

# **Autoreferat**

**dr n. wet. Anna Gajda**

Zakład Farmakologii i Toksykologii  
Państwowy Instytut Weterynaryjny  
- Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach

**Puławy 2018**

### **1. Imię i nazwisko**

Anna Gajda

### **2. Posiadane tytuły naukowe i stopnie naukowe**

- 2014** doktor nauk weterynaryjnych  
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach  
Tytuł rozprawy doktorskiej: „Pozostałości tetracyklin w produktach pochodzenia zwierzęcego – aspekty analityczne i występowanie zagrożeń”
- 2006** lekarz weterynarii  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

- Od 2014** adiunkt w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, osoba nadzorująca badania w zakresie badania leków przeciwbakteryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego
- 2010-2014** asystent w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach
- 2006-2010** specjalista inżynierjno – techniczny w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

**4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)**

**4a) Tytuł osiągnięcia naukowego będącego jednotematycznym cyklem publikacji**

„Profil zanikania i stabilność tetracyklin w materiale biologicznym pochodzenia zwierzęcego w aspekcie bezpieczeństwa żywności i ochrony zdrowia publicznego”

*Oświadczenia o indywidualnym wkładzie wszystkich współautorów stanowi załącznik 5 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.*

**4b) Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu**

**H-1. Gajda A., Posyński A.:** Płyn ustny jako materiał nieinwazyjnego wykrywania antybiotyków u świń. *Medycyna Weterynaryjna*, 2017, 73 (8), 462 – 468

**IF – 0,163; MNiSW = 15**

***Wkład własny:** opracowanie koncepcji pracy, zebranie i analiz piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu, wysłanie pracy do druku oraz wykonanie korekty po recenzji. Mój udział procentowy w powstaniu publikacji oceniam na 95%.*

**H-2. Gajda A., Jablonski A., Bladek T., Posyński A.:** Oral Fluid as a Biological Material for Antemortem Detection of Oxytetracycline in Pigs by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65, 494-500

**IF – 3,154; MNiSW = 40**

***Wkład własny:** opracowanie koncepcji pracy, zaplanowanie wszystkich doświadczeń, udział w części doświadczalnej, przeprowadzenie oznaczeń analitycznych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowanie wniosków, napisanie manuskryptu, wysłanie pracy do druku oraz wykonanie korekty po recenzji. Mój udział procentowy w powstaniu publikacji oceniam na 80%.*

**H-3. Gajda A., Jablonski A., Gbylik-Sikorska M., Posyński A.:** Correlation between oral fluid and plasma oxytetracycline concentrations after intramuscular administration in pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2017, 40(6), 39-44

**IF – 1,202; MNiSW = 25**

***Wkład własny:** opracowanie koncepcji pracy, zaplanowanie wszystkich doświadczeń, udział w części doświadczalnej, przeprowadzenie oznaczeń analitycznych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowanie wniosków, napisanie manuskryptu, wysłanie pracy do druku oraz wykonanie korekty po recenzji. Mój udział procentowy w powstaniu publikacji oceniam na 80%.*

**H-4. Gajda A., Posyński A.:** Doxycycline depletion and residues in eggs after oral administration to laying hens. *Food Additives and Contaminants Part A*, 2015, 32 (7), 1116-1123

**IF = 1,878; MNiSW = 30**

**Wkład własny:** opracowanie koncepcji pracy, zaplanowanie wszystkich doświadczeń, przeprowadzenie doświadczenia, wykonanie oznaczeń analitycznych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowanie wniosków, napisanie manuskryptu, wysłanie pracy do druku oraz wykonanie korekty po recenzji. Mój udział w powstaniu publikacji oceniam na 95%.

**H-5. Gajda A.,** Posyniak A., Tomczyk G.: LC-MS/MS analysis of doxycycline residues in chicken tissues after oral administration. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2014, 58, 573-579

**IF = 0,357; MNiSW = 15**

**Wkład własny:** opracowanie koncepcji pracy, zaplanowanie wszystkich doświadczeń, udział w części doświadczalnej, przeprowadzenie oznaczeń analitycznych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowanie wniosków, napisanie manuskryptu, wysłanie pracy do druku oraz wykonanie korekty po recenzji. Mój udział procentowy w powstaniu publikacji oceniam na 90%.

**H-6. Gajda A.,** Bladek T., Gbylik – Sikorska M., Posyniak A.: The influence of cooking procedures on doxycycline concentration in contaminated eggs. Food Chemistry, 2017, 221, 1666-1670,

**IF = 4,529; MNiSW = 40**

**Wkład własny:** opracowanie koncepcji pracy, zaplanowanie wszystkich doświadczeń, przeprowadzenie badań, wykonanie oznaczeń analitycznych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowanie wniosków, napisanie manuskryptu, wysłanie pracy do druku oraz wykonanie korekty po recenzji. Mój udział w powstaniu publikacji oceniam na 85%.

**H-7. Gajda A.,** Nowacka – Kozak E., Gbylik – Sikorska M., Posyniak A.: Tetracycline antibiotics transfer from contaminated milk to dairy products and the effect of the skimming step and pasteurisation process on residue concentrations. Food Additives and Contaminants Part A, 2018, 35(1), 66-76

**IF – 2,129; MNiSW = 30**

**Wkład własny:** opracowanie koncepcji pracy, zaplanowanie wszystkich doświadczeń, przeprowadzenie badań, wykonanie oznaczeń analitycznych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowanie wniosków, napisanie manuskryptu, wysłanie pracy do druku oraz wykonanie korekty po recenzji. Mój udział w powstaniu publikacji oceniam na 80%.

**H-8. Gajda A.,** Nowacka – Kozak E., Posyniak A.: Contamination of wild boars (*Sus scrofa*) muscles with tetracycline antibiotic from oral delivered rabies vaccine baits. Food Additives and Contaminants Part A, 2018, 35(7), 1286-1291

**IF – 2,129; MNiSW = 30**

**Wkład własny:** opracowanie koncepcji pracy, zaplanowanie wszystkich doświadczeń, pobieranie materiału do badań, wykonanie oznaczeń analitycznych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowanie wniosków, napisanie manuskryptu, wysłanie pracy do druku oraz wykonanie korekty po recenzji. Mój udział w powstaniu publikacji oceniam na 85%.

**- Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) – 15,541**

**- Suma punktów wg MNiSW – 225**

#### **4c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

##### **Wstęp**

Intensywna hodowla zwierząt może prowadzić do szybkiego rozprzestrzeniania się chorób bakteryjnych. Mimo stosowania, w celach profilaktycznych, wielu działań zapobiegawczych, zmierzających do ograniczenia występowania infekcji, to nadal trudno wyobrazić sobie współczesną hodowlę bez stosowania leków weterynaryjnych, a w szczególności antybiotyków. Jednak dość często dochodzi do popełniania różnych błędów w trakcie leczenia zwierząt, w tym przekraczanie dawek, nieprzestrzeganie czasów karencji i zamienne, niezgodne ze wskazaniami stosowanie leków. Szczególnie przy masowej produkcji, antybiotyki stosowane są często bez uzasadnienia już, od pierwszych dni chowu w celu zabezpieczenia przed powstawaniem infekcji. W konsekwencji, nieracjonalne stosowanie antybiotyków, może powodować występowanie ich pozostałości w żywności, które z kolei mogą negatywnie oddziaływać na zdrowie konsumentów poprzez wywieranie działań toksycznych czy też reakcji alergicznych. Przy długotrwałej ekspozycji na żywność z pozostałościami tetracyklin, nie można wykluczyć wystąpienia zaburzeń w prawidłowym funkcjonowaniu narządów wewnętrznych. Szczególnie narażone mogą być małe dzieci, gdyż tetracykliny wiążąc się z wapniem mogą odkładać się w kościach i zębach przyczyniając się do ich nieprawidłowego rozwoju. Nieuzasadnione stosowanie antybiotyków może również w znacznym stopniu przyczyniać się do narastania oporności chorobotwórczych szczepów bakteryjnych. W związku z zagrożeniem konsumentów wynikającym ze stosowania antybiotyków u zwierząt oraz rozpowszechnieniem zjawiska lekooporności, prowadzona jest kontrola występowania leków weterynaryjnych w żywności i produktach pochodzenia zwierzęcego.

Z punktu widzenia zabezpieczenia zdrowia konsumentów, istotnym elementem jest badanie utrzymywania się leku w jadalnych tkankach i narządach zwierząt docelowych lub ich produktach. Profil zanikania antybiotyków z produktów zwierzęcego pochodzenia do poziomów uznawanych za bezpieczne dla człowieka - MRL (maksymalne dopuszczalne stężenie; *ang. Maximum Residue Limit*) po statystycznym uwzględnieniu marginesu bezpieczeństwa jest podstawą do ustalenia czasów karencji.

Przestrzeganie czasów karencji jest podstawą do produkowania żywności wolnej od pozostałości weterynaryjnych produktów leczniczych w stężeniach wyższych od wartości MRL. Kinetyka zanikania i czas utrzymywania się leków zależy w dużym stopniu od specyfiki tkanki docelowej czy też produktu zwierzęcego, ale także od właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych zastosowanego produktu leczniczego. Wiek, infekcja, interakcje z innymi lekami mogą w znacznym stopniu wpływać na czas pozostawania leku w organizmie oraz stopień jego kumulacji w tkankach. Okazuje się bowiem, że stan chorobowy znacznie wydłuża proces eliminacji pewnych związków z organizmu. Wchłanianie, dystrybucja, metabolizm i wydalanie w dużej mierze zależą od drogi podania, dawki, gatunku zwierzęcia oraz postaci zastosowanego leku.

Analiza wyników badań kontrolnych pozostałości substancji chemicznych wskazuje, że zarówno w Polsce, jak i w pozostałych krajach Unii Europejskiej, najczęściej u świń i u drobiu wykrywane są antybiotyki z grupy tetracyklin. W większości przypadków w próbkach niezgodnych pochodzących od świń wykrywana jest doksycyklina oraz oksytetracyklina. U drobiu największy problem stanowi występowanie pozostałości doksycykliny. Dane oceniające zużycie tetracyklin w praktyce weterynaryjnej oraz raporty dotyczące sprzedaży środków przeciwdrobnoustrojowych jednoznacznie wskazują na dominującą rolę tej grupy leków w hodowli zwierząt. Wysoką częstotliwość stosowania tetracyklin w praktyce weterynaryjnej potwierdzają także ostatnie raporty Systemu Wczesnego Ostrzegania w Zakresie Żywności i Środków Żywienia Zwierząt (RASFF).

Powszechność stosowania tej grupy antybiotyków, zarówno w medycynie weterynaryjnej, jak i w medycynie ludzkiej, wynika z szerokiego spektrum działania przeciwbakteryjnego, korzystnych właściwości terapeutycznych, a także względów finansowych (niskie koszty leczenia). Jak każda substancja obca, leki z grupy tetracyklin po podaniu zwierzętom ulegają wchłonięciu, dystrybucji do tkanek i narządów, a następnie są metabolizowane i wydalone. Tetracykliny podawane doustnie podlegają szybkiemu, ale niepełnemu wchłanianiu. Ograniczone wchłanianie może wynikać z tworzenia niewchłanianych kompleksów z jonami metali obecnymi w przewodzie pokarmowym lub znajdującymi się w roztworze spożywanym wraz z lekiem oraz z interakcji ze składnikami pokarmu, czy też interakcji z niektórymi lekami, szczególnie zawierającymi jony dwuwartościowe. Tetracykliny są łatwo dystrybuowane do różnych tkanek organizmu, co uwarunkowane jest ich właściwościami

fizykochemicznymi. Osiągając wysokie stężenia w erytrocytach i granulocytach, łatwo przenikają przez bariery błonowe. Stopień wiązania tetracyklin z białkami zależy od gatunku zwierzęcia i rodzaju tetracykliny. Najsilniej z białkami krwi wiąże się doksycyklina (80-95%), co wpływa między innymi na jej dłuższy czas pozostawania w organizmie. Tetracykliny w bardzo ograniczonym stopniu ulegają procesom biotransformacji. Natomiast pod wpływem czynników zewnętrznych (światło, temperatura, kwaśne środowisko) są niestabilne.

Problem występującej lekooporności, prowadzi do wdrażania licznych działań mających na celu wyeliminowanie nadużywania antybiotyków u zwierząt. Planowane jest wprowadzenie przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) obowiązku raportowania wszystkich próbek, w których stwierdza się nawet śladowe ilości leków weterynaryjnych, gdyż do tej pory obowiązek raportowania dotyczył tylko próbek z przekroczonymi wartościami MRL. Biorąc pod uwagę nowe wymagania agencji Unii Europejskiej, badania *in vivo* dotyczące zanikania i czasu pozostawania leków przeciwbakteryjnych w tkankach oraz określanie stężeń i stabilności tych związków w materiale biologicznym wydają się być szczególnie istotne w zapewnieniu odpowiedniej jakości produktów żywnościowych. Wskazanie czasu utrzymywania się wybranych tetracyklin w produktach odzwierzęcych poprzez przedstawienie wyników doświadczeń przeprowadzonych na zwierzętach, w znacznym stopniu ułatwi podejmowanie ważnych decyzji administracyjnych.

W związku z wysoką częstotliwością wykrywania obecności tetracyklin w tkankach i produktach pochodzenia zwierzęcego, postanowiono przeprowadzić badania stabilności i czasu utrzymywania się tych antybiotyków, w różnym materiale biologicznym. Badania dystrybucji, przenikania leków weterynaryjnych w nietypowym, dotąd nie badanym na obecność leków materiale biologicznym, przyczyni się do opracowania i wdrożenia nowych, alternatywnych, nieinwazyjnych metod kontroli stosowania antybiotyków u zwierząt, co pozwoli na skuteczniejszą eliminację nielegalnego stosowania leków w weterynarii i pośrednio, niewątpliwie przyczyni się do zwiększenia bezpieczeństwa żywności.

## **Cel podjętych badań**

Głównym celem pracy było opracowanie nowego podejścia do kontroli występowania tetracyklin w żywności pochodzenia zwierzęcego, co zostało zrealizowane przez:

I. Określenie stopnia dystrybucji oraz profilu zanikania oksytetracykliny w płynie ustnym świń, jako alternatywnym materiale wykrywania stosowania antybiotyków na fermach trzody chlewnej oraz zbadanie zależności pomiędzy stężeniami w płynie ustnym a poziomami oznaczonymi w tkankach i w osoczu świń po eksperymentalnym podaniu zwierzętom weterynaryjnego produktu leczniczego zawierającego badany antybiotyk (H-1, H-2, H-3)

II. Określenie rozmieszczenia, czasu zanikania i stężeń doksycykliny w tkankach kur i w jajach po eksperymentalnym podaniu ptakom weterynaryjnego produktu leczniczego zawierającego analizowaną tetracyklinę (H-4, H-5)

III. Badanie wpływu procesów termicznych na stabilność tetracyklin oraz redukcję stężeń w jajach, mleku i w produktach mlecznych (H-6, H-7)

IV. Badanie występowania w mięsie dzików tetracykliny pochodzącej ze szczepionek dla lisów przeciw wściekliznie (H-8)



## **Omówienie przeprowadzonych badań i osiągniętych wyników**

### **I. Określenie stopnia dystrybucji oraz profilu zanikania oksytetracykliny w płynie ustnym świń, jako alternatywnym materiale wykrywania stosowania antybiotyków na fermach trzody chlewnej oraz zbadanie zależności pomiędzy stężeniami w płynie ustnym a poziomami oznaczonymi w tkankach i w osoczu świń po eksperymentalnym podaniu zwierzętom weterynaryjnego produktu leczniczego zawierającego badany antybiotyk (H-1, H-2, H-3)**

Kontrola stosowania leków weterynaryjnych jest ważnym elementem w zapewnieniu dobrostanu zwierząt. Do tej pory, w badaniach kontrolnych pozostałości leków przeciwbakteryjnych, prowadzonych w Polsce i na świecie, antybiotyki badane są głównie w tkankach. Przyżyciowo natomiast mogą być oznaczane we krwi, jednak pobieranie tego rodzaju materiału wiąże się z narażeniem zwierząt na duży stres oraz pewnymi niedogodnościami dla próbobiorcy. W związku z tym, najmniej inwazyjnym sposobem przyżyciowego badania stosowania antybiotyków w populacji trzody chlewnej wydaje się być wykorzystanie płynu ustnego, jako alternatywy dla badania tkanek i krwi.

U zwierząt, szczególnie u świń, wykorzystanie płynu ustnego do badań diagnostycznych cieszy się coraz większym zainteresowaniem. Uważa się, że pobieranie próbek płynu ustnego w regularnych odstępach czasowych, z uwagi na łatwą dostępność materiału i odzwierciedlenie statusu zdrowotnego stada, pozwoli na zminimalizowanie kosztów pobierania próbek w programach kontroli chorób zakaźnych oraz uproszczenie procesu diagnostycznego u świń. O ile wykorzystanie płynu ustnego jako matrycy do rozpoznawania patogenów w populacji świń jest coraz wnikliwiej analizowane i badania w tym zakresie trwają już od dłuższego czasu, to w przypadku zastosowania tego materiału biologicznego jako matrycy do detekcji antybiotyków, dostępne badania i dane literaturowe są dość mocno ograniczone. W pracy **H1** przedstawiono stopień zaawansowania badań nad dystrybucją i wykrywaniem leków w płynie ustnym zarówno w medycynie weterynaryjnej, jak i w medycynie ludzkiej oraz omówiono dotychczasową kontrolę stosowania leków weterynaryjnych w hodowli świń.

W związku z faktem, że płyn ustny nie był do tej pory wykorzystywany jako materiał biologiczny do wykrywania antybiotyków u zwierząt, a pojawiające się coraz częściej opinie sugerują uzasadnienie badania leków w tej matrycy i uważa się, że płyn ustny może być alternatywą dla pośmiertnego badania tkanek, postanowiono zbadać i określić możliwość identyfikacji wybranego leku w tym materiale (**H2**).

Głównym celem badań było przedstawienie możliwości wykorzystania płynu ustnego do wykrywania oksytetracykliny, po doświadczalnym podaniu produktu leczniczego zawierający testowany antybiotyk oraz określenie stężeń i czasu utrzymywania się badanego związku w testowanej matrycy. Do badań wybrano oksytetracyklinę, jako jeden z najczęściej stosowanych leków w zwalczaniu infekcji bakteryjnych u świń, podawanych iniekcyjnie. Zbadano także zależności stężeń oznaczonych w płynie ustnym a poziomami stwierdzonymi w tkankach (mięśnie, wątrobę, nerki) zwierząt doświadczalnych w dniu karencji zastosowanego produktu leczniczego.

Zwierzętom podawano domięśniowo weterynaryjny produkt leczniczy zawierający oksytetracyklinę w postaci jednorazowej dawki 20 mg/kg masy ciała. Świnie podzielono na trzy grupy: Grupa 1 - 100% zwierząt otrzymało oksytetracyklinę; Grupa 2 – 50% zwierząt otrzymało oksytetracyklinę; Grupa 3 – (kontrolna), w której zwierzęta nie otrzymywały leku. Po podaniu leku, płyn ustny pobierany był jako próbka zbiorcza w odpowiednich odstępach czasowych, przez okres 21 dni, oddzielnie od zwierząt z każdej grupy doświadczalnej. Do pozyskiwania próbek zbiorczych płynu ustnego zastosowano bawełnianą linę, która zawieszana była w kojcu na ok. 30 min i nasączana płynem ustnym zwierząt. Uzyskane wyniki badań wskazują na długi czas pozostawania i możliwości wykrywania podanego antybiotyku w płynie ustnym. Oksytetracyklina utrzymywała się w badanym materiale przez okres 21 dni (okres karencji). Najwyższe stężenie obserwowano 2 godziny po aplikacji leku, które wynosiło  $10653 \pm 1421 \mu\text{g}/\text{kg}$  w Grupie 1 oraz  $7456 \pm 1145 \mu\text{g}/\text{kg}$  w Grupie 2. Badanie tkanek zwierząt doświadczalnych w dniu karencji zastosowanego leku, pozwoliło na zaobserwowanie istotnej zależności pomiędzy stężeniami oksytetracykliny w płynie ustnym ( $30,8 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), a poziomami oznaczonymi w mięśniach ( $34,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Istotnym elementem pracy jest wykazanie możliwości badania antybiotyku w płynie ustnym po jego iniekcyjnym podaniu. Szczególną wartością poznawczą badań jest wykazanie zależności pomiędzy stężeniami oksytetracykliny w płynie ustnym i w tkankach, co potwierdza uzasadnienie wykorzystania płynu ustnego do kontroli

antybiotyków. W aspekcie zapewnienia konsumentom bezpiecznej żywności, przedstawiane w pracy zagadnienie wydaje się być bardzo istotne, gdyż dotychczasowa wiedza o możliwości wykrywania leków weterynaryjnych w płynie ustnym jest bardzo znikoma. Ponadto, badanie płynu ustnego umożliwia wykrycie nielegalnego lub niezgodnego ze wskazaniami stosowania antybiotyków w trakcie chowu zwierząt, co wiąże się z ograniczeniem start spowodowanych utylizacją mięsa w przypadku wykrycia obecności leku w tkankach. Analiza płynu ustnego daje możliwość szybkiej oceny, czy świnie przeznaczone na ubój są „wolne” od antybiotyków tzn. czy nie zaistniało ryzyko ewentualnej ich obecności w tkankach przeznaczonych do konsumpcji, powyżej maksymalnych dopuszczalnych limitów pozostałości – MRL.

Niewątpliwą zaletą zaprezentowanego sposobu kontroli stosowania antybiotyków poprzez analizę płynu ustnego jest fakt, że pobieranie materiału jest całkowicie nieinwazyjne i możliwe jest pozyskanie jednej próbki zbiorczej od dużej liczby osobników jednocześnie (jedna lina może przypadać nawet na kilkadziesiąt świń). Koszt analizy w przypadku jednej próbki zbiorczej płynu ustnego jest znacznie mniejszy od badania wielu indywidualnych próbek tkanek. Tak więc względy ekonomicznego zaproponowanego w pracy rozwiązania również wskazują na istotność podjętego tematu.

Analiza płynu ustnego może być wykorzystywana w określaniu terapeutycznych stężeń danego leku nie tylko w tym medium, ale również pozwala na przewidywanie stężeń w osoczu, co z punktu widzenia efektywności terapii może mieć kluczowe znaczenie w zwalczaniu wielu chorób. W płynie ustnym mogą znajdować się patogeny i ich metabolity oraz przeciwciała, które mogą być syntetyzowane lokalnie i systemowo. W prezentowanej pracy doświadczalnej **H3** określono zanikanie i wyznaczono parametry farmakokinetyczne ( $C_{max}$ ,  $T_{max}$ , AUC, MRT,  $t_{1/2\beta}$ ) dla oksytetracykliny w płynie ustnym i w osoczu, pobieranych indywidualnie od świń w odpowiednich punktach czasowych, po podaniu *i.m.* produktu leczniczego zawierającego oksytetracyklinę. Antybiotyk wykrywany był zarówno w płynie ustnym, jak i w osoczu, po 1 h od podania leku do 21 dnia. Wartości  $C_{max}$  dla płynu ustnego wynosiły  $4021 \pm 836$  ng/ml, natomiast dla osocza  $C_{max} = 4447 \pm 735$  ng/ml. Zaobserwowano silną korelację pomiędzy stężeniami w płynie ustnym i w osoczu ( $r = 0,92$ ). Stężenie terapeutyczne oksytetracykliny dla większości wrażliwych bakterii (powyżej wartości MIC) utrzymywało się do 48 h od podania leku, zarówno w płynie ustnym, jak i w osoczu. Wykazanie czasu utrzymywania się oksytetracykliny w stężeniu

terapeutycznym zarówno w płynie ustnym, jak i w osoczu, dla wrażliwych bakterii jest istotną wartością poznawczą pracy.

Elementem innowacyjności przedstawionych prac (**H-2**, **H-3**) jest również opracowanie metody z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS) w oznaczaniu oksytetracykliny w płynie ustnym, gdyż do tej pory brak jest metod pozwalających na analizę antybiotyków w tym materiale z zastosowaniem technik chromatograficznych. Oznaczanie stężeń antybiotyku w płynie ustnym, tkankach i osoczu wykonywano opracowaną metodą LC-MS/MS, która wyróżnia się nieskomplikowanym etapem przygotowania próbki oraz analizy chromatograficznej, pozwalającej na oznaczenie substancji macierzystej oksytetracykliny, jak i jej formy 4-epi oksytetracykliny w dużej liczbie próbek, w krótkim czasie.

Zbadanie stopnia przenikania i czasu pozostawania oksytetracykliny na poziomie oznaczalności metody oraz określenie zależności płyn ustny: tkanki i osocze umożliwiło opracowanie nowego sposobu wykrywania stosowania antybiotyków na fermach świń. Takie rozwiązanie znacznie usprawnia i zwiększa efektywność dotychczas prowadzonej kontroli substancji przeciwbakteryjnych.

## **II. Określenie rozmieszczenia, czasu zanikania i stężeń doksycykliny w jajach i w tkankach kur i po eksperymentalnym podaniu ptakom weterynaryjnego produktu leczniczego zawierającego analizowaną tetracyklinę (H-4, H-5)**

Stosowanie doksycykliny u kur niosek, od których pozyskuje się jaja do celów spożywczych jest prawnie zabronione, gdyż nie ustalono wartości MRL dla tej substancji w jajach. Jednak dość częste przypadki wykrywania doksycykliny w jajach, świadczą o jej nielegalnym podawaniu kurom nioskom w trakcie okresu nieśności. W badaniach kontrolnych potwierdzono obecność tego antybiotyku w jajach w stężeniu przekraczającym 1400 µg/kg. W związku ze stwierdzanymi przypadkami występowania wysokich stężeń w jajach, postanowiono zbadać jak długo doksycyklina utrzymuje się w tym produkcie przeznaczonym do konsumpcji (**H-4**). Poznanie stopnia kumulacji oraz stabilności tego antybiotyku w jajach oraz określenie stężeń i czasu zanikania przy zastosowaniu odpowiedniej metody analitycznej jest niezwykle istotne w aspekcie bezpieczeństwa żywności.

Przeprowadzono doświadczenie, w którym podawano doksycyklinę (Doxycyclinum 20%) kurom nioską w dawce zarejestrowanej jako terapeutyczna dla brojlerów kurzych. Weterynaryjny produkt leczniczy zawierający doksycyklinę, podawano sondą do wola przez okres 5 dni w dawce 10 mg/kg masy ciała (każdy ptak otrzymał taką samą dawkę leku). Jaja zbierano codziennie, przez cały czas doświadczenia (ostatni dzień aklimatyzacji, 5 dni podawania leku, a także przez 18 dni od ostatniego podania leku). Część jaj homogenizowano w całości, a w części oddzielano białko od żółtka i homogenizowano oddzielnie. Do oznaczania stężeń doksycykliny w jajach zastosowano metodę chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS).

W próbkach jaj całych doksycyklinę wykryto już po pierwszym dniu podawania produktu leczniczego zawierającego analizowany antybiotyk. W trakcie podawania leku stężenie stopniowo wzrastało i po 5 dniach osiągnęło wartość 1067±118 µg/kg. Od drugiego dnia po zakończeniu podania doksycykliny obserwowano zmniejszenie stężenia do 521±80 µg/kg. W kolejnych dniach zawartość doksycykliny stopniowo zmniejszała się i po 12 dniach osiągnęła wartość 8±1,5 µg/kg. W 13 dniu nie stwierdzono obecności doksycykliny w jajach powyżej granicy oznaczalności metody

(LOQ = 5 µg/kg). Analizując zawartość antybiotyku oddzielnie w białku i żółtku można stwierdzić, że w trakcie podawania doksyicyklina osiąga wyższe stężenia w białku kurzym, natomiast w miarę upływu czasu stwierdza się jej wyższe stężenie oraz dłuższe utrzymywanie się w żółtku. W czternastym dniu pozyskiwania jaj, doksyicyklina nadal pozostawała w żółtku w stężeniu  $10 \pm 2,6$  µg/kg, natomiast nie stwierdzano jej zawartości w białku. Szesnastego dnia nie wykrywano już doksyicykliny w żółtku.

Stężenia leku w jajach oraz jego eliminacja po podaniu zależą w dużym stopniu od dawki, czasu i sposobu podawania leku, ale także od dawki jaka została pobrana, gdyż spożycie wody może różnić się znacznie pomiędzy poszczególnymi osobnikami. Dane literaturowe dotyczące zanikania doksyicykliny, przedstawiają podawanie leku z wodą do picia *ad libitum*, w związku z czym trudno jest określić dawkę leku jaka została pobrana przez dane zwierzę. Brak precyzyjności w określaniu wyjściowego stężenia pobranej substancji, powoduje trudności w określeniu rzeczywistego metabolizmu i zachowania się leku w organizmie, dlatego też w prezentowanej pracy każdy ptak otrzymał taką samą dawkę. Osiągane stężenia leków w jajach zależą także od właściwości danej substancji. Nawet w obrębie jednej grupy związków można zaobserwować znaczne różnice w stężeniach osiąganych w jajach. W przypadku grupy tetracyklin, tetracyklina występuje w wyższych stężeniach w jajach niż oksytetracyklina i jest wykrywalna przez dłuższy okres czasu w porównaniu z chlortetracykliną. Należy zaznaczyć, że w przeciwieństwie do doksyicykliny, dla pozostałych tetracyklin (tetracykliny, oksytetracykliny i chlortetracykliny) wyznaczono dopuszczalne limity w jajach wynoszące 200 µg/kg.

Z terapeutycznego punktu widzenia uzyskanie wysokich stężeń leku w tkankach i narządach objętych infekcją jest jak najbardziej wskazane, gdyż w dużej mierze decyduje to o uzyskaniu zamierzonego efektu. Jednak z drugiej strony pozostawanie przez długi okres czasu wysokich stężeń tetracyklin, czy też innych antybiotyków, ogranicza możliwość przeznaczenia zwierząt do konsumpcji przez ludzi bezpośrednio po zakończeniu leczenia. W przypadku tkanek, mamy do czynienia z inną sytuacją jak w przypadku jaj, dla których nie wyznaczono bezpiecznych limitów dla doksyicykliny. W zależności od rodzaju tkanki, ustalono różne maksymalne dopuszczalne limity: 100 µg/kg dla mięśni, 300 µg/kg dla wątroby, 600 µg/kg dla nerek. Występowanie doksyicykliny w tkankach może świadczyć o nadmiernym, często niezgodnym ze wskazaniami dawkowaniu lub nieprzestrzeganiu ustalonego czasu karencji. Podjęto próbę określenia przyczyn częstego wykrywania doksyicykliny w tkankach (**H-5**).

W tym celu przeprowadzono doświadczenie na brojlerach kurzych, którym podawano w dawce terapeutycznej weterynaryjny produkt leczniczy zawierający doksycyklinę (Doksycyklina 20 % w postaci proszku do sporządzania roztworu doustnego) sondą do wola przez 5 dni w dawce 10 mg/kg masy ciała. Następnie badano zanikanie, przechodzenie i czas pozostawania doksycykliny w mięśniach udowych, mięśniach piersiowych, w wątrobie i w nerkach. Próbki tkanek pobierano po upływie 6 i 24 godzin od ostatniego podania leku oraz w 7 dniu (dzień karencji) i w 8 dniu.

W wyniku przeprowadzonych badań, w próbkach mięśni, nerek, wątrób, pobranych w 1 dniu od podania leku stwierdzono wysokie stężenia doksycykliny (znacznie powyżej przyjętych wartości MRL). Stężenia doksycykliny w nerkach i wątrobie były wyższe od poziomów osiąganych w mięśniach. Zaobserwowano występowanie wyższych stężeń antybiotyku w mięśniach piersiowych w porównaniu do mięśni udowych. W próbkach tkanek i narządów pobranych w dniu karencji dla zastosowanego leku (7 dzień) oraz 1 dzień po wyznaczonym okresie karencji oznaczone stężenia doksycykliny były znacznie poniżej wartości MRL, aczkolwiek nadal wykrywano pewne ilości doksycykliny, znacznie powyżej granicy oznaczalności stosowanych metod. Doksycyklina w najwyższych stężeniach występowała w nerkach ( $44,7 \pm 4,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). W wątrobie oznaczone stężenia były nieco niższe ( $21,6 \pm 3,2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). W mięśniach piersiowych i w mięśniach udowych oznaczono odpowiednio  $32,4 \pm 3,6 \mu\text{g}/\text{kg}$  oraz  $22,7 \pm 2,9 \mu\text{g}/\text{kg}$  doksycykliny.

Badania poziomów leków w tkankach, zwłaszcza określanie stężeń w dniu karencji i w okresie po karencji, mają duże znaczenie przy ustalaniu właściwego materiału biologicznego do badań kontrolnych. Szczególną wartością poznawczą pracy jest wykazanie różnicy stężeń w mięśniach piersiowych i udowych. Istotne jest również wykazanie obecności doksycykliny po czasie karencji, co z jednej strony wydaje się być bezpieczne, gdyż stwierdzone stężenia osiągały wartości poniżej MRL, jednak biorąc pod uwagę narastanie lekooporności, długotrwałe przyjmowanie nawet śladowych ilości antybiotyków, może być bardziej szkodliwe od jednorazowego przyjęcia wyższej dawki.

### **III. Badanie wpływu procesów termicznych na stabilność tetracyklin oraz stopień redukcji stężeń w jajach, mleku i w produktach mlecznych (H-6, H-7)**

W aspekcie ochrony zdrowia konsumentów, istotne jest uzyskanie informacji o losach antybiotyku podczas zabiegów termicznych. Nasuwa się pytanie, czy doksycyklina przedostaje się do organizmu człowieka z produktem poddanym kulinarnej obróbce termicznej, w jakim stopniu obróbka termiczna eliminuje obecność doksycykliny oraz jaki jest najskuteczniejszy sposób redukcji jej stężenia. Badania tego typu mają istotne znaczenie, gdyż pod wpływem gotowania, smażenia, pieczenia, działania kuchenki mikrofalowej zmienia się konsystencja, skład chemiczny oraz zmniejsza się objętość produktu wskutek odparowania wody, w związku z czym poziom leku w końcowym półprodukcie, bezpośrednio spożywanym przez ludzi niekoniecznie ulega redukcji, a wręcz przeciwnie, może być większy w przeliczeniu na 1 kg suchej masy. Stężenie antybiotyku w produkcie po obróbce termicznej zależy w dużym stopniu od stabilności substancji na działanie wysokich temperatur. Z badań własnych wynika, że doksycyklina wykrywana jest nie tylko w produktach surowych, ale zdarzają się także przypadki wykrycia tego antybiotyku w żywności przetworzonej.

Celem badań przedstawionych w pracy **H-6** było określenie wpływu obróbki termicznej na stabilność i trwałość doksycykliny w jajach naturalnie skażonych testowanym antybiotykiem. Należy podkreślić, że zgodnie z przepisami Unii Europejskiej, jak już wcześniej wspominałam, jej stosowanie u kur niosek jest zakazane. Wyniki badań **H-4** wskazują, że antybiotyk ten przenika do jaj w wysokich stężeniach i utrzymuje się przez długi okres czasu.

Powszechnie uważa się, że prawdopodobieństwo występowania antybiotyków w żywności przetworzonej jest minimalne i zabiegi kulinarne, jakim poddawana jest żywności skutecznie eliminują ich obecność. Jednak przeprowadzone badania, w których testowany materiał zawierający doksycylinę poddawany był gotowaniu, smażeniu i działaniu kuchenki mikrofalowej wykazały, że kulinarna obróbka termiczna nie zawsze jest czynnikiem eliminującym antybiotyk z jaj. Przedstawione w pracy **H-6** wyniki, wskazują, że rozpad doksycykliny nie był całkowity, a stopień redukcji stężenia substancji zależał od sposobu oraz czasu trwania procesu termicznego. Inaktywacja doksycykliny odbywała się w największym stopniu pod wpływem działania kuchenki mikrofalowej (50,3 – 53,0%), podczas gdy gotowanie powodowało redukcję



antybiotyku zaledwie o 29,8%. Procesu smażenia spowodował zmniejszenie stężenia testowanego leku o 39,8%.

Jaja kurze są wartościowym produktem odżywczym, często spożywanym przez ludzi. Tak więc w aspekcie bezpieczeństwa żywności, uzyskanie danych dotyczących eliminacji doksycykliny z jaj poddanych różnym sposobom kulinarnej obróbki termicznej jest niezwykle istotne. Dodatkowo, informacje dotyczące stabilności doksycykliny podczas różnych sposobów obróbki kulinarnej wskazują, że nie można wyznaczać dodatkowego marginesu bezpieczeństwa zależnego od obróbki termicznej, dla żywności zawierającej antybiotyki.

Żywność pochodzenia zwierzęcego, w tym mleko poddawana jest licznym procesom technologicznym oraz obróbce termicznej, w celu uzyskania produktów pochodzących z tego surowca. Mleko i produkty mleczne odgrywają podstawową rolę w odżywianiu i mają duże znaczenie dla zdrowia człowieka, gdyż są najlepszym źródłem bardzo dobrze przyswajalnego wapnia, dobrze przyswajalnego, pełnowartościowego białka, magnezu, potasu oraz wielu cennych witamin. Jednak nieodpowiednie stosowanie antybiotyków u krów mlecznych, a także nieprzestrzeganie pewnych zasad higienicznych podczas udoju i pozyskiwania mleka, powoduje prawdopodobieństwo występowania nie tylko pozostałości leków weterynaryjnych, ale również drobnoustrojów. Powszechnie uważa się, że poddawane mleka różnym procesom technologicznym pozwala uzyskać produkty odpowiednio bezpiecznie, niezagrażające zdrowiu konsumenta. Wydawać by się mogło, że również potencjalnie występujące leki w mleku surowym, ulegać będą rozkładowi podczas pasteryzacji oraz wytwarzaniu produktów mlecznych. Jednak, prezentowane dane dotyczące wyników badań kontrolnych w Europie i na świecie wskazują na obecność substancji przeciwbakteryjnych również w produktach otrzymywanych z mleka. Szczególnie obecność tetracyklin, które są dosyć powszechnie stosowanymi antybiotykami w leczeniu infekcji wymion u krów mlecznych, została potwierdzona w wielu badaniach. Unijne Raporty badań monitoringowych w latach 2012-2014 wykazały 4 niezgodne próbki mleka zawierające oksytetracyklinę oraz 5 próbek z doksycykliną. Szczególnie istotny jest przypadek wykrycia w 2016 roku tetracykliny w serze w stężeniu 312 µg/kg, podany w systemie RASFF. O ile dla tetracyklin w mleku wyznaczono dopuszczalne limity MRL – 100 µg/kg (z wyjątkiem doksycykliny, której stosowanie u krów mlecznych jest zabronione), to dla produktów mlecznych nie wyznaczono bezpiecznych wartości

pozostałości, w związku z czym dla tych wyrobów obowiązuje tzw. „limit zero” . Dodatkowo, wyniki badań prowadzonych w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii PIWet-PIB, potwierdziły występowanie tetracyklin w mleku w stężeniach 5 – 490 µg/kg oraz w serze na poziomie 7, 15 i 96 µg/kg. Ponadto dane literaturowe również przedstawiają przypadki wykrycia tetracyklin w serach, natomiast brak jest jednoznacznych doniesień dotyczących stabilności tetracyklin podczas procesów otrzymywania produktów mlecznych z mleka zawierającego badane związki.

W związku z tym, postanowiono eksperymentalnie zbadać stopień przechodzenia czterech tetracyklin: oksytetracykliny, tetracykliny, chlortetracykliny i doksyicykliny z mleka zanieczyszczonego tymi substancjami do produktów mlecznych, w procesie ich wytwarzania (**H-7**). W tym celu mleko wzbogacono mieszaniną tetracyklin w stężeniu 100 µg/kg oraz sprawdzono homogeniczność materiału. Jeden litr mleka zawierającego antybiotyki oraz litr mleka bez antybiotyków poddano jednocześnie procesom w których pozyskano śmietanę, maślanekę, masło, mleko zsiadłe, serwatkę, twaróg i ser żółty. Oznaczenia tetracykliny wykonywano opracowaną w tym celu i zwalidowaną metodą LC-MS/MS.

Uzyskane wyniki wskazują na wysoki stopień przenikania i pozostawiania tetracyklin w niektórych produktach. Najwyższe stężenia oznaczono w serze żółtym (280 – 561 µg/kg) i w twarogu (320 – 482 µg/kg). Natomiast poziomy tetracyklin w maśle i w serwatce były odpowiednio 11,8 – 19,0 µg/kg oraz 15,4 – 41,2 µg/kg. Kalkulacje stężeń uwzględniały niekiedy znaczną zmianę masy otrzymywanych produktów. Z jednego litra mleka otrzymywano różną masę produktów: od 0,845 l mleka zsiadłego do 0,018 kg masła.

W pracy **H-7** zbadano także stabilność tetracyklin i stopień rozkładu podczas zabiegu pasteryzacji LTLT (niska temperatura, dłuższy czas). Termostabilność tetracyklin zależała w dużym stopniu od analitu, lecz zaobserwowana redukcja stężeń nie była znaczna. Najwyższą stabilnością charakteryzowała się doksyicyklina ze spadkiem stężenia o 6% w porównaniu do stężenia wyjściowego. Najmniej stabilna okazała się chlortetracyklina, z redukcją 19%. Dodatkowo, określono dystrybucję tetracyklin podczas procesu odłuszczenia mleka. Różnice stężeń pomiędzy mlekiem pełnym i odłuszczonego wynosiły poniżej 19%, co wskazuje że proces odłuszczenia nie wpływa znacząco na transfer tetracyklin.

Uzyskane wyniki badań wskazują na potrzebę kontroli zarówno mleka, jak i produktów mlecznych, gdyż tetracykliny występujące w mleku surowym mogą

utrzymywać się przez cały cykl produkcyjny. Doświadczenie przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych wskazuje, że procesy jakim poddawane jest mleko nie gwarantują całkowitej redukcji zawartości antybiotyków, a wręcz przeciwnie stężenie ustalone za bezpieczne dla człowieka w mleku surowym może zwiększać się w końcowym produkcie i stwarzać potencjalne zagrożenie dla konsumentów.

#### **IV. Badanie występowania w mięsie dzików tetracykliny pochodzącej ze szczepionek dla lisów przeciw wściekliznie (H-8)**

W związku z przypadkami wykrywania wścieklizny (łac. *rabies*) u lisów w Polsce, prowadzone są doustne szczepienia tego gatunku zwierząt. Przyjęta szczepionki znakowana jest tetracykliną, antybiotykiem z grupy tetracyklin, kumulującym się w kościach i wykazującym właściwości fluorescencyjne po związaniu z jonami wapnia. Dzięki temu możliwe jest monitorowanie efektów akcji doustnego uodporniania lisów przeciwko wściekliznie poprzez określenie obecności tetracykliny w kościach żuchwy metodą mikroskopii fluorescencyjnej, jako markera przyjęcia szczepionki. Mimo tego, że docelowym gatunkiem są lisy, istnieje duże prawdopodobieństwo przypadkowego spożycia szczepionki, przez inne gatunki bytujące w ekosystemie leśnym. Szczególnie dziki (*Sus scrofa*), jako zwierzęta wszystkożerne, narażone są na przyjęcie wielu porcji szczepionek zawierających tetracyklinę, która może przenikać do mięśni i pozostawać tam przez pewien okres czasu. W związku z tym, nasuwa się pytanie czy istnieje ryzyko występowania tetracykliny w dzicyźnie, która cieszy się coraz większą popularnością wśród konsumentów? W celu zapewnienia właściwej jakości produktów pochodzenia zwierzęcego, leki przeciwbakteryjne badane są głównie w tkankach pochodzących od bydła, trzody chlewnej, owiec, kóz, koni, drobiu, ryb oraz zwierząt dzikich utrzymywanych w warunkach fermowych. Natomiast brak jest kontroli materiału przeznaczonego do konsumpcji przez człowieka pochodzącego od dzików.

Dzicyzna jest wysoce cenionym produktem kulinarnym ze względu na swoje wartości dietetyczne. W obecnym czasie obserwuje się znaczny wzrost spożycia mięsa tego gatunku zwierząt ze względu na zwiększenie liczebności populacji dzików (*Sus scrofa*) w ostatnich latach, co w konsekwencji powoduje wzrost pozyskiwania mięsa dzików oraz łatwiejszy dostęp do dzicyzny po stosunkowo niskich cenach.

Przynęta szczepionki przeciw wściekliźnie zawiera tetracyklinę (chlorowodorek tetracykliny), w stężeniu ok. 150 mg, która jest markerem przyjęcia szczepionki przez lisy. Zakładając, że dzik o wadze 50 kg, która jest najbardziej pożądaną masą dla myśliwych, spożyje jedną dawkę szczepionki, to stężenie tetracykliny jakie dostanie się do organizmu dzika w przynęcie będzie wynosiło 3 mg/kg. Jednak szacunkowe określenie przyjętego stężenia tetracykliny jest niemożliwe, gdyż ilość pobranych szczepionek może być bardzo różna przez poszczególne osobniki, począwszy od kilku sztuk do kilkudziesięciu, w związku z tym stężenia w tkankach mogą być bardzo zróżnicowane. Ponadto, ze względu na regularność szczepień (dwa razy w roku) może dochodzić do kumulacji tetracykliny w organizmie zwierząt.

W czasie zrzutu szczepionki i kilka dni po zakończeniu nie zaleca się polowań na zwierzynę łowną, aczkolwiek nie ma prawnego zakazu i nie zawsze informacja o planowanych szczepieniach dociera do wszystkich myśliwych. W związku z tym, polowania indywidualne odbywają się także w okresie szczepień oraz w niedługim czasie po ich zakończeniu. Zwłaszcza w obecnej sytuacji, w której populacja dzików znacznie wzrosła oraz kiedy dziki stanowią jedno z głównych źródeł szerzenia się afrykańskiego pomoru świń, zwiększa się intensywność odstrzałów dzików.

Dlatego też, w związku z dużym prawdopodobieństwem skażenia mięsa dzików tetracykliną, pochodzącą ze szczepionki dla lisów, przeprowadzono badanie (**H-8**) w którym poddano analizie 144 próbek mięśni pochodzących od dzików, pobieranych w okresie czterech tygodni od zakończenia zrzutów szczepionek. Wykonane analizy, wykazały obecność tetracykliny w 53 próbkach mięśni dzików, co stanowi 37% wszystkich zbadanych próbek. Oznaczone stężenia mieściły się w granicach 5-286 µg/kg. Analizowano również inne antybiotyki w badanych próbkach, ale nie potwierdzono obecności żadnych dodatkowych substancji. Uzyskane wyniki badań wskazują na wysoką stabilność tetracykliny w szczepionkach, a tym samym w środowisku ich bytowania, gdyż po przedostaniu się do organizmu dzików wykrywane są pozostałości antybiotyku w mięśniach. Ponadto, stosunkowo wysoki procent próbek zawierających tetracyklinę, wskazuje na potrzebę kontroli materiału przeznaczonego do konsumpcji, pochodzącego od zwierząt dzikich w kierunku obecności badanego związku.

### Osiągnięcia:

- Wykazanie możliwości wykrywania oksytetracykliny w płynie ustnym świń, co znacznie usprawni kontrolę stosowania antybiotyków u trzody chlewnej.
- Wykazanie istotnej zależności pomiędzy stężeniami oksytetracykliny w płynie ustnym a poziomami oznaczonymi w tkankach i osoczu.
- Określenie czasu pozostawania i profilu zanikania doksycykliny w tkankach kur i w jajach całych oraz w białku i żółtku, a także wykazanie obecności doksycykliny w tkankach po ustalonym czasie karencji, co w aspekcie zapewnienia bezpiecznej żywności jest niezwykle istotne.
- Wykazanie, że obróbka termiczna nie powoduje całkowitej inaktywacji antybiotyku, a stopień redukcji uzależniony jest ściśle od rodzaju i czasu trwania procesu termicznego.
- Wykazanie przechodzenia tetracyklin z mleka surowego skażonego antybiotykami w procesie otrzymywania produktów mlecznych oraz znacznej ich stabilności podczas pasteryzacji LLT.
- Uzyskanie danych (pierwszych na świecie) dotyczących przenikania i obecności tetracykliny w mięsie dzików, pochodzących ze szczepionek dla lisów.

### Piśmiennictwo

1. Commission Decision 2002/657/EC of August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off J Eur Commun. L 221, 8-36
2. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off J Eur Comm L 15:1-77
3. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC, 86/469/EEC and Decision 89/187/EEC and 91/664/EEC. OJ L 1996, 125, 10-31
4. Ghalaut P., Ghalaut V., Yadav S., Lekhvani S., Yadav A.: Diagnostic applications of saliva. J Clin Diagn Res, 2010, 4, 2330-2336
5. Hofman L.F.: Human saliva as a diagnostic specimen. J Nutr, 2001, 131, 1621- 1625
6. Kittawornrat A, Prickett J, Wang C, Olsen C, Irwin C, Panyasing Y, Ballagi A, Rice A, Main R, Johnson J, Rademacher C, Hoogland M, Rowland R, Zimmerman J.: Detection of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. J Vet Diagn Invest., 2012, 24, 262–269

7. Lui P., Muller M., Derendorf H.: Rational dosing of antibiotics: the use of plasma concentrations versus tissue concentrations. *Int J. Antimicrob Ag*, 2002, 19, 285-290
8. Markowska-Daniel I.: Nowa era w diagnostyce chorób zakaźnych zwierząt? *Lecznica Dużych Zwierząt*, 2010, 12, 68-72
9. Olsen C., Karriker L., Wang C., Binjawadagi B., Renukaradhya G., Kittawornrat A., Lizano S., Coetzee J., Main R., Meiszberg A., Panyasing Y., Zimmerman J.: Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *Vet J.*, 2013, 198(1), 159-163
10. Pfaffe T., Cooper-White J., Beyerlin P., Kostner K., Punyadeera CH.: Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clin Chem*, 2011, 57(5), 675-687
11. Stolker A.A.M., Brinkman U.A.Th. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. *J Chromatogr A*, 2005, 1067, 15-53.
12. Zimmerman J., Prickett J., Johnson J.: Nowe sposoby wykrywania patogenów w populacji świń – tańsze, lepsze i łatwiejsze. *Mag. Wet. Monografia Choroby Świń*, 2010, 595-596
13. Fletouris D.J., Botsoglou N.A. (2000). Stability of residues during food processing (Chapter 17). In Dimitrios J. Fletouris and Nikolaos A. Botsoglou (Eds.) *Drug residues in food: Pharmacology, food safety and analysis* (pp. 515-539). CRC Press.
14. Haagsma, N. (1993). Stability of veterinary drug residues during storage, preparation and processing. *Proceedings of EuroResidue II Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food*. Haagsma N; Ruiter A; Czedik-Eysenberg P.B., Eds., Veldhoven, The Netherlands, May 3-5, pp. 41-49
15. Hassani M., Lazaro R., Perez C., Condon S., Pagan R. (2008). Thermostability of oxytetracycline, tetracycline and doxycycline at ultrahigh temperatures. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56 (8), 2676-2680
16. Moats, W.A. (1999). The effect of processing on veterinary residues in foods. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 459, 233-241
17. Van Egmond H.J., Nouws J.F.M., Schilt R., van Lankveld-Driessen, W.D.M., Streutjens-van Neer E.P.M., Simons, F.G.H. (2000). Stability of antibiotics in meat during a simulated high temperature destruction process. *EuroResidue* 4, 430-437
18. Fedeniuk R.W., Shand P.J., McCurdy A.R. (1997). Effect of thermal processing and additives on the kinetics of oxytetracycline degradation in pork muscle. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 2252-2257
19. Ahmed, K.M.F., Hafez, R.S., Morgan, S.D., Awad, A.A. (2015). Detection of some chemical hazards in milk and some dairy products. *African Journal of Food Science*, 9(4) 187-193
20. Srimulyati, A., Purnawarman, T., Latif, H. (2015). Tetracycline residue detection on cheese imported through Priok Seaport, Jakarta. *Global Veterinaria* 14(6), 819-823
21. Fernandes, S.A.S., Magnavita, A.P.A., Ferrao, S.P.B., Gualberto, S.A., Faleiro, A.S., Figueiredo, A.J., Matarazzo, S.V. (2014). Daily ingestion of tetracycline residues present in pasteurized milk: a public health problem. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 3427-3434
22. Hsieh, M.K., Shyu, C.L., Liao, J.W., Franje, C.A., Huang, Y.J., Chang, S.K., et al. (2011). Correlation analysis of heat stability of veterinary antibiotics by structural degradation, changes in antimicrobial activity and genotoxicity. *Veterinary Medicine Czech*, 56, 274-285

23. Kebede, G., Zenebe, T., Disassa, H., Tolosa, T. (2014) Review on detection of antimicrobial residues in raw bulk milk in dairy farms. *African Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(4), 87-97
24. Cinquina A.L., Longo F., Anastasi G., Giannetti L., Cozzania R.: Validation of a high – performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J Chromatogr A* 2003, 987 (1-2), 227-233
25. Pereira, R.V., Siler, J.D., Bicalho, R.C., Warnick, L.D. (2014). Multiresidue screening of milk withheld for sale at dairy farms in central New York State. *Journal of Dairy Science.*, 97(3), 1513-1519
26. Jerome del Castillo R.E.: Tetracyclines. In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, edited by S. Giguere, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Walker, P.M. Dowling, New York, 2006, pp. 31–239.
27. Cherlet M., Schelkens M., Croubels S., De Backer P.: Quantitative multi-residue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2003, 492, 199–213.
28. Oka H., Ikai Y., Ito Y., Hayakawa J., Harada K., Suzuki M., Odani H., Maeda K.: Improvement of chemical analysis of antibiotics. XXIII. Identification of residual tetracyclines in bovine tissues by electrospray high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 1997, 693, 337–344.
29. Gajda A., Posyniak A., Żmudzki J., Tomczyk G.: Determination of doxycycline in chicken fat by liquid chromatography with UV detection and liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2013, 928, 113–120.
30. Gajda A., Posyniak A., Pietruszka K.: Analytical procedure for the determination of doxycycline residues in animal tissues by liquid chromatography. *Bull Vet Inst Pulawy* 2008, 52, 417-420
31. Donoghue DJ. 2003. Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: Human health concerns? *Poultry Sci.* 82 (4) : 618-621
32. Donoghue DJ, Hairston H. 1999. Oxytetracycline transfer into chicken egg yolk or albumen. *Poultry Sci.* 78 (3) : 343-345
33. Donoghue DJ, Hairston H. 2000. Food safety concern: antibiotics may rapidly contaminated egg albumen during the process of formation. *Brit Poultry Sci.* 41 : 174-177
34. European Commission Report. Commission Staff Working Paper on the Implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2014. (Council Directive 96/23/EC).  
[http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/docs/workdoc\\_2014\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/docs/workdoc_2014_en.pdf)
35. EMEA Summary Report Doxycycline (2), European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections, Committee for Veterinary Medicinal Products. Doxycycline – Summary Report (2). EMEA/MRL/270/97, 1997.
36. Hafez HM. 1991. Factors Influencing Drug Residues in Poultry Products: A Review. *Archiv fur Geflugelkunde.* 55 : 193-195
37. Kan CA. Petz M. 2000. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. *J Agric Food Chem.* 48 : 6397-6403
38. Kennedy DG, Cannavan A, McCracken RJ. 2000. Regulatory problems caused by contamination, a frequently overlooked cause of veterinary drug residues. *J Chromatogr A.* 882 : 37–52

39. Cooper AD, Stubbings GWF, Kelly M, Tarbin JA, Farrington WHH, Shearer G. 1998. Improved method for the on-line metal chelate affinity chromatography – high performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal products. *J Chromatogr A*. 812 : 321-326
40. Campbell, T.A., Long, D.B. (2009). Feral swine damage and damage management in forested ecosystems. *Forest Ecology and Management*, 257, 2319-2326
41. Campbell, T. A., Long, D. B., Massei, G. (2011). Efficacy of the Boar-Operated-System to deliver baits to feral swine. *Preventive Veterinary Medicine*, 98, 243-249
42. Fletcher, W.O., Creekmore, T.E., Smith, M.S., Nettles, V.F. (1990). A field trial to determine the feasibility of delivering oral vaccines to wild swine. *Journal of Wildlife Disease*, 26(4), 502-510
43. Gajda, A., Posyniak, A. (2015). Liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for the determination of ten tetracycline residues in muscle samples. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 59, 345-352
44. Hoffman, L.C., Wiklund, E. (2006). Game and venison – meat for the modern consumer. *Meat Science*, 74, 197-208
45. Johnston, J.J., Primus, T.M., Buettgenbach, T., Furcolow, C.A., Goodall M.J., Slate D., Chipman R.B., Snow J.L., DeLiberto T.J. (2005). Evaluation and significance of tetracycline stability in rabies vaccine baits. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(3), 549-558
46. Rosatte, R.C., Lawson, K.F. (2001). Acceptance of baits for delivery of oral rabies vaccine to raccoons. *Journal of Wildlife Diseases*, 37, 730-739
47. Oka, H., Ito, Y., Ikai, Y., Kagami, T., Harada, K. (1998). Mass spectrometric analysis of tetracycline antibiotics in food. *Journal of Chromatography A*, 812, 309–319
48. Anderson C.R., Rupp H.S., Wu W-H.: Complexities in tetracycline analysis – chemistry, matrix extraction, cleanup and liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2005, 1075, 23-32



## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych w zakresie badań prowadzonych poza zgłaszanym cyklem tematycznym**

### **5a) Opracowanie metod oznaczania leków przeciwbakteryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego**

Wśród produktów leczniczych stosowanych w weterynarii istnieje duża różnorodność. Jednak nadmierne i nieracjonalne stosowanie leków przeciwbakteryjnych u zwierząt, może powodować występowanie ich pozostałości w wielu produktach – w tkankach, jajach, miodzie, tłuszczu. W związku z tym konieczne jest prowadzenie kontroli występowania różnych grup substancji przeciwbakteryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego. Badania te odbywają się z zastosowaniem zwalidowanych metod analitycznych, opracowanych według ściśle przyjętych wymagań i kryteriów analitycznych. Dlatego też opracowano i wdrożono do praktyki laboratoryjnej wiele nowych, oryginalnych procedur badawczych, spełniających przyjęte w tym zakresie standardy światowe.

Opracowano metody wieloskładnikowe, pozwalające na oznaczanie w jednym toku analitycznym szerokiego zakresu związków w tkankach, jajach, albuminach i w miodzie. Było to duże wyzwanie analityczne, gdyż pomimo, że antybiotyki wywierają podobny efekt terapeutyczny, to jednak należą do różnych grup chemicznych, a to z kolei wiąże się z różnorodnością ich właściwości fizykochemicznych. W większości opracowanych procedur wykorzystano wysoce czułą i selektywną technikę chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS), która umożliwiła znaczne uproszczenie i skrócenie całego systemu przygotowywania próbek do badań, co znacznie obniża koszty prowadzonych analiz. W porównaniu do klasycznych metod możliwe jest wykrywanie, potwierdzanie i oznaczanie śladowych ilości substancji przeciwbakteryjnych.

W każdej z opracowanych metod optymalizowano w pierwszej kolejności warunki detekcji i rozdziału chromatograficznego dla danej grupy związków lub kilku grup antybiotyków jednocześnie. Następnie opracowywano najbardziej optymalny sposób izolacji związków z matrycy biologicznej. Szczególnie ważnym etapem było właściwe oczyszczenie ekstraktów, ponieważ skład próbki ma istotne znaczenie na wynik. Głównym celem było opracowanie takiego postępowania analitycznego, które umożliwiłoby wiarygodne oznaczenia, z jednoczesnym niezbyt skomplikowanym i czasochłonnym etapem przygotowania próbek do analizy instrumentalnej.

Wszystkie metody zostały zwalidowane zgodnie z europejskimi wymaganiami, a następnie wdrożone do realizacji Krajowego Programu Badań Kontrolnych Pozostałości Chemicznych, Biologicznych i Leków, który został wprowadzony w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii w 2003 roku.

Brałam czynny udział w opracowaniu następujących metod analitycznych oznaczania pojedynczych grup związków: tetracyklin w tkankach, linkomycyny w miodzie, fluorochinolonów w jajach, enrofloksacyny i ciprofloksacyny w albuminach i proszku jajecznym, doksycykliny w tłuszczu, a także w opracowywaniu wieloskładnikowych metod umożliwiających analizę wielu grup leków przeciwbakteryjnych w tkankach, jajach oraz albuminach jaj kurzych.

### Prace oryginalne:

- Piątkowska M., Gbylik-Sikorska M., **Gajda A.**, Jedziniak P., Błądek T., Żmudzki J., Posyniak A.: Multiresidue determination of veterinary medicines in lyophilized egg albumen with subsequent consumer exposure evaluation. *Food Chemistry*, 2017, 229, 646-652  
**IF = 4,529; MNiSW = 40**
- **Gajda A.**, Posyniak A.: Liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for the determination of ten tetracycline residues in muscle samples. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2015, 59, 345-352  
**IF = 0,468; MNiSW = 15**
- **Gajda A.**, Posyniak A., Żmudzki J., Tomczyk G.: Determination of doxycycline in chicken fat by liquid chromatography with UV detection and liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B – Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2013, 928, 113-120  
**IF = 2,694; MNiSW = 30**
- Gbylik M., Posyniak A., **Gajda A.**, Błądek T.: Determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in albumin and freeze-dried-eggs by liquid chromatography with fluorescence detection. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2013, 57, 351-355  
**IF = 0,365; MNiSW = 20**
- **Gajda A.**, Posyniak A., Żmudzki J., Gbylik M., Błądek T.: Determination of (fluoro)quinolones in eggs by liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2012, 135, 430-439  
**IF = 3,334; MNiSW = 45**

- Błądek T., Posyński A., **Gajda A.**, Gbylik M., Żmudzki J.: Multi-class procedure for analysis of antibacterial compounds in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2012, 56, 321-327  
**IF = 0,377; MNiSW = 20**
- Błądek T., Posyński A., **Gajda A.**, Gbylik M., Żmudzki J.: Multi-class procedure for analysis of antibacterial compounds in animal tissues by liquid chromatography-mass spectrometry. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2011, 55, 741-748  
**IF = 0,414; MNiSW = 20**
- Błądek T., **Gajda A.**, Gbylik M., Posyński A., Żmudzki J. : Analytical procedure for the determination of lincomycin in honey by liquid chromatography-mass spectrometry. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2010, 54, 205-209  
**IF = 0,321; MNiSW = 20**
- **Gajda A.**, Posyński A.: Tetracyclines and their epimers in animal tissues by high-performance liquid chromatography. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2009, 53, 263-267  
**IF = 0,218; MNiSW = 20**
- **Gajda A.**, Posyński A., Pietruszka K.: Analytical procedure for the determination of doxycycline residues in animal tissues by liquid chromatography. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2008, 52, 417-420,  
**IF = 0,337; MNiSW = 20**

#### **5b) Badanie wpływu zakażenia *Actinobacillus pleuropneumoniae* na farmakokinetykę tulatromycyny u świń**

Większość badań przedklinicznych dla produktów leczniczych oraz wyznaczanie parametrów farmakokinetycznych wykonywanych jest na zdrowych zwierzętach. Tymczasem stany chorobowe mogą znacząco zmieniać farmakokinetykę leków przeciwbakteryjnych oraz wpływać na ich metabolizm i wydalanie z organizmu. Z terapeutycznego punktu widzenia wysokie stężenia leku w tkankach i narządach leczonych zwierząt są jak najbardziej pożądane, ale z tym związana jest ich dłuższa eliminacja, co może powodować występowanie pozostałości.

Tualtromycyna jest antybiotykiem makrolidowym nowej generacji, który w znacznych ilościach przechodzi do organizmu zwierzęcego, gdzie może pozostawać przez długi okres czasu. Stosowana jest w leczeniu infekcji dróg oddechowych u świń,

w tym w zwalczaniu infekcji wywoływanej przez *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*App*), powodującej straty ekonomiczne w produkcji trzody chlewnej.

W związku z dość licznymi doniesieniami o wpływie infekcji na zmianę farmakokinetyki leków, postanowiono przeprowadzić doświadczenie na zwierzętach, w którym zbadano wpływ infekcji *App* na farmakokinetykę tulatromycyny w osoczu i płucach oraz farmakokinetykę tkankową u świń. Zwierzęta podzielono na dwie grupy: Grupa I w której znalazły się świnię zdrowe, Grupa II w której znalazły się świnię zainfekowane *App*. Zarówno zwierzęta zdrowe, jak i zwierzęta wykazujące wyraźne objawy chorobowe otrzymały jednorazowo, domięśniową dawkę tulatromycyny (2,5 mg/kg m.c.). Następnie od świń z obu grup pobierano próbki osocza oraz tkanek i narządów (wątroba, nerki, płuca, miejsce iniekcji oraz skóra z tłuszczem), w których wykonano oznaczenia zawartości tulatromycyny.

Przeprowadzone badanie wykazały wyraźny wpływ infekcji *App* na zmiany w profilu farmakokinetycznym antybiotyku zwiększając zarówno AUC w osoczu, jak i w badanych tkankach i narządach oraz wydłużając jego eliminację z organizmu. Największe różnice w wartościach AUC pomiędzy chorymi a zdrowymi świniami stwierdzono w wątrobie oraz kolejno w miejscu iniekcji, skórze z tłuszczem, mięśniach, nerkach, płucach i osoczu. Dodatkowo u zakażonych świń obserwowano zwiększoną dystrybucję tego leku do płuc, co obrazuje wyższy stosunek  $AUC_{\text{płuca}}/AUC_{\text{osocze}}$  w porównaniu do grupy zdrowej.

Ponadto stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenia leku w tkankach i narządach w końcowych punktach eksperymentu (po 360 i 792 h), co świadczy o tym, że infekcja przyczynia się do wzrostu stężeń w tkankach przeznaczonych do spożycia dla ludzi, a tym samym może wpływać na występowanie pozostałości antybiotyku po ustalonych okresach karencji.

Biorąc pod uwagę wyciągnięte wnioski, niezwykle ważne jest prowadzenia dalszych badań nad wpływem stanów chorobowych na farmakokinetykę pozostałych leków przeciwbakteryjnych stosowanych w praktyce weterynaryjnej.

### **Prace oryginalne:**

- **Gajda A.**, Posyniak A., Błądek T.: Analytical procedure for the determination of tulathromycin in swine plasma. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2013, 57, 191-196  
**IF = 0,365; MNiSW = 20**

- **Gajda A.**, Bladek T., Jabłoński A., Posyniak A.: The influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection on tulathromycin pharmacokinetics and lung tissue disposition in pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2016, 39, 2, 176-182  
**IF = 1,279; MNiSW = 25**
- Bladek T., Posyniak A., Jablonski A., **Gajda A.**: Pharmacokinetics of tulathromycin in edible tissues of healthy and experimentally infected pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Food Additives and Contaminants Part A*, 2015, 32 (11), 1823-1832  
**IF = 1,878; MNiSW = 30**

### **5c) Badanie wpływu śladowych ilości enrofloksacyny na farmakokinetykę doksycykliny u brojlerów kurzych zdrowych i zakażonych *Mycoplasma gallisepticum***

W praktyce weterynaryjnej, wiele produktów leczniczych zwłaszcza u drobiu podawanych jest z wodą pitną, ze względu na możliwość jednoczesnej aplikacji całej obsadzie zwierząt, łatwość przygotowania roztworów, możliwość szybkiej zmiany dawki lub leku, jeśli jest to konieczne, oraz względnie niskie koszty logistyczne. Jednak taka droga podania związana jest z tym, że substancje przeciwbakteryjne, po zakończeniu aplikacji bez zastosowania odpowiednia czyszczenia, mogą pozostawać w systemach dozowania wody przez długi okres czasu. Leki adsorbują się na wewnętrznej powierzchni rur tworząc kompleksy z jonami wapnia, żelaza, magnezu obecnymi w wodzie. Jednak po zakończonej antybiotykoterapii mogą stopniowo uwalniać się rur poprzez wymywanie, przez co zdrowe, nieleczone zwierzęta narażone są na przyjmowanie śladowych stężeń leków. Stała ekspozycja zdrowych zwierząt w wodzie pitnej może prowadzić do ich pozostałości w tkankach. W związku z tym, w Polsce prowadzona jest kontrola produktów przeznaczonych dla zwierząt jak woda.

W ramach przeprowadzonych badań kontrolnych wody do pojenia zwierząt hodowlanych w latach 2016 – 2017, obecność substancji przeciwbakteryjnych stwierdzono w 288 próbkach na ok. 16 000 przebadanych, pobieranych z ferm drobiu i trzody chlewnej. Ze względu na fakt, że w badaniach wykonywanych w ramach kontroli wody, najczęściej wykrywanym związkiem jest enrofloksacyna i doksycyklina, przeprowadzono doświadczenie na kurach, w którym badano wpływ stałej ekspozycji śladowymi ilościami enrofloksacyny (500 µg/l z wodą do picia) na stężenie

doksycykliny w mięśniach i wątrobie kur brojlerów, po podaniu w dawce 20 mg/kg mc. Kury podzielono na dwie grupy doświadczalne: I grupa miała dostęp do wody wolnej od antybiotyków; II grupa miała dostęp do wody zawierającej enrofloksynę. W piątym tygodniu życia kurom z obu grup podawano doksycyklinę w dawkach terapeutycznych przez pięć kolejnych dni. Stwierdzono statystyczne różnice pomiędzy średnim stężeniem doksycykliny w tkankach, w próbkach pobranych od ptaków poddanych stałej ekspozycji na śladowe ilości enrofloksacyny (grupa II), stężenie doksycykliny było prawie o 50% wyższe niż w próbkach pochodzących od kur z grupy I. Stwierdzano także śladowe ilości enrofloksacyny w mięśniach i wątrobie kur.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że nawet śladowe ilości enrofloksacyny w wodzie, która jest podawana często nieświadomie kurom brojlerom *ad libitum* przez cały okres chowu, może mieć istotny wpływ na pozostałości doksycykliny podawanej celowo w dawkach terapeutycznych.

Badano także wpływ zakażenia na zależności pomiędzy długotrwałą (sześciotygodniową) ekspozycją kur na śladowe ilości enrofloksacyny w wodzie (500 µg/kg) a kinetyką tkankową doksycykliny podawanej w dawkach terapeutycznych (20 mg/kg mc.). W tym celu kury zakażano *Mycoplasma gallisepticum* oraz wyznaczano parametry farmakokinetyczne doksycykliny w tkankach i osoczu. Najwyższe stężenie doksycykliny wykryto w wątrobie u zakażonych ptaków, które otrzymywały wodę zawierającą śladowe ilości enrofloksacyny. Były one o 40% wyższe niż u ptaków zdrowych, które otrzymywały wodę wolną od enrofloksacyny.

Wartość parametru  $AUC_{(0-t)}$  była o 75% wyższa u ptaków zakażonych w porównaniu do ptaków zdrowych. Także wartości  $C_{max}$  znacząco różniły się między grupami, przy  $T_{max}$  które w grupie zwierząt zainfekowanych znacznie się wydłużyło w porównaniu do wartości uzyskanej w grupie zwierząt zdrowych.

Uzyskane wyniki wskazują, że infekcja również w znaczny stopniu modyfikuje dystrybucję leku w organizmie zwierzęcym. Zwykle u chorych ptaków występują wyższe stężenia w narządach docelowych (objętych infekcją) w porównaniu do stężeń, występujących u zwierząt zdrowych.

Wydłużenie czasu eliminacji leku z organizmu zwierzęcego, a w związku z tym obecność pozostałości po czasie karencji, może powodować negatywne skutki, zarówno ekonomiczne (utyliczacja produktów) lub też zdrowotne dla konsumentów żywności pochodzenia zwierzęcego.

**Prace oryginalne:**

- Gbylik-Sikorska M., Posyniak A., Sniegocki T., Sell B., **Gajda A.**, Tomczyk G., Zmudzki J.: The effect of doxycycline concentrations increased in chicken tissues as consequence of permanent exposure to enrofloxacin traces supplied with drinking water. *Journal of Veterinary Research* 2016, 60, 293-299  
**IF = 0,462; MNiSW = 15**
- Gbylik-Sikorska M., Posyniak A., Sniegocki T., Sell B., **Gajda A.**, Sawicka A., Olszewska-Tomczyk M., Bładek T., Tomczyk G., Zmudzki J.: Influence of enrofloxacin traces in drinking water to doxycycline tissue pharmacokinetics in healthy and infected by *Mycoplasma gallisepticum* broiler chickens. *Food and Chemical Toxicology*, 2016, 90, 123-129  
**IF = 3,778; MNiSW = 40**
- Gbylik – Sikorska M., **Gajda A.**, Posyniak A.: Pharmacokinetics depletion phase of doxycycline in healthy and *Mycoplasma gallisepticum* infected chicken broilers after coadministration of enrofloxacin traces. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2018, 41(1), 166  
**IF = 1,202; MNiSW = 25**

**5d) Analityka i kinetyka zanikania tetracyklin i sulfonamidów w produktach pszczelich**

Stosowanie substancji przeciwbakteryjnych, w tym tetracyklin i sulfonamidów w pszczelarstwie jest zabronione, gdyż nie ma dla nich wyznaczonych wartości MRL w miodzie. Pomimo tego zakazu, wyniki badań kontrolnych pozostałości leków przeciwbakteryjnych z krajów Unii Europejskiej oraz dane RASFF wskazują na częste wykrywanie, zwłaszcza sulfonamidów oraz oksytetracykliny w miodzie.

W związku z przypadkami występowania oksytetracykliny w miodzie, postanowiono zbadać czas pozostawania oraz stężenia tego antybiotyku w miodzie po doświadczalnym podaniu leku pszczołom w warunkach pasiecznych. Oksytetracyklinę podawano pszczołom wraz z syropem cukrowym w dawce 0,5 g/1 litr syropu. Lek podawano trzykrotnie, w odstępach siedmiodniowych. Próbkę miodu pobierane były po upływie miesiąca od ostatniego podania leku, a także po 12 miesiącach (po okresie przezimowania). Analizę ilościową oksytetracykliny wykonano opracowaną w tym celu i zwalidowaną metodą chromatografii cieczowej z detektorem UV. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że po eksperymentalnym podaniu oksytetracykliny pszczołom, po upływie miesiąca od podania, we wszystkich

analizowanych próbkach miodu stwierdzono obecność badanego antybiotyku w stężeniach 17300 µg/kg – 34000 µg/kg. Natomiast w próbkach miodu pobranych po upływie 12 miesięcy od podania (po przezimowaniu rodzin pszczelich) nie stwierdzono obecności oksytetracykliny w stężeniach wyższych od granicy oznaczalności stosowanej metody, LOQ = 10 µg/kg. W warunkach laboratoryjnych (temp. 18-20°C), oksytetracyklina utrzymywała się w miodzie przez okres 18 miesięcy w stężeniach 425 – 348 µg/kg.

W trakcie badań ustalono, że oksytetracyklina po zastosowaniu u pszczół w znacznych ilościach przedostaje się do miodu, ale w warunkach pasiecznych jest niestabilna i względnie szybko zanika (po 12 miesiącach od podania nie stwierdzono już obecności antybiotyku w miodzie). Natomiast wyniki badania stabilności oksytetracykliny w trakcie przechowywania w warunkach laboratoryjnych jednoznacznie wskazują, że jej zawartość ulega znacznie wolniejszemu zanikaniu.

Tetracykliny podawane pszczołom z miodu mogą przedostawać się do innych produktów pszczelich, jak wosk. W celu kontroli wosku na obecność tetracyklin opracowano metodę analityczną z zastosowaniem techniki LC-MS/MS, umożliwiającej analizę siedmiu związków z tej grupy. Badania 48 próbek wosku pszczelego, pochodzącego z różnych rejonów Polski wykazały obecność oksytetracykliny w 5 próbkach.

Sulfonamidy to najczęściej oznaczane związki w miodzie. Najwyższy odsetek próbek niezgodnych w obrębie leków przeciwbakteryjnych dotyczy właśnie sulfonamidów. W celu zwiększenia zakresu i możliwości analitycznych dotychczas stosowanej metody oznaczania tych związków podjęto się opracowania nowej, ulepszonej procedury ich analizy w miodzie. W wyniku przeprowadzonych badań możliwe było uzyskanie rozdziału chromatograficznego siedmiu sulfonamidów i jednego wzorca wewnętrznego z wykorzystaniem nowej kolumny chromatograficznej, z zastosowaniem detekcji fluorescencyjnej. Opracowana metoda została zwalidowana i umożliwiła oznaczanie sulfonamidów na niskich poziomach stężeń. Procedura została włączona do programu badań kontrolnych pozostałości, a najczęściej oznaczanymi sulfonamidami w miodzie okazały się sulfatiazol, sulfacetamid i sulfametazyna.



**Prace oryginalne:**

- **Gajda A.**, Posyniak A., Bladek T., Bober A., Żmudzki J.: Oxytetracycline residues in honey analyzed by liquid chromatography with UV detection. *Journal of Apicultural Science*, 2013, 57 (1), 25-32  
**IF = 0,817; MNiSW = 20**
- Posyniak A., Jażdżewski K., Pietruszka K., Mitrowska K., **Gajda A.**: Improved analytical procedure for the determination of sulfonamides in honey. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2008, 52, 87-91  
**IF = 0,337; MNiSW = 20**
- **Gajda A.**, Antczak M., Mitrowska K., Posyniak A.: Development, validation and application to real samples of a liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for determination of tetracyclines in beeswax. *Journal of Separation Science*. DOI: 10.1002/jssc.201800503.  
**IF = 2,415; MNiSW = 30**

**5e) Analiza i wykrywanie leków przeciwbakteryjnych w wodzie i w paszach**

Leki stosowane, zarówno w medycynie weterynaryjnej, jak i ludzkiej, mogą przedostawać się do środowiska. Antybiotyki w niezmienionej postaci trafiają do środowiska naturalnego (wód gruntowych, powierzchniowych) gdzie mogą pozostawać przez bardzo długo czas. Szeroko i bardzo często w sposób niekontrolowany stosuje się antybiotyki w hodowlach zwierząt wodnych, zwłaszcza ryb, małż i krewetek. Zarówno w tkankach organizmów wyższych jak i w wodach czy glebach, antybiotyki często osiągają stężenia określane jako subinhibicyjne – niższe niż stężenia hamujące wzrost drobnoustrojów, co jest przyczyną gwałtownego rozprzestrzeniania się lekooporności wśród bakterii chorobotwórczych i środowiskowych.

W celu zbadania występowania antybiotyków i chemioterapeutyków w polskich rzekach i jeziorach, przebadano 159 próbek wody, 150 próbek osadów dennych i 443 próbki ryb pobieranych z 6 rzek oraz 3 jezior, z różnych regionów Polski. Do przeprowadzenia tych badań opracowano wieloskładnikową metodę pozwalającą oznaczyć 45 związków z 9 różnych grup.

Dla pełnej kontroli łańcuch żywnościowego niezbędne jest dysponowanie wiarygodnymi metodami pozwalającymi oznaczać występowania leków w paszach. Pomimo, że substancje przeciwbakteryjne z grupy fluorochinolonów nie są dopuszczone do stosowania w paszach i materiałach paszowych dla zwierząt rzeźnych, zdarzają się przypadki występowania niskich stężeń tych

chemioterapeutyków w mieszankach paszowych. Dlatego też podjęto się opracowania metody pozwalającej na wykrycie i oznaczenie ilościowe ciprofloksacyny, enrofloksacyny, sarafloksacyny i difloksacyny w paszach dla zwierząt rzeźnych z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej z detektorem fluorescencyjnym.

Opracowano także metodę chromatografii cieczowej z detektorem UV do wykrywania i oznaczania olaquindoksu i karbadoksu, należących do grupy syntetycznych leków przeciwbakteryjnych, które mogą być stosowane nielegalnie jako stymulatory wzrostu w dodatkach paszowych. Mając na względzie zdrowie oraz bezpieczeństwo konsumentów w Rozporządzeniu Rady (WE) nr 2788/98 Komisja Europejska zakazała stosowania benzopirazyny -N-dwutlenkukarbadoksu i olaquindoksu jako dodatków paszowych, ze względu na możliwość wywoływania działań kancerogennych oraz mutagennych.

### **Prace oryginalne:**

- Gbylik – Sikorska M., Posyniak A., Mitrowska K., **Gajda A.**, Błądek T., Śniegocki T., Żmudzki J.: Occurrence of veterinary antibiotics and chemotherapeutics in fresh water, sediments and fish of the rivers and lakes in Poland. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2014, 58, 399-404  
**IF = 0,357; MNiSW = 15**
- Gbylik-Sikorska M., Posyniak A., **Gajda A.**, Piątkowska M., Gaweł M.: Występowanie pozostałości leków przeciwbakteryjnych w wodzie pochodzącej z systemów pojenia drobiu. Pasze Przemysłowe, 2014, 23(2), 48-53  
**MNiSW = 3**
- Gbylik A., Posyniak A., **Gajda A.**: Simultaneous determination of fluoroquinolones in feed by liquid chromatography with fluorescence detection. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2012, 56, 343-347,  
**IF = 0,377; MNiSW = 20**
- Gbylik M., **Gajda A.**, Śniegocki T., Posyniak A.: Wykrywanie olaquindoksu i karbadoksu w paszach techniką chromatografii cieczowej z detektorem UV. Pasze przemysłowe, 2011, 20 (2), 64-66  
**MNiSW = 3**

## **5f) Badanie możliwości wykrywania i oznaczania antybiotyków w piórach kurzych**

Masowa produkcja drobiu wymaga zapewnienia zwierzętom odpowiednich warunków ich utrzymania, zgodnych z wytycznymi dobrostanu zwierząt. A jednocześnie kontrola stosowania antybiotyków (zwłaszcza w przypadku nielegalnego podawania) jest ważnym elementem zabezpieczającym zdrowie konsumentów, a także zapewniającym odpowiednią jakość hodowli drobiu. W związku z tym poszukuje się metod kontroli, które dawałyby możliwość przyżyciowego wykrywania antybiotyków u zwierząt. Najmniej inwazyjnym sposobem badania stosowania antybiotyków u drobiu, wydaje się być wykorzystanie piór kurzych, jako alternatywy dla innych matryc biologicznych.

Obecnie materiałem do badań na obecność antybiotyków u drobiu są głównie próbki tkanek (mięśnie, wątroba), pobierane bezpośrednio po uboju. Jednak badania pośmiertne nie dają możliwości monitorowania stosowania antybiotyków na fermach w trakcie hodowli. W badaniach przyżyciowych głównym problemem jest pozyskiwanie materiału do badań. U kur niosek do analiz mogą być pobierane jaja, jednak u brojlerów kurzych możliwości pozyskania materiału przyżyciowo są mocno ograniczone.

Analiza piór pozwala na określenie narażenia ptaków na antybiotyki oraz określenia czasu zastosowania antybiotyku i sposobu leczenia zwierząt (Jansen et al. 2016). Znaczną zaletą badania piór jest rozpoznanie i odtworzenie częstotliwości aplikowania leków u ptaków oraz rozróżnienie legalnego, zgodnie ze wskazaniami doustnego podawania od nielegalnego stosowania antybiotyków, np. w postaci sprayu. W celach profilaktycznych, pewne substancje przeciwbakteryjne aplikowane są nielegalnie przez długi okres czasu w stężeniach subterapeutycznych, co znacznie sprzyja rozwojowi i rozprzestrzenianiu się lekoopornych szczepów bakteryjnych. Analiza nowej matrycy, dawałaby możliwość zwalczania takiego niedopuszczalnego postępowania. Badanie piór pozwoliłoby na szybka weryfikację zgodności stosowanych aktualnie leków z prowadzoną na fermie dokumentacją leczenia, gdyż w przypadku wykrycia leków w tkankach zdarzają się przypadki braku odnotowania procesu ich podawania w książkach leczenia ptaków.

Pióra kurze są produktem ubocznym przemysłu drobiarskiego, nie przeznaczonym do konsumpcji przez człowieka. Głównym wykorzystaniem piór jest ich przeznaczenie do produkcji pasz dla wielu zwierząt gospodarskich. Jako składnik pasz

mogą być źródłem przedostawania się antybiotyków do łańcucha żywnościowego. W badaniach przeprowadzonych w laboratorium ZFT, potwierdzono obecność antybiotyków w mączkach drobiowych. Oznaczonymi związkami była doksycyklina i enrofloksacyna. Źródłem zanieczyszczeń były najprawdopodobniej pióra kurze. Ponadto, inne dane literaturowe potwierdzają wykrywanie antybiotyków w mączkach z piór, spośród których grupa tetracyklin, do której należy doksycyklina, była najczęściej stwierdzaną grupą związków. Biorąc pod uwagę jakość i bezpieczeństwo pasz przeznaczonych dla zwierząt hodowlanych, badania piór wydają się być jak najbardziej uzasadnione.

W związku z powyższym, podjęto się opracowania nowej metody UHPLC-MS/MS oznaczania 53 substancji przeciwbakteryjnych w piórach, należących do 11 różnych grup związków. Przeprowadzono także doświadczenie, w którym kurom brojlerom podawano doksycylinę, a następnie badano przechodzenie antybiotyku oraz stężenia w piórach, tkankach i kościach (analiza i opracowywanie wyników w trakcie realizacji).

#### **Doniesienia naukowe:**

- **Gajda A.**, Nowacka-Kozak E., Gbylik-Sikorska M., Piątkowska M., Posyński A. Antybiotyki w piórach kurzych jako potencjalne źródło zanieczyszczenia pasz. Wydawnictwo Pasze Przemysłowe, ISSN 1230-4743, 2018, nr 2, 76, Lublin 2018  
**MNiSW = 3**
- **Gajda A.**, Nowacka-Kozak E., Gbylik-Sikorska M., Posyński A. Multiclass ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) method for the analysis of veterinary drugs in poultry feathers. 8th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, Ghent, Belgium, 22-25.05.2018 – Doniesienie naukowe

#### **5g) Badania farmakokinetyczne wybranych antybiotyków i flawonoidów u krów mlecznych i w mleku**

Mastitis jest obecnie jedną z najczęściej występujących i najbardziej „kosztownych” chorób bydła mlecznego. Straty ekonomiczne generowane schorzeniem wynikają nie tylko z kosztów leków i obsługi weterynaryjnej, ale także ze strat mleka, które chorobowo zmienione nie może być oddawane do punktów skupu. Szacuje się, że corocznie na zapalenie wymienia zapada od 20% do nawet 50% krów na całym świecie.

Zapalenia gruczołu mlekowego tła bakteryjnego bez wątpienia wymaga podania antybiotyku. W związku z tym, że amoksycylina i penicylina G są często stosowane w zwalczaniu stanów zapalnych wymion, podjęto próbę określenia czy mastitis może mieć wpływ na ustalone dla tych leków czasy karencji. O ile dla amoksycyliny nie obserwowano znaczących zmian parametrów farmakokinetycznych, to stężenie penicyliny G utrzymywało się na poziomie MRL dla mleka przez 69 godz.

Aby zredukować stosowanie antybiotyków u zwierząt, coraz częściej powraca się do naturalnych metod leczenia, z wykorzystaniem preparatów ziołowych. Jednym z przykładów związków, mających korzystny wpływ na zdrowie i produktywność bydła są flawonole, należące do grupy flawonoidów, do których zalicza się kwercetynę. W związku z przeciwzapalnym działaniem tego flawonoidu, postanowiono określić jego parametry farmakokinetyczne oraz czas utrzymywania się w mleku.

W zwalczaniu zakażeń wywołanych przez *Mycoplasma bovis* u bydła, powszechnie stosowana jest enrofloksacyna w połączeniu z fluniksyną. Dlatego też, podjęto się przeprowadzenia badań wystąpienia ewentualnych interakcji tych dwóch leków oraz określenia wpływu fluniksyny na działanie i efektywność terapeutyczną enrofloksacyny u cieląt. Dodatkowym badanym czynnikiem był immunostymulator – pegbovigrastim. Przeprowadzone badanie wykazały wyraźną zmianę parametrów farmakokinetycznych enrofloksacyny w obecności fluniksyny, zarówno w obecności immunostymulatora, jak i bez jego stosowania.

### Prace oryginalne:

- Burmańczuk A., Grabowski T., Gbylik-Sikorska M., **Gajda A.**, Kowalski C.: Withdrawal of amoxicillin and penicillin G procaine in milk after intramammary administration in dairy cows with mastitis. *Journal of Veterinary Research*, 2017, 61 (1), 37-43  
**IF = 0,811; MNiSW = 15**
- Gbylik-Sikorska M., **Gajda A.**, Burmańczuk A., Tomasz Grabowski: Oznaczanie kwercetyny w mleku z zastosowaniem techniki UHPLC-MS/MS. Congress for young scientists Vet-Twin Project, Puławy, 27.10.2017 – Doniesienie naukowe
- Gbylik-Sikorska M., **Gajda A.**, Dudek K., Bednarek K., PosyniakA.: Pharmacokinetics of enrofloxacin co-administration with flunixin meglumine and immunostimulator in the adjunctive therapy of *Mycoplasma bovis* infection in calves: good or bad idea? – pilot study. 14<sup>th</sup> International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, Wrocław, 24-27.06.2018 – Doniesienie naukowe

## Podsumowanie dorobku publikacyjnego

Jestem autorem lub współautorem **32** publikacji z listy JCR oraz **2** publikacji z listy MNiSW (łącznie z osiągnięciem habilitacyjnym). Pełen wykaz publikacji znajduje się w załączniku 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

<b>Łączna liczba publikacji</b>	<b>34</b>
Liczba publikacji w czasopismach z listy JCR	32
Liczba publikacji z listy MNiSW	2
w tym: opublikowanych przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora	15
w tym: opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	19
w tym: stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	8
<b>Sumaryczny IF</b>	<b>43,082</b>
w tym: opublikowanych przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora	10,362
w tym: opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	17,179
w tym: stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	15,541
<b>Suma punktów MNiSW</b>	<b>771</b>
w tym: opublikowanych przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora	295
w tym: opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	251
w tym: stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	225
Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science Core Collection	116
Liczba cytowań według bazy Scopus	132
Indeks Hirscha według bazy Web of Science Core Collection	5
Indeks Hirscha według bazy Scopus	6
Liczba monografii	12
Liczba komunikatów konferencyjnych	50
w tym: zaprezentowanych na konferencjach krajowych	30
w tym: zaprezentowanych na konferencjach zagranicznych	20

Zestawienie oryginalnych (31) i przeglądowych (3) publikacji z listy JCR i pozostałych (z listy MNiSW) z uwzględnieniem wskaźnika Impact Factor, liczby punktów MNiSW oraz liczby cytowań

<b>Czasopismo</b>	<b>Rok publikacji</b>	<b>Liczba publikacji</b>	<b>Impact factor</b>	<b>Liczba punktów MNiSW</b>	<b>Liczba cytowań</b>
Food Chemistry	2017	1	4,529	40	2
	2017	1	4,529	40	1
	2012	1	3,334	45	29
Food and Chemical Toxicology	2016	1	3,778	40	3
Journal of Agricultural and Food Chemistry	2017	1	3,154	40	3
Journal of Chromatography B	2013	1	2,694	30	14
Journal of Separation Science	2018	1	2,415	30	-
Food Additives and Contaminants	2015	1	1,878	30	5
	2015	1	1,878	30	2
	2018	1	2,129	30	-
	2018	1	2,129	30	-
Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics	2018	1	1,202	25	-
	2017	1	1,202	25	-
	2016	1	1,279	25	5
Journal of Apicultural Science	2013	1	0,817	20	6
Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy	2008	1	0,337	20	8
	2008	1	0,337	20	7
	2009	1	0,218	20	8
	2010	1	0,321	20	1
	2011	1	0,414	20	4
	2012	1	0,377	20	5
	2012	1	0,377	20	5
	2013	1	0,365	20	4
	2013	1	0,365	20	3
	2014	1	0,357	15	6
	2014	1	0,357	15	5
	2015	1	0,468	15	3
Journal of Veterinary Research	2016	1	0,462	15	1
	2017	1	0,811	15	1
Medycyna Weterynaryjna	2010	1	0,203	9	1
	2012	1	0,203	10	1
	2017	1	0,163	15	-
Pasze Przemysłowe	2011	1	-	1	-
	2014	1	-	1	-
<b>SUMA</b>		<b>34</b>	<b>43,082</b>	<b>771</b>	<b>132</b>