

# Virginiamycin, valamint virginiamycin és furazolidon egymás melletti meghatározása állat-tápszerekben

ŐSZ JÓZSEFNÉ

Országos Takarmányozási és Állattenyésztési Felügyelőség Laboratóriumi Központ, Budapest

Érkezett: 1981. március 5.

Az intenzív hústermelés iránt támasztott követelmények szükségessé teszik, hogy az állatok optimális teljesítményük eléréséhez biológiailag aktív anyagokat, vitaminokat, antibiotikumokat, kokcidiosztatikumokat, stb. is kapjanak.

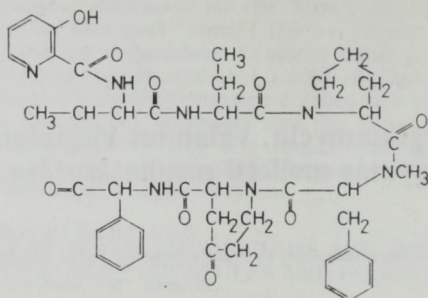
Az állategészségügyi és a takarmányellenőrző hatóságok évről évre felülvizsgálják azokat az antibiotikumokat, és kokcidiosztatikumokat, amelyek a takarmányokba preventív és nutritív céllal bedolgozhatók. A különböző hazai és külföldi előírások figyelembevételével megszabják, hogy milyen fajtájú állatnak, melyik nevelési és hizlalási fázisban, milyen dózisban alkalmazhatók ezek az anyagok. Közegészségügyi szempontból rendkívül fontos, hogy használatuk esetén az élelmezés-egészségügyi várakozási időt – általában 7 napot – betartsák valamint azt is, hogy az esetleg kialakuló rezisztencia elkerülése végett, mikor kell leváltani azokat.

Az új antibiotikumok és kokcidiosztatikumok bevezetésével egyidőben gondoskodni kell ezen anyagok kimutatási módszereinek kidolgozásáról is. Ez a munka egyre bonyolultabbá, egyre sokrétűbbé válik, mivel egyidejűleg kell rendszeresen ellenőrizni a már kitiltott és az újonnan bevezetett medikátumokat is. Célunk minél egyszerűbb és pontosabb vizsgálati módszerek kidolgozása. Ezeknek az eljárásoknak tartalmi elemei bizonyára hasznosíthatók lesznek az exportra kerülő hús-alapú termékek antibiotikumtartalmának ellenőrzésénél is. (1) Magyarországon az elmúlt 20 esztendőben a takarmányokhoz közel 10 féle antibiotikumot és megközelítőleg ugyanannyi kokcidiosztatikumot használtak fel, legnagyobb volumennel oxytetracyclint és cinkbacitracint. Dolgozatomban a virginiamycin, valamint a virginiamycin és furazolidon együttes vizsgálatával kapcsolatos tapasztalataimról számolok be.

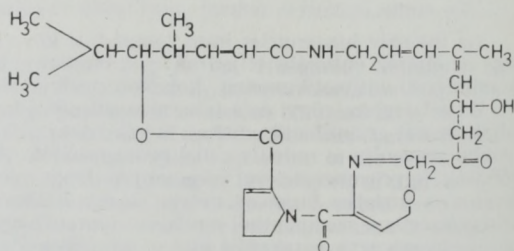
## Vizsgálati anyag és módszer

A virginiamycint *De Somer* fedezte fel. Belgium különböző helyeiről származó talajminták szisztematikus vizsgálatával izolálták először. A virginiamycin lényegesen különbözik azoktól az antibiotikumoktól, amelyeket hozamnövelő szerként eddig használtak. Két antibiotikum molekula keverékéből áll, amelyet ugyanaz a *Str. virginiae* nevű gomba termel. Ez a két faktor a következő: M faktor egy makrociklikus lacton, amelyet *Micrococcus aureus* elleni aktivitásáról neveztek el és S faktor, amely szerkezetileg egy ciklikus polipeptid, és a *Sarcina lutea* elleni gátló hatásáról kapta nevét. (2)

M faktor:  $C_{28}H_{35}N_3O_7$



S faktor:  $C_{43}H_{49}N_7O_{10}$



Kétfajta borjútápszert vontam be a vizsgálatba, az egyik 60 mg/kg virginiamycint, a másik 60 mg/kg virginiamycin mellett 50 mg/kg furazolidont is tartalmazott. Belső standardként olyan medikátum mentes tápszereket használtam, melyekhez a fentiekben leírt dózisokat adagoltam.

A vizsgálat menete – az anyag feltárása, mikrobiológiai értékmérés és kiértékelés – megegyezik a takarmányok furazolidon tartalmának vizsgálatánál ismertetett eljárással, ehhez csak az attól eltérő részletek ismertetésére térek ki. (3). 20 g takarmányt 20 cm<sup>3</sup> oldószerral alaposan eldörzsölünk, majd 100 cm<sup>3</sup>-es mérőlombikba bemossuk, 30 percig rázatjuk, utána szűrjük, majd dekantáljuk és hígítási sort készítünk belőle. Ezeket referencia standard és belső standard oldatok megfelelő hígításaihoz hasonlítjuk. A referencia standard oldatot a következőképpen készítjük:

52,6 mg referencia standardot (Smith Animal Health Products) 100 cm<sup>3</sup> 96%-os etanolban oldunk. Az eredetileg 190%-os standardból így kapunk 1000 µg/cm<sup>3</sup> törzsoldatot, amely 4 C<sup>o</sup>-on 1 hónapig tárolható.

380 összehasonlító vizsgálatot végeztem annak megállapítására, hogy a takarmányok mikrobiológiai értékmérésénél használt tesztorganizmusok közül melyek alkalmasak virginiamycin meghatározásra. A gyártó cég által kiadott technikai eljárás szerint ugyanis a *Corynebacterium xerosis* NCTC 9755 az értékmérés tesztmikroorganizmusa, mely rendkívül érzékeny, de fenntartása igen körülményes.

A vizsgálatokat az AOAC Method előírása szerint DIFCO táptalajokon (Antibiotikum-Medium 1, 2, 3) és speciális flavomycin táptalajon (Hoechst) végeztem.

Tesztmikroorganizmusok		Alkalmazási táptalajterület	
Micrococcus flavus	ATCC 1024 O . . . . .	Cinkbacitracin	Antibiotikum Medium 1.
Sarcina lutea	ATCC 9341 . . . . .	Oleandomycin	Antibiotikum Medium 3.
Staphylococcus aureus	ATCC 6538 P . . . . .	Flavomycin	Speciális flavomycin
Bacillus subtilis	ATCC 6633 . . . . .	Furazolidon	Antibiotikum Medium 2.

A virginiamycin feltárására 3 oldószert próbáltam ki, dimetilformamidot, mint a furazolidon oldószert, 50%-os vizes metanolt, mint általános oldószert és a 20%-os etanolt, melyet szakirodalom alapján vontam be a vizsgálatokba. (4).

Előzetes vizsgálataim ugyanis igazolták *Ragheb* megállapításait, miszerint 20 cm<sup>3</sup> etanol 100 cm<sup>3</sup>-re kiegészített pH 6 PBS eleggyel a borjútápszerekből 98,9–100,2%-ban extrahálja a virginiamycint.

Vizsgálataim másik részét egy olyan módszer kidolgozása képezte, mely lehetővé teszi a virginiamycin és furazolidon meghatározását ugyanabból a diklórmetános oldatból. Ez esetben a virginiamycin kvantitatív értékmérése *Micrococcus flavus* ATCC 1024 teszt baktériummal inokulált Antibiotikum Medium 1. (Difco) táptalajon, a furazolidoné pedig *Bacillus subtilis* ATCC 6633 teszt baktériummal inokulált Antibiotikum Medium 2. (Difco) táptalajon történik egyidejűleg, agar-diffúziós módszerrel. Ilyen jellegű közlemény, tudomásom szerint, a szakirodalomban még nem jelent meg.

### Eredmények és következtetések

Az alábbi táblázatokban, a szemléletesség kedvéért, a belső standardok gátlás zónáinak átmérőit tüntettem fel.

2. táblázat

Virginiamycin okozta gátlási zónák átmérője mm-ben

Oldószert	Tesztmikroorganizmusok							
	M. flavus		Sarc. lutea		Staph. aureus		Bac. subtilis	
	mikrogramm/cm <sup>3</sup> virginiamycin							
	1	2	1	2	1	2	1	2
Diklórmetán .	20,2	22,9	20,1	22,8	16,5*	19,0*	15,5–17,1*	18,2*
Metanol . . . . .	17,3	20,1	17,5	20,3	17,1*	19,5*	15,1–17,2*	17,9*
Etanol . . . . .	20,1	22,8	20,2	22,9	18,2*	20,8*	15,3–17,4*	18,1*

\* = gyűrűk nem élesek, lyukak körül diffúz felisztulás.

Virginiamycin + furazolidon által okozott gátlási zónák átmérője mm-ben

Oldószer	Tesztmikroorganizmusok							
	M. flavus		Sarc. lutea		Staph. aureus		Bac. subtilis	
	mikrogramm/cm <sup>3</sup> virginiamycin							
	1	2	1	2	1	2	1	2
Diklórmetán . . . . .	20,2	23,0	20,2	23,1	16,4*	19,1*	19,8–20,1*	22,3*
Metanol . . . . .	23,2	25,4	23,0	25,7	16,5*	19,3*	19,7–20,3*	22,4*
Etanol . . . . .	23,1	25,2	23,2	25,3	16,7*	19,5*	19,0–19,6*	21,5*

\* = gyűrűk nem élesek, lyukak körül diffúz feltisztulás.

A furazolidon okozta gátlási zónák átmérőjét külön táblázatban gyűjtöttem össze.

4. táblázat

Furazolidon okozta gátlási zónák átmérője mm-ben

Oldószer	Tesztmikroorganizmusok							
	M. flavus		Sarc. lutea		Staph. aureus		Bac. subtilis	
	mikrogramm/cm <sup>3</sup> furazolidon							
	1	2	1	2	1	2	1	2
Diklórmetán . . . . .	—	—	—	—	*	16,1*	20,0	22,3
Metanol . . . . .	—	—	—	—	*	17,1*	19,9	22,1
Etanol . . . . .	—	—	—	—	*	17,0*	19,7	22,3

\* = gyűrűk nem élesek, lyukak körül diffúz feltisztulás.

#### Következtetések:

1. A virginiamycin mikrobiológiai értékmérésére a *Micrococcus flavus* és a *Sarcina lutea* egyaránt jól alkalmazható. A világos, tiszta gátlási zóna jól elhatárolódik a táptalaj többi részétől. (2. táblázat)

2. A *Staphylococcus aureus* nem alkalmas virginiamycin értékmérésére, mivel a gátlási gyűrűk nem élesek, így leolvasásuk bizonytalan.

*Bacillus subtilis*vel inokulált táptalajban virginiamycin hatására kettős gyűrűk alakulnak ki, a belső gyűrűk élesek, a külsők diffúzak, elmosódott szélűek, tehát az eredmények nehezen értékelhetők (2. táblázat).

3. A virginiamycin legjobb oldószere az etanol és vele egyenértékű a diklórmetán. Vizsgálataim szerint utóbbit különösen akkor célszerű alkalmazni, amikor a takarmány furazolidont is tartalmaz. A diklórmetánnal feltárt oldatból egyidejűleg *Sarcina lutea*val és *Bacillus subtilis*vel inokulált lemezekben a furazolidon értékmérése, valamint a virginiamycin meghatározása is elvégezhető, ezáltal a vizsgálatok ideje jelentősen lerövidül. A *Micrococcus flavus* vagy *Sarcina lutea* tesztorganizmussal készített táptalajon a furazolidon nem zavarja a virginiamycin kimutatását. (4. táblázat)

4. A virginiamycin + furazolidon tartalmú borjútápszerek metanolos és etanolos feltárása nagyobb gátlási átméreteket eredményezett, mint amit a diklórmetános extrahálással kaptunk. (3. táblázat)

Feltételezhető, hogy szinergens hatás érvényesül, ennek bizonyítása azonban további kutatásokat igényel.

- (1) Simorffy Z., Horváthné J. E. és Vidáné P. B.: ÉVIKE, 23, 80, 1977.  
 (2) Oskley R. G.: A virginiamycin tulajdonságai. Smith Kline Animal Health Products Philadelphia. Symposium előadás anyaga, 1977.  
 (3) Ósz J.-né: Takarmányok furazolidon és nitrofurazon tartalmának vizsgálata. ÉVIKE, [25, 85, 1979.  
 (4) Ragheb H. S. és m.t.sai: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62, 3, 1979.

## СМЕЖНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРГИНИЯМИЦИНА И ВИРГИНИЯМИЦИН И ФУРАЗОЛИДОНА В ПИЩЕВЫХ КОНЦЕНТРАТАХ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Й. Ёс

На основании проведенных 380 сравнительных исследований автор установил, что для микробиологической оценки ВИРГИНИЯМИЦИНА самым подходящим является тесторганизм Микрококкус флавус ATCC 1024 и Сарцина лутеа ATCC 9341.

В качестве растворителя самым лучшим является дихлорметан и 20 см<sup>3</sup> этанол содержащий раствор PBSc pH – 6.

Автор разработали метод для определения ВИРГИНИЯМИЦИНА и ФУРАЗОЛИДОНА из вещества вышелаченного с дисхорметаном.

## NACHWEIS VON VIRGINIAMYCIN, FERNER VON VIRGINIAMYCIN UND FURAZOLIDON IN GEGENWART VON BEIDEN VERBINDUNGEN IN NÄHRMITTELN FÜR TIERE

J. Ósz

Es wurde auf Grund von 380 vergleichenden Untersuchungen bestätigt, dass zur mikrobiologischen Wertmessung des Virginiamycins die Testorganismen *Micrococcus flavus* ATCC 1024 und *Sarcina lutea* ATCC 9341 die günstigsten sind. Dichlormethan und eine 20 cm<sup>3</sup> Äthanol enthaltende PbS-Lösung vom pH 6 waren die geeignetsten Lösungsmittel. Es wurde eine Methode entwickelt, die die Bestimmung des Virginiamycins und Furazolidons in Gegenwart von beiden Verbindungen im Untersuchungs-material nach dem Aufschluss mittels Dichlormethan ermöglicht.

## DETECTION OF VIRGINIAMYCIN AND OF VIRGINIAMYCIN AND FURAZOLIDONE IN THE PRESENCE OF EACH OTHER IN NUTRIMENTS FOR ANIMALS

J. Ósz

It was found on the basis of 380 comparative investigations that the test organisms *Micrococcus flavus* ATCC 1024 and *Sarcina lutea* ATCC 9341 represent for the microbiological evaluation of virginiamycin the most suitable organisms. As a solvent dichloromethane and a PbS solution containing 20 cm<sup>3</sup> ethanol and adjusted to pH 6 proved the most appropriate. A method was developed for the determination of virginiamycin and furazolidone in the presence of each other in the investigated sample after its treatment with dichloromethane.