

ANDRZEJ NAJER, BOGUSŁAWA WERAKSO, WANDA PARNOWSKA

Badanie czystości mikrobiologicznej leków weterynaryjnych do stosowania doustnego

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej Instytutu Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

Czystością mikrobiologiczną doustnych leków w medycynie ludzkiej interesowano się od początku lat 60-tych (1, 2, 5) zarówno w Polsce (10, 11, 13, 14), jak i w innych krajach (3, 4). Zagrożenie ze strony drobnoustrojów znajdujących się w lekach może dotyczyć także zwierząt. Lekarze weterynarii stwierdzając częste infekcje zadają pytanie czy przy analizie przyczyn nie należy brać pod uwagę także możliwości zakażeń odleukowych. Aktualnie brak jest rozeznania o stanie czystości mikrobiologicznej doustnych leków weterynaryjnych w Polsce. Próbę taką podjęto w niniejszej pracy.

Materiał i metody

Badaniem objęto 46 serii 28 znanych preparatów produkcji krajowej (Polfa Biowet, Herbapol) o różnym składzie i działaniu farmakologicznym. W znacznej części uwzględniono odżywkę (grupa Polfamix-ów i Polfasoli) oraz leki weterynaryjne zawierające składniki pochodzenia roślinnego, o których wiadomo z poprzednich badań, że bardzo często są zanieczyszczone drobnoustrojami (6, 7, 8). Zaplanowano także określenie czystości mikrobiologicznej surowców wchodzących w skład leków. Ze względu na specyfikę produkcji leków weterynaryjnych (rzadko produkowane duże serie) badania przeprowadzono dla tych serii, jakie były osiągalne i traktowano je jako próby losowe, analogicznie jak dla leków stosowanych w medycynie ludzkiej.

Zakres oznaczeń obejmował określenie liczby bakterii i grzybów w g materiału oraz analizę jakościową zanieczyszczeń zgodnie ze stosowaną metodą (12). Poszukiwano drobnoustrojów z rodzajów *Staphylococcus* i *Pseudomonas* oraz z rodziny *Enterobacteriaceae* — zgodnie z wymaganiami w tym zakresie dla doustnych leków stosowanych dla ludzi. Gramujemne pałeczki identyfikowano w systemie francuskim AP/E20. Znajdowane w preparatach grzyby nie były klasyfikowane.

Wyniki i omówienie

W badanych lekach weterynaryjnych stwierdzono bardzo zróżnicowany poziom ilościowych zanieczyszczeń mikrobiologicznych (p. tabela 1). Znalezione liczby bakterii w 1 g preparatu wahają się od 10 do dziesiątek milionów; z niektórych leków nie wyizolowano w ogóle bakterii (np. Bioferan, Aniron, Hydrocortison).

17 serii 11 preparatów (I grupa w tab. 1) zawiera zanieczyszczenia bardzo niewielkie rzędu 10^1 komórek w 1 g. Maksymalne zanieczyszczenie w tej grupie preparatów to kilkadziesiąt bakterii np. w preparacie Synchronogest i w większości badanych Polfasoli.

Do II grupy preparatów zaliczono te, których zanieczyszczenia biologiczne zawierały się w granicach od 100 do 1000 komórek bakterii w 1 g. Było to 9 serii 7 różnych preparatów, w

Tab. 1. Maksymalne ilościowe zanieczyszczenia mikrobiologiczne w badanych preparatach weterynaryjnych

Preparaty o liczbie bakterii 0-100 w 1g		Preparaty o liczbie bakterii 100-1000 w 1g		Preparaty o liczbie bakterii 1000-10000 w 1g		Preparaty o liczbie bakterii powyżej 10000 w 1g	
Preparat	liczba bakterii	Preparat	liczba bakterii	Preparat	liczba bakterii	Preparat	liczba bakterii
Aniron	0-10	Avimix	460	Carbo medic.	6300	Bovimix forte	11000
Bioferon liq.	0	Biovit	210	Hippovit extra	3030	Herbagal	1000000
Hippovit	0-10	Hippovit	470	Moromix	1900	Norkowit	4400000
Hydrocortisonum	0	Polfamix P	130	Moromix forte	5900	Tarnowet	42000
Vetiselon	0	Polfamix T	443	Polfasol AD3E	8000	Polfamix A	36000
Rumizerm	17	Polfamix T	530	Polfamix P	6800	Polfamix C	39000
Synchronogest	33	Polfasol AD3E	930	Polfamix T	2800	Polfamix dla maziór	200000
Polfasol AD3	0	Polfasol B comp.	320	Polfamix T super	4700		
Polfasol AD3E	93			Polfamix Z	1200		
Polfasol B comp.	0-10						
Polfamix T super	0						
Polfamix P-2	40						

tym zaliczone również do grupy I o minimalnych zanieczyszczeniach Polfasole, Polfamixy i Hippovit.

11 serii 9 różnych preparatów zawierało wyższe zanieczyszczenia od 1000 do 10 000 bakterii w 1 g. Są wśród nich znowu Polfamixy i Polfasole, a także Hippovit zaliczone na podstawie badania innych serii do grup o mniejszych zanieczyszczeniach. Najwyższe znalezione liczby w tej grupie to Carbo medicinalis (6300), Polfamix P (6800) i Polfasol AD3E (8000).

Do grupy IV zaliczono preparaty o zanieczyszczeniach powyżej 10 000 bakterii w 1 g. Znajduje się wśród nich 9 serii 7 różnych preparatów. Stwierdzone zanieczyszczenia wahają się od kilkudziesięciu tysięcy (Polfamix A, Polfamix C, Tannowet) do dziesiątek milionów (Herbagal, Norkowit).

Przy analizowaniu poziomu zanieczyszczeń kilku serii tego samego preparatu stwierdzono obraz bardzo zróżnicowany. Są preparaty jak np. Aniron, którego wszystkie cztery badane serie wykazują podobny bardzo niski poziom zanieczyszczeń. W innych przypadkach jak np. w preparacie Hippovit, Polfasol zanieczyszczenia w różnych seriach wahają się od kilkudziesięciu do wielu tysięcy bakterii w 1 g. Są wreszcie preparaty, w których znaleziono tylko wysokie zanieczyszczenie. Przykładami mogą być Polfamix A i C oraz Herbagal, Tannowet i Norkowit.

Wiadomo że na stan czystości mikrobiologicznej końcowej postaci leku ma wpływ wiele czynników. Wśród nich należy wymienić przede wszystkim czystość mikrobiologiczną surowców farmaceutycznych wchodzących w skład leków oraz ogólną higienę produkcji przeciwdziałającą wtórnemu skażeniu preparatu (3, 4, 5, 11, 13, 14).

Z tego powodu w badanych preparatach weterynaryjnych postanowiono zająć się badaniem zanieczyszczeń mikrobiologicznych surowców wchodzących w skład tych leków, w których stwierdzono największe zanieczyszczenie. Wybrano do tych badań preparaty Polfamix A, C i dla macior oraz leki zawierające składniki pochodzenia roślinnego: Herbagal, Tannowet i Norkowit. Tym ostatnim poświęcono szczególną uwagę, ponieważ fakt dużego skażenia mikrobiologicznego leków roślinnych jest znany i można było spodziewać się, że te właśnie składniki determinują wysokie liczby bakterii znajdowane przez nas w końcowej postaci leku (3, 4, 6, 7, 10, 15).

Większość badanych surowców wchodzących w skład Polfamixów ma bardzo niewielkie zanieczyszczenia mikrobiologiczne. Wyjątek stanowi witamina B₁₂, gdzie znaleziono bardzo wysokie liczby bakterii (45 000 w 1 g). Na następnych miejscach należy umieścić witaminę K₃ (26 000 bakterii) i witaminę D₃ (700 bakterii). Wszystkie te witaminy wchodzą w skład leków z grupy Polfamix. Drugim powodem może być przypuszczenie, że zanieczyszczenia mikrobiologiczne tych witamin mają wpływ na wysokie skażenie końcowej postaci leków. Nie jest to jednak jedyna przyczyna obecności większej ilości bakterii w lekach z grupy Polfamix. Drugim powodem może być niewłaściwa higiena produkcji, a o słuszności tego przypuszczenia świadczy stwierdzenie w niniejszych badaniach fakt bardzo różnego stopnia zanieczyszczeń mikrobiologicznych w różnych seriach tego samego preparatu (np. Hippovit, Polfasol AD3E, Polfamix P, Polfamix T).

Jak już wspomniano największe, sięgające milionów komórek bakterii w 1 g, zanieczy-

Tab. 2. Maksymalne ilościowe zanieczyszczenia mikrobiologiczne preparatów zawierających składniki pochodzenia roślinnego

Preparat	Liczba w 1 g		Składniki roślinne	Liczba w 1 g	
	bakterie	grzyby		bakterie	grzyby
Norkowit	4 400 000	1700	Owoce róży	350	300
			Owoce jarzębiny	550	700
			Owoce głogu	66 000	200
			Liście pokrzywy	800	250
			Drożdże lecznicze	2 000	400
			Ziarna pszenicy	43 000 000	2 300
Herbagal	1 000 000	10	Liście pokrzywy	800	250
			Ziele krwawnika	1 000	350
			Ziele rdestu ptasiego	8 700	10 400
			Ziele dziurawca	850	3 500
			Kwiaty rumianku	1 260 000	300
			Korzeń żywokostu	1 700	300
Tannowet	42 000	30	Kora dębu	100	550
			Ziele dziurawca	850	8 500
			Ziele tymianku	1 850	250
			Liść szatwii	16 950	1 100
			Liść orzecha włoskiego	900	300
			Kwiat lipy	2 300 000	200
			Szyszki ciemielu	26 000	1 550
			Korzeń żywokostu	1 700	300
			Kora wierzby	350	1 700

szczenia mikrobiologiczne stwierdzono w 3 preparatach zawierających składniki pochodzenia roślinnego: Tannowet, Herbagal i Norkowit. Okazało się, że część surowców farmaceutycznych wchodzących w skład wymienionych leków zawiera również ogromne liczby bakterii i sytuacja ta może rzutować w sposób podstawowy na stan czystości mikrobiologicznej końcowej postaci preparatów. W przypadku Norkowitu stwierdzono wielomilionowe zanieczyszczenie ziarn pszenicy (43 miliony w 1 g), a ponadto duże skażenie owoców głogu (66 000) i nieco niższe drożdży leczniczych (2000 tab. 2).

Przy analizowaniu czystości mikrobiologicznej składników Herbagalu zwraca uwagę wielkie skażenie kwiatów rumianku (1 260 000 w 1 g), a ponadto rdestu ptasiego (8700) i w mniejszym stopniu korzenia żywokostu (1700) i ziela krwawnika (1000). Charakterystyczne, że we własnych wcześniejszych badaniach kwiatów rumianku także stwierdzono wielkie skażenie tego surowca (10, 12, 15).

Zanieczyszczenie składników Tannowetu to przede wszystkim kwiat lipy (2 300 000 w 1 g), a następnie liść szalwii (16 950), a ponadto szyszki chmielu (26 000), korzeń żywokostu (1700) i ziele tymianku (1850).

Ponadto zwraca uwagę fakt znacznego zanieczyszczenia grzybami wszystkich analizowanych składników, w tym zwłaszcza rdestu ptasiego (10 400), dziurawca (8500), ziarn pszenicy (2300), kory wierzby (1700), szyszek chmielu (1950) i liści szalwii (1100).

W badaniach identyfikacyjnych zanieczyszczeń składników roślinnych okazało się także, że niektóre z nich zawierają drobnoustroje potencjalnie chorobotwórcze z rodziny *Enterobacteriaceae* (rodzaj *Enterobacter*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Yersinia*).

Ogółem zanieczyszczenia mikrobiologiczne w surowcach pochodzenia roślinnego są bardzo wysokie, a w pewnych punktach przekraczają nawet stopień skażenia końcowej postaci trzech analizowanych preparatów.

Porównując wyniki badań zanieczyszczeń mikrobiologicznych leków weterynaryjnych z wcześniej prowadzonymi badaniami leków stosowanych w medycynie ludzkiej można stwierdzić, że generalnie uzyskano obraz zbliżony. Część preparatów zawierających substancje pochodzenia chemicznego nie zawierała dużych ilości bakterii. Leki pochodzenia roślinnego w obu przypadkach były bardzo skażone i mogą stanowić zagrożenie zwierząt jako źródło infekcji odlekowej (10, 14, 15).

Odmienny obraz, niż w przypadku odżywek medycyny ludzkiej uzyskano w badaniu odżywek weterynaryjnych. Leki te zawierały w dużej części wielkie zanieczyszczenia mikrobiologiczne, daleko przekraczające dopuszczalne normy. Takich skażeń nie stwierdzono we własnych badaniach odżywek ludzkich (14). Wyniki badań leków weterynaryjnych oraz ich

składników, gdzie nie znaleziono wielkich zanieczyszczeń, wskazują na błędy higieny produkcji. Proces wytwarzania tych leków wymaga szczegółowej analizy.

Wnioski

1. Badane leki weterynaryjne wykazują bardzo zróżnicowany poziom zanieczyszczeń mikrobiologicznych (od 10^1 do 10^7 bakterii w 1 g).

2. Część badanych preparatów (leki roślinne i z grupy Polfamix) zawiera zanieczyszczenia mikrobiologiczne wielokrotnie przekraczające dopuszczalne normy przewidziane dla leków doustnych, co może stanowić potencjalne zagrożenie zwierząt zakażeniem odlekowym.

3. Zanieczyszczenia leków roślinnych należy wiązać ze stwierdzonym w badaniach bardzo wysokim skażeniem surowców roślinnych wchodzących w skład tych preparatów; poza wielkimi liczbami bakterii, stwierdzono w tych surowcach obecność flory potencjalnie chorobotwórczej.

4. Zanieczyszczenie leków z grupy Polfamix należy wiązać z procesem technologicznym, sprzyjającym wtórnemu skażeniu oraz rozmnażaniu drobnoustrojów; badane składniki tych leków, poza nielicznymi wyjątkami, nie zawierają większych ilości drobnoustrojów.

Piśmiennictwo

1. Dony J., Gerard P.: w Conference sur le controle de la qualite des preparations pharmaceutiques. Helsinki 1968.
2. Ennel A.: w Microbiological contamination of medical preparation. Stockholm 1965.
3. FIP: J. Mond. Pharm. 13, 147, 1970.
4. FIP: Pharm. Acta Helv. 54, 370, 1979.
5. Kallinas L. O.: Good manufacturing procedures and microbiological control for non-sterile drugs. Stockholm 1968.
6. Kedzia B., Grabowska H.: Herba Polon. 28, 61, 1982.
7. Kedzia B.: Herba Polon. 31, 83, 1985.
8. Kedzia B.: Mat. XIII Zjazdu PTFarm. Katowice 1986, s. 141.
9. Surugińska J., Tynecka Z., Cwik E.: Farm. Polska 4, 393, 1972.
10. Werakso B.: Acta Polon. Pharm. 26, 569, 1969.
11. Woźniak W.: Post. Mikrobiol. 10, 405, 1971.
12. Woźniak W.: Mikrobiologiczne metody badania leków i materiałów biologicznych. PZWL, Warszawa 1973.
13. Woźniak-Parnowska W.: Post. Mikrobiol. 19, 239, 1980.
14. Woźniak-Parnowska W.: Mikrobiologiczne skażenia leków. Warszawa 1975.
15. Woźniak W., Werakso B.: Acta Polon. Pharm. 26, 187, 1969.

Adres autora: dr Andrzej Najer, ul. Puławska 18 m 12, 02-512 Warszawa

Наер А., Бераксо В., Парновская В. — Исследование микробиологической чистоты ветеринарных средств для перорального употребления

Исследовали микробиологическую чистоту избранных ветеринарных средств для непарентерального употребления. Отметим, что часть препаратов из группы Polfamix и растительные средства содержат загрязнения, многократно превышающие допустимые нормы, и могут являться опасностью для животных, особенно отлекарственной инфекцией, так как в растительном сырье входящем в состав препаратов, нашла бактериальную флору, потенциально болезнетворную. Из исследований вытекает, что причиной высоких загрязнений растительных средств могут являться их инфицированные вещества. Загрязнения средств из группы Polfamix вытекает, вероятнее всего, из условий технологического процесса, содействующего повторной инфекции и размножению микроорганизмов.

Najer A., Werakso B., Parnowska W. — **Microbiological purity of veterinary drugs administered per os**

The microbiological purity of selected drugs applied in animals was examined. It was found that a part of the preparations of Polfamix group and

plant drugs contained the contaminations exceeding Polish norms; in plant raw material there was found the presence of potential pathogenic bacteria. Contaminated plant components were the cause of contamination and regarding the drugs of Polfamix group — the technological process.

ZYGMUNT CYGAN, JAN BUCZEK *

Immunogenność autoszczepionki Clopervac C*)

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Słowicza 2, 20-336 Lublin
* Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Zakaźna enterotoksemia prosiąt-osesków wywołana przez *C. perfringens* C, wystąpiła w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat w wielu krajach (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 14, 15, 16, 20), w tym również w Polsce (2), stając się wszędzie przyczyną poważnych strat gospodarczych, zwłaszcza w dużych chlewniach (11), do których raz zawleczona utrzymywała się długo wykazując tendencję do enzoptycznych nawrotów (17). Jedyną, ale za to skuteczną metodą zwalczania choroby stanowią szczepienia swoistym immunogenem, tj. anatoksyną beta (9). Zasadą jest podanie preparatu ciężarnym maciorom, które przekazują wówczas poprzez siarę antytoksynę wrażliwym na zachorowanie prosiętom (9, 20). Bardziej kłopotliwa w stosowaniu i mniej skuteczna jest seroterapia (9).

Pojawienie się w naszym kraju przypadków zakaźnej enterotoksemii prosiąt-osesków (2) stało się impulsem do opracowania dla Drwańskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego technologii wytwarzania autoszczepionki pod nazwą Clopervac C. Celem natomiast niniejszej pracy jest sprawdzenie jej właściwości immunogennej, dynamiki przekazywania przeciwciał z krwi do siary oraz trwałości preparatu.

Materiał i metody

Próby. Badaniom poddano próbę krwi pobrane od uodpornionych autoszczepionką Clopervac C macior (jednokrotnie i dwukrotnie, dawka 10 ml s.c., podanie w 6—7 i 3 tygodniu przed terminem porodu). W czasie śledzenia dynamiki i utrzymywania się przeciwciał w krwi macior pobierano od nich krew co 3 dni w ciągu 3 tygodni. Siarę natomiast pozyskiwano codziennie przez 5 dni, względnie jednokrotnie, ale wtedy z krwi zarówno macior, jak i pochodzących od nich prosiąt. Trwałość preparatu sprawdzano określając poziom antytoksyny beta u macior po dwukrotnym podaniu im preparatu Clopervac C (seria: 11186, czas przechowywania w 6—8°C: 0,5 i 1 rok).

Oznaczanie przeciwciał. Badanie przeprowadzono odczynem seroneutralizacji (SN) z użyciem jako reagentów odwirowanej krwi (3000 obr./min. — 15 min.) oraz siary (najpierw rozcieńczono 2× w pf. potem wirowano w 60 000 obr./min. — 1 godz.), a także toksyny beta (18-godzinna hodowla w podłożu A70

szczepu C₉₆ *C. perfringens* C, wirowana przy 4500 obr./min.). Aktywność jadu beta określano w DLM₁₀₀/ml (dawka i.p. dla myszy 0,5 ml, okres obserwacji zwierząt 24 godz.). Czas wiązania reagentów wynosił 1 godz. w 37°C, wyniki wyrażano liczbą jednostek antytoksyny zawartych w ml (1 jedn. antyt. = najwyższe rozcieńczenie zobojętniające 1 dawkę DLM₁₀₀ toksyny).

Wyniki i omówienie

Ogółem zbadano 227 prób pobranego materiału, w tym 187 próbek krwi (od 167 macior i 20 prosiąt) oraz 40 — siary. Wzbudzony podaniem autoszczepionki Clopervac C poziom antytoksyny przeciwko jadowi beta wahał się we krwi macior oraz prosiąt od 4 do 1280 jedn. antyt./ml (tab. 1). W większości przypadków gdyż u 128 zwierząt (ok. 68%), mieścił się w przedziale aktywności wynoszącej 32—320 jedn. antyt./ml. Zatem immunogenność preparatu należy uznać za dobrą mimo stymulowania odporności zróżnicowanej, ale za to powstałej u wszystkich zwierząt, a u większości z nich wynoszącej 32 jedn. antyt./ml.

Indukowaną u macior — podaniem szczepionki — koncentrację swoistej antytoksyny i czas utrzymywania się jej we krwi ilustrują ryc. 1 i 2. Wynika z nich, że odporność przy dwukrotnej immunizacji narasta z wyższego pułapu (32 — 320 jedn. antyt./ml) i dłużej utrzymuje się na wysokim poziomie (u macior M₂ i M₁ wynosiła w 21 dniu jeszcze 80—160 jedn. antyt./ml), podczas gdy osiągnięta jednorazową wakcynacją była zwykle niższa (8—160 jedn./ml, w 3 tyg. od 4 do 8 jedn.). Poza tym przechodzenie antytoksyny z krwi do siary, a potem przekazywanej prosiętom, nie doprowadzało nigdy do zaniku odporności u ma-

Tab. 1. Poziom antytoksyny przeciwko jadowi beta we krwi immunizowanych macior i prosiąt

Użytkowość hodowlana zwierząt	Ogółem prób	Poziom antytoksyny epsilon (w jedn. ant./ml)									
		4	8	16	32	80	160	320	640	1280	
Maciora	167	20*	8	14	46	27	15	26	9	2	
Prosię	20	6			2		2	10			
	187	26	8	14	48	27	17	36	9	2	
										128	

*) Praca wykonana w problemie RR-24