

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXV, 12

SECTIO DD

1970

Z Katedry Farmakologii Wydziału Weterynaryjnego WSR w Lublinie
Kierownik: prof. dr habil. Grzegorz Staśkiewicz

Grzegorz STAŚKIEWICZ, Zbigniew ROLINSKI,
Elżbieta CHOJECKA

**Oznaczanie pozostałości antybiotyku w tkankach i płynach ustrojowych
cieląt po podawaniu z karmą oksytetracyliny (OTC) paszowej „Polfa”**

Определение остатков антибиотика в тканях и органических жидкостях телят
после кормления их кормом с окситетрациклином „Polfa”

Determination of Antibiotic Residues in Tissues and Organic Fluids of Calves
after the Administration of Fodder Oxytetracycline "Polfa"

Zagadnienie niemedycznego stosowania antybiotyków w Polsce jest stale aktualne, ponieważ do szeregu mieszanek pasz treściwych dodawana jest oksytetracylina w ilości 30 mg/kg paszy. Komitet ekspertów do spraw niemedycznego stosowania antybiotyków zaleca dodawanie ich w ilości 20—50 g/tonę paszy (4). Jest to ilość, która zazwyczaj nie powoduje występowania pozostałości antybiotyków w tkankach zwierząt powyżej dopuszczalnych norm.

Dotychczasowe badania wykonane w Katedrze Farmakologii WSR w Lublinie (5, 6) nie wykazały stężeń OTC powyżej dopuszczalnej normy — 1 ppm w tkankach kurcząt i prosiąt po stosowaniu oksytetracyliny paszowej „Polfa” w dawce 20 i 100 mg/kg paszy, w przeliczeniu na OTC zasadę.

Celem niniejszych badań było: 1) oznaczanie odzyskiwania znanych ilości OTC z tkanek; 2) oznaczanie poziomu OTC w tkankach i płynach ustrojowych cieląt w trakcie podawania oksytetracyliny paszowej przez 30 dni oraz 3) ewentualne stwierdzenie pozostałości OTC po zaprzestaniu podawania preparatu.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzano z preparatem pod nazwą „oksyterracyna paszowa z grzybnią”, produkcji Pabianickich Zakładów Farmaceutycznych „Polfi”. Wg deklaracji producenta preparat zawiera 10% oksyterracyny zasady.

Badania wykonano na 12 cielętach rasy n.c.z.b. w wieku 3–4 tygodni i wadze od 52 do 62 kg (w dniu rozpoczęcia badań). Cielęta podzielono na 2 grupy:

I grupa—6 szt. cieląt—otrzymywała codziennie z mlekiem 200 mg oksyterracyny paszowej na 1 kg mleka (= 20 mg OTC),

II grupa—6 szt. cieląt—otrzymywała codziennie z mlekiem 1000 mg oksyterracyny paszowej na 1 kg mleka (= 100 mg OTC).

W trakcie doświadczenia cielęta żywiono w sposób następujący: przez 15 dni mleko pełne—6 litrów, mleko chude—3 litry; przez dalsze 15 dni mleko pełne—6 litrów, mleko chude—3 litry oraz otręby pszenne—od 10 do 20 dkg na sztukę dziennie i siano *ad libitum*.

Cielęta z obu grup, po 1 sztuce, poddawano ubojowi na 10, 20 i 30 dzień podawania z mlekiem OTC paszowej oraz na 2, 4 i 8 dzień po zaprzestaniu dodawania antybiotyku do karmy.

Zawartość OTC oznaczano w mięśniach szkieletowych (partie mięśni przodu i zadu), w wątrobie, śledzionie, nerkach, moczu i żółci metodą dyfuzji w agarze.

Oznaczanie stężeń OTC wykonano (z nieznacznymi modyfikacjami) wg metody Grove i Randall'a (2). Każdorazowo dla świeżo przygotowanej zawiesiny zarodników *Bac. cereus* 8145 określano na płytkach, jaka ilość zawiesiny wykazuje dostateczną wrażliwość na OTC zasadę w stężeniu 0,025–0,05 mcg/ml. Odpowiednią wrażliwość uzyskiwano, gdy inoculum wynosiło 0,1%.

Jako standardu użyto OTC zasady o mocy 900 mcg/ml, którą otrzymano z Instytutu Leków w Warszawie. Ze standardu OTC zasady przygotowywano, przez rozpuszczenie w 0,01 n HCl, roztwór podstawowy zawierający 1000 mcg w 1 ml.

Dla wykreślenia krzywej standardowej z podstawowego roztworu OTC zasady wykonywano dalsze rozcieńczenia robocze (0,4; 0,2; 0,1; 0,05 i 0,025 mcg/ml) przy użyciu mieszaniny cytrynianowo-acetonowej (3). Krzywą standardową wykreślano analogicznie jak w pracy poprzedniej (5).

WYNIKI

Odzyskiwanie znanych ilości OTC z tkanek. Do prób tych używano tkanek cieląt, które nie otrzymywały OTC. W celu określenia stopnia odzyskiwania OTC z tkanek ekstrahowano oksyterracynę zasadę, której ściśle określone ilości w przeliczeniu na 1 g tkanki dodawano do próby. Próby na odzyskiwanie przeprowadzano w analogiczny sposób jak w pracy wcześniejszej (5).

W badaniach kontrolnych nastawiano kontrolę negatywną, z odpowiednią tkanką cielęcą bez antybiotyku, z dodatkiem mieszaniny cytrynianowo-acetonowej. Badania kontrolne dawały zawsze wynik negatywny. Wyniki przedstawiono w tab. 1.

Tab. 1. Ilości OTC odzyskiwane z tkanek cieląt
 OTC amounts extracted from the tissues of calves

Ilość dodanego OTC na 1 g tkanki	Próba nr	Rodzaj tkanki			
		<i>m. gluteus medius</i>		wątroba	
		Odzyskano		Odzyskano	
		mcg	%	mcg	%
0,8 mcg/g	1	0,84	100,5	b. h.	
	2	0,60	75,0	b. h.	
	3	0,66	82,5	b. h.	
		Średnio	0,70	Średnio	86,0
1,6 mcg/g	1	1,26	78,0	0,58	35,0
	2	1,27	79,0	0,63	39,0
	3	1,32	82,0	0,55	34,0
		Średnio	1,28	Średnio	79,60
				Średnio	0,59
	1				34,0
	2	Oznaczeń nie wykonano		1,16	36,0
	3			1,05	32,0
				Średnio	1,10
				Średnio	34,0

b. h. — brak hamowania drobnoustroju testowego

b. h. — test micro-organism not inhibited

Tab. 2. Zawartość OTC w tkankach i płynach ustrojowych cieląt po 10, 20 i 30 dniach podawania oksytetracyliny paszowej „Polfa”
 OTC content in tissues and organic fluids of calves after 10, 20 and 30 days of the administration of fodder oxytetracine “Polfa”

Dawka w mg/kg mleka	Dni	Kontrola negatywna	Zawartość OTC w mcg/g tkanki lub w mcg/ml płynu ustrojowego						
			<i>m. sub- scapu- laris</i>	<i>m. glu- teus medius</i>	śledziona	wątroba	żółć	nerka	mocz
200	10	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.
1000		b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	0,08	0,02
200	20	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	—	—	—
1000		b. h.	0,13	0,18	0,10	b. h.	b. h.	0,20	0,10
200	30	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.
1000		b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.

b. h. — brak hamowania drobnoustroju testowego.

b. h. — test micro-organism not inhibited.

Wykazano znaczny procent odzyskiwania OTC z tkanki mięśniowej, średnio w granicach 79,6—86%, i mniejsze odzyskiwanie OTC z tkanki wątrobowej, średnio w granicach 34—36%.

Stężenia OTC w tkankach cieląt po podawaniu antybiotyku z karmą przez 30 dni. Cielęta zabijano po 10, 20 i 30 dniach po jednej sztuce z każdej grupy. Próbkę materiału do badań pobierano bezpośrednio po zabiciu cieląt, gromadząc i przechowując do momentu rozpoczęcia oznaczeń w temperaturze $\pm 4^{\circ}$. Próby tkanek rozcierano w moździerzu z jałowym piaskiem, po czym dodawano porcjami mieszaninę cytrynianowo-acetonową w ilości 1 ml na 1 g tkanki, rozcierano z płynem przez 10 minut i pozostawiano w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ przez 20 minut. Następnie próby wirowano i sączone przez bibułę, po czym określano stężenia OTC analogicznie jak w pracy wcześniejszej (5). Stężenia antybiotyku w płynach ustrojowych (moczu i żółci) określano bez uprzedniego rozcieńczania. Wyniki przedstawiono w tab. 2.

Przy dodatku OTC paszowej w ilości 200 mg/kg mleka w trakcie stosowania u cieląt przez 30 dni nie stwierdzono antybiotyku ani w badanych tkankach, ani w płynach ustrojowych. Żywienie cieląt mlekiem z dodatkiem 1000 mg OTC paszowej na 1 kg przez 30 dni powodowało występowanie antybiotyku w próbach nerek oraz moczu tylko u jednego cielęcia po 10 dniach podawania oraz w mięśniach, śledzionie, nerkach i moczu u cielęcia zabitego po 20 dniach. Najwyższe stężenie OTC, wynoszące 0,2 mcg/g tkanki, stwierdzono w nerce. W próbach wątroby i żółci nie wykrywano antybiotyku.

Zanikanie OTC z tkanek i płynów ustrojowych cieląt. Po zaprzestaniu podawania OTC paszowej z mlekiem po 30 dniach oznaczano ewentualne pozostałości antybiotyku na 2, 4 i 8 dzień od przerwania podawania OTC z mlekiem. Oznaczenia wykonano analogicznie jak poprzednio. Wyniki oznaczeń podano w tab. 3.

Badania nad zanikaniem OTC z tkanek i płynów ustrojowych cieląt nie wykazały antybiotyku na wykrywalnym poziomie w badanych próbach tkanek i płynów ustrojowych.

Wg przepisów amerykańskich (1) dopuszczalne pozostałości dla chlotetracykliny w surowych tkankach cieląt żywionych karmą z dodatkiem tego antybiotyku wynoszą: wątroba i nerki—4 ppm, mięśnie i tłuszcz—1 ppm. Uwzględniając niekompletne odzyskiwanie antybiotyku z tkanek (79,6—86%), należy przyjąć, że 2-dniowy okres od zaprzestania podawania OTC paszowej z mlekiem u cieląt, w dawce 200 i 1000 mg/kg do momentu uboju, jest wystarczający do zaniku antybiotyku z tkanek poniżej dopuszczalnej normy.

Tab. 3. Zanikanie OTC z tkanek i płynów ustrojowych cieląt po 2, 4 i 8 dniach od zaprzestania podawania oksytetracyliny paszowej z mlekiem

Disappearance of OTC from tissues and organic fluids of calves after 2, 4 and 8 days following the stopping of administration of fodder oxytetracycline with milk

Dawka w mg/kg mleka	Dni	Kontrola negatywna	Zawartość OTC w mcg/g tkanki lub mcg/ml płynu ustrojowego						
			<i>m. sub- scapu- laris</i>	<i>m. glu- teus medius</i>	śledziona	wątroba	żółć	nerka	mocz
200	2	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.
1000		b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.
200	4	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.
1000		b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.
200	8	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.
1000		b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.	b. h.

b. h. — brak hamowania drobnoustroju testowego.

b. h. — test micro-organism not inhibited.

WNIOSKI

Przeprowadzone badania wskazują na to, że dodatek OTC paszowej w ilości 200 mg/kg mleka stosowany przez 30 dni nie powodował utrzymywania się antybiotyku na wykrywalnym poziomie w badanych tkankach i płynach ustrojowych.

Po dodawaniu do mleka OTC paszowej w ilości 1000 mg/kg mleka wykazano antybiotyk w próbach nerek oraz moczu jednego cielęcia oraz mięśniach, śledzionie, nerkach i moczu drugiego. Stwierdzone ilości antybiotyku w badanych próbach po dawce 1000 mg OTC paszowej na kg mleka nie przekraczały dopuszczalnej normy.

Po wstrzymaniu dodawania OTC paszowej do mleka na 2, 4 i 8 dzień nie wykrywano pozostałości antybiotyku w badanych tkankach i płynach ustrojowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Code of Federal Regulations, New York. January, 1, 1965.
2. Grove D. C., Randall A.: Assay Methods of Antibiotics. A Laboratory Manual. Medical Encyclopedia, Inc, New York 1955.
3. Rutczyńska-Skonieczna E.: Ilościowe oznaczanie antybiotyków z grupy tetracyklin, używanych do konserwowania mięsa. Roczniki PZH, 15, 153—165, 1964.
4. Sarkisow A. Ch.: Konferencja genewska o problemach niemiedycznego stosowania antybiotyków. Med. Wet., 21, 175—177, 1965.
5. Staśkiewicz G., Roliński Z.: Oznaczanie pozostałości antybiotyku w tkankach i płynach ustrojowych kurcząt po podawaniu oksytetracyliny paszowej „Polfa” Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio DD, vol. XXIV (1969), 17, Lublin 1971.
6. Staśkiewicz G., Roliński Z.: Oznaczanie pozostałości antybiotyku w tkankach i płynach ustrojowych prosiąt po podawaniu z karmą oksytetracyliny paszowej „Polfa”. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio DD, vol. XXV, 3, Lublin 1970.

РЕЗЮМЕ

Исследования проводили на 12 телятах голландской породы в возрасте от 3 до 4 недель и весом от 52 до 62 кг. Телят разделили на 2 группы: I группа — 6 телят, получающих каждый день с молоком эквивалент 20 мг окситетрациклина основания; II группа — 6 телят, получающих каждый день с молоком эквивалент 100 мг окситетрациклина основания.

Телят убивали (по одному из каждой группы) на 10, 20 и 30 день после подачи окситетрациклина и на 2, 4 и 8 день после отмены антибиотика.

Содержание окситетрациклина в скелетных мышцах, печени, селе-

зенке, почках, моче и желчи определяли методом диффузии в агаре с применением стандартного штамма *Bac. cereus* 8145.

Констатировали, что добавление эквивалента 20 мг окситетрациклина на кг молока в течение 30 дней не вызывало появления в исследованных тканях и органических жидкостях антибиотика в количествах возможных для определения.

После введения окситетрациклина в дозе 100 мг/кг молока в течение 30 дней обнаружили антибиотик у одного теленка в пробах почек и мочи, а у другого в мышцах, селезенке, почках и моче. Констатированные количества антибиотика в исследованных пробах после дозы 100 мг окситетрациклина/кг молока не превысили допустимой нормы. После отмены окситетрациклина на 2, 4 и 8 день не обнаружили антибиотика в исследованных тканях и органических жидкостях.

SUMMARY

Investigations were carried out on 12 calves of lowland black-white breed, aged 3—4 weeks and weighing from 52 to 62 kg. The calves were divided into 2 groups: group I—every day 6 calves were administered with 200 mg of fodder oxytetracycline (OTC) per 1 kg of milk (= 20 mg OTC base); group II—every day 6 calves were administered with 1,000 mg of fodder OTC per 1 kg milk (= 100 mg OTC base).

One animal from each group was slaughtered on the 10th, 20th and 30th day following the administration of fodder OTC with milk, and on the 2nd, 4th and 8th day after dropping the antibiotic treatment.

OTC content in skeletal muscles, liver, spleen, kidneys, urine and bile was determined by diffusion in agar gel method using a standard strain *Bac. cereus* 8145.

It was stated that fodder OTC at the amount of 200 mg/kg of milk, administered for 30 days, did not maintain on the detectable level in the examined tissues and organic fluids.

After the 30-day administration of fodder OTC at the amount of 1,000 mg/kg of milk, the antibiotic was observed in the kidneys and urine of one calf, and in the muscles, spleen, kidneys and urine of the other calf. The amounts of antibiotic in the examined samples did not exceed the normal after the dose of 1,000 mg of fodder OTC per kg of milk. On the 2nd, 4th and 8th day after stopping the fodder OTC administration, the antibiotic residues were not detected in the examined tissues and organic fluids.