

ZDZISŁAW GLIŃSKI, LASSI KAUKO *, GRZEGORZ J. GACEK

Badania nad pozostałością oksytetracykliny w miodach konsumpcyjnych z pasiek leczonych przeciwko zgnilcowi złośliwemu

Pracownia Chorób Owadów Użytkowych Wydziału Weterynaryjnego AR,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

* College of Veterinary Medicine Hameentie 57, SF 00550 Helsinki, Finlandia

Summary

Oxytetracycline residues in surplus honey from bee colonies treated against American foulbrood

Oxytetracycline (Terramycin) medicated sirup, extender patties or dust have been shown to be effective in controlling of American foulbrood in bee colonies in Finland and in Poland. No residues of oxytetracycline were found in surplus honey from 103 randomly chosen colonies treated with the antibiotic at doses from 150 to 600 mg/colony. The therapy should start at least 30 days before honey extraction to avoid contamination of this food product with oxytetracycline.

A high performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect oxytetracycline in honey samples. The separation was performed on a steel column packed with Li Chromosorb RP-10 (10 μ m) with methanol-acetonitrile-0.01 N aqueous hydrochloric acid (1:1:4) as the mobile phase at a flow rate of 0.7 ml/min at room temperature. 0.1 g sample of honey was dissolved in 20 ml of 0.1 M Na₂EDTA-Mc Ilwain buffer (pH 4.0) and cleaned to remove many peaks of interfering substances appearing in honey. The detection limits is 0.02 ppm for oxytetracycline in honey.

Pozostałości środków leczniczych w produktach spożywczych ciągle budzą zainteresowanie specjalistów od żywienia, producentów leków, lekarzy medycyny i weterynarii. Zdrowa żywność nie powinna bowiem zawierać aktywnych substancji pochodzenia egzogenne, które wywierają ujemny wpływ na zdrowie człowieka. Za bezsporną zasadę należy przyjąć, że pozostałości antybiotyków nie powinny w ogóle znajdować się w surowcach żywnościowych (23). Ta zasada odnosi się także do miodu, który jest składową wielu diet pokarmowych.

Jednym z czynników umożliwiających uniknięcie zanieczyszczenia miodu lekami jest wykorzystanie w terapii chorób pszczół preparatów, które ulegają szybkiej biodegradacji w miodzie na składniki obojętne dla organizmu konsumenta, rygorystyczne przestrzeganie okresu karencji leku, a także dobór takiej formy stosowania leku, która ogranicza do minimum możliwość jego przedostania się do miodu. Do bardzo skutecznych w zwalczaniu chorób bakteryjnych czerwia pszczoły miodnej, a jednocześnie bezpiecznych antybiotyków, które stosowane w dawkach leczniczych nie zanieczyszczają miodu (17, 24) lub ich zawartość w miodzie jest minimalna, należą tetracykliny zwłaszcza oksytetracyklina. Antybiotyk ten jest coraz częściej stosowany w wielu krajach w terapii zgnilca złośliwego. Przyjęto, że dawka oksytetracykliny wynosząca 400 mg/rodzina w formie pakietu i 200 mg/rodzina w formie opylania czerwia na plastrach cukrem pudrem z antybiotykiem zastosowane na jeden miesiąc przed odwirowaniem miodu powoduje bardzo nieznaczne zanieczyszczenie miodu. W miodzie pochodzącym z rodzin, w których zastosowano oksytetracyklinę w dawce 400 mg jej pozostałość nie przekraczała 0,5 ppm, zaś w dawce 200 mg w formie opylania czerwia pozostałości anty-

biotyków wahały się w granicach 1,1—3,5 ppm. Nie stwierdzono obecności antybiotyku w miodach pochodzących z rodzin, w których czerw opylono cukrem pudrem z dodatkiem antybiotyku (200 mg/rodzina) lub rodzinę podkarmiono syropem leczniczym (200 mg/2,5l/rodzina) (17). Stwierdzono przy tym, że oksytetracyklina szybko traci aktywność w syropie cukrowym zarówno w temperaturze 32° i 39°C (14).

Jednakże inni autorzy podają, że czas degradacji oksytetracykliny w miodzie i w syropie jest różny (4, 22) i że zależy on ściśle od pH środowiska i temperatury. Biologiczny okres półtrwania dla oksytetracykliny w 50% wodnym roztworze miodu o pH 3,2 w temperaturze 30°C wynosi 68 godz., zaś w miodzie o pH 3,7 w tej samej temperaturze aż 330 godz. W warunkach ula wykazano obecność tego antybiotyku w miodzie po 6—9 tygodniach (5, 7).

Celem badań przeprowadzonych w pasiekach w Finlandii i w Polsce było oznaczenie pozostałości oksytetracykliny w miodach konsumpcyjnych po leczeniu klinicznych postaci zgnilca złośliwego czerwia różnymi dawkami antybiotyku podanego różnymi metodami.

Materiał i metody

Przebadano 61 próbek miodu konsumpcyjnego wybranych losowo z 21 pasiek usytuowanych na terenie Finlandii i 42 próbki miodu wybrane losowo z 4 pasiek znajdujących się na terenie Polski, w których w celu likwidacji zgnilca złośliwego zastosowano oksytetracyklinę (Terramycin, Pfizer 5,5% powdered). W rodzinach z klinicznymi objawami zgnilca antybiotyk podawano w Finlandii w formie podkarmiania rodzin syropem cukrowym zawierającym 300 mg (10 rodzin) lub 600 mg (20 rodzin) antybiotyku, w formie opylania czerwia na plastrach cukrem z dodatkiem antybiotyku 150 mg (10 rodzin) lub 350 mg (10 rodzin) antybiotyku lub pakietów zawierających ciasto miodowo-cukrowe z dodatkiem 350 mg antybiotyku (11 rodzin). W siedmiu rodzinach oprócz tetracykliny zastosowano Perizin w celu likwidacji warrozy, w dwóch Fumidil B, a w trzech tymol. Leczenia nie poprzedzono przesiedlaniem i odkażaniem.

W Polsce oksytetracyklinę stosowano do podkarmiania w 50% syropie cukrowym w dawce 350 mg (21 rodzin) i 500 mg (21 rodzin) jednorazowo po podwójnym przesiedleniu rodziny. Celem przesiedlenia było zmniejszenie ekspozycji czerwia na zakażenie endosporami *Bacillus larvae* i usunięcie tego zarazka z przewodu pokarmowego pszczół. Niezależnie od pory roku (wczesna wiosna, lato) leczenie przeprowadzono na 28—30 dni przed wirowaniem miodu. Oznaczenia pozostałości oksytetracykliny w miodach wykonano po 30 dniach od chwili pobrania próbek, które przechowywano w temperaturze pokojowej.

Do wykrywania oksytetracykliny i jej pochodnych w miodach zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) stosując chromatograf cieczowy (Pharmacia LKB) z integratorem. Rozdziel przednio przygotowanej próbki miodu przeprowadzono na stalowej kolumnie (0,4 × 25) wypełnionej Li Chromosorb RP-18 (10 μ m) w 18°C stosując jako fazę ruchomą metanol-acetonitryl-HCl (1:1:4) przy przepływie fazy 0,7 ml/min. Detekcję przeprowadzono przy długości fali 370 nm. Na kolumnę наносono 10 μ l próbki (1 g miodu + 20 ml 0,1 M Na₂ EDTA-bufor Mc Ilwain'a pH 4), którą oczyszczono metodą Hisao Oka (15). Czulość metody wynosi 0,02 μ g/g miodu dla oksytetracykliny i tetra-

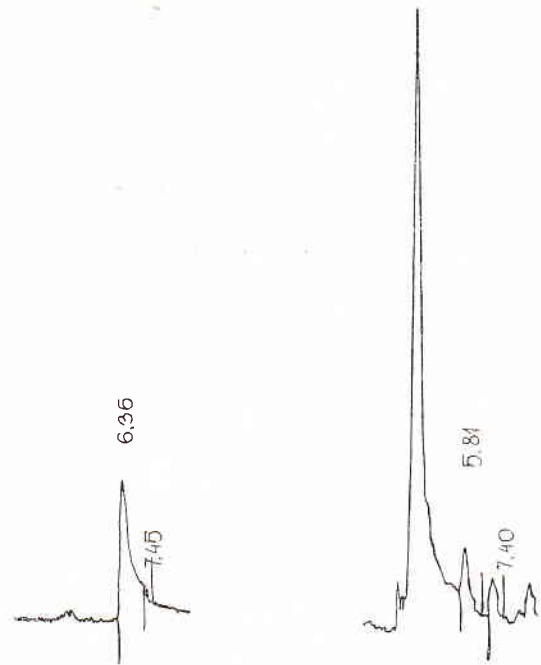
cykliny oraz 0,05 µg/g miodu dla chlorotetracykliny i doksy-cykliny. Kontrolę stanowił miód pochodzący z rodzin nie leczonych antybiotykiem (po 5 próbek z każdego kraju) oraz miód o znanej zawartości oksytetracykliny (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 3,0 ppm).

Wyniki i omówienie

Wzrost przypadków zgnilca złośliwego w pasiekach porażonych przez *Varroa jacobsoni*, będący następstwem zarówno przenoszenia zakażenia przez pasożytujące roz-tocza (12), jak i obniżenia stanu odporności czerwia w przebiegu inwazji (8, 9, 10, 11), spowodował ponowne zainteresowanie metodami zwalczania tej choroby. Nie-objęte znaczenie ma przy tym postępujące zwiększe-nie odsetków szczepów *B. larvae* opornych na sulfona-midy (2, 20) i mieszanki sulfonamidowe (13, 18), a także kilkunastomiesięczny okres utrzymywania się sulfona-midów w miodzie. Terapia zgnilca złośliwego przy użyciu oksytetracykliny, będącej lekiem z wyboru w wielu krajach, budzi nadal pewne kontrowersje. Doty-czą one dwóch zagadnień: możliwości zanieczyszczenia miodu przeznaczanego do konsumpcji przez antybioty-k stosowany w dawce terapeutycznej oraz czasu biodegra-dacji i metod wykrywania pozostałości oksytetracykliny w miodzie. Dodatkowym czynnikiem, który limituje skuteczność antybiotykoterapii jest przeprowadzenie zabiegów higieniczno-sanitarnych, takich jak: prze-siedlanie i odkażanie przed leczeniem antybiotykiem.

Oksytetracyklina w użytych dawkach (150—600 mg/rodzina) i metodach podawania leku (podkarmianie syropem leczniczym, opylanie czerwia i pszczoł cukrem pudrem z dodatkiem antybiotyku, pakiety z ciasta miodowo-cukrowego z antybiotykiem) okazała się skutecznym lekiem. Jednorazowe podanie antybiotyku, niezależnie od uprzedniego przesiedlenia, prowadziło do ustąpienia objawów zgnilca złośliwego. Do końca sezo-nu pasiecznego w 1990 r. nie zaobserwowano nawrotu choroby w leczonych pasiekach. Co więcej, nawet naj-wyższa dawka oksytetracykliny nie wpływała ujemnie na biologię rodziny, rozwój czerwia i czerwienie matki.

W ocenie leków stosowanych w chorobach zakaż-nych czerwia i pszczoł, oprócz efektywności preparatu w stosunku do czynnika etiologicznego choroby, bardzo ważną rolę odgrywa przedostawanie się leku do miodu oraz możliwość wykrycia jego pozostałości w miodzie. Spośród wielu metod wykorzystywanych do wykrywa-nia i określania stężenia oksytetracykliny w miodzie największe znaczenie mają metody mikrobiologiczne (14) i chromatograficzne (16, 19). Metody mikrobiologiczne wykorzystując selektywną wrażliwość określonych szczepów bakteryjnych na oksytetracyklinę i biologicznie aktywne produkty jej rozpadu umożliwiają wykry-cie w miodzie antybiotyku łącznie z produktami jego rozkładu o działaniu przeciwbakteryjnym (19, 21). Nie-dogodnością tej metody jest stosunkowo mała czułość (19), próg wykrywalności wynosi 0,2 µg oksytetracykli-ny/g miodu, niezbyt wielka powtarzalność wyników oraz fakt, że przy jej pomocy nie można wykryć nie-aktywnych biologicznie produktów rozkładu antybio-tyku, ponadto na wyniki oznaczeń może niekorzystnie wpływać obecność naturalnych inhibitorów w miodzie (19). Najwyższą czułość przy niemal 100% powtarzal-ności posiadają metody chromatograficzne, zwłaszcza HPLC (16). Próg wykrywalności antybiotyku ulega znacznemu obniżeniu po oczyszczeniu próbki miodu przed rozdziałem chromatograficznym. Zastosowana w badaniach metoda oczyszczania wg Hisao Oka (15)



Ryc. 1. Typowy chromatogram HPLC standardu chlorowodoru oksytetracykliny $t_R = 6,36$ (1) i próbki miodu (2)

zwiększa czułość metody około 10 razy, umożliwiając tym samym wykrycie aż 0,05 µg oksytetracykliny w jednym gramie miodu. W próbkach miodu nie oczyszczonych wynosił około 0,5 µg oksytetracykliny na gram miodu.

W żadnej ze 103 próbek miodu pobranych losowo z miodu odwirowanego po 28—30 dniach od momentu podania leku i oznaczonych po dalszych 30 dniach przechowywania miodu w temperaturze 18° nie stwierdzono metodą HPLC nawet śladowych ilości oksyte-tracykliny i jej pochodnych (ryc. 1). Tak więc miód pochodzący z leczonych rodzin z Finlandii i z Polski może być uznany za wolny od pozostałości oksytetra-cykliny i produktów rozpadu tego antybiotyku, zwrósz-cza apoterramycyny (22). Brak antybiotyku w miodzie jest efektem zarówno przeprowadzenia leczenia na 28—30 dni przed wirowaniem miodu, okresem czasu, jaki upłynął od momentu leczenia do chwili oznacze-nia pozostałości antybiotyku (około 60 dni), tempera-tury przetrzymywania miodu (temperatura ula, a na-stępnie temperatura pokojowa) oraz faktem, że naj-wyższa maksymalna dawka antybiotyku przewyższała tylko o około 100% średnią zalecaną dawkę tera-peutyczną (250—300 mg). Wśród czynników od których zależy szybkość rozkładu oksytetracykliny najważniej-sze znaczenie ma środowisko (miód, syrop), jego pH oraz temperatura i czas przechowywania. Gilliam i wsp. (6), badając metodą fluorometryczną (1) stabil-ność terramycyny w syropie i w miodzie w doświad-czalnych rodzinach i warunkach ula wykazali, że tera-ramycyna całkowicie rozkłada się w syropie cukrowym w temperaturze gniazda po 3—5 tyg. w zapasach miodu po 5—6 tyg. po podkarmianiu rodzin syropem z dodat-kiem 0,3 g/100 ml. Chociaż stężenie antybiotyku było znacznie większe w miodzie aniżeli w syropie, to jed-nak szybkość jego biodegradacji w obydwu przypad-kach była bardzo zbliżona. W miodzie z leczonych pa-siek terramycyny nie wykryto po 6—9 tyg. po zaprze-staniu leczenia trwającego około 2 tyg. Zauważalna, nieznaczniejsza fluorescencja miodu pochodzącego z leczonych rodzin obserwowana po 18 tyg. po zaprze-staniu leczenia nie pochodziła od aktywnej biologicznie

formy antybiotyku (3). Te opisane różnice w stabilności oksytetracykliny w syropie i w miodzie można wyjaśnić wpływem pH, ciśnienia osmotycznego i właściwościami buforującymi miodu, które przedłużają stabilność antybiotyku. Gohnauer i Bland (14) obserwowali znacznie krótszy czas rozpadu oksytetracykliny w syropie z rodzin leczonych identyczną dawką. Stosując metodę mikrobiologiczną z użyciem *B. subtilis* nie wykazali obecności antybiotyku już po dwóch tygodniach po leczeniu.

W warunkach ula, z reguły zanieczyszczeniu antybiotykiem ulega miód w plastrach gniazdowych. Miód poza gniazdem jest wolny od zanieczyszczeń niezależnie od metody stosowania antybiotyku, czasu trwania leczenia i okresu w sezonie pasiecznym, w którym przeprowadzono leczenie (4, 24). Zarówno wykonanie przesiedlenia przed leczeniem, jak i stosowanie leków przeciwko warracie i nozemozie nie wpływało negatywnie na pozostałość oksytetracykliny w miodzie i na oznaczenia zawartości antybiotyku wykonane metodą HPLC.

Wnioski

1. Miód konsumpcyjny pochodzący z rodzin leczonych oksytetracykliną w jednorazowej dawce 150—600 mg/rodzina zebrany po około miesiąca po rozpoczęciu leczenia i przetrzymywany przez 30 dni w temp. pokojowej nie zawiera pozostałości antybiotyku.

2. W terapii zgnilca złośliwego przy użyciu oksytetracykliny należy leczenie rozpocząć na co najmniej 30 dni przed wirowaniem miodu, stosując najmniejszą efektywną dawkę antybiotyku.

3. Ze względu na fakt, że tetracykliny są coraz powszechniej stosowane w leczeniu chorób zakaźnych

czewia w wielu krajach badanie miodu konsumpcyjnego na pozostałość tetracyklin i produktów ich biodegradacji jest konieczne ze względu na ochronę zdrowia człowieka.

Piśmiennictwo

1. Arguer R. J., Gilliam M.: *J. Invert. Path.* 23, 51, 1974.
2. Brizard A., Delorme G., Albisetti J.: *Annls Abeille* 7, 13, 1954.
3. Day S. T., Crouthamel W. G., Martinelli L. C., Ma J. K. H.: *J. Pharmac. Sci* 67, 1518, 1978.
4. Gilliam M., Arguer J. M.: *Amer. Bee J.* 115, 230, 1975.
5. Gilliam M., Arguer J. M.: *J. Environ. Entomol.* 10, 479, 1981.
6. Gilliam M., Taber III S., Arguer R. J.: *Amer. Bee J.* 119, 720, 722, 723, 1979.
7. Gilliam M., Taber III S., Arguer R. J.: *J. Apicult. res.* 18, 208, 1979.
8. Gliński Z., Klimont S.: *Medycyna Wet.* 43, 664, 1987.
9. Gliński Z., Klimont S.: *Annls Univ. Mariae Curie Skłodowska Sect. DD*, 42, 1, 1987.
10. Gliński Z., Jarosz J.: *Apidologie* 15, 329, 1984.
11. Gliński Z., Jarosz J.: *Folia vet.* 32, 29, 1988.
12. Gliński Z., Jarosz J.: *XVIII Int. Congr. Entomol., Vancouver*, 7, 245, 1988.
13. Gliński Z., Rzedzicki J.: *Pol. Arch. Wet.* 20, 9, 1977.
14. Gohnauer T. A., Bland S. E.: *J. Apicult. Res.* 13, 153, 1974.
15. Hisao Oka, Yoshimoto I., Narihisa K., Keiichi U., Masuo Y.: *J. Chromat.* 389, 417, 1987.
16. Khan N. H., Roets E., Hoogmartens J., Vanderhaeghe H.: *J. Chromat.* 465, 229, 1987.
17. Lehnert T., Shimanuki H.: *Apidologie* 12, 133, 1981.
18. Olszewski O.: *Pszczelarstwo* 24, 9, 1973.
19. Roth L., Kwan S., Sporn P.: *J. Fd Prot.* 9, 435, 1986.
20. Schulz-Langer E.: *Zool. Beitr.* 5, 393, 1960.
21. Schwartzman G., Wyland L., Alexander T., Furnkranz K., Selzer G.: *Chlorotetracycline hydrochloride*, w: *Analytical profiles of drug substances*, red. K. Florey, t. 2, Academic Press, NY, San Francisco 1979.
22. Sporn P., Kwan S., Roth L. A.: *J. Fd Prot.* 49, 383, 1986.
23. Tropito J., Szulc M., Leszczyńska K.: *Roczniki PZH* 36, 207, 1985.
24. Wilson W. T.: *Environ. Entomol.* 3, 674, 1974.

Adres autora: prof. dr habil. Zdzisław Gliński, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

ZYGMUNT PEJSAK

Paławy

Nowsze dane nt. mykoplazmowego zapalenia płuc u świń

Mykoplazmowe zapalenie płuc u świń — mycoplasmal pneumonia of swine (MPS) — jest zakaźną chorobą układu oddechowego świń, charakteryzującą się dużą zachorowalnością, natomiast małą śmiertelnością (45, 52, 55). Pierwotnym czynnikiem etiologicznym tej choroby jest *Mycoplasma hyopneumoniae* — Mhp (34, 55). W przeszłości chorobę nazywano enzoptyczną pneumonią, tzw. grypą świń lub enzoptycznym odoskrzelowym zapaleniem płuc prosiąt i warchlaków.

W ostatnich latach uzyskano nowe dane nt. czynnika chorobowego, patogeny oraz zwalczania MPS; opracowano również doskonalsze metody diagnostyki laboratoryjnej tej choroby. Znaczenie i aktualność MPS uzasadniają celowość przedstawienia tych danych.

Występowanie i straty

Mykoplazmowe zapalenie płuc jest najczęściej występującą chorobą układu oddechowego świń (22, 23, 25, 50). Opublikowane ostatnio wyniki badań epizootycznych wskazały, że w 99% ferm, znajdujących się na

terenie 13 rolniczych stanów USA odchowywane są tuczniaki, które przechorowały MPS (50). Przeprowadzone w rzeźniach amerykańskich badania poubojowe dowiodły, że zmiany typowe dla omawianego schorzenia stwierdza się u 30—80% ubijanych tuczniaków (45). W Wielkiej Brytanii wykazano (24), że w chlewniach, w których objawy kliniczne ze strony układu oddechowego wyrażone są w niewielkim stopniu, w badaniach poubojowych u 10—20% tuczniaków obserwuje się zmiany typowe dla MPS; tam, gdzie objawy chorobowe nasilone są średnio — zmiany sekcyjne charakterystyczne dla MPS stwierdza się u 40—60% świń; w gospodarstwach, gdzie symptomy choroby ze strony układu oddechowego występują u przeważającej liczby zwierząt — zmiany w płucach typowe dla MPS rejestruje się u 75—90% ubijanych zwierząt.

Badania Straw i wsp. (50) wskazują, że obecność oraz zakres zmian w płucach skorelowane są z zahamowaniem tempa przyrostów masy ciała (m.c.) świń. Jak wynika z pracy cytowanej autorki zwiększenie się powierzchni ognisk zapalnych w płucach o 10% prowadzi