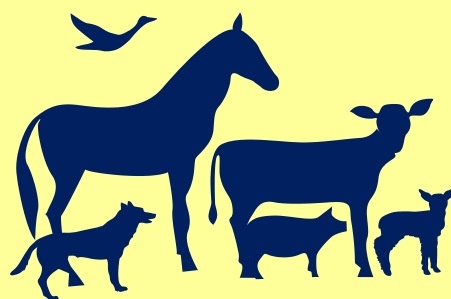


# BIULETYN DLA DORADCÓW ODR



*nr 1/2023*

WYDAWNICTWO

*Państwowego Instytut Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego*

*Puławy 2023*

*BIULETYN*  
*DLA*  
*DORADCÓW ODR*

**Redakcja:**

prof. dr hab. Stanisław Winiarczyk

prof. dr hab. Mirosław Polak

**Korekta:**

mgr Renata Wydra

Dyrekcja Instytutu składa podziękowania Koleżankom i Kolegom z  
Centrum Doradztwa Rolniczego oraz Ośrodków Doradztwa  
Rolniczego za podjęcie współpracy i współinicjowanie  
określonych działań

Wydawnictwo Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego  
Instytutu Badawczego w Puławach

*Nakład 100 egzemplarzy*

*Wszelkie prawa zastrzeżone*

# SPIS TREŚCI

<b>SEKCJA RÓŻNE</b> .....	<b>5</b>
<b>OGRANICZANIE ZJAWISKA NABYWANIA OPORNOŚCI MIKROORGANIZMÓW NA     SUBSTANCJE PRZECIWBAKTERYJNE, W OBSZARZE PRODUKCJI ZWIERZĘCEJ I     ŚRODOWISKA, NA PRZYKŁADZIE INICJATYW I DZIAŁAŃ PODEJMOWANYCH W     WYBRANYCH KRAJACH EUROPEJSKICH CZĘŚĆ I. DZIAŁANIA PODEJMOWANE WE     FRANCJI</b> .....	<b>5</b>
<b>SEKCJA PSZCZOŁY</b> .....	<b>35</b>
<b>WARROZA</b> .....	<b>35</b>
<b>NOSEMOZA</b> .....	<b>49</b>
<b>SEKCJA DRÓB</b> .....	<b>61</b>
<b>WYBRANE CHOROBY WIRUSOWE DROBIU WODNEGO</b> .....	<b>61</b>
<b>SEKCJA ŻYWIENIE</b> .....	<b>74</b>
<b>ZAGROŻENIA ZWIĄZANE ZE STOSOWANIEM MOCNIKA W ŻYWIENIU     PRZEŻUWACZY</b> .....	<b>74</b>
<b>ASPEKTY STOSOWANIA ROŚLIN GENETYCZNIE ZMODYFIKOWANYCH JAKO     ŻYWNOCI I PASZY</b> .....	<b>80</b>

# SEKCJA RÓŻNE

## OGRANICZANIE ZJAWISKA NABYWANIA OPORNOŚCI MIKROORGANIZMÓW NA SUBSTANCJE PRZECIWBAKTERYJNE, W OBSZARZE PRODUKCJI ZWIERZĘCEJ I ŚRODOWISKA, NA PRZYKŁADZIE INICJATYW I DZIAŁAŃ PODEJMOWANYCH W WYBRANYCH KRAJACH EUROPEJSKICH

### CZĘŚĆ I. DZIAŁANIA PODEJMOWANE WE FRANCJI

Zbigniew Osiński, Ewelina Patyra, Monika Przeniosło-Siwczyńska, Krzysztof Kwiatek

Zakład Higieny Pasz

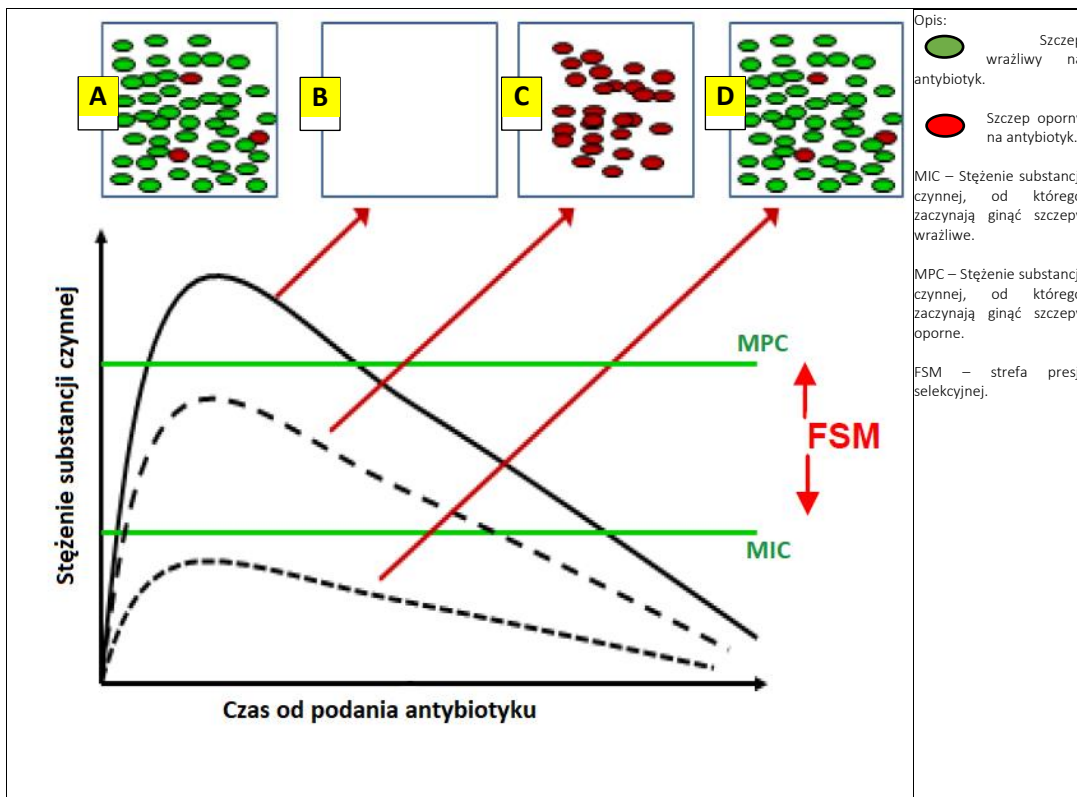
W ostatnich latach rozprzestrzenianie się oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe było coraz częściej postrzegane jako globalny problem zdrowotny, który można rozwiązać jedynie za pomocą międzysektorowego podejścia, które nazwano „Jedno zdrowie” (ang: „*One Health*”). Istnieje wiele inicjatyw i działań, które zajmują się tym problemem, co zostało przedstawione poniżej jako przykłady rozwiązań w kilku wybranych krajach Europy. Podstawą do rozpoczęcia walki z nabywaniem oporności mikroorganizmów na antybiotyki, był „Globalny plan działania w zakresie zwalczania zjawiska nabywania przez mikroorganizmy oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe” (WHO, 2001), który został opracowany w 2001 r., wspólnie przez Światową Organizację Zdrowia (WHO), Organizację Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) oraz Światową Organizację Zdrowia Zwierząt (OIE – obecnie WOAH). W roku 2015 zaktualizowano plan, który został przyjęty jako podstawa do opracowywania własnych, krajowych planów przez państwa członkowskie Wspólnoty Europejskiej (WE) (WHO, 2015).

W 2019 r. Światowa Organizacja Zdrowia, podkreśliła wagę problemu, uznając narastające zjawisko nabywania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe za jedno z 10 największych globalnych zagrożeń zdrowia publicznego, przed którymi stoi ludzkość. W lipcu 2022 r., także Komisja Europejska (KE) wraz z państwami członkowskimi, uznała to niekorzystne zjawisko, za jedno z trzech najpoważniejszych zagrożeń dla zdrowia ludzi w krajach Unii Europejskiej (KE, 2017).

Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe oznacza zdolność mikroorganizmu do przetrwania lub wzrostu w obecności stężenia środka przeciwdrobnoustrojowego, które jest zazwyczaj wystarczające do powstrzymania lub zabicia tego mikroorganizmu. Jeden z mechanizmów rozprzestrzeniania się oporności, przedstawiono na ryc. 1.

Wspomniane zjawisko, powszechnie uznawane jest za stale rosnące globalne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt, które powoduje poważne wyzwania społeczne

i gospodarcze. Stały wzrost oporności, wg prognoz może powodować 10 milionów zgonów rocznie na całym świecie (KE, 2017), zmniejszenie globalnego produktu krajowego brutto o 2-3,5 i co za tym idzie kosztować gospodarkę światową nawet 100 miliardów dolarów w perspektywie do roku 2050. Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe jest przyczyną ponad 35 000 zgonów każdego roku w krajach Wspólnoty Europejskiej.



Ryc. 1. Powstawanie presji selekcyjnej do nabywania oporności mikroorganizmów na substancje przeciwdrobnoustrojowe, poprzez powstawanie sprzyjających warunków do rozprzestrzeniania się tego niekorzystnego zjawiska. A) W populacji mikroorganizmów wrażliwych na antybiotyk, pojawiają się pojedyncze odporne kolonie, np. w następstwie spontanicznej mutacji w genomie bakteryjnym. B) Przypadek w rzeczywistości nie zawsze możliwy – odpowiednio wysoka dawka substancji przeciwbakteryjnej (powyżej wartości MPC), powoduje wyginięcie całej populacji mikroorganizmów docelowych (wrażliwe + odporne) – brak możliwości rozprzestrzeniania się zjawiska nabywania oporności. C) Presja selekcyjna jest wywierana, gdy stężenie substancji przeciwbakteryjnej zawarte jest pomiędzy wartościami MIC a MPC, gdzie giną szczepy wrażliwe, a przeżywają odporne. D) W przypadku braku presji selekcyjnej związanej z leczeniem antybiotykami (zawartość substancji czynnej poniżej MIC), wśród szczepów wrażliwych występują również odporne, ale na ogół pozostają w mniejszości (Canton i in. 2011).

Substancje przeciwdrobnoustrojowe umożliwiły ogromny postęp w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej, ograniczając zdolność do rozprzestrzeniania się wielu zakaźnych chorób, które w przeszłości jako plagi, rzutowały na historię

ludzkości. Narastająca oporność mikroorganizmów patogennych na środki przeciwdrobnoustrojowe, w coraz większym stopniu zagraża m.in. zdolności do przeprowadzania operacji chirurgicznych, leczenia pacjentów z obniżoną odpornością, przeszczepiania narządów i prowadzenia terapii przeciwnowotworowych. Narastająca oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe, jako niekorzystne zjawisko wywołuje potężne skutki ekonomiczne w systemie opieki zdrowotnej, ponieważ prowadzi do konieczności stosowania w niektórych przypadkach bardziej złożonych metod leczenia, wpływa na wyższe wskaźniki przyjęć i dłuższe pobyty w szpitalach. Bezpieczeństwo żywnościowe, jak i bezpieczeństwo żywności są również zagrożone, ponieważ oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe wpływa również na zdrowie zwierząt i produkcję żywności, poprzez silne powiązanie tego zjawiska i wzajemnych interakcji w aspekcie człowiek-zwierzę-środowisko. Francuska agencja ANSES (Francuska Agencja ds. Żywności, Zdrowia, Środowiska i Bezpieczeństwa Pracy), przedstawiła ten aspekt w opracowanym przez siebie raporcie z oceny narażenia środowiskowego na antybiotyki stosowane podczas zabiegów weterynaryjnych oraz możliwości transferu zagrożenia z tym związanego, do środowiska (Millemann i in., 2022). Raport ten, jako przykład działań podejmowanych przez Francję w omawianym zakresie, zostanie omówiony w dalszej części niniejszego opracowania.

Chociaż oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe występuje naturalnie, niewłaściwe stosowanie i nadużywanie środków przeciwdrobnoustrojowych u ludzi, zwierząt i tym samym pośrednio w środowisku, prowadzi do zanieczyszczania roślin jadalnych (żywność pochodzenia roślinnego i pasze), co z kolei przyczynia się do częstszego występowania oporności w wymienionym już wcześniej cyklu zamkniętym: człowiek-zwierzę-środowisko (ryc. 2).

## **FRANCUSKI RAPORT DOTYCZĄCY OGRANICZANIA NARAŻENIA ŚRODOWISKOWEGO NA ANTYBIOTYKI, STOSOWANE PODCZAS ZABIEGÓW WETERYNARYJNYCH**

W omawianym raporcie, podtrzymano tezę przytaczaną w wielu opracowaniach, ogólnościowych i krajowych, iż antybiotyki odgrywają kluczową rolę w leczeniu chorób zakaźnych u ludzi, zwierząt domowych, żywego inwentarza i w akwakulturze, jednak należy wprowadzać wszelkie działania mające na celu ich rozważne stosowanie. Antybiotyki są produkowane, stosowane i uwalniane do środowiska na dużą skalę, co budzi poważne obawy, co do ich negatywnego wpływu, poprzez obecność pozostałości antybiotyków lub ich metabolitów na ekosystemy wodne i lądowe (Brandt i in. 2015).

W kilku ostatnich raportach Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA, 2021), odnotowano zanieczyszczenie środowiska antybiotykami, jak również bakteriami opornymi na antybiotyki, co wiązano z czynnikami: naturalnymi (ewolucyjne dostosowywanie się mikroorganizmów do określonych warunków) lub w wyniku presji selekcyjnej związanej z działalnością antropogeniczną (działalność ludzi) oraz genetycznymi nośnikami oporności (ANSES, 2021).

Wpływ środowiska na powstawanie, selekcję i/lub rozprzestrzenianie się oporności na antybiotyki u ludzi i zwierząt, powinien być w przyszłości brany pod uwagę w ocenie bezpieczeństwa weterynaryjnych produktów leczniczych, na co wskazują nowe przepisy prawne (CVMP, 2018; Rozporządzenie WE nr 2019/6).

## **ZANIECZYSZCZENIE ŚRODOWISKA**

### **Wydalanie antybiotyków oraz ich metabolitów z organizmu zwierząt i ludzi**

Większość antybiotyków stosowanych zarówno u ludzi, jak i u zwierząt, zwłaszcza gospodarskich (Kumar i in. 2005, Taylor i Reeder, 2020), jest wydalana (poprzez kał, mocz) w znacznych proporcjach względem dawek, w jakich były pobrane w trakcie leczenia. Dotyczy to postaci niezmienionej substancji czynnych, jak również aktywnych metabolitów wydalanych w moczu i/lub kale. W zależności od rodzaju antybiotyków i sposobu podawania (doustnie lub pozajelitowo), te proporcje wydalania wahają się od 5% do 90% podanej dawki. Zazwyczaj ten odsetek (Tab. 1 i Tab 2.) wynosi około 60%-80% (Berendsen i in. 2015, Jechalke i in. 2014, Kumar i in. 2005). W przypadku omawianych zależności odnoszących się do leczenia zwierząt akwakultury, nie ma jeszcze wielu publikacji opisujących związek pomiędzy zanieczyszczeniem środowiska wodnego, a wydalonymi substancjami przeciwbakteryjnymi lub ich metabolitami. Należy zauważyć, że leki weterynaryjne są również stosowane u zwierząt domowych, a co za tym idzie ich pozostałości są wydalane przez zwierzęta domowe i mogą również trafiać do środowiska, w podobny sposób jak leki stosowane u ludzi (Perkins i in. 2021).

Ponadto, wydalana ilość omawianych substancji jest na ogół uzależniona od podawanej dawki oraz czasu trwania leczenia, jednak liczba leczonych zwierząt jest najważniejszym czynnikiem wpływającym na całkowitą wielkość, przekładającą się na ewentualne zanieczyszczenia środowiska ze strony antybiotyków i ich metabolitów. Uwzględnienie tych aspektów jest również obowiązkowym etapem oceny ryzyka dla środowiska w kontekście pozwolenia na dopuszczenie do obrotu weterynaryjnych produktów leczniczych (CVMP, 2016; CVMP, 2018).



Tab. 1. Dane dotyczące poziomu wydalania i stabilności środowiskowej wybranych grup substancji przeciwbakteryjnych.

Rodzaj substancji	Wydalenie	Stabilność środowiskowa
Aminoglikozydy	Prawie 100%, - wydalanie z kałem w przypadku podania doustnego, - wydalanie z moczem w przypadku podawania pozajelitowego.	$t_{1/2}$ (czas półtrwania): około 30 dni, przez biodegradację (w tym bakterie)
Tetracykliny	Ogółem 25-85%. Ponad 70% dawki w przypadku podania doustnego.	$t_{1/2}$ : 30 do 100 dni, przez fotodegradację (światło słoneczne)
Makrolidy	40 a 100%. Niska wchłaniania w przewodzie pokarmowym.	$t_{1/2}$ : <2 do 21 dni, przez hydrolizę (degradacja mikrobiologiczna)
Sulfonamidy	Wydalenie z moczem (dobra absorpcja przy drodze podania doustnej)	$t_{1/2}$ : < 8-30 dni, przez fotodegradację (światło słoneczne)
Trimetoprim	30-40% dawki w moczu (bardzo dobra absorpcja przy drodze podania doustnej w przypadku zwierząt monogastrycznych).	$t_{1/2}$ : >100 dni
$\beta$ -laktamy	Wydalenie z moczem. Przyjmowana doustnie niewchłonięta frakcja, może czasem ulec rozkładowi przez bakterie zasiedlające przewód pokarmowy.	$t_{1/2}$ : 5 dni, przez hydrolizę
Fluorochinolony	Wydalenie z moczem i kałem (grupa, która w małej ilości jest metabolizowana po wchłonięciu w przewodzie pokarmowym).	Stabilne $t_{1/2}$ : >100 dni
Fenikole	Wydalenie w postaci koniugatów glukuronidu z moczem.	Brak jednoznacznych danych, czy hydroliza glukuronidów jest możliwa w środowisku.

Tab. 2. Dane dotyczące wydalania i stabilności wybranych substancji przeciwbakteryjnych (lub grup), podawanych zwierzętom i ludziom

Rodzaj substancji	Wydalenie u zwierząt (jako odsetek podanej dawki doustnie)	Wydalenie u ludzi (jako odsetek podanej dawki doustnie)	Czas półtrwania w środowisku (w dniach)	Możliwość redukcji (jako odsetek zredukowanej masy) w przypadku kompostowania <sup>4)</sup>	Czas kompostowania <sup>4)</sup>
Tertacykliny	75-80% <sup>1)</sup>	60-90% <sup>1)</sup>	- od 47 dni, do postaci stabilnych <sup>1)</sup> , - 5-79 dni <sup>2)</sup>	70-99%	1-105 dni
Linkomycyna	60% <sup>1)</sup>	BD <sup>*)</sup>	BD <sup>*)</sup>	BD <sup>*)</sup>	BD <sup>*)</sup>
Makrolidy (erytromycyna, tiamulina, tylozyna)	50-90% <sup>1)</sup>	>60% <sup>1)</sup>	- 4-8 dni (np. tylozyna), erytromycyna – stabilna <sup>1)</sup> , - 5-26 dni <sup>2)</sup> , - 5-67 dni (np. tylozyna) <sup>3)</sup> .	70-99%	1-17 dni
β-laktamy (ampicylina, amoksycylina, penicylina)	BD <sup>*)</sup>	30-90% <sup>1)</sup>	- 4-100 dni – zależnie od matrycy <sup>1)</sup> , - 22-49 dni (np. ceftiofur – cefalosporyna 3 gen.) <sup>2)</sup> , - kilka godzin <sup>3)</sup> , - 50-100 dni <sup>1)</sup> , - 0,4-4 dni <sup>2)</sup> , - 2-10 dni dla frakcji wyekstrahowanej, 330 dni dla frakcji pozostałości <sup>3)</sup> .	BD <sup>*)</sup>	BD <sup>*)</sup>
Sulfonamidy	>96%	15% <sup>1)</sup>	- 75 dni <sup>1)</sup> , - 110 dni <sup>2)</sup> , - 2-8 dni (np. florfenikol) <sup>1)</sup>	70-99%	2-105 dni
Trimetoprim	BD <sup>*)</sup>	60% <sup>1)</sup>	- 60, do > 300 dni <sup>1)</sup> , - od kilku miesięcy, do kilku lat (nawet 20 lat)	BD <sup>*)</sup>	BD <sup>*)</sup>
Chloramfenikol	BD <sup>*)</sup>	5-10% <sup>1)</sup>	- 60, do > 300 dni <sup>1)</sup> , - od kilku miesięcy, do kilku lat (nawet 20 lat)	BD <sup>*)</sup>	BD <sup>*)</sup>
Chinolony	90% <sup>3)</sup>	BD <sup>*)</sup>	- 60, do > 300 dni <sup>1)</sup> , - od kilku miesięcy, do kilku lat (nawet 20 lat)	do 99%, lub zmniejszenie aktywności	217-2500 dni

BD<sup>\*)</sup> – brak danych

Publikacje, z których pochodzą dane:

<sup>1)</sup> Kumar i in. 2005

<sup>2)</sup> Sarmah i in. 2006

<sup>3)</sup> Jechalke i in. 2014

<sup>4)</sup> Ezzarai i in. 2018

Tab. 3 Trwałość w glebie pozostałości substancji przeciwbakteryjnych używanych w weterynarii i możliwość bioakumulacji. (Tasho i Cho 2016)

Rodzaj substancji	Okres półtrwania (w dniach)	Potencjalna możliwość bioakumulacji
Oksytetracyklina	> 20	Umiarkowana dla roślin
Chlorotetracyklina	24	Umiarkowana dla roślin
Penicylina	< 7	Umiarkowana dla roślin
Sulfametazyna	< 20	Umiarkowana
Neomycyna	BD*)	Słaba
Tylozyna	7-8	BD*)
Monenzyna	10-70	Od słabej, do umiarkowanej
Bacytracyna	4-10	Słaba

BD\*) – brak danych

### Wpływ na poszczególne elementy środowiska naturalnego

Z powodu możliwości różnych dróg przedostawania się antybiotyków i ich metabolitów z kału lub moczu ludzi i zwierząt, często te substancje znajdują się w różnych elementach środowiska (gleba, osady, wody powierzchniowe, wody gruntowe), po bezpośrednim wydaleniu do środowiska zewnętrznego (np. pastwiska, gdzie przebywają leczone zwierzęta), albo pośrednio po rozprowadzeniu (np. poprzez obornik, gnojowicę, osady ściekowe). Zespoły naukowe z wielu krajów zainteresowały się tym tematem i opracowano schematy/modele migracji antybiotyków, ich metabolitów lub/i rozprzestrzeniania się genów oporności u mikroorganizmów na antybiotyki w środowisku (Anses 2021, Ezzariai i in. 2018, Goulas i in. 2018, Tasho i Cho 2016, Berendsen i in. 2015). W raporcie na podstawie wymienionych prac schematycznie przedstawiono zależności pomiędzy stosowaniem antybiotyków weterynaryjnych u zwierząt, a potencjalnym zanieczyszczeniem środowiska, (ryc. 2) potwierdzającym słuszność podejścia „One Health”.

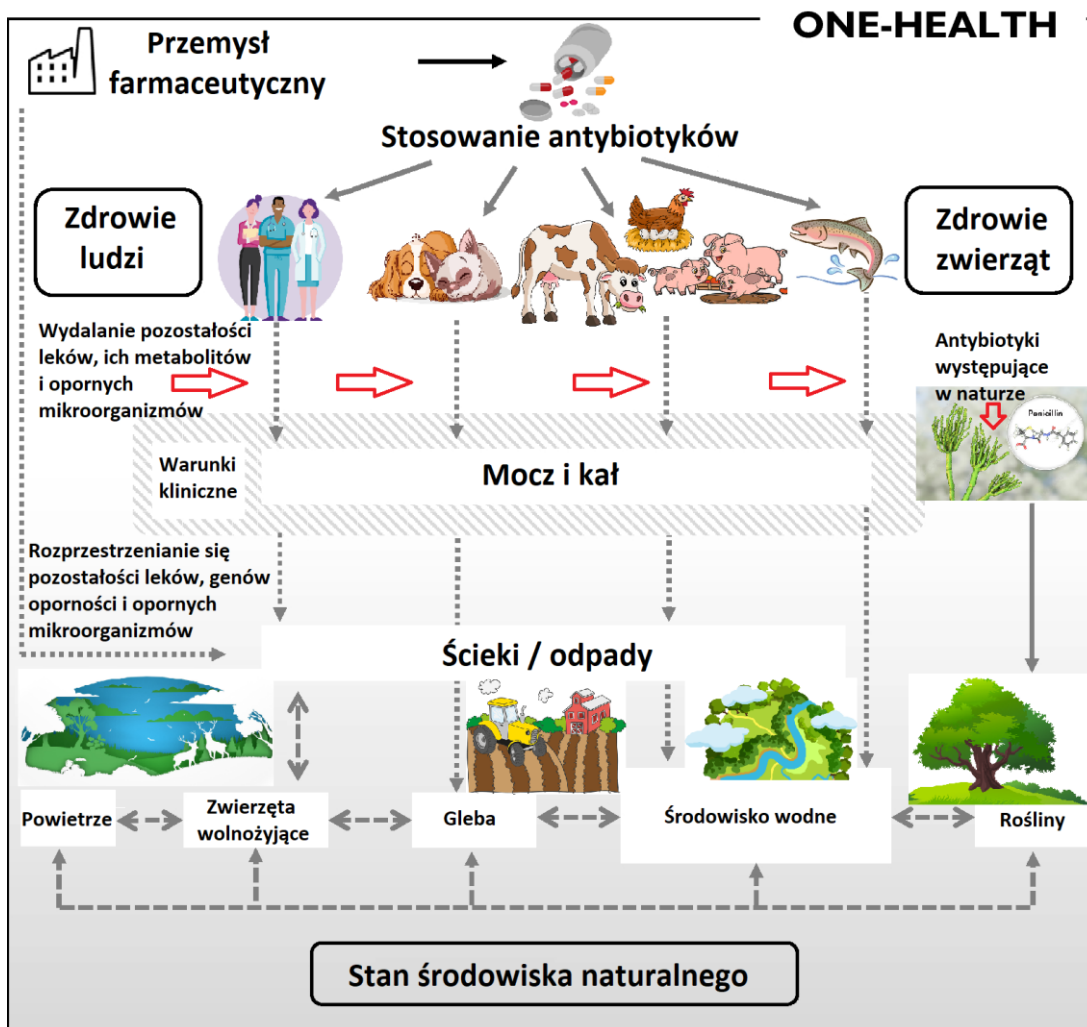
### Toksyczność antybiotyków w środowisku

Antybiotyki lub/i ich aktywne metabolity obecne w środowisku, mogą działać toksycznie na faunę i florę lądową, wodną, a także wywierać dodatkową presję selekcyjną na mikrobiomy (np., pokarmowy, skórny, itp.) osobników, na mikroflorę glebową lub roślinną (Jechalke i in. 2014, Tasho i Cho 2016).

Należy pamiętać, że antybiotyki mogą również wpływać na metabolizm roślin (Rocha i in. 2021). Mogą np. hamować kiełkowanie, wpływać na zmiany w długości korzeni roślin, a także liczby i długości liści, hamować wzrost łodyg i korzeni, zmniejszać biomasa określonych roślin, ale także odwrotnie: sprzyjać lepszemu wzrostowi niektórych roślin, przy występowaniu omawianych substancji w niskich

stężeniach (Tasho i Cho 2016). W związku z tym w niniejszych wytycznych, zostaną omówione dwie główne drogi zidentyfikowane w celu kontrolowania takiego zanieczyszczenia środowiska:

- kontrola stosowania antybiotyków, którą można określić hasłowo, jako „mniej i „skuteczniej”
- zarządzanie ściekami/gnojowicą/obornikiem.



Ryc. 2. Zależności pomiędzy stosowaniem antybiotyków u ludzi i zwierząt, a potencjalnym zanieczyszczeniem środowiska (na podstawie Goulas i in., 2018)

## Ryzyko środowiskowe związane z weterynaryjnymi produktami leczniczymi

Koncepcja „Jedno zdrowie” to zintegrowane podejście, które opiera się na tezie, iż zdrowie ludzi i zdrowie zwierząt są względem siebie współzależne, oraz jednocześnie ściśle można je powiązać z właściwym stanem ekosystemów, które współdzielą ludzie i zwierzęta. Podejście to jest szczególnie istotne w walce z opornością mikroorganizmów na antybiotyki co stanowi podstawę wspomnianego programu „Jedno zdrowie” (One Health European Joint Programme, OH-EJP). Narażenie na antybiotyki poprzez środowisko i jednocześnie związane z zabiegami przeprowadzanymi w weterynarii (leczenie zwierząt, profilaktyka), zależy od: podawanej ilości tych substancji zwierzętom, ilości substancji wydalanej przez zwierzęta (antybiotyki i ich metabolity), czasu utrzymywania się pozostałości (aktywności) w środowisku oraz sposobów gospodarowania wydalaminami zwierząt, tj. ściekami/obornikiem/gnojowicą.

Od 1998 r. przepisy prawne w UE nakładają obowiązek oceny ryzyka środowiskowego weterynaryjnych produktów leczniczych (WPL), począwszy od analizy ich emisji do środowiska, z tym, że produkty z pozwoleniem wydanym przed rokiem 2000 na dopuszczenie do obrotu, nie podlegały ocenie, np. ekotoksyczności. Jeżeli zanieczyszczenie środowiska nie przekraczało określonych progów regulacyjnych, analiza wpływu na środowisko nie była kontynuowana. Ten wymóg oceny ryzyka dla środowiska, był ograniczony do zwierząt hodowlanych i nie uwzględniał ryzyka związanego z opornością na antybiotyki. Obecnie obowiązujące przepisy (Rozporządzenie WE nr 2019/6), określają iż w badaniach laboratoryjnych bezpieczeństwa weterynaryjnego produktu leczniczego, jednym z elementów jest ocena ryzyka dla środowiska, która musi zawierać obowiązkowe elementy takiej oceny. Zgodnie z zaktualizowanymi przepisami dotyczącymi WPL, celem oceny ryzyka dla środowiska jest oszacowanie potencjalnie szkodliwych skutków dla środowiska naturalnego, które mogą zostać wywołane przez zastosowanie danego produktu, oraz rozpoznanie wszelkich środków zapobiegawczych, które mogą być niezbędne do zmniejszenia tego ryzyka. Ocena ta jest zazwyczaj przeprowadzana w dwóch fazach. Pierwsza faza oceny jest przeprowadzana obowiązkowo (zawsze). Szczegółowe informacje o ocenie podawane są zgodnie z ustalonymi wytycznymi. Ocena przedstawia potencjalne narażenie środowiska naturalnego, które może nieść użycie rejestrowanego produktu oraz poziom ryzyka związany z wszelkiego rodzaju narażeniem, biorąc pod uwagę w szczególności:

- docelowe gatunki zwierząt oraz proponowany wzór stosowania;
- metodę podawania, w szczególności prawdopodobny zakres, w którym produkt wejdzie bezpośrednio do systemu środowiskowego,
- możliwe wydalanie produktu, jego substancji czynnych lub istotnych metabolitów, do środowiska przez leczone zwierzęta, oraz utrzymywanie się tych substancji w wydalinach,

- usuwanie niewykorzystanego produktu lub jego odpadów.

Jeżeli wnioski z fazy pierwszej wskazują na możliwość narażenia środowiska na skutek wprowadzenia do stosowania danego produktu, wnioskodawca powinien przejść do fazy drugiej i ocenić w sposób bardziej szczegółowy potencjalne ryzyka, jakie WPL lub/i jego metabolity może stwarzać dla środowiska. Przeprowadzić się powinno w ramach tego etapu, dalsze dokładne badania, uwzględniające stabilność oraz zmiany omawianych substancji w czasie, w kontekście ich oddziaływania na konkretne ekosystemy. Uwzględnić się powinno możliwy zakres kontaktu danego produktu z elementami środowiska naturalnego oraz dostępne informacje dotyczące właściwości fizycznych/chemicznych, farmakologicznych lub toksykologicznych substancji, łącznie z metabolitami w przypadku rozpoznanego ryzyka, które to informacje zostały uzyskane podczas przeprowadzania innych badań i prób wymaganych przez przepisy. W zależności od wspomnianego zakresu kontaktu, należy uwzględnić elementy środowiska naturalnego: glebę, wodę, powietrze, systemy wodne oraz organizmy, które nie są organizmami docelowymi, a uwolnienie określonych substancji do środowiska może nieść dla nich ryzyko (np. poprzez pojenie - wodę, paszę, itp.). W przypadku oceny ryzyka dla środowiska, dotyczącego weterynaryjnych produktów leczniczych zawierających organizmy zmodyfikowane genetycznie lub samych organizmów, należy załączyć dodatkowe wymagane dokumenty i ewentualnie przeprowadzić dodatkowe badania, związane z przepisami o organizmach zmodyfikowanych genetycznie.

W ramach badania bezpieczeństwa i pozostałości WPL, należy uwzględnić wpływ na rozwój oporności mikroorganizmów przez rozpatrywane substancje. W tym przypadku konieczne jest przedstawienie danych dotyczących możliwego pojawienia się opornych bakterii mających znaczenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. W tej kwestii szczególnie ważny jest mechanizm rozwoju tej oporności. W razie konieczności należy zaproponować działania ograniczające rozwój oporności wynikającej z planowanego wykorzystania weterynaryjnego produktu leczniczego. Po zarejestrowaniu, w całym okresie użycia takiego WPL u zwierząt, wszelkie incydenty związane ze środowiskiem zaobserwowane po podaniu zwierzęciu weterynaryjnego produktu leczniczego, należy zgłaszać jako podejrzewane zdarzenia niepożądane. Zdarzenia takie mogą polegać na przykład na znacznym zwiększeniu zanieczyszczenia gleby daną substancją do poziomów uznawanych za szkodliwe dla środowiska lub na wysokim stężeniu weterynaryjnych produktów leczniczych w wodzie pitnej otrzymanej z wód powierzchniowych. W nowych przepisach zapewniono możliwość wspólnego korzystania z zasobów baz danych, przez odpowiednie organy krajów członkowskich UE, a tym samym zwiększenie efektywności systemu nadzoru nad bezpieczeństwem farmakoterapii. Zgromadzone dane będą (lub już są) przekazywane w jedno miejsce zbierania zgłoszeń, w celu zapewnienia wymiany informacji. Właściwe organy powinny wykorzystywać te dane do zapewniania stałej oceny stosunku korzyści do ryzyka w odniesieniu do WPL, dostępnych na rynku. W określonych przypadkach lub z perspektywy ochrony zdrowia publicznego, zdrowia zwierząt lub również ze względów środowiskowych, możliwe jest uzupełnianie danych dotyczących

bezpieczeństwa i skuteczności WPL dodatkowymi informacjami. W związku z tym jest możliwe nałożenie na posiadacza pozwolenia na dopuszczenie do obrotu, obowiązku przeprowadzania dodatkowych badań po wydaniu pozwolenia, w zależności od potrzeby, np. po ujawnieniu się pewnych czynników ryzyka lub gdy w jakimś zakresie powstaną wątpliwości w kontekście stałej oceny stosunku korzyści do ryzyka.

W trakcie stosowania WPL u zwierząt, na podstawie wyników ocen ryzyka, należy również uwzględniać środki ograniczające uwalnianie pozostałości substancji czynnych do środowiska lub środki minimalizujące takie zjawisko. Wszelkie takie działania powinny być podejmowane po dokonaniu oceny ich skutków.

## **OBSZARY KONTROLI DLA ZANIECZYSZCZEŃ ŚRODOWISKA**

### **Ograniczanie ilości antybiotyków podawanych zwierzętom**

Jednym z głównych czynników środowiskowego narażenia na antybiotyki, jest liczba leczonych zwierząt lub ich masa ciała.

Jak już wspomniano, za najbardziej sprzyjające ryzyku dla środowiska, uważa się zabiegi związane ze stosowaniem antybiotyków w odniesieniu do licznych grup zwierząt lub powtarzanych cyklicznie, np. przy nawracających infekcjach w gospodarstwie. Przy wystąpieniu takich okoliczności, dochodzi do wysokiego narażenia w czasie „T” i/lub kumulacji zagrożenia w czasie, gdy antybiotyk lub jego metabolit jest trwały (zachowuje aktywność przeciwdrobnoustrojową). Konieczne jest w szczególności stosowanie się do zaleceń Opinii opracowanej na poziomie krajowym, wewnątrz dla Francji przez ANSES, jeszcze w 2011 (ANSES, 2011) oraz nowego rozporządzenia weterynaryjnego 2019/6 (Rozporządzenie WE nr 2019/6) w celu ograniczenia profilaktyki antybiotykowej do wyjątkowych przypadków, a także stosowania metafilaktyki w sytuacjach, w których nie ma innego odpowiedniego rozwiązania i jedynie po zdiagnozowaniu choroby zakaźnej przez lekarza weterynarii.

Na poziomie indywidualnym, droga podania miejscowa lub ogólnoustrojowa, będzie miała bezpośredni wpływ na ograniczanie łącznej ilości antybiotyku biorąc pod uwagę daną jednostkę chorobową, zdiagnozowaną u zwierząt. Na przykład w kontekście leczenia *mastitis* bydła, całkowita ilość podawanego antybiotyku wynosi 200 mg amoksycyliny na strzykawkę dowymieniową (przy miejscowym stosowaniu), podczas gdy dla tej samej klasy antybiotyku, przy zastosowaniu ogólnoustrojowym, dzienna dawka podawana musiałaby wynieść aż 3500 mg na zwierzę o masie ciała 500 kg. W przypadku zastosowania produktu WPL, który zawiera jako substancje czynne penicylinę G oraz DHS (siarczan dihydrostreptomocyny), ilości wymienionych substancji czynnych w zawiesinie dowymieniowej wynoszą odpowiednio 570 mg i 410 mg, podczas gdy ilości potrzebne do uzyskania adekwatnego efektu przy podawaniu ogólnoustrojowym, wynoszą odpowiednio: 6500 mg i 8200 mg, dla krowy o masie ciała 500 kg. Tak więc w przypadku leczenia antybiotykami, gdy droga leczenia miejscowa, jest klinicznie i naukowo uzasadniona, zawsze należy ją preferować: zarówno aby ograniczyć narażenie bakterii komensalnych (głównie przewodu

pokarmowego) na antybiotyki, jak i ograniczyć stosowane ilości potencjalnie wydalone do środowiska. Oczywiście, gdy występują objawy ogólne (zapalenie gruczołu mlekowego), należy również podjąć leczenie ogólnoustrojowe.

Ponadto, aby zmniejszyć stosowane ilości, zaleca się stosowanie WPL o odpowiedniej aktywności, zmniejszając dawkę stosowanych substancji czynnych. Na przykład w przypadku większości zakażeń u bydła, zwykle istnieje antybiotyk o wystarczającej aktywności, aby można go było stosować w monoterapii. Oczywiście nie zawsze jest możliwe dokonanie takiego wyboru w obliczu warunków, które mogą wynikać z właściwości różnych bakterii o zróżnicowanym profilu wrażliwości na konkretną substancję czynną (przykład odmiedniczkowego zapalenia nerek u bydła) lub gdy nie są dostępne WPL o odpowiedniej skuteczności w danym zakresie (przykład benzylopenicyliny dla niektórych szczepów patogennych).

Skrócenie czasu leczenia do okresu, który jest bezwzględnie konieczny do wyleczenia zwierząt, jest zawsze korzystne, ponieważ systematycznie zmniejsza całkowitą podawaną dawkę antybiotyku. Skrócona jest także ekspozycja flory komensalnej u zwierzęcia oraz narażenie środowiska na antybiotyki. Niestety, do tej pory brakuje zgodności danych pochodzących z badań naukowych, co do możliwego skracania czasu stosowania WPL (względem wartości zalecanych) i właściwe byłoby zrewidowanie informacji dotyczących niektórych antybiotyków, szczególnie dla których badania skuteczności były przeprowadzane dość dawno. Jednocześnie niektóre badania wskazują, iż zbyt wczesne zakończenie terapii sprzyja rozwojowi oporności bakterii na antybiotyki, zwiększając ryzyko nawrotu choroby i braku skuteczności leku przy powtórnym zakażeniu. Nastąpić to może poprzez wydłużenie się czasu, w którym zostaną wytworzone mechanizmy obronne przez bakterie, które miały styczność z daną substancją czynną i przetrwały w organizmie zwierzęcia mimo leczenia.

Zmniejszenie dziennych dawek antybiotyku poniżej zalecanych dla określonego WPL, nie jest wskazane. Badania wykazały, że podczas wczesnego okresu leczenia infekcji (w okresie inkubacji choroby), dawka antybiotyku niezbędna do uzyskania wyleczenia klinicznego i bakteriologicznego, była mniejsza niż w przypadku infekcji w bardziej zaawansowanym stadium, jednak posiadane dane wciąż są niewystarczające do ustalenia skutecznych zaleceń.

### **Ograniczanie ilości antybiotyków wydanych do środowiska przez zwierzęta**

W przypadku leczenia zapalenia wymienia krów (*mastitis*) i podawania antybiotyku dowymieniowo, substancje czynne w niewielkim stopniu dyfundują do ogólnego krwioobiegu zwierzęcia i będą one głównie obecne w mleku. Narażenie środowiskowe w tym przypadku, będzie zależeć głównie od postępowania z mlekiem od leczonych krów<sup>\*</sup>). Jeśli mleko takie zostanie zakwalifikowane, jako uboczny produkt pochodzenia zwierzęcego, nieprzeznaczony do spożycia przez ludzi (tzw. UPZ) i po takiej kwalifikacji trafi np. do nawozu organicznego lub jako odpad, droga migracji pozostałości antybiotyku do środowiska będzie taka sama, jak pozostałości



wydalonych z moczem lub kałem (Berendsen i in. 2015). Zachowując jednak zaletę wydalania znacznie mniejszych ilości pozostałości antybiotyków i ich metabolitów, co jest korzystniejsze niż przy wyborze leczenia związanego z podawaniem WPL drogą doustną. Ważne jest również, aby zapobiec karmieniu cieląt mlekiem zawierającym pozostałości antybiotyków, ponieważ może to prowadzić do sprzyjającej presji selekcyjnej (ryc. 1) opornych bakterii w mikrobiocie jelitowej takich zwierząt i zwiększyć tym samym możliwość wydalania takich patogenów z kałem (EFSA 2017; Firth i in. 2021).

Po podaniu doustnym ilość pozostałości antybiotyków wydalanych z kałem, zależy od ich właściwości związanych z wchłanianiem do organizmu przez ścianę jelita. W przypadku antybiotyków, których wchłanianie jest stosunkowo niska i które są stosowane podczas leczenia chorób bakteryjnych powodujących u zwierząt biegunki (lub zespołów zakażeń wirusowo-bakteryjnych), wykorzystując działanie „miejscowe” WPL (np. neomycyna, kolistyna, itp.), należy wziąć pod uwagę, że w najgorszym przypadku prawie cała przyjęta doustnie dawka, jest wydalana z kałem leczonego zwierzęcia.

W przypadku antybiotyków o wysokim stopniu wchłaniania podawanych drogą doustną lub podawanych ogólnoustrojowo iniekcyjnie, eliminowana ilość podanych substancji czynnych zawartych w WPL, zależy od metabolizmu i innych dróg eliminacji antybiotyku (np. wydalanie poprzez układ moczowy).

<sup>\*)</sup> jest to tzw. UPZ – akronim od: produkt uboczny pochodzenia zwierzęcego nieprzeznaczony do spożycia przez ludzi, którym m.in. może być surowe mleko, siara od leczonych zwierząt lub produkty na bazie mleka, które można wyeliminować poprzez spalanie, kompostowanie, produkcję biogazu lub stosowanie jako jeden ze składników nawozu organicznego bezpośrednio do gruntu (Rozporządzenie WE nr 1069/2009). Ta ostatnia możliwość, odbywać się może wyłącznie za zgodą organu odpowiedzialnego za nadzór nad nawozami organicznymi w danym kraju członkowskim.

## Zarządzanie ściekami

W przypadku leczenia zwierząt, biotransformacja antybiotyków z postaci aktywnej, do postaci neutralnych dla środowiska metabolitów, odbywa się w organizmie zwierzęcia. Jednak jak już wspomniano, w zależności od właściwości farmakokinetycznych poszczególnych substancji czynnych, metody podania zwierzętom, wchłanianie w przypadku podania doustnego, a nawet przy stosowaniu paszy leczniczej – obecności pewnych składników hamujących wchłanianie (np. wapń, tworzący z niektórymi antybiotykami trudno przyswajalne kompleksy), część aktywnych substancji lub ich metabolitów posiadających aktywne właściwości względem mikroorganizmów, jest wydalana w moczu i/lub kale i/lub mleku leczonych zwierząt gospodarskich.

Niektóre metody oczyszczania ścieków mogą przyspieszyć degradację antybiotyków i ich metabolitów. Użycie mezofilnej fermentacji beztlenowej w tzw. temperaturze pokojowej/otoczenia, jest mniej skuteczne, niż przy przeprowadzeniu tego samego procesu w wyższej temperaturze, w kontekście możliwości rozkładu antybiotyków. Doświadczenia francuskie (Youngquist, 2016) wykazały, iż

najskuteczniejszą metodą związaną z możliwością rozkładu do składników bezpiecznych dla środowiska, odpadów zawierających pozostałości antybiotyków i ich aktywnych metabolitów, wydaje się proces kompostowania. W tym także uwzględniając jak największą liczbę antybiotyków, możliwą do neutralizowania ich do substancji bezpiecznych dla środowiska, wymienionym sposobem. Przy poprawnym przeprowadzeniu procesu fermentacji przy kompostowaniu, zmniejsza się stężenie: sulfonamidów, tetracyklin, makrolidów i florfenikolu, o okresach półtrwania, od jednego do szesnastu dni. Procesy przetwarzania termofilnego, jakie zachodzą w odpowiednich warunkach przy kompostowaniu, są skuteczniejsze w zmniejszaniu stężenia antybiotyków niż metanizacja mezofilna (np., w bioreaktorze biogazowni) lub proste przechowywanie w temperaturze otoczenia bez zastosowania szczególnych procesów, które mogłyby zredukować pozostałości substancji czynnych (Zhang i in. 2019). Od 17% do 100%, względem początkowego stężenia pozostałości antybiotyków można inaktywować w ściekach, na przykład przez kompostowanie osadów ściekowych (Ezzariai i in. 2018). Przy czym okresy półtrwania tych antybiotyków w środowisku z zastosowaniem procesu kompostowania lub bez takiego procesu, są bardzo zmienne, od 0,4 do 2500 dni w zależności od grupy antybiotyków. W niektórych przypadkach jest to jeszcze dłuższy okres. Również takie oszacowania czasu mogą się różnić w zależności od wyników uzyskiwanych przez poszczególne zespoły badawcze (patrz Tabele 1 i 2, Jechalke i in. 2014, Kumar i in. 2005, Sarmah i in. 2006, Tasho i Cho, 2016).

Rodzaj zastosowanych procesów obróbki ścieków, tj. natleniania lub zapewnienia warunków beztlenowych nie ma widocznego wpływu na zmniejszenie stężenia antybiotyków w ściekach (Youngquist, 2016), w porównaniu do wskazanego procesu kompostowania osadów ściekowych w wyższych temperaturach niż temperatura otoczenia. Badania przeprowadzone w Hiszpanii z użyciem procesów fermentacji mezofilno-beztlenowej, zasilanej obornikiem ściwińskim i odpadami z rzeźni, wykazały w takim procesie możliwość usuwania makrolidów (tylmikozyny i tylozyny) na poziomie od 42% do 94% we wszystkich sezonach (pory roku) (Gros i in. 2019). Z drugiej strony redukcja z użyciem omawianego procesu, okazała się mało skuteczna w przypadku fluorochinolonów z wyjątkiem marbofloksacyny (72%-96%) i tetracyklin z wyjątkiem chlorotetracykliny (57%-68%).

Wiele parametrów (czynników) powiązanych z zarządzaniem odpadami, warunkuje poziom redukcji antybiotyków wyrażany „okresem półtrwania w środowisku”. Mogą to być: rozpuszczalność w wodzie, obecność roślin i ich pozostałości (słoma, todygi, itp.) lub inne zanieczyszczenia w glebie, które mogą wchłaniać składniki z gleby, kumulując je i jednocześnie zatężając, np. poprzez przyspieszanie odparowywania wody. Kolejnymi czynnikami warunkującymi zróżnicowanie redukcji antybiotyków w środowisku są: rodzaj gleby (matryca), grubość poszczególnych warstw w tym przepuszczających i nieprzepuszczających wodę, możliwość bioakumulacji, w tym w roślinach (Tab. 3 oraz Tasho i wsp., 2016).

## Oczyszczanie ścieków komunalnych

Ścieki komunalne prawie zawsze zawierają antybiotyki i ich metabolity, wydalane podczas leczenia ludzi, a wiele z tych pozostałości trafia taką drogą do wód i rzek. W ściekach komunalnych występować mogą niektóre antybiotyki stosowane u zwierząt, np. towarzyszących, ale również czasami pozostałości związane z produkcją żywności pochodzenia zwierzęcego, rzadziej wynikające z utrzymywania zwierząt gospodarskich (Perkins i in. 2021, Kim i in. 2020).

Jednak większość pozostałości antybiotyków podawanych zwierzętom i ich aktywnych metabolitów, trafia do wód powierzchniowych lub gruntowych, innymi drogami niż poprzez ścieki komunalne. Należy również zauważyć, że procesy oczyszczania stosowane w oczyszczalniach ścieków lub technologie pozyskiwania i zagospodarowywania organicznych produktów odpadowych ze ścieków, zmniejszają poziomy bakterii opornych lub wrażliwych na antybiotyki, ale często nie eliminują całkowicie takiego zagrożenia (ANSES, 2021).

Wśród antybiotyków, takich jak chinolony, nitroimidazole i sulfonamidy, grupy te ulegają niewielkiej degradacji w tradycyjnych oczyszczalniach ścieków. Jednak stosując bioreaktory membranowe, można znacznie zwiększyć taką wydajność, nawet o ponad 80%. W przypadku makrolidów, skuteczność nie przekracza 33%. Stosowanie zaawansowanych jak na oczyszczanie ścieków komunalnych procesów mikrofiltracji i odwróconej osmozy, byłoby bardziej wydajne w redukcji omawianych pozostałości, niż konwencjonalne oczyszczanie, szczególnie w przypadku: fluorochinolonów, trimetoprimu, tylozyny i linkomycyny (Haguenauer, 2010).

Pomimo znacznego postępu, stosowane w oczyszczalniach, biologiczne systemy oczyszczania ścieków są umiarkowanie skuteczne (48% do 77%) w usuwaniu antybiotyków (ANSES, 2021).

Ogólnie rzecz biorąc, oczyszczalnie ścieków, korzystające z najbardziej zaawansowanych procesów oczyszczania trzeciego stopnia (np. ozonowanie, filtracja z użyciem węgla aktywnego, ultrafiltracji, itp.) są najskuteczniejsze w usuwaniu pozostałości wszelkich leków (w tym antybiotyków) w uzdatnianej w ten sposób wodzie, a stopień ich usuwania może wynosić od 97% do 100% (Angeles i in. 2020).

### Dobre praktyki

Leki niezużyte (w tym przeterminowane) w oryginalnych opakowaniach muszą być objęte zbiórką odpadów leczniczych. Dotyczy to również zużytych butelek, pozostałości po przygotowaniu roztworów leczniczych, paszy leczniczej, itp. Produkty te należy usuwać drogami prowadzącymi najlepiej do ich spalania w wysokiej temperaturze.

Wskazane jest również, aby nigdy nie wlewać mleka od leczonych zwierząt lub pozostałości niezużytych leków lub ich roztworów do kanalizacji.

Jeśli jest to możliwe, wielkość opakowania powinna być brana pod uwagę w momencie przepisywania leku jako dodatkowe kryterium rozsądnego i racjonalnego stosowania środka przeciwbakteryjnego. W związku z tym w przypadku dystrybucji, należy priorytetowo potraktować możliwość dostarczania weterynaryjnych produktów leczniczych zawierających antybiotyki, w wielu objętościach (opakowaniach), odpowiednich do przepisanych w receptce dawek, biorąc pod uwagę schemat podawania, liczbę zwierząt, które mają być leczone, masę ciała, wiek zwierząt, itp., aby optymalizować leczenie w kontekście ograniczania pozostałości.

Przede wszystkim, należy zachęcać do stosowania form lokalnych utylizacji wszelkich odpadów (poziom gospodarstwa) zawierających pozostałości antybiotyków, wynikających z leczenia zwierząt gospodarskich, szczególnie zawartych w oborniku lub gnojowicy. Właściwe jest wtedy stosowanie metod przetwarzania, które redukują takie pozostałości, najlepiej z wykorzystaniem procesów termicznych, np. kompostowania obornika zwierzęcego.

## WNIOSKI

Wiele antybiotyków stosuje się zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Zasada rozsądnego stosowania tego typu substancji ma zastosowanie do wszystkich środków przeciwdrobnoustrojowych w celu zachowania ich skuteczności oraz zminimalizowania rozwoju i rozprzestrzeniania się oporności mikroorganizmów patogennych na takie środki.

W celu ograniczenia stosowania antybiotyków związanym z użyciem ich u zwierząt i tym samym redukcji wydalania pozostałości lub aktywnych mikrobiologicznie metabolitów, w momencie przepisywania recept weterynaryjnych, należy zwrócić szczególną uwagę na ich kategoryzację ze względu na stosowanie w medycynie ludzkiej. Europejska Agencja ds. Leków (EMA) za pośrednictwem „Grupy ekspertów *ad hoc*, ds. porad dotyczących środków przeciwdrobnoustrojowych” (AMEG) opracowała kategoryzację antybiotyków stosowanych u zwierząt, zgodnie z potencjalnymi konsekwencjami w zakresie narastania zjawiska oporności na antybiotyki i wpływie tego zjawiska na zdrowie publiczne.

Ta kategoryzacja opublikowana w 2019 r., obejmuje cztery kategorie i jest opisana hasłowo określeniami wskazującymi na odpowiednie działanie wynikające ze stosowania odpowiednich substancji czynnych u zwierząt gospodarskich i w akwakulturze: kategoria A – „Unikaj”, B – „Ograniczaj”, C – „Uważaj”, D – „Stosuj rozsądnie”. Kategoryzacja ta powinna być traktowana jako narzędzie wspomagające w podejmowaniu decyzji przez lekarzy weterynarii, przy wyborze stosowanego antybiotyku w leczeniu zwierząt. Od lutego 2023 r. obowiązują akty prawne w zakresie wykluczenia pewnych substancji czynnych, wynikające z takiego krytycznego podejścia (Rozporządzenie 2022/1255) poprzez zarezerwowanie ich do leczenia niektórych zakażeń u ludzi.

Trudno jest jednak zidentyfikować klasę antybiotyków prowadzącą do mniejszego narażenia środowiskowego, a jeszcze trudniej jest zidentyfikować klasy, które ograniczają presję selekcji oporności lub minimalizują efekty toksyczne w środowisku. Interakcja antybiotyków ze środowiskiem jest złożona i zależy od różnych czynników, takich jak adsorpcja antybiotyku na powierzchni lub w odpowiedniej frakcji gleby lub osadów organicznych, poziom bioakumulacji, obecność i rodzaj bakterii w konkretnej mikrobiocie. W tym kontekście konieczne jest propagowanie dobrych praktyk, mających na celu ograniczanie stosowania antybiotyków w odniesieniu do liczby leczonych zwierząt, stosowanych dawek, czasu trwania leczenia oraz odpowiedniego zarządzania odpadami i ściekami pochodzącymi z produkcji zwierzęcej. Wskazane jest przestrzeganie zasad zawartych w dokumencie wydanym przez Komisję Europejską: „Zawiadomienie Komisji – Wytyczne dotyczące rozważnego stosowania środków przeciwdrobnoustrojowych w medycynie weterynaryjnej” (KE, 2015).

## **PRAWODAWSTWO FRANCUSKIE (SZCZEBLA KRAJOWEGO)**

Omówione oceny oraz wymagania i zalecenia Wspólnoty Europejskiej oraz innych organizacji międzynarodowych wpłynęły na powstanie odpowiednich zapisów w prawie krajowym Francji. System prawny tego kraju, polega na uchwalaniu i w zależności od tego czy obszar był już kodyfikowany, dokładaniu nowych lub modyfikowaniu już istniejących paragrafów lub rozdziałów do przepisów regulujących określone, zazwyczaj obszerne obszary w tzw. Kodeksach (np. zdrowia publicznego, pracy, rolnictwa, itp.). Omawiane aspekty zawarto na wniosek kilku podmiotów, w szczególności Ministra Spraw Społecznych, Zdrowia i Praw Kobiet oraz Ministra Rolnictwa, Przetwórstwa Żywności i Leśnictwa oraz Rzecznika Rządu Republiki Francuskiej, gdzie ustawami/rozporządzeniami zmodyfikowano Kodeks Zdrowia Publicznego oraz Kodeks rolnictwa i rybołówstwa. Określono w ten sposób obowiązki lekarza weterynarii, wynikające z wdrożenia polityk racjonalnego stosowania antybiotyków u zwierząt, m.in. przestrzegania czasu podawania leku, zachowywania karencji, oraz w kontekście zachowania zwierząt w dobrym stanie zdrowia, wykonywania czynności obsługi i zarządzania stadem, ustalono wykaz czynności lekarskich lub chirurgicznych u zwierząt, które mogą wykonywać niektóre osoby nie posiadające kwalifikacji lekarza weterynarii, uszczelniając system dostępu do leków zawierających antybiotyki i inne substancje czynne, kluczowe ze względu na ograniczanie zjawiska oporności. W Kodeksie Rolnictwa i Rybołówstwa (CPMR), w specjalnym Załączniku, określono ramy przestrzegania dobrych praktyk wytwarzania i dystrybucji pasz leczniczych, jak również kary wynikające z łamania zasad, w tym zawartych w prawie Wspólnoty Europejskiej. Dobrych praktyk stosowania w medycynie weterynaryjnej leków zawierających jedną lub więcej substancji czynnych (antybiotyki, kokcydiostatyki i przeciwrakowe) przewidziane w art. L. 5141-14-3 Kodeksu Zdrowia Publicznego, muszą przestrzegać lekarze weterynarii podczas leczenia zwierząt, apteki weterynaryjne oraz hodowcy lub osoby utrzymujące zwierzęta (w tym domowe).

Wspomniany załącznik (CPMR) składa się z następujących rozdziałów, których nazwy dobrze oddają zawartość:

Wstęp

1. Przytoczenie przepisów i norm

1.1. Zakres obowiązywania

1.2. Dostawa (produktów leczniczych) i przepisywanie recept

1.3. Praktyki hodowlane

2. Zakres dobrych praktyk

3. Zasady rozważnego stosowania

4. Rola i obowiązki lekarzy weterynarii przepisujących leki

4.1. Warunki przepisywania recept

4.2. Diagnoza zwierząt

4.3. Badania uzupełniające

4.4. Kryteria wyboru antybiotyku

4.5. Metody użycia

4.6. Stosowanie zatwierdzone przez podmiot odpowiedzialny lub „poza wskazaniami”

4.7. Identyfikowalność

4.8. Nadzór nad bezpieczeństwem farmakoterapii

5. Rola i odpowiedzialność dostawców

5.1. Producenci i dystrybutorzy pasz leczniczych

5.2. Lekarze weterynarii

5.3. Farmaceuci

6. Rola i odpowiedzialność hodowców zawodowych i nieprofesjonalnych

6.1. Rola i odpowiedzialność zawodowych hodowców

6.2. Rola i odpowiedzialność właścicieli zwierząt domowych oraz zwierząt sportowych i rekreacyjnych.

Stan prawny na kwiecień 2023 r. Republiki Francuskiej, określa następujące zasady:

Stosowanie produktów leczniczych u zwierząt, a dopuszczonych do stosowania u ludzi jest określone dwoma rodzajami ograniczeń:

- w przypadku zwierząt, od których, lub z których pozyskuje się żywność, istnieją Maksymalne Limity Pozostałości (MLP) w żywności, z wyjątkiem koniowatych oraz istnieje wykaz substancji podstawowych lub substancji o znaczeniu terapeutycznym;
- w przypadku zwierząt nieprzeznaczonych do produkcji żywności, istnieje wykaz leków na receptę podlegających ograniczeniom, z sugerowaniem określonej kolejności stosowania.

Sprzedaż weterynaryjnych produktów leczniczych jest zarezerwowana głównie dla zarejestrowanych farmaceutów i lekarzy weterynarii, w tym dla tych ostatnich bez prowadzenia apteki ale tylko dla zwierząt, którymi osobiście się opiekują lub nadzór zdrowotny i opieka jest im regularnie powierzana.

W przypadku zaklasyfikowania antybiotyków jako krytyczne ze względu na ich zastosowanie w produktach leczniczych wydawanych na receptę dla ludzi (lista I lub II), następują dodatkowe ograniczenia dotyczące przepisywania i stosowania leków u zwierząt. Antybiotyki te mogą być przepisywane i podawane przez lekarzy weterynarii, wyłącznie zwierzętom niewykorzystywanym do produkcji żywności i tylko wtedy, gdy będzie istnieć szczególna konieczność ich zastosowania.

Właściciele lub zawodowi hodowcy zwierząt należących do gatunków, z których pozyskuje się mięso lub inne produkty pochodzenia zwierzęcego przeznaczone do spożycia przez ludzi, są uprawnieni do stosowania zabiegów leczniczych, u zwierząt należących do ich inwentarza żywego lub zwierząt w ramach prowadzonej działalności, w tym pozajelitowego stosowania WPL w celach leczniczych lub profilaktycznych, z wyłączeniem zastrzeżonych czynności dla lekarzy weterynarii.

Do obowiązków producentów lub dostawców leków, należy przekazywanie pełnych i rzetelnych informacji o właściwościach terapeutycznych weterynaryjnych produktów leczniczych lub informowanie o problemach zgłaszanych przez nadzór nad bezpieczeństwem farmakoterapii.

Zgodnie z rozdziałem 3 Załącznika, rozsądne stosowanie antybiotyków powinno opierać się na zaleceniach i wdrożeniu praktycznych środków mających na celu uniknięcie lub ograniczenie selekcji, pojawiania się oraz rozprzestrzeniania bakterii opornych na antybiotyki oraz poprawę zdrowia zwierząt, służących do produkcji żywności i zwierząt towarzyszących.

Jest to zatem kwestia przestrzegania wszystkich zasad, gdzie należy:

- dbać o zwierzęta, i stosować zabiegi zapobiegające chorobom, a tym samym respektować etyczny obowiązek i ekonomiczną potrzebę utrzymania zwierząt w dobrym stanie zdrowia;

- zachować skuteczność antybiotyków i zagwarantować racjonalne ich stosowanie u zwierząt, w celu optymalizacji zarówno ich skuteczności jak i bezpieczeństwa;
- zapobiegać lub ograniczać rozprzestrzenianie się bakterii opornych oraz determinantów/nośników oporności pomiędzy zwierzętami (poziom fermy – lokalnie);
- zapobiegać lub ograniczać przenoszenie opornych bakterii lub czynników determinujących oporność między populacjami zwierząt, ludźmi i środowiskiem (poziom makro – globalny);
- zachowywać skuteczność antybiotyków przeznaczonych dla ludzi, a tym samym przedłużyć ich przydatność w stosowaniu w medycynie ludzkiej, stosując się do odpowiednich ograniczeń;
- chronić zdrowie konsumentów poprzez zagwarantowanie bezpieczeństwa żywności pochodzenia zwierzęcego i ochronę jej przed ryzykiem przeniesienia bakterii opornych na antybiotyki lub determinanty/nośniki oporności.

Te ogólne zasady przeznaczone są dla wszystkich uczestników łańcucha żywnościowego.

Lekarz weterynarii przepisuje antybiotyki po postawieniu diagnozy zgodnie z kodeksem etycznym. Leki zawierające antybiotyki powinny być przepisywane zgodnie z przepisami, a ważność recepty powinna wskazywać na niezwłoczne użycie.

Lekarz weterynarii może wypisać receptę bez badania klinicznego, zgodnie z innymi wymaganiami zawartymi w Kodeksie Zdrowia Publicznego (art. R. 5141-112-1 i R. 5141-112-2 CSP), w ramach stałego monitoringu zdrowotnego gospodarstwa, który obejmuje: coroczne badanie kontrolne, opiekę prawnie zleconą, wizyty kontrolne i regularną pielęgnację zwierząt.

Podczas corocznej kontroli stanu zdrowia w stadzie określa się choroby, którym należy zapobiegać w pierwszej kolejności. W celu zwalczania tych chorób preferowana jest profilaktyka sanitarna, higieniczna i lekarsko-weterynaryjna, poprzez stosowanie szczepionek, jeśli takie istnieją. Zgodnie z obowiązkiem zawartym w Kodeksie Rolnictwa i Rybołówstwa i omawianym Załącznikiem, z mocy prawa, lekarz weterynarii proponować powinien właścicielowi stada jak najczęściej odpowiedni plan profilaktyki zdrowotnej i/lub plan szczepień. Powinien on przypominać hodowcom zwierząt o zagrożeniach związanych ze stosowaniem antybiotyków i ich odpowiedzialności za przestrzeganie zaleceń. Podczas wizyt kontrolnych, powinna odbywać się ocena skuteczności proponowanych działań.

Recepty wystawione bez przeprowadzenia badania klinicznego, jeśli spełniają możliwość takiego wystawienia, powinny zawierać informacje o spełnieniu kryteriów alarmowych przewidzianych w protokole opieki/leczenia zwierząt oraz dostępowi do informacji, o których mowa w tym protokole. Gdy recepta zostaje wystawiona bez



badania klinicznego, a obejmuje antybiotyki, należy wzmocnić monitorowanie stanu zdrowia i regularnie oceniać protokół leczenia. Aby uniknąć powielania recept na antybiotyki, jeśli w nadzór zdrowotny nad hodowlą zaangażowani są różni lekarze weterynarii, lekarz przepisujący receptę zapewnia, aby informacje przekazywane przez posiadacza zwierząt, a dotyczące obowiązujących protokołów leczenia i przeprowadzanych zabiegów były kompletne i przejrzyste.

Aby ustalić diagnozę, lekarz weterynarii opiera się na danych epidemiologicznych, historii zdrowotnej stada, objawach klinicznych stwierdzonych podczas badania żywych zwierząt lub oględzin zmian chorobowych, stwierdzonych u martwych zwierząt oraz, jeśli to możliwe, wynikach dodatkowych badań diagnostycznych. Gdy diagnoza ustali jako przyczynę choroby infekcję bakteryjną, można zalecić antybiotykoterapię. W sytuacjach nagłych lub gdy pobranie próbki jest niemożliwe, antybiotykoterapię można wdrożyć w oczekiwaniu na wyniki ewentualnych dodatkowych badań diagnostycznych.

Badania diagnostyczne uzupełniające realizowane są w razie potrzeby, a ich wybór zależy od przydatności, znajomości ich wartości i po uwzględnieniu ograniczeń oraz ich wykonalności. Badanie bakteriologiczne przeprowadza się tak często, jak to możliwe i jak najwcześniej. W miarę możliwości powinno być ono przeprowadzane na zwierzętach, które nie były wcześniej leczone antybiotykami. Jest to część zdobywania informacji, które wyjaśniają osąd lekarza i poprawiają jego wiedzę na temat infekcji bakteryjnej w danym stadzie.

Wrażliwość patogenu na antybiotyki powinna być testowana chyba, że wiadomo iż aktywność użytej substancji jest właściwa przed rozpoczęciem leczenia. Jeśli stan zwierząt wymaga szybkiego wdrożenia terapii antybiotykowej na podstawie samych danych klinicznych i epidemiologicznych, pożądane jest wykonanie testów drażliwości na antybiotyki w celu dostosowania skuteczności danej terapii. Testy drażliwości na antybiotyki pozwalają na wykrycie możliwych zjawisk oporności. Dostarczają cennych informacji instytucjom nadzoru epidemiologicznego o oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe. Pomagają lekarzowi w dokonywaniu wyborów terapeutycznych, ale nie są jedynym kryterium, które należy wziąć pod uwagę przy dokonywaniu tego wyboru. Testy drażliwości na antybiotyki przeprowadzane powinny być w laboratoriach weterynaryjnych, znormalizowanymi i zwalidowanymi metodami oraz zgodnie z kryteriami interpretacyjnymi właściwymi dla medycyny weterynaryjnej. Oprócz surowych wyników, laboratorium diagnostyczne powinno przeprowadzić i przekazać lekarzowi weterynarii, opis interpretujący odczyt wyników testów drażliwości na antybiotyki. Może to być przydatne dla klinicysty, który jednak pozostaje wyłącznie odpowiedzialny za wybór leczenia zgodnie ze swoją najlepszą wiedzą.

W omawianym Kodeksie określono również kryteria wyboru antybiotyku, którego dokonuje się na podstawie oczekiwanej skuteczności leczenia, jego dostępności,

konieczności minimalizacji selekcji ze względu na zjawisko antybiotykooporności oraz rozprzestrzeniania się opornych bakterii i/lub mechanizmów oporności.

Wybór ten powinien być podyktowany następującymi elementami:

- doświadczeniem klinicznym lekarza weterynarii i jego znajomością specyfiki gatunku zwierząt i/lub typu produkcji;
- historią epidemiologiczną stada lub pojedynczego zwierzęcia, gdy to dotyczy jednostkowych przypadków, ze szczególnym uwzględnieniem danych dotyczących wrażliwości/oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz czynników chorobotwórczych. Jako minimum, należy wziąć pod uwagę wyniki krajowych (francuskich) planów monitorowania lub publikacji na temat istniejącej oporności u określonych gatunków zwierząt, szczepów bakterii lub statusu wobec tego zjawiska konkretnych antybiotyków, co może pomóc w wyborze odpowiedniego produktu leczniczego. W idealnej sytuacji profile środków przeciwdrobnoustrojowych, powinny zostać ustalone na poziomie gospodarstwa przed rozpoczęciem leczenia;
- zatwierdzeniem wskazania terapeutycznego dla antybiotyku/produktu leczniczego;
- spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego (poprzez preferowanie produktów leczniczych z wąskim spektrum działania) w odniesieniu do rozważanych czynników chorobotwórczych i ukierunkowania na określone mikroorganizmy;
- znajomością właściwości farmakodynamicznych i farmakokinetycznych antybiotyku, a w szczególności zoptymalizowanych schematów dawkowania produktu leczniczego;
- tolerancji i potencjalnych skutków ubocznych antybiotyku;
- oczekiwanej skuteczności (szanse wyzdrowienia);
- czasu karencji, o ile ubój jest zaplanowany i nie można go przełożyć;
- warunków stosowania leczenia, oczekiwanej zgodności, kryteriów praktyczności podawania, o ile gwarantują lepszą zgodność z dobrymi praktykami leczenia zwierząt;
- charakterystyką w zakresie zdolności antybiotyku do wywierania presji selekcyjnej, i tym samym ułatwiania rozprzestrzeniania się opornych bakterii i/lub mechanizmów oporności w szczególności drobnoustrojów komensalnych.

W przypadku niepowodzenia pierwszej zastosowanej antybiotykoterapii lub w przypadku nawrotu choroby, lekarz weterynarii ponownie rozpatruje diagnozę, ocenia szanse wyzdrowienia i podejmuje decyzje biorąc pod uwagę zasadność nowego leczenia.

Nową antybiotykoterapię ustala się, oprócz wyżej wymienionych kryteriów, na podstawie:

- wyników dodatkowych badań diagnostycznych i/lub analiz mikrobiologicznych;

- wyników wstępnego (pierwszego) leczenia.

Nie zaleca się podczas leczenia zwierząt łączenia antybiotyków. Preferowana jest monoterapia chyba, że po przeanalizowaniu konkretnego przypadku konieczne będzie zastosowanie kilku leków.

Stosowanie antybiotyków o krytycznym znaczeniu dla zdrowia ludzi, odbywa się zgodnie z obowiązującymi przepisami. Zawsze brany jest pod uwagę stosunek korzyści do ryzyka w odniesieniu do zdrowia ludzi i zwierząt.

Przy wyborze antybiotyków lekarz weterynarii opiera się na szczegółowych zaleceniach dotyczących stosowania konkretnych produktów leczniczych, o ile takie istnieją. Mogą być opracowane przez zrzeszenia i/lub związki lekarzy, ustanowione przez weterynaryjne organizacje zawodowe, zgodnie z informacjami zawartymi w niniejszym załączniku.

System identyfikowalności recept weterynaryjnych we Francji jest obowiązkowy w przypadku przeprowadzania leczenia, jak również przy stosowaniu paszy leczniczej. Każdy lekarz weterynarii interweniujący w stadzie, zapisuje wykonane czynności w rejestrze hodowlanym oraz wpisuje informacje związane z wystawioną receptą. Lekarz weterynarii regularnie sprawdza i potwierdza podpisem dokonane zapisy zgodnie z odpowiednimi przepisami Kodeksu.

Lekarze weterynarii zgłaszają odpowiedniej agencji monitorującej lub posiadaczowi pozwolenia na dopuszczenie do obrotu weterynaryjnego produktu leczniczego, każdy zaobserwowany brak skuteczności oraz każde działanie niepożądane. Lekarz weterynarii zwracać powinien szczególną uwagę na niedostateczną skuteczność w stosunku do oczekiwanej, w szczególności ze względu na możliwe zjawisko oporności na antybiotyki. W przypadku gdy lekarz jest świadomy problemów z obecnością pozostałości substancji czynnych poza dopuszczalnymi wartościami określonymi przez producenta, również powinien zgłosić takie przypadki.

W ramach nadzoru nad bezpieczeństwem farmakoterapii, producenci i dystrybutorzy aktywnie uczestniczą w zbieraniu informacji dotyczących zjawiska oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, w celu jak najszybszego przesłania takich informacji do weterynaryjnego centrum nadzoru nad bezpieczeństwem farmakoterapii lub kierownika ds. nadzoru nad bezpieczeństwem farmakoterapii oraz do posiadacza pozwolenia na dopuszczenie do obrotu.

Omawiany Kodeks Rolnictwa i Rybołówstwa Republiki Francuskiej, określa również dobre praktyki i obowiązki zawodowych hodowców w ramach zarządzania żywym inwentarzem, utrzymania właściwych środków higieny i bezpieczeństwa biologicznego (bioasekuracji).

Priorytetem są środki profilaktyki zdrowotnej chorób zakaźnych zgodne z branżowymi wytycznymi stosowania dobrych praktyk higienicznych w hodowli zwierząt gospodarskich oraz zalecenia sformułowane w protokole opieki przez

lekarza(-y) weterynarii odpowiedzialnego(-ych) za stały monitoring choroby. Aby uniknąć mnożenia recept na antybiotyki, preferowane jest korzystanie z usług jednego lekarza weterynarii, w celu zapewnienia stałego monitorowania stanu zdrowia. W przypadku, gdy stały monitoring zdrowotny jest prowadzony przez kilku lekarzy weterynarii, badania kontrolne i protokoły leczenia zebrane są w rejestrze hodowlanym ze wszystkimi wykonanymi zabiegami i podane do wiadomości wszystkich zainteresowanych.

W przypadku konieczności zastosowania paszy leczniczej, recepta weterynaryjna jest niezwłocznie wysyłana do producenta paszy leczniczej lub do dystrybutora w celu zapewnienia szybkiego wdrożenia leczenia. Producenci zatwierdzeni do przygotowywania paszy leczniczej doraźnie spełniają wymogi w zakresie czasu produkcji paszy leczniczej oraz zapobiegania błędom lub zanieczyszczeniu krzyżowemu paszy leczniczej. Adekwatność leczenia taką paszą do masy ciała zwierzęcia ma szczególne znaczenie w celu ograniczenia ryzyka antybiotykooporności. Przed wypisaniem recepty, hodowca zwierząt zapewnia przestrzeganie zalecanych dawek, okresów podawania, czasu trwania leczenia i drogi podawania. W przypadku zaobserwowania braku skuteczności w leczeniu, mimo stosowania się do zaleceń zgodnie ze wskazanymi kryteriami, hodowca informuje o takim fakcie lekarza weterynarii.

W omawianych przepisach określono dobre praktyki podawania antybiotyków.

W przypadku indywidualnego podawania leków, należy robić to wyłącznie wskazaną drogą i w przepisanych w receptce dawkach. W przepisach jest również pouczenie, o konieczności zachowania powściągliwości pod względem modyfikacji wskazanych parametrów.

Podczas grupowego leczenia i podawania antybiotyku doustnie, użyte techniki muszą pozwalać na rozprowadzenie niezbędnych ilości dla docelowej grupy leczonych zwierząt. Właściwości podawanych leków mogą ulec zmianie w zależności od sposobu ich podania, np. poprzez paszę lub wodę. Podawanie leków w wodzie do picia jest podejmowane wyłącznie po zapewnieniu zgodności fizykochemicznej antybiotyku i rozprowadzanej wody. Hodowca sprawdza również możliwość zapewnienia możliwości technicznych, podjętego sposobu leczenia mając na względzie spełnienie właściwych warunków oczyszczania wody używanej do pojenia zwierząt (lub instalacji rozprowadzania wody). Używany sprzęt (pompa dozująca, dozowniki/poidła, itp.) jest regularnie konserwowany, czyszczony i poddawany przeglądom, aby zapewnić jego optymalne działanie.

Podczas podawania antybiotyków drogą iniekcyjną schemat terapeutyczny (dawka, częstość podawania, czas trwania leczenia), droga podania, miejsce wstrzyknięcia i ilości na jedną iniekcję, są zgodne ze wskazaniami. Zaleca się stosowanie do iniekcji sprzętu jednorazowego użytku. W niektórych przypadkach bardziej odpowiednie mogą być określone materiały wielokrotnego użytku (niezawodność objętościowa,

praktyczność itp.). Te specyficzne materiały powinny być czyszczone po każdym użyciu i dezynfekowane zgodnie z zaleceniami producenta. Okres ważności po otwarciu fiolki zawierającej lek, powinien być przestrzegany.

Właściciel zwierząt powinien przestrzegać zaleceń sformułowanych przez lekarza weterynarii, odpowiedzialnego za stały monitoring zdrowotny hodowli, a te zalecenia powinny być zawarte w protokole opieki lekarsko-weterynaryjnej. W szczególności należy zapewnić zgodność ze wskazanymi w tym kontekście kryteriami ostrzegawczymi. Informacje przekazywane lekarzowi weterynarii przez właściciela zwierząt, w tym dotyczące przebiegu leczenia powinny być kompletne i przejrzyste w zakresie obowiązujących protokołów opieki i przeprowadzanych zabiegów. Opiekunowie (obsługa) zwierząt powinni przestrzegać obowiązku w zakresie zapewnienia warunków przechowywania weterynaryjnych produktów leczniczych, w tym zamykanych szaf i/lub pomieszczeń dostępnych wyłącznie dla osób odpowiedzialnych za opiekę oraz za zapewnienie zalecanych warunków środowiskowych. Pasza lecznicza powinna być przechowywana w taki sposób, aby nie doszło do zanieczyszczenia krzyżowego z inną paszą. Ewentualne ponowne użycie nieprzeterminowanych weterynaryjnych produktów leczniczych zawierających antybiotyki, jest uzależnione od konieczności wystawienia recepty dostosowanej do nowego leczenia. Niewykorzystane antybiotyki oraz opakowania jednostkowe są usuwane odpowiednim kanałem.

Hodowcy lub właściciele leczonych zwierząt, zgłaszają lekarzowi weterynarii, który przepisał receptę, lub każdemu lekarzowi weterynarii zajmującemu się hodowlą, incydenty lub negatywne efekty, które zaobserwowali po leczeniu zwierząt antybiotykami. Mogą również skorzystać z istniejącego portalu sprawozdawczego agencji nadzoru farmaceutycznego Francji lub skontaktować się z posiadaczem pozwolenia na dopuszczenie do obrotu.

W omawianych przepisach poza wymienionymi wytycznymi przywołano lub dostosowano niektóre rozdziały Kodeksów do wymagań rozporządzenia 2019/6 (Rozporządzenie WE nr 2019/6).

## **SYSTEM KAR I GRZYWIEN**

System kar i grzywien, dotyczący łamania omawianych artykułów Kodeksu Zdrowia Publicznego i Kodeksu Rolnictwa i Rybactwa, zawiera następujące stwierdzenia:

I.- Każde naruszenie zakazów przewidzianych w akapicie pierwszym artykułu L. 5141-14-2 podlega karze administracyjnej, której wysokość nie może przekroczyć 15 000 EUR dla osoby fizycznej i 75 000 EUR dla podmiotu prawnego.

II.- Kwota grzywny, o której mowa w punkcie I niniejszego artykułu, ulega podwojeniu w przypadku ponownego naruszenia w ciągu dwóch lat od dnia, w którym pierwsza decyzja o nałożeniu sankcji stała się ostateczna.

Ponadto grzywnie może towarzyszyć dodatkowa dzienna kara w maksymalnej wysokości 1000 euro, jeżeli sprawca przestępstwa nie zaprzestał naruszania przepisów, za które został ukarany po upływie terminu określonego w wezwaniu do usunięcia uchybień.

III.-Właściwa władza administracyjna zawiadamia z wyprzedzeniem sprawcę o naruszeniu przedstawiając mu dowody i powiadamiając o przepisach, które naruszył, oraz o karach, jakie ponosi. Informuje go o czasie, w jakim ma on przedstawić swoje uwagi na piśmie oraz, w stosownych przypadkach, o warunkach, na jakich może zostać przesłuchany, jeśli zwróci się z takim wnioskiem. Informuje go o prawie do pomocy przez wybranego przez siebie adwokata.

Decyzja o sankcjach nie może zostać podjęta po upływie roku od stwierdzenia faktów. Może być przedmiotem pełnego odwołania jurysdykcyjnego przed sądem administracyjnym.

## PODSUMOWANIE

Tab. 4. Sprzedaż wybranych substancji przeciwbakteryjnych w sektorze medycyny weterynaryjnej we Francji w latach 2010-2021 (EMA). Przedstawiono wartości w jednostkach PCU, która jest wykorzystywana do szacunków sprzedaży antybiotyków w UE, gdzie 1 PCU oznacza sprzedaż 1mg substancji przeciwbakteryjnej, przypadającej statystycznie na 1 kg masy zwierzęcia hodowlanego w danym kraju. Im większa wartość PCU, tym większa masa (w mg) substancji przeciwbakteryjnej została sprzedana w kraju na statystyczny 1 kg masy zwierząt.

Rok	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
<b>łącna sprzedaż</b>	<b>133,6</b>	<b>114,3</b>	<b>101,1</b>	<b>93,9</b>	<b>105,8</b>	<b>69,4</b>	<b>71,2</b>	<b>68,0</b>	<b>64,2</b>	<b>58,3</b>	<b>56,6</b>	<b>51,7</b>
Cefalosporyny III i IV gen.	0,30	0,30	0,31	0,29	0,28	0,21	0,06	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Chinolony	1,7	1,4	1,3	1,3	1,4	0,73	0,66	0,63	0,52	0,46	0,35	0,33
Polimyksyny	8,6	7,7	6,7	5,9	7,0	4,0	2,8	2,2	1,8	1,4	1,4	1,3



Przedstawione działania, podejmowane przez Republikę Francji są skuteczne. W raporcie Europejskiej Agencji Leków (EMA), dotyczącym sprzedaży substancji przeciwbakteryjnych w sektorze medycyny weterynaryjnej (ESVAC, 2022), można zaobserwować malejący trend dla tego kraju (Tab. 4). Sprzedaż w tym zakresie od roku 2010 do 2021, zmalała o 61,3%, od wartości 133,6 mg/PCU, odnotowanej w roku 2010. Przyczyniło się do tego niewątpliwie omawiane holistyczne podejście, oparte o ocenę ryzyka i wdrożenie na tej podstawie odpowiednich aktów prawnych zawierających wytyczne do dobrych praktyk.

Kontynuując cykl, w kolejnym numerze Biuletynu omówione zostaną przykłady z innych krajów, jak również najnowsze zalecenia, które zostały wydane przez Komisję Europejską w kwietniu i maju 2023 r.

## PIŚMIENICTWO:

- Angeles L, Mullen R, Huang I, Wilson C, Khunjar W, Sirotkine H, McElroy A and Aga D, 2020, "Assessing pharmaceutical removal and reduction in toxicity provided by advanced wastewater treatment systems." *Environmental Science: Water Research and Technology* 6 (1): 62-77.
- ANSES (2011). Évaluation des risques d'émergence d'antibiorésistances liées aux modes d'utilisation des antibiotiques dans le domaine de la santé animale. Édition I. 2011-SA-0071.
- ANSES (2014). Évaluation des risques d'émergence d'antibiorésistances liées aux modes d'utilisation des antibiotiques dans le domaine de la santé animale. Anses éditions, saisine n°2011-SA-0071. France, Maisons-Alfort, 1-218. ISBN : 979-10-286-0001-3.
- ANSES (2021). Antibiorésistance et environnement. État et causes possible de la contamination des milieux en France. Anses éditions, saisine n°2016-SA-0252.
- Berendsen BJA, Wegh RS, Memelink J, Zuidema T, Stolker LAM, 2015, The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta* 132:258-268.
- Brandt K, Amézquita A, Backhaus T, Boxall A, Coors A, Heberer T, Lawrence J, Lazorchak J, Schönfeld J, Snape J, Zhu YG, Topp E, 2015, Ecotoxicological assessment of antibiotics: A call for improved consideration of microorganisms. *Environment International* 85 (2015) 189-205.
- Canton, R. et Morosini, M.I., 2011. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev*, 35: 977-991.
- Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP), 2018. Reflection paper on antimicrobial resistance in the environment: considerations for current and future risk assessment of veterinary medicinal products. EMA Reflection paper EMA/CVMP/ERA/632109/2014.
- Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP), 2016. Guideline on environmental impact assessment for veterinary medicinal products in support of the VICH guidelines GL6 and GL38. EMA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1- Corr.
- EFSA Journal, 2017;15(1):4665. Risk for the development of Antimicrobial Resistance (AMR) due to feeding of calves with milk containing residues of antibiotics. 15(1):4665.
- EFSA (2017). Risk for the development of Antimicrobial Resistance (AMR) due to feeding of calves with milk containing residues of antibiotics. 15(1):e04665.
- EFSA (2021). Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. *j.efsa.2021.6651*.
- ESVAC (2022). Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2021. Trends from 2010 to 2021. Twelfth ESVAC report. European Medicines Agency, Luxembourg, 2022, 1-94.
- Ezzariai A, Hafidi M, Khadra A, Aemig Q, El Fels L, Barret M, Merlina G, Patureau D, Pinelli E, 2018 Human and veterinary antibiotics during composting of sludge or manure: Global perspectives on persistence, degradation, and resistance genes. *Journal of Hazardous Materials* 359 (2018) 465-481.
- Firth CL, Kremer K, Werner T and Käsbohrer A, 2021. The Effects of Feeding Waste Milk Containing Antimicrobial Residues on Dairy Calf Health. *Pathogens* 2021, 10, 112.
- Goulas A, Livoreil B, Grall N, Benoit P, Couderc-Obert C, Dagot C, Patureau P, Petit F, Laouénan C and Andremont A, 2018. What are the effective solutions to control the dissemination of antibiotic resistance in the environment? A systematic review protocol. *Environmental Evidence* (2018) 7:3.



- Gros M, Martic E, Balcázar JL, Boy-Roura M, Busquets A, Colón J, Sánchez-Melsió A, Lekunberri I, Borrego C, Ponsá S and Petrovic M, 2019 «Fate of pharmaceuticals and antibiotic resistance genes in a fullscale on-farm livestock waste treatment plant.» *Journal of Hazardous Materials* 378: 120716.
- Haguenaer JM, 2010. Les résidus de médicaments présentent-ils un risque pour la santé publique ? *Santé publique* 2010, volume 22, n° 3, pp. 325-342.
- Jechalke S, Heuer H, Siemens J, Amelung W, Smalla K, 2014, Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology* Vol. 22, No. 9, pp 536-545.
- Kim JP, Jin DR, Lee W, Chae M, Park J, 2020. Occurrence and Removal of Veterinary Antibiotics in Livestock Wastewater Treatment Plants, South Korea. *Processes* 2020, 8, 720.
- Komisja Europejska (2015). Zawiadomienie Komisji: Wytyczne dotyczące rozważnego stosowania środków przeciwdrobnoustrojowych w medycynie weterynaryjnej. Bruksela, dnia 11.09.2015 r. Dz.U.U.E.C.2015.299.7
- Komisja Europejska (2017). Europejski plan działania „Jedno zdrowie” na rzecz zwalczania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe. Bruksela, dnia 29.6.2017 r. COM(2017) 339.
- Kumar K, Gupta SC, Chander Y, Singh AK 2005. Antibiotic Use in Agriculture and Its Impact on the Terrestrial Environment. *Advances in Agronomy*, Volume 87 :1-55.
- Millemann Y., Ferran A., Hugnet Ch., Berny Ph., Perrot S., Bouchard D., Faucon J.-Ch. Pour limiter l'exposition de l'environnement aux antibiotiques lors de traitements en médecine vétérinaire. *LaDepeche Veterinaire*. Paris, 2022, 196. 25-30
- Perkins R, Whitehead M, Civil W, Goulson D, 2021. Potential role of veterinary flea products in widespread pesticide contamination of English rivers. *Science of the Total Environment* 755 (2021) 143560.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/6 z dnia 11 grudnia 2018 r. w sprawie weterynaryjnych produktów leczniczych i uchylające dyrektywę 2001/82/WE.
- Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2022/1255 z dnia 19 lipca 2022 r. określające środki przeciwdrobnoustrojowe lub grupy środków przeciwdrobnoustrojowych zarezerwowane do leczenia niektórych zakażeń u ludzi zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/6
- Rocha DC, da Silva Rocha C, Santos Tavares D, de Moraes Calado SL, Pedrosa Gomes M, 2021. Veterinary antibiotics and plant physiology: An overview. *Sci Total Environ*. 2021 May 1;767:144902.
- Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA, 2006, A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65 725-759.
- Tasho RP and Cho JY, 2016 Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. *Science of the Total Environment* 563-564: 366-376.
- Taylor P and Reeder R, 2020 Antibiotic use on crops in low and middle-income countries based on recommendations made by agricultural advisors. *CABI Agriculture and Bioscience* volume 1, Article number: 1.
- WHO (2001). *Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance*. Switzerland, 2001, 1-99.
- WHO (2015). *Global action plan on antimicrobial resistance*. [http://www.wpro.who.int/entity/drug\\_resistance/resources/global\\_action\\_plan\\_eng.pdf](http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf)

- Youngquist CP, Mitchell SM, Cogger CG. 2016. Fate of Antibiotics and Antibiotic Resistance during Digestion and Composting: A Review. *J Environ Qual.* 45(2):537-45.
- Zhang M, He LY, Liu YS, Zhao JL, Liu WR, Zhang JN, Chen J, He LK, Zhang QQ, Ying GG, 2019 «Fate of veterinary antibiotics during animal manure composting.» *Science of The Total Environment* 650 (Pt 1): 1363-1370.

# SEKCJA PSZCZOŁY

## WARROZA

Andrzej Bober

Zakład Chorób Pszczół

### KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA

Czynnikiem etiologicznym warrozy – choroby roztoczowej czerwiu i pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) jest *Varroa destructor* (Anderson i Trueman). Do roku 2000 uważano, że roztocza *Varroa* stwierdzone w rodzinach pszczoły miodnej należą do gatunku *Varroa jacobsoni*. *Varroa jacobsoni* został po raz pierwszy wykryty na Jawie w 1904 r. przez E. Jacobsona, jako pasożyt zewnętrzny dziko żyjącej pszczoły wschodniej indyjskiej (*Apis cerana indica*). Pierwszego opisu pasożyta dokonał holenderski akarolog Oudemans. Po przeprowadzeniu dokładnych badań DNA okazało się jednak, że roztocza pasożytujące na *A. mellifera* należą do odrębnego gatunku, któremu ze względu na wywieranie niszczyielskiego wpływu na rodziny pszczele nadano nazwę *Varroa destructor* (*V. destructor*). Przyjęta i coraz częściej ostatnio pojawiająca się w literaturze popularnonaukowej polska nazwa pasożyta to dręcz pszczeli.

Roztocz *V. destructor* jest pasożytem rozdzielnopłciowym. Dorosła samica w kolorze brunatnym, o wymiarach 1,1 x 1,7 mm, cechuje się grzbietowo-brzusznym spłaszczeniem ciała oraz poprzecznie owalnym kształtem. Samce są koloru szaro-białego, o wymiarach 0,97 x 0,93 mm, kształtu prawie kulistego. Samce nigdy nie opuszczają komórek z czerwiem zasklepionym i giną po zapłodnieniu samicy, dlatego nie spotykamy ich na dorosłych pszczołach. Związane jest to między innymi z tym, że samce nie mogą samodzielnie pobierać pokarmu przez kutikulę pszczół i czerwiu. Na dorosłych pszczołach pasożytują wyłącznie samice i ta faza pasożytowania nazywana jest fazą foretyczną. Pasożyt posiada cztery pary odnóży zaopatrzonych w przyłgi służące do utrzymywania się na ciele czerwiu i pszczół. Składane jaja są koloru mlecznobiałego, o wymiarach 0,4 x 0,6 mm. Z jaja po 2-3 dniach wylęga się larwa,

która przekształca się w protonimfę, później deutonimfę, a ta w osobnika dorosłego – samca lub samicę. Całkowity czas rozwoju, od jaja do postaci dorosłej trwa dla samca – ok. 7 dni, dla samicy – ok. 6 dni. Narządy gębowe są typu kłująco-ssącego i pozwalają na przebicie okrywy ciała pszczoły, zwłaszcza błon międzysegmentalnych, dlatego samice pasożyta szczególnie chętnie usadawiają się na odwłoku. Dobrze rozwinięty układ oddechowy roztoczy umożliwia życie zarówno w komórkach z czerwiem zasklepionym, jak i poza komórkami. Samice wykazują również zdolność do poruszania się po plastrach, ścianach i dnie ula, dzięki czemu po śmierci pszczoły mogą przechodzić na inną, żywą pszczołę. Charakterystyczną cechą jest wytrzymałość na brak pokarmu, bez którego mogą się obyć kilka dni (nawet do 9.). Na martwych pszczołach roztocza mogą przeżyć około 16-17 dni, a na plastrach z zamartłym czerwiem nawet do 32 dni. Poza ulem, na roślinach miododajnych, pasożyt może przeżyć nawet do 3 dni. Długość życia pasożyta ma ścisły związek z cyklem życiowym rodziny pszczelej, uwarunkowana jest także temperaturą i wilgotnością otoczenia. Osobniki, które pasożytują na pszczołach w pełni sezonu, żyją znacznie krócej, od 1 do 2. miesięcy, natomiast pokolenie pasożytów bytujące na pszczołach zimujących może przeżyć 5-8 miesięcy. W ciągu jednego sezonu pasiecznego (od wiosny do jesieni) w rodzinie pszczelej może pojawić się od 7 do 12 nowych pokoleń *V. destructor*.

## EPIDEMIOLOGIA

*V. destructor* stwierdzany jest prawie wszędzie tam, gdzie utrzymywana jest pszczoła miodna. Badania, prowadzone z wykorzystaniem metod biologii molekularnej, pozwoliły na wyróżnienie wśród populacji *V. destructor* pasożytujących na *Apis mellifera* dwóch haplotypów (typów genetycznych) – japońskiego (tajlandzkiego) występującego tylko na terenie Japonii, Tajlandii i w północnej oraz południowej Ameryce i koreańskiego (zwanego także rosyjskim) – rozpowszechnionego na całym świecie. Badania dotyczące zmienności genetycznej roztocza wykazały, że jego szkodliwe oddziaływanie na pojedynczą pszczołę, a w konsekwencji na całą rodzinę pszczelą, uwarunkowane jest haplotypem.

W Europie spotyka się wyłącznie haplotyp koreański, który uważany jest za bardziej patogenny niż haplotyp japoński. W ostatnich latach wyróżniono kolejne dwa haplotypy – chiński i Korea 2. Na obszarze Unii Europejskiej, zgodnie z treścią załącznika IX do Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) 2021/620 z dnia 15 kwietnia 2021 r. ustanawiającego przepisy dotyczące stosowania rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/429 w odniesieniu do zatwierdzania statusu obszaru wolnego od choroby [...] (wersja ujednolicona z dnia 26/01/2023), za strefy o statusie obszaru wolnego od zarażenia pasożytem *Varroa* spp. uznaje się terytorium 6 wysp należących do Portugalii oraz Wyspy Alandzkie należące do Finlandii. Do 23 czerwca 2022 r. uznawano Australię jako kontynent wolny od *V. destructor*, jednakże zgodnie z informacjami udostępnianymi przez Światową Organizację ds. Zdrowia Zwierząt (WOAH – dawniej OIE), a zamieszczanymi w ogólnodostępnym elektronicznym Światowym Systemie Informacji o Zdrowiu Zwierząt (WAHIS – <https://wahis.woah.org>) sytuacja ta uległa zmianie. Sukcesywnie przybywa nowych ognisk *V. destructor* (pasiek, gdzie stwierdzono pasożyta). Ostatni dostępny raport (z 2023-04-24) wskazuje na występowanie 148 ognisk w tym kraju. Pomimo wysiłków związanych ze zwalczaniem inwazji pasożyta przez kompetentne służby, podejmowane działania nie przynoszą oczekiwanych rezultatów.

## PATOGENEZA I OBJAWY KLINICZNE

Mechanizm negatywnego oddziaływania *Varroa* na rodzinę pszczelą ma charakter polietiologiczny (wieloczynnikowy). Dzięki badaniom przeprowadzonym w Stanach Zjednoczonych, których wyniki opublikowano na początku 2019 r. dzisiaj wiemy, że zarówno osobniki dorosłe, jak i stadia rozwojowe nie odżywiają się, jak dotychczas uważano, wyłącznie hemolimfą. Pasożyt wywiera swój niszczycielski wpływ na pszczoły, swojego żywiciela, poprzez pobieranie komórek ciała tłuszczowego (CT) – tkanki u owadów będącej odpowiednikiem wątroby ssaków. Podstawową funkcją CT jest magazynowanie rezerw tłuszczowych, białkowych i węglowodanowych. Komórki ciała tłuszczowego absorbują z hemolimfy metabolity

i je przechowują. CT odgrywa także istotną rolę w metabolizmie wysokoenergetycznych cząsteczek, detoksykacji (odtruwaniu), jest prekursorem syntezy żółtka jaj, odpowiada za magnetorecepcję i odpowiedź immunologiczną, aktywnie uczestniczy w homeostazie owadów poprzez regulowanie stężenia substancji w hemolimfie. W czerwiu pszczoły miodnej masa CT stanowi około 65% masy jego ciała. Biały kolor larw to efekt prześwitania tkanki tłuszczowej przez kutikulę (zewnętrzną powłokę ciała). Imago pszczoły (pszczoła po wygryzieniu się z komórki) ma zdecydowanie mniej CT, stanowi ono około 2% masy pszczoły i zlokalizowane jest po wewnętrznej (bezpośrednio pod kutikulą) grzbietowej i brzusznej stronie odwłoka. Stan CT dorosłej pszczoły zmienia się w trakcie cyklu życiowego i pełnionej funkcji. Pszczoły letnie mają je słabiej rozwinięte niż pszczoły zimowe. Robotnice karmiące mają dwukrotnie więcej tłuszczu niż zbieraczki. Poziom tłuszczu związany jest z pełnioną przez pszczołę funkcją, a nie z jej wiekiem.

Podsumowując, *Varroa destructor* wykorzystuje jako główne źródło pokarmu CT zaburzając w sposób prawidłowe funkcjonowanie wielu elementów związanych bezpośrednio i pośrednio z prawidłową, fizjologiczną kondycją pszczół. Sama utrata hemolimfy, choć z pewnością obecna ze względu na nakłuwanie powłok zewnętrznych i czas, który musi upłynąć aby doszło do jej krzepnięcia w powstałej ranie, wobec nowych dowodów wydaje się mieć marginalne znaczenie. Powstające w trakcie odżywiania się pasożytów uszkodzenia zewnętrznych powłok ciała pszczół mogą stanowić wrota zakażenia dla bakterii, a także wirusów pszczelich przenoszonych przez pasożyta (np. wirusa kaszmirskiego (KBV), wirusa ostrego paraliżu pszczół (ABPV), wirusa zdeformowanych skrzydeł (DWV)). *V. destructor* jest nie tylko wektorem zakażeń, może także indukować ujawnienie się zakażeń utajonych.

Objawy kliniczne choroby zauważalne są w rodzinie już wówczas, gdy na 100 dorosłych pszczół przypada 20 pasożytów. Pszczoły są wówczas niespokojne, widać kalekie robotnice, część czerwiu zamiera, ilość czerwiu trutowego zmniejsza się nawet

o połowę. Rodziny są wyraźnie osłabione. Dość charakterystyczne jest opuszczanie uli przez pszczoły.



Jesienią, często się zdarza, że pszczoły z przygotowanych do zimowania rodzin (podkarmionych), nie formują kłębu tylko znikają, pozostawiając puste gniazda z zapasami pokarmu i resztką czerwiu. Rodziny nieleczone, silnie porażone, osypują się w okresie jesienno-zimowym lub na przedwiośniu w ciągu 2-3 lat.

W ostatnich latach wprowadzono termin „Parasitic Mite Syndrome” (PMS) używany do określenia zespołu objawów klinicznych obserwowanych w rodzinach pszczelich, w czerwiu, a także u osobników dorosłych. Za przyczynę wywołującą syndrom uznaje się pierwotną infestację *V. destructor* wikłaną następnie zakażeniami wirusowymi. Objawy w czerwiu pszczelim mogą przypominać objawy obserwowane w przypadku wystąpienia zgnilca europejskiego, zgnilca amerykańskiego, czy choroby woreczkowej czerwiu. Należą do nich: obecność czerwiu rozstrzelonego, zmiany w zabarwieniu larw (od stadium larwy zwiniętej do przedpoczwarki) na kolor jasno brązowy, obecność nietypowo ułożonych larw w komórkach, obecność trudnych do usunięcia tzw. „łusek” – pozostałości po wyschniętych, zmarłych larwach. Z objawów obserwowanych u dorosłych pszczół uwagę zwracają: obniżenie liczby osobników

w rodzinie oraz pełzające pszczoły. Często syndromowi towarzyszy wymiana matki przez pszczoły. Podkreślenia wymaga fakt, że nie zawsze wszystkie ww. objawy muszą występować jednocześnie.

## DIAGNOSTYKA

### Badanie pszczoł

Badanie pszczoł przeprowadza się tzw. metodą wytrząsania, polega na wytrząsaniu próbki pszczoł w wodzie, w obecności detergentu mającego na celu ułatwienie oddzielenia pasożytów od pszczoł. Następnie próbkę przelewa się przez zestaw sit umożliwiający oddzielenie pszczoł od obecnych pasożytów. Na podstawie stosunku liczby stwierdzonych pasożytów *V. destructor* do liczby pszczoł można obliczyć intensywność inwazji w badanej próbce.

### Badanie osypu

Badanie osypu przeprowadza się metodą flotacji poprzez zalanie próbki alkoholem technicznym i dokładnym mieszaniu do rozpuszczenia kawałków wosku, bądź propolisu. Następnie identyfikuje się pasożyty, które wypływają na powierzchnię roztworu.

### Badanie czerwiu

Badanie czerwiu można wykonać dwoma metodami – jakościową, pozwalającą na wykazanie lub brak obecności pasożytów w badanej próbce lub ilościową pozwalającą na określenie intensywności i/lub ekstensywności inwazji *V. destructor*. Metoda polega na odklepaniu pojedynczych komórek i dokładnej obserwacji larw, bądź poczwerek oraz wnętrza komórki w celu stwierdzenia obecności pasożytów. Intensywność oblicza się jako stosunek liczby stwierdzonych pasożytów *V. destructor* do liczby badanych komórek. Ekstensywność inwazji wyraża stosunek komórek, w których na larwach, bądź ich wnętrzu wykryto pasożyta, do całkowitej liczby badanych komórek. Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt (WOAH) zaleca



także wyplukiwanie zawartości komórek na system sit umożliwiający oddzielenie czerwii od obecnych pasożytów.

## **ZWALCZANIE**

Na podstawie Rozporządzenia Komisji (UE) NR 37/2010 z dnia 22 grudnia 2009 r. (wersja ujednolicona z dnia 23/03/2023) w sprawie substancji farmakologicznie czynnych i ich klasyfikacji w odniesieniu do maksymalnych limitów pozostałości (MLP) w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego, aby określona substancja mogła zostać wykorzystana do leczenia określonego gatunku zwierząt musi znajdować się w wykazie substancji dozwolonych niniejszego rozporządzenia. Z substancji mogących służyć do zwalczania warrozy w rozporządzeniu znalazły się: amitraza (MLP dla miodu 200 µg/kg), kumafos (MLP dla miodu 100 µg/kg) oraz flumetryna, tau-fluwalinat, kamfora, mentol, tymol, eukaliptol, kwas szczawiowy, kwas mrówkowy, kwas mlekowy dla których MLP nie jest wymagany.

## **PRODUKTY LECZNICZE WETERYNARYJNE (PLW)**

Obecnie zgodnie z zapisami znajdującymi się w Rejestrze Produktów Leczniczych (stan na dzień 2023-05-08) dostępnym na stronach internetowych Centrum e-Zdrowia (CeZ), państwowej jednostki budżetowej powołanej przez Ministra Zdrowia, której przedmiotem działalności jest realizacja zadań z zakresu budowy społeczeństwa informacyjnego, obejmujących organizację i ochronę zdrowia oraz wspomaganie decyzji zarządczych ministra właściwego do spraw zdrowia na podstawie prowadzonych analiz (<https://rejestrmedyczne.ezdrowie.gov.pl/registry/rpl>) do obrotu dopuszczone są następujące PLW: Api – Bioxal®, Api Life Var®, Apiguard®, Apistrip®, Apivar®, Apiwarol®, Bayvarol®, Biowar®, Dany's BienenWohl®, Formic Pro®, Oxybee®, PolyVarYellow®, Thymovar®, VarroMed®. Dostępność na rynku poszczególnych PLW uzależniona jest od działań podejmowanych przez producentów, bądź dystrybutorów.

Należy pamiętać, żeby PLW stosować zgodnie z informacjami zawartymi w ich ulotkach, bowiem tylko wtedy możemy oczekiwać ich właściwej skuteczności. Często zapominanymi elementami są właściwe przechowywanie PLW przed zastosowaniem oraz okres ważności PLW po pierwszym otwarciu opakowania.

W przypadku podejrzenia braku skuteczności PLW, między innymi, właściciel zwierzęcia może ten fakt zgłosić. W celu przeprowadzenia tego procesu należy odwiedzić stronę internetową Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (<https://urpl.gov.pl/pl/urząd>), następnie przejść do zakładki „PRODUKTY LECZNICZE”, kolejno zakładka „Monitorowanie bezpieczeństwa leków”, potem link „ZGŁOŚ DZIAŁANIE NIEPOŻĄDANE” i wypełnić elektroniczny formularz (przedstawiona ścieżka dostępu dotyczy strony internetowej w wersji z dnia 2023-03-11).

Zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/6 z dnia 11 grudnia 2018 r. w sprawie weterynaryjnych produktów leczniczych i uchylające dyrektywę 2001/82/WE (wersja ujednolicona z dnia 28.01.2022) każda substancja aktywna (substancja farmakologicznie czynna) stosowana u pszczoł (jako gatunku od którego pozyskuje się żywność) do leczenia lub zapobiegania chorobom musi być autoryzowana (zarejestrowana) jako PLW. Żaden produkt leczniczy weterynaryjny nie może zostać wprowadzony do obrotu w Unii, dopóki nie zostanie wydane pozwolenie na dopuszczenie go do obrotu i dopóki nie zostaną wykazane jego jakość, bezpieczeństwo i skuteczność.

## **METODY BIOTECHNICZNE**

W zwalczaniu *V. destructor* można, a nawet należy stosować także tzw. metody biotechniczne. Metody te oparte są na wykorzystaniu właściwości biologicznych pasożyta do ukierunkowanego jego zwalczania. Ze względu na ilość metod odsyłam do dwóch pozycji literatury popularnonaukowej: Chorbiński P.: „Pokonaj warrozę” Wydawnictwo: Bee&Honey Sp. z o.o.; 2018 r. oraz Gajda A.:

„Pszczelarskie kompendium wiedzy o warrozie”; Wydawnictwo: Bee&Honey Sp. z o.o.; 2020 r., gdzie czytelnik znajdzie wyczerpujące i syntetyczne informacje na temat przedmiotowych metod.

## LEKOOPORNOŚĆ

Ciągłe, coroczne stosowanie określonych substancji chemicznych może prowadzić do powstawania lekooporności roztoczy *V. destructor*. Jedną z przyczyn zmniejszonej wrażliwości *V. destructor* na stosowane leki jest fakt, iż w obrębie każdej populacji roztoczy wrażliwość na akarycydy jest osobniczo zróżnicowana, w wyniku czego pewna liczba roztoczy, na ogół bardzo niewielka, nie ulega zniszczeniu podczas zastosowanych zabiegów i może wydać nowe, odporne pokolenie. Po dłuższym okresie stosowania danego leku prowadzi to do wyselekcjonowania szczepu opornego. Szczep oporny namnażając się w danej populacji, na skutek działania tzw. presji selekcyjnej, staje się szczepem dominującym. Zmniejszona wrażliwość roztoczy *V. destructor* na stosowane związki chemiczne jest związana także z zanieczyszczeniem wewnętrznego środowiska ula. Większość warroacydów wykazuje właściwości lipofilne (odkładają się w związkach tłuszczowych – wosk). Jak wykazano, pozostałości substancji rozpuszczalnych w tłuszczach (za wyjątkiem amitrazy, która bardzo szybko ulega rozkładowi na nieaktywne metabolity, a wosk jest uważany za katalizator/przyspieszacz tej reakcji), długo pozostają w wosku ze względu na ich dużą stabilność chemiczną, a w wyniku kolejnych zabiegów, przy braku wymiany plastrów na nowe, dochodzi do ich kumulowania się. W efekcie, nawet przy zaprzestaniu zwalczania warrozy danym preparatem leczniczym, roztocza mają ciągły kontakt, z niższymi od terapeutycznych, dawkami jego substancji czynnej, co skutkuje wzrostem oporności. Duży wpływ na powstawanie oporności ma także szeroko rozpowszechnione stosowanie w różnej postaci, chałupniczo wykonywanych przez pszczelarzy preparatów opartych na środkach opracowanych i służących do zwalczania szkodników upraw roślin, czy pasożytów zewnętrznych, innych niż pszczoły u zwierząt gospodarskich. W ten sposób do ula wprowadzane są substancje

w niekontrolowanych dawkach, przy czym nie jest także znana ich farmakodynamika w rodzinie pszczołej. W badaniach nad mechanizmami wytwarzania się u roztoczy oporności na pyretroidy przeprowadzonych w Stanach Zjednoczonych, zwrócono uwagę na występowanie punktowych mutacji w obrębie genu kodującego powstawanie kanału sodowego błon presynaptycznych synaps nerwowych (głównego punktu oddziaływania pyretroidów). Powstałe na skutek mutacji kanały sodowe mają zmienioną budowę molekularną, zatem obniżoną wrażliwość na działanie pyretroidu. Oporność może pojawiać się także na skutek zwiększenia stopnia działania monooksygenaz – rodziny enzymów detoksykacyjnych nazwanych wspólnie cytochrom P450, będących trans-błonowymi białkami związanymi z błoną retikulum endoplazmatycznego oraz wewnętrzną błoną mitochondrialną, charakteryzujących się niską specyficznością do substratu (szerokie spektrum działania na ksenobiotyki), katalizujących reakcje hydroksylacji. W doświadczeniach przeprowadzonych we Włoszech obliczono, że ilość tau-fluwalinatu potrzebna do zniszczenia 50% osobników ( $LC_{50}$  – median lethal concentration – stężenie substancji chemicznej powodujące śmierć 50% organizmów danej populacji w określonych warunkach) wzrasta z zakresu 15,9-18,5 mg/kg dla osobników wrażliwych, do zakresu 385-857 mg/kg w przypadku osobników opornych, a więc od 24 do 54 razy. Natomiast dla zniszczenia 95% populacji roztoczy ( $LC_{95}$ ) konieczne okazało się zwiększenie dawki od 440 do 1100 razy. Wyniki badań prowadzonych we Francji nad opornością na amitraz dowiodły, że w przeciągu 3 lat jego stosowania średni czas śmiertelności (MLT – mean lethal time) dla roztoczy wydłużył się z 24,9 ( $\pm 1,9$ ) min. do 57,6 ( $\pm 3,5$ ) min., czyli prawie dwukrotnie. Uważa się, że zjawisko oporności może mieć charakter wieloczynnikowy. Zmiany w obrębie procesów metabolicznych warunkujących posiadanie przez roztocze zdolności do wytwarzania oporności prowadzą do ich zaburzeń, co powoduje, że osobniki odporne mają zwykle mniejszą zdolność do rozmnażania i przeżywania w zmiennych warunkach środowiskowych. Dlatego w naturalnych warunkach przy braku czynników ograniczających wzrost całej populacji (np. akarycydy) pozostałe roztocza szybko zyskują przewagę nad opornymi, co określa się

mianem rewersji. W badaniach przeprowadzonych we Włoszech stwierdzono, że w przeciągu trzech lat, w trakcie których powstaje ponad 30 pokoleń pasożyta, odsetek opornych na fluwalinat roztoczy spadł z 42,2% do 4,6% (w przybliżeniu dziesięciokrotnie). Dlatego też, dla uzyskania zadowalającej skuteczności, po pojawieniu się oporności należałoby przerwać stosowanie tej substancji czynnej na okres 4-6 lat. Zjawiskiem utrudniającym walkę z warrozą jest także powstawanie u roztoczy tzw. oporności krzyżowej, polegającej na tym, że w przypadku stosowania określonej substancji czynnej preparatu leczniczego z danej grupy chemicznej u roztoczy pojawia się także oporność na pozostałe akarycydy, których substancje aktywne należą do tej samej grupy, ze względu na ich duże podobieństwo chemiczne. Dowiodły tego badania przeprowadzone we Włoszech, gdzie porównano wrażliwość roztoczy pochodzących z regionów kraju, w których obserwowano spadek skuteczności preparatu opartego na fluwalinacie, w porównaniu z roztoczymi pochodzącymi z miejsc, gdzie ww. pyretroid nadal wykazywał zadowalającą skuteczność. W grupie roztoczy, u których  $LC_{50}$  dla fluwalinatu wzrosło 24-54 razy, zauważono także wzrost  $LC_{50}$  dla pozostałych badanych pyretroidów. W przypadku flumetryny wzrost był 30-60 krotny, a dla akrynatriyny 10-26 krotny. Oporności krzyżowej nie stwierdzono natomiast pomiędzy substancjami pochodzącymi z różnych grup chemicznych. W badaniach prowadzonych w Wielkiej Brytanii w latach 2000-2001, w których do zwalczania warrozy stosowano tylko preparaty oparte na bazie pyretroidów (fluwalinat, flumetryna), przeprowadzono testy terenowe celem uzyskania roztoczy wrażliwych na działanie pyretroidów (skuteczność terenowa preparatów na poziomie 95-100%) i opornych (skuteczność terenowa preparatów na poziomie 2-5%). Te dwie grupy roztoczy poddano badaniom laboratoryjnym i stwierdzono, że  $LC_{50}$  fluwalinatu dla roztoczy wrażliwych wynosiło średnio 42,7 mg/kg, a dla roztoczy opornych 477 mg/kg (około 11 razy wyższe). Podobnie było w przypadku  $LC_{50}$  flumetryny, dla roztoczy wrażliwych wynosiło 0,47 mg/kg, dla roztoczy opornych 6,3 mg/kg (wzrost około 13-krotny). Nie zaobserwowano natomiast istotnych zmian, dla roztoczy wrażliwych i opornych na pyretroidy,

w wartościach LC<sub>50</sub> dla warroacydów z innych grup chemicznych takich jak: zw. fosforoorganiczne (kumafos), czy formamidyny (amitraz).

Badania laboratoryjne przeprowadzone w Polsce, których celem było porównanie w warunkach laboratoryjnych poziomu wrażliwości na amitraz populacji *V. destructor* pochodzących z rodzin leczonych przynajmniej przez 5 kolejnych lat preparatami zawierającymi tę substancję aktywną (Apiwarol, Biowar), z poziomem wrażliwości na amitraz populacji *V. destructor* pochodzących z rodzin leczonych przez taki sam okres innymi substancjami chemicznymi (fluwalinatem), wykazały istotne różnice w wielkości ocenianego parametru tj. średniego czasu śmiertelności (MLT – mean lethal time). Obserwacje roztoczy pochodzących z pasieki leczonej amitrazem wykazały, że średnio pasożyty ginęły po 2,5 godziny, natomiast w grupach kontrolnych średnio po 5 i 7 godzinach. W przypadku roztoczy z pasieki leczonej fluwalinatem średni czas śmiertelności wyniósł 1,5 godz., natomiast w grupach kontrolnych odpowiednio 6 i 8 godzin. Kolejne polskie doświadczenia mające na celu stwierdzenie w warunkach krajowych, czy kilkuletnie stosowanie fluwalinatu spowodowało obniżenie wrażliwości pasożyta *V. destructor* na flumetrynę – substancję należącą do tej samej grupy związków chemicznych (syntetyczne pyretroidy), jako wynik nabycia przez niego oporności krzyżowej nie wykazały istotnych różnic w średnich stężeniach flumetryny (LC<sub>50</sub>, LC<sub>95</sub>) dla roztoczy pochodzących z pasiek, w których rodziny pszczoły leczone przez kilka lat preparatami zawierającymi fluwalinat oraz populacji *V. destructor* pochodzących z pasiek, gdzie do zwalczania warrozy stosowano w tym czasie inne substancje chemiczne (amitraz, kwasy organiczne).

W innych krajowych badaniach dotyczących wrażliwości krajowej populacji *Varroa destructor* na pyretroidy (w tym przypadku tau – fluwalinat), których celem było ustalenie w jakim procencie pasiek mogą występować odporne na tę substancję pasożyty oraz jak dalece oporność ta jest zaawansowana, wśród 74 zbadanych pasiek w 17 (23%) stwierdzono obecność populacji *Varroa destructor* opornych na pyretroidy (spadek wrażliwości roztoczy na substancję aktywną w dawce 200 mg/kg powyżej

10%). W kolejnych 5 pasiekach (7%) stwierdzono obecność populacji *Varroa destructor* częściowo opornych na pyretroidy (spadek wrażliwości roztoczy na substancję aktywną w dawce 200 mg/kg w zakresie 5-10%).

## UWAGI O ZWALCZANIU

Dzięki informacjom ankietowym uzyskiwanym podczas realizacji jednego z zadań Programu Wieloletniego PIWet – PIB „Ochrona zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego” pt.: „Monitorowanie stanu zdrowotnego i strat rodzin pszczelich w krajowych pasiekach” każdego roku otrzymujemy między innymi dane dotyczące zabiegów zwalczania inwazji roztoczy *Varroa destructor*. Wyniki analiz danych ankietowych uzyskanych wiosną 2022 r. są następujące:

- 1) najczęściej stosowanym produktem leczniczym weterynaryjnym (PLW) był Apiwarol® – jego stosowanie zadeklarowało 64% pszczelarzy, zaobserwowano spadek stosowania ww. PLW w stosunku do poprzedniego roku badań, kiedy to stosowało go 86% pszczelarzy,
- 2) w 41% pasiek podano rodzinom Biowar 500® i jest to wartość zbliżona do poprzedniego roku (38%),
- 3) z innych PLW stosowano: Apivar® (6%), Bayvarol® (4%), Apiguard® (2%) i Varromed® (1%), w przypadku preparatu Bayvarol® w poprzednim roku badań jego stosowanie zadeklarowano w 10% pasiek,
- 4) **tylko w 7%** (w poprzednich badaniach 18%) pasiek, poza produktami leczniczymi weterynaryjnymi, stosowano biotechniczne metody zwalczania roztoczy (głównie ramki pracy, a w niewielkim odsetku – izolowanie matki na plastrze),
- 5) analizując informacje dotyczące zwalczania roztoczy (PLW, dawka, liczba zabiegów i ich częstotliwość) należy stwierdzić, że w blisko 82% pasiek zabiegi te przeprowadzono poprawnie, **stwierdzono jednak, że odpowiednio wcześniej** (okres

wychowu pokolenia pszczoł zimowych – lipiec, sierpień) zabiegi przeprowadzono tylko w blisko 40% ww. pasiek, co stanowiło 32% ogółu pasiek.

## PODSUMOWANIE

I. W Polsce dostępny jest szereg preparatów do zwalczania warrozy.

II. Kluczowe jest stosowanie preparatów zgodnie z informacjami zawartymi w ulotkach PLW.

III. Badania skuteczności PLW do zwalczania warrozy prowadzone przez kompetentne instytucje wskazują nadal na ich wysoką skuteczność.

IV. Należy zwracać szczególną uwagę na zjawisko oporności, które determinuje zmniejszoną skuteczność terapeutyczną.

V. Powinno się stosować zintegrowane metody zwalczania pasożyta – zabiegi biotechniczne + PLW.

VI. Niezwykle istotny jest czas rozpoczęcia zwalczania pasożyta, bowiem zbyt późne zwalczanie, pomimo wysokiej skuteczności, nie zagwarantuje odpowiedniej kondycji (warunkującej przeżycie okresu zimowania) pszczoł pokolenia zimowego.

VII. Obserwowane zmiany klimatyczne wpływają na biologię rodzin pszczelich (obecność stadiów rozwojowych – czerwiu) oraz dostępną bazę pożytkową.

**Powyższe względy pozwalają na stwierdzenie, że metoda zwalczania pasożyta V. *destructor* winna być dopasowywana indywidualnie do każdej pojedynczej pasieki, w oparciu o odpowiednią wiedzę i kompetencje.**



## NOSEMOZA

Andrzej Bober

Zakład Chorób Pszczół

### WSTĘP

Rodzaj *Nosema* (*Nosema spp.*), należący do gromady *Microsporidia*, stanowi dużą grupę obligatoryjnych (niezdolnych do życia poza organizmem żywiciela) pasożytów wewnątrzkomórkowych, zaliczanych do wysoce wyspecjalizowanych grzybów. U pszczoły miodnej dotychczas stwierdzono występowanie trzech gatunków z rodzaju *Nosema*: *Nosema apis* (*N. apis*), *Nosema ceranae* (*N. ceranae*) i *Nosema neumannii*, jednakże ze względu na ich rozprzestrzenienie istotne znaczenie mają dwa pierwsze gatunki. Najnowsze doniesienie przedstawione w 2020 r., przez zespół badaczy z Rosji, Chin i USA, którzy jako kryteria przynależności taksonomicznej przyjęli, nie jak się to dotychczas stosowało cykl rozwojowy organizmu, jego charakterystykę strukturalną, czy ultrastrukturalną, ale charakterystykę molekularną (badania genetyczne), rzuciły nowe światło na dotychczas obowiązującą systematykę i nazewnictwo w obrębie rodziny *Nosematidae*. Wprowadzono zmiany nazw podyktowane dokładniejszą analizą genomu w obrębie rodzaju *Nosema* i *Vairimorpha*. Zgodnie z niedawno przyjętą i obowiązującą systematyką dokonano adekwatnych zmian gatunków w obrębie ww. rodzajów. Przyjęte obecnie nazwy patogenów wywołujących nosemozę u pszczoły miodnej to: *Vairimorpha apis* (dawniej *N. apis*), *Vairimorpha ceranae* (dawniej *N. ceranae*) oraz *Vairimorpha neumannii* (dawniej *Nosema neumannii*). W ostatnich doniesieniach naukowych dotyczących nosemozy można spotkać się z podawaniem nazw gatunków w następujący sposób: *Vairimorpha (Nosema) apis* i *Vairimorpha (Nosema) ceranae*. W dalszej części niniejszego opracowania będę operował jednak stosowanymi od lat nazwami, bowiem musi upłynąć pewien czas zanim nowa nomenklatura wejdzie do powszechnego użycia i jej stosowanie nie będzie powodowało niepotrzebnego zamieszania.

## ETIOLOGIA

Jedynym stadium rozwojowym grzybów z rodzaju *Nosema* zdolnym do wywoływania zakażenia oraz posiadającym zdolność przeżycia w środowisku zewnętrznym są spory. Spory *N. apis* są owalne, o lekko zwężonym jednym biegunie. Wymiary spor to 3-4 x 5-7  $\mu\text{m}$ . Spory *N. ceranae* są owalno-cylindrycznego kształtu, proste, bądź lekko zakrzywione o wymiarach 2,3-3 x 3,6-5,5  $\mu\text{m}$ . Formy wegetatywne i niedojrzałe spory *N. apis* i *N. ceranae* stwierdzone są w komórkach nabłonka jelita środkowego i nie występują poza organizmem pszczoły. Należy wspomnieć, że metodą PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy) służącą do wykrywania materiału genetycznego potwierdzono obecność DNA *N. apis* i *N. ceranae* w gruczołach gardzielowych, gruczołach ślinowych, ciele tłuszczowym, natomiast nie wykryto ww. DNA w mózgu oraz mięśniach. Poza jelitem pszczoły dojrzałe spory *Nosema spp.* wykrywano w aparacie gębowym robotnic, co daje możliwość przenoszenia zakażenia tzw. drogą poziomą (z osobnika na osobnika) oraz w nasieniu trutni. Przeprowadzone dotychczas badania nie potwierdziły jednak możliwości wczesnego zakażenia robotnic pochodzących z jaj składanych przez zakażoną sporami *Nosema spp.* matkę pszczelą – tzw. pionowa droga zakażenia. Na uwagę zasługuje jednak fakt, że matki pszczoły mogą ulegać zakażeniu nosemozą w czasie zapłodnienia poprzez nasienie trutni zawierające spory *Nosema spp.* Kolejnym ważnym biologicznym aspektem jest stwierdzenie, że w badaniach przeprowadzonych w latach pięćdziesiątych nie potwierdzono możliwości zakażenia się larw sporami *N. apis*, natomiast w przypadku larw spożywających pokarm zawierający spory *N. ceranae* możliwy jest rozwój choroby już w stadium przedpoczwarki. Robotnice, które rozwiną się z zakażonych larw żyją około 30% krócej od robotnic z larw, które nie zostały zakażone. Opisując biologię *Nosema spp.* warto jeszcze raz wrócić do spor, które, jak wspomniano, różnią się kształtem i wymiarami, ale różnią się także (co jest istotne z punktu widzenia ich przeżywalności – zachowanej zdolności do zakażenia) wrażliwością na temperaturę. Spory *N. ceranae* są odporne na wysoką, a wrażliwe na niską temperaturę. Inkubacja spor w 60°C przez 6 godzin powodowała, że nadal około 90% spor pozostawało

zdolnych do zakażenia. Po 1 tyg. zamrażania (-18°C) większość spor traci żywotność. W przypadku spor *N. apis* są one odporne na niską, a wrażliwe na wysoką temperaturę: 60°C przez 15 min. całkowicie niszczy spory, a po 1 tyg. zamrażania – większość spor jest nadal zdolna do wywołania zakażenia.

## PATOGENEZA I OBJAWY KLINICZNE

W ogólnym ujęciu rozwój zakażenia *N. apis* i *N. ceranae* są zbliżone. Do zainfekowania pszczoł i rozprzestrzeniania się choroby w rodzinie pszczelej dochodzi drogą pokarmową na skutek spożywania zakażonego sporami pokarmu (pierzga, miód), wody, wzajemnego przekazywania pokarmu (trofalaksja), względnie podczas oczyszczania ula z wydaliny zakażonych osobników. Stwierdzono także, że pszczoły mogą przynosić do ula pyłek i nektar z kwiatów na których wcześniej znajdowały się chore na nosemozę pszczoły i który został zanieczyszczony sporami. Pszczoły robotnice zakażają się znacznie częściej niż matka i trutnie, co prawdopodobnie związane jest z wykonywaną przez nie pracą przy czyszczeniu gniazda, w której matka i trutnie nie uczestniczą. Uważa się, że uszkodzone mechanicznie i zainfekowane pszczoły (np. w czasie nieostrożnego przeglądu rodziny) mogą odgrywać rolę w transmisji (rozprzestrzenianiu się) choroby. Średnia dawka zakaźna  $ID_{50}$  (liczba spor potrzebnych do wywołania i rozwoju zakażenia u 50% osobników) wynosi około 85 (*N. ceranae*) i około 390 (*N. apis*) spor/pszczołę. Średnia dawka zakaźna  $ID_{100}$  (liczba spor potrzebnych do wywołania i rozwoju zakażenia u 100% osobników) wynosi 10 tys. spor/pszczołę niezależnie od gatunku *Nosema*. Spory po przedostaniu się wraz z pokarmem do światła jelita środkowego, na skutek właściwości biochemicznych treści pokarmowej i soków trawiennych pszczoły, zaczynają uwalniać specjalną strukturę – tzw. nić biegunową, która przebija się do wnętrza komórek jelita. Poprzez biegnący w nici biegunowej kanalik do zaatakowanej komórki przedostaje się zawartość spory i rozpoczyna skomplikowany proces namnażania pasożyta. Rozwijające się w komórce jelita spory prowadzą do jej mechanicznego uszkodzenia (pęknięcia). Potomne spory dostają się do światła jelita, skąd atakują kolejne komórki lub są wydalane z kałem, co więcej, każdorazowo nie musi dochodzić do niszczenia

komórki gospodarza i wydostania się spor do wnętrza jelita, aby zakażać kolejne komórki. Do zakażenia może dochodzić bezpośrednio między komórkami (pasożyt obecny w jednej komórce atakuje sąsiadującą komórkę). Możliwość międzykomórkowej transmisji u gospodarza zwiększa potencjał zakaźny pasożyta i czyni go bardziej patogennym (szkodliwym), bowiem bez tego typu transmisji potomne spory muszą trafić z powrotem do światła jelita i dopiero stąd mogą infekować kolejne komórki, co ogranicza tempo inwazji – wydłuża czas potrzebny do zaatakowania dużej liczby komórek. Efektem rozwoju grzyba w komórkach jelita środkowego są zaburzenia w ich funkcjach wydzielniczych i regeneracyjnych, co skutkuje brakiem przyswajania pobieranego przez pszczoły pokarmu – pojawia się głód pomimo dostępności pokarmu. Powodowane tym niedożywienie wpływa ujemnie na metabolizm i przebieg procesów fizjologicznych. Zaburzenia rozwoju obserwuje się w gruczołach okołogardzielowych. Dochodzi do upośledzenia zdolności gromadzenia białek w ciele tłuszczowym, czy zaburzeń funkcji ciał przyległych (*corpora allata*) wytwarzających hormony wpływające na rozwój i zachowanie. Pszczoły z karmicielek szybciej stają się zbieraczkami. U chorych osobników skraca się długość życia, nawet o połowę, co łącznie skutkuje zaburzeniem biologii i rozwoju całej rodziny pszczelej – zaburzenia w proporcji poszczególnych kast pszczół. Zainfekowana rodzina pszczelej wychowuje mniej czerwiu, co w konsekwencji skutkuje obniżeniem jej produktywności sięgającym 25-40%. Niestety objawy te są niezwykle trudne do zauważenia. Dostrzeżenie ww. objawów możliwe jest tylko przy posiadaniu w pasiece rodzin mogących stanowić grupę kontrolną (rodziny całkowicie zdrowe). U matek pszczelich nosemoza prowadzi do degeneracji jajników. Zakażenie matek *N. ceranae* przynosi efekt zmian w ilości poszczególnych substancji wchodzących w skład feromonu żuwaczkowego, tzw. substancji matecznej. Wyżej wymienione skutki obniżają znacząco płodność matki i mogą determinować szybszą jej wymianę przez robotnice.

W przypadku nosemozy wywoływanej przez *N. apis* (tzw. nosemoza typu A) można mówić o typowym, sezonowym przebiegu choroby objawiającym się

niewielkim poziomem infekcji latem, nieznacznym jej wzrostem jesienią i powolnym wzrostem w okresie zimy. Wiosną poziom infekcji wzrasta gwałtownie, co związane jest ze zwiększonym w tym okresie wychowem czerwiu i znacznie ograniczonymi możliwościami oblotu pszczoł. Dochodzi zatem do długotrwałego kontaktu owadów ze źródłem zakażenia (pojawiająca się biegunka), dodatkowo na intensywny rozwój choroby wpływają czynniki stresowe w postaci niedożywienia. W rodzinach zwiększa się osyp, a zbyt mała liczba pszczoł wychowuje mniejszą ilość czerwiu nawet przy prawidłowym czerwieniu matki, co prowadzi do ciągłego słabnięcia rodziny, a w konsekwencji do jej całkowitej zagłady. Odwłoki chorych pszczoł są silnie rozdęte ze śladami kału, chore pszczoły tracą zdolności lotne i mogą pełzać przed ulem. We wnętrzu ula i na desce wylotowej także można obserwować ślady gliniasto-żółtego kału. Opisana powyżej postać choroby to postać jawna. Przy niewielkim nasileniu inwazji, gdy mamy do czynienia z równowagą pomiędzy namnażaniem się pasożyta, a jego eliminacją z rodziny, choroba występuje w postaci utajonej. Brak jest wówczas ww. objawów klinicznych i stan taki może trwać nawet kilka lat, a jedynym niespecyficznym wówczas objawem jest nierównomierny rozwój rodziny.

Gdy mamy do czynienia z nosemozą, która wywoływana jest przez *N. ceranae* (tzw. nosemoza typu C), często brak typowych objawów choroby. W przypadku tej nosemozy nie stwierdza się sezonowości, jak opisano to w przypadku zakażenia *N. apis*, natomiast badacze z Hiszpanii wykazali występowanie 4 faz choroby. Długość poszczególnych faz może być różna, a rozwój i objawy choroby nie ograniczają się do jednego sezonu pasiecznego, co często potrafi być mylące. W pierwszej fazie choroby (faza bezobjawowa), mogącej przypadać na wczesną wiosnę lub jesień, rodzina pszczela wygląda zupełnie prawidłowo – ilość pszczoł i czerwiu jest adekwatna do pory roku. Kolejna faza (faza wyrównania siły rodziny) przypada zwykle na okres późnej jesieni, bądź nawet zimy. Na tym etapie rozwoju choroby ilość pszczoł nie budzi zastrzeżeń pszczelarza, natomiast zastanawiająca jest zwiększona ilość czerwiu w stosunku do pory roku, matka czerwi długo niezależnie od warunków klimatycznych. Stadium trzecie (fałszywe ozdrowienie) stwierdzone jest wiosną

kolejnego roku. W rodzinie obserwowany jest bardzo silny rozwój, jednakże rodziny, mimo znacznej siły, nie roją się. Matka bardzo intensywnie czerwi, próbując wyrównać straty szybko wymierających pszczoł, a rodzina często wydaje się silniejsza od pozostałych, co utwierdza pszczelarza w przekonaniu, że wszystko jest w jak najlepszym porządku. Niestety późną jesienią nadchodzi ostatnie stadium choroby (faza depopulacji). Objawy to pozostawanie w ulu garstki pszczoł z matką, obecna niewielka ilość czerwiu i pozostawione zapasy pokarmu.



Pszczoły często giną poza ulem. W żadnej z faz choroby nie występuje biegunka, dlatego nosemoza ta zwana jest „suchą”. Podczas późniejszych badań prowadzonych nad nosemozą C w różnych regionach świata nie potwierdzono tak charakterystycznego przebiegu nosemozy, jak opisano to w Hiszpanii. Należy pamiętać, że w przypadku nosemozy u jednej pszczoły, w jednej rodzinie może występować zarówno *N. apis*, jak i *N. ceranae* – mówimy wówczas o zakażeniu mieszanym. Zakażenie mieszane może dawać objawy, które będą wypadkową objawów obserwowanych przy zakażeniu tylko jednym gatunkiem *Nosema*. Na rozwój i przebieg choroby ma także wpływ dostępność odpowiedniej bazy pożytkowej, ze szczególnym uwzględnieniem stałej dostępności pyłku. Im lepsza dostępność, pod

względem jakościowym i ilościowym pokarmu, tym wpływ pasożyta na rodzinę pszczelą będzie mniej dotkliwy.

Zastanawiającym może być fakt, dlaczego *N. ceranae* w większości krajów o klimacie umiarkowanym wyparła, bądź wypiera *N. apis*. Dowiedzionych przyczyn jest kilka. Jako jedną z kluczowych uznaje się wrażliwość spor na temperaturę. Za kolejny z istotnych czynników dominacji inwazji *N. ceranae* uważa się fakt, że jest to relatywnie nowy pasożyt dla pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) zatem nie doszło jeszcze do pojawienia się stanu równowagi między pasożytem, a gospodarzem. Warto podkreślić, że celem pasożyta nie jest zabicie organizmu gospodarza, co oznacza też śmierć samego pasożyta. Przeprowadzone badania, wykazały brak różnic w odsetku śmiertelności pszczół zakażonych *N. apis*, bądź *N. ceranae*. Ponieważ wyniki ww. badań są alternatywą dla dotychczasowej wiedzy, która wskazywała, że zakażenie *N. ceranae* charakteryzuje się wyższym odsetkiem śmiertelności pszczół, przeprowadzono analizę czynników, które mogły wpłynąć na uzyskane rezultaty. Za główną przyczynę różnic obserwowanych w wirulencji zakażeń *Nosema spp.* uznano nie sam patogen, ale odpowiedź gospodarza na infekcję.

**Należy tutaj wspomnieć, że dotychczas opisano 26 podgatunków pszczoły miodnej i w opinii badaczy to właśnie ich zróżnicowanie genetyczne odgrywa kluczową rolę w rozwoju, przebiegu zakażenia i jego skutkach rozpatrywanych zarówno na poziomie pojedynczych osobników, jak i całej rodziny pszczelej. Autorzy podkreślają także rolę klimatu, który wpływając bezpośrednio na biologię rodziny pszczelej wpływa także na interakcje pasożyt – gospodarz.**

## **NOSEMOZA – INTERAKCJE**

Powszechnie uważa się, że wiele czynników wpływających negatywnie na zdrowie pszczół nie działa samodzielnie. Wskazuje się tzw. działanie addytywne (sumowanie się działania poszczególnych czynników), lub synergistyczne (wzajemne zwiększanie działania poszczególnych czynników) różnych stresorów. Pod pojęciem stresora rozumiemy każdy czynnik biologiczny, fizyczny, bądź chemiczny, który

wywołuje stres - stres to proces, za pomocą którego ww. czynniki zagrażają równowadze organizmu lub ją naruszają i za pomocą którego organizm reaguje na zagrożenie. U pszczoł narażonych na wysoki poziom pestycydów wykazano większą podatność na zakażenie *N. ceranae* i przypuszcza się, że to zwiększone ryzyko wynika z niezdolności narażonych pszczoł do skutecznej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko pasożytowi. Należy także wskazać, że choć ilość każdego indywidualnego pestycydu wykrytego w ulu może nie wystarczyć by spowodować ostrą toksyczność, to różne pestycydy i/lub ich metabolity (produkty przemian chemicznych) mogą się kumulować w ulu dając synergizm z innymi stresorami, takimi jak *Nosema* spp., *Varroa destructor*, czy nieodpowiednia baza pokarmowa. Nosemoza, na skutek obniżonej odpowiedzi immunologicznej może przyczyniać się także do łatwiejszego namnażania się w organizmach zainfekowanych pszczoł wirusów pszczelich.

## DIAGNOSTYKA

Rutynowa metoda diagnostyczna polega na wykonaniu rozcierania odwłoków i poszukiwaniu w homogenacie charakterystycznych spor *Nosema* spp. W celu uzyskania dokładniejszych wyników dotyczących poziomu zakażenia (określenie średniej liczby spor na pszczołę w badanej próbce) można wykonać liczenie spor z wykorzystaniem komory hemocytometru. Niezwykle istotnym jest, aby próbkę pszczoł pobraną do badań stanowiła tzw. „stara pszczoła” – pszczoła pobrana ze skrajnych ramek gniazda, bądź z nadstawki. U ww. pszczoł zakażenie może być w pełni rozwinięte, zatem uzyskany wynik będzie najbardziej miarodajny. Ze względu na duże podobieństwo morfologiczne spor obydwu gatunków z rodzaju *Nosema*, do diagnozowania gatunku opracowano szereg metod opartych o testy antygenowe, bądź wykrywanie specyficznego DNA. Do rutynowej diagnostyki gatunkowej zakażenia *Nosema* spp. zdecydowana większość laboratoriów referencyjnych zajmujących się zdrowiem pszczoł na świecie, w tym laboratorium PIWet – PIB w Puławach, stosuje metodę multiplex PCR, dzięki której w próbce pochodzącej



z zakażonej rodziny można wykrywać jednocześnie zarówno obecność *N. apis*, jak i *N. ceranae*.

Informacje dotyczące właściwego pobierania i przesyłania próbek do badań w kierunku nosekozy można znaleźć w dokumencie „Instrukcja pobierania i przesyłania próbek do badań” znajdującym się na stronie internetowej PIWet – PIB (<https://www.piwet.pulawy.pl>) w zakładce „Komunikaty” – Informacje dla pszczelarzy.

## ZWALCZANIE

Obecnie brak jest w Polsce zarejestrowanych preparatów leczniczych weterynaryjnych do zwalczania nosekozy. Może być ono wykonywane jedynie poprzez zabiegi dezynfekcyjne połączone ze stosowaniem preparatów wspomagających opartych na surowcach naturalnych.

Dezynfekcja uli, ich wyposażenia oraz narzędzi pasiecznych w przypadku zwalczania spor *N. apis* może zostać przeprowadzona poprzez ogrzanie ich do temperatury 60°C przez 15 minut. Plastry z rodzin pszczelich zainfekowanych *N. apis* mogą być odkażane poprzez ogrzewanie w temperaturze 49°C przez 48 godzin (temperatura topnienia wosku od 62°C). W badaniach stwierdzono, że 92% spor *N. ceranae* ogrzewanych w temp. 60°C przez 6 godzin nie traciło zdolności do wywoływania zakażenia. Do dezynfekcji można stosować także opary 80% kwasu octowego (2 ml/plaster przez 7-10 dni), który inaktywuje spory *N. apis*; brak informacji na temat wpływu tego sposobu dezynfekcji na spory *N. ceranae*. Do dezynfekcji powierzchni, na której mogą występować spory *Nosema spp.*, skuteczne zastosowanie znajdują środki zawierające w swoim składzie podchloryn sodu w stężeniu, co najmniej, 3%. Niezwykle istotny jest czas oddziaływania roztworu podchlorynu na dezynfekowaną powierzchnię. Dla uzyskania właściwej skuteczności czas oddziaływania podchlorynu powinien wynosić co najmniej 15 minut. Zbyt krótkie oddziaływanie ww. środka dezynfekcyjnego nie przyniesie właściwej skuteczności. Do niszczenia spor *Nosema spp.* może służyć także, odkrycie z 2021 r., woda amoniakalna (NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O) – zwyczajowa nazwa roztworu

amoniaku w wodzie. Skuteczne działanie potwierdzono już dla roztworu o stężeniu 1,65% i taki zalecany jest do stosowania. Do przeprowadzenia skutecznej dezynfekcji wystarczy czas ekspozycji wynoszący 5 min.

Na polskim rynku dostępny jest szereg preparatów, które wg ulotek producentów wykazują działanie wspomagające organizm pszczoły przy nosemozie. Poniżej przedstawię informacje tylko o dwóch preparatach, dla których znalazłem informacje opublikowane w źródłach naukowych. Nie jest to reklama wymienionych preparatów i moją intencją nie jest podważanie działania, innych niż opisane, dostępnych preparatów. Być może istnieją już, bądź niedługo pojawią się kolejne opracowania naukowe dotyczące kolejnych produktów.

API HERB® – zawiera m. in. wysuszone wywary roślinne, zioła aromatyczne, witaminy: B1 (tiamina), B2 (ryboflawina), B6 (pirydoksyna).

NOZEVIT® – głównym składnikiem jest wyciąg z kory dębu.

Badania skuteczności ww. preparatów przeprowadzone w Polsce wykazały, że po 5 tygodniach od zastosowania, w przypadku Nozevitu intensywność inwazji *Nosema spp.* w rodzinach pszczelich spadła z  $28,0 \times 10^4$  do  $0,2 \times 10^4$  spor *Nosema spp.*/pszczołę, przy czym od momentu zastosowania preparatu każdego tygodnia (od 1 do 4) intensywność inwazji ulegała wyraźnemu zmniejszeniu. W przypadku preparatu Api Herb po aplikacji intensywność inwazji obniżyła się z  $18,36 \times 10^4$  do  $0,43 \times 10^4$  spor *Nosema spp.*/pszczołę, co miało miejsce w 3. tygodniu od podania preparatu, w kolejnych tygodniach intensywność inwazji wzrastała, co może świadczyć, że preparat ten wykazuje krótsze, w zestawieniu z Nozevitem, działanie. Przedstawione wyniki badań świadczą o wyższej skuteczności preparatu Nozevit.

W badaniach przeprowadzonych w Chorwacji, Nozevit w 60. dniu po aplikacji spowodował obniżenie się poziomu porażenia pszczół sporami *Nosema spp.* o blisko 82% i podobnie, jak wykazały to krajowe badania od momentu aplikacji intensywność inwazji sukcesywnie malała. Skuteczność preparatu Api Herb (mierzona jako stosunek

intensywności inwazji przed i po leczeniu), w badaniach przeprowadzonych we Włoszech przez dwa zespoły badawcze wyniosła odpowiednio 46,0% i 71,7% po 3 tygodniach od zastosowania. Podsumowując należy podkreślić, że żaden z ww. preparatów nie zapewnia stuprocentowej skuteczności terapeutycznej, zatem niezwykle istotnym jest prowadzenie stałego monitorowania poziomu inwazji *Nosema spp.* w rodzinach pszczelich i podejmowanie adekwatnych działań.

## **ZASADY DOBREJ PRAKTYKI PSZCZELARSKIEJ (GBP) I BIOASEKURACJI (BMBs) W CELU ZMNIEJSZENIA RYZYKA WYBUCHU NOSEMOZY**

Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) w wydanym przewodniku „Good beekeeping practices – Practical manual on how to identify and control the main diseases of the honeybee (*Apis mellifera*)” (przewodnik dostępny on-line) jako zasady Dobrej Praktyki Pszczelarskiej w celu zmniejszenia ryzyka wystąpienia nosemozy, bądź zniwelowania skutków jej oddziaływania wskazuje na konieczność:

- 1) Odpowiedniej lokalizacji pasieki – miejsca gdzie nie występuje nadmierna wilgotność, nienarażone na zimne wiatry. Ule należy ustawiać najlepiej w stronę słońca, na obszarach gdzie występuje naturalna lekka wentylacja.
- 2) Dostosowania wielkości gniazda do siły rodziny – co ma zapobiegać stresowi termicznemu pszczół w zimnych porach roku.
- 3) Zapewnienia zimującym rodzinom właściwych ilościowo i jakościowo zapasów pokarmowych.
- 4) Skutecznego zwalczania inwazji *Varroa destructor*.
- 5) Zapewnienia spokoju rodzinom pszczelim w trakcie zimowania.
- 6) Niewykorzystywania w rodzinach plastrów pochodzących z rodzin, gdzie obserwowano jakiegokolwiek problemy zdrowotne.

- 7) Zapobiegania zanieczyszczeniu „sztucznych” źródeł wody kałem, bądź utopionymi lub martwymi pszczołami.
- 8) Nabywania matek od hodowców, których matki są wolne od zakażenia *Nosema* spp.
- 9) Wysyłania wiosną do badań próbek pszczoł pobranych z gniazda, bądź pszczoł z osypu.
- 10) Wzmacnianie i stymulowanie rodzin pszczelich jesienią i wiosną za pomocą stymulatorów lub suplementów paszowych.

Z kolei ww. przewodnik jako zasady bioasekuracji mające na celu obniżenie ryzyka pojawiania się nowych ognisk nosemozy wymienia:

- 1) Nabywanie matek od hodowców, których matki są wolne od zakażenia *Nosema* spp.
- 2) Wysyłanie wczesną jesienią, bądź wiosną próbek pszczoł do badań.
- 3) Zastosowanie dostępnych dozwolonych krajowym prawem produktów przeciwko nosemozie, gdy poziom infekcji dorosłych pszczoł przekracza 100 000 spor na pszczołę.

# SEKCJA DRÓB

## WYBRANE CHOROBY WIRUSOWE DROBIU WODNEGO

Wojciech Kozdruń, Karolina Piekarska, Natalia Styś-Fijoł, Agnieszka Stolarek, Jowita Samanta Niczyporuk

Zakład Chorób Drobiu

Hodowla drobiu wodnego w Polsce w ostatnim okresie jest dynamicznie rozwijającą się gałęzią produkcji drobiarskiej. W związku z taką sytuacją powstają wielkotowarowe fermy gęsi, a co za tym idzie wzrasta zagrożenie epidemiologiczne spowodowane najczęściej chorobami wirusowymi takimi jak:

- a) Parwowiroza gęsi zwaną chorobą Derzsy'ego
- b) Syndrom krwotocznego zapalenia jelit i nerek
- c) Zakażenie cirkowirusem gęsi.

### Zakażenie parwowirusem gęsi

Choroba Derzsy'ego (DD) jest chorobą wirusową wywoływaną przez wirus z rodziny *Parvoviridae*, zwanym wirusem choroby Derzsy'ego (DDV) lub parwowirusem gęsim (GPV). Choroba ta znajduje się według polskiego prawa weterynaryjnego na liście chorób podlegających obowiązkowi rejestracji. W Zakładzie Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach zlokalizowane jest Krajowe Laboratorium Referencyjne z zakresu diagnostyki laboratoryjnej tej choroby.

Badania prowadzone za pomocą odczynu seroneutralizacji krzyżowej i analizy restrykcyjnej wykazały różnice między szczepami parwowirusa izolowanymi od kaczek piżmowych i gęsi. Nie stwierdzono pokrewieństwa antygenowego z parwowirusami kurcząt i ssaków.

GPV jest stabilny w pH 3.0 i odporny na działanie eteru i chloroformu, względnie odporny na środki dezynfekcyjne takie jak fenol czy formalina. Nie ulega inaktywacji w temperaturze 56°C przez 3 h.

Zakażenia wywoływane przez GPV stwierdza się u wszystkich ras gęsi domowej oraz u kaczek piżmowych i kaczek Mullard. Opisywano także zakażenia u dzikich gęsi. W Polsce choroba Derzsy'ego jest przyczyną padnięć gęsi na poziomie 16,5%-19% w stosunku do ogólnej liczby padłych gęsi. Te dane wskazują, że jest to problem aktualny i poważny.

Dzięki stosowanym dotychczas programom szczepień ograniczono występowanie choroby, jednak nadal wirus bytuje w środowisku, a choroba Derzsy'ego występuje najczęściej w postaciach subklinicznych lub chronicznych (późnych) infekcji. Zakażeniu ulegają gąsięta do 6 tygodnia życia. Choroba przebiega jednak ze znacznie niższą śmiertelnością w porównaniu do sytuacji sprzed kilku lat.

Wrażliwe na zakażenie są gęsi domowe i dzikie, kaczki piżmowe oraz kaczki Mullard (mieszzańce). Natomiast kury, indyki i kaczki rasy Pekin nie ulegają zakażeniu. Najbardziej wrażliwe są 1-dniowe gąsięta, u których śmiertelność może dochodzić nawet do 100%.

Choroba szerzy się w stadzie na drodze horyzontalnej poprzez fekalia, zakażoną paszę i wodę. Brak jest danych na temat roli układu oddechowego i biologicznych wektorów w przenoszeniu się zakażenia. Replikacja wirusa następuje w ścianie jelit, skąd przedostaje się on do układu krwionośnego i występuje wiremia. Następnie wirus osiedla się w sercu i wątrobie.

Inną drogą zakażenia jest droga wertykalna poprzez jajo lub skorupę jaja. Zarodki pochodzące z zakażonych jaj zamierają podczas inkubacji lub tuż po wylęgu. Stają się one źródłem zakażenia dla innych wrażliwych gąsiąt, które już w wylęgarni mogą ulec zakażeniu.

Objawy kliniczne oraz okres wylęgania choroby zależą od wieku zakażonych ptaków. Jeśli zakażeniu uległy gąsięta w 1 dniu życia to okres inkubacji wynosi 3-5 dni. Natomiast w przypadku 2-3 tygodniowych ptaków objawy kliniczne mogą wystąpić od 5 do 10 dni później.

U zakażonych jednodniowych gąsiąt przebieg choroby jest ostry. U części gąsiąt mogą nie występować objawy kliniczne. Śmiertelność w stadzie przeważnie waha się w granicach 60-80%, czasem może dochodzić do 100%.



Ryc. 1. Objawy kliniczne w przebiegu parwowirozy gęsi

U ptaków starszych choroba ma przebieg przewlekły. Ptaki tracą apetyt, skupiają się wokół źródła ciepła. Część ptaków odłącza się od stada. Może wystąpić biegunka, kał jest szarobiały. Notowane są spadki masy ciała nawet o 50-80%. Występuje zwiększone pragnienie. Pojawiają się braki w upierzeniu, w szczególności w okolicy brzucha, grzbietu i przednich brzegów skrzydeł. U niektórych ptaków obserwuje się postawę "pingwina", co jest związane z gromadzeniem się płynu wysiękowego w jamie brzusznej. Choroba trwa około czterech tygodni, zaś śmiertelność nie jest wysoka: 20-30%, sporadycznie poniżej 10%. Notuje się 70-80% wyzdowień. Stado takich ozdowieńców jest niewyrównane, występują osobniki o wzroście i masie ciała normalnej obok osobników drobnych i silnie wychudzonych. Ptaki, które przechorowały są zakażone latentnie i stają się siewcami wirusa.



Ryc. 2. Objawy kliniczne w przebiegu parwowirusy gęsi



Ryc. 3. Ubytki w upierzeniu w przebiegu parwowirusy gęsi



U padłych gąsiąt obserwuje się powiększenie wątroby z obecnością szarobiałych ognisk martwicy i wybroczyn podtorebkowych. Serce jest blade z wyraźnie zaokrąglonym koniuszkiem i licznymi krwawymi wybroczynami.



Ryc. 4. Zmiany anatomopatologiczne w sercu w przebiegu parwowiroy gęsi

Wybroczyny występują także w trzustce i nerkach, które są znacznie powiększone. Czasami widoczne jest krwotoczne zapalenie jelit. Na skutek uszkodzenia nerek duża ilość płynu wysiękowego gromadzi się w jamie brzusznej. U starszych gąsiąt notowane jest zapalenie mięśnia sercowego i włóknikowe zapalenia worka osierdziowego i wątroby. Występuje zapalenie jelit cienkich. Sporadycznie zmiany anatomopatologiczne notowane są w śledzionie, nerkach i jelicie czczym.

Diagnostyka choroby Derzsy'e'ego oparta jest na badaniach: klinicznym, anatomopatologicznym, serologicznym, wirusologicznym, molekularnym oraz histopatologicznym.

Prawidłową diagnozę można postawić na podstawie badań klinicznych, serologicznych i anatomopatologicznych. Jednakże w przypadkach wątpliwych wykonuje się izolację wirusa z wątroby i serca padłych ptaków.

Odczyn seroneutralizacji (SN) polega na zobojętnieniu właściwości infekcyjnych wirusa przez przeciwciała. Wykonuje się go w hodowli fibroblastów zarodka gęsiego (GEF) mikrometodą beta. Stosuje się stałą dawkę wirusa i różne rozcieńczenia surowic badanych. Mieszaniną wirusa z rozcieńczoną surowicą zakaża się komórki fibroblastów gęsiego. Po 6-7 dniach inkubacji ocenia się pod mikroskopem występowanie efektu cytopatycznego, określając najwyższe rozcieńczenie surowicy, które powodowało neutralizację wirusa. Surowicę o mianie  $SND_{50}$  powyżej 40 uznaje się za dodatnią.

Test immunoenzymatyczny ELISA polega na wiązaniu kompleksu przeciwciało-wirus z koniugatem czyli gammaglobuliną królika lub kozy anty gammaglobulina gęsia. Po dodaniu substratu występuje reakcja barwna. Natężenie jej odczytuje się w spektrofotometrze przy długości fali zależnej od użytego substratu.

Obie wyżej przedstawione metody (SN i ELISA) służą do określenia obecności swoistych przeciwciał przeciwko wirusowi choroby Derzsy'ego w surowicach ptaków jak i w żółtkach jaj.

W badaniu histopatologicznym w przebiegu choroby Derzsy'ego obserwuje się ogniskowe lub rozlane zmiany degeneracyjne w mięśniu sercowym związane z obecnością wewnątrzjądrowych ciałek wtrętowych Cowdry typ A. Podobne zmiany są stwierdzane w jelitach. W wątrobie widoczna jest silna wakuolizacja hepatocytów. W cytoplazmie zwakuolizowanych hepatocytów występują ogniska martwicy dookoła kapilar. Czasami obserwuje się niecharakterystyczne zmiany w śledzionie, nerkach i jelitach.

Gęsi parwowirus izoluje się w 10-15 dniowych zarodkach gęsiego zakażanych do jamy omoczniowej homogenatami z serca lub wątroby chorych ptaków. U zarodków padłych obserwuje się przekrwienia i przebarwienia wątroby.

Wirus można izolować w pierwotnych hodowlach komórkowych fibroblastów zarodka gęsiego lub kaczki piżmowej. Replikacja wirusa zachodzi tylko w mitotycznych

komórkach, w fazie S. W zakażonych hodowlach po 5-7 dniach inkubacji tworzy się widoczny efekt cytopatyczny (CPE). Komórki kurczą się, tworząc drobne komórki silnie załamujące światło. Stopniowo dochodzi do przerywania ciągłości jednolitej warstwy komórkowej. Widoczne są również syncytia komórkowe i następuje całkowita degeneracja komórek. Obecność wirusa można także potwierdzić mikroskopem elektronowym, immunofluorescencją, a także techniką immunoperoksydazową.

W diagnostyce różnicowej należy uwzględnić:

- a) Syndrom S.M.M.D.R. (syndrom:śmiertelność, zachorowalność, utrata upierzenia, pełzanie)
- b) Syndrom karłowatości i skróconego dzioba
- c) Reowirozę
- d) Syndrom krwotocznego zapalenia nerek i jelit u gęsi (HNEG)
- e) Zakażenia wywołane poprzez cirkowirusy.

W 1982 roku wprowadzono w kraju szczepienia ochronne gęsi stad reprodukcyjnych. Stosowane są szczepionki przygotowane w oparciu o atenuowane szczepy parwowirusa choroby Derzsy'ego. Uodpornione gęsi przekazują potomstwu poprzez żółtko przeciwciała, zapewniając im w ten sposób ochronę immunologiczną w okresie największej wrażliwości na chorobę.

W immunoprofilaktyce choroby Derzsy'ego stosowana jest szczepionka „żywa” oparta na atenuowanym szczepie parwowirusa gęsiego (GPV) oraz obecnie wprowadzona biwalentna szczepionka olejowa, w skład której wchodzi inaktywowany szczep parwowirusa gęsiego (GPV) i szczep parwowirusa kaczki piżmowej (MDPV).

Szczepionki żywe przeciwko chorobie Derzsy'ego są podawane dwukrotnie gęsiom ze stad reprodukcyjnych przed okresem nieśności, a następnie po szczycie nieśności. Gąsięta z wysokim poziomem przeciwciał matczynych szczepi się w 2-3 tygodniu życia, natomiast z niskim poziomem szczepi się do 7 dnia życia.

Przy stosowaniu szczepionki inaktywowanej zalecane jest dwukrotne szczepienie stada rodzicielskiego, w terminie 6 i 3 tyg. przed nieśnością, natomiast gąsięta w 1 dniu życia oraz po 3-4 tygodniach.

### **Zakażenie polyomawirusem gęsi**

Polyomawirusy należą do niewielkich, bezotoczkowych wirusów o średnicy 40-50 nm, o ikozaedralnym kapsydie, zbudowanym z 72 pentametrycznych kapsomerów. Zawierają koliste, dwuniciowe DNA (dsDNA) o wielkości około 5000 par zasad (4.8-5.5 kbp). Charakteryzują się wysoką opornością na niesprzyjające warunki środowiska, w tym wysoką temperaturę, wysuszenie oraz tłuszczowe rozpuszczalniki.

Opierając się na filogenetycznej analizie stwierdzono, że czynnik wywołujący syndrom krwotocznego zapalenia nerek i jelit u gęsi jest ściśle związany, ale jednocześnie jest wyraźnie inny od pozostałych polyomawirusów i prawdopodobnie reprezentuje inny rodzaj wirusa nazywany "goose haemorrhagic polyomavirus (GHPV)".

Do głównych chorób poliomawirusowych mających znaczenie w przemysłowej hodowli i utrzymywaniu drobiu wodnego zaliczyć można syndrom krwotocznego zapalenia nerek i jelit u gęsi (HNEG), który jest śmiertelną, multisystemową chorobą młodych gęsi, wywołowaną przez GHPV.

Początkowo chorobę zanotowano na Węgrzech, w 1969 roku, natomiast czynnik etiologiczny był izolowany z homogenatów nerek i wątroby chorych ptaków w latach 2000-2001.

W ciągu kilku ostatnich lat choroba miała znaczący wpływ na hodowlę i zdrowotność stad gęsi w kilku europejskich krajach, w tym we Francji, Niemczech oraz na Węgrzech. Natomiast w Polsce pierwsze przypadki zachorowań, u 3-tygodniowych gęsi zanotowano w 2007 r.

Choroba ta cechuje się ostrym i gwałtownym przebiegiem oraz wysoką zachorowalnością i śmiertelnością. Charakterystyczne jest występowanie obrzęku

tkanki podskórnej, wodobrzusza z płynem o konsystencji żelatyny oraz krwotocznego zapalenia nerek i jelit.

W przypadkach terenowych zachorowalność waha się w granicach 30-80%, natomiast śmiertelność u gęsi w wieku od 4 do 10 tygodnia życia jest bliska 100%. Notowano również przypadki zachorowań u młodszych gęsi (4-dniowych) oraz w stadach starszych gęsi między 17 a 20 tygodniem życia, wówczas śmiertelność waha się między 4% a 67%, a osobniki mogą chorować przez dłuższy czas (1-2 miesiące).

Przebieg HNEG jest ostry i gwałtowny, a zmiany obserwowane u zakażonych ptaków mogą nasunąć fałszywe podejrzenie choroby Derzsy'ego. Często gęsi z zakażonych stad rozwijały się normalnie, a następnie stwierdzano nagłe padnięcia, bez żadnych wcześniejszych objawów klinicznych. U niektórych ptaków stwierdzano objawy kliniczne takie jak ataksja, drżenie głowy i szyi, wylewy podskórne oraz krwisty kał. Często u ptaków hodowlanych śmierć poprzedzona jest otępieniem trwającym kilka godzin, natomiast u gęsi eksperymentalnie zakażonych w pierwszym dniu życia, kilka godzin przed śmiercią stwierdzano objawy nerwowe, takie jak *opisthotonus* i niedowład. U 8-dniowych zakażonych eksperymentalnie gęsi, w badaniu sekcijnym, stwierdzano obrzęk tkanki podskórnej, wodobrzusze oraz obrzęk i krwotoczne zapalenie nerek. Często stwierdzano krwotoczne zapalenie niektórych odcinków lub całej długości jelit, w tym przede wszystkim dwunastnicy, jelita czczego oraz jelit ślepych. Zmiany koncentrowały się zarówno w kosmkach jelitowych jak i w regionie krypt jelitowych, były zmianami ograniczonymi i związanymi z zapaleniem tętnic.

Największe zmiany histopatologiczne obserwowano w nabłonku kanalików nerkowych. Notowano infiltrację heterofili i deplecję limfocytów w bursie Fabrycjusza oraz śledzionie, ale nie zaobserwowano jej w grasicy. Ponadto stwierdzano zapalenie naczyń krwionośnych w oku, trzustce, płucach i sercu. Histologiczne zmiany naczyniowe to przede wszystkim wieloogniskowe umiarkowane powiększenie jąder komórkowych śródbłonka naczyniowego, czasem z towarzyszącą delikatną infiltracją limfocytów w ścianie naczyń krwionośnych. Zapalenie tętnic stwierdzano we wszystkich zmienionych makroskopowo narządach. U starszych gęsi, u których rozwój choroby był wolniejszy i padły one kilka dni po zaobserwowanych klinicznie objawach, w badaniu sekcyjnym makroskopowo stwierdzano zmiany krwotoczne w nerkach oraz dnę moczaniową z kryształkami moczanów w stawach.



Ryc. 5. Zmiany anatomopatologiczne w jelitach w przebiegu HNEG

W badaniu histopatologicznym stwierdzano zapalenie jelit, nerek i nekrozę nabłonka nerek oraz umiarkowaną lub ciężką deplecję (zanik) limfocytów w bursie Fabrycjusza, zarówno w części obwodowej jak i środkowej grudek limfatycznych. Natomiast ogniska krwotoczne były obserwowane w większości tkanek, zwłaszcza u ptaków, u których choroba miała przebieg ostry.

Gęsi, które przeżyją chorobę pozostają nosicielami polyomawirusa, co osłabia ich zdrowotność i produktywność. Osobniki takie mogą zakażać inne gęsi, co powoduje u nowo zakażonych wystąpienie choroby w postaci ostrej. Opisano także występowanie GHPV u kaczek rasy Mallard i piżmowej, przy czym o ile wirus występujący u nich powodował typowe objawy choroby jak u zakażonych gęsi, to zakażenie kaczek referencyjnym szczepem gęsim nie wywoływało widocznych zmian. Oznacza to, że kaczki mogą być nosicielami i rezerwuarem omawianej choroby.

Najczęściej wykorzystywaną metodą laboratoryjnych badań diagnostycznych jest reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR), pozwalająca wykryć obecność materiału genetycznego wirusa. Do badań diagnostycznych nadają się wszystkie tkanki, w których stwierdzono zmiany histologiczne. W najwcześniejszej fazie zakażenia DNA wykrywane było w grasicy, mimo że nie stwierdzano w niej widocznych zmian sekcyjnych oraz histologicznych. W późniejszych fazach zakażenia obecność wirusa wykrywano w wątrobie, śledzionie, nerkach i bursie Fabrycjusza.

W badaniach laboratoryjnych do namnażania wirusa należy użyć komórek pierwotnych lub gęsiich jaj zarodkowych. Dopuszczalne jest też namnażanie wirusa w pierwotnych hodowlach komórkowych fibroblastów zarodków gęsiich lub nerek zarodków gęsiich. Replikacja GHPV jest słaba lub jej brak na ciągłych liniach komórkowych, tak więc nie nadają się one do wykorzystania w namnażaniu materiału genetycznego wirusa wykorzystywanego do dalszych badań.

### **Zakażenie cirkowirusem gęsi**

Zakażenia cirkowirusowe u ptaków są w ostatnim czasie narastającym problemem, zarówno u drobiu grzebiącego, ale także u drobiu wodnego. Wirusy te przede wszystkim wykazują działanie immunosupresyjne. Straty przez nie powodowane to: zahamowanie przyrostów masy ciała, zaburzenia w łaknieniu i pragnieniu, zaburzenia w prawidłowym upierzeniu oraz większa liczba wtórnych zakażeń wirusowych, bakteryjnych i grzybiczych, głównie wywoływanych przez

*Escherichia coli*, *Pasteurella spp.*, *Riemerella spp.* oraz *Aspergillus spp.* Ponadto uważa się, że jednym ze źródeł zakażeń cirkowirusowych dla drobiu są ptaki wolno żyjące.

Zakażenia cirkowirusem gęsim (GoCV) zostały potwierdzone w stadach gęsi w Niemczech, Chinach, na Węgrzech, Tajwanie i w Polsce.

Pierwsze przypadki zakażeń GoCV w Chinach zostały opisane w stadzie gęsi w którym pierwotnie wykryto zakażenie wirusem ptasiej grypy. Kolejne przypadki zakażeń GoCV potwierdzono na fermach zlokalizowanych w promieniu kilkunastu kilometrów, jednak przeważnie przebiegały one w formie subklinicznej, gdzie jedynym objawem choroby była apatia wśród ptaków.

Z kolei pierwszy przypadek zakażenia GoCV na Węgrzech został wykryty przypadkowo u gęsi w stadzie w którym stwierdzono obecność wirusa Zachodniego Nilu. Miało to miejsce w 2005 roku, a u gęsi tych widoczne były objawy neurologiczne.

Zakażenia GoCV potwierdzono w stadach gęsi z kliniczną postacią choroby jak i u gęsi z postacią subkliniczną.

Ostatnie doniesienia z Polski wykazują, że GoCV może być izolowany od różnych gatunków wolno żyjących gęsi: gęś gęgawa (*Anser anser*), gęś białoczelna (*Anser albifrons*), gęś zbożowa (*Anser fabalis*).

Do zakażenia ptaków dochodzi najczęściej drogą poziomą poprzez przewód pokarmowy, gdzie ma miejsce intensywna replikacja wirusa, a w konsekwencji jego wydalanie do środowiska.

Objawy kliniczne występują u ptaków w pierwszych tygodniach życia. Ptaki są osowiałe, obserwuje się zahamowanie przyrostów wagowych (nawet do 0,5 kg w 9 tygodniu odchowu), pojawiają się braki w upierzeniu (np. w postaci nekrozy foliку piór) oraz wzrasta odsetek wybrakowanych ptaków.



U padłych ptaków notuje się powiększenie grasicy i wątroby z obecnością wybroczyn, znaczne powiększenie śledziony, przekrwienie płuc, wybroczyny w mięśniu sercowym.

Diagnostyka zakażeń cirkowirusami oparta jest na badaniu anatomopatologicznym, badaniu wirusologicznym oraz badaniu histopatologicznym. Do badań należy pobrać bursę Fabrycjusza, śledzionę, wątrobę oraz inne chorobowo zmienione narządy.

Przeprowadzone badania własne u drobiu wodnego ewidentnie wskazują na stałe zagrożenie występowania zakażeń GoC. Przeprowadzone badania u ptaków wolno żyjących wykazały prewalencję zakażeń GoCV na poziomie 26%, co wskazuje na możliwość transmisji wirusa na stada gęsi w Polsce. Obecność GoCV we wszystkich narządach potwierdza wielonarządowy charakter zakażeń.

## SEKCJA ŻYWIENIE

### ZAGROŻENIA ZWIĄZANE ZE STOSOWANIEM MOCNIKA W ŻYWIENIU PRZEŻUWACZY

Ewelina Patyra, Krzysztof Kwiatek

Zakład Higieny Pasz

Względy natury ekonomicznej sprawiają, że poszukuje się dodatków do pasz, które są w stanie obniżyć koszty produkcji paszy jak również odpowiednio zbilansować dawkę pokarmową wymaganą dla zwierząt gospodarskich. Prawidłowe zbilansowanie dawki paszowej w białko, energię, włókno, składniki mineralne i witaminy nie jest proste. Dodatek paszowy jakim jest mocznik doskonale uzupełnia deficyt białkowy w żywieniu przeżuwaczy. Zgodnie z Rozporządzeniem (WE) Nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 sierpnia 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt, mocznik uzyskał zezwolenie na stosowanie jako dodatek paszowy w kategorii „dodatki dietetyczne”, w grupie funkcjonalnej „mocznik i jego pochodne”. Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) Nr 839/2012 z dnia 18 września 2012 r. dotyczące zezwolenia na stosowanie mocznika jako dodatku paszowego dla przeżuwaczy określa maksymalną zawartość mocznika w mieszance paszowej pełnoporcjowej o wilgotności 12% na 8800 mg/kg. Rozporządzenie to wskazuje również, że mocznik może zostać zastosowany wyłącznie u zwierząt z rozwiniętym żwaczem oraz, że dodatek ten należy wprowadzać do żywienia zwierząt stopniowo, a w dziennej dawce pokarmowej maksymalnie 30% całkowitego azotu powinno pochodzić z azotu mocznikowego.

Mocznik zawiera ok. 45-47% azotu, a 1 kg mocznika odpowiada 2800-2900 g białka ogólnego i 1440 g białka trawionego w jelicie wyliczonego na podstawie podaży azotu dla bakterii żwacza (BTJN). Bakterie żwaczowe trawią białka, peptydy oraz aminokwasy do amoniaku. Amoniak wchłaniany jest do krwioobiegu i przekształcany w wątrobie na mniej toksyczną formę – mocznik. Wiadomo, że mocznik nie może zastąpić dodatków białkowych takich jak poekstrakcyjna śruta sojowa, innych roślin

motylkowych czy śruta rzepakowa, ponieważ nie dostarcza on żadnych aminokwasów, będących niezbędnymi substratami w syntezie białek. Dodatkowo pamiętać należy, że pewna część białka z poekstrakcyjnej śruty sojowej, czy też rzepakowej nie ulega rozkładowi w żwaczu, przechodząc do jelita cienkiego, gdzie stanowi źródło niezbędnych aminokwasów do syntezy białek.

Należy mieć świadomość, że wprowadzenie mocznika do dawki pokarmowej nie może być zwykłą zamianą poekstrakcyjnej śruty sojowej czy rzepakowej, mocznik ma być jednym z elementów dawki pokarmowej, a nie zamiennikiem jednego z komponentów, stąd też po decyzji o jego zastosowaniu konieczna jest korekta dawki pokarmowej. Najważniejszą zasadą jest nieprzekraczanie bezpiecznej dawki, a ta nie powinna być większa niż 30 g na każde 100 kg masy ciała zwierzęcia. Tak więc najczęściej zaleca się od 100 do 150 g mocznika dziennie dla bydła. Aby poprawić wykorzystanie mocznika przez bakterie żwacza warto zwiększyć udział pasz zasobnych w łatwo fermentujące cukry, do których należy kiszonka z kukurydzy, ale też wysłodki buraczane czy melasa. Bezpieczny udział mocznika w mieszance wynosi 10-20 g na każdy kilogram przygotowywanej paszy. Należy pamiętać, że ostateczny udział mocznika w mieszance zależy będzie od dziennej dawki paszy treściwej, jaką podajemy w żywieniu przeżuwaczy. Mocznik stanowi bardzo wydajne i atrakcyjne ekonomicznie uzupełnienie pasz niskobiałkowych o dużej wartości energetycznej w białko. Jednak do prawidłowego żywienia tym dodatkiem podchodzić należy z dużą rozważa i ostrożnością. Niefrasobliwość można przypłacić kiepską kondycją, a nawet śmiercią zwierzęcia.

### **Zasady stosowania mocznika**

Według specjalistów od żywienia zwierząt mocznik jest bezpiecznym dodatkiem paszowym, pod warunkiem przestrzegania kilku zasad dotyczących jego stosowania:

- mocznik należy stosować wyłącznie w żywieniu bydła dorosłego, z dobrze rozwiniętym żwaczem (najlepiej u zwierząt powyżej 6 miesiąca życia);

- zwierzęta należy stopniowo przyzwyczajać do skarmiania mocznika, a okres ten nie może być krótszy niż 7-14 dni;
- nie należy stosować mocznika w postaci pólta;
- mocznik należy dobrze wymieszać z paszami dawki pokarmowej;
- ilość mocznika należy ograniczyć przy skarmianiu śruty sojowej lub innych strączkowych ze względu na obecność w nich ureazy (przyspieszenie uwalniania amoniaku w żwaczu);
- mocznik należy przechowywać w pomieszczeniach o bardzo niskiej wilgotności powietrza ponieważ posiada silne właściwości higroskopijne;
- należy unikać zbrylania mocznika, co mogłoby spowodować jego nadmierne pobranie i zwiększenie prawdopodobieństwa zatrucia;
- stosowanie mocznika wymaga precyzji dawkowania;
- mocznik powinien być traktowany, jako jeden z elementów dawki pokarmowej, a nie zamiennik innych komponentów;
- dawka pokarmowa powinna zawierać dodatki mineralne, w tym zawierające siarkę;
- maksymalna dzienna porcja mocznika nie powinna przekraczać 20-30 g na 100 kg masy ciała zwierzęcia;
- najczęściej zalecana dzienna dawka mocznika dla krów mlecznych i bydła opasowego to 100-150 g;
- przed podjęciem decyzji o wprowadzeniu mocznika do dawki pokarmowej, należy upewnić się, że nie znajduje się on już w paszach treściwych z zakupu;
- należy pamiętać iż mocznik dostarcza jedynie białka BTJN – ilość białka trawionego w jelicie cienkim z dostępnego w żwaczu azotu – może być więc skarmiany jedynie z paszami ubogimi w BTJN w stosunku do BTJE – ilość białka trawionego w jelicie cienkim wynikająca z dostępnej w żwaczu energii. Mocznikowanie paszy w celu uzupełnienia BTJN ma sens jedynie gdy zapewnimy zwierzęciu optymalną dawkę BTJE, stąd ciągłe przypomnienia o konieczności zapewnienia w dawce pokarmowej dużych ilości łątwo

fermentujących węglowodanów, np. w postaci kiszonki kukurydzianej jako podstawowej paszy objętościowej.

### **Przyczyny zatrucia mocznikiem**

Zatrucia mocznikiem zdarzają się z następujących przyczyn oraz w następujących okolicznościach:

- nagłe przejście na paszę z zawartością mocznika;
- zadawanie wilgotnej mieszanki treściwej zawierającej mocznik lub zadawanie mocznika z paszami soczystymi. Pasza nie powinna zawierać więcej niż 12% wilgotności, gdyż rozpuszczony mocznik jest dwa razy bardziej toksyczny;
- nieumiejętne stosowanie w żywieniu bydła mocznika, amoniakowanych wyśtoków buraczanych oraz melasy mocznikowanej;
- przekroczenie zawartości mocznika w dawce pokarmowej lub jego złe wymieszanie z pokarmem;
- lekkomyślne obchodzenie się z mocznikiem nawozowym, np.:
  - łatwy dostęp bydła do mocznika nawozowego,
  - nierównomierne rozsianie mocznika nawozowego,
  - spasanie bydłem pastwiska wkrótce po nawożeniu,
  - pastwiska nawożone mocznikiem mogą być wykorzystywane po dwóch tygodniach po nawożeniu, ten czas się skraca jeśli po nawożeniu wystąpią obfite opady deszczu.

### **Objawy zatrucia mocznikiem u przeżuwaczy**

Nadmierna ilość spożytego przez przeżuwacze mocznika prowadzi do znacznego zwiększenia produkcji amoniaku, przekraczającego zdolność mikroflory żwacza do wykorzystania go w syntezie białek oraz jego detoksykacji przez wątrobę w syntezie cyklu mocznikowego. W warunkach normalnego pH żwacza (6,5-6,7) prawie cały amoniak występuje w postaci jonowo-amoniowej ( $\text{NH}_4^+$ ), która jest dobrze rozpuszczalna w wodzie, ale nierozpuszczalna w lipidach. W przypadku

przedawkowania mocznika, oprócz bardzo wysokiego poziomu amoniaku w żwacu, sytuację dodatkowo pogarsza wzrost pH żwacza powyżej 7 i w tych warunkach jon amonowy ( $\text{NH}_4^+$ ) jest przekształcany w amoniak ( $\text{NH}_3$ ), który jest wysoce rozpuszczalny w lipidach.

Duże ilości amoniaku powstające z rozkładu nadmiarowych ilości mocznika mogą szybko przejść przez błonę komórkową i zostać wchłonięte do krwiobiegu, prowadząc w ten sposób do hiperamonemii. Normalny poziom amoniaku we krwi obwodowej wynosi poniżej 5 mg/l. U przeżuwaczy kliniczne objawy neurotoksyczności spowodowane przedawkowaniem mocznika pojawiają się, gdy ogólnoustrojowy poziom amoniaku we krwi osiąga 10 mg/l. Wczesne objawy zatrucia amoniakiem to drżenie mięśni (zwłaszcza głowy i uszu), wytrzeszcz oczu, ból brzucha, zwiększone ślinienie, wielomocz i bruksizm (mimowolne i intensywne zgrzytanie zębami), poważniejsze zatrucia mogą prowadzić do tężyczki. Poziom amoniaku we krwi obwodowej wyższy niż 50 mg/l może okazać się śmiertelny. Nasilenie objawów choroby (zasadowicy) zależy od ilości amoniaku w treści przedżołądków oraz jego koncentracji we krwi. Początkowo zwierzę traci apetyt, słabnie odruch przeżuwania oraz słabną ruchy żwacza. Kolejną konsekwencją zasadowicy jest zaburzenie stanu równowagi w populacji mikroorganizmów żwacza. Zbytne zalkalizowanie środowiska żwacza sprzyja namnażaniu się bakterii gnilnych, produkujących toksyny zabijające inne bakterie i uszkodzające komórki ścian całego przewodu pokarmowego.

Zasadowica może więc mieć przebieg lekki (subkliniczny), chroniczny lub ostry. Osłabieniu zwierzęcia może towarzyszyć biegunka, spadek mleczości i zawartości tłuszczu w mleku. O zasadowicy świadczy również zawartość mocznika w mleku, która przekracza 300 mg/l. Ponadto, do objawów zasadowicy należą: apatia, wzdęcia, pogorszenie parametrów rozrodu oraz biegunka lub silne zaparcie. W przypadku zasadowicy powstającej w wyniku zatrucia mocznikiem paszowym, pojawia się nadmierne ślinienie, trudności z oddychaniem, drżenie mięśni, niewydolność układu krążenia i porażenie, dochodzi do ustania ruchów żwacza i jego atonii. W ostrym przebiegu choroby u zwierząt obserwowane jest obniżenie

temperatury ciała o 1°C, występują również zaburzenia rytmu serca. Ponadto, zwierzęta oddają duże ilości wodnatego, ciemnego i pieniacego się kału. Mocz ma tendencje do pienia się, a krowy stają się nadpobudliwe, przy czym obserwujemy także sztywność kończyn oraz chwiejny chód. Biegunce towarzyszą nawracające wzdęcia. Koncentracja mocznika w dawce pokarmowej wynosząca 0,3-0,5 g/kg m.c. zwykle powoduje niekorzystne skutki ze względu na niezdolność mikroflory żwacza do wykorzystania dużych ilości wytworzonego amoniaku, a dawki 1,0-1,5 g mocznika/kg m.c. mogą być śmiertelne.

Ponadto u zwierząt obserwuje się zmianę zapachu płynu żwacza, który przybiera zapach amoniaku (ocena w trakcie sondowania lub nekropsji) oraz ciemną barwę, jego śluzówka staje się przekrwiona i obrzęknięta. W obrazie anatomopatologicznym (sekcyjnym) obserwowane jest zwyrodnienie wątroby, często obecne są też wybroczyny w nerkach. W przypadku pobrania przez zwierzę mocznika nawozowego, śmierć zwierzęcia może nastąpić natychmiast.

### **Zapobieganie i leczenie zatruc mocznikiem**

Zapobieganie zasadowicy żwacza polega głównie na przestrzeganiu prawidłowego żywienia, unikaniu nagłych zmian paszy i zachowaniu właściwych proporcji pomiędzy białkiem a węglowodanami w dawce pokarmowej. Leczenie polega przede wszystkim na zaprzestaniu podawania dotychczasowej paszy. Dobre efekty uzyskuje się po zastosowaniu łatwo strawnej paszy węglowodanowej (melasa, buraki). W ciężkich przypadkach należy skorzystać z pomocy lekarza weterynarii. W takich przypadkach konieczna jest szybka interwencja, zaś do momentu jego przybycia można spróbować obniżyć pH treści żwacza podając zwierzęciu ok. 3-5 l octu (lub 10-15 l roztworu 3% kwasu octowego) lub ok. 60 ml kwasu mlekowego rozpuszczonego w 5-10 l wody, które zneutralizują obecny w przedżołądku amoniak i zatrzymają jego wchłanianie do krwiobiegu. W lżejszych przypadkach alkalozę podajemy zwierzęciu pasze energetyczne zawierające łatwo przyswajalne węglowodany – np. 0,5 kg sacharozy rozpuszczonej w 5 l wody lub ok. 300-400 ml melasy.

# ASPEKTY STOSOWANIA ROŚLIN GENETYCZNIE ZMODYFIKOWANYCH JAKO ŻYWNOSCI I PASZY

Zbigniew Sieradzki, Beata Król, Nina Kozieł, Krzysztof Kwiatek

Zakład Higieny Pasz

## Wstęp

Metody inżynierii genetycznej wykorzystywane są w rolnictwie do tworzenia nowych odmian roślin o zdefiniowanych, nowych cechach, poprzez zastosowanie modyfikacji genetycznych. Powstające w ten sposób rośliny genetycznie zmodyfikowane to organizmy, w których materiał genetyczny został zmieniony w sposób niezachodzący w warunkach naturalnych (jak np. skutek krzyżowania się roślin lub naturalnej rekombinacji). Zdaniem biotechnologów, modyfikacje genetyczne roślin wykorzystywane są od początków uprawy roślin w procesie ich selekcji i hodowli nowych odmian, a istota modyfikacji genetycznych nie tkwi w fakcie dokonywania modyfikacji lecz w sposobie ich przeprowadzania. Stosowana w laboratoriach biotechnologicznych technika rekombinowanego DNA polega na dokonywaniu zmian bezpośrednio w strukturze DNA, z pominięciem mechanizmów rozmnażania i barier w przekazywaniu informacji genetycznej między gatunkami organizmów.

## Kierunki transgenezy roślin

Ze względu na zamierzony efekt transgenezy wyróżnić można trzy generacje roślin uprawnych genetycznie zmodyfikowanych:

1. Rośliny charakteryzujące się zmianami w wegetatywnych częściach roślin bez znaczących zmian składu chemicznego w częściach generatywnych roślin.
2. Rośliny ze zmianami w składzie chemicznym i wartości użytkowej jadalnych części roślin.



3. Rośliny, u których wywołano syntezę specyficznych, zazwyczaj gatunkowo obcych substancji.

Powszechne zastosowanie w uprawach komercyjnych na świecie znalazła jedynie jak dotąd generacja pierwsza. Obejmuje ona rośliny o zwiększonej tolerancji na działanie herbicydów, odpornych na działanie szkodników oraz odmiany roślin o obu wymienionych cechach, jak również rośliny odporne na choroby bakteryjne i wirusowe. Najpopularniejszą modyfikacją nadającą odporność na herbicyd jest odporność na działanie preparatu Roundup®. Substancją czynną tego herbicydu jest glifosat, który hamuje działanie enzymu syntazy EPSPS biorącego udział w szlaku syntezy aminokwasów aromatycznych. Nadawanie odporności na herbicyd odbywa się poprzez wszczępienie genu warunkującego syntezę enzymu niewrażliwego na glifosat lub genu odpowiedzialnego za syntezę enzymu rozkładającego glifosat (oksydoreduktazy glifosatu). Najczęściej uprawianą rośliną odporną na działanie opisywanych herbicydów jest soja odmiany MON40-3-2, nazywana również Roundup Ready.

Innym rodzajem modyfikacji genetycznej roślin uprawnych zaliczanym do pierwszej generacji jest odporność na szkodniki z rzędów *Lepidoptera* i *Coleoptera*. Odporność taka warunkowana jest przez geny pochodzące od powszechnie występujących w glebie bakterii *Bacillus thuringiensis*. Rośliny posiadające tą cechę określa się często w skrócie od nazwy bakterii jako odmiany Bt. Wyizolowane z *B. Thuringiensis* geny *cry* warunkują syntezę krystalicznych białek, deltaendotoksyn, o proteolitycznej aktywności enzymatycznej. Opisano około 170 rodzajów tych białek, m.in. Cry1Ab, Cry1Ac, Cry9C, Cry1F. Białka te w procesie trawienia w organizmie owada wchodzi w interakcję z receptorami komórek jelitowych i następuje perforacja jelita. Ekspresja deltaendotoksyn zachodzić może we wszystkich częściach roślin (np. kukurydza Bt11), tylko w częściach zielonych (liście, łodygi) i/lub pyłku (np. kukurydza Bt176). Kukurydza odmiany MON810 jest jedną z części stosowanych roślin Bt i charakteryzuje się odpornością na działanie owada Omacnicy prosowianki (*Ostrinia nubilalis*). Szkodnik ten stanowi poważny problem upraw kukurydzy w USA i Europie.

Wśród upraw komercyjnych występują również odmiany roślin charakteryzujących się odpornością na choroby wirusowe, bakteryjne i grzybowe. Przykładem rośliny uprawnej odpornej na choroby wirusowe są ziemniaki odporne na wirusa liściozwoju (PLRV) lub wirusa Y (PVY).

Przykładami organizmów genetycznie zmodyfikowanych zaliczanych do drugiej generacji są m.in. rośliny o zmienionym profilu jakościowym i ilościowym aminokwasów w białku, profilu kwasów tłuszczowych lub rośliny, u których transgeneza pozwoliła na redukcję zawartości alergenów. Pozwala to na zwiększenie zawartości niedoborowych aminokwasów (np. lizyna w zbożach) czy kwasów tłuszczowych (wzbogacanie olejów roślinnych) w produktach z roślin uprawnych.

Synteza specyficznych substancji chemicznych, w roślinach GMO trzeciej generacji, obejmuje m.in. produkcję farmaceutyków i szczepionek roślinnych. Przykładem takiego zastosowania roślin GM może być polska sałata transgeniczna, zawierająca antygeny ludzkiego wirusa zapalenia wątroby typu B.

**Kontrowersje związane z organizmami genetycznie zmodyfikowanymi** Stosowanie modyfikacji genetycznych, szczególnie w przypadku żywności i pasz, pomimo powszechnego ich wykorzystania budzi wiele niepokojów. Związane są one przede wszystkim z potencjalnymi zagrożeniami wynikającymi z możliwości przekazywania transgenów, syntezy nowych alergenów lub związków szkodliwych dla zdrowia, zmniejszenia bioróżnorodności, negatywnego wpływu na organizmy inne niż docelowe, wywoływania silnej presji selekcyjnej czy aspektów moralnych. Przytłaczająca większość prowadzonych dotąd doświadczeń na zwierzętach z zastosowaniem paszy tradycyjnej i paszy genetycznie zmodyfikowanej wykazała, że badane wskaźniki zdrowia zwierząt, jakości produktów zwierzęcego pochodzenia czy przyswajania paszy w obu przypadkach nie różniły się w istotny sposób. Opublikowane wyniki innych doświadczeń z zastosowaniem roślin GM, wykazywały występowanie symptomów negatywnego wpływu GMO na zdrowie badanych zwierząt. Uzyskane dane wskazywały m.in., że białka Bt, w tym Cry1Ac, wywołują odpowiedź

immunologiczną w postaci alergii skórnych lub zwiększonego poziomu przeciwciał IgE i IgG. Zagrożenia związane z użytkowaniem roślin genetycznie zmodyfikowanych dotyczą również ich wpływu na organizmy inne niż docelowe lub stan środowiska naturalnego. Wielokrotnie rozważano również możliwość przekazywania genów pomiędzy różnymi rodzajami organizmów żywych, jednak dane wskazują że proces horizontalnego transferu genów jest niemożliwy lub wręcz nieprawdopodobny.

### **Wielkość powierzchni upraw roślin genetycznie zmodyfikowanych**

Pierwsze komercyjne uprawy roślin genetycznie zmodyfikowanych zarejestrowano w 1996 roku. Obserwowany od tego czasu wzrost areалу upraw GMO wynosi kilkanaście procent w skali roku. Powierzchnia upraw roślin transgenicznych według danych na rok 2019 (ostatnie dostępne dane organizacji ISAAA) wynosiła 190,4 mln ha (powierzchnia Polski 31,3 mln ha). Wśród krajów gdzie rośliny GM uprawia się powszechnie wymienić można USA (71,5 mln ha, 95% zakres adaptacji odmian GMO w uprawach trzech gatunków – soi, kukurydzy i rzepaku), Brazylię (52,8,1 mln ha, 94% adaptacji GMO), Argentynę (24 mln ha, około 100% adaptacji GMO), Kanadę (12,5 mln ha, około 90% adaptacji GMO) i Indie (11,9 mln ha, około 94% adaptacji GMO). Główne gatunki roślin GMO obejmują soję (91,9 mln ha, 48,2% areálu wszystkich upraw GMO na świecie), kukurydzę (60,9 mln ha, 32% areálu GMO), bawełnę (25,7 mln ha, 13,5% areálu GMO) i rzepak (10,1 mln ha, 5,3% areálu GMO). Państwa członkowskie Unii Europejskiej, na których terenie uprawia się rośliny transgeniczne to Hiszpania (107130 ha) i Portugalia (4753 ha) z uprawami zmodyfikowanej kukurydzy Bt linii MON810. Najczęściej stosowanymi roślinami GM są odmiany odporne na herbicydy, następnie odmiany posiadające dwie lub trzy skumulowane cechy oraz rośliny odporne na działanie szkodników.

### **Uregulowania prawne stosowania GMO w Polsce**

Uregulowania prawne związane ze stosowaniem GMO w Polsce wynikają nie tylko z krajowych aktów, ale również z ustawodawstwa Unii Europejskiej i umów międzynarodowych. Zasady stosowania GMO wewnątrz UE regulują dwa dokumenty,

a mianowicie Rozporządzenie 1829/2003/WE w sprawie zmodyfikowanej genetycznie żywności i paszy oraz Rozporządzenie 1830/2003/WE dotyczące możliwości śledzenia i etykietowania organizmów zmodyfikowanych genetycznie oraz możliwości śledzenia żywności i produktów paszowych wyprodukowanych z organizmów zmodyfikowanych genetycznie, zmieniające Dyrektywę 2001/18/WE.

Rozporządzenie 1829/2003/WE obowiązuje od 18 kwietnia 2004 i odnosi się do GMO przeznaczonego do użycia w postaci żywności i pasz zawierających, składających się lub wyprodukowanych z GMO. Zapisy tego rozporządzenia stanowią, że dopuszczenie do obrotu żywności lub pasz genetycznie zmodyfikowanych na rynek Wspólnoty możliwe jest jedynie po przeprowadzeniu oceny ryzyka dla ludzi, zwierząt i środowiska przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). Rozporządzenie to stanowi również podstawę prawną do ustanowienia i prowadzenia Wspólnotowego Rejestru genetycznie zmodyfikowanej żywności i pasz. Rozporządzenie to wprowadza również obowiązek etykietowania żywności i pasz, które zawierają, składają się lub zostały wyprodukowane z GMO w części równej lub większej 0,9% składników żywności rozpatrywanych odrębnie. Produktów zawierających jeden składnik GMO poniżej 0,9% obowiązek etykietowania nie dotyczy, pod warunkiem, że jego występowanie jest przypadkowe lub nieuniknione technicznie. Zaznaczyć należy, że na obszarze Unii Europejskiej dopuszczone są do obrotu tylko takie GMO, które zostały pozytywnie zaopiniowane przez Komisję Europejską, po uwzględnieniu wyników oceny ryzyka dokonanej przez EFSA. Produkty zawierające GMO niedopuszczone do stosowania na obszarze Wspólnoty, po stwierdzeniu faktu ich obecności, wycofywane są z obrotu rynkowego.

Zapisy Rozporządzenia 1830/2003 dotyczą stworzenia w produkcji i obrocie ram umożliwiających śledzenie produktów zawierających GMO oraz żywności i pasz z GMO w celu ułatwienia etykietowania, monitorowania ich wpływu na środowisko i zdrowie, a także umożliwienia skutecznego zarządzania ryzykiem, w tym usunięcia produktów z rynku.

Z punktu widzenia rynku paszowego kolejnym ważnym aktem prawa jest Rozporządzenie Komisji (UE) nr 619/2011 z dnia 24 czerwca 2011 r. ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli paszy pod kątem występowania materiału genetycznie zmodyfikowanego, dla którego procedura wydawania zezwolenia jest w toku lub dla którego zezwolenie wygasło. W związku z tym, że w ostatnim czasie coraz więcej nowych odmian GMO jest zgłaszanych do autoryzacji na terenie UE problem ten częściej będzie rozpatrywany w przypadku GMO, dla których zezwolenie jest w toku. Zapisy tego rozporządzenia dopuszczają zawartość GMO dla którego procedura wydawania zezwolenia jest w toku lub dla którego zezwolenie wygasło w partii paszy lub materiałów paszowych do poziomu 0,1% (m/m). Potrzeba opracowania takich zasad dla pasz wynika z postępującego, globalnego, wielkotowarowego obrotu materiałami paszowymi, w których coraz częściej znajdują się materiały pochodzące z upraw roślin zmodyfikowanych genetycznie. Obecność GMO w paszach importowanych do UE jest coraz trudniejsza do wyeliminowania lub ograniczenia i z tego względu dla ułatwienia międzynarodowego obrotu i handlu paszami zdecydowano się na zliberalizowanie przepisów w stosunku do tych odmian, które zostały wycofane lub posiadają pozytywną opinię EFSA i zostaną w przyszłości zarejestrowane w UE.

Pobieranie próbek do analiz w kierunku GMO opisuje Rozporządzenie Komisji (UE) Nr 691/2013 z dnia 19 lipca 2013 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 152/2009 w odniesieniu do metod pobierania próbek i dokonywania analiz.

Podstawowym polskim aktem prawnym regulującym sprawy organizmów genetycznie zmodyfikowanych jest ustawa z dnia 22 czerwca 2001 o organizmach genetycznie zmodyfikowanych, z późniejszymi zmianami. Zgodnie z zapisami Ustawy o GMO Minister Środowiska koordynuje wszystkie sprawy związane z GMO na terenie Rzeczypospolitej Polskiej, związane z: wydawaniem zgody na zamknięte użycie GMO; wydawaniem zgody na zamierzone uwolnienie GMO do środowiska; wydawaniem zezwoleń na wprowadzenie do obrotu produktów GMO; wydawaniem zezwoleń na wywóz lub tranzyt produktów GMO; koordynacją kontroli i monitorowaniem

działalności regulowanej ustawą; koordynowaniem gromadzenia i wymiany informacji dotyczących zapewnienia bezpieczeństwa ludzi i środowiska w zakresie GMO.

Działania Ministerstwa Środowiska w odniesieniu do GMO prowadzi Zespół ds. GMO przy Departamencie Ochrony Przyrody. Ponadto, przy Ministrze Środowiska działa Komisja opiniotwórczo-doradcza ds. GMO, która zajmuje się opiniowaniem wniosków w sprawach wydawania zgody lub zezwoleń, opinii, opiniowaniem aktów prawnych i polityki państwa dotyczących GMO. Kontrolę przestrzegania przepisów ustawy sprawują ponadto w podległym sobie zakresie:

- Państwowa Inspekcja Sanitarna,
- Państwowa Inspekcja Ochrony Roślin i Nasiennictwa,
- Inspekcja Ochrony Środowiska,
- Inspekcja Weterynaryjna,
- Inspekcja Handlowa,
- Państwowa Inspekcja Pracy,
- Służba Celna,
- Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych.

Uregulowania prawne dotyczące stosowania GMO w żywieniu zwierząt ujęte są w Ustawie z dnia 22 lipca 2006 o paszach. Zapisy ustawy o paszach mówią wyraźnie o zakazie wytwarzania, wprowadzania do obrotu i stosowania w żywieniu zwierząt pasz genetycznie zmodyfikowanych oraz organizmów genetycznie zmodyfikowanych przeznaczonych do użytku paszowego, po upływie dwóch lat od ogłoszenia treści ustawy. Z zapisów ustawy wynika również, że Inspekcja Weterynaryjna sprawuje nadzór nad wytwarzaniem, obrotem i stosowaniem organizmów genetycznie zmodyfikowanych przeznaczonych do użytku paszowego i pasz genetycznie zmodyfikowanych oraz nad transgranicznym przemieszczaniem organizmów genetycznie zmodyfikowanych przeznaczonych do użytku paszowego. Niezbędnym elementem takiego nadzoru są badania laboratoryjne pasz w kierunku obecności i zawartości organizmów genetycznie zmodyfikowanych.

W 2013 roku wydano na podstawie art. 104 ust. 9 Ustawy o nasiennictwie dwa rozporządzenia Rady Ministrów: w sprawie zakazu stosowania materiału siewnego odmian kukurydzy MON810 oraz w sprawie zakazu stosowania materiału siewnego ziemniaka Amflora. Te akty prawne nakładają na Państwową Inspekcję Ochrony Roślin i Nasiennictwa (PIORiN) nowe zadania polegające na sprawowaniu nadzoru nad stosowaniem materiału siewnego oraz sprawowanie kontroli przestrzegania zasad i obowiązujących wymagań w zakresie stosowania materiału siewnego.

Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi wprowadziło w 2020 roku Ustawę z dnia 13 czerwca 2019 roku o oznakowaniu produktów wytworzonych bez wykorzystania organizmów genetycznie zmodyfikowanych jako wolnych od tych organizmów. Reguluje ona stosowanie jednego znaku „bez GMO” na produktach, które mają swoje odpowiedniki w unijnym rejestrze GMO, lub „wyprodukowane bez GMO” na produktach żywnościowych pochodzenia zwierzęcego. Forma, kształt i treść znaku określona została w przepisach wraz z zasadami ich stosowania. Znakowanie takie podlega kontroli urzędowej, podobnie jak stosowanie obowiązkowego znakowania tych produktów, które zawierają GMO. Przyjęty w projekcie próg to zawartość do 0,9% GMO pod warunkiem, że jest to niezamierzone lub technicznie nieuniknione, czyli jest to podejście całkowicie zbieżne z systemem unijnym, gdzie o GMO również decyduje próg 0,9%. Projekt przewiduje również pewne wyjątki, jak enzymy, dodatki paszowe, materiały paszowe, leki weterynaryjne, które nie mają innych odpowiedników niż te produkowane z lub z wykorzystaniem GMO.

### **Metody wykrywania i oznaczania roślin genetycznie zmodyfikowanych**

Wykorzystywanie roślin genetycznie zmodyfikowanych w produkcji żywności i pasz oraz obowiązek znakowania takich produktów w krajach Unii Europejskiej wymaga stosowania metod pozwalających na wykrywanie i oznaczanie GMO. Wśród wielu technik wykorzystywanych do identyfikacji roślin transgenicznych wymienić można dwa wiodące kierunki badań. Są to metody oparte na wykrywaniu materiału

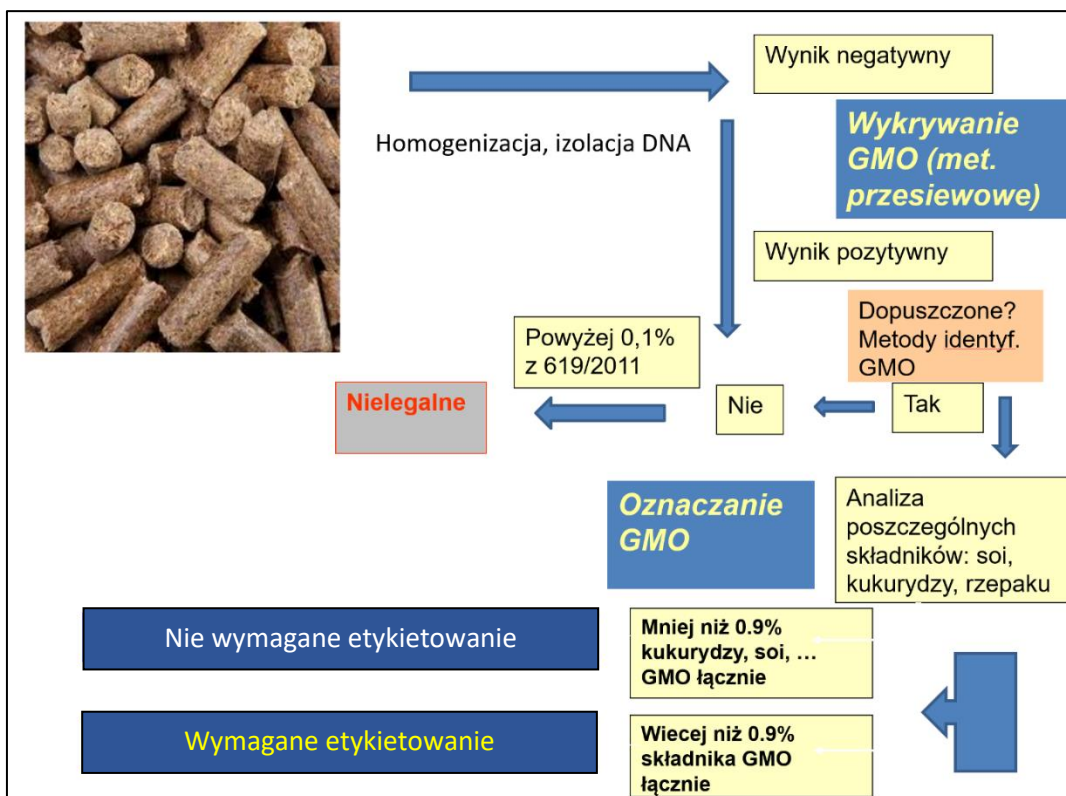
genetycznego w postaci kwasu deoksyrybonukleinowego – DNA poprzez reakcję łańcuchową polimerazy (PCR, z ang. polymerase chain reaction) oraz metody wykrywania nowych białek, kodowanych przez wprowadzone transgeny, za pomocą techniki ELISA. Inne techniki badawcze nie są powszechnie wykorzystywane w rutynowej kontroli żywności i pasz lub są jeszcze w fazie eksperymentalnych doświadczeń. Cały proces wykrywania lub oznaczania roślin genetycznie zmodyfikowanych w oparciu o analizę materiału genetycznego podzielić można na trzy etapy: ekstrakcji DNA, reakcji PCR lub PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) oraz potwierdzenie uzyskanych wyników poprzez analizę restrykcyjną, hybrydyzację Southern lub sekwencjonowanie.

### **Badania laboratoryjne – analiza i interpretacja wyników**

Interpretując wynik badań w kierunku GMO należy wziąć pod uwagę:

- Rodzaj stwierdzonych w próbce gatunków roślin, na podstawie składu lub wyników z badań w kierunku obecności genów referencyjnych dla poszczególnych gatunków roślin;
- Rodzaj stwierdzonych w próbce elementów charakterystycznych dla roślin zmodyfikowanych genetycznie na podstawie zastosowanych w tym kierunku metod przesiewowej detekcji GMO;
  - Rodzaj stwierdzonych modyfikacji genetycznych;
  - Zawartość poszczególnych GMO;
  - Niepewność metod;
  - Możliwą obecność tzw. „stacked GMO”.





Ryc. Schemat badań w kierunku wykrywania i oznaczania pasz GMO

Metody przesiewowej detekcji GMO obejmują powielanie w reakcji PCR sekwencji genów stosowanych często podczas modyfikacji genetycznych różnych gatunków roślin: sekwencji promotorów i terminatorów genów jak P35S, T-nos, pFMV, sekwencji genów właściwych *cry1Ac*, *cry1Ab*, *nptII*, *pat*, *bar*, czy konstruktów jak CTP2-CP4-EPSPS. Ideą prowadzenia takich badań jest stwierdzenie lub wykluczenie (z pewnym, dużym prawdopodobieństwem) obecności jakiegokolwiek GMO w próbce. Trudno jest natomiast stwierdzić całkowity brak obecności GMO, bo mogą być obecne organizmy genetycznie zmodyfikowane, które nie zawierają żadnej z sekwencji DNA obejmujących zastosowane metody przesiewowe, lub nieznanne, nieopisane linie GMO (idealnym przykładem jest papaja GM importowana do UE z Azji). Metody przesiewowej detekcji GMO oprócz identyfikacji GMO ukierunkowują kolejne badania na potwierdzenie lub wykluczenie występowania poszczególnych linii

GMO, w tym tych dozwolonych i niedozwolonych w UE i w Polsce. Pomocnym w tym zadaniu są bazy danych, programy komputerowe zawierające opisy sekwencji DNA wszystkich znanych GMO i wskazujące linie GMO mogące występować w badanym materiale.

Odmiany nieautoryzowane w UE podlegają wycofaniu z rynku, oprócz partii pasz, dla których zawartość materiału genetycznie zmodyfikowanego, dla którego procedura wydawania zezwolenia jest w toku lub dla którego zezwolenie wygasło, nie przekracza 0,1%, zgodnie z zapisami Rozp. 619/2011. Rejestr takich GMO prowadzony jest łącznie z rejestrem GMO na stronach internetowych Unii Europejskiej.

Zidentyfikowane linie GMO należy w dalszej kolejności oznaczyć ilościowo, najczęściej wynik podaje się, jako zawartość wyrażoną w procentach (%) masy genetycznie zmodyfikowanej w masie ogółem. Ze względu na charakterystykę metod wynik wskazujący na 56% zawartość soi GMO linii MON40-3-2 należy interpretować jako: 56% masy soi w próbce stanowi soja genetycznie zmodyfikowana linii MON40-3-2. Wszystkie wyniki oznaczeń ilościowych GMO odnoszą się do pojedynczego składnika rozumianego, jako gatunek rośliny: soja, kukurydza, rzepak itp.: 11% kukurydzy linii Bt11 i 43% kukurydzy linii MON810 to łącznie 54% kukurydzy GMO w próbce. Nie ma podstaw do sumowania zawartości GMO z różnych składników, czyli np. % GMO z rzepaku i kukurydzy. Natomiast sumuje się zawartość GMO z pojedynczego składnika i na tej podstawie dokonuje się analizy oraz interpretacji na potrzeby urzędowej kontroli. Przykładem może być mieszanka paszowa, w której w wyniku badań stwierdzono 0,7% soi MON40-3-2, 0,7% kukurydzy MON810 i 0,7% MON863. Rozpatrując poszczególne składniki mamy 0,7% soi GMO oraz 1,4% (0,7% + 0,7%) kukurydzy GMO. Zawartość kukurydzy przekracza próg legislacyjny 0,9% i taki produkt powinien być etykietowany lub opisany, jako zawierający kukurydzę genetycznie zmodyfikowaną. Sprawę komplikuje fakt, że mamy do czynienia z liniami MON810 i MON863, które mogą występować w próbce, jako dwa odrębne składniki mieszanki, lub jako linia tzw. stacked GMO MON810xMON863. W przypadku dwu odrębnych linii sumuje się ich zawartości i podaje % kukurydzy GMO (1,4%), natomiast

w przypadku linii stacked traktuje się ją jako pojedynczy GMO i zawartość kukurydzy GM w próbce należy interpretować jako 0,7% kukurydzy GMO. Niestety laboratorium nie jest w stanie stwierdzić czy są to linie pojedyncze czy linia stacked. Informację taką posiadać powinien rolnik uprawiający takie GMO i przekazywać ją dalej, natomiast tak najczęściej się nie dzieje, w wyniku ukrywania informacji o GMO lub w wyniku wymieszania tej partii ziaren kukurydzy wraz z innymi w trakcie przeładowywania, transportu i globalnego handlu towarami rolnymi. Problem linii stacked pozostaje jak dotąd nierozwiązany w kwestii badań laboratoryjnych. Pozostaje zatem posługiwać się tylko i wyłącznie opisem towarów z towarzyszącą im dokumentacją, szczególnie towarów importowanych z USA, Kanady, krajów Ameryki Południowej.

Podobny problem dotyczy zanieczyszczeń przez rośliny GMO partii pasz, czy materiałów paszowych, gdzie ich obecność jest przypadkowa lub niezamierzona. Często spotyka się zanieczyszczenia soją GMO ziarna kukurydzy wskutek przechowywania kukurydzy w silosie, w którym wcześniej składowana była śruta sojowa. Takie zanieczyszczenia coraz częściej odnotowywane są w dodatkach paszowych lub premiksach, gdzie obecność GMO jest pomijana, a w końcowym efekcie wyniki badań laboratoryjnych wskazują na stosowanie GMO. Trudno wtedy ustalić źródło pochodzenia GMO, a ponadto jest to najczęściej gatunek, którego obecność jest niezamierzona lub przypadkowa. Wyniki z badań wskazują w takich przypadkach zawartości GMO powyżej 100%, jednakże w odniesieniu do masy całkowitej próbki są to znikome ilości. Rozwiązaniem może być tutaj traktowanie takich przypadków jako zanieczyszczenie botaniczne, oznaczenie ich masy porównanie z masą próbki. Na tej podstawie podejmowane są decyzje administracyjne, czy należy stosować etykietowanie GMO, czy też nie. Zasadniczą wadą takiego rozwiązania jest problem z ustaleniem masy zanieczyszczeń, laboratoria GMO nie zajmują się zanieczyszczeniami botanicznymi i nie posiadają metodyki dla takiego rodzaju badań. Dodatkowo w zdecydowanej większości przypadków nie jest możliwe określenie dokładnej masy zanieczyszczeń, a doskonałym przykładem jest

gotowa mieszanka paszowa, gdzie większość składników jest w bardzo dużym stopniu rozdrobniona, nie do odróżnienia, czy mamy do czynienia z soją czy kukurydzą.

## **Podsumowanie**

Kontrola stosowania i prawidłowego oznakowywania produktów wytworzonych lub składających się z roślin genetycznie zmodyfikowanych nie jest zagadnieniem łatwym. Istnieje szereg problemów natury metodycznej, które komplikują znacząco dokładne i rzetelne określanie zawartości GMO w badanych próbkach. Dodatkowym problemem są stosowane obecnie krzyżówki odmian GMO, wykorzystywane dotąd jako pojedyncze modyfikacje, co komplikuje prawidłowe rozpoznanie i oznaczenie zawartości GMO. Innym problemem jest postępujące zanieczyszczenie partii towarów przez odmiany GM, związane z globalizacją handlu i dominacją wielkich międzynarodowych korporacji.

