

WYKRYWANIE SUBSTANCJI PRZECIWBAKTERYJNYCH W PASZACH W RAMACH URZĘDOWEJ KONTROLI PASZ W POLSCE

Monika Przeniosło-Siwczyńska, Krzysztof Kwiatek

Zakład Higieny Pasz

Państwowy Instytut Weterynaryjny — Państwowy Instytut Badawczy w Puławach (Polska)

Substancje przeciwbakteryjne, w tym głównie antybiotyki były powszechnie stosowane jako dodatki paszowe do końca 2005 roku. W związku z problemem nadużywania antybiotyków w żywieniu zwierząt, Unia Europejska wprowadziła zakaz ich stosowania z dniem 01.01.2006 r. Ze względu na globalny wymiar problemu podjęto kroki mające na celu monitorowanie stosowania antybiotyków i ich niekontrolowanego użycia. Do badań pasz w kierunku wykrywania substancji przeciwbakteryjnych zastosowano metodę przesiewową, mikrobiologiczną opartą na hamowaniu wzrostu określonych szczepów testowych. Metoda pozwala na wykrycie antybiotyków β -laktamowych, tetracyklin, antybiotyków aminoglikozydowych i makrolidowych oraz chinolonów. W niniejszym artykule przedstawiono wyniki badań wykonanych w ramach urzędowej kontroli pasz w kierunku wykrywania substancji przeciwbakteryjnych w paszach w latach 2006–2012.

Substancje przeciwbakteryjne, głównie antybiotyki stosowane były w żywieniu zwierząt gospodarskich jako dodatki paszowe od początku lat 50-tych XX wieku. W Polsce antybiotyki w paszach zaczęto stosować na większą skalę dopiero w latach 1968-1970. Pierwszym antybiotykiem zastosowanym na szeroką skalę w żywieniu bydła była penicylina, potem odkryto silniej działające tetracykliny (chlorotetracyklinę i oksytetracyklinę). Największe zastosowanie antybiotyki znalazły w żywieniu trzody chlewnej, cieląt i drobiu. Do najczęściej stosowanych antybiotyków paszowych w Polsce i w Unii Europejskiej należały: awoparcyna, monenzyna, flawomycyna, salinomycyna, spiramycyna, tylozyna, wirginiamicyna, cynk-bacytracyna. Wprowadzenie antybiotyków jako dodatków paszowych stanowiło próbę zabezpieczenia zwierząt przed zaburzeniami równowagi mikrobiologicznej w przewodzie pokarmowym, ponieważ ich dodatek do paszy był przydatny do kontroli stanu równowagi mikrobiologicznej jelit. Dodatek antybiotyków do paszy powodował eliminację przewlekłych zakażeń jelitowych, dając tym samym wzrost efektywności produkcji zwierzęcej, a ponadto skutkowało zwiększeniem przyrostów masy ciała zwierząt, a także stopnia wykorzystania paszy. Dzięki swoim właściwościom zyskały one nazwę antybiotykowych stymulatorów wzrostu (ASW, ang. antibacterial growth promoters - AGPs). Biorąc pod uwagę negatywne aspekty stosowania antybiotyków, głównie narastanie zjawiska antybiotykkooporności, UE rozpoczęła proces wycofywania antybiotyków z żywienia zwierząt. W kwietniu 1997 roku wprowadzono zakaz stosowania awoparcyny, natomiast od 1 lipca 1999 roku zostały wycofane następujące antybiotykowe stymulatory wzrostu: cynk-bacytracyna, spiramycyna, tylozyna i wirginiamicyna. Pozostałe antybiotyki stosowane w paszach (awilamicyna, flawomycyna, monenzyna, salinomycyna) wycofano z dniem 31.12.2005 r. Zgodnie z obowiązującymi przepisami i wymaganiami UE od 2004 roku w Polsce corocznie opracowywany jest Krajowy Plan Urzędowej Kontroli Pasz. Ma on na celu kompleksową ocenę stanu bezpieczeństwa pasz produkowanych w Polsce. Plan ten obejmuje wiele czynników zagrożeń, również badanie pasz w kierunku wykrywania substancji przeciwbakteryjnych w paszach i wodzie. Ze względu na globalny wymiar problemu nadużywania antybiotyków, w krajach UE podjęto kroki mające na celu monitorowanie zużycia antybiotyków i ich niekontrolowanego stosowania, m.in. poprzez analizę składu pasz stosowanych w żywieniu zwierząt. Podjęto zatem badania, których celem była kontrola i ocena występowania substancji przeciwbakteryjnych w paszach. Badania zostały wykonane zgodnie z opracowaną w Zakładzie Higieny Pasz instrukcją dotyczącą wykrywania substancji przeciwbakteryjnych w paszach.

Materiały i metody. Materiał do badań stanowiły próbki dostarczone do badań w ramach urzędowej kontroli tj.: mieszanki paszowe pełnoporcjowe, premiksy, koncentraty paszowe, dodatki paszowe, woda. Do badań zastosowano metodę mikrobiologiczną dyfuzyjną, której zasada oparta jest na zjawisku dyfuzji antybiotyku w pożywce agarowej. Pożywka jest dobrana w taki sposób, aby umożliwić jak najlepszą dyfuzję substancji do podłoża. W badaniu pasz największe zastosowanie znalazła metoda studzienkowo - płytkowa, ponieważ naniesiony ekstrakt dyfunduje równomiernie na całej wysokości studzienki, co pozwala na uzyskanie dobrych wyników. Szczepy testowe zastosowane w metodzie dobrane są na podstawie ich wrażliwości na antybiotyki. Wybrane szczepy cechuje stała, wysoka wrażliwość na wiele substancji o działaniu przeciwbakteryjnym. Jako szczepy testowe wybrano następujące drobnoustroje: *Bacillus subtilis* BGA, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ex. *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 11303. Do badań zastosowano pożywki Antibiotic Medium No. 1 i Standard II Nutrient Agar. Pożywki posiadają zróżnicowany odczyn pH, tj. 6,0, 7,2, 8,0. Poprzez zróżnicowanie szczepów testowych i pH pożywki można wykazać nie tylko obecność antybiotyku, ale także wstępnie określić grupę, do której należy dany antybiotyk. W przypadku obecności w badanej próbce substancji przeciwbakteryjnej widoczna jest strefa zahamowania wzrostu, której średnica jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia wykrytej substancji. Strefa inhibicji wyznaczana jest przez interakcję dwóch zachodzących równocześnie procesów: wzrostu bakterii testowych oraz dyfuzji antybiotyku. Badanie polega na przygotowaniu ośmiu płytek z odpowiednią pożywką i szczepem testowym. Do pożywki dodawana jest odpowiednia ilość szczepu testowego, pożywka rozlewana jest na płytki, które pozostawia się w temperaturze otoczenia w celu zestalenia pożywki. Sposób przygotowania płytek przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Sposób przygotowania płytek do badań

Płytki	Szczep testowy	Pożywka	pH	Temp. inkubacji (°C)	TMP* µg/ml
1	<i>B. subtilis</i> BGA	Antibiotic medium No.1	6,0	30	-
2	<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341	Antibiotic medium No.1	6,0	37	-
3	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	Antibiotic medium No.1	6,0	30	-
4	<i>B. subtilis</i> BGA	Antibiotic medium No.1	7,2	30	0,5
5	<i>B. subtilis</i> BGA	Antibiotic medium No.1	8,0	30	-
6	<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341	Antibiotic medium No.1	8,0	37	-
7	<i>E. coli</i> ATCC 11303	Standard II Nutrient Agar	6,0	37	-
8	<i>E. coli</i> ATCC 11303	Standard II Nutrient Agar	8,0	37	-

Kontrola przygotowanych płytek polegała na zastosowaniu krążków o średnicy 6.35 mm nasączonych odpowiednim wzorcem antybiotyku według schematu podanego w tabeli 2.

Tabela 2

Schemat sporządzania kontroli jakości płytek wraz z wymaganymi strefami

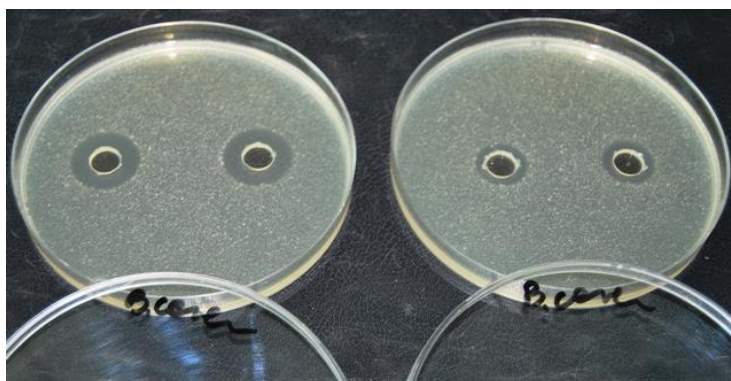
Płytki nr	1,2	3	4	5	6	7	8
Kontrolne stężenie w krążku	PEN* 0,01 j.m.	TETR 30 µg	SULF 2 µg	STR 0,5µg	TYL 0,5 µg	FLUM 5 µg	ENR 5 µg
Minimalna strefa kontrolna	≥ 6 mm	≥ 12 mm	≥ 6 mm	≥ 8 mm	≥ 6 mm	≥ 9 mm	≥ 9 mm

* PEN – penicylina, TETR – tetracyklina, SULF – sulfametazyna, STR – streptomycyna, TYL – tylozyna, FLUM – flumechina, ENR – enrofloksacyna

Badanie próbek polegało na odważeniu 10 g próbki i dodaniu 50 ml mieszaniny do ekstrakcji, którą stanowi metanol i bufor fosforanowy pH 8,0 w stosunku 1:1. Następnie próbki podlegały etapowi ekstrakcji poprzez wytrząsanie na wytrząsarce przez 30 min. Po ekstrakcji

próbki były odwirowywana przez 10 min przy 3500 x g, a następnie ekstrakty (100 µl) były наносzone do studzienek na płytkach.

Wyniki i dyskusja. Pojawienie się strefy zahamowania wzrostu szczepu testowego świadczy o obecności w próbce antybiotyku lub innej substancji o działaniu przeciwbakteryjnym. Obecność strefy o średnicy powyżej 14 mm uznawano za wynik dodatni, tzn. świadczący o obecności substancji o działaniu hamującym.



Ryc. Obecność stref zahamowania wzrostu na płytkach z *B.cereus*.

W latach 2006-2012 zbadano ogółem 452 próbki pasz w kierunku wykrywania substancji przeciwbakteryjnych. Przeważającą część próbek do badania stanowiły mieszanki paszowe przeznaczone dla trzody chlewnej i drobiu. Wśród nadesłanych do badania próbek znalazły się także: pasza dla ryb (1 próbka), wywary gorzelniane (21 próbek) oraz karma dla zwierząt domowych (10 próbek). Spośród 452 zbadanych próbek 126 (27,9 %) stanowiły mieszanki czyszczące, czyli mieszanki lub materiały paszowe stosowane do czyszczenia linii technologicznej po produkcji pasz leczniczych. Próbki te były badane na obecność pozostałości substancji czynnej użytej do wytworzenia paszy leczniczej. Wyniki dodatnie, czyli stwierdzenie obecności substancji przeciwbakteryjnej uzyskano w przypadku 185 próbek paszy, z czego 57 to mieszanki czyszczące (30,8 %). Liczba próbek pasz, które nie powinny zawierać substancji przeciwbakteryjnych, a w których stwierdzono ich obecność wyniosła 128 (28,3 %). Do badań w kierunku wykrywania substancji przeciwbakteryjnych dostarczono również 13 próbek wody przeznaczonej do pojenia zwierząt. W 1 próbce (0,13 %) uzyskano wynik dodatni. Szczegółowe wyniki badań przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3

Liczba próbek zbadanych w ramach urzędowej kontroli pasz w latach 2006–2012

Rodzaj paszy	Liczba próbek zbadanych	Liczba próbek ujemnych	Liczba próbek dodatnich
Mieszanki paszowe:			
dla bydła	10	7	3
dla świń	56	36	20
dla drobiu	55	27	28
dla ryb	1	1	0
pozostałe	139	84	55
Mieszanki czyszczące	126	69	57
Premiksy	7	5	2
Dodatki / materiały paszowe	45	26	19
Woda	13	12	1
Ogółem	452	267	185 (40,9 %)

Metoda mikrobiologiczna jest metodą przesiewową pozwalającą na stwierdzenie lub wykluczenie obecności antybiotyków lub innych substancji o działaniu przeciwbakteryjnym

w paszy. Metoda ta nie daje wyników absolutnie pewnych, szczególnie jeśli chodzi o tożsamość wykrytej substancji. Dla ostatecznego potwierdzenia wyniku należy zastosować bardziej specyficzne i czułe metody chromatograficzne. Obecnie chromatografia cieczowa, dzięki swoim właściwościom stała się techniką dominującą w analizie pozostałości substancji przeciwbakteryjnych zarówno w żywności pochodzenia zwierzęcego, jak i w paszach. W klasycznej analizie pozostałości antybiotyków łączy się ją najczęściej z detektorami UV lub detektorami fluorescencyjnymi (FLD). Coraz częściej jednak do potwierdzenia obecności leków przeciwbakteryjnych stosowana jest spektrometria mas (MS), która umożliwi nie tylko wykrycie obecności analizowanego związku chemicznego, lecz również określenie jego struktury.

W Zakładzie Higieny Pasz stosowane są do badań potwierdzających metody oparte na technikach chromatograficznych z detekcją diodową (HPLC-DAD) oraz połączoną ze spektrometrią mas (LC-MS). Badania potwierdzające wykonywane są w zakresie oznaczania antybiotyków z grupy tetracyklin z użyciem metod HPLC-DAD i LC-MS oraz innych antybiotyków stosowanych jako ASW (tylozyna, spiramycyna) oraz pozostałych (amoksycylina, linkomycyna, tiamulina) z użyciem metod opartych na technice LC-MS. W przypadku wyniku dodatniego uzyskanego w metodzie przesiewowej poza potwierdzeniem tożsamości pozwalają one również w sposób wiarygodny oznaczyć ilość wykrytej substancji.

EXPOSURE OF ANTIBACTERIAL SUBSTANCES IN FORAGE WITHIN THE FRAMEWORK OF OFFICIAL CONTROL OF FORAGE IN POLAND

M. Psheniosło-Sivchynska, K. Kviatak

Department of Hygiene of Animal Feedingstuffs
National Veterinary Research Institute (Poland)

S U M M A R Y

Antibacterial substances, mainly antibiotics were used as feed additives by 2006. Due to a problem with overuse of antibiotics in farming, EU banned the use of antibiotics as growth promoters. For these reasons the measures to control the compliance of the ban and illegal use of antibacterials were taken. This paper describes microbial method for the screening of antibacterial substances in animal feeds. The microbiological method for the detection of antibacterial substances is based on the growth inhibition of test microorganisms and detects the main antibiotics groups: β -lactams, tetracyclines, aminoglycosides, macrolides and quinolones. This technique can be used as a screening method for the detection of antibiotics in feeds, but more specific methods would be necessary for full identification of antimicrobials in screening-positive samples. In this article the results of the official control of the detection of antibacterial substances in feeds in 2006–2012 were presented.

ВИЯВЛЕННЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ СУБСТАНЦІЙ У КОРМАХ У РАМКАХ ОФІЦІЙНОГО КОНТРОЛЮ КОРМІВ В ПОЛЬЩІ

М. Пшеньосло-Сівчинська, К. Квятєк

Кафедра гігієни кормів для тварин
Національного ветеринарного інституту (Польща)

А Н О Т А Ц І Я

Антибактеріальні речовини, переважно антибіотики, застосовували як кормові добавки до 2006. Через проблему надмірного застосування антибіотиків у сфері сільського

господарства, ЄС наклав заборону на застосування антибіотиків як стимуляторів росту. З цієї причини прийняли міри для контролю відповідності заборони та незаконного застосування антибактеріальних речовин. Цей документ описує мікробний метод для скринінгу антибактеріальних речовин у кормах для тварин. Мікробіологічний метод для виявлення антибактеріальних речовин проводять на основі затримки росту мікроорганізмів та виявляє головні групи антибіотиків: β -лактами, тетрацикліни, аміноглікозиди, макроліди та хіноліни. Цей метод можна застосовувати як скринінг метод для виявлення антибіотиків у кормах, але для повної ідентифікації протимікробних речовин у скринінг-позитивних зразках потрібно застосувати більш специфічні методи. У цій статті представлені результати офіційного контролю виявлення антибактеріальних речовин у кормах протягом 2006–2012 рр.

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СУБСТАНЦИЙ В КОРМАХ В РАМКАХ ОФИЦИАЛЬНОГО КОНТРОЛЯ КОРМОВ В ПОЛЬШЕ

М. Пшенёсло-Сівчиньска, К. Квятек

Кафедра гигиены кормов для животных
Национального ветеринарного института (Польша)

А Н Н О Т А Ц И Я

Антибактериальные вещества, преимущественно антибиотики, применяли как кормовые добавки до 2006. Из-за проблемы чрезмерного применения антибиотиков в сфере сельского хозяйства, ЕС наложил запрет на применение антибиотиков как стимуляторов роста. По этой причине приняли меры для контроля соответствия запрета и незаконного применения антибактериальных веществ. Этот документ описывает микробный метод для скрининга антибактериальных веществ в кормах для животных. Микробиологический метод для выявления антибактериальных веществ проводят на основе задержки роста микроорганизмов и обнаруживает главные группы антибиотиков: β -лактами, тетрациклины, аминогликозиды, макролиды и хинолины. Этот метод можно применять как скрининг метод для выявления антибиотиков в кормах, но для полной идентификации противомикробных веществ в скрининг-позитивных образцах нужно применить более специфические методы. В настоящей статье представленные результаты официального контроля выявления антибактериальных веществ в кормах в течение 2006–2012 гг.

L I T E R A T U R A

1. *Posyniak A.* Występowanie antybiotyków w żywności – aspekty prawne i analityczne kontroli pozostałości. *Życie Weterynaryjne*, 2011. — 86 (9). — P. 717–721.
2. *Przeniosło-Siwczyńska M., Kwiatek K.* Dlaczego zakazano stosowania w żywieniu zwierząt antybiotykowych stymulatorów wzrostu? *Życie Weterynaryjne*, 2013. — 88 (2). — P. 104–108.
3. *Przeniosło-Siwczyńska M., Kwiatek K.* Evaluation of multi-plates microbial assay for screening of antibacterial substances in animal feedingstuffs. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 2007. — 51 (4). — P. 599–602.
4. *Różańska H.* Fałszywie dodatnie lub ujemne wyniki w wykrywaniu pozostałości antybiotyków. *Medycyna Weterynaryjna*, 1996. — 52(3). — P. 167–169.
5. *Różańska H.* Wpływ stosowania antybiotyków u drobiu na zdrowie ludzi. *Materiały Konferencyjne: Salmonellozy drobiu, Puławy*. 23–24.10.1998 r.