazoli przez mikroorganizmy znajdujące się w przewodzie pokarmowym przeżuwaczy, biodostępność metronidazolu u krów i cieląt oraz ronidazolu

u owiec jest bardzo niska i stanowi, odpowiednio, 6,9% (18), 33,7% (4) oraz 2,6% (48).

Pochodne 5-nitroimidazolu jako związki lipofilne łatwo przechodzą do wszystkich tkanek. Przenikają do kości i ośrodkowego układu nerwowego. Przechodzą do łożyska i mleka w stężeniu porównywalnym do tego w osoczu. Stopień wiązania metronidazolu z białkami osocza jest niewielki i u kur niosek jest niższy niż 3%. Objętość dystrybucji (V_d) dla metronidazolu po podaniu *i.v.* u kur niosek wynosi 1,1 l/kg, co świadczy o pozanaczyniowym rozmieszczeniu leku, natomiast u krów i cieląt V_d jest mniejsza niż 1 l/kg i wskazuje na wyższe stężenia leku we krwi w porównaniu z peryferyjnymi płynami ustrojowymi. Biologiczny okres półtrwania w osoczu w fazie eliminacji ($t_{1/2}$) metronidazolu u kur niosek równy jest 4,2 godz. (10), natomiast

Tab. 1. Wybrane parametry farmakokinetyczne 5-nitroimidazoli u zwierząt, których produkty przeznaczone są do spożycia przez ludzi

Gatunek	Lek	Dawka (mg/kg)	Droga podania	V_d (l/kg)	$t_{1/2}$ (h)	Cl (l/h/kg)	F (%)	Źródło
Kura	metronidazol	30	<i>i.v.</i>	1,10	4,20	0,131	–	(10)
		30	<i>p.o.</i>	–	4,70	–	78,40	
	dimetridazol	50*	<i>p.o.</i>	–	2,56	2,350	81,94	(30)
		250*	<i>p.o.</i>	–	2,69	2,350	80,50	
		50*	<i>i.m.</i>	–	2,88	2,660	–	
		75	<i>p.o.</i>	–	1,50	–	–	(1)
Krowa	metronidazol	25	<i>i.v.</i>	0,73	2,70	0,220	–	(18)
		25	<i>p.o.</i>	–	2,00	–	6,90	
Cielę	metronidazol	20	<i>i.v.</i>	0,79	1,92	0,280	–	(4)
		50	<i>p.o.</i>	–	4,38	0,260	33,70	
Owca	ronidazol	5	<i>i.v.</i>	–	–	–	–	(48)
		5	<i>p.o.</i>	–	–	–	2,60	

Objaśnienia: V_d – objętość dystrybucji; $t_{1/2}$ – okres półtrwania; Cl – klirens; F – biodostępność; * – dawka podawana przez 3 dni

dla dimetridazolu $t_{1/2}$ waha się od 1,5 do 2,9 godz. zależnie od dawki i drogi podania (1, 30). Dłuższym okresem półtrwania charakteryzuje się ronidazol – 9 godz. (1), co przy stosowaniu zbyt częstych i dużych dawek prowadzi do akumulacji leku w organizmie i jest przyczyną neurotoksyczności ronidazolu u kur niosek.

Nitroimidazole ulegają w wątrobie szybkiemu utlenianiu (w pozycji C2 pierścienia imidazolowego) do hydroksy-, acetylo- i karboksypochodnych, a następnie podlegają sprzęganiu z kwasem glukuronowym i siarkowym (21). Na drodze utleniania z metronidazolu powstaje hydroksymetronidazol, z ipronidazolu tworzy się hydroksyipronidazol, a dimetridazol i ronidazol mają wspólny metabolit – 2-hydroksylmetyl-1-metyl-5-nitroimidazol (HMMNI) (ryc. 1). Należy podkreślić, że dimetridazol jest intensywnie przekształcany do HMMNI, dlatego jego stężenie w osoczu jest od 5 do 20 razy wyższe od substancji macierzystej. Z kolei ronidazol ma inną ścieżkę metaboliczną i tylko od 1% do 2% jego stężenia stanowi HMMNI (1). Wszystkie te hydroksymetabolity nadal posiadają w swojej strukturze pierścień imidazolowy, dlatego ich kancerogenność nie może być wykluczona. Pochodne 5-nitroimidazolu ulegają również, w środowisku o niskim ciśnieniu parcjalnemu tlenu, reakcjom redukcji grupy nitrowej w pozycji C5, które prowadzą do rozerwania pierścienia imidazolowego i powstania reaktywnych produktów pośrednich, prawdopodobnie odpowiedzialnych za działanie mutagenne nitroimidazoli. Końcowym metabolitem tej przemiany jest między innymi acetylamid będący substancją potencjalnie rakotwórczą dla człowieka (16, 21).

Zarówno substancje macierzyste nitroimidazoli, jak i ich hydroksymetabolity są wydalane z organizmu głównie z moczem, zaś w mniejszym stopniu z żółcią i kałem oraz przez płuca z wydychanym powietrzem (19, 21, 35).

Pozostałości w tkankach i produktach zwierzęcych

Niekorzystną z punktu widzenia konsumenta konsekwencją stosowania tej grupy leków u zwierząt, których produkty przeznaczone są do spożycia przez ludzi, może być występowanie pozostałości zarówno leku macierzystego, jak i jego metabolitu w żywności pochodzenia zwierzęcego.

Stężenie dimetridazolu podawanego w dawce 20 mg/kg/m.c. przez 14 dni z wodą do picia w mięśniach indyka po upływie 1 dnia od zakończeniu leczenia kształtowało się na poziomie poniżej 1 µg/kg, a stężenie jego metabolitu, HMMNI, wynosiło 20 µg/kg i po 3 dniach było poniżej granicy wykrywalności metody. W wątrobie dimetridazol był obecny tylko tuż po zakończonej terapii. W porównaniu do mięśni stężenie HMMNI w wątrobie po pierwszym dniu od ostatniego podania leku było niższe (6 µg/kg), ale utrzymywało się dłużej – do 5 dni. Dimetridazol i HMMNI po upływie 1 dnia od zakończenia terapii występowały

w osoczu i siatkówce, odpowiednio, w stężeniach 19 i 237 µg/kg oraz 107 i 1445 µg/kg, a oba związki znajdowano jeszcze w 5. dniu od zakończenia podawania. Po zastosowaniu zarówno dimetridazolu, jak i ipronidazolu stężenia metabolitów we wszystkich badanych tkankach były wyższe niż substancji macierzystych. Odwrotną sytuację stwierdzono po stosowaniu metronidazolu i ronidazolu, dla których obserwowano wyższe stężenia substancji macierzystych niż metabolitów. W badaniach porównawczych wykazano, że po jednym dniu od zakończenia leczenia najbardziej kumuluje się ronidazol, ipronidazol (w formie IPZOH), dimetridazol (w formie HMMNI), a najmniej metronidazol, co w pełni koreluje z wyznaczonymi parametrami farmakokinetycznymi (tab. 1). Natomiast najwyższe stężenia tych substancji występowały w porządku malejącym w siatkówce, osoczu, mięśniach i wątrobie. Ponadto ustalono, że w mięśniach i wątrobie nitroimidazole (szczególnie ronidazol i HMMNI) nie są jednorodnie rozmieszczone i ulegają szybszej degradacji niż w innych matrycach. Dlatego zaleca się, by nielegalne stosowanie nitroimidazoli było kontrolowane poprzez analizę zarówno substancji macierzystych, jak i ich hydroksymetabolitów w osoczu lub siatkówce oka, gdyż stanowią one materiał bardziej homogenny i dostępny do pobrania, zaś analizy występują w nich w wyższych stężeniach, utrzymują się dłużej i są bardziej stabilne (28). U świń pozostałości dimetridazolu, ronidazolu i ipronidazolu oraz ich metabolitów utrzymują się na niższych poziomach stężeń i krócej niż u indyków (15, 21). Również u kur dimetridazol i ipronidazol są intensywnie metabolizowane do hydroksypochodnych, które mogą pojawić się w jajach już w pierwszej dobie od podania (1). Dimetridazol przechodzi do jaj kur (w 57% do żółtka) w stężeniu od 0,28% do 1,15% całkowitej dawki i utrzymuje się od 4 do 6 dni od zakończenia leczenia (29). Natomiast ronidazol przenika do jaj głównie w postaci niezmienionej i pozostaje tam do 7 dni (1). U pstrągów leczonych metronidazolem pozostałości utrzymują się w mięśniach i skórze ryb do 3 tygodni od zakończenia leczenia (43).

Wykazano, że procesy kulinarne przeprowadzone w wysokiej temperaturze nie zapewniają zmniejszenia pozostałości nitroimidazoli. Zawartość dimetridazolu i ronidazolu w mięsie kurcząt po gotowaniu w wodzie i smażeniu spada w niewielkim stopniu, natomiast w omlecie smażonym na patelni przez 3 min. zmniejsza się tylko o średnio 23% (37).

Toksyczność u ssaków

Nitroimidazole są zazwyczaj dobrze tolerowane, a działania niepożądane obejmują głównie uszkodzenia mózdzku odpowiedzialnego za koordynację ruchów oraz inne zaburzenia układu nerwowego, w tym bóle i zawroty głowy, neuropatie obwodowe, dezorientację, nerwowość, depresję, zaburzenia snu oraz omdlenia. Występują one niemal wyłącznie w przypadku intensywnej i długotrwałej terapii i zazwyczaj ustępują

wraz z zaprzestaniem stosowania leku. Ze względu na szybką absorpcję i wolną eliminację, szczególnie duże ryzyko powstania zaburzeń neurologicznych istnieje przy stosowaniu ronidazolu u kotów (36). Ponadto nitroimidazole posiadają niski potencjał cytotoksyczny, z wyjątkiem ronidazolu, który wykazywał cytotoksyczność wobec ludzkich i szczurzych hepatocytów (31).

Pochodne 5-nitroimidazolu wykazują niską toksyczność ostrą. Ipronidazol po podaniu *p.o.* jest bardziej toksyczny u szczurów i myszy (LD_{50} około 950 mg/kg m.c.) niż dimetridazol (LD_{50} od 1600 do 2500 mg/kg m.c.), ronidazol (LD_{50} od 2330 do 3140 mg/kg m.c.) i metronidazol (LD_{50} od 4350 do 5000 mg/kg m.c.). Gatunkiem najbardziej wrażliwym na działanie metronidazolu jest pies (LD_{50} większe od 750 mg/kg m.c.) (16, 22).

Badania oceny toksyczności podostrej, podprzewlekłej i przewlekłej wykazały, że dimetridazol i ronidazol powodowały niedorozwój i łagodny zanik jąder, a ipronidazol był przyczyną powiększenia wątroby u psów. Metronidazol podawany szczurom wywoływał zaburzenia spermatogenezy, dystrofię jąder i zanik prostaty. W oparciu o wyniki dostępnych badań oceny toksyczności w warunkach powtarzanego narażenia poziom bez obserwowanego działania (NOEL – No Observed Effect Level) nie mógł być ustalony dla żadnego z nitroimidazoli (15, 16, 22).

Nitroimidazole nie wpływają na rozrodczość gryzoni, jednak ipronidazol powodował zmiany degeneracyjne w jądrach. Dimetridazol, ronidazol i ipronidazol nie są teratogenne dla gryzoni i królików, ale w badaniach laboratoryjnych z zastosowaniem wysokich dawek wykazują działanie toksyczne u ciężarnych samic, a ronidazol dodatkowo był toksyczny dla płodu (21). Badania przeprowadzone na grupie 328 846 dzieci, których matki stosowały metronidazol w ciąży (w celu leczenia rzęsistkowicy) nie wykazały wzrostu występowania nowotworów, a dwukrotny wzrost zachorowalności na nerwiaka płodowego nie był statystycznie istotny (45).

W klasyfikacji działań niepożądanych leków stosowanych w ciąży według FDA metronidazol znajduje się w kategorii leków grupy B, które podawane zwierzętom nie wykazały zagrożenia dla płodu lub pojawiły się działania niepożądane, ale nie zostały one potwierdzone w badaniach u kobiet ciężarnych, zarówno w I trymestrze, jak i w późniejszym okresie ciąży. Leki takie przepisują się tylko ze zlecenia lekarza w szczególnych przypadkach (17). Metronidazol wydzielany jest również do mleka, jednakże nie zaobserwowano żadnych efektów ubocznych u dzieci karmionych mlekiem kobiet przyjmujących metronidazol trzy razy dziennie w dawkach 400 mg (27).

Najbardziej istotny i kontrowersyjny aspekt toksyczności nitroimidazoli wiąże się z ich genotoksycznością. Właściwości mutagenne metronidazolu, dimetridazolu, ronidazolu i ipronidazolu zaobserwowano w teście Ames z pałeczkami *Salmonella typhimurium* oraz

w testach z *Escherichia coli*, *Ciprobacter freundii* i *Klebsiella pneumoniae* niemniej jednak wykazano, że obserwowana mutagenność ma ścisły związek z aktywnością nitroreduktazy badanych bakterii i nie ujawnia się w testach z bakteriami nieprodukującymi tego enzymu. Metronidazol i dimetridazol dodatkowo dawały dodatni wynik w badaniach postępowych i powrotnych mutacji przeprowadzonych na niższych mikroorganizmach eukariotycznych (*Saccharomyces cerevisiae*), a genotoksyczny wpływ ronidazolu stwierdzono w badaniach recesywnych mutacji letalnych związanych z płcią u *Drosophila melanogaster* oraz w testach cytogenetycznych na szpiku kostnym myszy. Ponadto aktywność mutagenną metronidazolu dowiedziono przy użyciu metod *in vitro* w hodowlach pierwotnych hepatocytów szczurów i ludzi oraz w testach *in vivo* u myszy. Podwyższony poziom mutacji chromosomalnych stwierdzono w limfocytach krwi obwodowej pacjentów po długotrwałej terapii metronidazolem. Genotoksyczne działanie metronidazolu wykazano także w testach kometowych przeprowadzonych na materiale genetycznym izolowanym z ludzkich limfocytów. Dodatkowo określono mutagenność hydroksymetabolitów metronidazolu, która była wyższa niż substancji macierzystej. Na podstawie powyższych danych metronidazol uznano za lek genotoksyczny dla ludzi po podaniu doustnym i nie wyklucza się, że pozostałe nitroimidazole mogą wywierać podobne działanie (15, 16, 22).

Metronidazol wykazuje działanie kancerogenne u zwierząt. Po długotrwałym podawaniu zaobserwowano zwiększenie częstości występowania nowotworów gruczołu mlekowego, wątroby, przysadki i jąder u szczurów oraz chłoniaków złośliwych i gruczolaków płuc u myszy (16, 22). W badaniach nad kancerogennością innych nitroimidazoli wykazano, że dimetridazol, ronidazol i ipronidazol zwiększają częstość powstawania nowotworów gruczołu mlekowego u szczurów, a ronidazol i ipronidazol dodatkowo indukują wzrost guzów płuc u myszy (15, 22). Mimo że nie dowiedziono kancerogennego działania metronidazolu u ludzi, to mając na względzie fakt, że nie badano odległych skutków długotrwałej terapii dużymi dawkami tego leku, Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem zakwalifikowała w 1987 r. metronidazol do grupy 2B obejmującej substancje potencjalnie rakotwórcze dla człowieka. W badaniach retrospektywnych obejmujących grupę 12 000 osób, które stosowały metronidazol, nie stwierdzono zwiększenia występowania nowotworów po dwóch i pół latach obserwacji (20). Ponadto w badaniach z udziałem 771 kobiet leczonych metronidazolem z powodu rzęsistkowicy nie wykazano zwiększonej częstości zapadalności na nowotwory, a badania retrospektywne potwierdziły, że metronidazol nie jest kancerogeny, nawet po wzięciu pod uwagę wpływu palenia papierosów przez pacjentki (2, 3). W 2011 r. w ramach działalności Amerykańskiego Krajowego Programu Toksykologicznego me-

tronidazol został wymieniony w Dwunastym Raporcie o Kancerogenach jako związek o przewidywanych w sposób racjonalny właściwościach kancerogennych dla ludzi (47), co w świetle dostępnych badań może wydać się opinią przesadzoną (33, 34).

Powyższa klasyfikacja nie przyczyniła się jednak do zakazu stosowania nitroimidazoli u ludzi. Dlaczego więc zostały one wycofane ze stosowania u zwierząt, których tkanki lub produkty przeznaczone są do spożycia przez ludzi? Znaczenie ma tu mechanizm działania nitroimidazoli, który związany jest z redukcją grupy nitrowej podstawionej w pozycji 5 pierścienia imidazolowego, czego następstwem jest powstawanie reaktywnych produktów pośrednich, które uszkadzają DNA komórek patogenu i prowadzą do ich śmierci. Oprócz działania przeciwbakteryjnego, mechanizm ten wyjaśnia także efekty mutagenne wywierane przez nitroimidazole. Proces ten wymaga niskiego potencjału oksydacyjno-redukcyjnego występującego jedynie w organizmach z metabolizmem beztlenowym lub ubogim w tlen, co jest przyczyną braku ich aktywności wobec bakterii tlenowych. Wskutek dobrego zaopatrzenia w tlen i dodatkowej bariery znajdującej się w błonie jądra, komórki ludzkie są mniej wrażliwe na działanie nitroimidazoli niż bakterie (14, 19, 35), jednakże reaktywne produkty pośrednie nitroimidazoli łączą się kowalencyjnie z makrocząsteczkami komórkowymi i nie można wykluczyć, że podczas spożycia i trawienia żywności pochodzącej od leczonych zwierząt nie mogą być uwolnione jako potencjalnie toksyczne związki (32, 44, 49).

Mutageny i kancerogeny potencjał nitroimidazoli jest przyczyną braku określenia dopuszczalnego dziennego pobrania (ADI – Acceptable Daily Intake) oraz najwyższego dopuszczalnego poziomu pozostałości (MRL – Maximum Residue Limit) i w konsekwencji stosowanie tych związków zostało zakazane u zwierząt, których tkanki lub produkty przeznaczone są do spożycia przez ludzi.

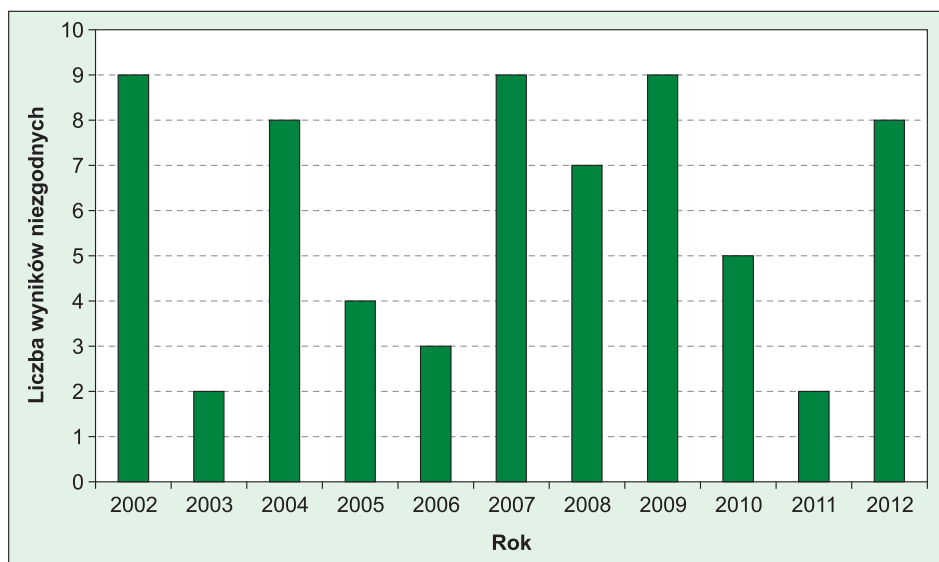
Legislacja i badania kontrolne pozostałości

Ze względu na brak wystarczających badań nad kancerogennością u ludzi w 1993 r. wycofano na terenie Unii Europejskiej autoryzację dla ronidazolu (7), w 1995 r. dla dimetridazolu (6), a w 1998 r. dla metronidazolu (5) jako leku weterynaryjnego do stosowania u zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność. Natomiast jako dodatek paszowy dla indyków ronidazol został wycofany w 1998 r. (12), ipronidazol w 1999 r. (40), a dimetridazol dopuszczony był do użytku do 2002 r. (39). Pozostałe nitroimidazole nigdy nie były zarejestrowane jako leki weterynaryjne do stosowania u zwierząt, których tkanki lub produkty przeznaczone są do konsumpcji. Wycofane nitroimidazole zostały umieszczone w Aneksie IV Rozporządzenia Rady (EWG) 2377/90 (41), obecnie zastąpionego Rozporządzeniem Komisji (UE) 37/2010 (38), a substancje te ujęto w tabeli 2, gdzie zebrano

substancje zakazane, dla których wartości MRL nie mogą być wyznaczone. Nitroimidazole nie mają również wyznaczonego wymaganego minimalnego poziomu oznaczania (MRPL – Minimum Required Performance Limit), dlatego Unijne Laboratorium Referencyjne podało „rekomendowane stężenie” oznaczania wszystkich nitroimidazoli i ich metabolitów na poziomie 3 µg/kg w preferowanych matrycach dla drobiu (osocze, surowica, jaja) oraz świń i innych gatunków (osocze, surowica, mięśnie) (9). Stosowanie tych związków zostało zabronione również w Stanach Zjednoczonych Ameryki, Kanadzie, Australii, Chinach i Japonii.

O konieczności prowadzenia badań kontrolnych pozostałości przez kraje Unii Europejskiej i kraje do niej eksportujące mówi Dyrektywa Rady 96/23/WE (13). W wykazie substancji objętych programem kontroli pozostałości nitroimidazoli umieszczone zostały w grupie A6, w której znajdują się substancje zakazane, w tym chloramfenikol, chloropromazyne i nitrofurany.

Badania w kierunku pozostałości nitroimidazoli rozpoczęto w Polsce w latach 90. ubiegłego wieku (42). Liczba próbek przebadanych w tym kierunku zwiększyła się z 300 w 2002 r. do 439 próbek w 2013 r. Do badań z terenu całego kraju pobierane są próbki mięśni, osocza, a także wody z gospodarstw prowadzących hodowlę bydła, świń, kurcząt, indyków, gęsi i kaczek oraz próbki mięśni owiec, kóz, ryb, królików i zwierząt dzikich utrzymywanych w warunkach fermowych. Programem kontroli pozostałości objęte są również mleko, jaja i miód (50). Do badań wykorzystuje się technikę chromatografii cieczowej połączoną z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS), która na podstawie analizy struktury chemicznej daje możliwość jednoznacznej identyfikacji 5-nitroimidazoli w złożonych matrycach biologicznych (24-26). Opracowane w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii PIWet-PIB procedury badawcze pozwalają na oznaczanie metronidazolu, ronidazolu, dimetridazolu, ipronidazolu oraz ich metabolitów na poziomie poniżej „rekomendowanego stężenia” i zostały zwalidowane zgodnie z wymaganiami Decyzji Komisji 2002/657/WE (11) oraz akredytowane według normy PN-EN ISO/IEC 17025. W realizacji badań kontrolnych bierze udział także 6 zakładów higieny weterynaryjnej. Dotychczas obecność nitroimidazoli w Polsce wykryto tylko w dwóch przypadkach. W 2008 r. stwierdzono metronidazol w dwóch próbkach drobiu (indyków) oraz w 2013 r. jednej próbce miodu. Potencjalne ryzyko występowania nitroimidazoli w żywności pochodzenia zwierzęcego importowanej do Unii Europejskiej znalazło potwierdzenie w raportach Systemu Wczesnego Ostrzegania o Substancjach Niebezpiecznych w Żywności i Paszach (RASFF – Rapid Alert System for Food and Feed). Pozostałości metronidazolu obecne były w miodach importowanych z Indii (2010 r.), Chin i Gwatemali (2011 r.) oraz w wołowinie z USA i brojlerach z Argentyny (2008 r.).



Ryc. 2. Liczba wyników niezgodnych dla grupy nitroimidazoli w UE w latach 2002-2012

W 2012 r. w Unii Europejskiej w ramach programu kontroli pozostałości przebadano 427 193 próbek żywności i produktów pochodzenia zwierzęcego w kierunku obecności blisko 800 substancji niedozwolonych lub których stężenie nie powinno przekraczać wyznaczonych limitów. Spośród 1071 wyników niezgodnych 8 wyników dotyczyło grupy nitroimidazoli, co stanowiło 23% wszystkich niezgodnych wyników w grupie A6 odnoszącej się do substancji zakazanych obok chloramfenikolu i nitrofuranów. Na przestrzeni lat 2002-2012 stwierdzono obecność nitroimidazoli łącznie w 66 próbkach (ryc. 2). Najwięcej wyników niezgodnych dotyczyło metronidazolu obecnego w próbkach pochodzących od drobiu i świń oraz w jajach głównie we Francji (25 wyniki) i Niemczech (15 wyników) (tab. 2) (8).

Mimo że nadal niekompletne i niejednoznaczne są dane dotyczące negatywnego wpływu nitroimidazoli na zdrowie ludzi, to jednak, ze względu na ich potencjalnie działanie genotoksyczne i kancerogenne, obecnie nie są one dopuszczone do stosowania u zwierząt,

od których lub z których pozyskuje się żywność. W konsekwencji ograniczony został zakres legalnie dostępnych środków farmaceutycznych stosowanych w profilaktyce i leczeniu chorób zwierząt, których tkanki lub produkty przeznaczone są do spożycia przez ludzi w sytuacji, gdy są one szeroko stosowane w medycynie człowieka. Skutkiem tego zakazu jest obowiązek prowadzenia badań kontrolnych pozostałości nitroimidazoli w żywności pochodzenia zwierzęcego przez kraje UE i kraje do niej eksportujące. Badania kontrolne prowadzone w tym zakresie przyczyniają się do zapewnienia bezpieczeństwa i zmniejszenia ewentualnego zagrożenia dla zdrowia konsumenta, a ich wyniki wskazują na przestrzeganie tego zakazu przez polskich i unijnych hodowców. Wycofanie ze stosowania nitroimidazoli ma również konsekwencje w ograniczaniu importu produktów zwierzęcych z krajów, w których użycie tych leków jest dozwolone, co wpływa korzystnie na zwiększenie konkurencyjności żywności pochodzenia zwierzęcego z krajów UE.

Piśmiennictwo

1. Aerts R. M. L., Egberink I. M., Kan C. A., Keukens H. J., Beek W. M. J.: Liquid chromatographic multicomponent method for determination of residues of ipronidazole, ronidazole, and dimetridazole and some relevant metabolites in eggs, plasma, and feces and its use in depletion studies in laying hens. *J. AOAC Int.* 1991, 74, 46-55.
2. Beard C. M., Noller K. L., O'Fallon W. M., Kurland L. T., Dahlin D. C.: Cancer after exposure to metronidazole. *Mayo Clin. Proc.* 1988, 63, 147-153.
3. Beard C. M., Noller K. L., O'Fallon W. M., Kurland L. T., Dockerty M. B.: Lack of evidence for cancer due to use of metronidazole. *N. Engl. J. Med.* 1979, 301, 519-522.
4. Bhavsar S. K., Malik J. K.: Pharmacokinetics of metronidazole in calves. *Br. Vet. J.* 1994, 150, 389-393.
5. Commission Regulation (EC) No 613/98. *Off J Eur Commun.* 19.03.1998, L 82, 14.

Tab. 2. Występowanie pozostałości nitroimidazoli w żywności i produktach pochodzenia zwierzęcego w UE w latach 2002-2012

Rodzaj próbki	Liczba wyników niezgodnych				Razem
	Metronidazol + MNZOH	Dimetridazol + HMMNI	Ronidazol + HMMNI	Grupa nitroimidazoli*	
Bydło	2	1	–	–	3
Świnie	13	1	1	–	15
Owce/kozy	–	1	2	–	3
Drób	10	4	8	3	25
Ryby	1	–	–	–	1
Jaja	2	–	4	6	12
Króliki	–	1	–	–	1
Dzicyzna hodowlana	1	–	5	–	6
Razem	29	8	20	9	66

Objaśnienie: * – bez wyszczególnienia poszczególnych nitroimidazoli

6. Commission Regulation (EC) No 1798/95. Off J Eur Commun. 26.07.1995, L 174, 20.
7. Commission Regulation (EC) No 3426/93. Off J Eur Commun. 15.12.1993, L 312, 15.
8. Commission Staff Working Documents on the Implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012 (Council Directive 96/23/EC).
9. CRL Guidance Paper, CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans. 2007, December 2007.
10. *Cybulski W., Larsson P., Tjalve H., Kowalska-Pylka H., Sylla M., Semeniuk S.*: Disposition of metronidazole in hens (*Gallus gallus*) and quails (*Coturnix coturnix japonica*): pharmacokinetics and whole-body autoradiography. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1996, 19, 352-358.
11. Decyzja Komisji 2002/657/WE. Dz.U. L 221 z 17.8.2002, s. 8.
12. Dyrektywa Komisji 98/19/WE. Dz.U. L 96 z 28.3.1998, s. 39.
13. Dyrektywa Rady 96/23/WE. Dz.U. L 125 z 23.5.1996, s. 10.
14. *Edwards D. I.*: Nitroimidazole drugs – action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J. Antimicrob. Chemother.* 1993, 31, 9-20.
15. The European Agency for the Evaluation of Medical Products. Committee for Veterinary Medicinal Products. Summary Report. Dimetridazole. 1996.
16. The European Agency for the Evaluation of Medical Products. Committee for Veterinary Medicinal Products. Summary Report. Metronidazole. In 1997.
17. Food and Drug Administration. Federal Register 1980;44:37434-67.
18. *Friis C.*: Disposition kinetics of metronidazole in the cow. *Acta Vet. Scand.* 1991, 87 (Suppl.), 155-157.
19. *Giguère S., Prescott J. F., Dowling P. M.*: Antimicrobial therapy in veterinary medicine, fifth edition. John Wiley&Sons, Inc. Ames, Iowa 2013.
20. International Agency for Research on Cancer (IARC): Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity. Suppl. 7. 1987, 250.
21. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Residues of some veterinary drugs in animals and foods. FAO Food and Nutrition Paper 41/2. Monographs prepared by the Thirty-Fourth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 30 January – 8 February 1989.
22. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series, No. 25. 1990.
23. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Committee on residues of veterinary drugs in foods: Discussion paper on veterinary drugs in honey production. 2010, Agenda Item 10 CX/RVDF 10/19/10.
24. *Mitrowska K., Antczak M., Posylniak A.*: A confirmatory method for the determination of nitroimidazoles in milk by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2014, 58, 581-587.
25. *Mitrowska K., Posylniak A., Zmudzki J.*: Multiresidue method for the determination of nitroimidazoles and their hydroxy-metabolites in poultry muscle, plasma and egg by isotope dilution liquid chromatography mass spectrometry. *Talanta*. 2010, 81, 1273-1280.
26. *Mitrowska K., Posylniak A., Zmudzki J.*: Selective determination of fourteen nitroimidazoles in honey by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Lett.* 2014, 47, 1634-1649.
27. *Passmore C. M., McElroy J. C., Rainey E. A., D'Arcy P. F.*: Metronidazole excretion in human milk and its effect on the suckling neonate. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1988, 26, 45-51.
28. *Polzer J., Stachel C., Gowik P.*: Treatment of turkeys with nitroimidazoles impact of the selection of target analytes and matrices on an effective residue control. *Anal. Chim. Acta.* 2004, 521, 189-200.
29. *Posylniak A., Semeniuk S., Zmudzki J., Niedzielska J., Biernacki B.*: Residues of dimetridazole in eggs after treatment of laying hens. *Vet. Res. Commun.* 1996, 20, 167-174.
30. *Posylniak A., Semeniuk S., Zmudzki J., Niedzielska J., Biernacki B.*: Tissue concentration of dimetridazole in laying hens. *Food Addit. Contam.* 1996, 13, 871-877.
31. *Radko L., Minta M.*: Cytotoxicity of some nitroimidazole derivatives – comparative studies on human and rat hepatoma cell lines. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2012, 56, 579-584.
32. *Rico A. G., Burgat-Sacaze V.*: Toxicological significance of covalently-bound residues. *Food Addit. Contam.* 1984, 1, 157-161.
33. *Roe F. J.*: Safety of nitroimidazoles. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 1985, 46, 72-81.
34. *Roe F. J.*: Toxicologic evaluation of metronidazole with particular reference to carcinogenic, mutagenic, and teratogenic potential. *Surgery* 1983, 93, 158-164.
35. *Roliński Z.*: Farmakologia i farmakoterapia weterynaryjna. PWRiL, Warszawa 2008.
36. *Rosado T. W., Specht A., Marks S. L.*: Neurotoxicosis in 4 cats receiving ronidazole. *J. Vet. Intern. Med.* 2007, 21, 328-331.
37. *Rose M. D., Bygrave J., Sharmar M.*: Effect of cooking on veterinary drug residues in food. Part 9. Nitroimidazoles. *Analyst.* 1999, 124, 289-294.
38. Rozporządzenie Komisji (UE) NR 37/2010 z dnia 22 grudnia 2009 r. w sprawie substancji farmakologicznie czynnych i ich klasyfikacji w odniesieniu do maksymalnych limitów pozostałości w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego. Dz.U. L 15 z 20.1.2010, s. 1.
39. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 2205/2001. Dz.U. L 297 z 15.11.2001, s. 3.
40. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 45/1999. Dz.U. L 6 z 12.1.1999, s. 3.
41. Rozporządzenie Rady (EWG) NR 2377/90. Dz.U. L 224 z 18.8.1990, s. 1.
42. *Semeniuk S., Posylniak A., Niedzielska J., Zmudzki J.*: Determination of nitroimidazole residues in poultry tissues, serum and eggs by high-performance liquid-chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 1995, 9, 238-242.
43. *Sorensen L. K., Hansen H.*: Determination of metronidazole and hydroxymetronidazole in trout by a high-performance liquid chromatographic method. *Food Addit. Contam.* 2000, 17, 197-203.
44. *Sved S., Foster B.*: Nitroimidazoles: proposed studies on the toxicity of bound residues. *Drug Metab. Rev.* 1990, 22, 849-861.
45. *Thapa P. B., Whitlock J. A., Brockman Worrell K. G., Gideon P., Mitchel E. F., Jr., Roberson P., Pais R., Ray W. A.*: Prenatal exposure to metronidazole and risk of childhood cancer: a retrospective cohort study of children younger than 5 years. *Cancer* 1998, 83, 1461-1468.
46. *Treves-Brown K. M.*: Applied fish pharmacology. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht 2000.
47. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program, Metronidazole, Report on Carcinogens, 12th edn, 2011, s. 269-270.
48. *Vynckier L. J., Debackere M.*: Plasma ronidazole concentrations in sheep after intravenous, oral, intraruminal and intraabomasal administration. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1993, 16, 70-78.
49. *Wislocki P. G., Lu A. Y. H.*: Formation and Biological Evaluation of Ronidazole Bound Residues. *Drug Metab. Rev.* 1990, 22, 649-661.
50. *Zmudzki J.*: Kontrola pozostałości chemicznych w tkankach zwierząt i żywności – ważny element w ochronie zdrowia publicznego. *Post. Nauk Rol.* 2008, 2, 49-59.

Adres autora: dr Kamila Mitrowska, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: kamila.mitrowska@piwet.pulawy.pl